



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

Mycobacterium tuberculosis, un problema de salud mundial

Autor: Jorge Gómez-Carpintero Jiménez

D.N.I.: 05461344-V

Tutor: Rosalía Díez Orejas

Convocatoria: Junio

Resumen

M. tuberculosis es la bacteria responsable de causar la tuberculosis, una enfermedad contagiosa responsable de una inmensa cantidad de muertes en todo el mundo. Este patógeno es capaz, por sus peculiares características de manipular la respuesta inmune de tal manera que hace de un entorno hostil para la mayoría de patógenos, un nicho perfecto para su supervivencia. El diagnóstico de esta enfermedad es muy complicado debido a que es capaz de permanecer en estado de latencia clínica, haciendo de los asintomáticos un reservorio en el que es capaz de permanecer indefinidamente. Debido al desarrollo de resistencias, los tratamientos frente a la enfermedad son cada vez más escasos. Por todo ello, el desarrollo de una vacuna parece ser el único modo de erradicar esta terrible enfermedad.

Introducción y antecedentes

La tuberculosis es una enfermedad pulmonar infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, más conocido en el mundo entero como el bacilo de Koch. Aparte de *M. tuberculosis*, la cual es la bacteria responsable de provocar el mayor número de casos de tuberculosis, hay otras especies del mismo género que también son capaces de causar la enfermedad. Estas bacterias son *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. Todas estas bacterias constituyen el complejo tuberculosis y son capaces de causar la enfermedad. [2]

La tuberculosis es una enfermedad que convive con el ser humano desde la antigüedad. De hecho se han encontrado evidencias arqueológicas de la enfermedad en momias egipcias y peruanas, de las que se tomaron muestras de ADN y se detectó la presencia del patógeno. [1] Durante la historia, la tuberculosis es probablemente una de las enfermedades que ha acabado con la vida de un mayor número de personas. Durante el transcurso de la historia, la tuberculosis ha sido considerada una enfermedad aceptada entre la población. Mientras que la peste o la sífilis eran consideradas castigos divinos, aquellos que estaban infectados con la tuberculosis transmitían un aire bohemio y poético que resultaba, hasta cierto punto atractivo y bello.

Hoy en día se estima que un tercio de la población mundial está infectada con la enfermedad, por lo que esta supone un problema de salud mundial de primer orden. [1]

Objetivos

- 1) Conocer las características de *M. tuberculosis* y de la tuberculosis y porque es a día de hoy un problema de salud mundial.
- 2) Estudiar la complejidad de la interacción entre *M. tuberculosis* y el sistema inmune del hospedador, necesaria para el desarrollo de una solución a este problema de salud Conocer la problemática del diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

- 3) Evaluar las características de la vacuna actual y las de las nuevas vacunas que se encuentran en desarrollo y el posible rol de estas en el control y erradicación de la enfermedad.
- 4) Evaluar las características de la vacuna actual y las de las nuevas vacunas que se encuentran en desarrollo y el posible rol de estas en el control y erradicación de la enfermedad.

Resultados y discusión

1.1) La inmunocompetencia del hospedador es crucial en el devenir de la enfermedad.

La tuberculosis es una enfermedad pulmonar contagiosa que principalmente se transmite por vía aérea. El patógeno se encuentra mayormente en gotículas suspendidas en el aire y por ello el principal portal de entrada son las vías respiratorias. Una vez el patógeno ha conseguido cruzar el portal de entrada hacia el cuerpo humano pueden sucederse varias posibilidades. En primer lugar podría darse el caso de que la respuesta inmune innata del organismo sea capaz de eliminar al patógeno y que la infección no llegue nunca a establecerse. Si el patógeno por el lado contrario es capaz de sobrevivir a la respuesta inmune innata la infección se establece y el individuo pasa a enfermar. ^{[2][3][14][15]}

Una vez adquirida la enfermedad pueden darse varias posibilidades. En algunos casos, la respuesta inmune celular de hospedador es insuficiente para contener la multiplicación activa del patógeno, mayormente por causas de **inmunosupresión, inmunodeficiencia** o incluso **desnutrición severa**. Este proceso es conocido como **tuberculosis primaria activa**. La tuberculosis primaria es frecuente en aquellas personas infectadas con el **VIH** previamente a adquirir la tuberculosis ya que las el sistema inmune de estos individuos está muy mermado y es incapaz de detener la proliferación del patógeno. Esta presentación de la enfermedad es especialmente grave ya que ante la imposibilidad de controlar la multiplicación del patógeno, este en un gran número de casos, es capaz de diseminarse por todo el organismo. Usualmente debido a esto, la tuberculosis primaria suele desembocar en una **meningitis tuberculosa** (en la cual el patógeno alcanza las meninges, causando la sintomatología típica de una meningitis) o una **tuberculosis diseminada** (en la cual el patógeno se disemina y multiplica en distintos órganos, provocando fallo multiorgánico). En cualquier caso, cualquiera de los dos procesos suele ser fatal para el hospedador. ^{[2][3][14][15]}

En la mayoría de los casos, en los cuales el paciente es inmunocompetente, la respuesta inmune es capaz de contener la multiplicación activa del patógeno y este queda confinado dentro de unas lesiones producidas durante la respuesta inmune denominadas **granulomas**. En esta forma, la tuberculosis queda en estado de latencia clínica y se denomina **tuberculosis latente**. En este estadio, la enfermedad es asintomática y el único signo clínico es una reacción

inflamatoria inespecífica. El enfermo de tuberculosis latente supone un **reservorio** de la enfermedad pero no será un foco infeccioso ya que no eliminará bacilos. ^{[2][3][14][15]} Entre un 90 y un 95% de los infectados permanecerán como asintomáticos durante el resto de sus vidas pero en el 5-10% restante por causas aún desconocidas la infección se reactivará y el paciente pasará a ser un foco infeccioso. Esta manifestación de la enfermedad se conoce como **tuberculosis secundaria o de reactivación**. Además en aquellos individuos que presenten una infección latente y que adquieran una inmunodeficiencia posterior a la infección (portadores asintomáticos de tuberculosis que adquieren el SIDA posteriormente) puede producirse que estos desarrollen una tuberculosis secundaria también. ^{[2][3][14][15]}

1.2) Todos los países a año 2013 poseen casos de tuberculosis aunque el mayor número de casos se haya en países en vías de desarrollo.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas con mayores tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad en el mundo. La OMS estima que en 2013 hubo **9x10⁶ de casos nuevos de tuberculosis a nivel mundial**, una **prevalencia de 11x10⁶ de enfermos** y que causó la **muerte de 11x10⁴ personas en el mundo**. La gran mayoría de los casos incidentes, prevalentes y muertes se produjeron en países en vías en desarrollo. La pobreza trae consigo situaciones de desnutrición y condiciones higiénico-sanitarias deficientes, lo que provoca que los países africanos y asiáticos sean responsables del mayor número de casos mundiales. ^{[4][6]}

Uno de los grandes peligros que presenta la tuberculosis es la coinfección con el VIH. Cuando estas dos enfermedades se asocian, la tuberculosis se convierte en una enfermedad letal y la mortalidad entre estos pacientes se multiplica varias veces. La OMS estima que en los últimos 15 años, la incidencia de la tuberculosis se ha doblado en los países con alta prevalencia de VIH. Teniendo **únicamente en consideración a los países subdesarrollados, la mortalidad causada por la coinfección de la tuberculosis junto con el VIH asciende al 12% del total de las muertes** causadas por la tuberculosis mundialmente. Si tenemos en cuenta a todos los países del mundo, **la mortalidad causada por la coinfección de estas dos enfermedades asciende al 37% del total de las muertes** causadas por la tuberculosis en el mundo. ^{[4][7]}

Otro gran problema actual de la tuberculosis es la dificultad del tratamiento ocasionado por la aparición de cepas resistentes a la quimioterapia actual. Dentro de estas cepas resistentes distinguimos a las cepas **MDR** (siglas para *Multi Drug Resistant* o cepas multirresistentes) y las cepas **XDR** (siglas para *Extensive Drug Resistant* o cepas extensivamente resistentes) las cuales son prácticamente imposibles de tratar por su gran tolerancia a la terapia antituberculosa

actual. El mayor número de casos de tuberculosis causada por cepas XDR se dan en países en vías en desarrollo. El principal motivo de esta distribución se debe a la poca concienciación que tiene la población de estos países respecto a la importancia de la pauta posológica y duración del tratamiento de la enfermedad. El tratamiento frente a la tuberculosis es prolongado en el tiempo y no está exento de efectos adversos. Esto hace que los infectados abandonen el tratamiento al poco tiempo y el bacilo tuberculoso pueda desarrollar resistencia a los fármacos al estar expuesto a bajas concentraciones de estos y durante poco tiempo. ^{[4][8]}

Si además respaldamos las cifras de incidencia, prevalencia y mortalidad con el coste que genera la enfermedad a nivel mundial ciertamente podemos afirmar que la importancia a nivel mundial de la tuberculosis es primordial. El coste total para diagnóstico, tratamiento y prevención en 122 países que responden al 95% de los casos diagnosticados de tuberculosis asciende a **6,3 billones de dólares en 2014**. Esto no incluye a los costes requeridos para la investigación de nuevas vacunas, tratamientos y métodos diagnósticos, los cuales ascienden a **2 billones de dólares**. ^[4]

En respuesta a todas estas cifras, la OMS declaró en 1993 a la tuberculosis como **emergencia sanitaria global**. Numerosas organizaciones están invirtiendo millones de dólares para tratar de erradicar la enfermedad mediante la creación de programas sanitarios. Entre ellas se encuentran la **fundación Bill y Melinda Gates**, **TBVI** (Tuberculosis Vaccine Initiative) y **Aeras** (organización dedicada a la búsqueda de vacunas frente a distintas enfermedades) o la propia **OMS** con su programa **STOPTB** iniciado en 2006, encaminado a erradicar la enfermedad.

1.3) Las características de *M. tuberculosis*, y en especial su pared celular hacen de él uno de los patógenos más resistentes y persistentes que existen.

Los integrantes del complejo tuberculosis se caracterizan por ser bacilos clasificados genéticamente dentro del grupo de los gram positivos, aerobios, inmóviles y no esporulados, sin cápsula y pertenecen al grupo de las micobacterias, género *Mycobacterium*. Las micobacterias se describen como bacilos rectos o ligeramente curvados y son ácido-alcohol resistentes, es decir que no son coloreables por la tinción de gram y es necesario recurrir a la tinción de Ziehl-Neelsen o a fluorocromos (auramina-rodamina) para visualizarlos en el microscopio. Esto es debido a la estructura de su pared celular, en la cual se encuentran los **ácidos micólicos**, moléculas situadas en la capa más externa de la pared celular de los bacilos que poseen un alto grado de hidrofobicidad.^[2]

Las bacterias del complejo tuberculosis son bacterias de **crecimiento muy lento**. Este tiempo de generación tan grande es un rasgo común entre todas las micobacterias más patógenas, dentro de las cuales encontramos a *Mycobacterium tuberculosis*. De hecho las micobacterias menos patógenas como *Mycobacterium abscessus*, bacteria únicamente patógena en inmunodeprimidos, tienen tiempos de generación mucho más rápidos. Por ello, se ha establecido una relación inversamente proporcional entre la virulencia y el tiempo de generación dentro del género de las micobacterias. Este tiempo de generación tan lento además es uno de los principales obstáculos en la obtención de vacunas y nuevos tratamientos frente al patógeno ya que se tarda un tiempo muy elevado en obtener cultivos del patógeno y por tanto en verificar la eficacia de nuevos tratamientos y obtener nuevas vacunas. ^{[3][9][10]}

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno que **únicamente tiene reservorio humano**. Dentro del humano, el lugar anatómico donde va a encontrarse mayormente es en el parénquima pulmonar. Una vez en el parénquima pulmonar, *M. tuberculosis* va a provocar su propia fagocitosis al interior de los macrófagos alveolares formando un entorno favorable para su supervivencia mediante la manipulación de los mecanismos bactericidas de estos. Esto convierte a *M. tuberculosis* en un **patógeno intracelular facultativo**. ^{[3][9]}

La tuberculosis es una **enfermedad contagiosa y que se transmite de persona a persona**. **Principalmente se transmite por el aire**, en la forma de pequeñas gotículas que quedan suspendidas en el aire tras la tos, el estornudo o incluso el habla de una **persona infectada que posea la enfermedad activa**, es decir, **el enfermo** propiamente dicho. Estas gotículas, que pueden contener de uno a tres bacilos, quedan suspendidas en el aire, capaces de moverse libremente y si llegan a alveolos los pulmonares a través del portal de entrada, **la mucosa respiratoria**, pueden establecer la infección. ^{[2][3][15]}

De esto podemos deducir que la contagiosidad de la enfermedad será máxima en espacios cerrados y está asociada a condiciones de hacinamiento. Esta estará relacionada directamente también con la frecuencia de tos del enfermo, con la extensión de la infección en el pulmón de este y con la cantidad de bacilos eliminados. Esta posibilidad también será dependiente del tiempo y de la intimidad del contacto. ^{[2][3]}

La composición de la pared celular es el elemento característico de *M. tuberculosis*. A pesar de estar clasificado taxonómicamente dentro del grupo de las bacterias gram positivas la composición de su pared celular es muy distinta a la del resto de bacterias de este grupo. La estructura base está constituida por una fina capa de **peptidoglicano**. A este se une el

arabinogalactano, el cual forma una capa más externa. Por último, al arabinogalactano se unen los **ácidos micólicos**, componente característico propio de las bacterias del género *Mycobacterium*, formando estos la capa más externa de la pared celular. Los ácidos micólicos representan un escudo para la bacteria frente a agentes nocivos para esta, como distintos antibióticos, haciendo a la bacteria intrínsecamente resistente a estos. ^{[9][14]}

A su vez, a las dos capas de arabinogalactano y peptidoglicano se unen distintos lipoglicanos como el **lipoarabinomanano (LAM)**, el **lipoarabinomanano unido a manano (ManLAM)**, **lipomanano (LM)** y el **fosfatidil-mio-inositol manósido (PIM)**. Estos PAMPs son muy importantes para el patógeno ya que la unión inicial con distintos receptores en la superficie de los macrófagos alveolares desata una respuesta inmune favorable para la supervivencia de *M. tuberculosis*. ^{[9][14]}

2.1) La respuesta inmune innata juega un papel crucial en el establecimiento o no de la infección.

Durante el reconocimiento inicial del patógeno por parte de estas células se determina si se establece la infección o por el contrario esta nunca llega a producirse. Se cree que en algunos individuos, la respuesta inmune innata es capaz de contener reconocer al patógeno y eliminarlo, resolviéndose de esta manera el proceso. Por el contrario, si la respuesta inmune innata es incapaz de eliminar al patógeno la infección se establece. ^[11-13]

El reconocimiento inicial del patógeno es llevado a cabo por los macrófagos alveolares. Estos, mediante distintos receptores en su membrana como el **receptor de manosa**, el **receptor del complemento** o los **receptores tipo Toll** reconocen el patógeno a través de distintos PAMPs. El reconocimiento trae consigo dos consecuencias:

- 1) En primer lugar tras el reconocimiento el patógeno es interiorizado al interior de los macrófagos alveolares.
- 2) La activación de los macrófagos que a su vez provoca la secreción de **citoquinas proinflamatorias** lo que causa la atracción de distintas células del sistema inmune, siendo las más notables los **neutrófilos** y las **células NK**. Las primeras producen radicales oxidantes y nitrantes, lo que desemboca en la lisis del patógeno. Las segundas lisan directamente a las bacterias que han sido fagocitadas por los macrófagos alveolares y los propios macrófagos alveolares que han fagocitado al patógeno. Esto lo consiguen a través de la inducción de la apoptosis de estas células. ^[11-15]

Tras la fagocitosis, el patógeno queda internalizado en una vesícula denominada **fagosoma**. El fagosoma irá adquiriendo distintos marcadores a lo largo del tiempo que

determinarán la evolución de este y su destino final, que será la fusión con los **lisosomas** y la lisis final del patógeno. Tras la fagocitosis, se formará el **fagosoma temprano**, el cual tiene un escaso número de **ATPasas** y **GTPasas** capaces de bombear protones, por lo que el pH de este será prácticamente neutro. El marcador específico de este fagosoma será la GTPasa **Rab5**. [14]

El siguiente estadio en la maduración del fagosoma será la formación del **fagosoma tardío**. Este tendrá un pH más ácido que el fagosoma tardío al haber adquirido un mayor número de ATPasas y GTPasas. Este también habrá adquirido otros marcadores, siendo el más destacado **Rab7**. Para que se produzca la maduración del fagosoma es necesaria la activación de los macrófagos. La activación es producida por la citoquina **IFN- γ** , la cual juega un papel principal en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* y determina el desarrollo de esta durante la infección. Esta citoquina es producida por los propios macrófagos infectados y actúa como una regulación homeostásica positiva, potenciando los mecanismos microbicidas del macrófago. [14][15]

La adquisición de los distintos marcadores en el fagosoma y la maduración de este están influenciados en gran medida por la presencia de **fosfatidilinositol-fosfato (PI3K)**. La desfosforilación de este compuesto en la membrana del fagosoma provoca el aumento de calcio intracelular que provoca a su vez el movimiento de las fibras de actina que fusionan marcadores al fagosoma y promueven su maduración. [13][14][15]

La última fase en la maduración del fagosoma es la formación del fagolisosoma. Este es el resultado de la fusión del fagosoma con los lisosomas y su principal característica es su pH ácido. Este pH ácido, resultado del alto número de ATPasas y GTPasas presentes en la membrana vesicular, además de ser nocivo para el patógeno activa a las enzimas hidrolíticas como la **catepsina D**, que son capaces de lisarlo. Además en el fagosoma se producen radicales oxidantes y nitrantes que potencian el ambiente microbicida presente en este. Esto desemboca al final en la lisis de la mayoría de los bacilos fagocitados pero en algunos casos, este mediante distintos mecanismos es capaz de evitar este desenlace. [14][15]

2.2) Mediante distintos mecanismos, *M. tuberculosis* es capaz de evadir la respuesta inmune innata y hacer de los macrófagos alveolares un nicho perfecto para su supervivencia.

Una vez ha sido fagocitado, *M. tuberculosis* por distintos mecanismos es capaz de sobrevivir y convertir el fagosoma en un nicho perfecto para su supervivencia. El fagosoma que se forma tras la fagocitosis de *M. tuberculosis* tiene un pH más alto de lo que debería, por lo

que las enzimas hidrolíticas son incapaces activarse. Esto es debido a que durante el reconocimiento inicial el **ManLam** interacciona con el **receptor de manosa**, lo que provoca una disrupción en la incorporación de **PI3K** a la membrana fagosómica. El PI3K como se ha mencionado antes es esencial para la incorporación de ATPasas y GTPasas que acidifican el lisosoma. Además *M.tuberculosis* libera una **fosfatasa** que hidroliza el PI3K que se une a la membrana fagosómica. Por otro lado, la unión de ManLam al receptor TLR además de provocar el efecto previamente mencionado, causa que el macrófago secrete **IL-10**, citoquina antiinflamatoria que provoca una respuesta inmune amortiguada, causando de esta manera el silenciamiento de esta.^{[9][12][13][14][15][18]}

Además cuando el patógeno ha agotado los recursos del macrófago este secreta las proteínas **CFP-10 y Esat-6**, las cuales le permiten escapar del fagosoma hacia el citosol del macrófago e incluso inducir la apoptosis de este mediante una cascada de señalización celular en la que intervienen las caspasas celulares para infectar nuevos macrófagos.^{[9][12][13][14][15][20]}

2.3) La respuesta inmune adaptativa provoca que *M. tuberculosis* pase a un estado de latencia, siendo capaz de permanecer así años o incluso toda la vida del hospedador.

Tras un periodo de tiempo relativamente largo, debido principalmente a distintos mecanismos propios del patógeno, se produce la presentación antigénica y por tanto el paso de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa.

En el caso de la tuberculosis, la presentación antigénica se produce mediante **MHC I** y **MHC II**. Mediante la primera vía se activarán linfocitos CD8+ y mediante la segunda se activarán linfocitos CD4+. Como se ha comentado anteriormente, *M. tuberculosis* es capaz de escapar al citosol de la célula infectada, lo que fomenta la presentación vía MHC I debido al procesamiento de **péptidos citosólicos** mediante la ruta **ubiquitina-proteosoma**. Además *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo cuya principal ubicación es el fagosoma, por lo que la presentación antigénica mediante MHC II es otro desenlace. Esta, a diferencia de la presentación vía MHC I, es realizada mediante la carga de **péptidos exógenos** a la cadena invariable de la molécula de MHC II mediante el procesamiento en los **fagolisosomas** de estas proteínas.^{[3][19]}

Para retrasar el proceso de presentación antigénica, el patógeno se vale principalmente de regular la producción y expresión de moléculas de MHC II. Esto lo consigue principalmente bloqueando la transcripción de esta proteína mediante la inhibición del **transactivador de MHC II** o **CIITA**. Esta proteína se transcribe por la activación del macrófago por IFN- γ y

actúa posteriormente como un factor de transcripción que promueve la producción de moléculas de MHC II, por tanto la inhibición de su síntesis supondrá un menor número de moléculas de MHC II en la superficie celular de los macrófagos.^{[14][16]}

Una vez se produce el reconocimiento por parte de linfocitos CD4+ y CD8+ estos se diferenciarán a linfocitos **T helper (Th)** y a **linfocitos T citotóxicos (Tc)** respectivamente. Los linfocitos Th se diferencian en dos poblaciones los **Th₁** y los **Th₂**. La primera población estimula una respuesta inmune adaptativa de tipo celular, protectora frente a la enfermedad mientras que la segunda estimula una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral, la cual es no protectora frente a la infección. Lo que deriva que los linfocitos se diferencien a una población u otra es el entorno de citoquinas presente durante la presentación antigénica. Si hay predominancia de **IL-12** e **IFN- γ** , la respuesta derivará a una celular, y por tanto protectora.^{[3][19]}. Si la respuesta inmune adaptativa deriva en una de tipo celular, se formarán linfocitos Th₁ que secretarán activamente citoquinas que activarán a otras células del sistema inmune. Estas citoquinas son, principalmente **IFN- γ** , **IL-2** y **TNF- α** .^{[3][14][15][18][19]}

Estas citoquinas, y principalmente IFN- γ juegan un papel central en la respuesta adaptativa. En primer lugar, IFN- γ activa y estimula a células CD8+ para que estas puedan diferenciarse a linfocitos Tc durante la presentación antigénica. Estos linfocitos tienen se encargan de lisar bacterias que se encuentran en el interior de macrófagos infectados de manera **perforina/granulisina** dependiente. Además las los linfocitos Tc son capaces de producir también más IFN- γ , el cual activa a macrófagos no infectados para que estos produzcan ROS (especies reactivas de oxígeno) y RON (especies reactivas de nitrógeno) que eliminan al patógeno. Esto se consigue mediante la inducción de la enzima NOS (óxido nítrico sintasa). Estos radicales son altamente oxidantes y son dañinos para los tejidos, sin embargo, *M. tuberculosis* es capaz de evitar el estrés oxidativo de estos radicales. Esto lo consigue mediante la presencia en su pared celular de los **DIMs** (dimicocerosatos), ácidos grasos que impiden la entrada de radicales oxidantes al interior del bacilo, lo que asegura la integridad de sus componentes celulares.^{[14][15][30]}

La suma de la llegada masiva de células inmunes al foco de infección en conjunto con el daño producido por el estrés oxidativo resulta en la formación del **granuloma**. El granuloma, el cual es un aglomerado celular resultado de la **imposibilidad del sistema inmune de eliminar al patógeno**, tiene una estructura altamente estratificada y definida. En el centro se sitúan los macrófagos infectados, mientras que en las capas más externas se sitúan numerosas células del sistema inmune reclutadas al foco de infección y células fibróticas, resultado del

tejido cicatrizal producido por los radicales oxidantes. En este estado, el paciente habría desarrollado una tuberculosis latente y sería un portador asintomático. ^{[9][13][14][18]}

Una vez más, *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir dentro del entorno hostil del granuloma. Es capaz mediante la activación de genes como el **regulón de supervivencia de inactividad (Dos)**, el cual controla la expresión de más de 50 genes relacionados con la respuesta a la hipoxia. Por otro lado, el entorno ácido de los fagosomas de los macrófagos activados es detectado mediante el sistema sensor **PhoPR**. Este sensor es capaz de detectar el pH ácido y provoca que la fuente principal de energía del patógeno sean los lípidos, la desactivación del metabolismo central y la activación del metabolismo anaeróbico. Estos cambios provocan la detención en el crecimiento del patógeno y su paso a un estado de **latencia**. ^{[9][11]}

En algunos casos, algunos bacilos no detendrán su crecimiento y continuarán multiplicándose. Estos son los denominados bacilos “**scouters**”, los cuales son fácilmente eliminados por el sistema inmune. Se formará un equilibrio entre la eliminación de “scouters” y la supervivencia de bacilos que quedan en estado latente. Este equilibrio será dependiente del estado de la respuesta inmune celular del hospedador. En caso de la respuesta inmune celular estuviera inicialmente comprometida o hubiera un defecto de esta posterior a la infección la textura del granuloma comenzaría a ser menos sólida y comenzaría a adquirir una parecida a la del queso, dándose así el proceso de **caseificación** del granuloma. La evolución natural de este proceso sería la formación de una **caverna** (oquedad) mediante la cual, el patógeno es capaz de escapar del árbol bronquial al exterior mediante la tos, el estornudo, el esputo o incluso el habla del paciente, contagiando a nuevos individuos. Este es el perfil correspondiente al **enfermo crónico** (5-10% de infectados latentes que desarrollan la enfermedad) y al paciente que presenta **recidivas** por inmunocompromiso que ha desarrollado tuberculosis latente previamente. ^{[9][11]}

2.4) La formación de linfocitos de memoria centrales podría ser necesaria para una memoria inmune a largo plazo

Durante la formación de la respuesta inmune adaptativa se formarán linfocitos T de memoria que reaccionarán diferenciándose a linfocitos Th₁ y liberando IFN- γ . Dentro de los linfocitos de memoria distinguimos a los **linfocitos de memoria efectores**, relacionados con la memoria inmunológica a corto plazo y los **linfocitos de memoria centrales**, relacionados con la memoria a largo plazo. ^{[9][21]}

La gran diferencia entre estas dos poblaciones es que los linfocitos de memoria centrales suponen un pool rápido de células capaces de estimular a macrófagos y linfocitos Tc frente a patógenos altamente invasivos, mientras que los linfocitos de memoria centrales pueden diferenciarse a linfocitos T de memoria efectores en caso de que los primeros no sean capaces de contener la infección. El objetivo de la creación de nuevas vacunas será por tanto obtener un perfil predominante de linfocitos T de memoria central. Estos están relacionados con una memoria inmunológica a largo plazo y son indicativos de una infección controlada, además de que en caso exposición de nuevo a antígenos de *M. tuberculosis* estos pueden diferenciarse a linfocitos T de memoria efectores y ser capaces de potenciar y activar a las otras células del sistema inmune. ^{[9][21]}

3.1) Las medidas actuales de diagnóstico no permiten un control adecuado de la enfermedad.

Hay distintos métodos de diagnosticar la tuberculosis. Podemos optar por **métodos indirectos** que se basan en la medición de la respuesta inmune o en **métodos directos**, que detectan la presencia del patógeno en el organismo o de los efectos provocados por la enfermedad.

Entre los métodos indirectos distinguimos en primer lugar la **prueba de Mantoux** o de la **tuberculina**. Esta prueba se basa en la inoculación de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* por vía subcutánea al paciente, los cuales desencadenan una reacción de hipersensibilidad de tipo IV o retardada. El tamaño de la inflamación local, determina si la prueba es positiva o negativa. El gran inconveniente de esta técnica diagnóstica es la gran cantidad de falsos positivos que se pueden dar debido a una posible vacunación previa con la vacuna BCG (y por tanto expuesta previamente a antígenos de *Mycobacterium*). ^{[2][9][15][22]} Otro método de diagnóstico indirecto es el **IGRA** (Interferon-gamma release assays). Esta técnica consiste en medir la concentración de interferón gamma producido por linfocitos T al ser expuestos a determinados antígenos propios de *M. Tuberculosis* (**Esat-6** y **CFP-10**). El diagnóstico por esta prueba es mucho más fiable ya que al usarse antígenos específicos de *M. tuberculosis*, se eliminan todos los posibles falsos positivos que puede diagnosticar el Mantoux. La principal desventaja de esta técnica es el alto coste económico de la prueba y el hecho de que se tenga que extraer sangre del paciente. ^{[2][9][15][22]}

Como métodos de diagnóstico directo en primer lugar podemos realizar una **baciloscopía** (diagnóstico microbiológico), en la que tomaríamos una muestra de esputo del paciente y teñiríamos esta usando la tinción de Ziehl-Neelsen, tiñiendo a los bacilos de rojo, o la tinción

por auramina-rodamina en la que se usan fluorocromos. Tras confirmar la presencia del patógeno, se procedería a su cultivo y a la determinación de sus resistencias a través de un antibiograma. El otro método de diagnóstico directo sería un diagnóstico paraclínico en el que usaríamos **rayos-X** para observar las cavernas producidas por la enfermedad. ^{[2][3]}

La gran problemática del diagnóstico de la enfermedad es que el test más económicamente viable, el Mantoux tiene un alto porcentaje de falsos positivos, los que han sido vacunados por la BCG, es decir, que **no distingue entre enfermo latente y vacunado**. Además también tiene un porcentaje de falsos negativos que son aquellos que no han desarrollado la hipersensibilidad frente a la enfermedad pero ya están infectados. Por otro lado el IGRA tiene un alto coste económico no admisible para los sistemas sanitarios de los países del mundo. Los métodos de diagnóstico directo solo son útiles una vez la enfermedad se manifiesta y no serían adecuados como tests de screening. Todos estos inconvenientes hacen que la tuberculosis sea una enfermedad en la que es difícil establecer medidas profilácticas.

3.2) El desarrollo de resistencias hace que los tratamientos frente a la enfermedad sean cada vez menos efectivos.

Una vez la enfermedad ha sido instaurada es esencial el tratamiento tanto como para evitar daños mayores en el paciente como para evitar la aparición de nuevos casos de enfermedad. Para el tratamiento de la tuberculosis se usan combinaciones de dos o más fármacos para **evitar la aparición y selección de mutantes resistentes**. ^{[2][5]}

En un paciente tuberculoso se admite la existencia de tres grupos de bacilos. El primer grupo está constituido por **bacilos de multiplicación rápida**, los cuales son extracelulares y metabólicamente activos y suelen estar presentes en las cavernas. El segundo grupo está constituido por **bacilos intracelulares de multiplicación lenta** y que además son relativamente inactivos. El último grupo está constituido por **bacilos extracelulares**, propios de las lesiones granulomatosas pero confinados en estas. Para la erradicación de cada uno de estos tipos de bacilos se usan distintos fármacos. ^[2]

Dentro de estos fármacos encontramos en primer lugar la **rifampicina**. La rifampicina es bactericida frente a los tres tipos de bacilos y su mecanismo de acción es la inhibición de la RNA polimerasa bacteriana. La **isoniazida** es otro de los fármacos que son básicos para el tratamiento de la tuberculosis. Esta es bactericida frente a bacilos extracelulares metabólicamente activos y bacilos intracelulares y su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos. Otro fármaco usado también para el tratamiento de la

tuberculosis es la **pirazinamida**, la cual es bactericida frente a bacterias intracelulares. Por otro lado, el **etambutol**, es únicamente bacteriostático e inhibe el transporte de ácidos micólicos a la pared celular. Por último, la **estreptomicina** es activa frente a bacilos extracelulares metabólicamente activos, pero es ineficaz frente a bacterias intracelulares. ^{[2][5]}

En pacientes que no han recibido tratamiento previo con fármacos antituberculosos o aquellos que no han recibido un tratamiento superior a un mes de duración, se opta con un tratamiento combinado de isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante los dos primeros meses e isoniazida y rifampicina durante los cuatro meses siguientes. En el caso de que el paciente padezca meningitis tuberculosa se reemplazará el etambutol por estreptomicina, que aunque tiene más efectos secundarios, es efectiva frente a micobacterias extracelulares metabólicamente activas. La administración de los fármacos será diaria preferiblemente pero se admite la posibilidad de una administración cada tres días siempre que el paciente esté bajo supervisión continua. En pacientes previamente tratados (y por tanto con altas posibilidades de haber desarrollado tuberculosis multirresistente) o que han sido diagnosticados con tuberculosis multirresistente, será el antibiograma quien dirija la combinación de fármacos a usar y la pauta posológica a elegir. ^[5]

La terapia antituberculosa tiene dos grandes inconvenientes:

1. El tratamiento tiene una larga duración.
2. El tratamiento no está exento de toxicidad, manifestándose principalmente una clara hepatotoxicidad debido a la administración de isoniazida, rifampicina y pirazinamida. Además la isoniazida es capaz de provocar una neuropatía periférica. ^{[2][5]}

Estos dos inconvenientes causan un abandono del tratamiento por parte del paciente y esto a su vez provoca, por un lado, el fracaso terapéutico produciéndose recaídas en la enfermedad, y por otro la aparición de cepas resistentes a la terapéutica actual, lo que causa mayor dificultad de tratamiento en pacientes infectados con estas cepas.

Los tratamientos frente a la enfermedad se agotan ya que el patógeno es capaz de desarrollar resistencias. Ante esto la única solución parece el desarrollo de una medida profiláctica efectiva como una vacuna para poder erradicar la enfermedad.

4.1) Por sus características, la vacuna actual es incapaz de detener la progresión de la enfermedad en el mundo.

A principios del siglo XX se desarrolló lo que se creyó que era el arma definitiva frente a la tuberculosis. Tras más de 13 años de investigación, se consiguió obtener una vacuna

obtenida a partir de una **cepa atenuada de *Mycobacterium bovis***. La cepa fue bautizada como **BCG** (bacilo de Calmette-Guerin). La inoculación de esta cepa en distintos animales no hacía que enfermasen, por lo que tras realizar esta observación se procedió a probar la vacuna en humanos. Los resultados fueron altamente prometedores al reducir la mortalidad infantil por tuberculosis de un 25% a un 1,8% en un ensayo realizado entre 1921 y 1926. ^[23-25]

Hoy en día esta vacuna sigue siendo la última vacuna comercializada existente frente a la tuberculosis y es una de las más utilizadas en el mundo. En el presente, los países que siguen usándola para vacunar son los países en vías de desarrollo, ya que son los países con mayores tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad de la enfermedad. La vacuna es **eficaz en la prevención de la tuberculosis diseminada y la meningitis tuberculosa** y además **confiere a los niños una alta protección frente a la enfermedad**. Los países subdesarrollados, en los cuales las tasas de tuberculosis infantil son muy altas, la vacuna es por tanto altamente útil. Por último **la vacuna es de las más seguras del mundo**, por lo que esta se puede usar con libertad en distintos grupos poblacionales, con la salvedad de inmunodeprimidos, en los cuales la vacuna podría causar la enfermedad. Los países del primer mundo, por el contrario no tienen tasas de la enfermedad tan elevadas por lo que no la incluyen en sus programas de vacunación. Para estos países que tienen tasas de incidencia bajas es más importante realizar un diagnóstico exacto evitando los falsos positivos que puedan ocurrir debido a la vacunación en el test de Mantoux. ^[22-23]

A pesar de sus múltiples bondades, la vacuna tiene dos grandes limitaciones que la hacen ineficaz como herramienta de control de la enfermedad. En primer lugar, **la vacuna confiere una protección muy variable, y por tanto ineficiente ante la tuberculosis pulmonar en la población adulta**. Al ser esta la principal forma de manifestación de la enfermedad y la **forma contagiosa** esto la hace ineficiente como herramienta profiláctica. El otro gran defecto de esta vacuna es la **poca capacidad de esta para inducir una respuesta duradera en el tiempo**. La vacuna es capaz de estimular la formación de linfocitos de memoria efectoras pero no centrales, por lo que la tuberculosis pulmonar puede manifestarse y adquirirse incluso tras haber sido vacunado con la BCG. ^{[23][25]}

4.2) Para el desarrollo de nuevas vacunas se han seguido distintas estrategias alternativas, y para la comercialización de estas son necesarios varios años de ensayos clínicos para demostrar su seguridad y eficacia.

Como se ha mostrado la vacuna actual frente a la tuberculosis tiene limitaciones que la hacen ineficiente en el control de la enfermedad. Esto crea la necesidad de desarrollar nuevas vacunas que mejoren a la actual y sean capaces de sustituirla para lograr erradicar la enfermedad.

La tuberculosis es una enfermedad que cumple los requisitos para ser erradicada mediante la vacunación. *M. tuberculosis* es un patógeno que presenta **escasa variación antigénica**, lo que sumado a que **su único reservorio es el ser humano** hace que la enfermedad pueda ser erradicada por medio de la vacunación. Para ello la tasa de vacunación debe ser suficiente como para obtener la cobertura crítica y de este modo obtener la inmunidad de grupo.

Para obtener nuevas vacunas frente a la tuberculosis distintos equipos de investigación han optado por distintos métodos:

- En primer lugar, se han diseñado **vacunas de subunidades**, las cuales, consisten en la administración de un virus que expresa un antígeno de *M. tuberculosis*, o antígenos de este acompañados de un adyuvante para reforzar la inmunogenicidad.
- Por otro lado otros equipos de investigación han optado por crear **vacunas vivas recombinantes** a partir de la vacuna BCG. Estas vacunas se basan en la inserción de genes al bacilo de la BCG que consiguen mejorar la eficacia protectora frente a la enfermedad.
- Por último se ha optado por crear **vacunas vivas atenuadas**. Estas, a diferencia de la BCG, que es un **mutante espontáneo** creado por presión selectiva, son **mutantes dirigidos**, a los cuales se les han suprimido genes esenciales para su virulencia. ^{[23][24]}

Para poder comercializar una nueva vacuna esta ha de someterse a distintos ensayos que verifiquen su **seguridad** y su **eficacia**. Estos dos parámetros son de gran importancia en el desarrollo de vacunas ya que en primer lugar, la seguridad de la vacuna asegura que esta no causará efectos adversos graves que puedan poner en riesgo la vida de los vacunados, y en segundo lugar que la vacuna sea capaz de evitar la aparición de la enfermedad en los mismos. Para ello, todas las vacunas deberán en primer lugar probarse en animales durante la **fase preclínica** para posteriormente probarse en humanos en los **ensayos clínicos**. ^{[23][24]}

Durante la **fase I** de los ensayos clínicos se examinará la seguridad de la vacuna (toxicidad) y su inmunogenicidad (la capacidad de la vacuna para estimular el sistema inmune). En la **fase II** de los ensayos clínicos se examina la respuesta del individuo en función de la dosis, en primer lugar en centenares de pacientes (fase IIa) y posteriormente en millares (fase IIb). La **fase III** estudia la eficacia de la vacuna comparándola con otra (la BCG) en un gran

número de voluntarios. Tras haber superado las distintas fases se comercializará y se procederán a realizar los ensayos de **fase IV** de farmacovigilancia en condiciones de uso real. [23]

El desarrollo de nuevas vacunas trae consigo un gran problema que es el largo tiempo que transcurre entre su desarrollo y su puesta en el mercado debido a la necesidad de verificar la seguridad y eficacia de la vacuna en humanos a través de los ensayos clínicos. Para acortar este tiempo se están buscando **biomarcadores** en la sangre de los vacunados que sean capaces de correlacionarse con una inmunidad protectora frente a la enfermedad. Estos biomarcadores deben **específicos** de una respuesta protectora. Además deben ser **fáciles de detectar** en la sangre del paciente para poder realizar el seguimiento a bajo coste económico.

4.3) Hay un gran número de vacunas candidatas con potencial de sustituir a la actual.

Actualmente, se están desarrollando nuevas vacunas en distintas partes del mundo para sustituir a la BCG que se encuentran en distintas fases de los ensayos clínicos. Estas han seguido distintas estrategias de síntesis y son las siguientes: [28]

- **MVA85A:** Es una vacuna de subunidades que se compone del antígeno 85A de *M. tuberculosis* expresado a través de un vector vírico. Se descartó ya que no mejoraba a la BCG.
- **M72+AS01:** Es una vacuna de subunidades que se compone del antígeno M72 de *M. tuberculosis* junto con un adyuvante como potenciador. Actualmente se encuentra en fase IIb.
- **Crucell Ad35:** Es una vacuna de subunidades que se compone de los antígenos 85A 85B y TB10.4 expresados a través de un vector vírico. Se encuentra en fase IIa
- **Hybrid 1+ IC31, Hybrid 4+IC31, Hybrid 56+IC31:** Son vacunas de subunidades que contienen distintos antígenos de *M. tuberculosis* con un adyuvante. Se encuentran en fase IIa.
- **Ad5Ag85A:** Es una vacuna de subunidades que contiene el antígeno 85A expresado a través de un vector viral distinto a la MVA85A. Se encuentra en fase I.
- **ChAdOx1 85A+MVA85A:** Es una combinación entre ChAdOx1 85A, que es una vacuna de subunidades que expresa el antígeno 85A de *M. tuberculosis* a través de un vector vírico y la vacuna MVA85A. Se encuentra en fase I.
- **Crucell Ad35+MVA85A:** Es una combinación entre estas dos vacunas previamente descritas. Se encuentra en fase I.
- **ID93+GLA-SE:** Es una vacuna de subunidades en la cual se utiliza el antígeno ID93 de *M. tuberculosis* junto a un adyuvante. Se encuentra en fase I.
- **VPM1002:** Es una vacuna viva recombinante de la BCG a la que se le insertó un gen de *Listeria* para aumentar la presentación antigénica. Se encuentra en fase IIb.

4.4) La vacuna MTBVAC, por su diseño alternativo y los resultados obtenidos en la fase preclínica es una de las vacunas con mayor potencial para sustituir a la BCG.

Una de las vacunas en las que hay puestas grandes expectativas como sustituta de la BCG es la vacuna MTBVAC. Esta es una **vacuna viva atenuada** y es una vacuna altamente innovadora al ser la primera vacuna obtenida a partir de una cepa virulenta de *M. tuberculosis*, la cepa Mt103. A esta cepa se le han suprimido genes esenciales para la virulencia generándose de esta manera un **mutante dirigido**. [23][30]

En primer lugar a esta cepa se le suprimió el gen **PhoP**. El gen *PhoP* se activa por medio del sistema sensor proteico dual **PhoPR** en respuesta a distintos estímulos y actúa regulando un gran número de genes de *Mycobacterium tuberculosis*, involucrados en múltiples funciones como síntesis de lípidos de la pared del patógeno, la respuesta a la hipoxia y al medio ácido. El gen *PhoP* además es responsable de la síntesis de la proteína **Esat-6**, uno de los principales factores de virulencia del patógeno. Para que la vacuna entrase a la fase de ensayos clínicos era necesario crear otra mutación independiente e irreversible y que de esta manera satisficiera los criterios de Ginebra para la creación de vacunas vivas atenuadas seguras. Para ello, se decidió suprimir otro gen esencial para la virulencia, el gen **fad26**. El gen *fad26* es responsable de la síntesis de uno lípidos esenciales para la virulencia del patógeno, los **dimicocerosatos (DIMs)**, los cuales como se ha descrito anteriormente juegan un importante papel en la permeabilidad de la pared celular a radicales oxidantes y la supervivencia intracelular del patógeno. [29][30] [30] [31] [32]

En la fase preclínica, la vacuna probó ser **segura** y además estaba más atenuada que la BCG al producir **menos reacciones adversas** con respecto a la BCG. Además, esta mostró una mejora significativa con respecto a la BCG en **la reducción de la carga bacilar pulmonar**. Por último, en los ensayos de inmunogenicidad han mostrado que la vacuna es capaz de inducir una mayor diferenciación de las células CD4+ a **linfocitos T de memoria centrales**, lo cual, se correlaciona positivamente a una mayor duración de la eficacia protectora. [23][30]

En la actualidad, ha sido aprobada para ingresar en ensayos clínicos en humanos y se encuentra en la fase I. El ensayo no ha finalizado pero en el tiempo transcurrido no se ha observado ningún caso de enfermedad o de reacción adversa, por lo que hay grandes expectativas puestas en esta vacuna. [23][30]

4.5) Hay otras vacunas que se encuentran en fases avanzadas de los ensayos clínicos y que también son candidatos con alto potencial para mejorar la eficacia de la vacuna actual.

Siendo la vacuna MTBVAC una de las vacunas en desarrollo más prometedoras, hay otras que se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos. La vacuna **M72 + AS01** es una vacuna de subunidades compuesta del antígeno M72 de *M. tuberculosis* acompañada de un adyuvante para mejorar la inmunogenicidad. La vacuna se encuentra en fase IIb de los ensayos clínicos y ha obtenido resultados muy robustos en cuanto a su seguridad y eficacia en adultos. La vacuna **VPM1002**, es una vacuna viva recombinante, se ha basado en la inserción de un gen de *L. monocytogenes*, el cual codifica la listeriolisina al bacilo de la BCG, lo que provoca una mayor presentación antigénica a linfocitos CD8+. Esta vacuna también ha mostrado resultados altamente prometedores mostrando un alto nivel de seguridad y una presentación antigénica superior a la BCG. ^{[24][25][26]}

Conclusiones

1. *M. tuberculosis* presenta una resistencia y una estructura que hacen que la tuberculosis sea una enfermedad muy difícil de manejar y que a día de hoy sigue siendo un problema de salud mundial de importancia primordial.
2. *M. tuberculosis* es capaz de evadir y resistir la respuesta inmune a distintos niveles y manipularla para hacer de un entorno hostil para cualquier patógeno un lugar perfecto para su supervivencia.
3. Las actuales medidas de diagnóstico y tratamiento son insuficientes para controlar la enfermedad debido a sus características y es necesario dirigir los esfuerzos en otras medidas.
4. El desarrollo de vacunas parece ser el único método para erradicar la enfermedad. Hay múltiples candidatos a ser la vacuna que lo consiga pero es necesaria más investigación e inversión económica para encontrar la solución a este problema de salud mundial.

Bibliografía

1. Daniel TM. *The history of tuberculosis*. Respiratory medicine (2006) 100, 1862-1870.
2. Rotger Anglada R. *Microbiología sanitaria y clínica*. 1ª edición. Editorial síntesis. 1997.
3. Murray PR. Rosenthal KS. Pfaüer MA. *Microbiología médica* 5ª edición. GEA Consultoría editorial. 2005.
4. World Health organization. *Global tuberculosis report 2014*. Geneva. 2014.
5. World Health organization. *Treatment of tuberculosis guidelines fourth edition*. Geneva. 2014.
6. World Health organization. *Estimated TB incidence rates, 2013*. Geneva. 2014. (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TBincidence_2013.png)
7. World Health organization. *Percentage of notified TB patients with known HIV status by country, 2013*. Geneva. 2014. (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_Patients_HIV_2013.png)
8. World Health organization. *Number of patients with laboratory confirmed XDR-TB started on treatment in 2013*. Geneva. 2014. (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_cases_xdr_2013.png)

9. Delogu G., Sali M., Fadda G., *The biology of Mycobacterium tuberculosis infection*. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013, 5(1)
10. García P., García-Agudo L. *Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido*. *Enferm infecc microbiol clin*. 2012; 30(4): 192-200.
11. de Martino et al. *Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein?*. *BMC Infectious diseases* 2014, 14 (Suppl 1):S1
12. Guirado E., Schlesinger L.S., Kaplan G. *Macrophages in tuberculosis: friend or foe*. *Semin. Immunopathol*. 2013 September: 35(5): 563-583.
13. BoseDasgupta S., Pieters J. *Striking the right balance determines TB or not TB*. *Frontiers in immunology*. 2014. 455(5).
14. Welin A., *Survival strategies of Mycobacterium tuberculosis inside the human macrophage*. LiU-Tryck. Linköping University. 2011.
15. Ahmad S. *Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis Infection*. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011.
16. Harding CV., Boom WH. *Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 April: 8(4): 296-307.
17. Russell D.G. *The evolutionary pressures that have molded Mycobacterium tuberculosis into an infectious adjuvant*. *Curr Opin Microbiol*. 2013 February: 16(1): 78-84.
18. Yuk JM, Jo EK. *Host immune responses to mycobacterial antigens and their implication for the development of a vaccine to control tuberculosis*. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014;3;155-167
19. Chen K., Kolls JK. *T-Cell-mediated host immune defenses in the lung*. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 605-633.
20. Tan T., Lee WL, Alexander DC., Grinstein S., Liu J. *The ESAT-6/CFP-10 Secretion system of Mycobacterium marinum modulates phagosome maturation*. *Cellular Microbiology*. 2006 8(9), 1417-1429.
21. Sallusto F., et al. *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potential and effector functions*. *Nature* 401 (1999), 708-712.
22. Zwerling A, et al. *The BCG world atlas: A database of global BCG vaccination policies and practices*. *PLoS Med*. 2011. 8(3).
23. Asensio JG., Aguiló N., Martín C. *Nuevas vacunas contra la tuberculosis*. *Investigación y ciencia*. Octubre 2014: 38-46.
24. Leunda A. et al. *Novel GMO-Based vaccines against tuberculosis: State of the art and biosafety considerations*. *Vaccines*. 2014, 2, 463-499.
25. Ottenhoff THM, Kaufmann SHE. *Vaccines against tuberculosis: Where are we and where do we need to go?* *PLoS Pathogens* 2012. Mayo. 8(5).
26. McShane H., Williams A. *A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data*. *Tuberculosis* 94. 2014: 105-110.
27. Perez E. et al. *An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence*. *Molecular Microbiology*. 2001. 41(1), 179-187.
28. Frick M. *The Tuberculosis Vaccines Pipeline*. 2014 Pipeline report. TB vaccines p 233-254.
29. Arbues A et al. *Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials*. *Vaccine* 31. (2013): 4867-4873.
30. Infante E et al. *Inmunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium tuberculosis fad26 mutant*. *British Society for Immunology, Clinical and experimental microbiology*, 141: 21-28.
31. Kumar Das A et al. *Unique N-terminal Arm of Mycobacterium tuberculosis PhoP protein plays an unusual role in its regulatory function*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. 288(40): 29182-29192.

