



Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
Vicedirección de Microbiología
Laboratorio Nacional de Referencia
de TB, Lepra y Micobacterias

**Virulencia, inmunogenicidad y
protección conferida por la vacunación
con *Mycobacterium 'habana'* en un
modelo murino de tuberculosis**

Tesis en opción al grado de
Doctor en Ciencias de la Salud

Lic. Iliana del Carmen Valdés Hernández, M.C.

La Habana
2014

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Vicedirección de Microbiología
Departamento Bacteriología-Micología
Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias

**Virulencia, inmunogenicidad y protección conferida
por la vacunación con *Mycobacterium 'habana'* en un
modelo murino de tuberculosis**

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud

Autora: Lic. Iliana del Carmen Valdés Hernández, M.C.

Tutores: Dr. Rogelio Hernández-Pando, Dr.C.
Dr. Armando Acosta Domínguez, Dr.C.

La Habana
2014

A la memoria del Prof. José Antonio Valdivia

A mis padres e hijo, razones de sobra para mi existencia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida, por despertar cada mañana y ser congruente con mis propósitos, por ponerme delante a personas que han sido mi soporte y compañía en circunstancias personales y profesionales.

A mis tutores, los que están y los que no... Al Dr. Hernández-Pando, por permitir apropiarme de una parte de su vasto arsenal de conocimientos y materializar este trabajo desde la idea inicial hasta lo que es hoy esta Tesis. Al Prof. Armando Acosta, por adoptarme en las etapas finales, aportar ideas y sugerencias oportunas. Por confiar en mí y en nuestro trabajo. Su humildad, sencillez y sabiduría dejaron una impronta en mi vida profesional. Me encantaría seguir trabajando con ustedes.

A mi hijo por representar mi futuro y mi felicidad. Te he inculcado mi constancia y me has premiado con tu cariño y frescura. Disculpa si en los últimos tiempos has visto en esta tesis mi prioridad..., no es así, TÚ siempre serás mi máxima prioridad.

A mis padres y abuela, por haberme dado la libertad de elegir este camino, por ser mis mayores consejeros. Por enseñarme a pensar y a tomar decisiones con madurez y responsabilidad y sentir siempre su confianza. A toda mi familia por verme siempre como un ejemplo.

A mis amigas Dihadenys, Tere y Gilda, hemos crecido y aprendido juntas, no solo profesionalmente sino más allá,... lo que significa el respaldo de una verdadera amistad.

A Migue, porque es nuestra mayor alegría en el Lab. y también nuestro termómetro. Su pasión por lo que hace nos contagia y llena de entusiasmo. A todo el personal del LNR-TBLM por el apoyo brindado durante todos estos años.

Al IPK, sus profesores y queridísimos compañeros de trabajo, que me enseñaron a cuestionar, a dudar y a soñar. Al personal de Patología Experimental del INCMNSZ: Brenda, Dulce, Don Leo y Jorge, por compartir los buenos momentos y los que no lo fueron tanto. Jorge, todavía conservo aquel papelito donde me escribiste, en un momento de desesperación: "Lo demás, es lo de menos...".

A mi familia mexicana (Martica, Roberto, Robertico, Nelly, Célida, Mamá Mely y Chave), quienes me brindaron todo el apoyo y me demostraron, mientras estuve lejos de casa, que la soledad no existe.

A Yane y Edua...Ustedes dijeron que podía estudiar en Mayabeque y me lo creí... Gracias por ayudarme a equilibrar mi cerebro con música, dominó y playa y esas otras cosas que te llenan el alma.

A Manue y su familia, que en tan poco tiempo me ha acogido como suya. Llegaste justo en el momento que más lo necesitaba.....Te quiero mucho

A todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de este trabajo, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

La autora

SÍNTESIS

La vacunación con el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) protege solo contra la tuberculosis grave de la infancia, lo cual plantea un reto en la búsqueda de alternativas profilácticas. Teniendo en cuenta el antecedente protector de *Mycobacterium 'habana'* contra la tuberculosis experimental y la posibilidad de contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias, del Instituto "Pedro Kourí" (IPK), con una colección autóctona de esta micobacteria, nos propusimos determinar la virulencia, inmunogenicidad y protección, de tres cepas de *M. 'habana'* como candidato vacunal contra la tuberculosis. La infección intratraqueal de ratones, con *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337 permitió un 100% de sobrevida, escasos daños pulmonares y la expresión de factores inmunoprotectores contra *M. tuberculosis*. En cambio, *M. 'habana'* IPK-220 mostró una menor atenuación, y se descartó del experimento de vacunación. Las cepas IPK-337 y TMC 5135 manifestaron ser más inmunogénicas que BCG, en respuesta a antígenos relevantes de *M. tuberculosis* e iguales de seguras que esta, cuando se aplicaron en un modelo animal inmunodeficiente, resultados que permitieron continuar hacia el experimento de protección. La vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 impidió la progresión a enfermedad, luego del reto con *M. tuberculosis*, en niveles similares a BCG. Estos resultados garantizan la continuidad de este candidato hacia etapas posteriores del desarrollo preclínico.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAR	Ácido-alcohol resistencia
ADC	Albúmina-Dextrosa-Catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag85	Antígeno 85
APC, de sus siglas en inglés	Células presentadoras de antígenos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC, de sus siglas en inglés	Colección Americana de Cultivos Tipo
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BCGr	BCG recombinante
BCG Phipps	BCG subcepa Filadelfia
BSL, de sus siglas en inglés	Nivel de bioseguridad
BSC, de sus siglas en inglés	Cabina de seguridad biológica
CD	Clúster de diferenciación
CFA, de sus siglas en inglés	Antígenos solubles
CFP, de sus siglas en inglés	Proteína del filtrado de cultivo
ConA	Concanavalina A
CTL, de sus siglas en inglés	Linfocitos T citotóxicos
DAF	Diacetato de fluoreceína
DC, de sus siglas en inglés	Célula dendrítica
DIM, de sus siglas en inglés	Tiocerol dimicoceratos
DS	Desviación estándar
DOTS, de sus siglas en inglés	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
E/C	Índice de estimulación antigénica
ESAT-6, de sus siglas en inglés	Antígeno de secreción temprana (6 kDa) estimulador de células T
FDA, de sus siglas en inglés	Agencia de administración de alimentos y medicamentos (Estados Unidos)

GAPDH, de sus siglas en inglés	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GPL	Glicopeptidolípidos
HSP, de sus siglas en inglés	Proteína de choque térmico
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
IMC	Inmunidad mediada por células
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (México)
iNOS, de sus siglas en inglés	Óxido nítrico sintasa inducible
IPK	Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
i.t.	Intratraqueal
LAM	Lipoarabinomanano
LNR-TBLM	Laboratorio Nacional de Referencia de TB, Lepra y Micobacterias
MAN	Manosa
<i>mce</i> , de sus siglas en inglés	Entrada a las células de mamíferos
MDR	Multidrogorresistente
MHC, de sus siglas en inglés	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MR, de sus siglas en inglés	Receptores de manosa
M ϕ	Macrófagos
NO	Oxido nítrico
OADC	Ácido oleico-Albúmina-Dextrosa-Catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS, de sus siglas en inglés	Tampón Salina-Fosfato
PCR, de sus siglas en inglés	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	Posinfección
PNC	Programa Nacional de Control
PPD	Prueba de intradermoreacción a la tuberculina
p.r.	Posreto
p.v.	Posvacunación
RD	Región de Diferencia
RNI, de sus siglas en inglés	Intermediarios reactivos del nitrógeno
ROI, de sus siglas en inglés	Intermediarios reactivos del oxígeno
RPMI, de sus siglas en inglés	Instituto "Roswell Park Memorial"
SOD	Superóxido dismutasa
SS	Solución salina
T.A.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculosis
Th, de sus siglas en inglés	Células T cooperadoras

TLR, de sus siglas en inglés	Receptores tipo <i>Toll</i>
TMC, de sus siglas en inglés	Colección Trudeau para Micobacterias
TNF- α , de sus siglas en inglés	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR, de sus siglas en inglés	Extremadamente resistente
ZN	Ziehl-Neelsen.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Introducción	2
I.2. Hipótesis	4
I.3. Objetivos	5
I.4. Novedad científica	5
I.5. Valor Teórico	5
I.6. Valor Práctico	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
II.1. Situación Mundial de la TB	8
II.2. Hacia la eliminación de la TB en Cuba	8
II.3. Etiopatogenia de la TB	9
II.3.1. Cronología de eventos en la patogénesis de TB	11
II.4. Respuesta inmune a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	13
II.4.1 Respuesta inmune innata	13
II.4.1.1. Reconocimiento de <i>M. tuberculosis</i> por las células del hospedero: El primer encuentro	13
II.4.1.2. Mecanismos microbicidas de los Mφ	15
II.4.2. Inmunidad adaptativa: Paradigma Th1/Th2	17
II.4.2.1 Restricción MHC y estimulación de células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ ..	18
II.4.2.2 Mecanismos efectores de la respuesta adaptativa mediada por células	19

II.4.3.	Papel de las células T reguladoras en la persistencia o latencia de <i>M. tuberculosis</i>	20
II.5.	Infección latente por <i>M. tuberculosis</i>	22
II.6.	Mecanismos de evasión de la respuesta inmune desarrollados por <i>M. tuberculosis</i>	23
II.7.	Vacunas contra la TB	24
II.7.1.	BCG	24
II.7.2.	Desarrollo de nuevos candidatos vacunales contra la TB	25
II.7.2.1.	Vacunas de ADN	26
II.7.2.2.	Vacunas de subunidades	27
II.7.2.3.	Vacunas vivas atenuadas	28
II.7.2.3.1.	Mejoramiento de BCG a través de métodos de recombinación	28
II.7.2.3.2.	Empleo de cepas mutantes de <i>M. tuberculosis</i>	29
II.7.2.3.3.	MNT como inmunógenos contra la TB	30
II.8.	<i>M. 'habana'</i>	30
II.8.1.	Potencial inmunogénico de <i>M. 'habana'</i> en la infección tuberculosa experimental	31
II.8.2.	Protección conferida por <i>M. 'habana'</i> en la lepra experimental y humana	32
II.9.	Un puente entre las investigaciones in vitro y los estudios en humanos: Modelos animales en el desarrollo preclínico de candidatos vacunales contra la TB	34
II.9.1.	Ratones	34
II.9.2.	Cobayos	35
II.9.3.	Primates no humanos	36
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
III.1.	Determinación de la virulencia de cepas de <i>M. 'habana'</i> en un modelo experimental de TB pulmonar progresiva	39
III.1.1	Obtención del inóculo bacteriano	39
III.1.2.	Infección experimental	40
III.1.3.	Eutanasia y obtención del tejido pulmonar	40
III.1.4.	Determinación de la carga bacilar en los pulmones de ratones	

	infectados	40
III.1.5.	Análisis morfométrico automatizado del tejido pulmonar de ratones infectados	41
III.1.6.	Análisis de la expresión pulmonar de citoquinas y de la enzima iNOS	42
III.1.6.1	Aislamiento del ARN mensajero de los pulmones de los ratones infectados	42
III.1.6.2.	Transcripción reversa del ARNm	42
III.1.6.3.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para el análisis de citoquinas e iNOS en los pulmones de los ratones infectados.	42
III.2.	Inmunogenicidad y biodistribución de cepas vivas de <i>M. 'habana'</i> empleadas como vacunas en ratones BALB/c	44
III.2.1.	Preparación del inóculo	44
III.2.2.	Inmunización y eutanasia de los ratones	44
III.2.3.	Preparación de las suspensiones celulares	44
III.2.4.	Estimulación celular	45
III.2.5.	Producción de IFN- γ	45
III.2.5.1.	Determinación del tiempo óptimo de exposición antigénica de los cultivos celulares provenientes de los ratones vacunados con <i>M. 'habana'</i>	45
III.2.5.2.	Producción de IFN- γ en los órganos de los ratones vacunados con ' <i>M. habana'</i> '	46
III.2.6.	Determinación de la capacidad de multiplicación y diseminación bacilar a diferentes órganos en los ratones vacunados con <i>M. 'habana'</i>	46
III.3.	Análisis de la seguridad de cepas de <i>M. 'habana'</i> empleada como vacuna viva en ratones inmunodeficientes.	46
III.4.	Protección conferida por la vacunación con cepas vivas de <i>M. 'habana'</i> en ratones BALB/c tras el reto con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	47
III.5.	Análisis estadístico	47
III.6.	Normas de Bioseguridad.	48
III.7.	Consideraciones éticas en el uso de animales de laboratorio	48
IV.	RESULTADOS	50
IV.1.	Virulencia de cepas de <i>M. 'habana'</i> en un modelo experimental de TB	51

	pulmonar progresiva	
IV.2.	Inmunogenicidad y biodistribución de cepas vivas de <i>M. 'habana'</i> empleadas como vacunas en ratones BALB/c '	58
IV.2.1	Tiempo óptimo de exposición antigénica de los cultivos celulares provenientes de los ratones vacunados con <i>M. habana'</i> TMC 5135.	58
IV.2.2	Inmunogenicidad inducida por la vacunación con <i>M. 'habana'</i> TMC 5135 e IPK-337.	60
IV.2.3	Biodistribución de las cepas <i>M. 'habana'</i> TMC 5135 e IPK-337 empleadas como vacuna subcutánea en ratones BALB/c	62
IV.3.	Seguridad de la vacunación con cepas de <i>M. 'habana'</i> empleadas como vacuna viva en ratones inmunodeficientes.	63
IV.4.	Protección conferida por la vacunación con cepas vivas de ' <i>M. habana'</i> en ratones BALB/c tras el reto con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	64
V.	DISCUSIÓN	68
V.1.	Virulencia de cepas de <i>M. 'habana'</i> en un modelo experimental de TB pulmonar progresiva	70
V.2.	Inmunogenicidad y biodistribución de cepas vivas de <i>M. 'habana'</i> empleadas como vacuna subcutánea en ratones BALB/c.	81
V.3.	Seguridad de la vacunación con cepas vivas de <i>M. 'habana'</i> en animales inmunodeficientes	87
V.4.	Protección conferida por ' <i>M. habana'</i> tras el reto con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	88
V.5.	Consideraciones Generales.	91
VI.	CONCLUSIONES	94
VII.	RECOMENDACIONES	97
VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
VIII.1	Referencias Bibliográficas Consultadas	100
VIII.2	Producción Científica de la autora relacionada con el tema de la Tesis....	116
VIII.3.	Producción Científica de la autora no relacionada con el tema de la Tesis	119

ANEXOS

Anexo 1. Descripción de los medios de cultivo

- Anexo 2. Preparación de soluciones
- Anexo 3. Protocolo para el conteo bacteriano con DAF
- Anexo 4. Diagrama de flujo para el aislamiento y purificación del ARNm a partir de tejidos animales empleando el estuche comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Anexo 5. Protocolo para la transcripción reversa del ARNm empleando el juego de reactivos comercial Omniscript (Qiagen, Inc)
- Anexo 6. Protocolo del PCR en tiempo real para el análisis de citoquinas e iNOS empleando el estuche Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen)
- Anexo 7. Protocolo para la realización del ELISA de cuantificación de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo celulares.
- Anexo 8. Aval de aprobación del Comité de Investigación en animales del INCMNSZ. Registro CINVA 190

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

Más de cinco décadas han transcurrido desde la introducción de drogas potencialmente eficaces contra la Tuberculosis (TB) en los Programas Nacionales de Control (PNC). Sin embargo, esta enfermedad continúa siendo un problema de salud a escala mundial encontrándose como la segunda causa de muerte entre las enfermedades infecciosas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó, al cierre de 2012, la aparición de 8,6 millones de casos nuevos y 1,3 millones de muertes. A estas cifras se le añade que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, la emergencia de cepas multidrogorresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) y el incremento de la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), presentándose un nuevo escenario para el manejo y control de esta enfermedad (WHO, 2013).

El Bacilo Calmette-Guérin (BCG) es la única vacuna disponible para prevenir la TB. Su introducción se produjo en el año 1921 y desde 1974 la OMS la incluyó en su Programa Extendido de Inmunización. En la actualidad se estima la administración de más de tres mil millones de dosis, lo cual la convierte en la vacuna más utilizada en humanos. El uso de BCG tiene como ventajas su bajo costo y amplio historial de seguridad, a lo que se añade una eficacia protectora mayor del 80% en las formas graves de la enfermedad en la infancia, entre las que se encuentran la TB meníngea y miliar. En contraste, las evidencias de protección contra la TB pulmonar en adolescentes y adultos son en

extremo variables y se reporta un rango de eficacia entre el cero y el 80% (Liu et al., 2009).

Se han propuesto múltiples hipótesis para explicar dicha variabilidad, entre las que se incluyen las diferencias entre las cepas vacunales empleadas, la exposición diferencial de las poblaciones a las micobacterias ambientales, así como las características genéticas y nutricionales de las mismas, entre otras. Estas explicaciones no son mutuamente excluyentes y todas pudieran contribuir a la heterogeneidad de la eficacia vacunal (Liu et al., 2009; Ho et al., 2010).

El desarrollo de vacunas contra aquellos patógenos cuyo control depende de la inmunidad celular constituye un reto probado y TB no es la excepción. La propia historia natural de esta enfermedad resulta la primera limitante para la búsqueda de una única solución capaz de prevenir la infección, la latencia y/o reactivación (Ottenhoff & Kaufmann, 2012). Por esta razón se ha experimentado un incremento significativo en las investigaciones de nuevos candidatos vacunales, en los últimos 20 años. Estos comprenden desde las vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN), las de subunidades, aquellas que emplean cepas de BCG recombinantes (BCGr) hasta las vacunas vivas atenuadas obtenidas a partir de la inducción de mutaciones en genes que codifican para importantes factores de virulencia de *M. tuberculosis* o mediante el uso de micobacterias no tuberculosas (MNT) (van Helden & Hoal, 2013).

Las vacunas vivas constituyen potentes estimuladores de la respuesta inmune protectora contra la TB. Su principal ventaja radica en la expresión de todo el arsenal de antígenos micobacterianos y la capacidad de estos de estimular combinaciones de diferentes poblaciones de células T. El principal obstáculo en el desarrollo de este tipo de inmunógeno radica en lograr un nivel razonable de atenuación de las cepas sin afectar su inmunogenicidad. Algunas MNT como *Mycobacterium indicus pranii* (*Mycobacterium w*) (Gupta et al., 2009) y *Mycobacterium vaccae* se han convertido en blanco de las investigaciones en el desarrollo de nuevas vacunas (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

Mycobacterium 'habana' se aisló por primera vez en Cuba, por Valdivia, Suárez & Echemendía (1971), a partir de esputos provenientes de pacientes con enfermedad

pulmonar indistinguible de una TB. A pesar de que su perfil bioquímico y serológico es similar al de *Mycobacterium simiae* serotipo I (Meissner & Schröder, 1975) existen diferencias antigénicas (Mederos et al., 1998) e inmunogénicas (Gupta et al., 1979) que permanecen sin explicación, por lo que en la literatura se mantiene la denominación *M. 'habana'* para aquellos aislamientos originales de Cuba (Mederos, Valdivia & Valero-Guillén, 2008).

Diversos estudios experimentales apuntan a que la vacunación de modelos experimentales con *M. 'habana'* TMC (del inglés, *Trudeau Mycobacterium Collection*) 5135 confiere protección contra la infección por *M. tuberculosis* (Gupta et al., 1979), *Mycobacterium ulcerans* (Singh et al., 1981), *Mycobacterium leprae* (Singh et al., 1989) y *Leishmania donovani* (Anuradha et al., 1995). A pesar de estos hallazgos relevantes, poco se conoce acerca de la virulencia, la respuesta inmunogénica y la seguridad de la aplicación de *M. 'habana'* como vacuna en modelos animales apropiados para el estudio de estas variables.

Los antecedentes del uso experimental de esta micobacteria como inmunógeno frente a la TB, así como poder contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de TB, Lepra y Micobacterias (LNR-TBLM) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), con más de 30 cepas de *M. 'habana'* motivaron el análisis de la virulencia, inmunogenicidad y protección conferida por *M. 'habana'* en respuesta a la TB murina experimental. La demostración de la atenuación de *M. 'habana'* en diferentes modelos animales, así como el aporte de evidencias que relacionen la vacunación con esta micobacteria con la activación de una respuesta inmune relacionada con la protección frente al reto con *M. tuberculosis*, permitirán la evaluación preclínica posterior de *M. 'habana'* como candidato vacunal contra la TB.

I.2. Hipótesis

La vacunación experimental con cepas vivas de *M. 'habana'* es segura y genera una respuesta protectora en un modelo murino de TB pulmonar progresiva.

I.3. Objetivos

Objetivo general

- Determinar el potencial vacunal de *M. 'habana'* contra la TB experimental.

Objetivos específicos

1. Evaluar la virulencia de *M. 'habana'* empleando un modelo de TB pulmonar progresiva.
2. Determinar la inmunogenicidad y la biodistribución de diferentes dosis de cepas vivas de *M. 'habana'* en ratones BALB/c.
3. Comparar la seguridad de la administración de las dosis más inmunogénicas de cepas vivas de *M. 'habana'* con la seguridad de la vacunación con BCG en ratones inmunodeficientes.
4. Evaluar la protección conferida por la vacunación con *M. 'habana'* durante el reto experimental con *M. tuberculosis*.

I.4. Novedad Científica

Se demuestra la seguridad, inmunogenicidad y protección que confieren múltiples cepas de *M. 'habana'* frente a la TB experimental, con el empleo de nuevos modelos animales, el uso de técnicas morfométricas automatizadas y la determinación de factores inmunológicos, no antes descritos en la infección por este agente. La introducción del reto intratraqueal (i.t.) con *M. tuberculosis* supone una novedad con respecto a los estudios previos que explotan el reto endovenoso con este agente, permitiendo simular la vía natural que emplea este patógeno para producir la infección.

I.5. Valor Teórico

Se aportan nuevos conocimientos acerca de la biología y la respuesta inmune a *M. 'habana'*, entre los que se encuentran:

- Se sugiere la atenuación natural de cepas de *M. 'habana'* en un modelo murino de TB pulmonar progresiva y la seguridad de la vacunación con las mismas en comparación con BCG, tras inmunizar animales inmunodeficientes.
- Se estudia, por primera vez, la inducción de respuesta inmune cruzada, tras la vacunación con *M. 'habana'*, contra antígenos relevantes para la protección frente a *M. tuberculosis*, la cual superó a la promovida por la vacunación con BCG.
- Se sugiere la ausencia de los genes que codifican para el antígeno de secreción temprana (6 kDa) estimulador de células T (ESAT-6, del inglés *6 kDa Early Secreted Antigenic Target*) en cepas de *M. 'habana'*.
- Se demuestra que la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135, detiene la progresión de la TB murina experimental, de la misma forma que BCG.

I.6. Valor Práctico

Se cierra una primera etapa en la evaluación de la seguridad, inmunogenicidad y protección conferida por *M. 'habana'* como inmunógeno vivo contra la TB; de acuerdo al flujograma de la Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drugs Administration*) lo que permite el avance a etapas posteriores del desarrollo preclínico de nuevos candidatos vacunales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Situación Mundial de la TB

Una década después de que la OMS declarara a la TB como una emergencia sanitaria mundial, esta enfermedad se reafirma como un crítico problema de salud de difícil manejo, control y erradicación. La TB constituye la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas, luego de la infección por el VIH. Los últimos estimados de la OMS revelan una elevada incidencia con la aparición de casi nueve millones de casos nuevos y 1,3 millones de defunciones por esta causa (320 000 entre pacientes VIH positivos). A este difícil panorama se añade el hecho de que un tercio de la población mundial se encuentra infectada, de forma latente, con *M. tuberculosis*, condición que presupone un importante reto para la erradicación de la enfermedad (WHO, 2013).

II.2. Hacia la eliminación de la TB en Cuba

El PNC-TB en Cuba se inició en el año 1962 y se ha caracterizado por cinco etapas que transitan desde el tratamiento dispensarial con ingreso sanatorial, la implementación del tratamiento ambulatorio controlado en 1971, la adopción en 1982 del esquema acortado estrictamente supervisado (DOTS, del inglés *Directly Observed Treatment Short-Course*) con el uso de rifampicina en la primera fase; en 1987, el uso de esta droga en ambas fases; hasta la introducción, en 1997, de acciones específicas para reducir la fuente de infección en los contactos de casos de TB pulmonar con baciloscopía positiva (Marrero et al., 2009).

En el año 2009, luego de 48 años del funcionamiento ininterrumpido y exitoso del PNC-TB en Cuba, se establece la etapa de eliminación de esta enfermedad en el país (< 5 x 100 000 habitantes). Esta cuenta con indiscutibles ventajas, entre las que se encuentran: La voluntad política, la presencia de un Sistema Nacional de Salud potente con una extensa red de servicios gratuitos, un PNC fortalecido con una red nacional de laboratorios microbiológicos, la estrategia DOTS, la baja incidencia de casos nuevos y recaídas y muy baja frecuencia de circulación de cepas de *M. tuberculosis* MDR y XDR, así como un control estricto de la coinfección VIH-TB, todo esto desarrollado en un marco de participación social y comunitaria (González & Armas, 2012).

II.3. Etiopatogenia de la TB

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa producida por cualquiera de las cinco especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis*, propiamente dicho, produce más del 99% de los casos de enfermedad en el mundo. *Mycobacterium bovis*, causa enfermedad fundamentalmente en animales, y puede tener una importancia relativa en aquellos lugares donde se consume leche cruda o sin pasteurizar; *Mycobacterium africanum*, muy similar a *M. tuberculosis*, se relaciona con enfermedad en el África Occidental; *Mycobacterium microti*, que causa la enfermedad en roedores y es responsable de casos aislados de TB en el hombre y el de más reciente inclusión, *Mycobacterium caneti* (Caminero, 2006).

M. tuberculosis pertenece al orden Actinomycetales, a la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Rastogi, Legrand & Sola, 2001), al cual pertenecen otras casi 100 especies, conocidas como MNT. Todas ellas resultan menos virulentas pero muy resistentes a los fármacos antituberculosos, y son capaces de producir enfermedad, sobre todo en individuos inmunodeficientes (Caminero, 2006).

Muchas son las características intrínsecas de *M. tuberculosis* que permiten su diferenciación del resto de las bacterias, sin embargo, ninguna tan importante como la presencia de una pared celular muy rica en lípidos (Figura 1), particularmente en ácidos micólicos. Estos son los principales responsables de sus propiedades de ácido-alcohol

resistencia (AAR), fundamento en que se basa la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN), que se emplea para su identificación. Adicionalmente, la pared micobacteriana, le confiere resistencia a las agresiones externas, incluyendo a la mayoría de los antimicrobianos (Brennan & Crick, 2007).

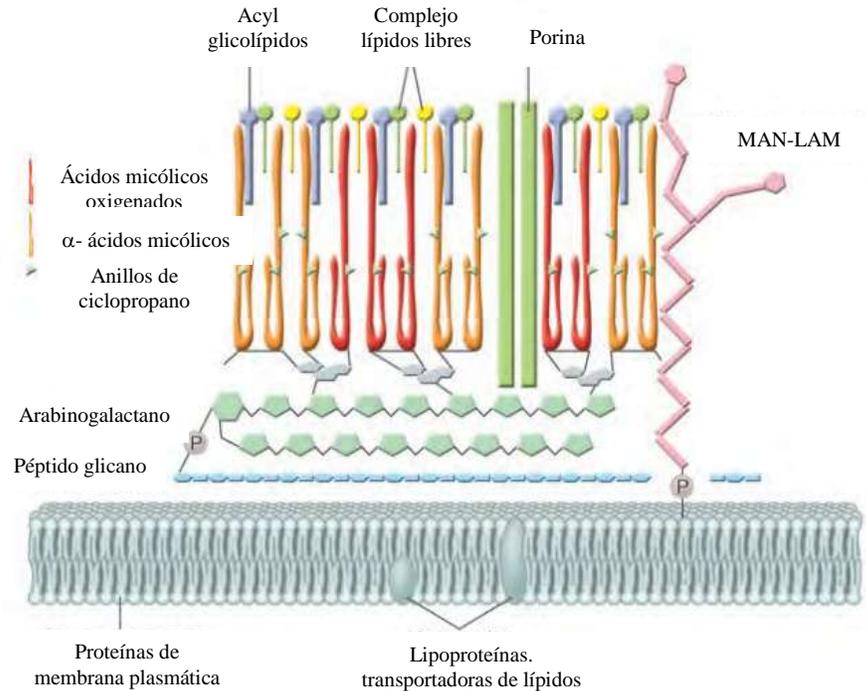


Figura 1. Esquema general de la pared celular de *M. tuberculosis*. Adaptado de Brennan & Crick 2007

M. tuberculosis es aerobio estricto, por lo que su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Parece existir una interdependencia entre la disposición anatómica de la enfermedad y la tensión de oxígeno disponible en la zona, lo cual explica la propensión al progreso de la enfermedad en los lóbulos pulmonares superiores, a partir de las siembras posprimarias. En cualquier caso, las condiciones ideales de multiplicación del bacilo las encuentra a un pH de 7,4 y a una presión de oxígeno entre 100 y 140 mm de Hg. Sin embargo, aún bajo estas condiciones, su multiplicación es muy lenta, oscilando entre las 14 y 24 h (Caminero, 2010).

II.3.1. Cronología de eventos en la patogénesis de TB

Posterior a su entrada al pulmón, *M. tuberculosis*, sostiene una serie de encuentros con diferentes mecanismos inmunes del hospedero. El resultado final de la infección depende del balance entre el crecimiento y la muerte de *M. tuberculosis* y entre la extensión de la necrosis/fibrosis en el tejido y la regeneración.

La primera fase comienza con la inhalación de *M. tuberculosis*. Los bacilos se transmiten desde un paciente con TB pulmonar a través de pequeñas gotas de secreciones respiratorias y saliva aerosolizadas por la tos, el estornudo o el habla, las que permanecen suspendidas en el aire durante períodos prolongados. La infección ocurre por la confluencia de factores exógenos como el contacto con un paciente infectante y su duración, el grado de intimidad con el mismo, la infectividad de la fuente y el ambiente donde se produce (García, Sarmiento & Acosta, 2009).

La llegada de *M. tuberculosis* hasta el espacio alveolar significa que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio superior. En este escenario los macrófagos (M ϕ), fagocitan los bacilos y, habitualmente, los destruyen. El proceso de muerte bacteriana depende de las características microbicidas intrínsecas de los fagocitos del hospedero y de los factores de virulencia del microorganismo. Los bacilos dotados de mecanismos de escape a los efectos bactericidas iniciales, se multiplican y salen de los M ϕ . Cuando esto ocurre, los monocitos sanguíneos y otras células inflamatorias resultan atraídos hacia el sitio de infección (Segunda fase). Estos monocitos se diferencian en M ϕ , fagocitando rápidamente los bacilos pero sin destruirlos. En esta fase simbiótica se produce el crecimiento logarítmico de *M. tuberculosis* y la acumulación de M ϕ derivados de monocitos sanguíneos, sin embargo el daño que se detecta en el tejido es mínimo (Dheda et al., 2010).

Entre las 2-3 semanas posteriores, se desarrolla la inmunidad de células T, con el arribo al sitio de infección de linfocitos T antígeno-específicos, los cuales proliferan en el interior de la lesión temprana y luego activan a los M ϕ , para la eliminación de las bacterias intracelulares. Seguidamente a esta fase, se detiene el crecimiento logarítmico del bacilo (tercera fase).

La necrosis sólida central presente en las lesiones primarias inhibe el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis* y como resultado la infección se convierte en estacionaria o latente. La enfermedad puede progresar y producirse una diseminación hematógena inmediatamente después de la infección primaria o en los meses o años posteriores (TB posprimaria), bajo condiciones de fallo en la vigilancia inmunológica. En este proceso, la licuefacción del *caseum*, provee de condiciones excelentes para el crecimiento extracelular de las micobacterias. La formación de cavidades puede conllevar a la ruptura de los bronquios cercanos, permitiendo que el bacilo se disemine, a través de las vías respiratorias, a otros sitios del pulmón y al ambiente exterior (Figura 2) (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002; Dheda et al., 2010).

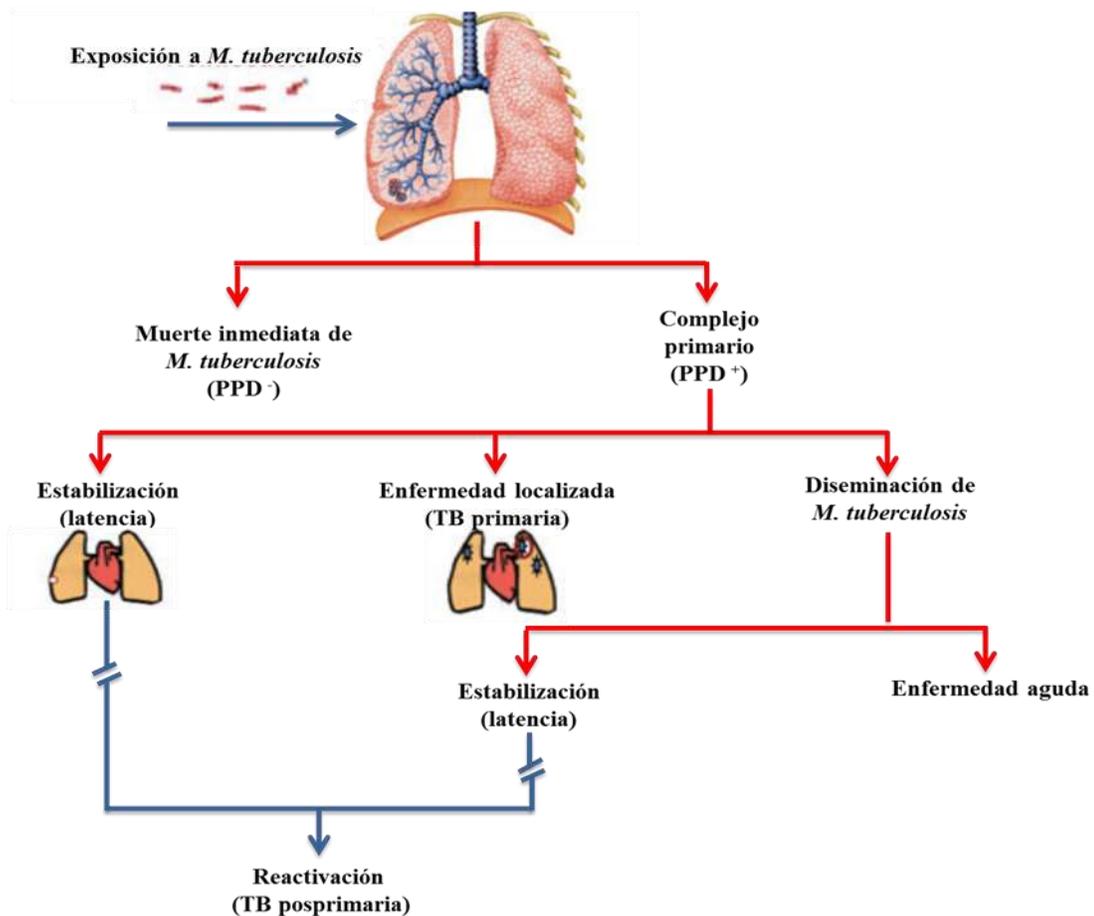


Figura 2. Espectro de la infección por *M. tuberculosis* y su ciclo de vida. Adaptado de van Crevel, Ottenhoff & van der Meer (2002); Dheda et al. (2010).

II.4. Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*

II.4.1. Respuesta inmune innata

A pesar de que la información disponible acerca de los mecanismos de la inmunidad innata a *M. tuberculosis* es incompleta, estos resultan esenciales para limitar el crecimiento bacteriano en la fase inicial de la infección. Tan temprano como en 1964, Lurie demostró que los conejos genéticamente susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* mostraban 20 veces mayor número de bacilos en los siete días posteriores a la infección, que los genéticamente resistentes. Estos hallazgos fueron indicativos del papel protector de la respuesta innata, una vez que se conoce que la respuesta de células T no controla el crecimiento bacilar en estadios tan tempranos (Lurie, 1964). Posteriores a este descubrimiento, estudios genéticos poblacionales, así como la demostración de que contactos intradomiciliarios de pacientes con TB permanecen saludables y negativos a la prueba de intradermoreacción a la tuberculina (PPD), sugieren el efecto de factores genéticos relacionados con la inmunidad innata en el control de la infección (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002).

II.4.1.1 Reconocimiento de *M. tuberculosis* por las células del hospedero: El primer encuentro

La función central del M ϕ en la TB se encuentra sólidamente establecida sobre la base de estudios histológicos en modelos animales. En este punto, los M ϕ actúan como la primera barrera de defensa a la infección y, de forma paradójica, como el centro de replicación de la misma, contribuyendo posteriormente a su diseminación (Pieters, 2008).

La superficie micobacteriana es altamente compleja, lo que le permite interactuar con diversos receptores de los M ϕ residentes, confiriéndole una gran capacidad de adaptación a la vida intracelular (Trejo et al., 2003; Pieters, 2008). El primero y más crítico de los pasos asociados a la entrada de *M. tuberculosis*, es la adhesión del patógeno a la superficie de las células del hospedero. Seguido de este primer encuentro, las células dendríticas (DC, del inglés *Dendritic Cell*) y los M ϕ derivados de monocitos,

también forman parte del proceso fagocítico (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002).

La endocitosis de *M. tuberculosis* involucra diferentes receptores en las células fagocíticas, los cuales pueden unirse a las bacterias no opsonizadas o reconocer opsoninas unidas a la superficie bacteriana (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002). Sin embargo, los receptores mejor caracterizados son aquellos que median la fagocitosis independiente de opsoninas, entre los que se encuentran los receptores de manosa (MR, del inglés *Manose Receptor*).

Existen evidencias de que la interacción entre *M. tuberculosis* y los M ϕ humanos se produce a través del reconocimiento de los residuos de manosa (MAN) unidos al lipoarabinomanano (LAM) de la pared celular bacteriana. Por otra parte se reconoce su papel mediador en la transferencia de LAM a los compartimentos endocíticos para facilitar la presentación antigénica de los ácidos micólicos y antígenos lipoglicanos a través de las moléculas del clúster de diferenciación (CD) 1, a las células T (Dheda et al., 2010).

Cuando la internalización por MR se encuentra bloqueada, los M ϕ pueden fagocitar a las micobacterias a través de los receptores de desecho (del inglés, *Scavenger*) (Schäfer et al., 2009). De igual forma, los receptores de la fracción cristalizable (Fc) de la inmunoglobulina (Ig) G, pueden reconocer a las micobacterias opsonizadas, favoreciendo la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI, del inglés *Reactive-Oxygen Intermediates*) y la fusión fagosoma-lisosoma (Herrera-Barrios et al., 2005).

Paralelamente a estos mecanismos de reconocimiento micobacteriano, los M ϕ y las DC emplean los receptores tipo *Toll* (TLR, del inglés *Toll-like Receptor*). Estas son proteínas filogenéticamente conservadas capaces de unirse a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés *Patogen-Associated Molecular Pattern*), resultando en la activación de factores nucleares de transcripción. Estos regulan la producción, por los M ϕ , de citoquinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras

responsables de la activación del sistema inmune (Montaño & Chávez, 2008; Kawai & Akira, 2010).

Como podemos apreciar existen múltiples mecanismos involucrados en el reconocimiento e internalización de *M. tuberculosis*. La mayoría de ellos dilucidados a partir de experimentos in vitro y su importancia relativa in vivo permanece sin esclarecer. Las diferentes rutas de entrada de *M. tuberculosis* pueden marcar la diferencia en la transducción de las señales, la activación inmune y la supervivencia intracelular de este patógeno (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002).

II.4.1.2. Mecanismos microbicidas de los M ϕ

Los M ϕ están diseñados para la eliminación de los patógenos, a través de una plétora de mecanismos microbicidas presentes en el interior de los fagosomas. Estos se forman luego de procesos seriados de invaginación de membrana, crecimiento y fusión. La estructura resultante experimenta una sucesión de eventos de fusión con la vía endocítica, lo que se conoce como maduración fagosomal, adquiriendo propiedades antimicrobianas (Koul et al., 2004).

Entre los principales mecanismos microbicidas presentes en el fagosoma maduro se incluyen la acidificación de su medio interno, la producción de péptidos antimicrobianos, la activación de las enzimas NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*) (Welin & Lerm, 2012). La iNOS se expresa en varios tipos celulares, incluyendo M ϕ , neutrófilos, células epiteliales y hepatocitos y produce cantidades excesivas de óxido nítrico (NO) durante los procesos de infección, inflamación o en estados de estimulación fisiológica. Su síntesis ocurre a través de una reacción enzimática de dos pasos, a partir de una molécula de L-arginina obtenida de forma exógena (alimentación), de fuentes endógenas (degradación de proteínas) y, en menor medida, a través de la síntesis de *novo* (a partir de la acción de la enzima arginosuccinato sintasa renal, empleando como sustrato la citrulina) (Chul-Su, Jae-Min & Eun-Kyeong, 2009).

Las citoquinas del tipo Th1 (del inglés *T helper*): interferón gamma (IFN- γ), interleuquina (IL) 1 β y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*) estimulan la expresión de iNOS por los M ϕ ; mientras que, cuando estas células se encuentran bajo la influencia de citoquinas del perfil Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13), ocurre la depleción de la arginina, por las arginasas (Chul-Su, Jae-Min & Eun-Kyeong, 2009).

El NO es uno de los muchos intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI, del inglés *Reactive Nitrogen Intermediates*) con actividad antimicrobiana. Presenta funciones pleiotrópicas en los procesos patofisiológicos, entre las que se incluyen la modificación del ADN, los lípidos y las proteínas bacterianas. Particularmente, el NO, puede desaminar y dañar directamente el ADN de las micobacterias generando sitios abásicos y rotura de cadenas. Otro de los mecanismos microbicidas incluye la interacción con blancos específicos en las proteínas accesorias, resultando en la inactivación de enzimas y/o el mal funcionamiento de las mismas (Nathan, 2002).

La importancia de los mecanismos, antes señalados, en la protección contra la TB, está ampliamente demostrada en modelos murinos. Los ratones *knock-out* para iNOS o los modelos animales inmunodeficientes infectados con *M. tuberculosis* presentan un riesgo significativamente mayor de que ocurra diseminación microbiana y muerte, al compararlos con grupos controles (Chul-Su, Jae-Min & Eun-Kyeong, 2009).

En contraste con los modelos murinos de TB, existe controversia alrededor del papel del NO en la muerte o inhibición de *M. tuberculosis* en humanos. Se ha demostrado que la inhibición temprana del crecimiento micobacteriano en M ϕ alveolares humanos es independiente del NO (Azad, Sadee & Schlesinger, 2012). No obstante, un creciente cuerpo de evidencias sugiere que su producción por los monocitos/ M ϕ humanos, líneas celulares de M ϕ y células epiteliales, infectadas con *M. tuberculosis*, inducen actividad bacteriostática contra este agente, por lo que no se excluye su participación en los mecanismos de defensa del hospedero (Liu & Modlin, 2008; Chul-Su, Jae-Min & Eun-Kyeong, 2009).

El material generado en estos procesos degradativos, se distribuye a través del tráfico de vesículas a la ruta de presentación, donde los fragmentos antigénicos se unen a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) clase II. Estas transportan los antígenos micobacterianos hacia la superficie celular donde se reconocen por los receptores $\alpha\beta+$ de las células T $CD4^+$, las cuales producen citoquinas del tipo Th1, como el IFN- γ . Este proceso está reconocido como el elemento más importante en la protección contra *M. tuberculosis* (Pieters, 2008) y la razón que explica la elevada ocurrencia de la coinfección VIH-TB, en los cuales este mecanismo no resulta funcional (Douek, Roederer & Koup, 2009).

La IL-12, producida por las células presentadoras profesionales (APC, del inglés *Antigen-Presenting Cells*), $M\phi$ o DC, es la mayor inductora de la polarización de las células Th1, mientras que la diferenciación celular Th2 ocurre en ausencia de esta citoquina y se sustenta en la producción de IL-4. La importancia de la IL-12, en el control de la infección por *M. tuberculosis* se ha comprobado a través del uso de ratones deficientes del gen-IL-12p40. Cuando estos animales se infectan, muestran una carga bacteriana elevada y una disminución del tiempo de sobrevida en relación con los ratones del grupo control, lo cual se explica por una reducción sustancial en la producción de IFN- γ . En los humanos, la presencia de mutaciones en los genes IL-12p40 o en el receptor de IL-12 se traduce en una disminución en la producción de IFN- γ por las células T y en un aumento en la susceptibilidad a la diseminación de BCG y a las infecciones por *Mycobacterium avium* (Kaufmann, 2010).

II.4.2. Inmunidad adaptativa: Paradigma Th1/Th2

Tradicionalmente se considera que la inmunidad mediada por células (IMC) es la responsable de ofrecer una protección elevada contra la infección por *M. tuberculosis*. Este concepto se basa en el paradigma clásico Th1/Th2, el cual apoya la hipótesis de que frente a los patógenos intracelulares se desarrolla exclusivamente una respuesta inmune celular, de tipo Th1, mientras que frente a los patógenos extracelulares se desarrolla una respuesta inmune humoral, de tipo Th2. Sin embargo, en la actualidad es ampliamente aceptado que no existe una respuesta exclusiva de un tipo u otro frente a los patógenos,

sino que se establece una combinación de ambas, donde una suele prevalecer sobre la otra (Dheda et al., 2010).

II.4.2.1 Restricción MHC y estimulación de células T CD4⁺ y CD8⁺

El fagosoma es el sitio intracelular de residencia y procesamiento de *M. tuberculosis* y esto explica la profunda estimulación de las células T CD4⁺, durante la TB. Los antígenos procesados en los compartimentos fagosomales pueden cargarse rápidamente en las moléculas del MHC II, responsables de la estimulación de dicha subpoblación linfocitaria. No obstante, las células T CD8⁺ también son estimuladas, probablemente a través de dos mecanismos que no resultan excluyentes. Primero, los antígenos producidos por *M. tuberculosis* pueden alcanzar el citosol, donde se cargan en el surco del MHC I. Segundo, los Mφ infectados con *M. tuberculosis* pueden sufrir apoptosis, fenómeno que conlleva a la formación de vesículas cargadas con antígenos micobacterianos. Estas son fagocitadas por APC ubicadas en su vecindad y luego presentados los antígenos, en contexto MHC I y II, promoviendo la estimulación de células T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente (Figura 3) (Kaufmann, 2010).

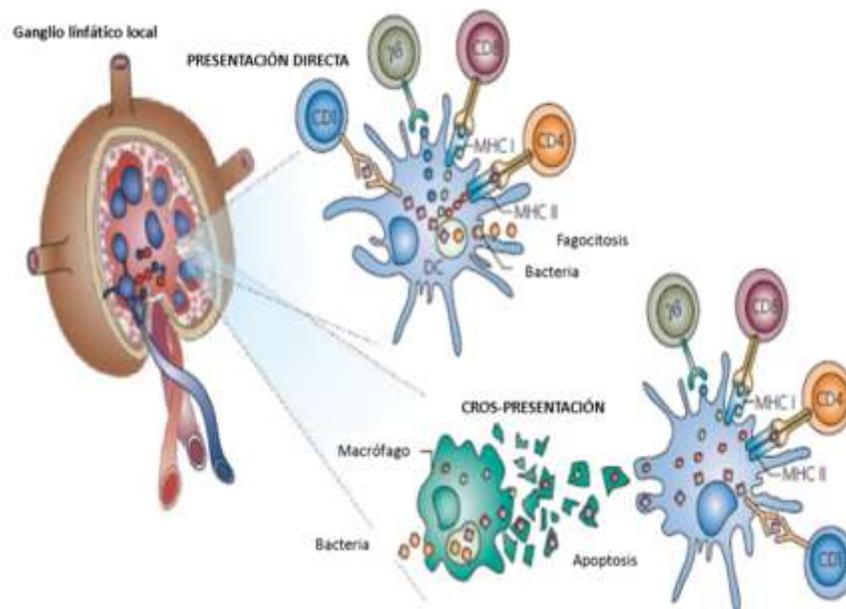


Figura 3. Presentación antigénica efectuada por APC a diferentes subpoblaciones de células T: Presentación directa y cros-presentación. Adaptado de Kaufmann (2007)

El reconocimiento antigénico de las subpoblaciones de células T no convencionales, no se encuentra restringido al contexto MHC. Algunos glicolípidos micobacterianos se presentan en contexto CD1, a una subpoblación de células T restringida a CD1, todas ellas dotadas de receptores con combinaciones de cadenas α/β . Un receptor alternativo de células T, compuesto por cadenas γ/δ reconocen antígenos no proteicos ricos en fosfatos, sin necesidad de que estos se presenten en el contexto de una molécula conocida (Meraviglia et al., 2011).

II.4.2.2 Mecanismos efectores de la respuesta adaptativa mediada por células

Cuando ocurre la presentación de los antígenos micobacterianos a las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, estas se expanden y migran de regreso a los pulmones y luego, a través del tejido pulmonar, hacia el foco de infección, presumiblemente en respuesta a señales quimiotácticas producidas por las células infectadas o en respuesta a estas (Cooper & Khader, 2008).

Las células T $CD4^+$ median el control del crecimiento bacteriano a través de la liberación de $IFN-\gamma$, citoquina responsable de la activación de los $M\phi$ infectados. Esta vía de control se basa en datos experimentales que muestran que el correlato primario del control bacteriano es la expresión, en los pulmones, del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para esta citoquina y que el arribo de las células T $CD4^+$ antígeno-específicas, ocurre a la misma vez que el cese del crecimiento bacteriano en este órgano (Cooper & Khader, 2008).

Las células Th1 producen, además, $TNF-\alpha$, IL-2, linfotoxina y factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos, los cuales promueven la rápida estimulación de las células Th1, de los linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *Cytotoxic T Lymphocytes*) y la maduración y activación tanto de los $M\phi$, como de los granulocitos (Dheda et al., 2010)

Existen evidencias concluyentes de que la combinación de $TNF-\alpha$ con $IFN-\gamma$, induce la actividad antimicrobiana en $M\phi$, a través de la inducción de RNI. En concordancia, los ratones deficientes de $TNF-\alpha$ producen cantidades insuficientes de estos radicales

durante la TB y fracasan en el control de la infección. Otras de las funciones principales del TNF- α abarcan, el reclutamiento de monocitos y linfocitos T circulantes hacia el sitio de infección y la modulación de la migración de linfocitos B. Los mecanismos por los cuales el TNF- α dirige la migración leucocitaria incluyen su acción sobre el endotelio y la capacidad de establecer gradientes para las quimiocinas, a través de la inducción en la expresión de sus ligandos (Stenger, 2005).

Por otra parte, los CTL secretan moléculas efectoras con bioactividad perforadora de membranas (perforinas y granulinas), encargadas de lisar las células diana. Para la TB, estas moléculas tienen una importancia relevante ya que pueden destruir al bacilo, incluso cuando se encuentra presente en el interior de las células del hospedero (Stenger, 2005).

La migración de los diferentes tipos de células mencionadas anteriormente, hacia el sitio de infección culmina en la formación del granuloma, característica que distingue a la TB. Este está formado, mayoritariamente, por M ϕ , células epitelioides y células gigantes multinucleadas (también conocidas como células gigantes de Langhans), rodeadas de una corona de linfocitos T (Silva et al., 2012). La proporción relativa de los diferentes tipos celulares varía según el estadio del granuloma y su función principal se relaciona con la segregación de la bacteria, en el interior de esta estructura, apartándola del resto del tejido pulmonar y limitando su diseminación. Además, los granulomas funcionan como un microambiente inmune que facilita la interacción entre las células T, los M ϕ y las citoquinas. Sin embargo, esta estructura, también provee de un nicho para la supervivencia de *M. tuberculosis* por extensos períodos, ya que algunas bacterias pueden evadir su eliminación dentro de los granulomas, entrando en un estado conocido como latencia (Lugo-Villarino et al., 2013).

II.4.3. Papel de las células T reguladoras en el equilibrio de la respuesta inmune, la persistencia o latencia de *M. tuberculosis*

Además de la activación de las células T que proveen de funciones efectoras protectoras, *M. tuberculosis* también induce la activación y expansión de poblaciones de células T

reguladoras (Treg). Estas abarcan desde aquellas mayoritariamente reactivas, que se presentan de forma natural y que muestran un fenotipo CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, las Treg CD4⁺ inducidas de manera específica por un antígeno y las Treg CD8⁺, de reciente identificación en la respuesta inmune humana a las micobacterias. Las Treg presentan múltiples efectos inhibitorios, entre los que se encuentran: La supresión directa de las células T CD4⁺ a través de la secreción de IL-10, CCL4, o la expresión del factor transformador del crecimiento β (TGF- β); la desactivación de las APC y por consiguiente la inhibición de la respuesta de las células T CD4⁺; y la inhibición del influjo de estas en los ganglios linfáticos y/o el bloqueo de su proliferación y expansión, lo que resulta en un retardo o impedimento para el inicio de la respuesta inmune adaptativa a *M. tuberculosis* (Singh et al., 2012).

Una multitud de células y mecanismos interconectados están involucrados en la respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*, incluyendo funciones activadoras/efectoras e inhibidoras/reguladoras. El balance de la respuesta y su habilidad para eliminar de manera efectiva las células diana infectadas con *M. tuberculosis* dicta cómo la respuesta del hospedero permitirá controlar la infección y la posible erradicación bacteriana o como la infección pudiera progresar con un incremento en el número de bacterias, el daño pulmonar y la transmisión de *M. tuberculosis* a nuevos hospederos susceptibles. *M. tuberculosis* es el moderador principal de los circuitos inmunes regulatorios. Este induce una fuerte respuesta de Treg CD4⁺ y CD8⁺ que suprime la respuesta Th1 y Th17. La micobacteria explota estos mecanismos que se usan, normalmente, en la prevención de la respuesta inflamatoria excesiva y modula negativamente las rutas claves en la protección, como son: la apoptosis, la autofagia y la producción de IFN- γ . Los probables efectos sinérgicos del bloqueo de múltiples vías a diferentes niveles unido al retardo que se produce en su transporte desde los pulmones hasta los ganglios linfáticos y el subsecuente retardo en la activación de las células T crean, colectivamente, un ambiente donde el microorganismo puede establecerse en un nicho seguro de infección, desde el cual, puede diseminarse. (Ottenhoff & Kaufmann, 2012).

Las vacunas que restringen la inducción de Treg o los agentes inmunoterapéuticos que modulen negativamente o eliminen, de forma temporal, las poblaciones de Treg presentes durante la infección latente con *M. tuberculosis* pudieran dar como resultado una respuesta inmune capaz de prevenir la infección crónica o conducir a la eliminación de la infección latente (Hoft, 2008).

II.5. Infección latente por *M. tuberculosis*

El término de latencia se utiliza desde 1927 y se propuso, inicialmente, por Opie y Aronson. Estos reportaron la presencia de micobacterias vivas en casi el 50% de muestras de tejido pulmonar, provenientes de sujetos fallecidos por causas ajenas a TB. A diferencia de los pacientes con TB activa, los individuos con TB latente no representan un riesgo inmediato a la salud pública al no ser transmisores del agente infeccioso. La importancia de esta entidad radica en el riesgo de reactivación de la infección, favorecida por condiciones como la coinfección con VIH y los trastornos metabólicos como diabetes, obesidad y malnutrición, que suprimen al sistema inmunológico propiciando la reactivación de la infección (Barrios-Payán et al., 2010).

Poco se conoce acerca de la transición entre el control de la infección aguda y el establecimiento de la infección latente. La fisiología de *M. tuberculosis* durante este estado no se encuentra esclarecida totalmente debido a la ausencia de modelos animales apropiados que reproduzcan las condiciones que se ponen de manifiesto durante la latencia (Álvarez et al., 2009; Lin & Flynn, 2010).

La capacidad que posee *M. tuberculosis* para sobrevivir dentro de las células es el resultado de un complejo y exquisito control de su regulación genética. La expresión diferencial de algunos genes regulatorios puede ser determinante en la infección por el patógeno o para su capacidad de persistir dentro del hospedero. En los últimos años se realizan numerosas investigaciones que constatan la correlación entre los diferentes reguladores transcripcionales y la diversidad de condiciones ambientales que pueden originar un estrés celular. Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la micobacteria persiste en presencia de diferentes situaciones de estrés, entre los que se

encuentran los cambios bruscos de temperatura, hipoxia, ausencia de hierro o zinc, presencia de NO y estrés oxidativo (Álvarez et al., 2009).

Estudios de expresión genética revelan el papel de algunos genes presentes en el regulón *dosR* de *M. tuberculosis* expresados durante las condiciones de hipoxia (Leyten et al., 2006). Hampshire et al. (2004), señalaron cuatro genes sobreexpresados en este estado y que se relacionan con la respiración anaerobia (*narG*, *cysH*, *nirA* y *fdhF*). Por otra parte, se conoce que los factores sigma *sigB*, *sigE* y *sigH* modifican la expresión de un subgrupo de genes necesarios para la adaptación al estrés in vivo. El estudio de los niveles de expresión de *rpoA*, cuyo incremento sugiere que el funcionamiento de las polimerasas del ARN es vital en la supervivencia de la población estacionaria, indica que el bacilo tuberculoso persistente es transcripcionalmente activo (Arráiz, 2002).

II.6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune desarrollados por *M. tuberculosis*

El sistema inmune ha evolucionado para combatir y eliminar a los microorganismos patógenos. Sin embargo, algunos de ellos pueden subvertir de forma exitosa la respuesta inmunológica para establecer su sobrevivencia intracelular a través de diferentes estrategias. Estas comprenden el enmascaramiento o secuestro de antígenos, mimetismo molecular, inmunosupresión, evasión de la cascada de citoquinas y factores del complemento, bloqueo de la presentación antigénica, escape de los mecanismos de apoptosis y autofagia y modulación de las señales coestimuladoras. Algunos de estos mecanismos se muestran en la tabla 1 (Webb & Kahler, 2008; Khan et al., 2012).

Tabla 1. Mecanismos relacionados con la persistencia de *M. tuberculosis* en los tejidos infectados.

Mecanismo de evasión	Moléculas relacionadas	Referencia
Detoxificación de los ROI y los RNI durante el estallido respiratorio	Catalasa-peroxidasa (<i>katG</i>) Superóxido dismutasa (SOD) Peroxidasa NADH-dependiente Peroxinitrito reductasa	Newton, Buchmeier & Fahey, 2008 Ehrt & Schnappinger, 2009
Reparación de proteínas	Metionina sulfóxido reductasa	Ehrt & Schnappinger, 2009
Reparación del ADN, protección y mutagénesis	ADN polimerasa (<i>DnaE2</i>)	Boshoff et al., 2003
Interferencia en la acidificación del fagosoma	Proteína de membrana externa (OmpATb).	Ehrt & Schnappinger, 2009
Bloqueo de maduración fagosoma lisosoma	Liberación de NH ₄ , LAM, Serina/treonina quinazas, tirosina-fosfatasa	Houben, Nguyen & Pieters, 2006 Welin et al., 2008 Meena & Rajni, 2010
Inhibición de apoptosis	MAN-LAM	Briken & Miller, 2008 Rao & Meena, 2011

II.7. Vacunas contra la TB

II.7.1. BCG

BCG se corresponde con una cepa atenuada de *M. bovis* y constituye, en la actualidad, la única vacuna disponible contra la TB. Esta se administra, cada año, a una cifra aproximada de 100 millones de recién nacidos, basado en la consistencia de la protección que confiere contra la meningitis tuberculosa de la infancia, así como frente a la TB miliar (Dye, 2013).

En contraste a lo planteado anteriormente, las evidencias de protección contra la forma pulmonar en adolescentes y adultos, oscilan en un rango de eficacia entre el 0-80%. Esta elevada variabilidad no se encuentra totalmente dilucidada, no obstante, se han planteado varias hipótesis, entre las que se encuentran: i) Las diferencias entre las cepas vacunales que se emplean en los estudios clínicos; ii) La exposición de la población en estudio a MNT; iii) Las diferencias genéticas y nutricionales de las poblaciones; iv) La desigualdad en el diseño de los ensayos y v) La variabilidad entre los diferentes asilamientos clínicos de *M. tuberculosis*. (Liu et al., 2009).

Este panorama plantea la necesidad urgente de contar con una vacuna efectiva para el control de la TB. Tomando en consideración que alrededor de dos mil millones de personas se encuentran presumiblemente infectadas con *M. tuberculosis* y solo el 10% desarrolla la enfermedad activa, resulta obvio que las estrategias de vacunación deben ir encaminadas en dos direcciones: Vacunación de preexposición, dirigida a impedir el establecimiento de la infección, en individuos que no se han expuesto a *M. tuberculosis* y la vacunación posexposición, cuyo objetivo radica en prevenir la enfermedad, en aquellos infectados, en forma latente, con el bacilo tuberculoso. Hasta el momento, la mayor parte de los nuevos candidatos vacunales contra la TB pertenecen al primer grupo (Thaiss & Kaufmann, 2010).

II.7.2. Desarrollo de nuevos candidatos vacunales contra la TB

Según recoge la publicación anual de la OMS en 2013; 10 candidatos vacunales para la prevención de la TB se encuentran en fase I, II o Iib y dos alternativas inmunoterapéuticas se ubican en las fases II y III de los ensayos clínicos (Figura 4). El diseño de estos candidatos responde a diferentes estrategias, entre las que se encuentran los vectores virales, las vacunas de subunidades, BCGr, entre otras (WHO, 2013)

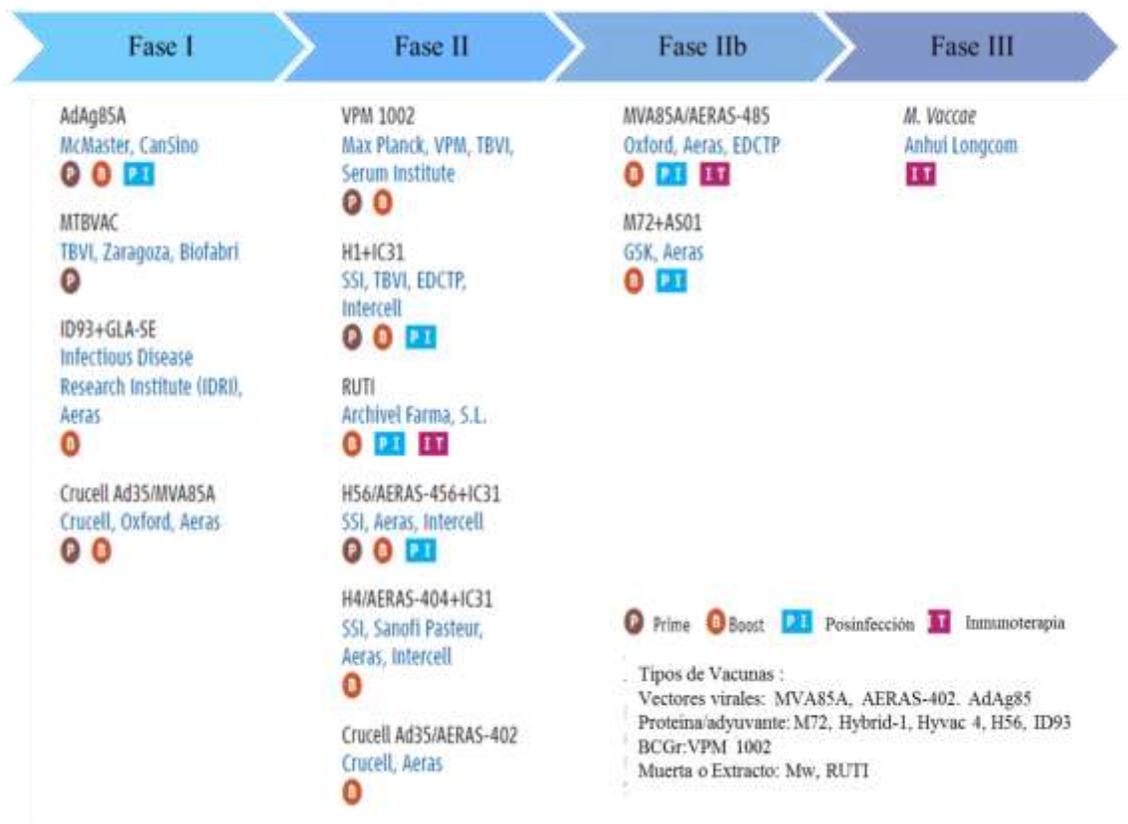


Figura 4. Línea de desarrollo de nuevos candidatos vacunales contra la TB. Julio, 2013. Adaptado de *WHO Global Tuberculosis Report 2013*

II.7.2.1. Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN consisten en genes que codifican para antígenos de TB, insertados en vectores plasmídicos, los cuales se amplifican en bacterias y posteriormente se purifican para administrarse en individuos inmunocompetentes (Romano & Huygen, 2010). Entre las principales ventajas de estos candidatos se encuentran, su fácil manipulación, efectividad, seguridad y bajo costo de producción (Gao et al., 2009). Adicionalmente estos vectores plasmídicos pueden manipularse para lograr la expresión de más de un antígeno o la fusión de numerosos de ellos, para obtener vacunas más eficientes (Romano & Huygen, 2012). Varios de estos candidatos se han probado en modelos animales. Estos incluyen la proteína de choque térmico (HSP, del inglés *Heat-Shock Protein*) de 65 KDa, complejo antígeno 85 (Ag85), la proteína de 38 kDa, ESAT-

6, proteínas del filtrado de cultivo 10 (CFP-10, del inglés *Culture Filtrate Protein*), MPT64, MPT83 (Gao et al., 2009).

Numerosos estudios evalúan la respuesta protectora inducida por la vacunación con ADN. Estos demuestran que tras la inmunización, se produce el material antigénico en los miocitos, keratinocitos y en el interior de las APC y tanto los antígenos endógenos como los exógenos se procesan, en la mayoría de los casos, de la misma forma que ocurre tras la infección con un patógeno intracelular. La respuesta inmune restringida al MHC I, inducida por este tipo de inmunización, resulta muy atractiva como agentes iniciadores en las estrategias de vacunación *prime/boost*, donde este tipo de inmunidad correlaciona con la protección (Romano & Huygen, 2012)

II.7.2.2. Vacunas de subunidades

Las vacunas de subunidades necesitan considerar la complejidad del ciclo de vida de *M. tuberculosis*. La fase aguda de la infección se caracteriza por un crecimiento bacteriano rápido y el desarrollo de una respuesta inmune inicial dominado por el reconocimiento de los antígenos de secreción bacterianos. Sin embargo, cuando las bacterias entran en estado de latencia, se producen alteraciones drásticas en su metabolismo, lo que se traduce en un cambio en la expresión de sus genes (Dietrich & Doherty, 2010). Esta peculiaridad hace que se diseñen candidatos según la estrategia de preexposición, empleando antígenos de secreción temprana de *M. tuberculosis* o combinaciones de estos: ESAT-6 (Randt et al., 2000), Ag85, ESAT6-Ag85b (Langermans et al., 2005), TB 10.4, Ag85b-TB10.4 (Duffy et al., 2009), Rv1196–Rv0125 (Mustafa, 2009) y aquellos que se insertan en la estrategia de posexposición empleando antígenos propios de la fase de latencia, entre los que se encuentran: HSP X (Rv2031c) (Dietrich & Doherty, 2010).

Las vacunas de subunidades ofrecen ventajas significativas, entre las que se encuentran: La posibilidad de seleccionar antígenos con un reconocido potencial inmunogénico y la combinación de este con otros antígenos o con adyuvantes, que su efectividad no se afecta por la sensibilización previa del individuo con MNT y la seguridad que presupone

su administración en individuos inmunodeprimidos. Este último aspecto las convierte en una opción apropiada para los programas de vacunación de las regiones endémicas de TB, donde la coinfección VIH-TB es cada vez mayor (Dietrich & Doherty, 2010).

II.7.2.3. Vacunas vivas atenuadas

Los candidatos vacunales clásicos deben mimetizar la infección natural lo más fielmente posible sin llegar a causar la enfermedad. Estos deben reunir una serie de principios básicos, entre los que se encuentran: la seguridad, inmunogenicidad, la inducción de protección duradera y contra aislamientos clínicos hipervirulentos de *M. tuberculosis* como los pertenecientes al genotipo Beijing, así como frente a cepas MDR y XDR (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

II.7.2.3.1. Mejoramiento de BCG a través de métodos de recombinación

La principal motivación para el uso de BCG como vector de expresión de antígenos heterólogos se basa en su capacidad adyuvante y de replicación en el interior de las APC. Estas células son capaces de presentar antígenos propios de BCG o heterólogos, iniciando la respuesta inmune (Bastos et al., 2009). Varios candidatos vacunales de BCGr se han probado en ensayos preclínicos, entre los cuales podemos citar: BCG::RD1, el cual contiene la región de diferencia (RD) 1 perdida en el proceso de atenuación de BCG (Locht, 2010), BCGr sobreexpresando la enzima L,D-transpeptidasa (Nolan & Lamichhane, 2010) y BCGr32-kDa, que sobreexpresa las proteínas del complejo Ag85 (Sai-Priya et al., 2010).

La vacuna BCGr VPM1002 lleva insertados los genes que codifican para la listeriolisina de *Listeria monocitogenes* y sufre delección del gen de la ureasa, con el objetivo de fortalecer su inmunogenicidad. Recientemente esta variante concluyó el ensayo clínico fase II en Sudáfrica, al cual le seguirá la demostración de su seguridad e inmunogenicidad en neonatos infectados con VIH, que hayan estado expuestos o no a *M. tuberculosis* (WHO, 2013).

II.7.2.3.2. Empleo de cepas mutantes de *M. tuberculosis*

Existen numerosos genes de *M. tuberculosis* que pudieran emplearse como dianas para la obtención de cepas mutantes con potencial vacunal. Una de las principales dificultades que enfrenta este tipo de diseño es la selección del gen o los genes blancos, de un total de 4000, presentes en el genoma de *M. tuberculosis* (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

La eliminación de genes esenciales para la biosíntesis de algunos aminoácidos o de ácidos nucleicos se emplea para la obtención de mutantes auxotróficos de *M. tuberculosis*. Las cepas *M. tuberculosis* $\Delta proC \Delta trpD$, auxótroficas para prolina y triptófano (Smith et al., 2001); $\Delta leuD \Delta panCD$, auxótroficas para la leucina y pantotenato (Sampson et al., 2011) se han probado en diferentes modelos animales, confiriendo una protección variable contra la TB experimental (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

Otros de los mecanismos empleados en la atenuación de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, se basan en la inducción de mutaciones en genes que codifican para factores de virulencia importantes (Astarie-Dequeker et al., 2009; Kalscheuer et al., 2010). De esta forma podemos citar la obtención de la cepa *fadD26*, deficiente en la biosíntesis de tiocerol dimicoceratos (DIM) (Quintero-Macías et al., 2010) y *mce-2* y *mce-3*, deficientes de los genes que codifican para las proteínas que median la entrada a las células de mamíferos (*mce*, del inglés *Mammalian Cell Entry*) (Aguilar et al., 2006), entre otros (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

El candidato MTBVAC, exhibe dos deleciones independientes en los genes *phoP*, sin marcadores de resistencia a antibióticos, los cuales codifican para factores de transcripción claves en la regulación de la virulencia de *M. tuberculosis* y en *fad26*, esencial en la síntesis de DIM. Arbues et al. (2013) demostraron recientemente, que esta cepa presenta perfiles de seguridad y biodistribución, similares a BCG, con niveles superiores de protección al evaluarla en estudios preclínicos. Estos atributos permitieron que MTBVAC se convirtiera en la primera vacuna viva atenuada en pasar a la evaluación clínica.

II.7.2.3.3. MNT como inmunógenos contra la TB

M. vaccae, en su forma inactivada por calor, es el único agente inmunoterapéutico recomendado por la OMS en el Plan Estratégico de Desarrollo contra la TB. Su uso promueve el funcionamiento de la IMC a través de la inducción de Treg, por una parte y la promoción de las funciones efectoras de los M ϕ , por otra, modulando el balance Th1/Th2. Metaanálisis acerca del uso de *M. vaccae* como terapia adyuvante al tratamiento con drogas antituberculosas demuestran que su uso contribuye a disminuir la duración del tratamiento antibiótico, induce una respuesta inmune capaz de eliminar los bacilos persistentes, acelera la conversión del esputo y promueve la absorción de las lesiones y la reparación de las cavidades (Xiao-Yan et al., 2011). En la actualidad se encuentran en ejecución los ensayos clínicos fase III, para demostrar su eficacia como agente inmunomodulador (WHO, 2013).

Otra de las variantes exploradas se basa en el uso de *Mycobacterium smegmatis*, como vector estable de la expresión de genes foráneos (ej. Ag85), capaces de desatar respuesta inmune celular y mucosal. A diferencia de otras micobacterias y de BCG, que son capaces de sobrevivir en las células del hospedero por largos periodos a través de la inhibición de la maduración del fagosoma, *M. smegmatis* se destruye rápidamente por la acción de las proteasas fagolisosomales de las células infectadas. No obstante, su presencia, induce a los M ϕ a producir una mayor cantidad de citoquinas, en comparación con las especies patógenas. Adicionalmente, *M. smegmatis*, tiene la potencialidad de inducir la maduración de MHC I y de las moléculas coestimuladoras, así como de facilitar el rápido reconocimiento de los antígenos expresados y la crospresentación (Taylor et al., 2012).

II.8. *M. 'habana'*

M. 'habana' se aisló por primera vez en Cuba, por Valdivia et al., en 1971, a partir de esputos provenientes de pacientes con enfermedad pulmonar indistinguible de TB. Treinta y cinco de estos pacientes se correspondían con casos crónicos, hospitalizados en centros del país y con diagnóstico anterior de TB pulmonar. El resto (10 pacientes) provenían de casos nuevos detectados en policlínicos, gracias a la adopción de la

estrategia de búsqueda bacteriológica de casos, en el marco del nuevo PNC que se ponía en práctica por aquella época (Valdivia, Suárez & Echemendía, 1971; Valdivia, 1973).

Las características tintoriales de *M. 'habana'* mostraron su propiedad de AAR, formas y dimensiones similares a las especies pertenecientes al género *Mycobacterium*. Su crecimiento lento y no cromogenicidad la ubicaron en el grupo III de Runyon. El hallazgo más trascendental durante su clasificación bioquímica lo constituyó su intensa positividad a la niacina, de 18-25 veces mayor que en *M. tuberculosis*, característica que hasta el momento, se consideraba exclusiva de este último. Por otra parte, estos aislamientos resultaron positivos en la prueba de termoestabilidad catalasa a 68°C, característica propia de las MNT (Valdivia, Suárez & Echemendía, 1971).

Teniendo en cuenta estas características y otro grupo de pruebas bioquímicas, fisiológicas y biológicas, los aislamientos se propusieron como una nueva especie dentro del género *Mycobacterium*. Años más tarde, el Grupo Internacional de Taxonomía de Micobacterias, la clasificó como *M. simiae* (serotipo I) debido a la similitud bioquímica y serológica con esta especie (Meissner & Schröder, 1975). No obstante, existen diferencias antigénicas e inmunogénicas que permanecen sin explicación y se ha mantenido, en la literatura, la denominación *M. 'habana'* para aquellas cepas aisladas originalmente en Cuba (Mederos et al., 1998).

II.8.1. Potencial inmunogénico de *M. 'habana'* en la infección tuberculosa experimental

A menos de una década del reporte inicial de *M. 'habana'*, un grupo de investigadores de la India estudió el potencial inmunogénico de la cepa TMC 5135 en comparación con el inducido tras la vacunación subcutánea con 19 cepas de diferentes especies de micobacterias, empleando un modelo experimental murino. Gupta et al. (1979), demostraron la habilidad de *M. 'habana'* de proteger a los ratones vacunados luego del reto con *M. tuberculosis* H37Rv, detectando valores de sobrevida superiores en un 20% a los mostrados tras la vacunación con BCG, en las mismas condiciones experimentales.

Contrariamente a la similitud serológica demostrada por Meissner & Schroeder (1975) entre *M. 'habana'* y *M. simiae* serotipo I, los experimentos de inmunogenicidad evidencian que esta última no confiere protección frente a la infección tuberculosa experimental (Gupta et al., 1979), por lo que probablemente *M. 'habana'* presenta características antigénicas distintivas que expliquen este comportamiento.

En este sentido, Mederos et al. (1998) y Mederos, Valdivia & Valero-Guillén (2008) reportaron diferencias en la composición de las fracciones de glicopeptidolípidos (GPL) y ácidos micólicos (Mederos, Valdivia & Valero-Guillén, 2007) entre ambas especies micobacterianas, las cuáles pudieran estar involucradas con sus diferencias inmunogénicas. Esta hipótesis se sustenta en la evidencia de que cepas de *M. tuberculosis* con mutaciones a nivel de los ácidos micólicos difieren de las cepas salvajes en sus propiedades patogénicas e inmunogénicas (Rao et al., 2005; 2006). Recientemente Mederos et al. (2010), mostraron la existencia de diferencias estructurales en el 'Factor Cuerda' entre cepas de *M. 'habana'* y *M. simiae*, sin embargo estas no parecen ser relevantes en la inducción de la producción de TNF- α en líneas celulares de M ϕ (Mederos, Montoro & Valero-Guillén, 2010).

De igual manera, se han explorado otras alternativas al uso de la cepa viva como vacuna, entre las que se encuentran la potencialidad de sus antígenos de secreción de conferir protección contra la TB experimental (Jyothi, Garg & Singh, 2000). Paralelamente, se han llevado a cabo diferentes ensayos, tanto en animales como en humanos, donde se asocia, la inmunización con este agente, con protección frente *M. leprae*.

II.8.2. Protección conferida por *M. 'habana'* en la lepra experimental y humana

Singh et al. (1989) investigaron el efecto de la vacunación con células de *M. 'habana'* vivas e inactivadas, en la protección experimental contra *M. leprae*. Los resultados demuestran que la misma protege contra la lepra, incluso cuando se administra de forma inactivada. Años más tarde se reportó que la vacunación con esta micobacteria, en todos sus estados físicos, es capaz de generar una respuesta de hipersensibilidad retardada

contra antígenos homólogos (habanina) y heterólogos (lepromina) mayor que la vacunación con BCG (Singh et al., 1997).

Los principales antígenos inmunoreactivos de *M. 'habana'* se determinaron en un estudio realizado por Chaturvedi et al., tras enfrentar fracciones celulares de esta micobacteria contra sueros de pacientes con lepra (Chaturvedi, Singh & Sinha, 1995). Por su parte, Bisht et al. (1996), demostraron la existencia de una proteína citosólica mayoritaria (23 KDa), con actividad SOD, que era reconocida por las células T de pacientes con lepra, de forma similar al reconocimiento que se produce con su análogo en *M. leprae*.

Singh et al. (1997) demostraron que los antígenos de esta micobacteria estimulan una fuerte respuesta linfoestimuladora al ser enfrentados con monocitos de sangre periférica de monos sensibilizados con *M. leprae*. De igual forma, se conoce que la vacunación con *M. 'habana'* puede producir inmunidad adoptiva al transferir células provenientes de ratones previamente inmunizados a ratones singénicos.

Wakhlu et al. (2001) reportaron la vacunación de pacientes con lepra lepromatosa y sus contactos domiciliarios con dosis única de una cepa inactivada de *M. 'habana'*. A través de este ensayo se demostró la conversión de la totalidad de los pacientes y contactos lepromina-negativos, así como un aumento de la reactividad en aquellos que presentaban una reacción positiva anterior a esta prueba. A pesar de existir algunos efectos colaterales sistémicos, las principales reacciones adversas se encontraron restringidas al sitio de vacunación e incluyeron la induración, ulceración, prurito, dolor y linfadenitis local no complicada, los cuales remitieron espontáneamente. Estos resultados demuestran la utilidad de la vacunación con *M. 'habana'* en la estimulación específica de la respuesta IMC contra *M. leprae*. Los efectos colaterales mínimos y su buena aceptación entre los sujetos participantes en el estudio, suponen su alta tolerabilidad (Wakhlu et al., 2001).

II.9. Un puente entre las investigaciones in vitro y los estudios en humanos: Modelos animales en el desarrollo preclínico de candidatos vacunales contra la TB

El uso de modelos animales para el estudio de diversas enfermedades es extremadamente importante en el progreso científico de la Medicina. Muchas de las observaciones cruciales para descifrar la etiopatogénesis de diferentes enfermedades, entre ellas las infecciosas, se han obtenido con el empleo de esta herramienta. Estos son esenciales en la evaluación de nuevas drogas y su toxicidad, así como en la estimación de la eficacia de nuevos candidatos vacunales en los estudios preclínicos (Orme, 2005; Hernández-Pando, Aguilar & Hernández, 2010a).

Existe un amplio rango de especies animales que pueden infectarse experimentalmente y muchas de ellas se han empleado como modelos animales que simulan la infección natural. Sin embargo, algunas resultan favoritas para el desarrollo de una infección exitosa con *M. tuberculosis* y reproducen al menos parcialmente, la enfermedad en el humano. La principal dificultad de estos experimentos radica en que no existe un modelo animal único, capaz de replicar la complejidad del comportamiento humano y los factores ambientales que influyen en el desenlace de la infección o de la intervención terapéutica. A pesar de esto, los experimentos en modelos animales de TB son una herramienta valiosa en la comprensión de los mecanismos de patogenicidad de las infecciones micobacterianas y en el progreso hacia un nuevo candidato vacunal (McShane & Williams, 2010).

II.9.1. Ratones

No existe un modelo murino único para el estudio de la infección/enfermedad y la respuesta inmune inducida por *M. tuberculosis*. Las líneas C57BL6 y BALB/c se destacan como las más empleadas en el estudio de la eficacia protectora de las nuevas vacunas contra la TB (Hernández-Pando, Aguilar & Hernández, 2010a).

Las principales desventajas del uso de modelo murinos se asocian a que la naturaleza de la protección no puede ser extrapolada totalmente a los humanos. Este hecho se basa, fundamentalmente, en las diferencias que se observan en la constitución celular de los

granulomas y su apariencia histológica entre ambas especies. Esta desigualdad se explica por la resistencia natural de los ratones a la TB, que los hace controlar, de forma parcial, el crecimiento bacteriano así como la progresión a la enfermedad (McShane & Williams, 2010).

No obstante, existen ventajas irrefutables en el uso de los modelos murinos. Entre estas se encuentran: La posibilidad de contar con líneas isogénicas, lo cual aumenta la reproducibilidad de la respuesta a la vacunación y al reto y la existencia de líneas *knock-out* para diferentes genes que codifican importantes factores involucrados en la inmunidad celular ante *M. tuberculosis* (McShane & Williams, 2010). Desde la perspectiva práctica, los ratones son más baratos, se pueden albergar en un alto número y son fáciles de mantener en facilidades con un nivel de bioseguridad (BSL, del inglés *Biosafety Level*) 3, además de que se cuenta con todo un arsenal de reactivos inmunológicos para el estudio de vacunas, drogas antibacterianas y mecanismos inmunes (Dharmadhikari & Nardell, 2008).

II.9.2. Cobayos

En el comienzo del estudio de la TB, Robert Koch empleó cobayos en la descripción del bacilo. Estos animales resultan altamente susceptibles a dosis pequeñas de *M. tuberculosis*, particularmente cuando se emplea la infección por aerosol y esto sugiere su capacidad de simular la infección en el humano (Dharmadhikari & Nardell, 2008).

El modelo de cobayos representa un papel importante en el proceso de desarrollo de vacunas y constituye un medio más exigente que el modelo murino, en la determinación del potencial del nuevo candidato (McShane & Williams, 2010). Este es capaz de replicar muchos de los aspectos de la infección tuberculosa en humanos, especialmente de la TB infantil y la que se desarrolla en individuos inmunocomprometidos. Entre estos se encuentran: La formación de granulomas, las lesiones pulmonares primarias y hematógenas, la diseminación y la necrosis caseosa. Sin embargo, la falta de disponibilidad de reactivos inmunológicos para estudiar la respuesta inmune que se

produce en la vacunación constituye, sin dudas, una de las desventajas más citadas, con respecto al uso de este modelo experimental (Dharmadhikari & Nardell, 2008).

II.9.3. Primates no humanos

Los primates no humanos constituyen el modelo de elección para los estudios de TB. Ellos reproducen la mayoría de las características de la infección en humanos y poseen los elementos de la respuesta inmune del hospedero, que se encuentran ausentes en la mayoría de los modelos animales pequeños (McShane & Williams, 2010).

La mayoría de los estudios se producen en macacos *rhesus* o *cynomolgus*, los cuales presentan diferente susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*. En dependencia de la dosis infectante, ambas especies pueden desarrollar un espectro de síntomas clínicos que incluyen la propensión a desarrollar una TB latente capaz de reactivarse bajo un estrés natural o químico (Hernández-Pando, Aguilar & Hernández, 2010a).

Muchos de los reactivos que se emplean en los estudios en humanos son aplicables a este modelo animal, por lo que resulta posible realizar ensayos idénticos en ambas especies. No obstante a las ventajas expuestas, resulta obvio que los estudios en primates no humanos solo se justifican para aquellos candidatos que ofrezcan resultados promisorios tras su evaluación en otros modelos preclínicos. El alojamiento de estos animales en condiciones BSL 3, unido al el muestreo y procesamiento de las muestras es muy costoso (McShane & Williams, 2010).

A pesar de la valiosa información que reporta el uso de estas especies animales en los estudios preclínicos, no existen regulaciones que exijan la realización de los mismos previo a la entrada del candidato en ensayos clínicos fase I. Es por esto que muchas investigaciones en este campo optan por evaluar, en paralelo, la inmunogenicidad, eficacia y seguridad de sus candidatos en los primates no humanos y en el hombre, (McShane & Williams, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones que forman parte de este trabajo se desarrollaron en el período comprendido entre enero de 2006 y septiembre de 2012, en la Unidad de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), México. Las mismas pertenecen al Proyecto Nacional “Desarrollo de vacunas de nueva generación y de métodos de diagnóstico para el control de la Tuberculosis” del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente de Cuba (CITMA, Código PNCT-05), así como al proyecto “Caracterización microbiológica e inmunológica de cepas de *Mycobacterium ‘habana’* como posible inmunógeno contra la Tuberculosis” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Código J200.754/2004) de México.

- **Cepas bacterianas**

M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, del inglés *American Type Culture Collection*. Rockville, MD EUA). La misma se empleó como control en el experimento de virulencia, mientras que en el experimento de protección se empleó como reto.

M. ‘habana’ IPK-220, IPK-337 y TMC 5135, pertenecen a la colección de micobacterias del LNR-TBLM del IPK, Cuba. La selección de estas cepas se basó en la clasificación realizada por Mederos *et al.*, 1998, de acuerdo a la composición de los GPL polares (Grupos A-D). Las cepas *M. ‘habana’* IPK-337 y TMC 5135 (pertenecientes al Grupo

A) se caracterizan por la presencia de los GPL-I, II y III y *M. 'habana'* IPK-220 (grupo D), la cual carece de estos compuestos. Adicionalmente, la cepa *M. 'habana'* TMC 5135 se encuentra depositada en la colección internacional para Micobacterias *Trudeau* (*Trudeau Institute, Saranac Lake, NY 12983, EUA*). *Mycobacterium bovis* BCG subcepa Filadelfia (BCG Phipps), donada gentilmente por el Dr. Marcel A. Behr (*McGill General Hospital, Montreal, Canadá*), se empleó como cepa control en los experimentos de vacunación.

- **Animales de experimentación**

En los experimentos de virulencia, inmunogenicidad y protección se emplearon ratones BALB/c machos, de 8 semanas de vida, con un peso entre los 15-25 g. Adicionalmente, se utilizaron ratones desnudos (*nude, nu/nu*) para comprobar la seguridad de la vacunación con las cepas de *M. 'habana'* en un modelo experimental inmunodeficiente. Todos los animales provenían del bioterio del INCMNSZ.

III.1. Determinación de la virulencia de cepas de *M. 'habana'* en un modelo experimental de TB pulmonar progresiva

III.1.1. Obtención del inóculo bacteriano

Las cepas *M. 'habana'* IPK-220, IPK-337, TMC 5135 y *M. tuberculosis* H37Rv se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (*DifcoLabs, Detroit, EUA*) enriquecido con un suplemento de Albúmina-Dextrosa-Catalasa (ADC, *DifcoLabs, Detroit, EUA*) (Anexo 1) y se incubaron a 37°C durante tres semanas. La biomasa se resuspendió en tampón salina-fosfato (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) (Anexo 2) con Tween-80 (*Merck, Alemania*) al 0,05%. Los agregados celulares se dispersaron empleando 10 ciclos de vórtex de un minuto. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min y se colectaron los sobrenadantes. En estos se realizó el conteo y chequeo de la viabilidad celular, en cámara de Neubauer, empleando diacetato de fluoresceína (DAF) (*Sigma*) (Anexo 3). El inóculo final, para cada una de las cepas, se ajustó a $2,5 \times 10^5$ bacterias/100 μ L de PBS.

III.1.2. Infección experimental

Se siguió el modelo experimental de TB pulmonar progresiva descrito por Hernández-Pando et al. (1996). Se emplearon cuatro ratones BALB/c por cepa para cada uno de los tiempos de sacrificios previamente establecidos (ver acápite III.1.3.). Estos se anestesiaron intraperitonealmente con pentobarbital sódico (*Sedalphorte*, México) a razón de 56 mg/Kg. Se practicó una incisión en la parte anterior del cuello hasta lograr la exposición de la tráquea, a través de la cual se inyectó directamente el inóculo de cada cepa. El grupo control se infectó con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Posteriormente, se suturó la incisión con hilo de seda estéril y se mantuvieron los ratones en cajas acopladas a un microaislador y conectadas a presión negativa (*Allentown caging equipment Co. inc, USA*). Los animales se mantuvieron bajo una humedad relativa de 88-90%, una temperatura de 20°C, con ciclos de 12 h luz : 12 h oscuridad. Para la construcción de la curva de sobrevivencia se registró la muerte de un grupo adicional de 10 ratones por cepa, inoculados con igual carga bacteriana, durante las 17 semanas posteriores a la infección.

III.1.3. Eutanasia y obtención del tejido pulmonar

Se sacrificaron cuatro ratones por cepa empleando el método de exanguinación (Close et al., 1996) luego de 1, 3, 15, 21, 28, 60 y 120 días posteriores a la infección i.t. Los pulmones se perfundieron a través de la tráquea, con 1 mL de etanol 100% (*High Purity A1695*, México). Estos se removieron de forma alterna (derecho o izquierdo) y se colocaron en frascos con etanol absoluto o en tubos secos estériles para realizar el análisis morfométrico del tejido infectado o la determinación de la carga bacteriana y citoquinas, respectivamente. Estos últimos se conservaron inmediatamente a -70°C hasta su procesamiento.

III.1.4. Determinación de la carga bacilar en los pulmones de ratones infectados

Los pulmones se homogeneizaron, por acción mecánica, en 1 mL de solución salina (SS) fisiológica estéril, empleando un homogenizador de tejidos Polytron (*Kynematica*, Luzern; Switzerland) a una velocidad de 3000 rpm. Se realizaron cinco diluciones

decimales seriadas y se sembraron, por duplicado, 10 μ L de cada una, en placas de cultivo con medio Middlebrook 7H10 (*DifcoLabs*, Detroit, EUA) suplementado con Ácido oleico-Albúmina-Dextrosa-Catalasa (OADC, *DifcoLabs*, Detroit, EUA) (Anexo 1). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. Las lecturas se realizaron a los días 14 y 21 posinoculación.

Se contaron las colonias compatibles morfológicamente con *M. habana'* o *M. tuberculosis* (en dependencia del grupo de ratones infectados al cuál pertenecía el homogeneizado). El cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó de la siguiente forma:

$$\text{UFC} = \text{Número colonias} \times \text{Factor dilución}$$

III.1.5. Análisis morfométrico automatizado del tejido pulmonar de ratones infectados

Se realizó un corte parasagital de los pulmones y estos se procesaron según los protocolos de rutina establecidos para los estudios histopatológicos (Smith & Warfield, 2005). Se prepararon cortes por duplicado de 3 μ m de espesor empleando micrótomo (*Leica*, EUA). Los mismos cortes se tiñeron en paralelo con Hematoxilina-Eosina o ZN (Smith & Warfield, 2005) para registrar la evolución de la infección en términos histológicos y demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), respectivamente.

El área total de neumonía se calculó como la sumatoria del área ocupada por todas las zonas de neumonía observada en cada corte. Para determinar el porcentaje del área neumónica se tomó como referencia el área pulmonar total. En ambos casos no se consideró la superficie correspondiente a los espacios ocupados por los vasos sanguíneos principales y bronquios. La talla de los granulomas se expresó como el promedio de la talla de todos los granulomas observados en el mismo corte. Los cálculos morfométricos se realizaron con el empleo de un sistema automatizado de análisis de imágenes (*LEICA Qwin standard, Leica*, EUA).

III.1.6. Análisis de la expresión pulmonar de citoquinas y de la enzima iNOS.

III.1.6.1. Aislamiento del ARNm de los pulmones de los ratones infectados.

Se emplearon los pulmones de cuatro ratones por cada cepa para el aislamiento del ARNm empleando el estuche comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen Inc, EUA), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Qiagen RNeasy® Mini Handbook 09/2010) (Anexo 4). Se evaluó la calidad y cantidad de ARN a través de espectrometría (260/280) y sobre geles de agarosa (Sigma) con bromuro de etidio (Sigma).

III.1.6.2. Transcripción reversa del ARNm

La transcripción reversa del ARNm total se realizó empleando 5 µg de ARN, oligo-dT y el juego de reactivos comercial *Omniscript* (Qiagen Inc, EUA), de acuerdo a las exigencias del fabricante (Qiagen Omniscript™ Reverse Transcriptase Handbook) (Anexo 5)

III.1.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real para el análisis de citoquinas e iNOS en los pulmones de los ratones infectados

Se empleó el sistema *7500 Real Time PCR system* (Applied Biosystems, EUA) y el estuche *Quantitect SYBR Green Mastermix kit* (Qiagen Inc, EUA) (Anexo 6). Las curvas patrones de los productos de PCR cuantificados y diluidos así como los controles negativos se incluyeron en cada corrida de PCR. Los cebadores específicos se diseñaron empleando el programa *Primer Express* (Applied Biosystems, EUA) para los blancos que se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Cebadores empleados en la cuantificación de la expresión del ARNm codificador de citoquinas e iNOS en pulmones de ratones infectados con cepas de *M. 'habana'* y *M. tuberculosis* H37Rv

Proteínas Blanco	Secuencia de los Cebadores
GAPDH*	5'-cattgtggaagggtcatga 3' 5'-ggaaggccatgccagtgagc 3'
TNF- α	5'-tgtggttcgacctctacctc 3' 5'-gccgagaaaggctgcttg 3'
IFN- γ	5'-ggtgacatgaaaatcctgcag 3' 5'-cctcaaactggcaatactcatga 3'
IL-4	5'cgtcctcacagcaacggaga 3' 5'gcagcttatcgatgaatccagg 3'
iNOS	5'-agcgaggagcaggtggaag-3', 5'-catttcgctgtctcccaa-3'.

*Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH)

Condiciones de la amplificación: Después de la desnaturalización inicial durante 15 min a 95°C, se aplicaron 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 60°C y 34 s a 72°C. Se cuantificaron las cantidades de ARNm específico para cada uno de los blancos, en la muestra, de acuerdo al gen estándar correspondiente.

El ARNm que codifica para la enzima GAPDH se empleó como control interno invariante para normalizar la expresión de los genes de las citoquinas en estudio. Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar (DS) del número de copias de ARNm específico para cada citoquina por 10^6 copias de ARNm específico para GAPDH, de cuatro ratones diferentes para cada tiempo (Aguilar et al., 2006).

III.2. Inmunogenicidad y biodistribución de cepas vivas de *M. 'habana'* empleadas como vacunas en ratones BALB/c

III.2.1. Preparación del inóculo

Las cepas *M. 'habana'* TMC 5135 y *M. 'habana'* IPK-337 se sembraron en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con un 5% de ADC y se incubaron a 37°C durante tres semanas. La preparación del inóculo se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el acápite III.1.1. Las suspensiones bacilares se ajustaron con PBS a 2500, 5000 y 8000 bacterias por inóculo. La cepa BCG Phipps se empleó como control del experimento, a una densidad de 8000 bacilos/inóculo, según lo establecido por Castillo-Rodal et al. (2006), para los experimentos de vacunación con esta última cepa.

III.2.2. Inmunización y eutanasia de los ratones

Se inmunizaron cuatro ratones por cepa por cada tiempo de sacrificio, empleando la vía subcutánea (en la base de la cola), con un volumen de 100 µL. El sacrificio se realizó por exanguinación (Close et al., 1996) al cabo de los 15, 30 y 60 días posvacunación (p.v.). En cada tiempo se colectaron los pulmones, bazo, ganglios linfáticos inguinales y una porción del tejido celular subcutáneo del sitio de vacunación.

III.2.3. Preparación de las suspensiones celulares

Los órganos colectados se depositaron inmediatamente en 2 mL de medio RPMI (Instituto "Roswell Park Memorial") 1640 (GIBCO, invitrogen co., EUA) suplementado con 0.5 mg/mL de colagenasa tipo 2 (Worthington, NJ, EUA) y se incubaron por 1 h a 37°C. Posteriormente estos se maceraron a través de un tamizador de tejidos (FALCON, Becton-Dickinson, 70 µm, nylon 35-2350, EUA) y se lavaron tres veces empleando el mismo medio de cultivo. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Los glóbulos rojos presentes en las suspensiones celulares de pulmones y bazo se eliminaron con solución de lisis para eritrocitos (Anexo 2), durante 20 min a 37°C. Posterior al lavado, la masa celular se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con L-Glutamina 2 mM, 100 U/mL de

penicilina, 1 µg/mL de estreptomina y suero fetal bovino 10% (todos de *Sigma*). Las células se contaron con azul tripan 0.4% (*Sigma*), se ajustaron a 10⁶ células viables/mL y se distribuyeron 100 µL/pozo. Cada suspensión se colocó por duplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano (*BD Falcon TM*, EUA).

III.2.4. Estimulación celular

Los cultivos celulares se enfrentaron a tres antígenos de *M. tuberculosis*: Antígeno soluble (CFA, del inglés *culture filtrate antigens*), ESAT-6 y Ag85b, todos a una concentración de 5 µg/mL (Aguilar et al., 2006). Como controles positivo y negativo de estimulación se empleó la Concanavalina A (Con A), a razón de 4 µg/mL (*Sigma*) y medio RPMI (*Sigma*) sin estimulantes, respectivamente.

III.2.5. Producción de IFN-γ

III.2.5.1. Determinación del tiempo óptimo de exposición antigénica de los cultivos celulares provenientes de los ratones vacunados con *M. 'habana'*.

Se emplearon los órganos colectados a partir de los ratones vacunados con la dosis de 8000 bacilos, correspondientes a la cepa *M. 'habana'* TMC 5135, el día 15 p.v. Se cuantificó la producción de IFN-γ en el sobrenadante de los cultivos celulares luego de 24, 48 y 72 h de aplicado el estímulo antigénico, a través del sistema inmunenzimático (ELISA, del inglés *Enzyme linked immunosorbent assay*) comercial *BD OptEIA™* (*BD Biosciences Pharmingen*, San Diego CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 7). El experimento se realizó por duplicado. La concentración de IFN-γ se calculó empleando la función correspondiente a cada curva patrón de IFN-γ recombinante. Esta se expresó como la concentración media (pg/mL) ± DS. En el tiempo de exposición correspondiente a la mayor producción de IFN-γ se calculó el índice de estimulación antigénica con respecto al control (E/C). Una relación E/C mayor que tres se consideró como una respuesta positiva al estímulo (Al-Attayah et al., 2006).

$$E/C = \frac{\text{Concentración de IFN-}\gamma \text{ en presencia de estimulación antigénica}}{\text{Concentración de IFN-}\gamma \text{ en ausencia de estimulación antigénica}}$$

III.2.5.2. Producción de IFN- γ en los órganos de los ratones vacunados con *M. 'habana'*

Una vez establecido el tiempo óptimo de exposición al estímulo antigénico en el acápite III.2.5.1, este se empleó en los tiempos posteriores de sacrificio (días 30 y 60 p.v.) y con el resto de las dosis, siguiendo los procedimientos descritos en los acápites III.2.3 y III.2.4. Se establecieron como las mejores dosis de vacunación aquellas en las que se detectaron los mayores valores de producción de IFN- γ . Los cultivos celulares de los ratones vacunados con BCG Phipps se estimularon con los mismos antígenos durante 72 h (Infante et al., 2005).

III.2.6. Biodistribución de las cepas *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337 empleadas como vacuna subcutánea en ratones BALB/c.

Luego de 15, 30 y 60 días p.v. se determinó la multiplicación bacilar en el tejido celular subcutáneo del sitio de vacunación, así como la biodistribución a ganglios linfáticos regionales, pulmones y bazo, siguiendo la metodología descrita en el acápite III.1.4.

III.3. Análisis de la seguridad de cepas de *M. 'habana'* empleadas como vacuna viva en ratones inmunodeficientes.

Dos grupos de 20 ratones inmunodeficientes (*nude*, *nu⁻/nu⁻*) (Carbone & Maschi, 2006) se vacunaron subcutáneamente, en la base de la cola, con las cepas *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 con el objetivo de confirmar la atenuación natural de las mismas en comparación con BCG Phipps. Las dosis empleadas se correspondieron con aquellas que lograron una mayor producción de IFN- γ , en el experimento descrito en el acápite III.2.5.2. Para la vacunación con la cepa BCG Phipps se empleó una dosis de 8000 bacterias, reportada previamente para experimentos de este tipo (Castillo-Rodal et al., 2006). Se registraron los datos de mortalidad en el tiempo y se construyó la curva de sobrevida.

III.4. Protección conferida por la vacunación con cepas vivas de *M. 'habana'* en ratones BALB/c tras el reto con *M. tuberculosis* H37Rv

Se emplearon dos grupos experimentales de 20 ratones BALB/c. Cada grupo se inmunizó subcutáneamente, en la base de la cola, con las dosis más inmunogénicas de cada cepa de *M. 'habana'*, obtenidas tras la realización del experimento descrito en el acápite III.2.5.2. Luego de 60 días p.v., se retaron por vía i.t (ver acápite III.1.2.) con $2,5 \times 10^5$ células de *M. tuberculosis* H37Rv. El grupo control de vacunación recibió 8000 células vivas de la cepa BCG Phipps.

El sacrificio de los ratones se estableció a los 60 y 120 días posteriores al reto (p.r.), empleando el método de exanguinación (Close et al., 1996). Un grupo adicional de 10 ratones por cepa se usó para la construcción de la curva de sobrevida y a un grupo de igual número de animales se les administró SS fisiológica estéril. Este último funcionó como grupo control de animales sin vacunar.

La protección conferida por la vacunación se determinó a través de la cuantificación de UFC en los homogeneizados pulmonares, la sobrevida y la medición automatizada del área pulmonar afectada por neumonía y el área total de granulomas, según se describe en el acápite III.1.5.

III.5. Análisis estadístico

En el experimento de estandarización del tiempo de estimulación (ver acápite III.2.5.1) se calculó la DS para cada uno de los estímulos antigénicos, en los diferentes tiempos de estimulación y se realizó la prueba T para muestras pareadas (IC 52.31-100.25; IC 100.25-126.53).

Las curvas de sobrevida se construyeron por el método de Kaplan-Meier y la comparación de las distribuciones de supervivencia se realizó empleando la prueba de logaritmos de rango (*logrank*) (Pita, 1995). La prueba *T-student* se empleó para determinar la significación estadística de las UFC y el análisis histopatológico. Se consideró significativo la obtención de una $p < 0,05$, entre los grupos de ensayo y los

controles. El análisis estadístico se realizó mediante el sistema NCSS 2004 (del inglés, *Number Cruncher Statistical Systems*, Kaysville, Utah).

III.6. Normas de Bioseguridad.

Las cepas de *M. 'habana'*, *M. tuberculosis* y BCG se manipularon en cabinas de seguridad biológica clase II (BSC II, del inglés *Biosafety Cabinet class II*). Todos los procedimientos con animales se realizaron en BSC II, ubicadas en instalaciones BSL3 para animales de laboratorio. Se emplearon todos los medios de protección disponibles, entre los que se encontraron los uniformes quirúrgicos, guantes y mascarillas de protección con filtros N95 (3M 8511 *NIOSH*, EUA). Las carcacas de los animales sacrificados se colocaron en bolsas para desechos biológicos, debidamente rotuladas y se pusieron a disposición del Departamento de Eliminación de Desechos del INSMNSZ.

III.7. Consideraciones éticas en el uso de animales de laboratorio

En el diseño de los experimentos con animales se siguió el principio de las 3 Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) enunciado por Russell & Burch (1959). El protocolo experimental estuvo en concordancia con las regulaciones internacionales para el manejo y cuidado de los animales de experimentación (National Research Council, 2002) y las buenas prácticas de Laboratorio para estudios preclínicos (WHO/TDR, 2009). Obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Investigación del INCMNSZ (Código: CINVA 190) (Anexo 8).

Principio del Reemplazo: Se realizó una extensa revisión bibliográfica en las principales bases de datos internacionales para revistas biomédicas. Esto permitió seleccionar el modelo animal a emplear, así como las dosis de vacunación para la cepa control, evitando la repetición innecesaria de experimentos.

Principio de Reducción: Se emplearon animales con status genético (BALB/c y *nude*) y calidad microbiológica conocidos (Chackerian & Behar, 2003). La interpretación de los resultados experimentales se avaló con la introducción de grupos controles cuyo

comportamiento se encuentra reportado en la literatura (Hernández-Pando et al., 1996; Castillo-Rodal et al., 2006).

Principio de Refinamiento: Se tuvieron en cuenta las principales necesidades biológicas de los animales: encamado, confinamiento social, alimentación y suministro de agua (Guittin & Decelle, 2002). Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo el empleo de anestesia y en los experimentos de vacunación subcutánea se emplearon técnicas adecuadas para la restricción del animal (Morton et al., 2001). El investigador que llevó a cabo el trabajo con animales cuenta con la Categoría C de la Federación de Sociedades Europeas para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (FELASA), la cual lo acredita para diseñar, conducir y ejecutar este tipo de experimentos (FELASA Working groups, 2001). Se empleó como método de eutanasia la exanguinación (Close et al., 1996) previa inducción de anestesia en cámaras con sevoflurano.

IV. RESULTADOS

IV.1. Virulencia de cepas de *M. 'habana'* en un modelo experimental de TB pulmonar progresiva

La figura 5 muestra el comportamiento de la sobrevivencia de ratones infectados con diferentes cepas de *M. 'habana'*. La infección experimental con *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 permitió un 100% de sobrevivencia, mientras que los animales inoculados con *M. 'habana'* IPK-220 comenzaron a morir a partir de la semana nueve p.i., mostrando un 80% de sobrevivencia al término del experimento. En contraste, la muerte de los animales pertenecientes al grupo control infectado con *M. tuberculosis* H37Rv, comienza a registrarse tempranamente y para la novena semana del experimento todos los animales habían muerto, mostrándose diferencias significativas entre este y todos los grupos infectados con *M. 'habana'* ($p < 0,05$).

La multiplicación bacilar en los pulmones de los animales infectados (Figura 6) se correspondió con los resultados de sobrevivencia. De esta forma aquellos que recibieron las cepas de *M. 'habana'* mostraron valores significativamente menores de UFC que los pertenecientes al grupo control ($p < 0,05$). Los ratones infectados con la cepa IPK-220 mostraron la mayor carga bacilar al compararlos con el resto de los grupos inoculados con *M. 'habana'*, aunque estos resultados solo presentaron diferencias significativas en el día 120 p.i. Para esta fecha no fue posible obtener resultados de la cepa H37Rv, pues todos los animales habían muerto.

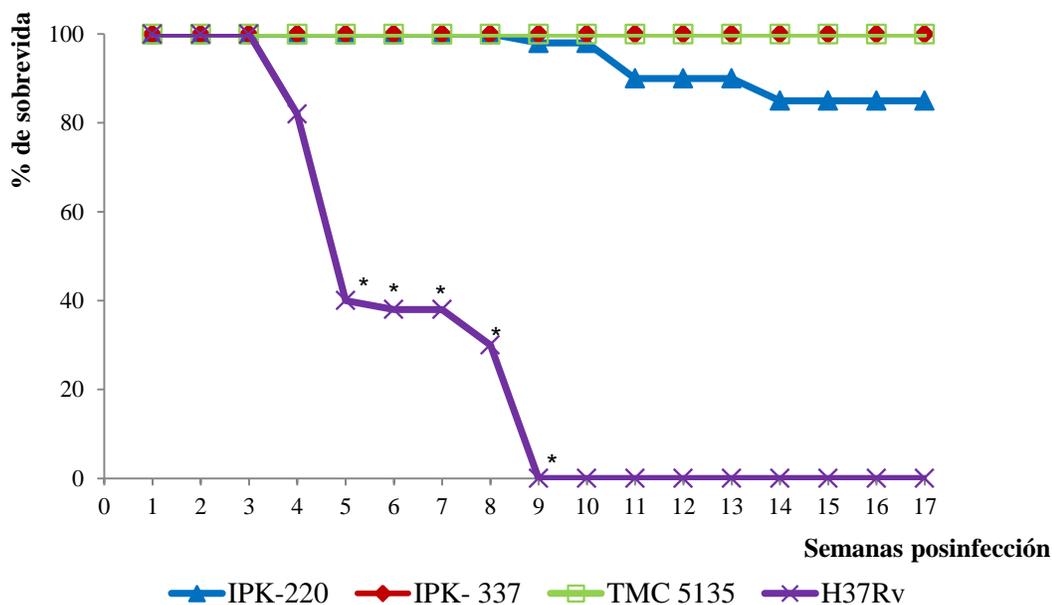


Figura 5. Curvas de sobrevivida de los animales infectados con *M. habana'* IPK-220, IPK-337 y TMC 5135. El grupo control se inoculó con *M. tuberculosis* H37Rv. * $p < 0,05$ entre el grupo control y los grupos infectados con *M. habana'*.

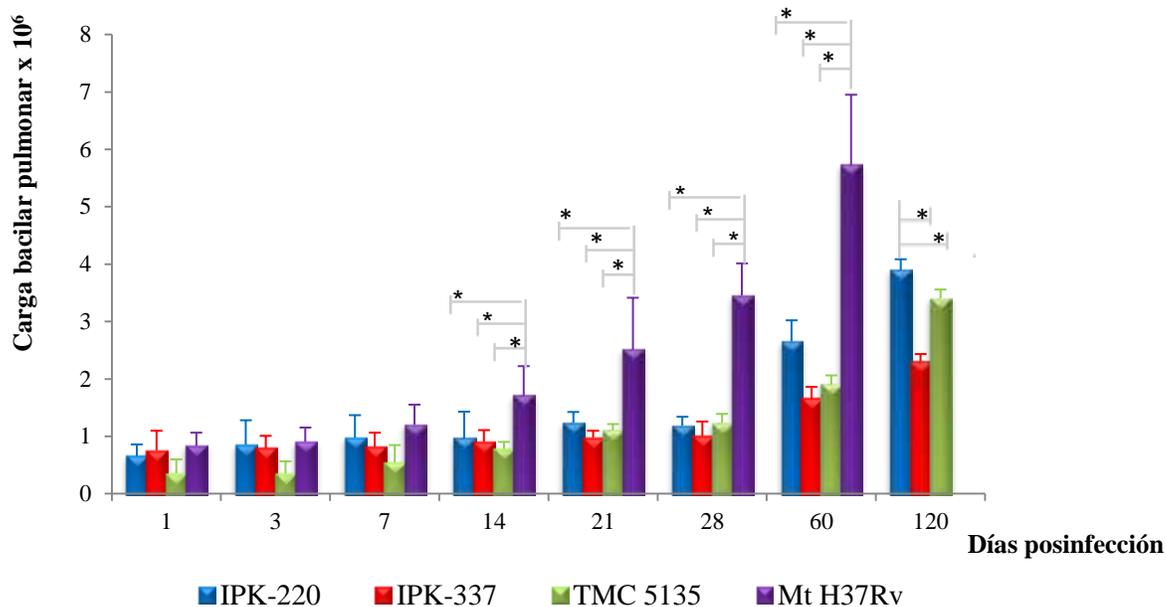
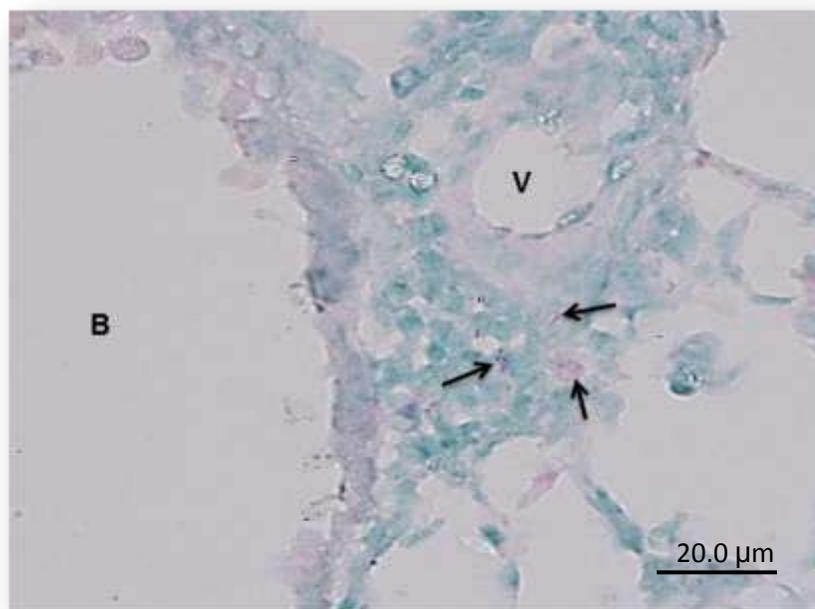


Figura 6. Carga bacilar en los pulmones de los ratones infectados i.t. con *M. habana'* IPK-220, IPK-337, TMC 5135 y *M. tuberculosis* H37Rv. * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

La presencia de BAAR, se demostró en el 58% de los tejidos pertenecientes a los animales infectados con *M. 'habana'* y en el 100% de los que formaban parte del grupo control. Como se observa en la figura 7, estos se localizaron, fundamentalmente, en pequeñas zonas de infiltrado inflamatorio situadas en los espacios perivascular y peribronquiales. Esta localización coincidió con las primeras manifestaciones de reacción histológica, en la fase temprana del experimento (primer mes), la cual se caracterizó por infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y M ϕ .



Aumento 100x.

Figura 7. Demostración de BAAR en el tejido pulmonar de un ratón BALB/c infectado i.t con *M. 'habana'* IPK-337, a través de la tinción de ZN. **B:** Bronquio **V:** Vénula

El porcentaje de superficie pulmonar afectado por neumonía se tomó como indicador del daño provocado por la infección con micobacterias. Como se muestra en la figura 8A las áreas de neumonía comienzan a aparecer luego de 28 días de administrado el inóculo. Estas se caracterizaron por la presencia de abundantes M ϕ vacuolados intraalveolares con algunas células gigantes multinucleadas y numerosos linfocitos alveolares e intersticiales rodeando las áreas perivascular y peribronquiales (Figura 8B).

Los ratones infectados con las cepas IPK-337 y TMC 5135 mostraron un porcentaje de consolidación pulmonar significativamente menor que el observado en el grupo control inoculado con *M. tuberculosis* H37Rv ($p < 0,05$). En esta última la neumonía abarcó, aproximadamente, un 40% del área pulmonar, luego de 2 meses de la infección. Para este mismo tiempo la inoculación con *M. 'habana'* IPK-220 indujo los más altos porcentajes de neumonía, resultados que difieren significativamente ($p < 0,05$) de los observados en los grupos que recibieron el resto de las cepas de *M. 'habana'* (Figura 8A).

Por su parte, en los pulmones de los ratones infectados con *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135, los granulomas comenzaron a aparecer tempranamente (7 días) y su talla se incrementó de manera significativa a través del experimento (Figura 8C). El acmé de la respuesta inmune se alcanzó el día 21 p.i., cuando los granulomas adquirieron su plena maduración. Estas estructuras se caracterizaron por un área central rica en M ϕ y una capa de infiltrado linfocitario limitante alrededor de los M ϕ infectados y activados (figura 8D). Al finalizar el experimento los animales que recibieron la cepa TMC 5135 mostraron granulomas tres veces mayores que el grupo control ($p < 0,05$) (Figura 8C).

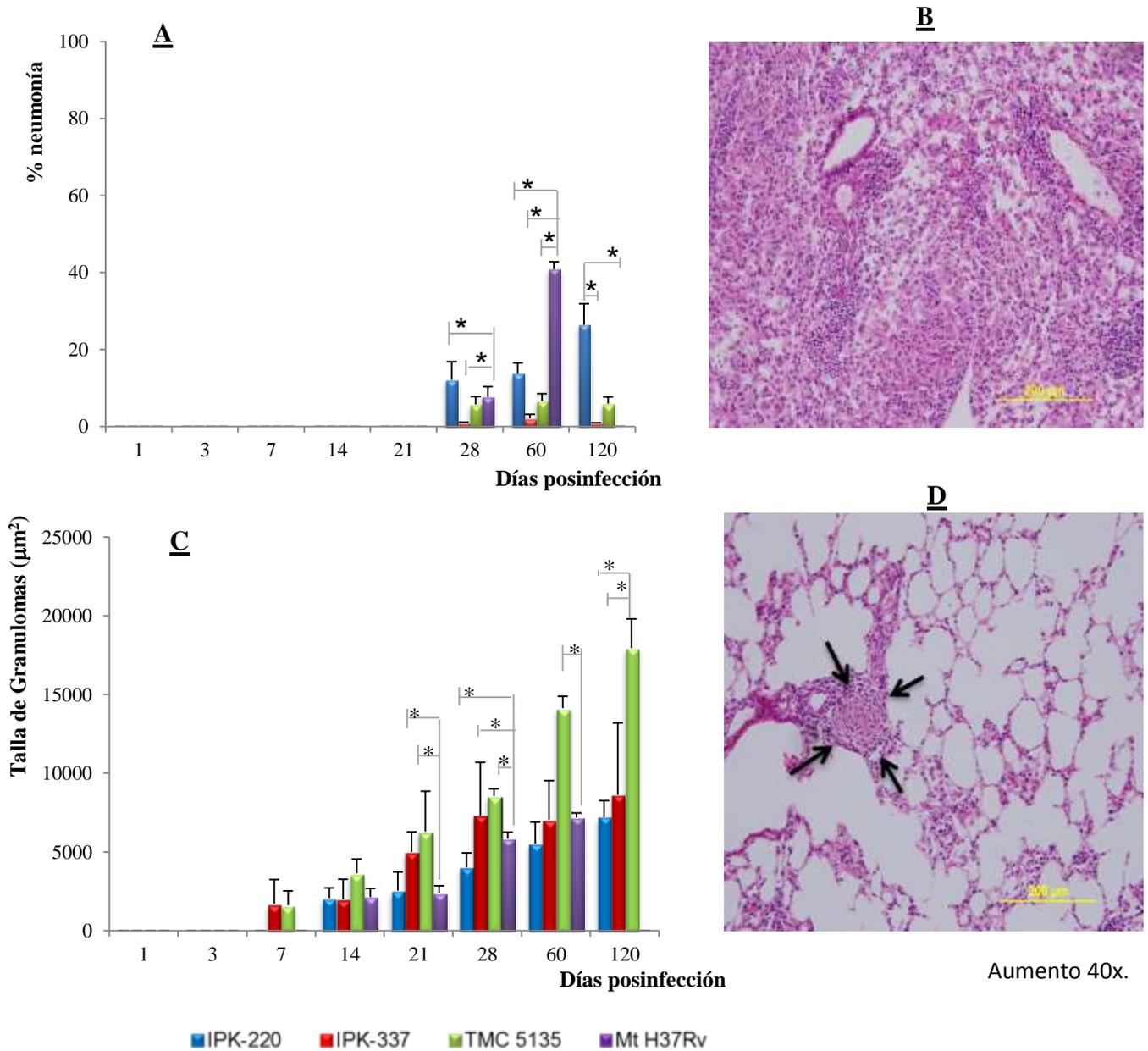


Figura 8. Morfometría del tejido pulmonar de ratones infectados con *M. habana* y *M. tuberculosis*. (A). Porcentaje afectado por neumonía. (B) Área neumónica observada en un ratón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv (día 60 p.i.) (C) Talla de los granulomas. (D) Granuloma desarrollado en un ratón infectado con *M. habana* TMC 5135 (día 21 p.i.). * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

Se cuantificó la expresión de ARNm específico para varias citoquinas e iNOS durante la infección con diferentes cepas de *M. 'habana'* y la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, empleada como control (Figura 9 A-D).

Como se muestra en la figura 9A, el grupo control experimentó un incremento progresivo en la expresión del ARNm específico para IFN- γ . El valor máximo, en este grupo, se alcanzó el día 21 p.i., siendo este significativamente mayor que el inducido por las cepas de *M. 'habana'*, seguido por un decremento pronunciado en los días 28 y 60. En contraste, *M. 'habana'* IPK-337 indujo un aumento progresivo en la expresión de IFN- γ , con un pico de expresión el día 60 p.i. Dos meses más tarde, este valor disminuyó solamente el 5% con respecto al nivel máximo alcanzado, resultando mayor que el inducido por la cepa H37Rv durante la etapa tardía de la infección. Por su parte *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-220 indujeron la menor expresión de IFN- γ , sin embargo esta fue estable durante todo el experimento.

La infección con *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337 provocó una expresión de TNF- α significativamente mayor que la inducida por *M. tuberculosis* H37Rv ($p < 0,05$), mientras que los ratones infectados con la cepa IPK-220 mostraron los menores valores de expresión para esta citoquina (Figura 9B).

Como se muestra en la figura 9C, la máxima expresión de iNOS se observó en los primeros tres días del ensayo, seguido por una disminución progresiva de los mismos a lo largo del experimento. Los animales inoculados con *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337 indujeron valores similares y los más elevados de esta enzima, resultados estadísticamente significativos, al compararlos con el resto de los grupos estudiados.

Luego de dos semanas de producida la infección, los ratones receptores de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. 'habana'* IPK-220 mostraron un incremento progresivo de la expresión de IL-4, siendo estos, significativamente diferentes al resto de los grupos infectados con cepas de *M. 'habana'* ($p < 0,05$) (Figura 9D).

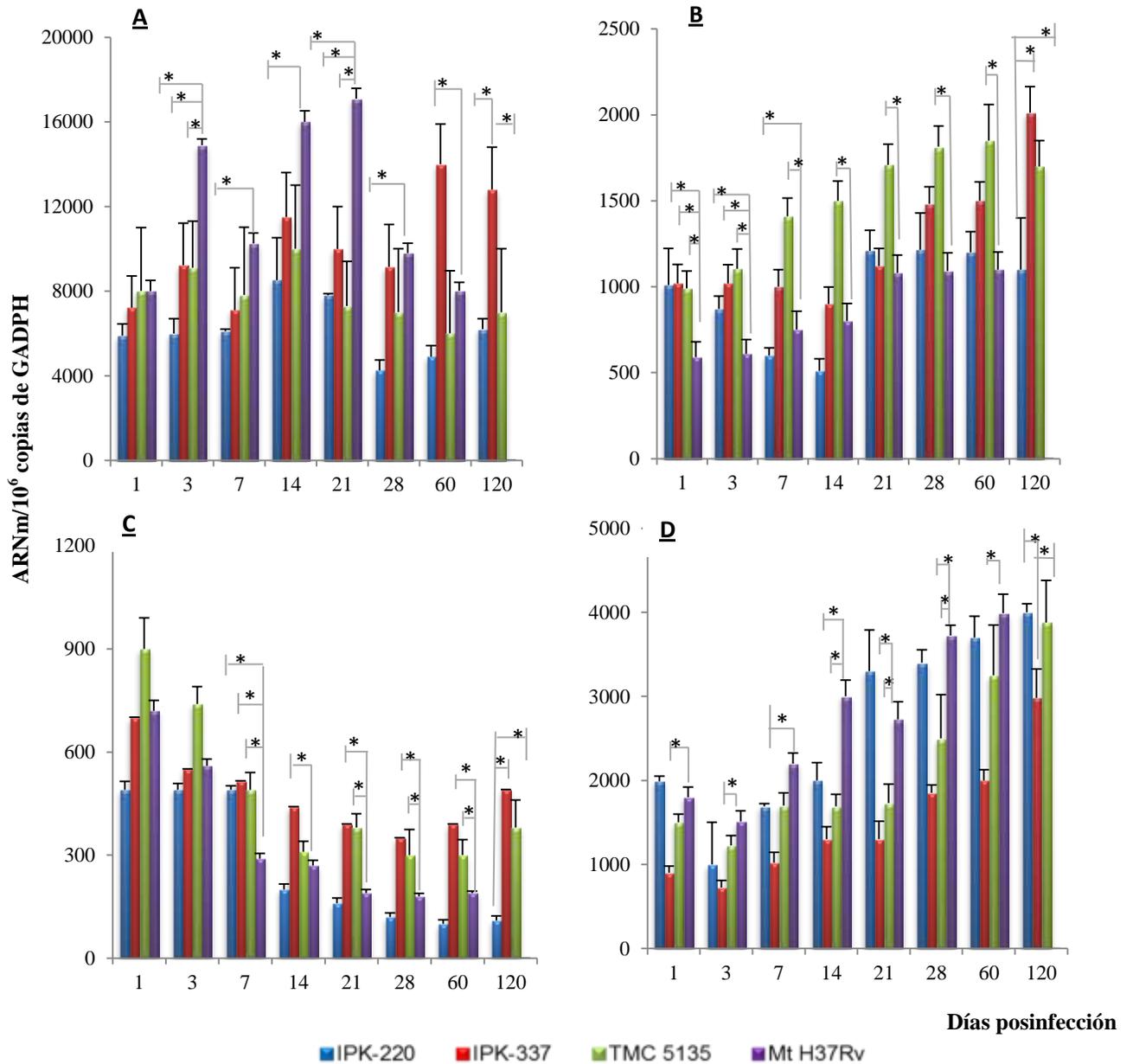


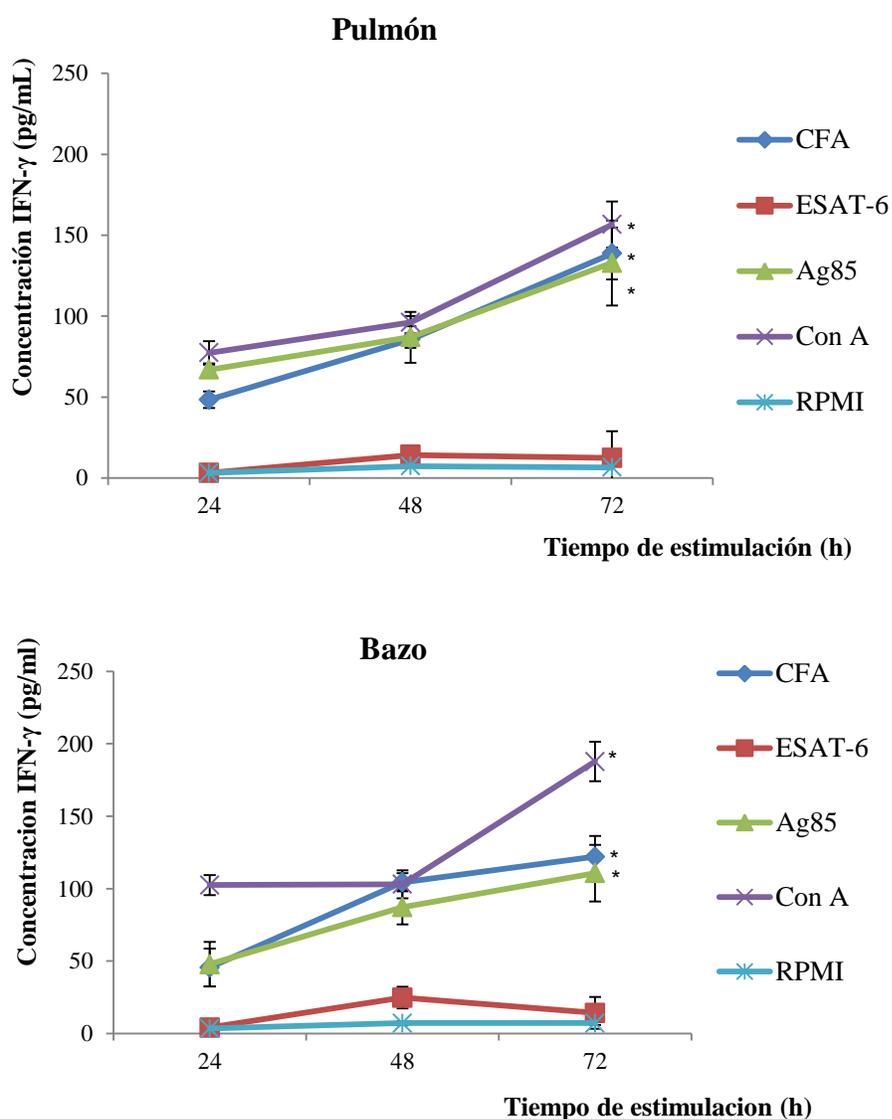
Figura 9. Expresión cuantitativa de ARNm codificador de factores inmunológicos en pulmones de ratones infectados con cepas de *M. habana* y *M. tuberculosis* H37Rv.

A: IFN- γ , **B:** TNF- α , **C:** iNOS, **D:** IL-4. * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

IV.2. Inmunogenicidad y biodistribución de cepas vivas de *M. 'habana'* empleadas como vacunas en ratones BALB/c

IV.2.1 Tiempo óptimo de exposición antigénica de los cultivos celulares provenientes de los ratones vacunados con *M. 'habana'* TMC 5135.

Como se muestra en la figura 10, la mayor producción de IFN γ ($p < 0,05$) en todos los órganos analizados, se observó luego de 72 h de exposición a los estímulos antigénicos, cuando se comparó con el control sin estimular. Dicho tiempo de exposición se seleccionó para la cuantificación de IFN γ en los restantes sacrificios.



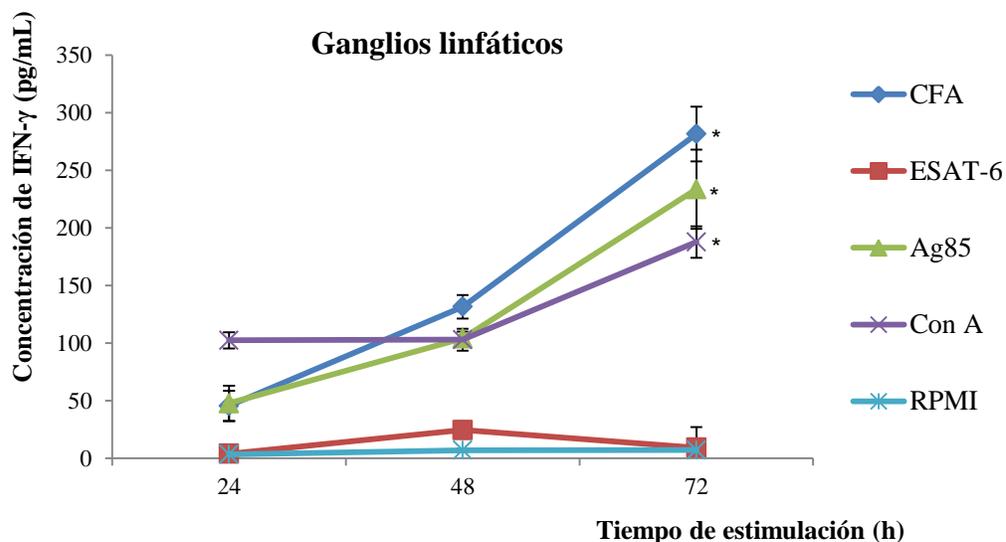


Figura 10. Producción de IFN- γ (pg/mL) por los cultivos celulares de pulmón, bazo y ganglios linfáticos de ratones inmunizados con *M. 'habana'* TMC 5135 sometidos a estimulación con antígenos de *M. tuberculosis* en intervalos de 24, 48 y 72 h. * $p < 0,05$ con respecto al cultivo sin estimular.

Los E/C correspondientes a las 72 h de estimulación antigénica, se muestran en la Tabla 3. Se registraron índices de estimulación frente al mitógeno ConA acordes a los reportados en este tipo de estudio ($E/C > 20$) (Pérez et al., 2000). Los menores valores de E/C se encontraron en el sobrenadante de los órganos estimulados con ESAT-6, los cuales resultaron menores que 3, en todos los órganos estudiados. Los cultivos de ganglios linfáticos mostraron los mayores E/C tanto frente a CFA como al Ag85b, siendo estos de 40,4 y 32,8; respectivamente.

Tabla 3. E/C, expresado como producción de IFN- γ en cultivo de células de pulmón, bazo y ganglios linfáticos de animales vacunados con '*M. habana*' TMC 5135, tras 72 h de estimulación con antígenos de *M. tuberculosis*

Estímulo antigénico	IFN- γ					
	Pulmón		Bazo		Ganglio	
	Media (pg/mL) \pm DS	E/C	Media (pg/mL) \pm DS	E/C	Media (pg/mL) \pm DS	E/C
Sin antígeno	6,5 \pm 1,2		7,2 \pm 1,3		7,2 \pm 1,3	
CFA	141,7 \pm 16,0	21,8	122,0 \pm 14,3	17,2	281,5 \pm 23,8	40,4
ESAT-6	12,32 \pm 1,5	1,9	14,17 \pm 5,3	2,0	9,33 \pm 2,7	0,2
Ag-85b	132,8 \pm 26,2	20,5	110,7 \pm 19,5	15,7	233,6 \pm 34,3	32,8

¹E/C=Concentración de IFN- γ en cultivos estimulados / Concentración de IFN- γ en cultivos sin estimular.

IV.2.2 Inmunogenicidad inducida por la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337.

En la figura 11 se muestran los valores de concentración de IFN- γ para aquellas dosis que resultaron las mayores inductoras de esta citoquina. Estas dosis se correspondieron con 2500 y 8000 bacterias para las cepas IPK-337 y TMC 5135, respectivamente (Datos no mostrados).

Las células de ganglios inguinales, bazo y pulmones de los animales vacunados con *M. 'habana'* y estimulados con CFA o con Ag85b produjeron niveles significativamente mayores de IFN- γ que los inmunizados con BCG, al finalizar el experimento. La mayor producción de esta citoquina se observó en los ratones que recibieron *M. 'habana'* TMC 5135.

La estimulación antigénica con ESAT-6 indujo valores inferiores a los 15 pg/mL de IFN- γ en los tres órganos ensayados durante todo el experimento. Estos valores no mostraron diferencias significativas al compararlos con el grupo control.

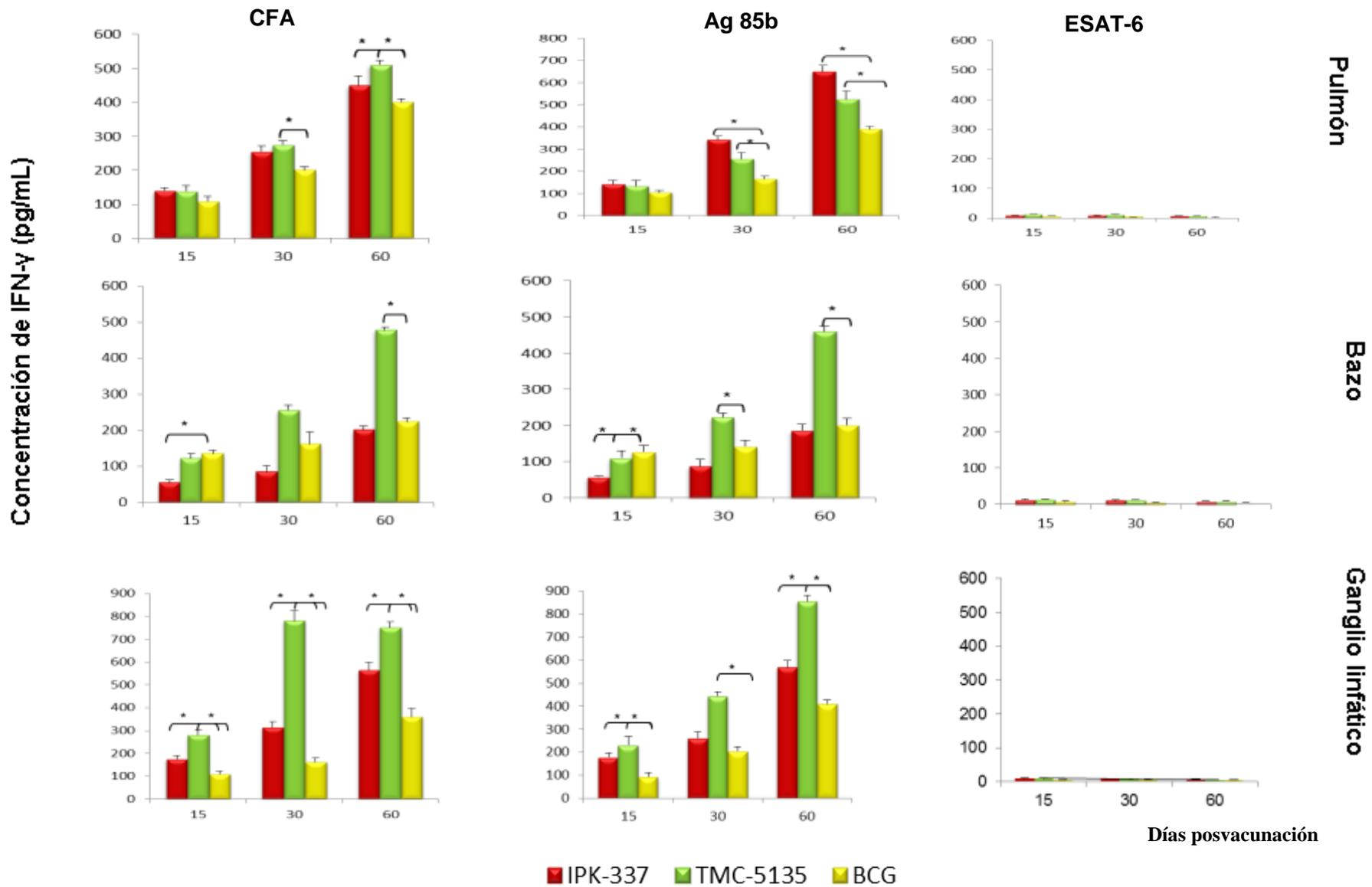


Figura 11. Cuantificación de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos celulares de pulmón, bazo y ganglios linfáticos de ratones vacunados con cepas de *M. habana* y posteriormente estimulados con CFA, Ag85b y ESAT-6, en comparación con un grupo control inmunizado con BCG. * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

IV.2.3. Biodistribución de las cepas *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337 empleadas como vacuna subcutánea en ratones BALB/c.

Se constató diseminación de las cepas hacia todos los sitios analizados. Los animales receptores de IPK-337 mostraron la menor carga bacilar en el sitio de inoculación, mientras que los vacunados con TMC 5135 o con BCG mostraron una carga bacteriana similar a los 15 y 30 días p.v. Para el día 60 del experimento se observaron valores trece veces mayores en los ratones inmunizados con BCG (Figura 12).

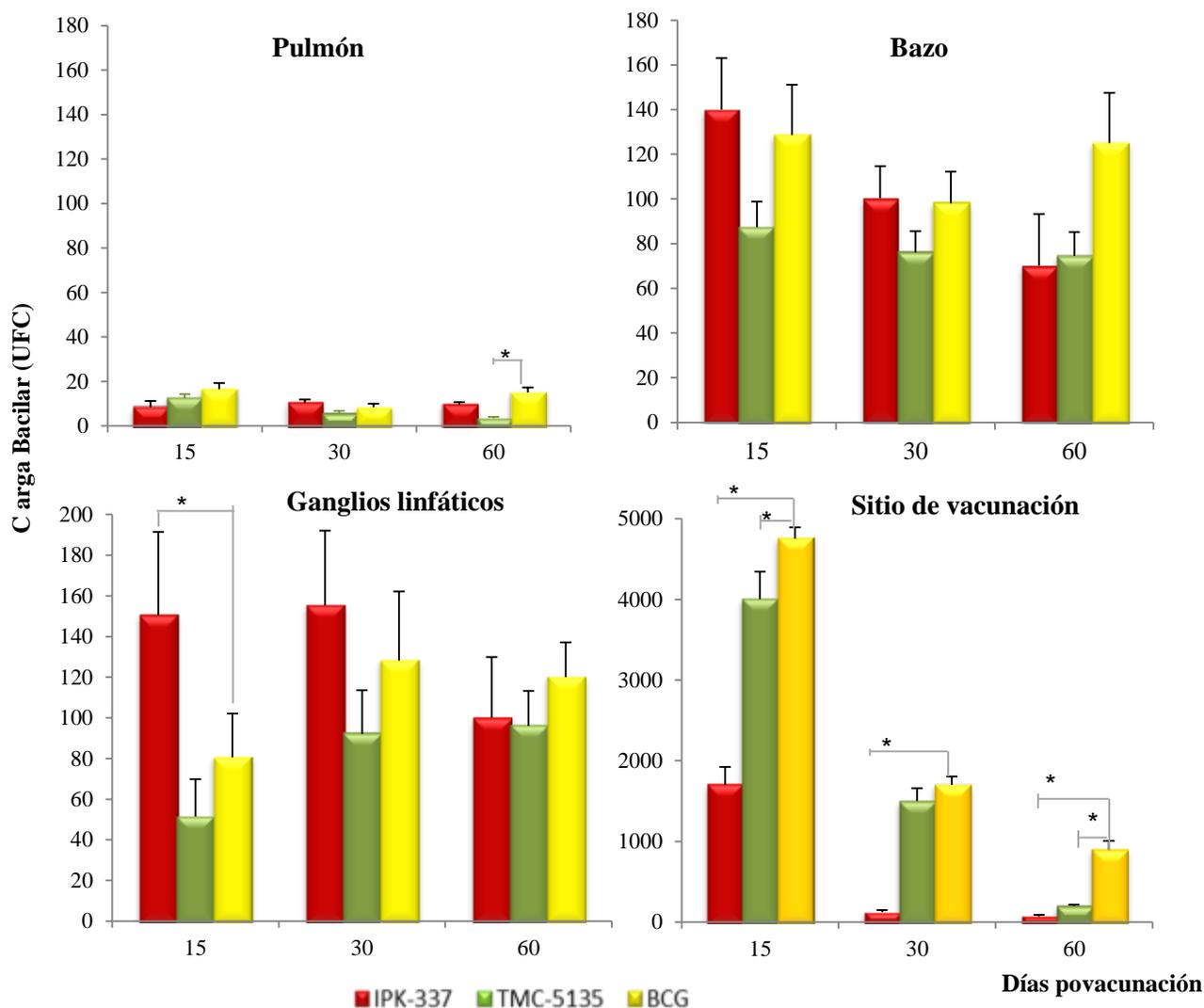


Figura 12. Carga bacilar en pulmones, bazo, ganglios linfáticos inguinales y sitio de vacunación pertenecientes a ratones BALB/c inmunizados con cepas de *M. 'habana'* o BCG. * $p < 0,05$ entre los grupos indicados.

Los ganglios linfáticos cercanos al sitio de vacunación (inguinales) provenientes de los animales inmunizados con *M. 'habana'* IPK-337 revelaron la mayor carga bacilar en los 15 y 30 días posteriores a la inmunización, sin embargo al finalizar el experimento no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratones vacunados (Figura 12).

La multiplicación bacilar esplénica fue similar tanto en los ratones vacunados con las cepas de *M. 'habana'* como con BCG, mientras que en los pulmones se observó una carga bacteriana significativamente menor en los animales que recibieron *M. 'habana'* con respecto al grupo control (Figura 12).

IV.3. Seguridad de la vacunación con cepas de *M. 'habana'* empleadas como vacuna viva en ratones inmunodeficientes.

La figura 13 muestra que los animales inoculados con *M. 'habana'* TMC 5135 sobrevivieron más tiempo que los que recibieron BCG, lo cual pudiera sugerir una mayor atenuación de la primera. Por su parte, *M. 'habana'* IPK-337 indujo una mortalidad ligeramente superior a la producida en el grupo control, no obstante estas diferencias no resultaron significativas.

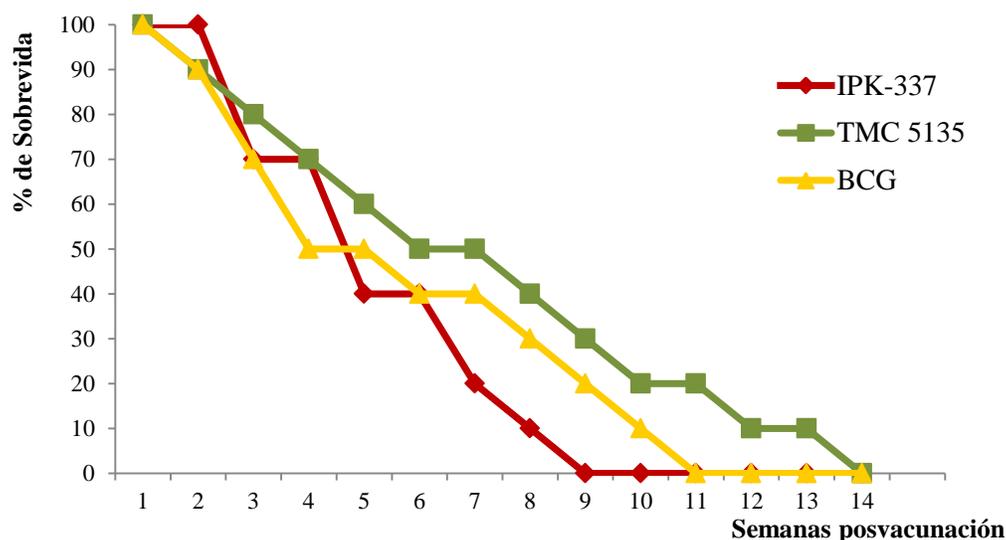


Figura 13. Curvas de supervivencia de los ratones desnudos (20 animales / cepa) vacunados subcutáneamente en la base de la cola con 2500 UFC de *M. 'habana'* IPK-337, 8000 UFC de *M. 'habana'* TMC 5135 y 8000 UFC de BCG Phipps.

IV.4. Protección conferida por la vacunación con cepas vivas de *M. habana* en ratones BALB/c tras el reto con *M. tuberculosis* H37Rv.

Grupos de cuatro ratones recibieron la vacunación subcutánea con 2500 y 8000 bacilos de *M. habana* IPK-337 y TMC 5135, respectivamente. Estas dosis se correspondieron con las que indujeron una mayor producción de IFN- γ en el experimento de inmunogenicidad (ver acápite IV.2.2).

Todos los animales vacunados con *M. habana* TMC 5135 o con BCG Phipps sobrevivieron al reto con *M. tuberculosis* H37Rv. En cambio los ratones que recibieron *M. habana* IPK-337 y los que funcionaron como control sin vacunar (SS) mostraron un 60% y 75% de sobrevida, respectivamente (Figura 14).

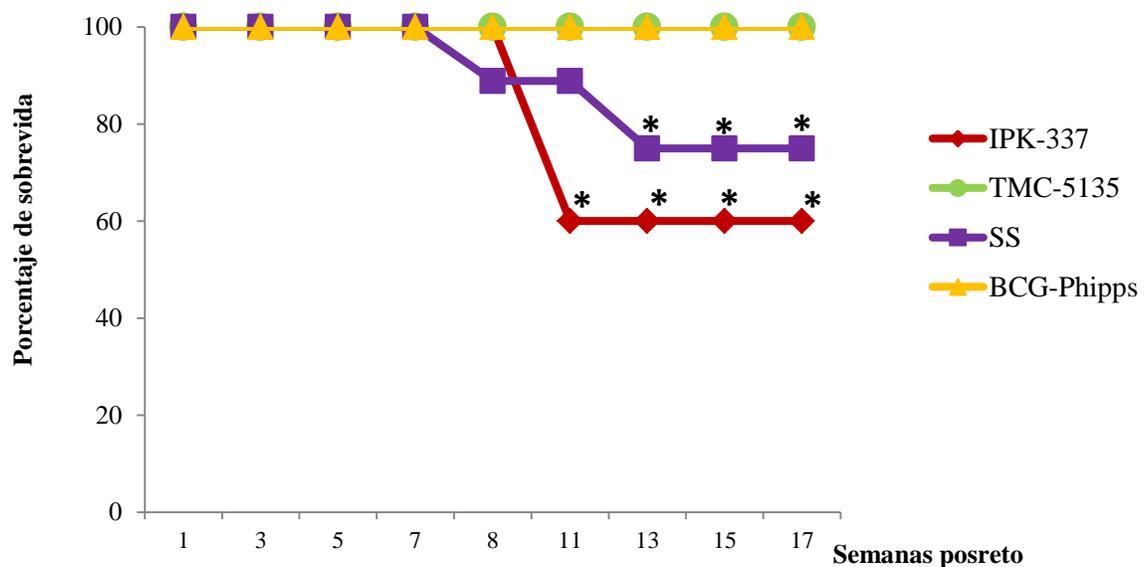


Figura 14. Curvas de sobrevida de los ratones vacunados subcutáneamente con *M. habana* IPK-337, TMC 5135 y BCG Phipps, luego del reto experimental con *M. tuberculosis* H37Rv. Paralelamente se empleó un grupo al que se le administró SS estéril, el cual funcionó como control de no vacunación. * $p < 0,05$ entre los grupos vacunados y el grupo control.

La figura 15 muestra la carga bacilar pulmonar de los ratones vacunados y retados, posteriormente, con *M. tuberculosis* H37Rv. Para el primer tiempo de sacrificio se

cuantificaron valores similares de UFC en los ratones inmunizados con *M. 'habana'* y el grupo sin vacunar. Solo los animales inmunizados con BCG mostraron valores significativamente menores. Sin embargo, hacia el final del experimento, se pudo constatar una ligera disminución en la carga bacteriana en los animales que recibieron las cepas de *M. 'habana'*, la cual contrasta con la elevada multiplicación encontrada en el grupo control sin vacunar, diferencias que resultaron estadísticamente significativas. En este punto no se registraron diferencias entre la vacunación con *M. 'habana'* y con BCG.

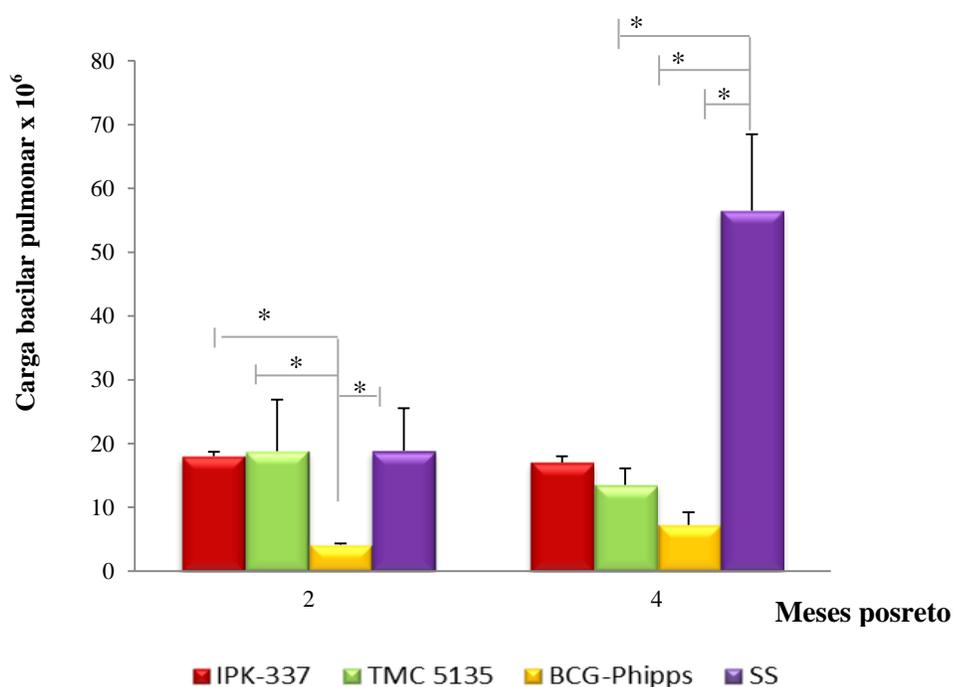


Figura 15. Cuantificación de la carga bacilar en los ratones inmunizados con *M. 'habana'* IPK-337, TMC 5135 y BCG Phipps y retados con *M. tuberculosis* H37Rv. Las barras violetas se corresponden con el grupo que no recibió vacunación (SS). * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

De manera general y a lo largo del experimento (Figura 16), todos los ratones que recibieron algún tipo de vacunación mostraron menor porcentaje de neumonía en comparación con aquellos inoculados con SS. En el tiempo correspondiente al primer sacrificio (2 meses) el porcentaje de consolidación pulmonar en los animales vacunados

con *M. 'habana'* TMC 5135 fue menor que en aquellos que recibieron BCG Phipps, aunque esta diferencia no tuvo significación estadística. Las observaciones finales (4 meses) no revelaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales inmunizados.

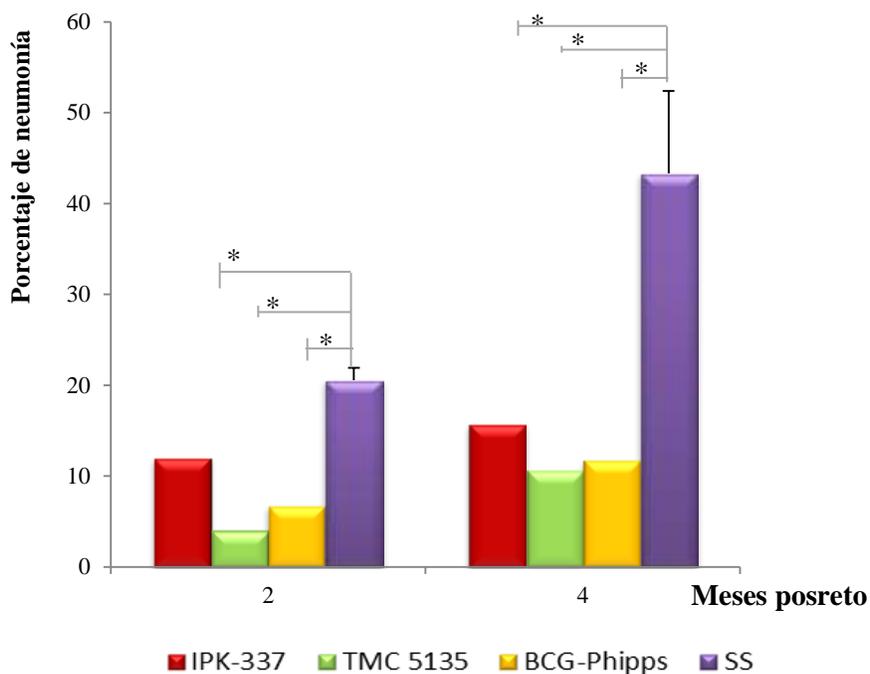


Figura 16. Porcentaje de consolidación pulmonar en los animales vacunados con cepas de *M. 'habana'* y BCG, después del reto con *M. tuberculosis* H37Rv. Las barras violetas se corresponden con el grupo al que se le administró SS estéril (como control de no vacunación). * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

La talla de los granulomas, constituyó otra de las variables medidas durante el análisis morfométrico y sus resultados se muestran en la figura 17. A pesar de que en los dos meses p.r. no se observaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados y el control sin vacunar, se observa una menor talla en los granulomas correspondientes a este último grupo. En el segundo tiempo de sacrificio los mayores granulomas se correspondieron con el grupo de ratones que recibieron *M. 'habana'* TMC 5135.

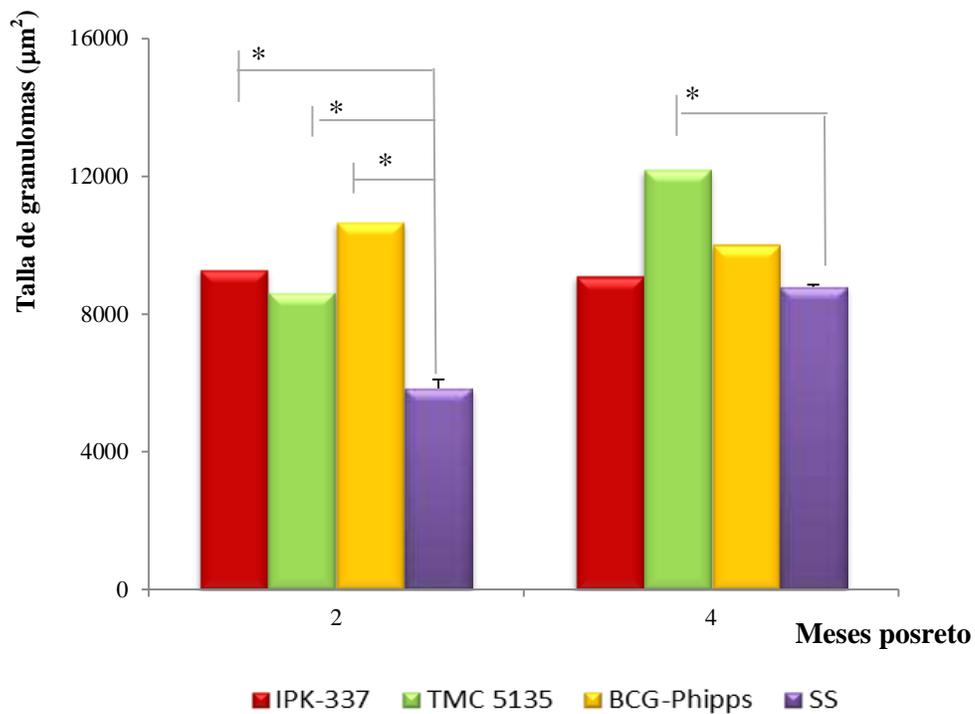


Figura 17. Talla de los granulomas observados en el tejido pulmonar provenientes de animales vacunados con cepas de *M. 'habana'* y BCG, después del reto con *M. tuberculosis* H37Rv. Las barras violetas se corresponden con el grupo al que se le administró SS estéril. * $p < 0,05$ entre los grupos señalados.

V. DISCUSIÓN

Las vacunas profilácticas constituyen una de las herramientas más útiles y costo-efectivas en la reducción de la morbi-mortalidad asociada a las enfermedades infecciosas (Martín & Gicquel, 2011). A pesar de la aversión inicial hacia el desarrollo de inmunógenos vivos, el grupo de expertos en vacunas antituberculosas de la OMS, defiende enérgicamente el uso de este tipo de vacunación (Ho et al., 2010). Estos inmunógenos constituyen potentes estimuladores de una respuesta inmune protectora tomando como ventajas el amplio espectro de expresión antigénica así como la habilidad para estimular una combinación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T (Kaufmann & McMichael, 2005; Baumann, Eddine & Kaufmann, 2006). Adicionalmente, estos candidatos, pueden administrarse a través de la vía mucosal, la cual juega un papel central en la TB, proporcionando un blanco valioso para la protección contra patógenos de transmisión respiratoria (Li et al., 2012).

Entre los candidatos vacunales vivos contra la TB, se destacan aquellos que introducen diferentes variaciones genéticas en BCG, produciendo recombinantes capaces de i) sobreexpresar antígenos con inmunogenicidad probada (ej. Ag85 a y b) (Romano & Huygen, 2012) o antígenos propios del estado de latencia (ej. enzima L, D-transpeptidasa) (Nolan & Lamichhane, 2010) y ii) expresar el gen de la listeriolisina de *L. monocytogenes* y mutar el gen de la ureasa para mejorar su inmunogenicidad (ej. VPM 1002) (WHO, 2013). De igual forma, se han probado en modelos preclínicos y ensayos clínicos Fase I, cepas de *M. tuberculosis*, genéticamente inactivadas para los genes reguladores de la transcripción de *phoP* y *fad26* (Romano & Huygen, 2012).

Las MNT también forman parte de las propuestas de nuevos candidatos vacunales. Estas se han empleado tanto en su forma natural, inactivadas por calor o radiaciones, como portando genes de *M. tuberculosis*, responsables del aumento de su inmunogenicidad. Entre ellas se destacan los estudios que emplean *M. smegmatis* (Romano & Huygen, 2012), *M. w* (Gupta et al., 2009) y *M. 'habana'* (Gupta et al., 1979). Un preparado inmunomodulador que emplea una cepa inactivada de *M. vaccae*, se encuentra en la actualidad en fase III de ensayos clínicos, como adyuvante de la terapia con drogas antituberculosas (WHO, 2013).

Análisis bioquímicos han llevado a considerar a *M. 'habana'* como sinónimo de *M. simiae* serotipo 1 (Meissner & Schröder, 1975; Weiszfeiler, Karaseva & Karczag, 1981). Sin embargo, la presencia de diferencias serológicas y la composición de GPL permiten diferenciarlos (Kay-Hooi et al., 1996; Mederos, Valdivia & Valero-Guillén, 2008).

En particular *M. 'habana'* TMC 5135 se ha propuesto, en diversas formas (viva, proteínas secretorias, irradiada, muerta por calor) como candidato vacunal contra la TB y otras micobacteriosis (Gupta et al., 1979; Chaturvedi et al., 1999a; Raj et al., 2003). Esta cepa ofrece protección contra aislamientos virulentos de *M. tuberculosis*, mostrando mayor eficacia que BCG, en modelos murinos (Gupta et al., 1979).

A pesar de estas evidencias experimentales, poco se conoce acerca de la virulencia, la respuesta inmunológica y la seguridad de la aplicación de *M. 'habana'* como vacuna en modelos animales apropiados para el estudio de estas variables. Nuestros resultados confirman y enriquecen los datos disponibles, a través de la caracterización de tres cepas de *M. 'habana'* en términos de patogenicidad, inmunogenicidad y potencialidad como vacuna contra la TB.

V.1 Virulencia de cepas de *M. 'habana'* en un modelo experimental de TB pulmonar progresiva

La seguridad constituye una de las grandes preocupaciones y el mayor reto en el desarrollo de vacunas vivas en virtud de proveer suficiente garantía para su posterior

aplicación en humanos (Sadoff & Hone, 2005; Singhal, Bisht & Joshi, 2010). Tradicionalmente, estos estudios emplean la evaluación del candidato en diferentes modelos experimentales, los cuales involucran desde cultivos celulares, animales susceptibles o resistentes a la enfermedad, hasta el uso de animales inmunodeficientes (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010; Hernández-Pando et al., 2012). Por otra parte, el conteo de la población bacteriana en los pulmones, la sobrevivencia de los animales tras la infección con dosis letales, así como la evaluación histopatológica de los principales órganos dianas constituyen herramientas importantes para comprobar la virulencia de las micobacterias (Smith, 1981). En el presente trabajo se observó una buena correlación entre estos tres parámetros.

Nuestros resultados sugieren la atenuación natural de las cepas *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135, permitiendo la sobrevivencia total de los animales, luego de cuatro meses de infección. Estos hallazgos se correspondieron con cargas bacilares significativamente menores así como con daños mínimos en el tejido pulmonar, al comparar estos grupos de animales con los que recibieron la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv.

En nuestra opinión los estudios de sobrevivencia, a pesar de no ser los ideales, constituyen un requisito imprescindible en el análisis de enfermedades letales como la TB. Estos permiten obtener representaciones gráficas de la probabilidad que tiene un animal de experimentación de sobrevivir en función del tiempo (Luis & Boffi, 1991). Para la interpretación de los resultados, el método de Kaplan-Meier resultó especialmente útil, dado el pequeño número de ratones por grupo de ensayo. Este nos permitió obtener una curva de sobrevivencia confiable al poder incluir todas las observaciones realizadas en función del cálculo de los animales que sobrevivieron y su probabilidad de hacerlo en cada momento en el que se produjo una muerte eventual.

La carga bacilar en los pulmones de los animales infectados se correspondió con los resultados de sobrevivencia. El conteo de UFC/pulmón (en el orden de los millones de bacterias) en todos los grupos de ensayo, responde a las características propias de los modelos animales que utilizan altas dosis infectantes de micobacterias por vía i.t. (Hernández-Pando et al., 1996; Rook, Hernández-Pando & Zumla, 2009). Este modelo

se encuentra concebido para países en vías de desarrollo, donde la exposición previa a micobacterias ambientales resulta muy elevada demandando el requisito de un inóculo potente para inducir la enfermedad progresiva (Hernández-Pando et al., 2004; Rook, Hernández-Pando & Zumla, 2009).

Durante la primera fase del experimento (1^{er} mes) se observó una multiplicación bacteriana en forma de meseta en los grupos de animales infectados con *M. 'habana'*. Posteriormente (2^{da} fase), se registró un aumento en la proliferación bacteriana, pero este fue significativamente menor con respecto al grupo control y a los animales que recibieron la cepa IPK-220. En estos últimos este comportamiento se acompañó de una amplia diseminación de la neumonía, lo cual correlaciona con la muerte de los animales. Del análisis de estos resultados parece evidente que los animales infectados con las cepas *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 controlan con mayor eficiencia la multiplicación bacteriana pulmonar, registrándose un menor conteo de UFC acompañado del aumento en la talla de los granulomas pulmonares.

Es interesante destacar el registro de un 20% de mortalidad en los ratones infectados con *M. 'habana'* IPK-220, al término del experimento. Estos resultados se correspondieron con la alta carga bacilar y con un daño pulmonar que alcanzó, aproximadamente el 30% de la superficie de este órgano. De igual manera la inducción de una respuesta del tejido ante la infección por esta cepa fue significativamente menor, expresada en granulomas que aparecieron de manera retardada cuyas tallas promedio fueron menores que las calculadas en los ratones infectados con el resto de las cepas de *M. 'habana'*.

La literatura internacional refiere un amplio espectro de virulencia al infectar modelos experimentales con diferentes especies de micobacterias. Collins & Watson (1981) reportan que el patrón de crecimiento de estos microorganismos en pulmones, hígado y bazo de ratones infectados puede variar desde una rápida eliminación (en aquellas cepas completamente avirulentas) hasta la persistencia continua, lo cual provoca la muerte de un número importante de animales. En dicho estudio se demostró una reducción lenta y progresiva de las cargas bacilares en los pulmones de ratones infectados con *M. 'habana'* TMC 5135 y escasas pistas de diseminación hacia hígado y bazo.

Nuestros resultados se corresponden con los reportados por Raj et al. (2003), los cuales demuestran la seguridad de la inoculación endovenosa de 10^6 UFC de *M. 'habana'* TMC 5135. Este experimento muestra una sobrevida total con reducción paulatina de la carga bacilar y tendencia a la esterilización de los diferentes órganos infectados, lo que queda evidenciado a partir de la tinción específica para estos bacilos así como el recobrado de pocas UFC (Raj et al., 2003).

A pesar de que nuestra investigación coincide con el empleo de la cepa *M. 'habana'* TMC 5135 y un inóculo similar, que en el estudio referido anteriormente, la cinética de multiplicación bacteriana difiere de uno al otro. En opinión de la autora este fenómeno pudiera estar mediado por las diferencias en las rutas de inoculación. Cuando la infección se realiza por la vía aérea, como en nuestro estudio, se requiere de un periodo mayor para que las micobacterias o sus antígenos se diseminen desde los pulmones a los ganglios linfáticos regionales y al bazo, donde se genera la respuesta inmune. Por su parte, en los ratones infectados por la vía endovenosa, el bazo se infecta de forma inmediata lo que resulta en la generación de una respuesta inmune más temprana y en consecuencia la estabilización de la infección no solo en este órgano sino también en los pulmones.

Por otra parte Jung et al. (2008) demuestran que cuando las micobacterias llegan a los pulmones a través de la vía sanguínea necesitan ser transportadas por los fagocitos sanguíneos, primero, a través del endotelio vascular y luego a través del epitelio respiratorio, para poder entrar, finalmente, en los alveolos pulmonares. En contraste con lo que sucede en la vía respiratoria, donde las bacterias alcanzan directamente los alveolos pulmonares, lo que facilita la instalación de la infección y la multiplicación bacteriana.

La apariencia microscópica de los pulmones constituye un parámetro evaluador de la severidad de la infección. Esta reporta grandes ventajas cuando deja de ser una simple descripción cualitativa para convertirse en parámetros cuantificables. El empleo de morfometría automatizada, en nuestro trabajo, permitió ponderar el daño pulmonar provocado por la infección, así como la respuesta del tejido a la invasión micobacteriana.

Se demostró la presencia de BAAR en el 58% de los animales que recibieron las cepas de *M. habana* y en la totalidad de los infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, lo cual corrobora que los cambios histológicos observados se producen en respuesta a la infección experimental.

Algunos autores reportan la baja sensibilidad de la tinción de ZN en la TB experimental, oscilando entre cero y 44% (Goel & Budhwar, 2007). Nuestros resultados superan estas cifras, a la vez que demostramos que, a pesar de que ambos grupos de ratones reciben igual carga infectante, aquellos inoculados con *M. habana* muestran una menor positividad de BAAR, en esta tinción. Este comportamiento pudiera encontrar su explicación en que solo los bacilos intactos son capaces de teñirse con el colorante, por lo que en aquellas áreas paucibacilares o con presencia de abundantes detritos celulares, como lo puede ser el interior de los granulomas, se dificulta su detección, ambos aspectos se demuestran tras la infección con *M. habana*.

En la actualidad el empleo de técnicas inmunohistoquímicas que incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos a diversos antígenos micobacterianos, aumentan considerablemente la posibilidad de detección de bacterias en los tejidos. Su positividad, tanto en la TB experimental como en la clínica, fluctúa entre el 69-100% y permite la localización de los bacilos íntegros o la presencia de sus detritos, los cuáles retienen sus propiedades antigénicas (Goel & Budhwar, 2007).

En general, la calidad y la cinética de la respuesta inflamatoria, particularmente en los pulmones, es un buen predictor del desenlace de la infección y la inmunopatología de este órgano puede emplearse como indicador de virulencia de diferentes cepas de micobacterias (Mehrad & Standiford, 1999). Los ratones infectados con las cepas *M. habana* IPK-337 y TMC 5135 mostraron los menores porcentajes de consolidación pulmonar y los mayores granulomas. Ambos aspectos apuntan a favor de una mayor atenuación de las mismas.

En este sentido, Manabe et al., en Estados Unidos de América (2002), demuestran la seguridad de la infección experimental con *M. microti*, especie perteneciente al complejo *M. tuberculosis*. Esta aseveración tiene como base la demostración de una baja carga

bacteriana, así como la ausencia de daños histológicos luego de la administración endovenosa o intraperitoneal de altas dosis de esta micobacteria, en ratones BALB/c (Manabe, Scot & Bishai, 2002).

Mycobacterium indicus pranii (*Mycobacterium w*) constituye un ejemplo del uso experimental de MNT como candidatos vacunales contra la TB. Gupta et al., en un estudio realizado en la India, en 2009, proveen evidencias acerca de que la infección murina con esta micobacteria, empleando diferentes vías de inoculación, es autolimitada y de corta duración, lo cual resulta crucial para evaluar su seguridad y la inducción de respuesta de memoria (Gupta et al., 2009).

La introducción e implementación de la ingeniería genética en las micobacterias abrió la posibilidad de obtener cepas atenuadas de *M. tuberculosis*. Sin embargo resulta extremadamente difícil la selección de los blancos genéticos, entre los aproximadamente 4000 genes que integran el genoma de este microorganismo. Por esta razón se han empleado diferentes estrategias para llevar a cabo este propósito (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

Los mutantes auxotróficos para la síntesis de aminoácidos (*proC* o *trpD*, auxótrofos para la síntesis de prolina o triptófano, respectivamente) o de ácidos nucleicos exhiben ciclos, limitados de replicación del microorganismo en el interior de las células del hospedero. El empleo de estos mutantes en modelos animales, muestra diversos grados de atenuación y de potencial vacunal, sin superar, en la mayor parte de los casos, el reportado para BCG (Martín & Gonzalo-Asensio, 2010).

A pesar de los múltiples intentos por conseguir cepas atenuadas de *M. tuberculosis* persiste la preocupación relacionada a la posibilidad de ocurrencia de reversión de las mutaciones. Por esta razón se ha llegado al consenso de que los candidatos deben presentar al menos dos mutaciones irreversibles e independientes. Las estrategias más recientes pretenden la combinación de una transformación que confiera auxotrofía con otra que afecte la virulencia del agente (Delogu & Fada, 2009).

Hsu et al. demuestran que *M. tuberculosis* mutante de RD1, induce una protección similar a BCG pero posee la limitante de mantener una virulencia residual y en

consecuencia una menor atenuación que esta última (Hsu et al., 2003). En esta línea de pensamiento, se han propuesto diferentes mutantes de *M. tuberculosis* para los genes *mce*, que codifican para proteínas encargadas de la entrada del patógeno a las células del hospedero (Aguilar et al., 2006). Otra de las estrategias se basa en la inactivación de *secA*, gen responsable de codificar uno de los componentes del sistema de secreción de proteínas micobacterianas involucradas en la inhibición de la apoptosis de las células infectadas. Consecuentemente, este promueve la supervivencia de *M. tuberculosis* en el interior de la célula hospedera. Por el contrario la inactivación de *secA*, resulta en un incremento de la apoptosis con el razonable aumento de la respuesta específica de células T CD8⁺ (Hinchey et al., 2007). Por otra parte Martín et al. reportan la inactivación de factores de transcripción esenciales en *M. tuberculosis*, como *phoP*, logrando obtener un fenotipo completamente atenuado en modelos celulares y animales (Cardona et al., 2009).

En nuestro estudio, al realizar un análisis integral de la respuesta del tejido a la infección, podemos observar que la maduración de los granulomas así como el incremento paulatino de su talla en el tiempo, el que llega a ser significativo en los ratones infectados con las cepas TMC 5135 e IPK-337, constituye un obstáculo en la progresión de la neumonía en estos animales. Estos resultados constituyen hallazgos interesantes si tenemos en cuenta que, en el modelo animal empleado, la extensión de la neumonía correlaciona con la progresión y severidad de la enfermedad, mientras que el tamaño de los granulomas correlaciona con resistencia y protección (Hernández-Pando et al., 2005).

Manabe et al. (2002) a pesar de demostrar la atenuación natural de *M. microti*, tras la infección experimental en modelos murinos, detectan la ausencia de granulomas durante los estadios tempranos de infección lo que pudiera constituir una limitante para su empleo como candidato vacunal. La no aparición de estas estructuras imposibilita el análisis de los mediadores que participan en la respuesta inmune, sobre todo de aquellos que resultan críticos en la inmunidad inducida por la vacunación (Thaiss & Kaufmann, 2010).

El granuloma tuberculoso es el resultado de la interrelación entre las bacterias y las células del hospedero, en el sitio de infección. El control de este proceso se asocia, comúnmente, al hospedero, en su objetivo por limitar el crecimiento bacteriano y prevenir la diseminación. En la actualidad este punto de vista es cuestionado y existe la tendencia creciente a considerar el granuloma como una estructura altamente dinámica, donde la bacteria desempeña un papel activo (Russell et al., 2009; Kondratieva et al., 2010).

A pesar de que diversos reportes destacan que *M. tuberculosis* puede dirigir la formación y maduración de granulomas, como parte de su ciclo de vida, se ha demostrado que en ausencia de estas estructuras no existe protección, al menos en los humanos. Los granulomas garantizan una yuxtaposición única entre las células T activadas y los M ϕ cargados de micobacterias. Por otra parte, la coincidencia temporal de la diferenciación de las células T, la consolidación del granuloma y la reducción del crecimiento micobacteriano en aquellos modelos animales que simulan la enfermedad en los humanos, sugiere causalidad entre estos fenómenos (Ehlers & Schaible, 2013).

Por esta razón, la autora coincide con los criterios esgrimidos por Ehlers & Schaible (2013), quienes consideran que a la luz de las nuevas consideraciones focalizadas en el papel de los granulomas desde la óptica del patógeno, no se pueden obviar las evidencias existentes a favor del papel protector de estas estructuras en la contención de la infección, entre las que se encuentran: i) Las células T transfieren inmunidad protectora y estimulan la formación de granulomas (Orme & Collins, 1983); ii) La acumulación de M ϕ (granulomas innatos) no elimina eficientemente a las bacterias hasta que no ocurre la activación por las células T (North & Izzo, 1993; Smith et al., 1997) y iii) Los individuos infectados con VIH muestran una pobre inflamación granulomatosa y un pobre control del crecimiento micobacteriano (Lawn, Butera & Shinnick, 2002).

La fagocitosis mediada por M ϕ , es uno de los eventos más importantes que se produce en la respuesta inmune innata ante la llegada de las micobacterias a los pulmones. Sin embargo, para que se desaten los mecanismos microbicidas, estos necesitan activarse, para lo cual requieren del IFN- γ liberado por las células T CD4⁺. Por lo tanto, de

acuerdo al paradigma Th1/Th2, la inmunidad mediada por células T frente a la TB está dominada por el primero.

La elevada expresión de factores inmunoprotectores (IFN- γ , TNF- α e iNOS) en los ratones infectados con las cepas *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135, sugieren que ambas desatan una fuerte respuesta inmune celular.

Como resultado de la infección respiratoria con micobacterias se producen una serie de eventos de la inmunidad, que promueven la expansión de células T efectoras liberadoras de IFN- γ , citoquina encargada de la activación de los M ϕ infectados (Mata-Espinosa & Hernández-Pando, 2008). Este proceso induce la expresión de más de 200 genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta inmune. Entre sus efectos se encuentran la producción de ROI y RNI, la acidificación del fagosoma y la autofagia (Dheda et al., 2010; Castillo et al., 2012), la producción de α y β defensinas (Rivas-Santiago et al., 2008), aumento en la expresión de moléculas MHC I y MHC II involucradas en la presentación de antígenos proteicos, así como la expresión de la enzima iNOS (Herbst, Schaible & Schneider, 2011).

La mayor producción de iNOS se observó durante la primera semana p.i. en todos los grupos de ratones. A partir de este momento se registraron diferencias significativas entre aquellos que recibieron las cepas *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 y los infectados con *M. 'habana'* IPK-220. La iNOS es responsable de la producción de NO a partir de L-arginina como sustrato. Este reacciona con los ROI, producidos en gran cantidad y al mismo tiempo, resultando en la formación de peroxinitrilos, compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, especialmente a las proteínas (en particular al aminoácido tirosina). Las proteínas nitrosiladas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuye a la muerte celular (Welin & Lerm, 2012). Fue, precisamente, en aquellos animales en los que observamos una mayor producción de esta enzima, los que registraron una menor multiplicación bacilar, resultados que repercutieron en una sobrevida máxima al finalizar el experimento.

Por otra parte, la mayor expresión de TNF- α en los ratones infectados con *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 se correspondió con la aparición temprana de granulomas y con el aumento de su talla durante el experimento. Suficientes evidencias indican que la generación y el mantenimiento de los granulomas tuberculoides requieren de la presencia de TNF- α (Stenger, 2005; Fallahi-Sichani et al., 2010). Publicaciones recientes demuestran que la reactivación tuberculosa por el uso terapéutico de un agente bloqueador de TNF, en las patologías de naturaleza autoinmune, está asociado a la ruptura de la arquitectura del granuloma, provocando la diseminación de las micobacterias en el tejido circundante (Wong et al., 2008; Beham et al., 2011).

En contraste a lo planteado anteriormente, la cepa *M. 'habana'* IPK-220 mostró una menor atenuación, indujo una baja expresión de factores inmunoprotectores y una mayor expresión del ARNm que codifica para la IL-4. Esta citoquina promueve la activación inadecuada de los M ϕ (Gordon, 2003), disminuye la expresión y la señalización a través de los TLR 2 (Rook et al., 2004) y regula negativamente la expresión de iNOS (Bogdan et al., 1994). Estos fenómenos redundan en un control ineficiente de la multiplicación bacilar tras la infección experimental, lo cual se encuentra relacionado con extensos daños en el tejido pulmonar y muerte; aspectos todos demostrados en nuestra investigación.

En este sentido North (1998), demuestra que el aumento de la expresión de IL-4 promueve el anclaje del receptor de esta citoquina en la membrana de las células T CD4⁺, lo cual constituye una señal para el comienzo de la transcripción de los genes que codifican para citoquinas del tipo Th2, patrón que se reconoce como no protector frente a la TB. Posteriormente Fletcher et al. (2004), demuestran que los niveles de expresión de ARNm de la IL-4 correlacionan proporcionalmente con la gravedad de la enfermedad en humanos.

Rook et al. (2004) realizan una amplia revisión de la literatura para dar a conocer las implicaciones de la IL-4 en el diseño de vacunas antituberculosas. Estos reportan la aparición, en pacientes tuberculosos, de algunos fenómenos dependientes de IL-4, un incremento de la expresión del ARNm para esta citoquina y de las células T positivas para ella. Estos hallazgos correlacionan, de forma significativa, con la presencia sérica

de IgE, CD30 y con la extensión de la cavitación. De la misma forma, cuando se trata de modelos experimentales, se relaciona la presencia de IL-4 en la fase tardía de la infección con la regulación negativa de la respuesta Th1 y la detección de citoquinas Th2 (Rook et al., 2004).

La variabilidad del curso de la infección bacteriana depende de la compleja interacción de diversos factores, los cuales no se encuentran completamente dilucidados. Determinados defectos genéticos que afectan la relación IFN- γ /IL-12, así como factores ambientales que generan microambientes nutricionales deficientes, se encuentran asociados a una mayor susceptibilidad a la infección tuberculosa (Hernández-Pando et al., 2012). El uso de un modelo animal con uniformidad genética bajo condiciones ambientales controladas nos permite afirmar que las variaciones encontradas en respuesta a la infección con diferentes cepas de *M. 'habana'* responden a diferencias intrínsecas entre las mismas.

Estudios recientes acerca de la diversidad de GPL en cepas de *M. 'habana'*, empleando técnicas avanzadas de espectrometría de masa, demuestran la ausencia de GPL-II y GPL-III en *M. 'habana'* IPK-220 (Mederos, Valdivia & Valero-Guillén, 2008). Los GPL son parte integral de la envoltura celular en algunas micobacterias y pudieran estar involucrados en funciones biológicas importantes, a la vez de ser antigénicos debido a su cadena oligosacáridica.

La pared celular micobacteriana consiste en un complejo arreglo de lípidos distintivos y proteínas, a muchos de los cuales se les conoce su actividad inmunomoduladora. Algunas de estas funciones se atribuyen a la interacción de los componentes de la superficie bacteriana con los M ϕ , durante el proceso de fagocitosis e involucran receptores de reconocimientos de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*) como son los TLR (Rocha-Ramírez et al., 2008).

Bhatnagar & Schorey (2007), demuestran que los exosomas liberados por M ϕ infectados in vitro, con *M. avium*, contienen GPL. Estas vesículas interactúan con M ϕ sin infectar e inducen una respuesta proinflamatoria. Estas evidencias sugieren el papel potencial de los GPL en la modulación de la respuesta inmune in vivo. Probablemente, las diferencias

en términos de virulencia e inducción de respuesta inflamatoria encontradas durante la infección experimental con cepas de *M. 'habana'* encuentren su explicación en su desigualdad de GPL, previamente demostrada (Mederos, Valdivia, Valero-Guillén & 2008). Como consecuencia de estos resultados decidimos descartar la cepa *M. 'habana'* IPK-220 y continuar hacia el experimento de inmunogenicidad con las cepas IPK-337 y TMC 5135.

V.2. Inmunogenicidad y biodistribución de cepas vivas de *M. 'habana'* empleadas como vacuna subcutánea en ratones BALB/c.

Los correlatos de protección constituyen variables inmunológicas con valor predictivo de resistencia al desarrollo de la enfermedad (Parida & Kauffmann, 2010). Existe consenso internacional en cuanto a la dificultad para encontrar parámetros útiles que puedan ser correctamente extrapolados desde el modelo experimental hasta los humanos. Esta situación se hace aún más difícil para los candidatos vacunales vivos, los cuales expresan una multitud de antígenos y estimulan diferentes combinaciones de células T (Kaufmann & Stenger, 2009). El establecimiento de un potente biomarcador subrogado de punto final pudiera reducir drásticamente la necesidad de ensayos clínicos prolongados y a gran escala, agilizando el descubrimiento de nuevas vacunas y su comprobación clínica (Kaufmann & Parida, 2008; Ottenhoff & Kaufmann, 2012).

Aaggaard et al. (2009), teniendo como antecedente un modelo experimental de infección con *Leishmania major*, analizan la potencialidad de varios biomarcadores como correlatos de protección contra *M. tuberculosis*, tras vacunar ratones con el candidato de subunidades Ag85B-TB10.4/IC31H. Los resultados de este estudio les permiten concluir que la cantidad y calidad de la respuesta T de memoria, particularmente aquellas que presentan un fenotipo polifuncional, o sea que expresan a la vez IFN- γ , IL-2, TNF- α , funcionan como un potente correlato de protección. Estudios posteriores plantean la posibilidad de adicionar, a la expresión de IFN- γ , la presencia de perforinas y granulinas como potenciales correlatos. Estas últimas, constituyen marcadores de una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺, reconocida como protectora frente a la TB (Scherer et al., 2009).

A pesar de que la medición de un único factor, como es la producción de IFN- γ , pudiera no reflejar todo el potencial funcional de las células Th1 y la habilidad de las células T de memoria de coexpresar múltiples citoquinas que induzcan un respuesta superior ante un nuevo llamado de la inmunidad, está ampliamente demostrado que el control de la infección micobacteriana se caracteriza por la participación de células T CD4+, productoras de citoquinas tipo I, en particular IFN- γ (Doherty, Wallis & Zumla, 2009). La producción de esta citoquina constituyó el biomarcador, empleado en nuestro estudio para medir la inmunogenicidad inducida por los candidatos en investigación.

La estimulación con CFA de *M. tuberculosis* H37Rv indujo los más altos niveles de IFN- γ en los animales inmunizados con *M. 'habana'*. Målen et al. demostraron, a través de varias técnicas cromatográficas, que este filtrado antigénico se encuentra altamente enriquecido con las proteínas de secreción (Målen, Søfteland & Wiker, 2008). Esta observación sugiere una estrecha relación entre las proteínas secretadas por ambas especies de micobacterias y constituye, sin dudas, una ventaja cuando se intenta estimular una respuesta inmune heteróloga.

Los antígenos solubles, en su conjunto, constituyen estimuladores tempranos de la inmunidad, debido a su rápida aparición en el curso de la infección. La producción ascendente de IFN- γ durante el transcurso del experimento sostiene la hipótesis de que los bacilos vivos funcionan como inductores poderosos de la respuesta inmune celular (Jyothi, Garg & Singh, 2000).

Chaturvedi et al. (1999a) estudian el potencial inmunogénico de proteínas secretorias de *M. 'habana'* TMC 5135 y demuestran que en la fase exponencial esta micobacteria secreta proteínas de 19, 22, 29, 30, 31/32, 50 y 54-58 kDa, las cuales también se reportan en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* (Målen, Søfteland & Wiker, 2008). Resulta interesante destacar que algunas de estas proteínas de *M. 'habana'* son reconocidas por sueros de pacientes tuberculosos, lo cual además de corroborar la similitud antigénica entre estas micobacterias, les confiere la potencialidad de emplearse en técnicas de serodiagnóstico de TB (Chaturvedi et al., 1999a).

La menor respuesta de IFN- γ encontrada en los ratones inmunizados con BCG pudiera estar relacionada con el hecho de que esta subcepa, en particular, no presenta la RD1 ni la RD2, las cuales codifican para antígenos de secreción con un reconocido potencial inmunogénico. La selección de BCG-Phipps como control de inmunogenicidad se debió a la demostración previa de su mayor capacidad de generar protección contra *M. tuberculosis* al compararla con otras 10 subcepas de BCG (Castillo-Rodal et al., 2006).

Por su parte, la respuesta inducida con el Ag85b resultó más eficiente en los animales que se inmunizaron con *M. habana* que en los vacunados con BCG Phipps. El complejo Ag85 está conformado por tres proteínas (30-32 kDa) con actividad transferasa de ácidos micólicos que intervienen en la biogénesis de la pared micobacteriana: Ag85a, Ag85b y Ag85c y es el Ag85b el componente mayoritario en este complejo (Målen, Sjøfteland & Wiker, 2008). Estudios experimentales demuestran que este constituye una fracción relevante dentro de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* y que resulta muy inmunogénico por contener numerosos epítomos para células T CD4⁺ y CD8⁺. Esta característica representa una ventaja obvia para el desarrollo de cepas recombinantes de BCG superproductoras de los diferentes componentes de este complejo.

Dhar et al., demuestran que la vacunación de ratones BALB/c con BCGr sobreexpresando Ag85a provoca un incremento en la inmunidad humoral, en comparación con la cepa parental, así como una respuesta Th1 caracterizada por la producción de altos niveles de IFN- γ (Dhar, Rao & Tyagi, 2004). Por otra parte la cepa BCGr para la expresión de Ag85b fue el primer candidato en entrar en fase de ensayo clínico (Tyagi, Nangpal & Satchidanandam, 2011).

Chaturvedi et al. (1999a) y Jyothi et al., en 2000; coinciden al afirmar que el Ag85b constituye la proteína de secreción temprana más importante al purificar sobrenadante de cultivo, en fase exponencial, de *M. habana* TMC 5135. La respuesta de los órganos de los ratones inmunizados con *M. habana*, estimulados *in vitro* con este antígeno nos permite inferir, que este constituye un potente inductor de la respuesta inmune tras la

vacunación con las cepas vivas, generando una respuesta de memoria detectable frente a un nuevo enfrentamiento antigénico (Jyothi, Garg & Singh, 2000).

La estimulación con ESAT-6 indujo valores inferiores a los 15 pg/mL de IFN- γ en los tres órganos ensayados durante todo el experimento. Estos valores no mostraron diferencias significativas al compararlos con el grupo control.

ESAT-6, es una proteína pequeña involucrada en la modulación de la respuesta inmune (Hall et al., 2009). Se conoce que esta constituye uno de los blancos principales de las células T de memoria, en ratones infectados con *M. tuberculosis* y que el reconocimiento no se encuentra influenciado por la composición genética de la especie animal empleada (Brodin et al., 2006).

Brodin et al. (2006) demostraron que en cinco de seis líneas de ratones genéticamente diferentes, las células T de memoria, son capaces de reconocer a ESAT-6, durante una re-exposición a este antígeno. Además, estas constituían entre el 25-35% del repertorio de células T reactivas a TB, en la primera fase de la enfermedad.

Estudios realizados en humanos, empleando el ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas (ELISPOT, del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*), detectan respuesta específica a este antígeno en un 96% de los pacientes con TB. Esta frecuencia de reconocimiento no se había registrado con anterioridad para ningún antígeno micobacteriano en particular. Investigaciones experimentales demuestran que las vacunas que contienen este antígeno proveen de una fuerte protección contra la TB y lo sitúan como un candidato promisorio en el desarrollo de vacunas contra esta enfermedad (Hall et al., 2009). ESAT-6 está codificado por un grupo de genes que se encuentran en la RD1. En la vecindad de estos operones, se encuentran localizados al menos otros siete genes, agrupados en clúster que codifican para antígenos del tipo T, hecho que sugiere que esta región pudiera constituir una isla de inmunogenicidad, con implicaciones vacunales (Brodin et al., 2004a).

Desde nuestro punto de vista, la escasa producción de IFN- γ por los órganos de los ratones vacunados con *M. 'habana'* en respuesta a la estimulación con ESAT-6 pudiera obedecer a factores inherentes a la micobacteria, al propio antígeno o a la respuesta

inmune del hospedero. Los genes responsables de ESAT-6 no están presentes en BCG, ni en *M. microti*, ni en la mayoría de las MNT (Brodin et al., 2004a). La ausencia de respuesta de los ratones inmunizados con *M. habana'* a la estimulación con este antígeno, sugiere aunque no concluye, que estas cepas también carecen de la información genética que lo codifica.

Brodin et al. en un intento por mejorar la inmunogenicidad de *M. microti*, construyen la cepa recombinante *M. microti* OV254::RD1-2F9, resultante de la introducción de la RD1. Esta región codifica para potentes antígenos estimuladores de la respuesta T (ESAT-6 y CFP-10) resultando en una mayor expresión de los marcadores de activación de los linfocitos T sin perder la seguridad demostrada en experimentos anteriores (Brodin et al. 2004b). Teniendo en cuenta el papel inmunogénico probado de ESAT-6, la obtención de cepas de *M. habana'* recombinantes para este antígeno, podría constituir una alternativa interesante para elevar su inmunogenicidad.

Por otra parte, existe una serie de evidencias acerca de que las células T efectoras de memoria (humanas) producen IFN- γ en respuesta a ESAT-6 y, de hecho, dos pruebas sanguíneas utilizan esta respuesta para diagnosticar la infección tuberculosa latente y la TB activa. Igualmente, está demostrado que las vacunas de subunidades basadas en ESAT-6 inducen protección contra *M. tuberculosis* en ratones y que la construcción vacunal que codifica para ESAT-6 y Ag85 reduce la carga bacilar luego del reto con *M. tuberculosis* en primates no humanos. Sin embargo, aunque ESAT-6 es altamente inmunogénico, la secreción de esta proteína se requiere para la virulencia de *M. tuberculosis* en modelos animales. Recientemente, se ha relacionado a ESAT-6 con efectos adversos en las células de mamíferos, los cuales incluyen la citólisis y la reducción de la producción de IL-12 por los fagocitos mononucleares, lo cual puede originar una disminución de la producción de IFN- γ y por consiguiente de la inmunidad contra la TB (Barnes et al., 2009).

Hallazgos recientes demuestran que concentraciones elevadas de ESAT-6 inhiben marcadamente la producción de IFN- γ por las células T, estimuladas con *M. tuberculosis*. Esta proteína inhibe, también, la proliferación y la expresión de los

marcadores tempranos de activación CD25 y CD69. Presumiblemente, la unión de ESAT-6 a los ligandos de superficie de las células de mamíferos transmite señales intracelulares que inhiben el desarrollo de la inmunidad de células T (Barnes et al. 2009). Este efecto inhibitorio pudiera constituir otra de las explicaciones de la ausencia de respuesta encontrada, frente a este antígeno, en los modelos animales vacunados con *M. 'habana'*.

Adicionalmente, está demostrado el efecto supresor de las células Treg en la producción específica de IFN- γ por las células T mediado por la liberación de IL-10 (Li & Wu, 2008). A pesar de que este aspecto no se exploró durante la ejecución del presente estudio, pudiera ser otra de las causas, de la pobre respuesta de IFN- γ de los órganos de los ratones vacunados con *M. 'habana'* frente a la estimulación con ESAT-6.

Paralelamente al estudio de inmunogenicidad de *M. 'habana'*, se estudió la distribución bacteriana y se pudo constatar la diseminación de las cepas vacunales a todos los órganos estudiados, así como la multiplicación en el sitio de vacunación. Los estudios limitados en el tiempo tienen como desventaja la imposibilidad de monitorear un parámetro una vez que se sacrifica el animal. Sin embargo, fue posible cuantificar, bajas cargas bacilares, con una perfecta tendencia a la esterilización en el tejido celular subcutáneo del sitio de vacunación. Este hecho garantiza una estimulación antigénica sostenida en el tiempo, promoviendo la liberación de IFN- γ por los linfocitos T (Dubos & Pierce, 1956).

A pesar de que el criterio expuesto anteriormente goza de varias décadas de vigencia, en la actualidad, diferentes autores coinciden al afirmar que las cepas vivas atenuadas empleadas como candidatos vacunales necesitan retener la habilidad limitada de crecer y diseminarse en el hospedero, con el objetivo de inducir inmunidad protectora (Liu et al., 2009). Este aspecto se corroboró en nuestro estudio y viene a reforzar las razones por las cuales, las vacunas diseñadas a partir de bacterias muertas, resultan menos efectivas contra los patógenos intracelulares, que las basadas en el uso de microorganismos vivos atenuados (Frankel, 2005).

El análisis integral de los resultados de este experimento conllevó a la formulación de las siguientes interrogantes:

- ¿La vacunación con cepas vivas de *M. 'habana'* resultará segura en animales inmunodeficientes?
- ¿La inmunogenicidad demostrada tras la vacunación con cepas de *M. 'habana'* será capaz de generar protección ante el reto con *M. tuberculosis*?

Ambos aspectos constituyeron la base para la realización de los experimentos posteriores.

V.3. Seguridad de la vacunación con cepas vivas de *M. 'habana'* en animales inmunodeficientes

El solapamiento geográfico entre las epidemias de TB y VIH es evidente, al igual que lo es la devastadora sinergia que ambas presentan. Estas constituyen importantes razones que justifican el estudio, en fase preclínica, del efecto que produce la inmunodepresión en la seguridad de las vacunas vivas atenuadas (Kaufmann & Stenger, 2009).

Existen un sinnúmero de modelos murinos disponibles, portadores de diferentes tipos de inmunodeficiencias o de sus combinaciones. Los ratones desnudos (*nu⁻/nu⁻*) exhiben una mutación en un alelo que pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11. Estos presentan un fenotipo desnudo (sin pelo) y carecen de un timo funcional, el cual permanece rudimentario, por lo que producen un número reducido de células T maduras (Carbone & Maschi, 2006). Como consecuencia de este defecto genético se ven imposibilitados de montar la mayoría de los eventos que tienen lugar en la IMC y que resultan cruciales en el desarrollo de una respuesta protectora contra las bacterias intracelulares (Dheda et al., 2010).

El presente estudio demostró que la supervivencia de los ratones desnudos vacunados con *M. 'habana'* TMC 5135 e IPK-337, fue similar a la registrada en el grupo inmunizado con BCG. Este hecho apunta a que la vacunación con ambas cepas presenta, al menos, el mismo nivel de seguridad que la vacuna BCG.

Raj et al. (2003) demuestran la seguridad de la administración endovenosa de *M. 'habana'* TMC 5135 en ratones inmunodeficientes SJL/J. Estos presentan un defecto en el receptor de células T, inducido por la producción de IL-4.

Nuestros resultados muestran similitud con los reportados por Hernández-Pando et al. (2010b), al evaluar la seguridad de *M. tuberculosis* mutante de *SigE*, empleando el mismo modelo de animal inmunodeficiente. En este trabajo se demuestra que los ratones desnudos vacunados con este candidato sobreviven por un tiempo de 15 semanas, mostrando mayor seguridad que la cepa BCG Phipps.

Por el contrario, Manabe et al. manifiestan que la infección endovenosa, con dosis elevadas de *M. tuberculosis*, en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, del inglés *Severe Combined Immunodeficiency*), promueve la muerte rápida de los animales, cuya sobrevivencia alcanza una media de solo 32 días (Manabe, Scot & Bishai 2002).

El II Consenso de Ginebra para el monitoreo del avance en las investigaciones que emplean candidatos vacunales vivos contra la TB, publicado en 2010, establece como requisito obligatorio, la demostración de que los nuevos candidatos sean, al menos, iguales o más seguros que BCG (Kamath et al., 2005; Walker et al., 2010). Las cepas de *M. 'habana'* evaluadas en el presente estudio se adhieren a este requisito, lo que permitió proseguir su evaluación, hacia el experimento de protección.

V.4. Protección conferida por '*M. habana*' tras el reto con *M. tuberculosis* H37Rv

En los experimentos de validación de candidatos vacunales se emplea el modelo de reto por aerosol, como instrumento preferido para evaluar la protección contra *M. tuberculosis*. No obstante, la instilación i.t. es una alternativa razonable cuya complicación radica en el empleo de procedimientos quirúrgicos pero ofrece resultados más eficientes que la inoculación intranasal (Orme, 2005).

El experimento de protección, empleando como reto la infección i.t. con *M. tuberculosis* H37Rv no mostró diferencias significativas entre la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 y BCG Phipps en términos de sobrevivencia, carga bacilar y extensión del daño

en el tejido pulmonar. Estos resultados nos permiten afirmar que ambas cepas detienen la progresión a la enfermedad experimental, en la misma medida.

El modelo experimental empleado en nuestro trabajo constituye el soporte preclínico de cuatro candidatos vacunales vivos contra la TB: (i) *M. tuberculosis ΔphoP*, capaz de inducir protección similar que BCG (Aguilar et al., 2007); (ii) *M. tuberculosis ΔfadD26*, el cual confiere buena protección (70% de sobrevida) pero muestra una atenuación parcial (Infante et al., 2005); (iii) *M. tuberculosis Δmce2*, que muestra una severa atenuación e induce una sobrevida elevada tras el reto con *M. tuberculosis* genotipo Beijing (Aguilar et al., 2006) y (iv) *M. tuberculosis sigE*, que exhibe similar atenuación que *mce2* pero induce una mayor protección (80% de sobrevida) (Hernández-Pando et al., 2010b).

La sobrevida del 100% registrada en el grupo vacunado con *M. 'habana'* TMC 5135, no solo la sitúa en el mismo nivel de protección que el inducido por una cepa vacunal de BCG; sino que resultan superiores a los valores registrados por el grupo de candidatos vacunales vivos referidos anteriormente, tras el empleo de similar modelo de evaluación preclínica.

Los reportes internacionales que valoran el poder protector de *M. 'habana'* TMC 5135 en modelos experimentales de TB, toman como premisa el uso de la cepa viva, muerta o de algunas de sus subunidades protéicas. El primer hallazgo de la actividad protectora de esta micobacteria, empleada como vacuna viva, fue reportado por Gupta et al. (1979). Este grupo de investigadores demostraron que los ratones vacunados con *M. 'habana'* TMC 5135 y retados con *M. tuberculosis* H37Rv, mostraban una probabilidad 20% superior de sobrevivir al reto, que los vacunados con BCG o con otras 18 especies de micobacterias, entre las que se incluían *M. tuberculosis* H37Ra y *M. simiae*. A pesar de que esta última se encuentra estrechamente relacionada con *M. 'habana'*, las diferencias inmunogénicas resultan evidentes durante este experimento.

Años más tarde Raj et al. demuestran la capacidad que tiene la vacunación endovenosa con *M. 'habana'*, para restringir la multiplicación de *M. tuberculosis*, en los pulmones, bazo e hígado de ratones inmunocompetentes (AKR) e inmunodeprimidos (SJL/J), en

relación con los animales no vacunados. De igual forma, el examen del tejido pulmonar de los animales vacunados con *M. 'habana'*, señala que el daño se limita a una pequeña proporción del parénquima, con ausencia de áreas necróticas e incremento de linfocitos. En términos de sobrevida, el estudio reporta un incremento del 50% en los ratones vacunados con relación al grupo control sin inmunizar. Estos resultados, les permitieron sugerir que una vacuna basada en esta MNT pudiera representar un modo seguro de inmunización en individuos inmunocomprometidos (Raj et al., 2003).

Otra de las alternativas exploradas, en el uso de *M. 'habana'*, se basa en el estudio de sus principales antígenos, con el objetivo de explicar la capacidad protectora de esta micobacteria. Chaturvedi et al., llevaron a cabo el aislamiento y la localización subcelular de estos antígenos, demostrando que estos se encuentran, en una alta densidad, en la fracción de membrana externa. Adicionalmente, el hallazgo más interesante consistió en la coincidencia en los patrones de separación de las proteínas periféricas y de membrana de *M. 'habana'* y *M. tuberculosis*, lo que pudiera constituir una explicación a la respuesta protectora inducida por esta micobacteria (Chaturvedi et al., 1999b).

Otros autores reportan el empleo de proteínas secretorias de *M. 'habana'*, en presencia o no de adyuvante, como inmunógenos frente a dosis elevadas de *M. tuberculosis* H37Rv (Chaturvedi et al., 1999a). La ausencia de signos clínicos (pérdida de peso, letargo, piloerección), unido a una elevada sobrevida y la recuperación de pocas UFC en pulmón, y bazo evidencian la protección inducida por estos componentes. Más tarde Jyothi et al. investigan los mecanismos involucrados en la protección conferida por estas proteínas y demuestran un incremento en la actividad de las enzimas lisosomales de los M ϕ peritoneales de los animales vacunados, así como de los niveles de NO y H₂O₂ (Jyothi, Garg & Singh, 2000).

Resulta extremadamente difícil establecer comparación entre nuestros resultados y los reportados por otros grupos de trabajo dedicados a la investigación de vacunas vivas, debido a la gran diversidad de modelos animales empleados, dosis y rutas utilizadas en la vacunación y el reto. A esta dificultad se le añade que, la mayoría de los ensayos

preclínicos realizados con MNT, explotan las variantes de inactivación por calor o por radiaciones. Los mecanismos por los cuales una u otra estrategia induce una respuesta inmune protectora distan de los descritos en el uso de los candidatos vacunales vivos

La totalidad de los estudios que involucran a *M. 'habana'* como candidato vacunal, emplean el reto endovenoso con *M. tuberculosis*, aspecto que, como habíamos discutido anteriormente, discrepa de la vía natural que emplean las micobacterias para producir la infección en el huésped susceptible. Este aspecto hace limitado el análisis de los resultados provenientes de estos experimentos.

En opinión de la autora, la incorporación del modelo de reto i.t. con micobacterias virulentas constituye un aporte, del presente estudio, al conocimiento del potencial vacunal de *M. 'habana'* contra la TB. Los resultados sientan precedente para estudios futuros con este candidato, los cuales deben tener en cuenta diferentes modelos animales. La incorporación de aquellos que emplean el reto por aerosol con bajas dosis de *M. tuberculosis*, nos permitirá, evidenciar si el uso de cepas vivas de *M. 'habana'* como inmunógeno, es capaz de prevenir la infección con *M. tuberculosis*.

V.5. Consideraciones Generales.

Los candidatos vacunales tienen la obligatoriedad de atravesar seis fases principales para alcanzar la autorización de mercadeo. Estas incluyen: Descubrimiento, desarrollo preclínico, Fase I y Fase II/IIb para la prueba de concepto, Fase III de ensayo clínico, aplicación de mercadeo y licenciamiento (Marinova et al., 2013).

La decisión de continuar a la fase siguiente tiene lugar en la puerta existente entre ambas fases, empleando múltiples criterios en el proceso de selección. Estos criterios se encuentran definidos de acuerdo a las características propias de cada candidato y se dividen entre la calidad del producto, la seguridad, inmunogenicidad, eficacia, características clínicas, proceso de producción, estrategias regulatorias, impacto financiero y en la salud, novedad, entre otros (Martín & Gicquel, 2011; Marinova et al., 2013).

El criterio general para la calidad del producto es su pureza, estabilidad y potencia como vacuna. La seguridad, inmunogenicidad y criterios de eficacia requieren de los datos que se obtienen a partir del uso de modelos animales relevantes, así como de los ensayos clínicos, en dependencia de a las puertas de que fase, de las mencionadas, se encuentre el candidato (Marinova et al., 2013).

Los experimentos que aseguran la conformidad con la fase preclínica resultan demorados y extremadamente caros, no solo por los reactivos y animales involucrados sino por la obligatoriedad de que se realicen en facilidades BSL3 para animales de laboratorio, instalaciones presentes en pocos países, a nivel mundial y en solo dos países de nuestra región.

En este largo camino, la modesta contribución de esta investigación radica en la demostración de la atenuación de *M. 'habana'* en animales inmunocompetentes e inmunodeprimidos, así como la evaluación de la inmunogenicidad y protección frente al reto con *M. tuberculosis*, garantizando la continuidad de su estudio en fases posteriores del desarrollo preclínico como candidato vacunal contra la TB.

En los últimos 20 años se ha visto un renacer de las investigaciones en este campo. La búsqueda de alternativas vacunales mejoradas ha resurgido gracias al esfuerzo y soporte financiero de muchos gobiernos e instituciones filantrópicas. Las vacunas experimentales más efectivas se han probado en ensayos clínicos Fase I/II y Fase III. Sin embargo, debido a la complejidad de estos estudios, se puede anticipar que los resultados de los ensayos Fase III, no estarán listos hasta los años 2014-2015 (WHO, 2013).

Algunos científicos prominentes argumentan que no existen evidencias científicas que sugieran el desarrollo de una vacuna antituberculosa completamente protectora, arrojando escepticismo sobre la búsqueda de nuevos candidatos. Sin embargo, es importante recordar que la obtención de una vacuna que funcione mejor que BCG o que muestre "solo" un 50% de eficacia en los adultos pudiera salvar millones de vidas en el transcurso de pocos años, aliviando la dramática carga de salud, social y económica que

impone la TB sobre los países de escasos recursos y en vías de desarrollo (Delogu & Fada, 2009).

VI. CONCLUSIONES

- ✓ La sobrevida total, la baja carga bacteriana, el escaso daño pulmonar, la respuesta del tejido a la infección, así como la producción de factores inmunoprotectores en los ratones infectados con *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 sugieren la atenuación natural de dichas cepas y su posible uso como candidato vacunal contra la TB.
- ✓ Los daños que provoca en el receptor la inoculación intratraqueal de *M. 'habana'* IPK-220 no recomiendan su uso como candidato vacunal en estudios posteriores de la fase preclínica.
- ✓ La respuesta inmune generada en los ratones vacunados con *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 frente a antígenos relevantes de *M. tuberculosis* confirma la relación antigénica entre ambas especies y sugiere la posibilidad de inducción de respuestas protectoras contra *M. tuberculosis* luego de la inmunización con estas cepas.
- ✓ La diseminación de las cepas vacunales a los principales órganos relacionados con la respuesta inmune, así como el mantenimiento de una carga bacilar baja y sostenida promueven la estimulación antigénica de los linfocitos T, lo que se corrobora a través de la producción de IFN γ como citoquina considerada marcadora de protección contra la TB. *M. 'habana'* TMC 5135 mostró ser más inmunogénica que la tradicional BCG Phipps en el modelo experimental empleado.

- ✓ La escasa detección de IFN- γ en los ratones inmunizados con *M. 'habana'* frente a la estimulación con ESAT-6 pudiera estar relacionada con la ausencia de los genes que codifican para esta familia de proteínas en *M. 'habana'*; con el efecto inhibitorio del antígeno sobre la producción de IFN- γ por las células T o por la activación de Treg, responsables de la liberación de IL-10, con inhibición de un patrón de respuesta Th1.
- ✓ La administración de la dosis vacunal de las cepas vivas *M. 'habana'* IPK-337 y TMC 5135 es igual de segura que BCG en modelos experimentales de inmunodeficiencias lo que permitiría su evaluación futura en poblaciones donde se utiliza la vacuna BCG.
- ✓ La vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 garantiza la sobrevida total de los animales e impide la progresión de la enfermedad tuberculosa, en la misma manera que BCG, aspecto que garantiza la continuidad de su estudio como candidato vacunal en etapas posteriores del desarrollo preclínico.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar la virulencia, inmunogenicidad y protección de las cepas *M. habana*' IPK-337 y TMC 5135 empleando cobayos como modelo experimental
- ✓ Diseñar estudios que permitan esclarecer el papel de las subpoblaciones linfocitarias que participan en la inmunidad generada por la vacunación con cepas vivas de *M. habana*', así como su contribución a esta respuesta.
- ✓ Modificar genéticamente cepas de *M. habana*' a través de la introducción de genes micobacterianos que codifiquen para proteínas altamente antigénicas con el objetivo de aumentar su inmunogenicidad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII.1. Referencias Bibliográficas Consultadas

Aagaard, C., Hoang, T.T.K.T., Izzo, A., Billeskov, R., Troudt, J. & Arnett, K. et al. (2009) Protection and polyfunctional T cells induced by Ag85B-TB10.4/IC31H against *Mycobacterium tuberculosis* is highly dependent on the antigen dose. *PLoS ONE*. 4(6). e5930.

Aguilar, D., Infante, E., Bianco, M.V., Cataldi, A., Bigi, F. & Hernández-Pando. R. (2006) Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis mce-2* and *mce-3* mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine*. 24. p.2333-2342.

Aguilar, D., Infante, E., Martín, C., Gormley, E., Gicquel, B. & Hernández-Pando, R. (2007) Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/c mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis (phoP)* SO2 strain. *Clin Exp Immunol*. 147. p.330-338.

Al-Attiyah, R., Madi, N.M., El-Shamy, A.S.M., Wiker, H.G., Andersen, P. & Mustafa, A.S. (2006) Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEEMS Immunol Med Microbiol*. 47. p.254-261.

Álvarez, N., Borrero, R., Reyes, F., Camacho, F., Mohd, N., Sarmiento, M.E. et al. (2009) Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *VacciMonitor*. 18 (3). p.18-25.

Anuradha, A., Zehra, K., Katiyar, J.C., Gupta, H.P. & Singh, N.B. (1995) Vaccination of hamster with *Mycobacterium habana* against *Leishmania donovani* infection. *Current Science*. 69 (1). p.90-93.

Arbues, A., Aguilo, J.I., Gonzalo-Asensio, J., Marinova, D., Uranga, S., Puentes, E. et al. (2013) Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the

first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine*. 1 (42). p.4867-4873.

Arráiz, N. (2002) Factores sigma y respuesta a estrés en micobacterias. *Kasmera*. 30 (2). p.112-125.

Astarie-Dequeker, C., Le-Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F.K., Chalut, C., López, A. et al. (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog*. 5 (2). e1000289.

Azad, A.K., Sadee, W. & Schlesinger, L.S. (2012) Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun*. 80 (10). p.3343–3359.

Barnes, P.F., Samten, B., Shams, H. & Vankayalapati, R. (2009) Progress in understanding the human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 89 (1). p.5–9.

Barrios-Payán, J.A., Castañón-Arreola, M., Flores-Valdéz, M.A., Hernández-Pando, R. (2010) Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. *R Salud Pública Mex*. 52. p:70-78.

Bastos, R.G., Borsuk, S., Seixas, F.K. & Dellagostin, O.A. (2009) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine*. 27. p.6495–6503.

Baumann, S., Eddine, A.N. & Kaufmann, S.H.E. (2006) Progress in tuberculosis vaccine development. *Current Opinion Immunol*. 18. p.438-448.

Beham, A.W., Puellmann, K., Laird, R., Fuchs, T., Streich, R., Breysach, C. et al. (2011) A TNF-regulated recombinatorial macrophage immune receptor implicated in granuloma formation in tuberculosis. *PLoS Pathog*. 7 (11). e1002375.

Bhatnagar, S. & Schorey, J.S. (2007) Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chemistry*. 282 (35). p.25779–25789.

Bisht, D., Mehrotra, J., Dhindsa, M.S., Singh, N.B. & Sinha, S. (1996) A major T-cell-inducing cytosolic 23 kDa protein antigen of the vaccine candidate *Mycobacterium habana* is superoxide dismutase. *Microbiol*. 142. p.1375-1383.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., Paik, J., Xie, Q.W. & Nathan, C. (1994) Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol*. 55. p.227–233.

- Boshoff, H.I., Reed, M.B., Barry, C.E. & Mizrahi, V. (2003) DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 113. p.183–193.
- Brennan, P.J. & Crick, D.C. (2007) The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 7 (5). p.475-488.
- Briken, V. & Miller, J.L. (2008) Living on the edge: Inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*. 3. p.415–422.
- Brodin, P., Majlessi, L., Brosh, R., Smith, D., Bancroft, G., Clark, S. et al. (2004b) Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant *Mycobacterium microti* vaccine that induced T cell immunity against region of difference 1 antigens. *J Infect Dis*. 190. p.115-122.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, M.L., Bottai, D., Demangel, C. et al. (2006) Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun*. 74 (1). p.88–98.
- Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S.T. & Brosch, R. (2004a) ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors?. *TRENDS in Microbiol*. 12 (11). p.500-508.
- Caminero, J.A. (2006) La erradicación de la Tuberculosis: ¿Mito o realidad?. *Enf Emerg*. 8 (4). p.271-281.
- Caminero, J.A. (2010) Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. *Int J Tuberc Lung Dis*. 14 (4). p.382–390.
- Carbone, C. & Maschi, F. (2006) El ratón *nude* (*nu/nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva*. 5 (1). p.19-23.
- Cardona, P.J., Asensio, J.G., Arbués, A., Otal, I., Lafoz, C., Gil, O. et al. (2009) Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine *SO2* based on *phoP* mutant. *Vaccine*. 27 (18). p.2499-2505.
- Castillo, E.F., Dekonenko, A., Arko-Mensah, J., Mandell, M.A., Dupont, N., Jiang, S. et al. (2012) Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *PNAS*. 109 (46). p.3168–3176.
- Castillo-Rodal, A.I., Castañón-Arreola, M., Hernández-Pando, R., Calva, J.J., Sada-Díaz, E. & López-Vidal, Y. (2006). *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 74 (3). p.1718–1724.

- Chackerian, A.A. & Behar, S.M. (2003) Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*: lessons from inbred strains of mice. *Tuberculosis*. 83 (5). p.279-285.
- Chaturvedi, V., Jyoti, D., Srivastava, S. & Gupta, H.P. (1999a) Secretory proteins of *Mycobacterium habana* induce a protective immune response against experimental tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 26. p.143-151.
- Chaturvedi, V., Singh, N.B. & Sinha, S. (1995) Immunoreactive antigens of a candidate leprosy vaccine: *Mycobacterium habana*. *Lepr Rev*. 66. p.31-38.
- Chaturvedi, V., Srivastava, A., Gupta, H.P. & Srivastava, B.S. (1999b) Protective antigens of *Mycobacterium habana* are distributed between peripheral and integral compartments of plasma membrane: a study in experimental tuberculosis of mouse. *Vaccine*. 17. p.2882-2887.
- Chul-Su, Y., Jae-Min, Y. & Eun-Kyeong, J. (2009) The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Network*. 9 (2). p.46-52.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J. et al. (1996) Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. *Laboratory animals*. 30. p.293-316.
- Collins, F.M. & Watson, S.R. (1981) Immune response to atypical mycobacterial lung infections. *Rev Infect Dis*. 3 (5). p.981-989.
- Cooper, A.M. & Khader, S.A. (2008) The role of cytokines in the initiation, expansion and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological Reviews*. 226. p.191-204.
- Delogu, G. & Fada, G. (2009) The quest for a new vaccine against tuberculosis. *J Infect Developing Countries*. 3 (1). p.5-15.
- Dhar, N., Rao, V. & Tyagi, A.K. (2004) Immunogenicity of recombinant BCG vaccine strains overexpressing components of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Microbiol Immunol*. 193. p.19-25.
- Dharmadhikari, A.S., Nardell, E.A. (2008) What animal models teach humans about tuberculosis?. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 39. p.503-508.
- Dheda, K., Schwander, S.K., Zhu, B., van Zyl, S. & Zhang, Y. (2010) The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 15. p.433-450.
- Dietrich, J. & Doherty, T.M. (2010) Subunit vaccines against infection with *Mycobacterium tuberculosis*: Preclinical and clinical considerations. En: Nor, N.M.,

Acosta, A., Sarmiento M.E. (eds.). *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development*. 1st edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T).

Doherty, M., Wallis, R.S., Zumla, A. & WHO–Tropical Disease Research/European Commission joint expert consultation group (2009) Biomarkers for tuberculosis disease status and diagnosis. *Curr Opin Pulm Med*. 15. p.181–187.

Douek, D.C., Roederer, M. & Koup, R.A. (2009) Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*. 60. p.471–484.

Dubos, R.J. & Pierce, C.H. (1956) Differential characteristics in vitro and in vivo of several substrains of BCG. Immunizing effectiveness. *Am Rev Tuberc*. 74 (5). p.699–717.

Duffy, D., Dawoodji, A., Agger, E.M., Andersen, P., Westermann, J., Bell, E.B. (2009) Immunological memory transferred with CD4 T cells specific for tuberculosis antigens Ag85B-TB10.4: persisting antigen enhances protection. *PLoS ONE*. 4 (12). e8272.

Dye, C. (2013) Making wider use of the world’s most widely used vaccine: Bacille Calmette–Guérin revaccination reconsidered. *J R Soc Interface*. 10. 20130365.

Ehlers, S. & Schaible, U.E. (2013) The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*. 3. p.1-9.

Ehrt, S. & Schnappinger, D. (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defense against host stresses. *Cellular Microbiology*. 11 (8). p.1170–1178.

Fallahi-Sichani, M., Schaller, M.A., Kirschner, D.E., Kunkel, S.L., Linderman, J.J. (2010) Identification of key processes that control tumor necrosis factor availability in a tuberculosis granuloma. *PLoS Comput Biol*. 6 (5). e1000778.

FELASA Working groups (2001) *FELASA recommendations for the education and training of persons involved in animals experiments*. Royal Society of Medicine Press: Laboratory Animal Ltd.

Fletcher, H.A., Owiafe, P., Jeffries, D., Hill, P., Rook, G.A.W., Zumla, A. et al. (2004) Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4 δ 2 in cells from contacts of *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology*. 112. p.669–673.

Frankel, F.R. (2005) Vaccine wakes from the dead. *Nat Med*. 11 (8). p.833–834.

Gao, H., Li, K., Yu, S. & Xiong, S. (2009) A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes cast in a natural structure elicits enhanced Th1 immunity compared with BCG. *Microbiol Immunol*. 53. p.541–549.

- García, M.A., Sarmiento, M.E., Acosta, A. (2009) La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. *Vaccimonitor*. 18 (1). p.25-34.
- Goel, M.M. & Budhwar, P. (2007) Immunohistochemical localization of *Mycobacterium tuberculosis* complex antigen with antibody to 38 KDa antigen versus Ziehl-Neelsen staining in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc*. 54. p.24-29.
- González, E.R. & Armas, L. (2012) New indicators proposed to assess tuberculosis control and elimination in Cuba. *MEDICC Review*. 14 (4). p.40-43.
- Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 3. p.23–35.
- Guittin, P. & Decelle, T. (2002) Future improvements and implementation of animal care practices within the animal testing regulatory environment. *ILAR Journal*. 43 (suppl1). p.80-84.
- Gupta, A., Geetha, N., Mani, J., Upadhyay, P., Katoch, V.M., Natrajan, M. et al. (2009) Protective efficacy of “*Mycobacterium w*” against *Mycobacterium tuberculosis* in mice immunized with live versus heat-killed *M. w* by the aerosol or parenteral route. *Infect Immun*. 77 (1). p.223-231.
- Gupta, H.P., Singh, N.B., Mathur, I.S. & Gupta, S.K. (1979) ‘*Mycobacterium habana*’, a new immunogenic strain in experimental tuberculosis of mice. *Indian J Exp Biol*. 17 (11). p.1190-1193.
- Hall, L.J., Clare, S., Pickard, D., Clark, S.O., Kelly, D.L.F., El Ghany. M.A. et al. (2009) Characterization of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B–ESAT6 fusion protein. *Vaccine*. 27 (49). p.6894–6904.
- Hampshire, T., Soneji, S., Bacon, J., James, B.W., Hinds, J., Laing, K. et al. (2004) Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?. *Tuberculosis*. 84. p.228-238.
- Herbst, S., Schaible, U.E. & Schneider, B.E. (2011) Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS ONE*. 6 (5). e19105.
- Hernández-Pando, R., Aguilar, D. & Hernández, R. (2010a) The contribution of diverse animal models in the evaluation of new vaccines against tuberculosis. En Nor, N.M., Acosta, A., Sarmiento, M.E. (eds.). *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development*. 1st edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T).

- Hernández-Pando, R., Aguilar, D., Smith, I. & Manganelli, R. (2010b) Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis sigE* mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 78 (7). p.3168–3176.
- Hernández-Pando, R., Aguilar-León, D., Orozco, H., Serrano, A., Ahlem, C., Trauger, R. et al. (2005) 16 α -Bromoepiandrosterone restores T helper cell type 1 activity and accelerates chemotherapy-induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 191. p.299–306.
- Hernández-Pando, R., Marquina, B., Barrios-Payán, J. & Mata, D. (2012) Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution.* 12. p.725-731.
- Hernández-Pando, R., Orozco, E.H., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva, S.J. et al. (1996) Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 89 p.26–33.
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Aguilar, D., López-Casillas, F. & Rook, G. (2004) Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico.* XVII p.129-153.
- Herrera-Barrios, M.T., Torres-Rojas, M., Juárez-Carvajal, E. & Sada-Díaz, E. (2005) Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 18 (4). p.327-336.
- Hinchey, J., Lee, S., Jeon, B.Y., Basaraba, R.J., Venkataswamy, M.M., Chen, B. et al. (2007) Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 117 (8) .p.2279–2288.
- Ho, M.M., Southern, J., Kang, H.N. & Knezevic, I. (2010) WHO Informal Consultation on standardization and evaluation of BCG vaccines Geneva, Switzerland 22–23 September 2009. *Vaccine.* 28. p.6945–6950.
- Hoft, D.F. (2008) Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet.* 372. p.164–175.
- Houben, E.N.G., Nguyen, L. & Pieters, J. (2006) Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Current Opinion in Microbiology.* 9. p.76–85.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M. et al. (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *PNAS.* 100 (21). p.12420–12425.

- Infante, E., Aguilar, D., Gicquel, B. & Hernández-Pando, R. (2005) Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis fadD26* mutant. *Clin Exp Immunol.* 141. p.21-28.
- Jung, Y.L., LaCourse, R., Ryan, L. & North, R.J. (2008) 'Immunization' against airborne tuberculosis by an earlier primary response to a concurrent intravenous infection. *Immunology.* 124. p.514–521.
- Jyothi, M.D., Garg, S.K. & Singh, N.B. (2000) Mechanisms involved in protective immune response generated by secretory proteins of *Mycobacterium habana* against experimental tuberculosis. *Scand J Immunol.* 51. p.502-510.
- Kalscheuer, R., Weinrick, B., Veeraraghavan, U., Besra, G.S. & Jacobs, W.R. (2010) Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugBSugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS.* 107 (50). p.21761–21766.
- Kamath, A., Fruth, U., Brennan, M.J., Dobbelaer, R., Hubrechts, P., Ho, M.M. et al. (2005) New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine.* 23. p.3753–3761.
- Kaufmann, S.H.E. & Parida, S.K. (2008) Tuberculosis in Africa: learning from pathogenesis for biomarker identification. *Cell Host Microbe.* 4. p.219-228.
- Kaufmann, S.H.E. & McMichael, A.J. (2005) Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine Supplement.* 11 (4). p.33-44.
- Kaufmann, S.H.E. & Stenger, S. (2009) Immune Response to tuberculosis as a basis for rational vaccination strategies. En Kaufmann, S.H.E., Walker, B.D. (eds.). *AIDS and Tuberculosis: A Deadly Liaison.* Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kaufmann, S.H.E. (2010) Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *J Internal Med.* 267. p.337–353.
- Kaufmann, S.H.E. (2007) The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nature Rev Microbiology.* 5. p.491-504.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010) The role of pattern recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunol.* 11 (5). p.373-384.
- Kay-Hooi, K., Chatterjee, D., Dell, A., Morris, H., Brennan, P. & Draper, P. (1996) Novel O-methylated terminal glucuronic acid characterizes the polar glycopeptidolipids of *Mycobacterium habana* strain TMC 5135. *J Biochem Chem.* 271. p.12333-12342.

- Khan, N., Gowthaman, U., Pahari, S. & Agrewala, JN. (2012) Manipulation of costimulatory molecules by intracellular pathogens: Veni, Vidi, Vici!!. *PLoS Pathog.* 8 (6). e1002676.
- Kondratieva, E., Logunova, N., Majorov, K. & Averbakh, M. (2010) Host genetics in granuloma formation: Human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to *M. tuberculosis* and *M. avium*. *PLoS ONE.* 5 (5). e10515.
- Koul, A., Herget, T., Klebl, B. & Ullrich, A. (2004) Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nature Rev Microbiol.* 2. p. 189-202.
- Langermans, J.A.M., Doherty, T.M., Vervenne, R.A.W., van der Laan, T., Lyashchenkod, K., Greenwaldd, R. et al. (2005) Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine.* 23. p. 2740–2750.
- Lawn, S.D., Butera, S.T. & Shinnick, T.M. (2002) Tuberculosis unleashed: the impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 4. p.635–646.
- Leyten, E.M.S., Lin, M.Y., Franken, K.L.M.C., Friggen, A.H., Prins, C., van Meijgaarden, K.E. et al. (2006) Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection.* 8. p.2052-2060.
- Li, L. & Wu, C.Y. (2008) CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to *M tuberculosis* antigen ESAT-6. *Blood.* 111 (12). p. 56329-56336.
- Li, W., Deng, G., Li, M., Liu, X. & Wang, Y. (2012) Roles of mucosal immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberc Res Treat.* 2012. p. 1-12.
- Lin, P.L. & Flynn, J.L. (2010) Understanding latent tuberculosis: A moving target. *J Immunol.* 185. p.15-22.
- Liu, J., Tran, V., Leung, A.S., Alexander, D.C. & Zhu, B. (2009) BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines.* 5 (2). p.70-78.
- Liu, P.T., & Modlin, R.L. (2008) Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology.* 20. p.371–376.
- Locht, C. (2010) From genomic characterization to improved BCG. En Nor, N.M., Acosta, A., Sarmiento, M.E. (eds.). *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development.* 1st edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T)

- Lugo-Villarino, G., Hudrisier, D., Benard, A. & Neyrolles, O. (2013) Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. *Frontiers Immunol.* 3 (405). p.1-9.
- Luis, V. & Boffi, H.J. (1991) Curvas de sobrevida mediante técnicas multivariadas (Kaplan-Meier, Mantel-Haenszel, Regresión de Cox). *Bol A N de Medicina.* 69. p.97-103.
- Lurie, M.B. (1964) *Resistance to tuberculosis: experimental studies in native and acquired defense mechanisms.* Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Målen, H., Sjøfteland, T. & Wiker, H.G. (2008) Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. *Scandinavian J Immunol.* 67. p.245–252.
- Manabe, Y.C., Scott, C.P. & Bishai, W.R. (2002) Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 70 (3). p.566-570.
- Marinova, D., Gonzalo-Asensio, J., Aguilo, N. & Martín, C. (2013) Recent developments in tuberculosis vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 12 (12). p.1431–1448.
- Martín, C. & Gicquel, B. (2011) New tuberculosis vaccines. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29 (Supl 3). p.56-61.
- Martín, C. & Gonzalo-Asensio, J. (2010) Attenuated Vaccines. En Nor, N.M, Acosta, A, Sarmiento, M.E. (eds.). *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development.* 1st edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T).
- Mata-Espinosa, D.A. & Hernández-Pando, R. (2008) Interferon gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Rev Invest Clin.* 60 (5). p.421-431.
- Marrero, A., Carreras, L., Valdivia, J.A., Montoro, E., González. E., Torres, R. et al. (2009) Dirección Nacional de Epidemiología. *Programa Nacional de Control de la TB. Manual de normas y procedimientos.* La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.
- McShane, H. & Williams, A. (2010) Preclinical evaluation of tuberculosis vaccines. En Nor, N.M., Acosta, A., Sarmiento, M.E. (eds.). *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development.* 1st edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T) .
- Mederos, L., Valdivia, J.A. & Valero-Guillén, P.L. (2007). Analysis of the structure of mycolic acids of *Mycobacterium simiae* reveals a particular composition of α -mycolates in strain 'habana', considered as immunogenic in tuberculosis and leprosy. *Microbiology.* 153. p.4159-4165.

- Mederos, L.M., Montoro, E.H. & Valero-Guillén, P.L. (2010) Structural studies of cord factors from *Mycobacterium simiae* related to the capacity for tumour necrosis factor alpha (α -TNF) induction. *Microbiology*. 156. p.3744-3753.
- Mederos, L.M., Valdivia, J.A., Sampere, M.A. & Valero-Guillén, P.L. (1998) Analysis of lipids reveals differences between '*Mycobacterium habana*' and *Mycobacterium simiae*. *Microbiology*. 144 (5) .p.1181-1188.
- Mederos, L., Valdivia, J.A. & Valero-Guillén, P.L. (2008) New variants of polar glycopeptidolipids detected in *Mycobacterium simiae*, including '*habana*' strains, as evidenced by electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry. *J Applied Microbiol*. 105. p.602–614.
- Meena, L.S. & Rajni (2010) Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Journal*. 277. p.2416–2427.
- Mehrad, B. & Standiford, T.J. (1999) Use of animal models in the study of inflammatory mediators of pneumonia. *ILAR Journal*. 40 (4). p.167-174.
- Meissner, G. & Schröder, K.H. (1975) Relationship between *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium habana*. *Am Rev Respir Dis*. 111 (2). p.196-200.
- Meraviglia, S., El-Daker, S., Dieli, F., Martini, F. & Martino, A. (2011) $\gamma\delta$ T cells cross-link innate and adaptive immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011. e 587315.
- Montaño, L.F. & Chávez, R. (2008) Respuesta inmune innata y adaptativa: ¿Son los TLRs el eslabón perdido?. *Rev Fac Med UNAM*. 51 (2). p.60-62.
- Morton, D.B. & the Joing Working Group on Refinement (2001). *Removal of blood from laboratory mammals and birds*. Laboratory Animals: Laboratory Animal Ltd. Royal Society of Medicine Press.
- Mustafa, A.S. (2009) Vaccine potential of *Mycobacterium tuberculosis*-specific genomic regions: in vitro studies in humans. *Expert Rev Vaccines*. 8 (10). p.1309-1312.
- Nathan, C. (2002) Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung. *American J Resp Critical Care Med*. 166. p.130-131.
- National Research Council (2002). *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. México DF: Halam México S.A de C.V.
- Newton, G.L., Buchmeier, N. & Fahey, R.C. (2008) Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 72. p.471–494.

- Nolan, S.T. & Lamichhane, G. (2010) Protective efficacy of BCG overexpressing an L, D-transpeptidase against *M. tuberculosis* infection. *PLoS ONE*. 5 (10). e13773.
- North, R.J. & Izzo, A.A. (1993) Granuloma formation in severe combined immunodeficient (SCID) mice in response to progressive BCG infection. *Am J Pathol*. 142. p.1959–1966.
- North, R.J. (1998) Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*. 113. p.55-58.
- Orme, I.M. & Collins, F.M. (1983) Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T-cell deficient recipients. *J Exp Med*. 158. p.74–83.
- Orme, I.M. (2005) The use of animal models to guide rational vaccine design. *Microbes and Infection*. 7. p.905-910.
- Ottenhoff, T.H.M. & Kaufmann, S.H.E. (2012) Vaccines against Tuberculosis: Where are we and where do we need to go?. *PLoS Pathog*. 8 (5). e1002607.
- Parida, S.K. & Kaufmann, S.H.E. (2010) The quest for biomarkers in tuberculosis. *Drug Discovery Today*. 15 (3/4). p.148-157.
- Pérez, A.B., Sierra, B., Delgado, I., Rodríguez, R. & Guzmán, M.G. (2000). Ensayo de linfoproliferación antígeno específico al virus dengue con células T humanas. *Rev Cubana Med Trop*. 52. p.197-202.
- Pieters, J. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: Maintaining a balance. *Cell Host & Microbe*. 2008. p.399-407.
- Pita S (1995). Análisis de supervivencia. *Cad Aten Primaria*. 2. p.130-135.
- Qiagen Omniscript™ Reverse Transcriptase Handbook 04/1999. EUA: Valencia.
- Qiagen RNeasy® Mini Handbook 09/2010. 4th edition. EUA: Valencia.
- Quintero-Macías, L., Santos-Mendoza, T., Donis-Maturano, L., Silva-Sánchez, A., Aguilar, D., Orozco, H. et al. (2010) T-cell responses and in vivo cytotoxicity in the target organ and the regional lymphoid tissue during airborne infection with the virulent *Mycobacterium tuberculosis* MT103 and its lipid mutant *fadD26*. *Scandinavian J Immunol*. 71. p.20–28.
- Raj, P.P., Srivastava, S., Jain, S.K., Srivastava, B.S. & Srivastava, R. (2003) Protection by live *Mycobacterium habana* vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv challenge in mice. *Indian J Med Res*. 117. p.139-145.

- Randt, L., Elhay, M., Rosenkrands, I., Lindblad, E.B. & Andersen, P. (2000) ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 68 (2). p.791–795.
- Rao, R.N. & Meena, LS. (2011) Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and cord Factor: An overview. *Biotechnology Research International.* 2011. 274693.
- Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A. & Glickman, M.S. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* control host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med.* 201. p.535-543.
- Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W.R. & Glickman, M.S. (2006) Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation and virulence. *J Clin Invest.* 116. p.1660-1667.
- Rastogi, N., Legrand, E. & Sola, C. (2001) The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 20. p.21-54.
- Rivas-Santiago, B., Contreras, J.C.L., Sada, E. & Hernández-Pando, R. (2008) The potential role of lung epithelial cells and β -defensins in experimental latent tuberculosis. *Scandinavian J Immunol.* 67. p.448–52.
- Rocha-Ramírez, L.M., Estrada-García, I., López-Marín, L.M., Segura-Salinas, E., Méndez-Aragón, P., van Soolingen, D. et al. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis.* 88. p.212–220.
- Romano, M. & Huygen, K. (2012) An update on vaccines for tuberculosis - there is more to it than just waning of BCG efficacy with time. *Expert Opin Biol Ther.* 12 (12). p.1601-1610.
- Romano, M. & Huygen, K. (2010) DNA vaccines for the prophylaxis of tuberculosis. En Nor, N.M., Acosta, A., Sarmiento, M.E. (eds.). *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development.* 1st edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T).
- Rook, G.A.W., Hernández-Pando, R., Dheda, K. & Seah, G.T. (2004) IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *TRENDS in Immunology.* 25 (9). p.483-488.
- Rook, G.A.W., Hernández-Pando, R. & Zumla, A. (2009) Tuberculosis due to high-dose challenge in partially immune individuals: A problem for vaccination?. *J Infect Dis.* 199. p.613-618.

- Russell, D.G., Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S. & Altare, F. (2009) Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. *Nat Immunol.* 10 (9). p.943-948.
- Russell, W.M.S. & Burch, R.L. (1959) *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co. Ltd.
- Sadoff, J.C. & Hone, D. (2005) The role of “go no-go” decisions in TB vaccine development. *Microbes and Infection.* 7. p.899-904.
- Sampson, S.L., Mansfield, K.G., Carville, A., Magee, D.M., Quitugua, T., Howerth, E.W. et al. (2011) Extended safety and efficacy studies of a live attenuated double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* as a vaccine candidate. *Vaccine.* 29 (29-30). p.4839–4847.
- Sai-Priya, V.H., Latha, G.S., Hasnain, S.E., Murthy, K.J. & Valluri, V.L. (2010) Enhanced T cell responsiveness to *Mycobacterium bovis* BCGr32-kDa Ag correlates with successful anti-tuberculosis treatment in humans. *Cytokine.* 52 (3) p.190-193.
- Schäfer, G., Guler, R., Murray, G., Brombacher, F. & Brown, G.D. (2009) The role of scavenger receptor B1 in infection with *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PLoS ONE.* 4 (12). e8448.
- Scherer, C.F.C., Endsley, J.J., de Aguiar, J.B., Jacobs, W.R., Larsen, M.H., Palmer, M.V. et al. Evaluation of granulysin and perforin as candidate biomarkers for protection following vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or *M. bovis* RD1. *Transboundary Emerg Dis.* 56. p.228–239.
- Silva, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., Altare, F. (2012) The tuberculous granuloma: An unsuccessful host defense mechanism providing a safety shelter for the bacteria?. *Clin Develop Immunol.* 2012. Article ID 139127.
- Singh, N.B., Celia, T.A., Lave, R.E., Rees, R.J.W., Colston, D.M.J. (1989) Vaccination of mice against *Mycobacterium leprae* infection. *Infect Immun.* 57 (2). p.653-655.
- Singh, N.B., Gupta, H.P., Srivastava, A., Kandpal, H. & Srivastava, U.M.L. (1997) Lymphostimulatory and delayed-type hypersensitivity responses to a candidate leprosy vaccine strain: *Mycobacterium habana*. *Lepr Rev.* 68. p.125-130.
- Singh, N.B., Mathur, I.S., Gupta, H.P. & Srivastava, A. (1981) A novel immunogenic strain ‘*Mycobacterium habana*’ against *Mycobacterium ulcerans* (Buruli ulcer) infection in mice. *Curr Sci.* 50. p.994-996.

- Singh, A., Dey, A.B., Mohan, A., Sharma, P.K. & Mitra, D.K. (2012) Foxp3+ regulatory T cells among tuberculosis patients: impact on prognosis and restoration of antigen specific IFN- γ producing T cells. *PLoS One*. 7 (9). e44728.
- Singhal, N., Bisht, D. & Joshi, B. (2010). Immunoprophylaxis of tuberculosis: An update of emerging trends. *Arch Immunol Ther Exp*. 58. p.97–106.
- Smith, A.L. (1981) Unit Three: Microbes, production of infection. En *Principles of Microbiology*. 9th ed. St-Louis, Missouri, USA: Mosby Editorial Company.
- Smith, D., Hansch, H., Bancroft, G. & Ehlers, S. (1997) T-cell independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology*. 92. p.13–21.
- Smith, D.A., Parish, T., Stoker, N.G. & Bancroft, G.J. (2001) Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun*. 69 (2). p.1142–1150.
- Smith, P.J. & Warfield, J.L. (2005) Section 1 Histopathology: Specimen handling and preparation for routine diagnostic histopathology. En Crocker, J. & Burnett, D. (eds.). *The Science of Laboratory Diagnosis*. 2nd edition. the Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd
- Stenger, S (2005) Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis*. 64. p.24–28.
- Taylor, N., Bahunde, F., Thompson, A., Yu, J.S., Jacobs, W.R., Letvin N.L. et al. (2012) Enhanced priming of adaptive immunity by *Mycobacterium smegmatis* mutants with high-level protein secretion. *Clin Vaccine Immunol*. 19 (9). p.1416–1425.
- Thaiss, C.A. & Kaufmann, S.H.E. (2010). Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *YALE J Biology and Medicine*. 83. p.209-215.
- Trejo, H., Gorocica, P., Porras, F., Chávez, R., Lascrain, R. & Zenteno E. (2003) Bases moleculares de la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los macrófagos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 16 (1). p.41-47.
- Tyagi, A.K., Nangpal, P. & Satchidanandam, V. (2011) Development of vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis* . 91 (5). p.469-478.
- Valdivia, J.A., Suárez, R. & Echemendía, M. (1971) *Mycobacterium habana*, probable nueva especie dentro de las especies no clasificadas. *Bol Hig Epidemiol*. 9. p.65-73.
- Valdivia, J.A. (1973) *Mycobacterium habana*: Significación clínica y epidemiológica. Informe preliminar. *Bol Hig Epid*. 11. p.129-133.

- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H.M. & van der Meer, J.W.M. (2002) Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 15 (2). p.294–309.
- van Helden, P.D. & Hoal, E.G. (2013) A new TB vaccine: Fact or fiction?. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36 (3). p.287-294.
- Wakhlu, A., Gaur, S.P.S., Kaushal, G.P., Misra, A., Asthana, O.P. & Sircar, A.R. (2001) Response of *Mycobacterium habana* vaccine in patients with lepromatous leprosy and their household contacts. A pilot clinical study. *Lepr Rev.* 72. p.179-191.
- Walker, K.B., Brennan, N.J., Ho, M.M., Eskola, J., Thiry, G., Sadoff, J. et al. (2010) The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine.* 28. p.2259–2270.
- Webb, S.A.R. & Kahler, C.M. (2008) Bench-to-bedside review: bacterial virulence and subversion of host defences. *Critical Care.* 12.p. 234.
- Weiszfeiler, J.G., Karaseva, V. & Karczag, E. (1981) *Mycobacterium simiae* and related mycobacteria. *Rev Infect Dis.* 5. p.1-25.
- Welin, A. & Lerm, M. (2012) Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 92 (2). p.113-120.
- Welin, A., Winberg, M.E., Abdalla, H., Särndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O. et al. (2008) Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun.* 76 (7). p.2882–2887.
- WHO (2013) *Global Tuberculosis Report 2013* ISBN 978 92 4 15646550 62.
- WHO/TDR (2009). *Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development.* 2nd ed. ISBN 978 92 4 154755 0.
- Wong, M., Ziring, D., Korin, Y., Desai, S., Kim, S., Lin, J. et al. (2008) TNF α blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clinical Immunology.* 126. p.121–136.
- Xiao-Yan, Y., Qun-Frei, C., You-Ping, L. & Si-Miao, W. (2011) *Mycobacterium vaccae* as adjuvant to anti-tuberculosis chemotherapy in never treated tuberculosis patients. A meta-analysis. *PLoS One.* 6 (9). e23826.

VIII.2. Producción científica de la autora relacionada con el tema de la Tesis

PUBLICACIONES

1. **Valdés I**, Echemendía M, Mederos L, Valdivia JA, Montoro E. Aspectos relevantes en el uso de *Mycobacterium 'habana'* como candidato vacunal contra la tuberculosis. *VacciMonitor* 2011; 20(3): 34-9.
2. Montoro E, Díaz R, Lemus D, Mederos LM, **Valdés I**, Martínez MR, Llop A, Valdivia JA. El Laboratorio Nacional de Referencia y su contribución a la eliminación de la tuberculosis en Cuba. *Rev cubana Salud Pub* 2012; 38(2): 214-29.
3. **Valdés I**, Montoro E, Hernández-Pando R. Producción in vitro de interferón γ en ratones vacunados con *Mycobacterium 'habana'* frente a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev cubana Med Trop* 2012; 64(3): 189-95.
4. **Valdés I**, Mederos LM, Echemendía M, Valdivia JA, Montoro E. (2014) CHAPTER 5.8 *Mycobacterium 'habana'* as a live vaccine candidate against TB. En Nor, N. Acosta, A. Sarmientos, M.E. (eds.). *The Art and Science of Tuberculosis Vaccine Development*. 2nd edition. Malaysia: Oxford Fajar Sdn. Bhd. (008974-T).
5. **Valdés I**, Montoro E, Mata-Espinoza D, Asín O, Barrios-Payán O, Francisco A, Valdivia JA, Hernández-Pando R. Virulence, immunogenicity and protection conferred by *Mycobacterium 'habana'* in a murine model of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2014; 94(1): 65-72.

RESÚMENES PUBLICADOS

1. **Valdés I**, Montoro E, Aguilar D, Orozco H, Hernández-Pando R. '*Mycobacterium habana'*: Virulence, Immunogenicity and protection against experimental tuberculosis. *Inter J Tuberculosis Lung Dis* 2010; 14(11): S243.
2. **Valdés I**, Montoro E, Aguilar D, Hernández-Pando R. Eficacia protectora de '*Mycobacterium habana'* como candidato vacunal contra la tuberculosis, en un modelo experimental murino. *Vaccimonitor* 2011; 20(supp 1): 8.

EVENTOS CIENTÍFICOS

Simposio Internacional "Fronteras del conocimiento en tuberculosis y otras micobacteriosis", Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México DF, México; 2006

Potencial vacunal de *Mycobacterium 'habana'* contra la infección experimental con especies del género *Mycobacterium*. (Autora)

Taller Internacional de Centros Colaboradores OMS e Instituciones de Excelencia Científica. La Habana, Cuba; 2006

Caracterización microbiológica e inmunológica de cepas de *Mycobacterium 'habana'* como posible inmunógeno contra la Tuberculosis. (Autora)

Congreso Neumocaribe 2007 y 1er Simposio de Cáncer de Pulmón. Santiago de Cuba, Cuba; 2007

Patogenicidad de cepas de *Mycobacterium 'habana'* en un modelo murino de infección pulmonar progresiva. (Autora)

Evaluación experimental de la respuesta inmune inducida por *Mycobacterium 'habana'* en un modelo murino. (Autora)

International Workshop on Tuberculosis Vaccines 2007. Varadero, Cuba; 2007.

Virulence of *Mycobacterium 'habana'* strains in a Balb/c model of progressive pulmonary tuberculosis. (Autora)

Immunogenicity induced by three strains of *Mycobacterium 'habana'* in a Balb/c model of progressive pulmonary tuberculosis. (Autora)

VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. La Habana, Cuba; 2007

Immunopatogenia y capacidad protectora de cepas de *Mycobacterium 'habana'* empleando un modelo experimental murino. (Autora).

VI Congreso Nacional de Inmunología. Camagüey, Cuba; 2008.

Potencial inmunogénico y protector de cepas de *Mycobacterium 'habana'*. Estudios in vivo. (Autora).

Convención Centro Provincial de Higiene y Epidemiología Ciudad de la Habana. La Habana, Cuba; 2008.

Immunogenicidad y protección experimental inducida por cepas vivas de *Mycobacterium habana* contra la infección tuberculosa. (Autora).

Advanced WHO/TDR course on Immunology, Vaccinology and Biotechnology applied to Tuberculosis". Lausanne, Suiza; 2010.

Virulence, Immunogenicity and protection conferred by '*Mycobacterium habana*' in a murine model of pulmonary tuberculosis. (Autora)

Congreso 70 Aniversario del IPK. VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. La Habana, Cuba; 2009.

Immunopatogenia y capacidad protectora de cepas de *Mycobacterium habana* empleando un modelo experimental. (Autora)

30th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. Lisboa, Portugal; 2009.

Virulence, Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium habana* in a murine model of pulmonary tuberculosis. (Autora)

41st World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Berlin, Alemania; 2010.

Virulence, Immunogenicity and protection against experimental tuberculosis. (Autora)

7mo Congreso Nacional de Inmunología. La Habana, Cuba; 2011.

Eficacia protectora de *Mycobacterium habana* como candidato vacunal contra la Tuberculosis, en un modelo experimental murino (Autora).

"X Congress of the Latin-American Association of Immunology-ALAI". INMUNOPERU 2012. Lima, Perú; 2012.

Virulencia, inmunogenicidad y protección conferida por *Mycobacterium habana* contra la Tuberculosis experimental.

RECONOCIMIENTOS Y PREMIACIONES

Sanofi Pasteur Grant for Latin American Women Physicians and Scientists como parte del "14th International Congress on Infectious Diseases". Miami, Estados Unidos de América; 2010.

Mycobacterium habana: Virulence, Immunogenicity and protection against experimental tuberculosis. (Autora)

Resultado Relevante del IPK y propuesta a logro de la Academia de Ciencias de Cuba. Octubre, 2013

Mycobacterium habana TMC 5135 como candidato vacunal contra la tuberculosis: Evidencias experimentales. (Autora)

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba. Abril, 2014

Mycobacterium 'habana' TMC 5135 como candidato vacunal contra la tuberculosis: Evidencias experimentales. (Autora)

PROYECTOS

- Proyecto Nacional CITMA (PNC-09) Desarrollo de vacunas de nueva generación y de métodos de diagnóstico para el control de la Tuberculosis. (2004-actualidad).
- Proyecto de Colaboración Internacional Cuba-México (CONACyT-J200.754/2004). Caracterización microbiológica e inmunológica de cepas de *Mycobacterium 'habana'* como posible inmunógeno contra la Tuberculosis" (2005-2010).
- Proyecto Ramal MINSAP Técnicas de avanzada aplicadas al diagnóstico, la vigilancia e investigación de laboratorio de *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias. (2013-actualidad)

VIII.3. Producción científica de la autora no relacionada con el tema de la Tesis

PUBLICACIONES

1. Martínez G, Asín O, Illnait MT, **Valdés I**. Potencial patógeno y de diseminación de cepas de *Cryptococcus neoformans* en ratones BALB/c. Bioquímica. 2003; 28 (especial).
2. **Valdés I**, Martínez G, Fernández CM, Illnait MT. Estudio de la pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar Extracto de semillas de girasol. Rev Cub Med Trop 2003; 55(2): 119-20.
3. Illnait MT, **Valdés I**, Fernández CM, Perurena MR, Martínez GF. Determinación de la DL50 de una cepa de *Cryptococcus neoformans* utilizando diferentes vías de inoculación. Rev Pan Infectol 2004; 6(1): 8-11.
4. Illnait MT, Tamargo I, Martínez GF, Fuentes K, **Valdés I**, Rodríguez F. Infección del sistema nervioso central por *Cryptococcus neoformans* y *Streptococcus pneumoniae* en un paciente seronegativo al VIH. Rev Pan Infectol 2004; 6(2): 54-6.
5. Illnait MT, Miranda Y, **Valdés I**, Martínez GF, Fernández CM, Perurena MR, Mendoza D. Obtención de antiseros específicos para la serotipificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Rev Cub Med Trop 2004; 56(2): 142-4.

6. Martínez G, Barrial L, Illnait MT, **Valdés I**, Fernández C, Perurena M *et al*. Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. Rev Cub Med Trop 2004; 56(1): 77-9.
7. Fernández CM, Martínez G, Perurena MR, Illnait MT, **Valdés I**. La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí": funciones y retos. Rev Cubana Med Trop 2005; 57(3): 1-7.
8. Illnait MT, Gato R, Martínez GF; Otero A, Sarracent J, Rodríguez H, Fernández CM, **Valdés I**. Efecto del anticuerpo monoclonal 4B3 en la infección experimental por *Cryptococcus neoformans*. Rev Cubana Med Trop 2011; 63(2): 123-9.

RESÚMENES PUBLICADOS

1. **Valdés I**, Más P, Martínez E. El Comité de Ética de Investigación del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí": Experiencia de tres años de funcionamiento. Rev Cubana de Farmacia 2011; 45 (supp 2): P-E-03.
2. Martínez GF, Illnait MT, **Valdés I**, Fernández CM, Torres M, Millán JC, Perurena MR, Mendoza D. Cryptococcal Meningoencephalitis: Clinical manifestation, and laboratory findings in patients with and without AIDS. Int J Infect Dis 2004; 6 (supl 1): 38.004.
3. Illnait MT, Gato R, Martínez G, **Valdés I**, Fernández CM, Perurena MR, Sarracent J, Otero A. Evaluation of a monoclonal antibody anti *Cryptococcus neoformans* in fungicide capacity of murine macrophage P338.D1. Clinical and Investigative Medicine 2004; 27(4): M 2.56.

EVENTOS

XI Congreso Internacional de Enfermedades Infecciosas. Cancún, México; 2004.

Cryptococcal Meningoencephalitis: Clinical manifestation, and laboratory findings in patients with and without AIDS. (Coautora)

XII Congreso Internacional de Inmunología. Montreal, Canadá; 2004.

Evaluation of a monoclonal antibody anti-*Cryptococcus neoformans* in fungicide capacity of murine macrophage P338.D1. (Coautora)

XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba; 2007. **Resultado Destacado.**

Criptococosis en Cuba: Estudio Integral. (Autora)

IV Congreso Nacional de Inmunología. Santa Clara, Cuba; 2004

Sistema Látex para la detección de antígenos de *Cryptococcus neoformans*. Normalización y evaluación externa. (Autora).

AcM 4B3 y su efecto protector en la criptococosis murina experimental. (Coautora)

VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. La Habana, Cuba; 2007

Fragmento final del gen HSP65. Posible secuencia diana para el diagnóstico del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. (Coautora)

V Taller Internacional de Diseño y Conducción de Ensayos Clínicos. La Habana, Cuba; 2011.

El Comité de Ética de Investigación del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí": experiencia de tres años de funcionamiento (Autora)

"X Congress of the Latin-American Association of Immunology-ALAI". INMUNOPERU 2012. Lima, Perú; 2012.

In vitro and in vivo experimental pathogenicity of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* (Coautora)

33 Congress of the "European Society of Mycobacteriology". Brasov, Rumania; 2012. Application of alternative methods to identify resistance to first and second line antituberculosis drugs (Coautora)

QUIMICACUBA 2012. (La Habana, Cuba; 2012)

Reconocimiento inmunológico de las proteínas de secreción tempranas de *Mycobacterium habana*. (Coautora)

RECONOCIMIENTOS Y PREMIACIONES

Logro de la Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, Cuba; 2004.

Criptococosis en Cuba. Estudio Integral

Resultado Destacado en el XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba; 2007.

Criptococosis en Cuba: Estudio Integral. (Autora)

PROYECTOS

- Proyecto Internacional de Colaboración Cuba-Venezuela: "Desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico, detección de resistencia, caracterización molecular e

- implementación de sistemas de vigilancia epidemiológica para el control de la tuberculosis” (Terminado).
- Proyecto Internacional de Colaboración con Bélgica: “Desarrollo de métodos rápidos para el diagnóstico y detección de resistencia *en Mycobacterium tuberculosis*” (Terminado)
 - Proyecto Internacional del Fondo Mundial de lucha contra el sida, la tuberculosis y la malaria, Ronda 7: “Fortalecimiento del Programa Tuberculosis en la República de Cuba” (En ejecución).

ANEXOS

Anexo 1.Descripción de los medios de cultivo

Medio Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC

Medio Middlebrook 7H9 deshidratado	4,7 g
Glicerina	4 mL
Agua destilada	900 mL
ADC	100 mL

Se resuspendió el medio Middlebrook 7H9 en el agua destilada con glicerina. Se esterilizó a 121°C durante 10 min. Una vez que el medio alcanzó una temperatura de 45°C se agregó, asépticamente, el ADC. Se verificó el pH final a $6.6 \pm 0,2$. Se realizó el control de esterilidad a 37°C por 72 h. El medio se conservó a 4°C hasta su utilización.

Medio Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC

Medio Middlebrook 7H10 deshidratado	19 g
Glicerina	5 mL
Agua destilada	900 mL
ADC	100 mL

Se resuspendió el medio Middlebrook 7H10 en agua destilada con glicerina y se calentó, con agitación, hasta la total disolución del medio. Se esterilizó a 121°C por 10 min. Una vez que el medio alcanzó una temperatura de 50-55°C, se agregó, asépticamente, el OADC. Se verificó el pH final a $6.6 \pm 0,2$. Se distribuyó en placas de Petri, a razón de 20 mL/placa. Una vez sólido, se realizó el control de esterilidad a 37°C por 72 h. El medio se conservó a 4°C hasta su utilización.

Anexo 2. Preparación de soluciones

PBS

Fosfato disódico anhidro	1,15 g
Fosfato monopotásico	0,2 g
Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Agua destilada	1000 mL

Se disolvieron los reactivos en agua destilada y se ajustó el pH a 6,8. Se esterilizó durante 15 min a 121°C y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización

Solución de lisis para eritrocitos

Cloruro de amonio	0,829 g
Ácido etilendiamino tetraacético	0,037 g
Hidrógeno carbonato de potasio	0,1 g

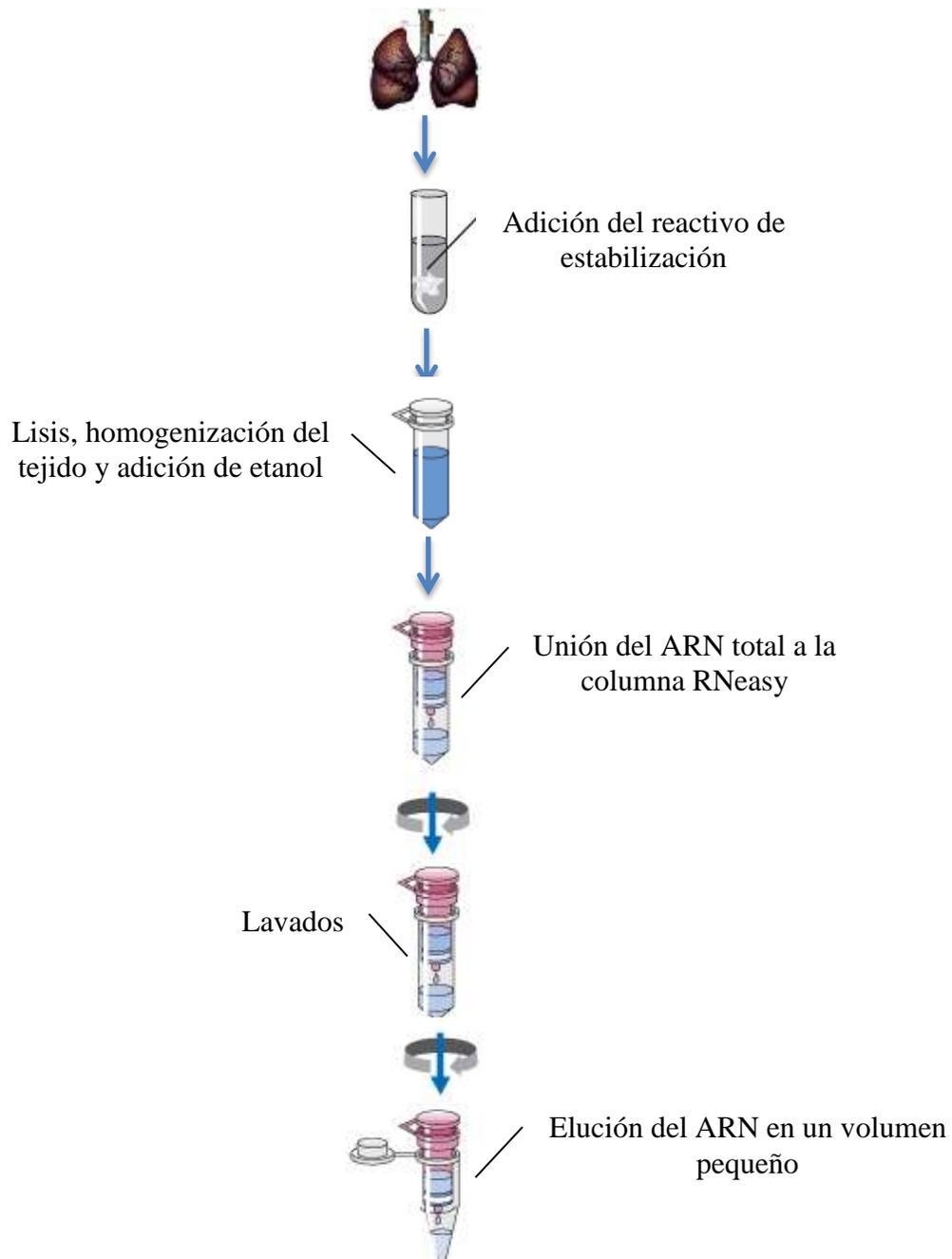
Se disolvieron los componentes en agua destilada y se ajustó el pH a 7,2. Se aforó a un volumen de 100 mL y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización

Anexo 3. Protocolo para el conteo bacteriano con DAF

- Se preparó una solución madre de DAF (2.5 mg de DAF en 500 μ L de acetona fría).
- Se tomaron 6.5 μ L de la solución madre de DAF y se diluyó en 500 μ L de SS
- Se realizó una dilución 1:100 de las bacterias con la solución de DAF, preparada anteriormente y se esperó de 15-20 min para realizar el conteo.
- El conteo bacilar se realizó en cámara de Neubauer bajo microscopio de fluorescencia (filtro de excitación: 460-490 nm, Filtro de emisión; 510IF)

Nota: Las bacterias viables son capaces de metabolizar el colorante por lo que el conteo final del inóculo se realiza en base a las bacterias vivas existentes en la suspensión.

Anexo 4. Diagrama de flujo para el aislamiento y purificación del ARNm a partir de tejidos animales empleando el estuche comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen)



*Adaptado de *Qiagen RNeasy® Mini Handbook 09/2010*

Anexo 5. Protocolo para la transcripción reversa del ARNm empleando el juego de reactivos comercial Omniscript (Qiagen, Inc)

1. Se descongeló la solución que contenía el ARNm, en hielo. Los cebadores, el tampón RT 10X, la mezcla de dNTP y el agua libre de ARNasas se descongelaron a temperatura ambiente. Estos se colocaron en hielo inmediatamente y se homogeneizaron empleando vórtex.
2. Se diluyó el inhibidor de ARNasas a una concentración final de 10 U/ μ L en solución tampón RT 1X fría. Se mezcló cuidadosamente en vórtex y se centrifugó brevemente para colectar los residuos líquidos de los lados del tubo.
3. Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a las siguientes proporciones

Componentes	Volumen/reacción	Concentración final
Mezcla de reacción		
Tampón RT 10X	2,0 μ L	1X
Mezcla de dNTP (5mM cada dNTP)	2,0 μ L	0,5 mM cada dNTP
Cebadores (10 μ M)	2,0 μ L	1 μ M
Inhibidor de ARNasas (10 units/ μ l)	1,0 μ L	10 U / 20 μ L reacción
Reverso transcriptasa Omniscript	1,0 μ L	4 U / 20 μ L reacción
Agua libre de ARNasas	variable	
Molde de ARNm		
ARNm molde, añadido en el paso 4	variable	Hasta 2 μ g / 20 μ L reacción
Volumen Total	20,0 μL	-

Se mezclaron gentilmente en vórtex por un tiempo no mayor de 5 s y se centrifugaron brevemente para colectar los residuos líquidos de los lados del tubo. Se mantuvieron en hielo en hielo.

4. Se adicionó el molde de ARN a la mezcla de reacción y se mezcló cuidadosamente empleando vórtex por un tiempo no mayor de 5 s. Posteriormente se centrifugó brevemente para coleccionar los residuos líquidos de los lados del tubo y se mantuvo en hielo.

5. Se incubó a 37°C por 60 min.

*Adaptado de *Qiagen Omniscript™ Reverse Transcriptase Handbook. 09/1999*

Anexo 6. Protocolo del PCR en tiempo real para el análisis de citoquinas e iNOS empleando el estuche Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen)

1. Se descongeló la mezcla de reacción QuantiTect SYBR Green PCR 2X, el molde de ADN, los cebadores y el agua libre de ARNasas y se mezclaron individualmente las soluciones.
2. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo a las siguientes proporciones

Componentes	Volumen/ Reacción	Concentración final
2x QuantiTect SYBR Green PCR	25 μ l	1X
Mezcla de reacción*		
Cebador A	variable	0,3 μ M
Cebador B	variable	0,3 μ M
Agua libre de ARNasas	variable	–
Opcional: Uracil-N-glycosylasa	variable	0.5 U / reacción
Molde de ADN (añadir en el paso 4)	variable	\leq 500 ng / reacción
Volumen Total	50,0 μL	–

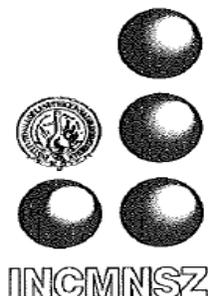
* Provee de una concentración final de 2.5 mM de MgCl₂.

3. Se homogeneizó la mezcla de reacción y dispensaron los volúmenes apropiados en las placas de PCR.
4. Se añadió el ADN molde (\leq 500 ng/reaction) a los pozos que contenían la mezcla de reacción.

Anexo 7. Protocolo para la realización del ELISA de cuantificación de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo celulares

1. Se recubrieron los pozos con AcM anti IFN- γ de ratón. Se sellaron las placas y se incubaron toda la noche a 4°C.
2. Se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (volumen \geq 300 μ L/pozo).
3. Las placas se bloquearon con el diluyente del ensayo (volumen \geq 200 μ L/pozo) y se incubaron a temperatura ambiente (T.A) por 1 h.
4. Se repitió el paso 2.
5. Se preparó la curva patrón y las diluciones de las muestras en el diluyente del ensayo. La curva se elaboró a partir del patrón suministrado con el estuche (IFN- γ recombinante de ratón 2000 pg/mL). Se realizaron diluciones seriadas adicionando 300 μ L de cada estándar al siguiente tubo y agitando entre cada transferencia. El diluyente del ensayo se empleó como blanco (0 pg/mL).
6. Se añadieron 100 μ L de cada uno de los puntos de la curva patrón, las muestras y controles en los pozos apropiados. La placa se incubó por 2 h a T.A.
7. Se repitió paso 2 (cinco veces)
8. Se añadieron, a cada pozo, 100 μ L de la solución de detección: AcM anti IFN- γ de ratón biotilado / conjugado avidina-peroxidasa de rábano picante. Las placas se incubaron 1 h a T.A.
9. Se repitió el paso 2 (10 veces).
10. Se añadieron 100 μ L del sustrato TMB (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen). Las placas se incubaron sin sellar por 30 min a T.A. y oscuridad.
11. Se detuvo la reacción con 50 μ L de la solución de parada (H₂SO₄ 1M), a cada pozo.
12. La lectura se realizó en espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm dentro de los primeros 30 min después de detenida la reacción

**Anexo 8. Aval de aprobación del Comité de Investigación en animales del
INCMNSZ. Registro CINVA 190**



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

México D.F., 11 de febrero, 2005

Dr. Rogelio Hernández Pando
Departamento de Patología

Estimado Dr. Hernández,
En relación con el proyecto de investigación:
"Caracterización microbiológica e inmunológica de cepas de *Mycobacterium habana*
como posible inmunógeno contra la tuberculosis"
Registro CINVA: 190
2da. Revisión: 28 de enero, 2005

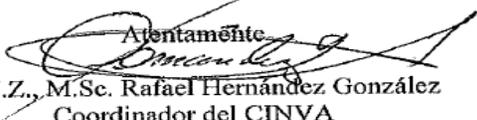
El Comité de Investigación en Animales (CINVA) ha revisado su respuesta a las observaciones emitidas en la primera revisión y después de conocerlas ha resuelto APROBAR su proyecto de investigación con las siguientes observaciones las cuales le solicito incluya en su solicitud de revisión de proyecto en futuras ocasiones para agilizar la respuesta a su solicitud.

Observaciones.

1. Los documentos que los investigadores envían para revisión del proyecto son revisados por los miembros del Comité los cuales no necesariamente conocen los trabajos anteriores del investigador. Si bien el trabajo de los investigadores puede ser conocido por algunos de los miembros, no es conocido por todos, por lo que no es suficiente referirse solamente al modelo descrito por ellos mismos sin especificar datos importantes en el protocolo. En un futuro deberá incluirse un párrafo donde brevemente resuman la forma cómo serán manipulados los animales (inoculación subcutánea, sitio, intra-traqueal, cantidades, sedación-anestesia). Debe justificarse y especificarse la carga bacteriana que será inoculada. También se debe mencionar la forma en la que serán cuidados los animales posteriormente (alimentación, atención médica, otros cuidados) y los criterios para terminación de los experimentos individuales en caso de no "alcanzar llegar" a los tiempos predeterminados (signos de dolor, insuficiencia respiratoria, desarrollo de ulceraciones crónicas, etc.).
2. Debe recordarse que el CINVA es independiente del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio.

Investigación particular y en espera de su respuesta me despido de usted deseándole éxito en su proyecto de investigación.

Tradición Servicio
Asistencia Docencia
20007700

Atentamente

M.V.Z., M.Sc. Rafael Hernández González
Coordinador del CINVA

• Vasco de Quiroga 15,
• Delegación Tlalpan
• C.P. 14000 México, D.F.
• Tels. 55-73-12-00
• 55-73-06-11

