



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Nuevas estrategias para el diseño de vacunas
frente a *Mycobacterium tuberculosis***

Autor: Alejandra Ramos Carmena

Tutor: Prof^a Rebeca Alonso Monge

Convocatoria: Febrero

Nuevas estrategias para el diseño de vacunas frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Alejandra Ramos Carmena

Resumen:

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) es una micobacteria causante de una de las enfermedades más letales y antiguas que afecta al ser humano. Es una bacteria Gram positivo (aunque no se tiñe con tinción para Gram+), AAR de lento crecimiento. Su pared bacteriana tiene una estructura muy compleja y está principalmente formada por ácidos micólicos, esta complejidad es responsable de la resistencia a antibióticos que desarrolla este patógeno. Además, los péptidos que contiene son antígenos responsables de una manera importante de la estimulación de la respuesta inmunitaria del hospedador. A principios del siglo XX se descubrió la vacuna BCG (Bacilo de Calmett-Guerin) contra la tuberculosis que es la que se sigue utilizando hoy en día. Es una vacuna viva atenuada de *Mycobacterium bovis* que protege únicamente contra meningitis y enfermedad tuberculosa diseminada en lactantes y niños pequeños. Es por este motivo que en este trabajo realizamos una revisión de los avances que se están produciendo en el desarrollo de nuevas vacunas que ofrezcan una protección mayor. Por un lado destacan las vacunas que ya se encuentran en ensayos clínicos. Este tipo de vacunas están enfocadas principalmente a tres ámbitos: vacunas vivas derivadas de *Mycobacterium* que pretenden reemplazar a BCG; vacunas encaminadas a reforzar la eficacia de la BCG; y vacunas terapéuticas que se administren junto con el tratamiento para acortar los plazos. Por otro lado, tratamos de desgranar los nuevos enfoques que se están utilizando con el fin de diseñar vacunas novedosas: la utilización de la bioinformática en el descubrimiento de nuevos antígenos; el estudio de coadyuvantes que puedan estimular la inmunidad producida por la propia vacuna y por último, explorar nuevas vías de administración de las vacunas (vía nasal por ejemplo), alternativas a la parenteral, que puedan desencadenar una respuesta inmunitaria más eficaz y segura.

Introducción y antecedentes:

Mycobacterium tuberculosis pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*. Junto con *M. africanum*, *M. bovis* y *M. microti*, constituye el complejo de bacterias causantes de la tuberculosis (TB), una de las enfermedades más letales y antiguas que afecta al ser humano.

M. tuberculosis es un bacilo Gram positivo (aunque no se tiñe con tinción para Gram+), ácido alcohol resistente, con tamaño entre 0.2-0.7 x 1-10 micras (μm), inmóvil, aerobio estricto y no formador de esporas. Es una bacteria de crecimiento muy lento, ubicada en agua y suelo (Fig. 1).

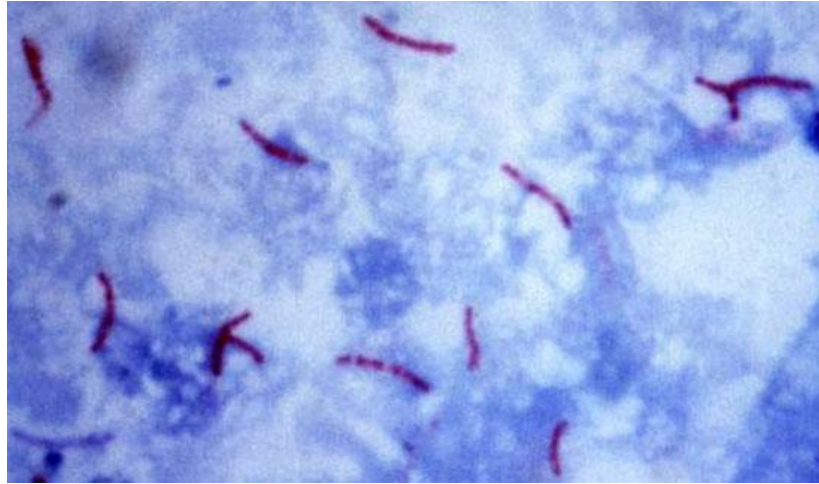


Fig. 1: *M. tuberculosis* en frote de esputo teñido. Técnica de Ziehl-Neelsen. CDC/RW Smithwick

Su pared micobacteriana posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) excepcionalmente complejos, altamente hidrofóbicos y refractarios al ataque hidrolítico por parte de enzimas celulares. Todas estas características hacen de la pared micobacteriana una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales. Esta pared se compone principalmente de tres macromoléculas que se encuentran interconectadas entre ellas (Fig. 2):

- En la capa más externa, se encuentran los ácidos micólicos, que son el principal constituyente de este complejo de macromoléculas (60% del peso de la pared celular), y que son ácidos grasos de 70-80 carbonos ramificados que se estructuran formando una capa lipídica similar a la membrana externa de cualquier Gram negativo. Además estos ácidos micólicos confieren una gran hidrofobicidad, lo que le hace resistente a un gran número de antibióticos.
- Los ácidos micólicos están esterificados con el arabinogalactano; que consiste en un polímero formado por residuos D-galactofuranosil y D-arabinofuranosil.
- Por último, al arabinogalactano se conecta el peptidoglicano en su posición 6, vía un disacárido, que se conoce como “cord factor”.

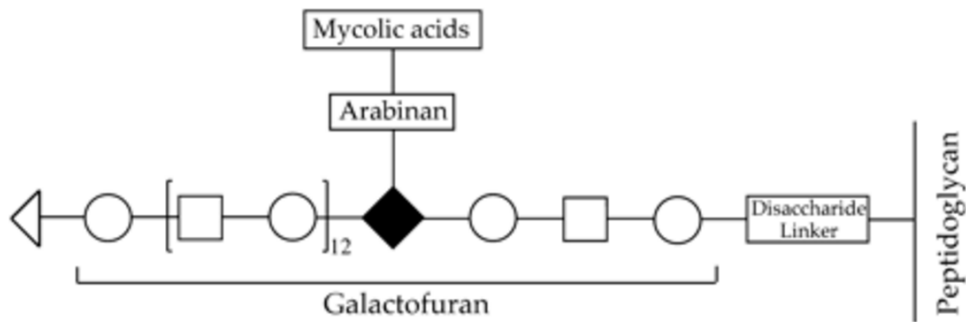


Fig. 2. Estructura principal de la pared micobacteriana. Fuente: *Dianas de Pared*, Universidad Autónoma de Barcelona

Los ácidos micólicos se encuentran orientados perpendicularmente al plano de la membrana y aportan una barrera lipídica responsable de muchos de los aspectos fisiológicos e inmunogénicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Por otro lado cabe añadir que, las cadenas de péptidos que se encuentran en esta pared son antígenos responsables, de manera importante, de la estimulación de la respuesta inmune celular del hospedador (de hecho, se utilizan para preparar derivados protéicos purificados (PPD) empleados para evaluar la exposición a *M. tuberculosis* en la prueba de la tuberculina). La presencia de sulfolípidos en esta pared inhibe la fusión fago-lisosomal y es considerada un indicador de cepas virulentas. La envoltura celular también incluye adhesinas y no contiene toxinas conocidas. Es por esto que es difícil caracterizar la virulencia de este patógeno.

Esta bacteria es transmitida por vía aérea directamente de persona a persona. La infección se produce por la inhalación por parte de una persona sana de los aerosoles producidos por personas infectadas por *M. tuberculosis* al toser, estornudar, hablar o cantar. La bacteria entra en el sistema respiratorio del hospedador y se dirige a los alveolos pulmonares. Allí, es fagocitada por los macrófagos alveolares y por las células dendríticas. *M. tuberculosis* es reconocida por los receptores tipo Toll de los macrófagos y es fagocitada. Una vez dentro de los macrófagos, se replica hasta que, la respuesta de la inmunidad innata activa a estos macrófagos en un intento por controlar el patógeno. En este punto, *M. tuberculosis* es capaz de evitar la maduración del fagosoma y consecuentemente la formación del fagolisosoma. La bacteria se defiende de esta manera ya que el fagolisosoma es una estructura en la que se produce un cambio drástico de pH y unas enzimas hidrolíticas que la llevarían a la muerte. Al evitarse la formación de este compartimento, la bacteria previene su destrucción. Por otro lado, las bacterias fagocitadas por las células dendríticas, son transportadas a los nódulos linfáticos. Allí, los antígenos obtenidos tras hidrolizar el patógeno

son presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad a los linfocitos T CD4+ Y CD8+, y posteriormente a los linfocitos T específicos para este antígeno que se han generado. Los linfocitos se dirigen hasta el lugar donde se ha producido la entrada del patógeno y secretan diferentes tipos de citoquinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral e interferón para tratar de controlar la infección. Los propios macrófagos secretan entonces óxido nítrico (NO) que contribuye de manera fundamental en el control de la infección. Si la respuesta inmunitaria es exitosa, el patógeno queda recluido en granulomas formados por diferentes tipos de células del sistema inmunitario. Mientras la bacteria se mantiene dentro de los granulomas, la enfermedad no se manifiesta y la bacteria queda en un estado de latencia en el que ralentiza su tasa de replicación pero no muere. Esto puede llevar a una reactivación en el futuro, si el granuloma se rompe, y a la manifestación de la enfermedad tiempo después de haberse producido la primoinfección.

Desafortunadamente, no se conocen con claridad los factores de virulencia involucrados en el desarrollo de la patogenicidad, debido a que *M. tuberculosis* no consta de los factores de virulencia clásicos que poseen otras bacterias patógenas, como por ejemplo toxinas. Además este patógeno tiene mucha facilidad para mutar y así evadir tanto al sistema inmune como la acción de los antibióticos, estas son las cepas resistentes. Es por esto la dificultad que existe en la efectividad del tratamiento de esta infección. Estas cepas se han convertido en un verdadero problema a nivel mundial que debe ser enfrentado.

Como ya hemos mencionado anteriormente, *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis, una enfermedad infecciosa considerada una de las más letales y más antiguas que afecta al ser humano. Es una enfermedad sistémica, crónica, que afecta principalmente al sistema respiratorio y que se adquiere principalmente por vía aérea. Aunque se trata mayoritariamente de una enfermedad pulmonar (85%), puede afectar también a otros órganos y tejidos. Puede ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado. Actualmente, se considera un severo problema de salud pública la presencia de cepas fármacorresistentes. La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas de mayor mortalidad y mayor distribución en el mundo. De acuerdo al Informe Global sobre la Tuberculosis de la OMS de 2014, durante ese mismo año, nueve millones de personas desarrollaron la enfermedad y 1.5 millones fallecieron (360 000 de las cuales eran VIH positivas). En este mismo año la OMS estima que, un millón de niños enfermaron y 140 000 de ellos murieron de tuberculosis. Además, la tuberculosis se considera la causa principal de

muerte entre las personas infectadas por VIH; en 2015, fue la causa de una de cada tres defunciones en este grupo de población.

En la mayoría de los casos, la enfermedad no se manifiesta tras la primera infección por *M. tuberculosis*. El bacilo puede permanecer latente durante años dentro de los gránulos y en algunos casos reactivarse de nuevo. Es entonces cuando se produce la tuberculosis pulmonar. En otras ocasiones menos comunes, la enfermedad puede reactivarse en cuestión de semanas después de la infección primaria.

Al romperse estos gránulos y reactivarse la infección, los bacilos pueden dispersarse también a través de las vías linfática y hematológica a tejidos diversos: hígado, bazo, riñones, meninges, etc. Esta distribución de la enfermedad es menos frecuente pero igualmente virulenta.

Los síntomas con los que cursa esta enfermedad incluyen dificultad respiratoria, dolor en el pecho, tos con expectoración y en algunos casos sangre, sudoración especialmente nocturna, fatiga, fiebre alta y pérdida de peso.

El diagnóstico de esta enfermedad consiste inicialmente en la observación de los síntomas que el paciente presenta. Entonces el médico ausculta al paciente y se realiza una radiografía del tórax. Si con esto, sospecha que existe la posibilidad de una infección por *Mycobacterium tuberculosis*, las pruebas que se realizan con más frecuencia para comprobar el diagnóstico son la prueba de la tuberculina (o método de Mantoux) en conjunto con las técnicas IGRA (*Interferon gamma release assay*); y la baciloscopia. La prueba de la tuberculina es la prueba estándar y consiste en una inyección intradérmica de 0.1 ml de derivado protéico purificado de la tuberculina en la cara anterior del antebrazo. Esta inyección produce una elevación leve de la piel, la cual se revisa a las 48-72 horas después de administrada. Las limitaciones de esta prueba radican principalmente en su relativamente baja especificidad, ya que se pueden producir falsos positivos si el paciente ha sido vacunado previamente con la vacuna BCG o si ha sufrido una infección por otro tipo de micobacterias no tuberculosas. También pueden producirse falsos negativos por diferentes causas como se indica en la tabla más abajo (Fig. 3). Además la interpretación de la prueba requiere personal experimentado.

Fig. 3. Causas de resultado falso negativo en prueba de tuberculina. Fuente: Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010.

Infecciones
Virales: VIH, sarampión, varicela, parotiditis
Bacterianas: tuberculosis (formas graves y una proporción de localización en serosas), fiebre tifoidea, brucelosis, tos ferina, lepra
Vacunación con virus vivos: sarampión, parotiditis, poliomielitis
Insuficiencia renal crónica
Desnutrición grave
Enfermedad de órganos linfoides: linfomas, leucemias, sarcoidosis
Corticoterapia prolongada (≥ 15 mg de prednisona más de 1 mes)
Quimioterapia y cualquier medicación inmunosupresora
Menores de 6 meses y ancianos
Técnica y/o lectura incorrectas

Es por esto que, siguiendo un algoritmo de actuación (Fig. 4), dependiendo del resultado de esta prueba, se realiza la prueba IGRA. Esta segunda prueba se realiza si el resultado de la prueba de la tuberculina ha sido negativo pero el paciente es inmunodeprimido o si la prueba ha resultado positiva pero el individuo esta vacunado con la vacuna BCG; que son los casos en que la técnica de Mantoux no da un resultado tan específico. Esta técnica se basa en la detección del interferón gamma en sangre, una citoquina fundamental en el control de la enfermedad tuberculosa, que se libera como respuesta a la estimulación *in vitro* de las células T sensibilizadas con antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis*. De esta manera es posible discriminar a los individuos infectados por *M. tuberculosis* de los vacunados por BCG y de los infectados por otras micobacterias.

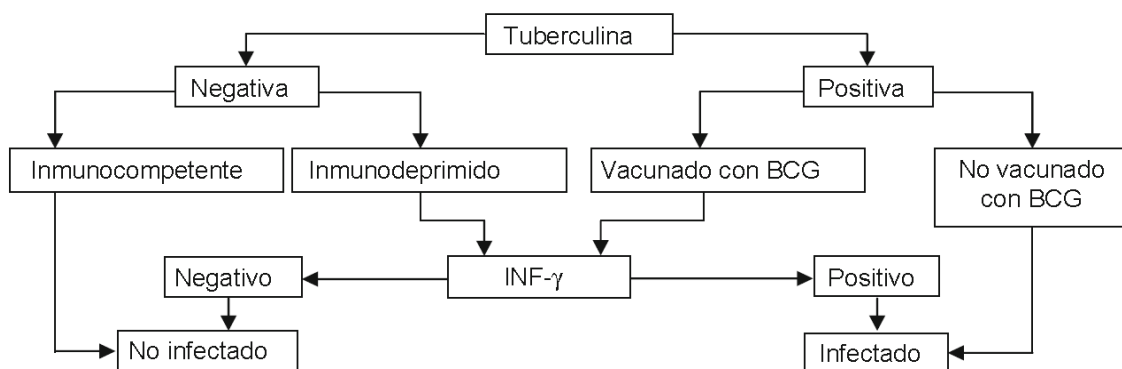


Fig. 4. Algoritmo de utilización conjunta de la prueba de la tuberculina y las técnicas de determinación del interferón gamma para el diagnóstico de la infección tuberculosa. Fuente: Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010.

Por otro lado, la baciloscopia es un examen microscópico para la detección de bacilos ácido alcohol resistentes mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Es un método sencillo, de bajo coste y rápido, ya que en un día se pueden obtener los resultados. Pero presenta baja sensibilidad, ya que se requieren al menos 5000 bacilos/ml de esputo para que la microscopía resulte positiva; la sensibilidad es aún menor en casos de tuberculosis extrapulmonar, cuando existe coinfección con VIH y cuando la infección es debida a micobacterias no tuberculosas. Según datos de la OMS de 2010, la microscopía de fluorescencia ofrece un 10% más de sensibilidad pero es más costosa. En la mayoría de casos, la infección es diagnosticada o descartada con estos métodos pero también existen otras opciones para el diagnóstico de esta enfermedad. Uno de ellos es el cultivo sólido o líquido de una muestra del paciente. Este método aumenta la posibilidad de diagnóstico en un 30-50% en relación a las técnicas de microscopía; pero es un método más complejo, más lento (ya que *M. tuberculosis* es de crecimiento lento) y requiere de medidas de bioseguridad. El último procedimiento diagnóstico que destacaremos son las pruebas bioquímicas y moleculares, que ofrecen un resultado rápido.

Una vez diagnosticada la infección, se procede a instaurar el tratamiento con el que se tratará de eliminar la bacteria patógena. Actualmente el tratamiento estándar tiene una duración de seis meses: los dos primeros meses con Rifampicina, Isoniacida, Piracinamida y Etambutol; seguidos de cuatro meses en los que solo se continúa el tratamiento con Rifampicina e Isoniacida. Los niños suelen tener buena tolerancia a los fármacos y su tratamiento será igual que en los adultos, ajustando la dosis al peso. Tampoco debe modificarse la pauta durante el embarazo o la lactancia. Actualmente en España se dispone de preparados con los cuatro fármacos y con dos de ellos para facilitar la adhesión y seguimiento correcto del tratamiento, debido a su larga duración.

A pesar de los inmensos esfuerzos realizados en la investigación de vacunas para prevenir la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, hoy en día se sigue utilizando a nivel mundial una vacuna que se descubrió a principios del siglo XX, la vacuna BCG (*bacillus Calmette- Guerin*). La especie utilizada para esta vacuna es *Mycobacterium bovis* en una preparación de bacterias vivas atenuadas. Es administrada en una única dosis de inoculación intradérmica. Actualmente en España, no se incluye en el calendario de vacunación ya que en España la incidencia de tuberculosis no es muy alta y debido también a que los individuos vacunados pueden dar falsos positivos en la prueba de la tuberculina. Por otra parte, la vacuna BCG solamente proporciona una protección parcial en humanos. Protege efectivamente

contra meningitis y enfermedad tuberculosa diseminada en lactantes y niños pequeños; pero fracasa en tuberculosis pulmonar y en la infección latente en adultos de cualquier sexo y edad, incluso en niños.

Debido a la protección parcial que proporciona esta vacuna es necesario avanzar en la investigación y el diseño de nuevas vacunas que ofrezcan una inmunidad superior y de más amplio espectro que las que se conocen y se utilizan en la actualidad.

Objetivos:

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de la situación en que se encuentra en este momento el diseño de nuevas vacunas frente a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* en cuanto a su efectividad y diseño; y los enfoques que se están dando en cuanto al diseño de nuevas alternativas que puedan ser más efectivas o aumentar la efectividad de las vacunas ya existentes por diferentes métodos.

Metodología:

Se realizó una revisión bibliográfica de un amplio número de artículos científicos publicados en diferentes bases de datos de ámbito científico tales como *Pubmed*, *MedlinePlus* o *Elsevier Health Journals*. Además, también se consultaron fuentes oficiales como la página web de la Agencia Europea del Medicamento (<http://www.ema.europa.eu/ema>), la Organización Mundial de la Salud (OMS), o de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC); documentos publicados por organismos oficiales tales como el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo y se consultaron los fondos de la biblioteca de la Facultad de Farmacia.

Discusión:

Como hemos mencionado anteriormente, la vacuna BCG es la única vacuna disponible en la actualidad contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Pero se están realizando grandes esfuerzos de investigación para desarrollar nuevas alternativas a esta vacuna, que sean capaces de prevenir la tuberculosis en todas sus formas y con mayor probabilidad. A continuación expondremos estas alternativas que se están desarrollando, entre las cuales podemos diferenciar claramente entre las vacunas candidatas que ya se encuentran en ensayos

clínicos; y aquellas que están en desarrollo y cuyo diseño es novedoso con respecto a las mencionadas anteriormente.

Vacunas en ensayos clínicos

Debido a la protección que confiere la vacuna BCG en la niñez, actualmente las estrategias que se están tomando para desarrollar las vacunas que se encuentran en ensayos clínicos son: modificar la vacuna BCG para hacerla más inmunogénica o reforzar la vacunación primaria con BCG con nuevas vacunas que aumenten la protección. También se están estudiando algunas vacunas de bacterias vivas con el fin de reemplazar completamente la BCG.

Vacunas que refuerzan la vacuna BCG:

El objetivo que se busca con la utilización de estas vacunas es que, continuando con la inmunización con BCG en neonatos, se suplemente a una edad mayor con otra nueva vacuna que refuerce la protección y aumente la inmunización ofrecida en primera instancia por la BCG. Algunas de estas nuevas vacunas amplificadoras podrían incluir como vectores poxvirus o adenovirus recombinantes. Por ejemplo se ha desarrollado el MVA85A, esto es, el virus vaccinia Ankara (Poxviridae) modificado altamente atenuado, que se utiliza como vector viral para el antígeno micobacteriano 85A, que se ha visto que aumenta la inmunidad producida por BCG en humanos.

También podemos destacar otro caso de vectores virales, en este caso una cepa recombinante del serotipo 5 de Adenovirus que expresa el antígeno 85A de *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas atenuadas de Adenovirus utilizadas como vectores de vacunas provocan una gran respuesta de las células T CD4+ y CD8+, de ahí que se esté probando su utilidad para las vacunas contra *M. tuberculosis* actualmente en un ensayo clínico en fase II que se está llevando a cabo en Canadá. Una variación de esta vacuna, usa como vector el serotipo 35 de un Adenovirus recombinante que expresa los antígenos 85A, 85B y TB10.4 de *M. tuberculosis*. La ventaja que presenta Ad35 (Adenovirus serotipo 35) sobre otros vectores virales es la baja frecuencia con que se encuentran anticuerpos anti-adenovirus en humanos. Esta vacuna está siendo examinada en un ensayo clínico en fase IIb bajo el nombre de AERAS-402 (Fig.5).

Vaccine ID	Vaccine type	Delivery vector/adjuvant system	Antigen (H37Rv Locus ID)	Function	Clinical trial phase
Ad5Ag85A	Viral vector	Recombinant adenovirus serotype 5	Ag85A (Rv3804c)	Mycyl transferase surface protein	Phase I
MVA85A/AERAS-485	Viral vector	Modified vaccinia virus Ankara (MVA)	Mtb32a (Rv0125) Ag85A (Rv3804c)	Serine protease Mycyl transferase surface protein	Phase IIb
Crucell/AERAS-402	Viral vector	Replication-defective adenovirus 35 (Ad35) with fused recombinant protein	Ag85A (Rv3804c) Ag85B (Rv1886c) TB10.4 (Rv0288)	Mycyl transferase surface protein Fibronectin binding protein surface protein EsxH (Esx-3 T7SS)	Phase IIb

Fig. 5. Vacunas candidatas contra TB en ensayos clínicos y sus antígenos. *Current and novel approaches to vaccine development against tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012.

Otra estrategia destacable para reforzar la inmunidad inducida por la BCG es el uso de vacunas derivadas de subunidades protéicas de *Mycobacterium tuberculosis*. Algunas vacunas de este tipo que se encuentran actualmente en ensayos clínicos incluye Mtb72F/AS01/AS02A, que consiste en una proteína recombinante que contiene Mtb32 y Mtb39, antígenos de *M. tuberculosis* que han demostrado inducir fuertemente la respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ en animales de laboratorio; pero más importante aún, en individuos sanos con la prueba de la tuberculina positiva (Fig. 6).

Vaccine ID	Vaccine type	Delivery vector/adjuvant system	Antigen (H37Rv Locus ID)	Function	Clinical trial phase
Mtb72F/AS01E	Adjuvant subunit vaccine	Recombinant protein with AS01 adjuvant system	Mtb39a (Rv1196)	Proline-proline-glutamic acid 18 family (PPE18)	Phase II
MVA85A/AERAS-485	Viral vector	Modified vaccinia virus Ankara (MVA)	Mtb32a (Rv0125) Ag85A (Rv3804c)	Serine protease Mycyl transferase surface protein	Phase IIb

Fig. 6. Vacunas candidatas contra TB en ensayos clínicos y sus antígenos. *Current and novel approaches to vaccine development against tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012.

Vacunas vivas derivadas de Mycobacterium que tratan de reemplazar a BCG

Este tipo de vacunas se está diseñando a través de dos estrategias principalmente: la primera el uso de la vacuna BCG como espina dorsal de la potencial nueva vacuna; y la segunda, el desarrollo de mutaciones de la propia BCG que sean capaces de escapar del fagosoma para inducir la respuesta de los linfocitos T CD8+. La BCG comparte muchas

proteínas con *M. tuberculosis* pero muchas de estas proteínas no inducen respuesta inmunitaria en las personas cuando son vacunadas. Una de estas proteínas es la conocida como antígeno 85B, la proteína de secreción mayoritaria en *Mycobacterium*, que ha demostrado inducir protección frente a *M. tuberculosis* en modelos animales. Aunque BCG produce la proteína 85B, no se detecta respuesta inmunitaria a esta molécula tras la vacunación. Por este motivo se ha desarrollado una vacuna recombinante de BCG, rBCG30, que sobreexpresa y secreta 5.5 veces más de Ag85B que la BCG original, induciendo también, una respuesta inmunitaria de un orden de magnitud mayor. Ensayos clínicos de fase I han sido superados satisfactoriamente por esta nueva vacuna recombinante.

Inmunoterapia

El desarrollo de estas vacunas está enfocado hacia el tratamiento de pacientes ya infectados por *M. tuberculosis*, como un tratamiento coadyuvante a la quimioterapia. Sin embargo, la inmunoterapia con componentes bacterianos de este patógeno posee un alto riesgo para la salud, ya que se ha observado que pacientes inoculados con altas dosis de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* podrían sufrir reacciones adversas similares a un shock por tuberculina (síndrome descrito por primera vez por Robert Koch). Por lo tanto, es indispensable elegir cuidadosamente los antígenos candidatos a inmunoterapia.

Una de las vacunas diseñadas para inmunoterapia que se está evaluando en ensayos clínicos actualmente recibe el nombre de RUTI, y es un fragmento celular de *M. tuberculosis* inactivado por calor diseñado para acortar el tratamiento para la infección de tuberculosis latente. En los ensayos clínicos llevados a cabo, la vacuna demostró ser bien tolerada por los pacientes. Actualmente su eficacia está siendo evaluada.

Caben destacar también los ensayos realizados con vacunas inactivadas por calor de *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) y de *Mycobacterium vaccae* en combinación con quimioterapia, para la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En estos ensayos se ha observado que la administración de varias dosis de MIP posteriormente al tratamiento estándar para la tuberculosis, disminuye la respuesta inflamatoria y conlleva una mejoría de la patología pulmonar en modelos animales.

Por otro lado, *M. vaccae*, administrada en series de varias dosis, produjo una protección significativa frente a la tuberculosis en individuos adultos coinfectados con VIH y que habían sido vacunados con BCG durante la infancia. Por tanto, este protocolo representa una

potencial alternativa inmunoterapica muy interesante contra la tuberculosis para un amplio rango de población, los pacientes coinfectados con *M. tuberculosis* y VIH.

Nuevas estrategias en el desarrollo de vacunas contra M. tuberculosis

Pese al análisis de nuevas vacunas contra *Mycobacterium tuberculosis*, no existe garantía de que ninguna de ellas sea más eficaz que la ya conocida BCG. Todavía existen lagunas a la hora de comprender las relaciones patógeno-hospedador entre el ser humano y *M. tuberculosis*, especialmente sus estrategias para evadir al sistema inmunitario. En este apartado se pondrá en relieve los nuevos enfoques y estrategias que se están llevando a cabo para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis. En primer lugar, los esfuerzos están yendo encaminados a encontrar nuevos antígenos que nos puedan ser útiles a través de estrategias novedosas. Estas estrategias con la ayuda de las nuevas tecnologías y el desarrollo de la bioinformática, nos permiten conocer la secuencia genómica del patógeno. Una vez conocida esta secuencia, podemos hacer un análisis *in silico* para identificar antígenos que intervienen en la producción de la respuesta inmunitaria del hospedador y desarrollar vacunas que tengan como diana los antígenos para los que codifican estas secuencias. Tradicionalmente la manera de buscar candidatos era muy diferente, de hecho inversa a este método. Pero esto resulta una gran avance en la inmunología actual.

Se pueden aplicar estas estrategias alternativas para identificar antígenos que se expresan durante la forma activa de la tuberculosis. Son antígenos que son reconocidos por el sistema inmunitario del hospedador cuando *Mycobacterium tuberculosis* se está replicando y que son potenciales dianas inmunológicas a la hora de controlar la enfermedad. Diferentes equipos de investigación están trabajando en este aspecto, identificando, por ejemplo, antígenos secretados en orina por pacientes con tuberculosis pulmonar. Estos antígenos han sido evaluados en estudios preclínicos, demostrando ser capaces de provocar la respuesta tanto de células T CD4+ como CD8+.

Por otro lado, para desarrollar una vacuna eficaz contra la tuberculosis, los investigadores deben encontrar, además, una solución en su diseño al problema de la latencia y de la evasión del sistema inmune. El paso lógico al respecto es tratar de identificar los antígenos que se expresan preferentemente durante el estado de latencia del patógeno.

Otro enfoque que se está produciendo a la hora de abordar la búsqueda de nuevas vacunas es el de desarrollar nuevos adyuvantes que puedan estimular o amplificar la respuesta

inmunitaria que produce la propia vacuna. Por ejemplo es el caso del Glucopiranosil-lípido A (GLA), una molécula sintética no tóxica desarrollada por el Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas (IDRI) de Seattle. Esta molécula, formulada con escualeno, forma una emulsión estable que ha demostrado estimular los linfocitos Th1. Recientemente, este Instituto desarrolló una formulación con este adyuvante que incluía una posible vacuna poliprotéica para la tuberculosis. Esta formulación ofreció unos resultados prometedores en experimentos llevados a cabo en ratones, tras lo que el instituto ha anunciado que va a continuar con el desarrollo de esta vacuna y comenzará a realizar ensayos clínicos de fase I. Otro ejemplo son los carbómeros, que habitualmente se usan en el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación prolongada, también han demostrado ser útiles como adyuvantes en vacunas, ya que provocan la producción de citoquinas tanto de Th1 y Th2.

Actualmente también se están llevando a cabo investigaciones basadas en el mecanismo innato de apoptosis que se produce en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* y que previene que la bacteria se establezca en el hospedador. Entender cómo se regula la apoptosis en estos casos, cómo se restringe la replicación del patógeno y cómo esos mecanismos pueden ser manipulados para intensificar o realzar los efectos de una vacuna, es otro de los objetivos de los investigadores hoy en día.

Con el tiempo, diferentes microorganismos entre los que se encuentra *Mycobacterium tuberculosis*, han evolucionado desarrollando mecanismos para suprimir la autofagia que lleva a cabo el hospedador como método de defensa, para favorecer su propia supervivencia. A este respecto, se está estudiando la posibilidad de conseguir vacunas con micobacterias mutadas capaces de inducir autofagia. La autofagia, un importante mecanismo de defensa del hospedador, presenta un papel esencial tanto en la inmunidad innata como adaptativa y consiste en la maduración del fagosoma a fagolisosoma con el fin de destruir al patógeno. La generación que se propone de micobacterias mutadas autófagas puede tener aplicaciones muy significativas en el desarrollo de vacunas efectivas y seguras contra la tuberculosis.

Por último, otro aspecto a tener en cuenta a la hora de diseñar nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis es la vía de inmunización del posible candidato. Aunque en estudios preclínicos se han evaluado gran variedad de vías de administración de las vacunas (intradérmica, subcutánea, intramuscular, nasal y oral), los ensayos clínicos se han limitado a usar solamente la vía parenteral. La inmunización por vía parenteral ha sido históricamente utilizada con éxito para una gran variedad de vacunas contra diversas enfermedades, pero, como *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno de la mucosa

respiratoria, es importante que el sistema de liberación de la vacuna induzca una protección inmunitaria de la mucosa de los pulmones que es donde la micobacteria inicialmente produce la infección a nivel de los macrófagos alveolares. Pero es posible que la falta de ensayos clínicos en los que se utilice esta vía se deba al conocimiento limitado que se tiene de cómo formular una vacuna que llegue y se libere correctamente en la mucosa. Además, existe cierto debate sobre cómo influye la administración de una vacuna en la mucosa sobre la especificidad y la distribución anatómica de los linfocitos T que se generan como respuesta. A pesar de la controversia, existe cierta evidencia que sugiere que los linfocitos T que se generan por esta vía, podrían inicialmente permanecer localizados en el sitio de inoculación, pero posteriormente, distribuirse ampliamente por otros compartimentos de la mucosa y/o sistémicamente. Por ejemplo, en humanos, la inmunización a través de la mucosa con una subunidad de la toxina B del cólera, claramente ha demostrado que la respuesta más fuerte se produce en el lugar de administración en la mucosa. Aunque también se detectan respuestas bastante potentes en las zonas contiguas de la mucosa y áreas interconectadas como la nasopulmonar. Por tanto, sería interesante que se destinaran mayores esfuerzos a la evaluación preclínica de vacunas que inmunicen la mucosa, y concretamente al desarrollo de formulaciones que exploten la vía nasal como vía de administración de vacunas contra la tuberculosis.

Conclusión:

A lo largo de las últimas dos décadas de intensa investigación, un gran número de potenciales vacunas y adyuvantes han sido estudiados. Desafortunadamente, ninguna ha resultado ser efectiva hasta el momento. En este punto, podemos considerar que el mayor reto que se nos presenta a la hora de desarrollar una vacuna contra la tuberculosis es entender los mecanismos por los cuales *Mycobacterium tuberculosis* evade la respuesta inmune tanto innata como adaptativa de su hospedador, creando cepas multirresistentes. De ahí que se considere prioritario continuar las investigaciones encaminadas a dilucidar completamente estos mecanismos. El conocimiento que obtengamos de estos estudios contribuirá indudablemente al diseño más racional de vacunas que serán capaces de inducir una respuesta inmunitaria que superará las defensas creadas por *Mycobacterium tuberculosis*, incluso por las cepas más resistentes. Es previsible que estas vacunas incluyan nuevos antígenos, y muy importante también, que sean administradas por una vía no convencional (por ejemplo por vía nasal). Esto estimulará un tipo de respuesta inmunitaria todavía por terminar de descifrar que

nos protegerá contra este patógeno que ha sido capaz de evolucionar junto a su hospedador durante miles de años.

Bibliografía:

1. Mark J. Cayabyab, Lilia Macovei, Antonio Campos-Neto. 2012. Current and novel approaches to vaccine development against tuberculosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2 Article 154.
2. Manual de Vacunas en línea de la Asociación Española de Pediatría (AEP). 2015. Sección IV, capítulo 40: Tuberculosis.BCG.
3. Publicación del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 2015. Tuberculosis.
4. Julià González-Martín, José María García-García, Luis Inabarro, et col. 2010. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28 (5): 297.e1- 297.e20.
5. Enciclopedia Médica, MedlinePlus. 2014. Tuberculosis pulmonar.
6. Ficha de Agentes Biológicos: *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
7. Organización Mundial de la Salud (OMS). Nota descriptiva nº 104. 2015. Tuberculosis.
8. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC). Hojas informativas. Tuberculosis (TB).
9. Publicación del Departamento de Bioinformática de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dianas de pared. Características de la pared.
10. María Teresa Herrera, Martha Torres, Esmeralda Juárez, Eduardo Sada. 2005. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 18 (4): 327-336.
11. JoAnne L. Flynn. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 84: 93-101.
12. P. J. Brennan. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83: 91-97.
13. Bennett JE, Dolan R, Blaser MJ. 2015. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8° ed. cap 251.