



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DE NUEVAS VACUNAS PARA PREVENIR LA
TUBERCULOSIS PULMONAR EN UN MODELO MURINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

KAREN MAGDALENA GARCÍA RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA

2014

“Bueno es ir a la lucha con determinación,
abrazar la vida y vivir con pasión,
perder con clase y vencer con osadía,
Porque el mundo pertenece a quien se atreve
y la vida es mucho más para ser insignificante”.

Charles Chaplin



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna GARCÍA RODRÍGUEZ KAREN MAGDALENA, con número de cuenta 306051504 de la carrera de Q. F. B., se le ha fijado el día 05 del mes de Mayo de 2014 a las 15:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	DRA. MA. TERESA CORONA ORTEGA	
VOCAL*	DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA	
SECRETARIO	Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN	
SUPLENTE	DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA	
SUPLENTE	M. en C. GUILLERMO RODOLFO GUTIÉRREZ ESPINDOLA	

El título de la tesis que se presenta es: **Evaluación de nuevas vacunas para prevenir la tuberculosis pulmonar en un modelo murino.**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 02 de Abril de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECCIÓN

RECIBÍ:
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.
DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

El presente trabajo se realizó con el financiamiento otorgado por Instituto de Ciencia y Tecnología (ICyT). Durante la realización de éste, goce de una beca de ayudante de SNI, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ, POR TUS ESFUERZOS, CONSEJOS, EJEMPLO Y APOYO INCONDICIONAL Y SOBRE TODO POR CREER EN MÍ.

A MI FAMILIA, GUTY, PATRICIO, EZEQUIEL, DANIEL, MOISES, PATRICIA, YOLANDA, ALAN, MATHEWS Y MARTÍN, POR SU AMOR, EJEMPLO Y ENSEÑANZAS Y POR ESTAR EN LAS BUENAS Y MALAS SIEMPRE.

A MIS GRANDES AMIGOS MAYDA, LUIS, DIEGO, BETO, FILI, CRIS, ISAAC, JAIME, NORBERTO Y LEO, QUE ME ACOMPAÑARON DURANTE LA UNIVERSIDAD CON SUS CONSEJOS, ALEGRÍAS Y EXPERIENCIAS.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en especial a la Dra. Dulce Adriana Mata-Espinosa por su apoyo dedicación y enseñanzas.

Gracias al Dr. Rogelio Hernández-Pando por su asesoría y confianza.

Gracias al Dr, Jorge Barrios-Payan y a la Dra. Brenda Marquina-Castillo, por su asesoría, apoyo y enseñanzas.

Agradezco a la profesora Patricia Vidal Milán, por su apoyo y asesoría.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ, en especial a Octavio Ramos, por su gran apoyo, consejos y experiencias.

Agradezco a los miembros de mi comité sinodal, por su asesoría y valiosos consejos para el desarrollo de este trabajo.

DRA. MA. TERESA CORONA ORTEGA
DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA
Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN
DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA
M. EN C. GUILLERMO RODOLFO GUTIÉRREZ ESPINDOLA

ÍNDICE

Índice	i
Abreviaturas	v
Introducción	1
Marco Teórico	3
1. Tuberculosis.....	3
1.1. Aspectos generales.....	3
1.2 Agente infeccioso.....	4
1.3 Epidemiología.....	5
1.4 Características clínicas.....	5
1.5 Diagnostico.....	6
1.6 Tratamiento.....	6
2. Vacunas.....	6
2.1. Historia y características generales de vacunas.....	6
2.2. Vacunas de microorganismos desactivados o muertos.....	8
2.3. Vacunas de subunidades.....	8

2.4. Vacunas de ADN.....	9
2.5. Vacunas de microorganismos vivos atenuados.....	10
2.6. Vacunas recombinantes.....	11
3. Vacuna BCG.....	13
3.1. Historia.....	13
3.2. Atenuación.....	13
3.3. Aplicación.....	14
3.4. Efectos adversos.....	14
3.5. Nivel de protección.....	15
3.6. Nuevos candidatos vacunales.....	16
4.- Heparin- Binding Hemagglutinin Adhesin.....	17
Planteamiento del problema.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	22
Material y métodos.....	23

A. Diseño.....	23
B. Universo.....	23
C. Variables.....	23
D. Técnicas.....	23
1. Preparación de las vacunas 261 y 361, y preparación de las cepas H37Rv y 5186.....	23
1.1. Verificación de la pureza de las cepas y las vacunas.....	23
1.2. Curva de crecimiento de las cepas y las vacunas.....	24
1.3. Pre-cultivo y escalamiento de cultivo de las cepas y las vacunas.....	25
1.4. Titulación de las cepas y las vacunas por UFC.....	25
2. Vacunación de ratones.....	26
3. Reto con las cepas H37Rv y 5186.....	26
4. Sacrificio.....	27

5. Determinación de la carga bacteriana (UFC's)	27
6. Preparación del tejido pulmonar para el estudio histológico y morfométrico.	27
7. Ensayo de atenuación.....	28
E. Análisis estadístico.....	28
F. Diagrama de flujo.....	29
Resultados.....	30
A. Determinación de sobrevida.....	30
B. Determinación de la carga bacteriana (UFC'S)	31
C. Determinación del porcentaje de neumonía.....	34
D. Ensayo de atenuación.....	37
Discusión.....	39
Conclusiones.....	45
Perspectivas.....	46
Referencias.....	47

ABREVIATURAS

ADN, Ácido desoxirribonucleico

BAAR, Bacilo alcohol ácido resistente

BCG, Bacilo de Calmette y Guerín

CD4, marcador de linfocitos T CD4+

cDNA, ADN complementario

HBHA, Heparin-binding hemagglutinin adhesion

IFN γ , Interferón gamma

IgM, Inmunoglobulina M

MHC II, Complejo principal de histocompatibilidad clase II

OMS, Organización Mundial de la Salud

RD 1, Región de diferenciación I

rHBHA, Proteína HBHA recombinante

TB, Tuberculosis

Th1, Linfocitos T cooperadores 1

Th2, Linfocitos T cooperadores 2

TNF α , Factor de necrosis tumoral alfa

UFC's, Unidades formadoras de colonias

VIH, Virus de inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. canetti*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. tuberculosis*) y afecta a un tercio de la población mundial (Arráiz R. et al, 2007). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que en 2011 hubo 8,7 millones de nuevos casos de TB y 1,4 millones de muertes a nivel mundial y en México se reportaron 18,986 nuevos casos en todas sus formas (SUIVE, DGE, 2007).

Aunque la enfermedad es curable, el tratamiento se debe administrar por un periodo de 4 a 9 meses para lo cual se utilizan 4 diferentes antibióticos; isoniazida, pirazinamida, etambutol y rifampicina de manera simultánea, lo que fomenta el abandono del tratamiento, promoviendo la aparición de cepas resistentes a varios antibióticos, lo cual complica el tratamiento incrementando su costo y toxicidad (Ramos G. et al, 2003).

Por lo anterior, resulta necesario un diagnóstico y tratamiento oportuno para el control de la TB, así como una vacunación eficiente. Aunque está lejos de ser la vacuna ideal, actualmente la única vacuna con la que se cuenta para la profilaxis de la enfermedad es la BCG (Bacilo de Calmette Guerin), la cual es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* y se ha utilizado desde 1921. La vacuna se aplica por vía intradérmica en el periodo neonatal, y no requiere de posteriores refuerzos. A pesar de que la BCG presenta complicaciones, son raras y es eficiente para controlar formas graves en niños como la TB miliar o cerebral, en adultos su eficiencia es limitada para prevenir la forma pulmonar, ya que su capacidad protectora es muy variable y va del 0 al 80% (Palomino J. C. 2007)

Actualmente existen diversas tecnologías para la generación de nuevos candidatos vacunales, los cuales pueden ser fabricados a partir de vacunas ya existentes, en donde se adicionan genes para la sobre-expresión de antígenos inmunogénicos (BCG recombinantes).

En colaboración con el Dr. M. Alberto Flores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco CIATEJ en Guadalajara Jal. México, se han obtenido dos vacunas a partir de BCG Pasteur las cuales sobre-expresan la proteína HBHA (heparin-binding hemagglutinin adhesin); La vacuna 261 sobre-expresa la proteína de manera episomal en forma de plásmido y la vacuna 361 la sobre-expresa de manera integrada en el genoma bacteriano.

La proteína HBHA es una invasina que naturalmente se encuentra en la superficie de la pared bacilar de micobacterias patógenas como *M. tuberculosis*, y tiene la capacidad de adherirse a células no fagocíticas como células epiteliales, facilitando así la diseminación extra pulmonar del bacilo, también puede formar uniones entre las mismas proteínas generando la agregación de los bacilos, lo cual es un mecanismo de virulencia de la bacteria (Menozzi, 1996).

En este estudio se evaluó la capacidad protectora de las vacunas que sobre-expresan esta proteína, así como la sobrevivencia, la carga bacteriana y el porcentaje de neumonía en un modelo murino de tuberculosis progresiva, vacunando y retando ratones con una cepa hipervirulenta y una de mediana virulencia.

MARCO TEÓRICO

1. Tuberculosis

1.1. Aspectos generales

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual comprende una serie de bacilos intracelulares, aerobios estrictos y de crecimiento lento, siendo estos: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* y el más estudiado *Mycobacterium tuberculosis*, que también es conocido como bacilo de Koch, en honor a su descubridor Robert Koch que lo clasificó por primera vez en 1882 (Palomino J. C, 2007; H Smith 2006).

La enfermedad se remonta desde hace ya varios años, y el conocimiento de la misma ha evolucionado con el paso del tiempo. Durante los siglos XVII y XIX alcanzó cifras epidémicas en el norte de América y Europa lo que alentó la búsqueda hacia una mayor comprensión de la enfermedad; a principios del siglo XIX Théophile Laennec desarrolló trabajos con el objetivo de comprender la patogénesis de la TB, los cuales fueron completados por Jean-Antone Villemin en 1865, quien demostró el mecanismo de transmisibilidad. Posteriormente en 1907 Clemens Von Pirquet desarrolló la prueba de la tuberculina y a principios de siglo XX, en los centros sanitarios se desarrolló un tratamiento para pacientes con tuberculosis (M. Daniel, 2006).

Tiempo después y como consecuencia de la primera guerra mundial, se desarrollaron extensas campañas de vacunación, con la BCG, la cual, hasta la fecha, se sigue utilizando (Daniel M., 2006). Actualmente en varios laboratorios en todo el mundo, se siguen realizando estudios para terminar de comprender la enfermedad y su posible erradicación.

Ahora se sabe que el mecanismo de transmisión de la enfermedad es mediante las vías respiratorias, a través de un individuo enfermo que expulsa bacterias vivas

mediante tos, estornudo, y al hablar o escupir, y posteriormente son inhaladas por un individuo sano (Flynn & Chan, 2001).

Como consecuencia al mecanismo de transmisión, la enfermedad es pulmonar principalmente, sin embargo existe la enfermedad extra-pulmonar, que puede ser producto de una diseminación por vía linfática, por contigüidad o hematogena, siendo esta última la principal causante de las TB extra-pulmonares, pudiéndose presentar TB ganglionar, meníngea, del aparato urinario, digestiva, genital, oftálmica, tópica, y pericarditis tuberculosa, entre otras (Fanlo & Tiberio, 2007).

1.2. Agente Infeccioso

Taxonómicamente, el agente causal de la tuberculosis pertenece al orden *Actinomycetales* y a la familia *Mycobacteriaceae*. La enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, uno de los microorganismos que comprenden el complejo tuberculoso (Luna, 2003).

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria sin motilidad y es un bacilo aerobio estricto, lo cual es importante ya que debido a esto, la enfermedad pulmonar es la más común. Es considerado un parásito facultativo intracelular, y se sitúa principalmente en macrófagos. Tiene un tiempo generacional lento, que va de las 15 a las 20 horas, característica fisiológica que puede contribuir como un mecanismo de virulencia. El tamaño del bacilo va de 0.2-0.6 μm x 1.0-10 μm y no forma capsulas, ni presenta flagelos, ni forma esporas (Finer, 2009).

La bacteria puede cultivarse en medio Middlebrook's que es un medio a base de agar, y en Lowenstein-Jensen, que es un medio a base de huevo. En ambos medios, las colonias sembradas a 35°-37°C pueden observarse dentro de las 4 y 6 semanas. Las colonias se observan color beige y tienen una apariencia granular seca y áspera (Finer, 2009; Todar, 2008-2012).

Las micobacterias, fuera de ser bacterias Gram positivas o Gram negativas, son clasificadas como Bacilos Alcohol Acido Resistentes (BAAR), debido a la permeabilidad de su pared a la fucsina fenicada y a la resistencia a decolorarse con alcohol-acido por lo que al microscopio se observan color fucsina.

La estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, es única dentro de las células procariotas; además es el mayor determinante de virulencia de la bacteria y juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Su pared se compone de peptidoglicanos, pero principalmente de lípidos, (más del 60% de los componentes de la pared son lípidos) (Todar, 2008-2012; Forreland A., et. al, 2013). Estos últimos forman ceras y se denominan ácidos micólicos, los cuales son moléculas orgánicas muy largas que contienen de 60 a 90 carbonos.

1.3. Epidemiología

La tuberculosis es un problema de salud mundial. En 1993 fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como emergencia sanitaria y actualmente está considerada como la segunda causa de muerte por una enfermedad infecciosa después del virus del VIH.

En el 2011 se reportaron 9 millones de nuevos casos y 1.4 millones de muertes a nivel mundial, y en México en el mismo año, se reportaron 18, 986 casos de TB en todas sus formas, siendo 81.4% pulmonar, 5.6% ganglionar 1.5% meníngea y 11.4% otras formas (WHO, 2012; SUIVE, DGE, 2011)

1.4. Características clínicas

En el periodo de inoculación, los síntomas se caracterizan como tuberculosis primaria pulmonar; dos tercios de los pacientes con tuberculosis primaria se mantienen asintomáticos. En la exploración física no muestran complicaciones y el hallazgo radiográfico más común es adenopatía hiliar e infiltrados pulmonares aunque con menor frecuencia. Aproximadamente el 90% de los casos se deben a una reactivación de la enfermedad primaria (Wieland, 2011). En general son síntomas leves e incluyen tos crónica, producción de esputo, pérdida del apetito, pérdida de peso, fiebre, y diaforesis nocturna. En las formas graves menos comunes se presenta dolor torácico, disnea que se refiere a dificultad respiratoria y hemoptisis (Zumla, et. al, 2013).

1.5. Diagnostico

El diagnóstico de la enfermedad pulmonar se realiza mediante el hallazgo de bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, los cuales se pueden aislar de muestras provenientes del tracto respiratorio (Palomino J. C., 2007)

El cultivo en medio Lowenstein-Jensen y las tinciones para observar bacterias BAAR positivas, siguen siendo el estándar de oro para la identificación del complejo tuberculoso. Dentro de estas tinciones, existen dos métodos: Ziehl-Neelsen y Kinyoun. En ambas tinciones se utiliza como colorante primario fucsina básica en etanol. En la tinción Ziehl-Neelsen, las laminillas deben ser calentadas durante la incubación con fucsina; mientras que en Kinyoun, la tinción no requiere calentamiento. En las dos tinciones se utiliza decoloración con alcohol-ácido (etanol al 95% y ácido clorhídrico al 0.5%) y azul de metileno como colorante de contraste (Forbes, 2007).

1.6. Tratamiento

El tratamiento convencional de TB es de 6 meses en donde se administran simultáneamente los 4 antibióticos rifampicina, isoniacida, etambutol y pirazinamida, durante los primeros 2 meses y rifampicina e isoniacida durante los 4 meses posteriores; sin embargo debido al largo periodo de tratamiento, los pacientes suelen dejarlo antes del tiempo recomendado, lo que origina la aparición de cepas resistentes a fármacos (Ramos G., et. al, 2003; Secretaria de Salud, 2009).

2. Vacunas

2.1 Historia y características generales de vacunas

La palabra vacuna proviene del latín “*vacca*” que significa vaca, ya que la primera vacuna fue elaborada a partir de la “viruela de las vacas”, en 1796 por el médico Edward Jenner en Inglaterra. En el experimento inoculó a un niño sano con pus proveniente de una lesión de una mujer enferma que se había contagiado de viruela mediante una vaca. En los días posteriores, Jenner observó que el niño no presentaba síntomas graves ni complicaciones. Posteriormente inoculó al niño con pus pero esta vez proveniente de un enfermo de viruela humana, y observó que el

niño no enfermo, aunque presentó una lesión en el lugar de la inoculación (Labonne 2005).

Estos estudios realizados por Jenner demostraron la importancia de prevenir una infección mediante la pre-inoculación con el agente causal de la enfermedad. Posteriormente en el siglo XIX este método de inmunización ya era comúnmente utilizado en Norte América y Europa.

La vacunación brinda una capacidad de defensa de manera eficaz y rápida contra patógenos que no son eliminados mediante la inmunidad innata. Las vacunas confieren un tipo de inmunización activa, que a diferencia de la inmunización pasiva en donde se transfieren anticuerpos preformados a un receptor, la inmunización activa consiste en brindar protección y memoria inmunitaria, transfiriendo activamente el patógeno o unidades de este a un receptor para estimular la producción de anticuerpos, lo que genera que a la siguiente exposición con el patógeno, se desencadene una reacción inmunitaria específica que lo elimine con eficacia o prevenga la enfermedad (Abbas, 2008)

De manera muy general el mecanismo mediante el cual las vacunas promueven una respuesta de memoria es el siguiente:

El patógeno en cualquiera de sus formas (dependiendo el tipo de vacuna), o fragmentos del patógeno, penetran al organismo superando las barreras naturales de defensa, posteriormente el antígeno es fagocitado por células presentadoras de antígeno, como macrófagos y células dendríticas, y mediante el MHC II, las cuales exponen fragmentos del patógeno en su superficie. Estos fragmentos son exhibidos a células CD4, o linfocitos Th2, las cuales estimulan la activación de linfocitos B, promoviendo la liberación de anticuerpos. Algunas de las células B estimuladas, se convierten en células de memoria, que estimularán la producción de anticuerpos, en una posterior presentación del antígeno (Kindt, Goldsby y Osborne, 2007).

Por otro lado las condiciones que debe reunir una vacuna que sea “ideal” es que brinde inmunidad efectiva y específica, para lo cual sería necesario utilizar la misma vía de administración que emplea el patógeno en la infección natural, también la

vacuna ideal debe brindar inmunidad de por vida, no debe presentar efectos secundarios, debe ser termoestable y barata (Cabello, 2007)

2.2 Vacunas de microorganismos desactivados o muertos

Para obtener vacunas de microorganismos desactivados o muertos, se utiliza calor, irradiación o agentes químicos como formaldehído, lo que evita que el agente patógeno pueda replicarse dentro del hospedero.

El proceso de inactivación es muy importante ya que se requiere conservar intacta la estructura de los epitopos de los microorganismos. Se obtienen buenos resultados con la inactivación con formaldehído o agentes como óxido de etileno o propiolactona. La inactivación por calor no es tan recomendable ya que se pueden desnaturalizar proteínas y alterar los epitopos del agente patógeno.

En este tipo de vacunas es necesario el uso de refuerzos para seguir estimulando el sistema inmunológico, ya que el microorganismo no puede seguirse replicando. También las vacunas de microorganismos desactivados o muertos, estimulan una reacción más de tipo humoral que de tipo celular en comparación con las vacunas de microorganismos atenuados.

Una de las ventajas de estas vacunas es que son estables y que no se corre el riesgo de que el microorganismo se pueda reactivar; sin embargo se presentó el caso de vacuna tipo Salk donde el mecanismo de inactivación con formaldehído no fue adecuado y produjo un porcentaje elevado de poliomielitis paralítica en los individuos que habían sido vacunados (Abbas, 2008; Kindt, Goldsby y Osborne, 2007).

2.3 Vacunas de subunidades

Para prevenir los riesgos que se corren al utilizar vacunas de microorganismos inactivados o de microorganismos atenuados, se utiliza otro tipo de vacunas en donde se introduce en el hospedero, fragmentos moleculares purificados provenientes del agente patógeno, los cuales estimulan una respuesta humoral contra el antígeno pero sin inocular al microorganismo completo.

Dentro de este tipo de vacunas, se pueden utilizar cápsulas bacterianas como fragmentos moleculares. Algunas bacterias utilizan como mecanismo de virulencia, la cápsula polisacárida hidrófoba que les brinda protección ante la fagocitosis y evita que sean eliminadas por el complemento; de esta manera crear anticuerpos contra los polisacáridos capsulares, generaría una buena defensa contra el microorganismo.

En el caso de bacterias que producen enfermedad mediante toxinas, se pueden elaborar vacunas a partir de la atenuación de la toxina purificada, mediante formaldehído, obteniendo *toxoides* que además mantienen su actividad inmunogénica; de esta manera al introducir el toxoide en el hospedero, se pueden producir anticuerpos anti-toxoides, que son capaces de unirse a la toxina y bloquear su efecto. En estas vacunas es crucial la inactivación de la toxina para no producir daño en el hospedero pero dejando intacta la estructura del epítopo. También es necesario implementar técnicas moleculares para la producción de grandes cantidades de la toxina para su posterior purificación y atenuación.

De igual forma dentro de las vacunas de subunidades se encuentran las vacunas de péptidos sintéticos, los cuales se fabrican mediante síntesis química. Sin embargo no se han obtenido buenos resultados con estas vacunas, ya que los péptidos no son tan inmunogénicos como las proteínas y no es tan sencillo producir respuesta humoral y celular contra estos péptidos (Abbas, 2008; Kindt, 2007; Rojas-Espinosa, 2001; Fainboim & Gaffner, 2005; Kuby, 2003)

2.4 Vacunas de ADN

En este tipo de vacunación se utiliza ADN de plásmido que codifica para proteínas antigénicas. Dentro del plásmido además de ADN, se insertan promotores y terminadores de ADN para facilitar la expresión de los genes del agente patógeno de interés. Esta secuencia se inyecta directamente en el músculo del receptor. Una vez captado el ADN por las células musculares y por células dendríticas que se encuentran en la zona de la inyección, el antígeno proteínico codificado es expresado e induce una respuesta tanto de tipo humoral como de tipo celular.

Las células dendríticas son de gran importancia en este tipo de vacunas ya que al ser células presentadoras de antígeno, están más involucradas en la respuesta humoral que las células epiteliales. Se propone que una vez captado el ADN por las células del hospedero, se puede conservar de manera episomal durante periodos prolongados.

Entre las ventajas que ofrece este tipo de vacunación, se puede destacar que ofrecen una protección de tipo celular y humoral, además, la proteína que es codificada dentro del hospedero se encuentra en su forma natural, ya que no ha sido modificada para poder ser insertada, además otra de sus características es que mediante un solo plásmido se pueden expresar proteínas distintas correspondientes a diferentes microorganismos. Por otro lado una desventaja de estas vacunas es que solo pueden codificar antígenos proteicos, y existe el temor de que pudieran causar mutaciones en el genoma celular y promover autoinmunidad contra el ADN o cáncer, además de que se pudiera presentar tolerancia; sin embargo, nada de esto se ha observado en los animales en los que se prueban estas vacunas. Y por otro lado se ha reportado que en ensayos las vacunas de ADN tienen menos eficacia en humanos que en ratones (Abbas, 2008; Kindt, 2007; Rojas-Espinosa, 2001; Fainboim y Gaffner, 2005; Kuby, 2003).

2.5 Vacunas de microorganismos vivos atenuados

Las vacunas de microorganismos atenuados brindan altos niveles de protección además de una duración prolongada. La vacuna BCG, que es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, conocida como el *bacilo de Calmette- Guérin*, contra la tuberculosis es un ejemplo muy importante de microorganismos vivos atenuados.

En este tipo de vacunas, se mantiene al agente infeccioso vivo dentro del hospedero pero sin la capacidad de causar la enfermedad, aunque si mantiene su capacidad de producir una respuesta inmune. Debido a que el microorganismo se encuentra vivo se puede estar replicando constantemente dentro del hospedero, estimulando respuesta mediante la exhibición continua de sus epitopos, lo que resulta en un aumento de su inmunogenicidad y en la producción de células de memoria.

El hecho de que el microorganismo pueda seguirse replicando es de gran ventaja ya que de esta manera se evita la necesidad de refuerzos múltiples, debido a que en algunos países por los hábitos culturales, muchas personas no regresan a los centros de salud a recibir refuerzos, lo que disminuye la capacidad protectora de ciertas vacunas.

La atenuación del agente patógeno se puede realizar mediante pasajes seriados de cultivo en condiciones anormales. En el proceso de atenuación los microorganismos adquieren la capacidad de desarrollarse en condiciones no habituales, como temperaturas muy altas o muy bajas o medios muy concentrados, lo que posteriormente las hace menos eficaces para desarrollarse en las condiciones normales del hospedero.

La consideración más importante en las vacunas atenuadas, es el hecho de que la virulencia se pueda revertir; sin embargo existen técnicas moleculares en donde se eliminan selectivamente genes que son necesarios para la virulencia del patógeno, lo que impide que produzca enfermedad en el hospedero y que su virulencia regrese (Abbas, 2008; Kindt, 2007; Rojas-Espinosa, 2001; Fainboim & Gaffner, 2005; Kuby, 2003).

2.6 vacunas recombinantes

El término recombinante, se refiere a la combinación de fragmentos de ADN de diferentes fuentes biológicas que de manera natural no se encuentran juntas.

Las vacunas recombinantes consisten en microorganismos previamente atenuados, que tienen insertado un cDNA ajeno, dentro de su material genético, que codifica para la sobre-expresión de una proteína antigénica. Pueden utilizarse como microorganismos atenuados, vacunas que ya han sido aprobadas, lo que brinda una ventaja respecto al proceso de atenuación (Abbas, 2008; Kindt, 2007; Rojas-Espinosa, 2001; Fainboim y Gaffner, 2005; Kuby, 2003).

Dentro de las ventajas de las bacterias recombinantes se encuentran las siguientes: 1) el proceso de fabricación es relativamente barato y se puede producir a gran escala, 2) no se ha reportado ninguna reversión de la atenuación de cepas

recombinantes en animales inmuno-suprimidos, 3) los vectores utilizados actualmente son sensibles a antibióticos y 4) pueden ser administrados por vía oral, lo que es más práctico en un programa de vacunación mundial (Shata, et. al, 2000)

El fragmento de cDNA, puede mantenerse como plásmido, separado del ADN cromosómico, o puede ser insertado dentro del genoma de la bacteria (Dennehy y Williamson, 2005). El vector que se encuentra de manera episomal, en forma de plásmido, puede perderse por mutaciones, aunque su replicación es independiente al ADN de la bacteria, y tiene la desventaja de que su expresión es transitoria. Por otro lado el fragmento que se encuentra integrado en el genoma, es más estable, su expresión es a largo plazo y no se puede perder, pero presenta mayor probabilidad de generar mutagénesis (Singer, Yee y Nash, 1998).

Independientemente de la manera en que se tenga insertado el vector dentro de la célula portadora, finalmente la proteína antigénica es traducida y expresada por la célula viva. Una vacuna recombinante puede producir inmunidad exponiendo la proteína antigénica, ya que simula la infección natural, pero sin el riesgo de generar enfermedad en el hospedero debido a que la vacuna no presenta todos los demás mecanismos de virulencia del microorganismo.

Lo que se pretende es identificar los antígenos responsables de la atenuación de la vacuna y sobre-expresarlos para obtener una vacuna con un nivel de protección mayor. Se han investigado antígenos como ESAT-6, CFP10 y Ag85B. Aunque aún no se tienen resultados concretos, en modelos experimentales, las vacunas recombinantes han mostrado una profilaxis mayor o por lo menos igual a la BCG actual (Triccas, 2010).

Actualmente existen cepas BGC recombinantes que se encuentran en fases clínicas, como la rBCG30, desarrollada en la Universidad de California en Los Ángeles, que sobre-expresa el antígeno Ag85B que ha superado exitosamente la fase clínica I (Unnikrishnan, Rappouli y Serruto, 2012; McShane, 2011).

3. Vacuna BCG

3.1. Historia

Actualmente la única vacuna aprobada para humanos para prevenir tuberculosis es la BCG, la cual se elaboró a partir de la atenuación de un bacilo de *Mycobacterium bovis*. En 1902, Nocard aisló la bacteria de una vaca con mastitis tuberculosa, y la cultivó en un medio con papa cocida, agregado de glicerina y bilis. Posteriormente, en Francia Calmette y Guérin en el Instituto Pasteur realizaron resiembras *in vitro*, de 1908 a 1921, del aislado, efectuando pruebas en terneros y cobayos, considerando así, que su virulencia estaba atenuada pero conservaba su carácter antigénico (Liu, et. al, 2009; WHO, 2001).

El Dr. Weil Halle, el 21 de Mayo de 1921, en París, fue el primero en utilizar la vacuna BCG en un niño que presentaba alto riesgo de adquirir TB, administrándosela inicialmente por vía oral, luego subcutánea y finalmente por vía intradérmica. En 1943 se iniciaron campañas de vacunación masiva tras la segunda Guerra Mundial, como medida de urgencia en Europa, en la década de los 50's la vacuna se difundió mundialmente.

En 1960 surgió la vacuna liofilizada, la cual es secada por congelación, remplazando a la vacuna líquida y en 1974 se introdujo en el Programa Ampliado de Inmunización de la OMS, aunque Holanda y Estados Unidos no han indicado esta vacuna a nivel de programas Nacionales. Actualmente la vacuna es fabricada por distintos proveedores como vacuna BCG, y se aplica a cerca de 100 millones de recién nacidos cada año (Liu, et. al, 2009).

3.2 Atenuación

La atenuación de la vacuna se realizó mediante 230 pasajes, comprendidos de 1908 a 1921, en cultivo *in vitro*. Durante esta atenuación, la bacteria perdió la región de diferenciación (RD1). La cual comprende 9 genes que codifican una serie de proteínas, que le otorgan factores de virulencia y patogenicidad a la bacteria.

La segunda fase de atenuación inicio en 1924 con la distribución de la BCG por todo el mundo, para 1927, al menos 60 países habían ya recibido cultivos de la vacuna

y cada laboratorio la propagaba bajo diferentes condiciones, lo que llevo a segundas atenuaciones de la cepa, obteniendo distintas clases de BCG con diferentes niveles de atenuación (Liu, et. al, 2009).

Actualmente no existe una producción estandarizada de la vacuna BCG entre fabricantes y más del 90% de las vacunas utilizadas a nivel mundial se elaboran a partir de 5 cepas con características diferentes, las cuales comprenden: la cepa danesa 1331, la cepa Pasteur 1173 P2, la cepa Glaxo 1077, la cepa Tokio 172-1, la BCG –I Rusa y las cepas Moreau RDJ (OMS, BCG, 2012).

3.3 Aplicación

La aplicación de la BCG según la OMS es mediante la vía intradérmica con jeringa y aguja estéril. Se aplica una dosis de 0.1 ml en recién nacidos o lo más cercano al nacimiento, también puede aplicarse a niños hasta los 14 años de edad, que no hayan recibido la vacunación (Secretaria de Salud; 2013)

3.4. Efectos Adversos

Los efectos adversos de la vacuna son pocos y raros, a pesar de que se usa ampliamente a nivel mundial. Entre los eventos adversos leves, la mayoría de los vacunados presenta un reacción en el sitio de aplicación de la vacuna que se puede observar como una pápula, la cual aparece 2 o más semanas después de aplicada la vacuna y se observa enrojecida, indurada y sensible, puede ulcerarse 2 a 5 meses después, dejando una cicatriz superficial (OMS, BCG, 2012).

Dentro de los eventos adversos severos, se pueden presentar locales o sistémicos, dentro de los primeros se ha observado, linfadenitis, supuración, absceso localizado y cicatriz que loide aunque son muy raros ya que se presentan en 1 de cada 1,000 a 10,000 vacunados.

Dentro de los sistémicos lesiones cutáneas, Osteitis, reportados 1 por cada 3,333x10⁸ vacunados BCG generalizada (generalmente en pacientes inmunocomprometidos) en 1 por cada 230,00-640,000 de vacunados y Síndrome de reconstitución inmune, que se manifiesta como abscesos localizados o

linfadenitis regional generalmente sin diseminación., los cuales se han reportado 1 por cada 640,000 individuos que han recibido la vacuna (OMS, BCG, 2012).

3.5. Nivel de protección

A pesar de las ventajas de la BCG, como lo son el que sea relativamente barata, que sus efectos adversos sean raros y que binde protección de TB miliar, pulmonar y meníngea en niños, su nivel de protección en adultos es muy variable y está muy lejos de ser la vacuna ideal.

En los años de 1927 a 1968 se realizaron 21 estudios controlados sobre la eficacia de la vacuna BCG, utilizando para ello vacunas diferentes, evaluando finalmente 19 países, demostrando una protección extremadamente variable, de 0 a 80% (OMS, la vacuna antituberculosa, 2001; Castillo-Rodal, et. al, 2006)

En América del Norte y el norte de Europa se reportaron las tasas de protección más altas, que van del 60 a 80%, y en regiones tropicales se observa una protección baja o nula; por ejemplo se reportó una protección de 77% tras una vacunación en Inglaterra, mientras que en el sur de la India la misma cepa, Copenhagen, produjo una protección del 0% y en Estados Unidos, la cepa Tice de BCG que se utilizó indujo tasas de protección de los vacunados que van del 0 al 75%. También la duración de la protección es variable, y disminuye gradualmente transcurridos 10 y 20 años de la aplicación (OMS, la vacuna antituberculosa, 2001).

En un estudio realizado en 2005, se evaluó la capacidad protectora de 10 diferentes sub-cepas de BCG, las cuales fueron, Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught, Tice, Denmark, México, Birkhaug, Sweden y la cepa Moreau, en donde se vacunaron ratones Balb/c y posteriormente se retaron con la cepa H37Rv. En el estudio se demostró que la sub-cepa BCG Phipps brindo la mejor capacidad protectora, ya que presentó la menor concentración bacilar en pulmones y el menor porcentaje de área neumónica, entre otras características (Castillo-Rodal, et. al, 2006).

Las posibles explicaciones a estas diferencias en las respuestas de la BCG pueden ser diferencias en el diseño de estudio, el diferente grado de atenuación de las cepas aplicadas, y la exposición a micobacterias ambientales de individuos que

viven en climas fríos y de los que viven en climas calientes. Esta exposición a micobacterias ambientales puede inducir una protección similar a la de la BCG, lo cual provoca que la vacunación no mejore el nivel de protección existente (Liu, et. al, 2009)

Debido a lo anterior, se han propuesto nuevos candidatos de vacuna anti-tuberculosa, tanto para la enfermedad pulmonar como para la diseminada.

3.6. Nuevos candidatos vacúnales

Para la implementación de una nueva vacuna contra la tuberculosis, se requiere que esta induzca un alto nivel de inmunidad celular. Células T CD4+, junto con citocinas de respuesta Th1, como interferón gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), son necesarias para una inmunidad protectora. A pesar de ello, en estudios clínicos se ha observado que IFN γ es necesario pero no suficiente para generar una protección, por lo que se requieren nuevas estrategias para generar una protección más eficiente, con una vacuna más inmunogénica (McShane, 2011).

Actualmente, gracias a la ingeniería genética se tienen nuevas estrategias en la construcción de vacunas contra la tuberculosis. Existen vacunas en fases clínicas que están fabricadas a partir de la atenuación de *Mycobacterium tuberculosis*, de BCG recombinantes y de adyuvantes que aumentan la inmunogenicidad de la BCG actual (McShane, 2011). En 2011, 12 candidatos a vacunas habían alcanzado llegar a fases clínicas, sin embargo solo una logró llegar a fase III, y por el momento se cuentan con varios candidatos en fases pre-clínicas que pudieran ser la nueva generación de candidatos (Kaufmann, 2011).

De los más de 4000 antígenos codificados en el genoma de *M. tuberculosis*, se tienen en estudio no más de 10 antígenos como candidatos vacunales (Bocanegra-García. Et. al, 2011). Dentro de estos antígenos protectores se encuentran el antígeno Ag85A y Ag85B, que son proteínas de unión a fibronectina, ESAT-6, que es el antígeno de secreción temprana, CFP-10, que se conoce como antígeno filtrado de cultivo, TB10-4, conocido como proteína de bajo peso molecular y HBHA

también llamada hemaglutinina de unión a heparina. Todos ellos presentes en *M. tuberculosis* y en BCG a excepción de ESAT-6 Y TB10-4 que no se encuentran en BCG (Kaufmann, 2011).

4. HBHA (*Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin*)

La proteína HBHA, Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin es una proteína de superficie de 21 kDa, formada por 198 residuos organizados en 4 dominios. Debido a que es una hemaglutinina, tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos, además, está involucrada en la agregación celular de la micobacteria y en la diseminación extra pulmonar del bacilo tuberculoso. Se ha encontrado en micobacterias patógenas como *M. leprae*, *M. tuberculosis* y *M. avium*, sin embargo no se ha observado en micobacterias saprofitas como *M. smegmatis* (Menozzi, 1996).

Dentro de los 4 dominios de la proteína, el primero se denomina *dominio transmembranal*, que comprende del residuo 5 al 18 de la cadena proteica. Este dominio es rico en leucinas, y tiene la función de fijarse a la parte externa de la capa lipídica de la superficie de la micobacteria (Lebrun, et. al, 2012).

Seguido del dominio trans-membranal continúa el segundo dominio que va del residuo 24 al 109, y es llamado *dominio de espiral*. Éste es el responsable de la agregación de las micobacterias, debido a la formación de uniones HBHA-HBHA, lo cual es un mecanismo de patogenicidad, ya que tanto *in vivo* como *in vitro*, los bacilos forman conglomerados o agregados bacterianos que permiten la colonización al formar masas densas bacilares, que a diferencia de un solo bacilo, los agregados pueden invadir mejor las células hospederas, además de esta manera impiden que sustancias químicas como antibióticos puedan penetrar a ellos y así evitar ser destruidos. También se sugiere que la agregación le permite a las micobacterias poder adherirse a las células epiteliales (Lebrun, et. al, 2012; Delogu y Brennan, 1999; Esposito, et. al, 2010).

Existen enzimas naturales dentro del hospedero que son capaces de degradar a la proteína HBHA, por lo que como mecanismo de defensa, la micobacteria se metila en el N-terminal de este dominio de espiral, por metiltransferasas que posiblemente

se encuentren en la pared del bacilo. La metilación le brinda a la proteína la capacidad de evitar ser degradada, aunque por otro lado, esta metilación es la responsable de la inducción de la respuesta inmune, ya que en ensayos experimentales, donde se prueban proteínas HBHA no metiladas, se observa una diferencia muy significativa en la producción de INF γ , TNF α , y anticuerpos, la cual se ve muy disminuida en proteínas que no presentan el dominio metilado (Temmerman, et. al, 2004).

Después del dominio de espiral continua un siguiente dominio denominado *dominio de unión*, que va del residuo 110 al residuo 159, y hasta ahora se sabe que su única función es la unión del dominio de espiral con el dominio más externo de la proteína el cual se denomina *dominio de unión a heparina*. Este último dominio está involucrado en la adherencia de la micobacterias con células no fagocitas y a componentes de la matriz extracelular, lo que a su vez propicia la diseminación extra pulmonar del bacilo (Lebrun et. al, 2012)

El dominio de unión a heparina va del residuo 160 al 198 y es rico en aminoácidos como alanina, prolina, y lisina principalmente, los cuales le dan características catiónicas (Menozzi, et. al, 2006). Se sugiere que la unión a células epiteliales se da mediante fuerzas electrostáticas entre el dominio catiónico rico en lisinas y los grupos sulfato de los glicosaminoglicanos que se encuentran la superficie de las células no fagocíticas, como el heparán sulfato principalmente.

Este dominio rico en lisinas ha sido de gran importancia para comprender ciertos mecanismos de *M. tuberculosis*. Se ha demostrado que el bacilo se multiplica mejor dentro de células epiteliales que dentro de células fagocíticas, por lo que esta unión entre el dominio catiónico y las células epiteliales resulta interesante.

Se observó que una vez que el bacilo se adhiere a las células, los filamentos de actina del citoesqueleto, se reorganizan, lo cual es similar a lo que sucede en otras bacterias intracelulares y se sugiere que una vez que sucede la reorganización, se puede inducir la endocitosis del bacilo al interior de la célula hospedera (Menozzi, et. al, 2006).

En un experimento en donde cubrían partículas de oro con la proteína HBHA purificada, se observó que HBHA es la única responsable de la diseminación de la micobacteria. Estas partículas cubiertas de la proteína se colocaron *in vitro*, en células fagocíticas de humano, y en células de la barrera hemato-encefálica de bovino y encontraron mediante micrografías de transmisión electrónica, que las partículas de oro penetraban el interior de las células y cruzaban al otro lado de la capa celular. Lo que sugiere que HBHA está también involucrada en la diseminación extra pulmonar, produciendo tuberculosis cerebral, ya que es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (Menozzi, et. al, 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la única vacuna aprobada para prevenir la tuberculosis es la BCG la cual ha sido utilizada durante los últimos 92 años, ofreciendo un nivel de protección de corta duración, y una eficacia que varía del 0 al 80%. Debido a ello es interesante la posibilidad de probar una vacuna recombinante que sobre-exprese la proteína HBHA, la cual teóricamente sería una vacuna mejorada más eficiente para prevenir la tuberculosis pulmonar y podría ofrecer un nivel de protección mayor a la BCG actual.

Gracias a la colaboración con el Dr. Mario Alberto Flores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), quien construyó dos vacunas BCG recombinantes, que sobre-expresan la proteína HBHA. La vacuna denominada "261", que presenta el plásmido pmV261, de manera episomal y la vacuna denominada "361", que contiene el cDNA de la proteína integrado en el genoma de la bacteria. Se evaluará su eficacia en ensayos de protección en un modelo murino de TB pulmonar.

HIPÓTESIS

La vacuna BCG recombinante que sobre-expresa el antígeno hemaglutinina asociado a heparina (HBHA) inducirá un nivel mayor de protección que la conferida por la BCG actual, para prevenir tuberculosis pulmonar en un modelo murino con una cepa de mediana virulencia y con una cepa hipervirulenta.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el grado de atenuación y el nivel de protección de las vacunas recombinantes 261 y 361 que sobre-expresan el gen que codifica al antígeno HBHA en un modelo murino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la sobrevivencia en ratones Balb/c singénicos de 8 semanas vacunados con las vacunas recombinantes, 261 y 361 e infectados con las cepas H37Rv y 5186.
- 2.- Establecer el nivel de protección conferido por las vacunas recombinantes en ratones machos Balb/c singénicos de 8 semanas retados con la cepa de referencia H37Rv y con la cepa hipervirulenta 5186, mediante carga bacilar y porcentaje de neumonía.
- 3.- Determinar el grado de atenuación de las vacunas recombinantes, en ratones desnudos nu/nu de 8 semanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

A.- Diseño

Tipo de estudio:

Experimental, retrospectivo, prospectivo, longitudinal y comparativo.

Criterios de inclusión:

Ratones Balb/c singénicos machos de 6 a 8 semanas
ratones nu/nu

Criterios de exclusión:

Ratones enfermos, menores o mayores a 8 semanas.

Criterios de eliminación:

Ratones que se han peleado y con colas y piel mordida.

B.- Universo

96 ratones singénicos Balb/c machos de 8 semanas de edad.

24 ratones desnudos *nu/nu* de 8 semanas de edad.

C.- Variables

Dependiente: profilaxis de la enfermedad

Independiente: vacunas BCG recombinantes

D.- Técnicas

1.- Preparación de las vacunas 261 y 361, y preparación de las cepas H37Rv y 5186

1.1.- Verificación de la pureza de las cepas y las vacunas

Para verificar la pureza de las cepas se realizó una tinción con Ziehl-Neelsen. Se tomó una asada de la cepa en medio líquido Bacto Middle brook 7H9 (laboratorios difco, Deroit MI) enriquecido con ADC (albúmina, dextrosa y catalasa) y se depositó en un portaobjetos limpio. Se fijó con fenol al 5% en metanol, todo esto dentro de una campana de bioseguridad nivel III. Posteriormente cuando las muestras

estaban secas se irradiaron con luz UV y se fijaron nuevamente por calor con mechero.

Para la tinción, se dejaron 15 minutos dentro de un vaso coplin con fucsina fenicada previamente filtrada. Después de esto se lavó con agua corriente y se le adicionó a cada laminilla acido- alcohol hasta obtener un frotis transparente. Posteriormente se volvieron a colocar las laminillas en un vaso coplin pero esta vez con azul de metileno previamente filtrado, durante 2 minutos y se prosiguió a lavar nuevamente con agua corriente.

Se dejaron secar las laminillas y se montaron con resina.

Finalmente se observaron al microscopio en el objetivo de 100x, con aceite de inmersión.

1.2.- Curva de crecimiento de las cepas y las vacunas

La cepa de referencia H37Rv, la cepa hipervirulenta 5186 y las vacunas 261 y 361 se crecieron de la misma manera en medio 7H9, el cual se preparó pesando 4.7g de polvo en 900 ml de agua destilada adicionando 5 ml de glicerol y 0.05% de tween 80, posteriormente a su preparación se esterilizó en autoclave por 10 minutos a 121 lb de presión y se dejó enfriar. Una vez estéril, dentro una campana de bioseguridad nivel III (Forma Class II A2, Thermo Electro Corp.), limpia y esterilizada con luz UV durante 10 minutos, se le adiciono al medio, 100 ml de medio de enriquecimiento ADC, que contiene albúmina, catalasa, y dextrosa (Becton, Dickinson y Compañía, Sparks, MD), se mezcló perfectamente y el medio liquido final se fraccionó en botellas (Corning) con cuello angulado y tapa con filtro, y se colocaron en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas, para realizar prueba de esterilidad.

Una vez que el medio se mantuvo estéril, se prepararon botellas de crecimiento donde se colocaron 500 µl de bacteria por cada 8 ml del medio, en botellas de cultivo (Corning), dentro de la campana de bioseguridad. Las botellas se colocaron en una incubadora durante 48 horas en agitación constantes a 35°C. Posteriormente se colocaron 4 ml de la bacteria previamente incubada en botellas de cultivo con 60 ml de medio 7H9 estéril y se tomaron lecturas de absorbancia

diariamente, en un espectrofotómetro a 600 nm hasta obtener una D.O de 0.6 llegando la fase logarítmica de crecimiento bacteriano.

1.3.- Pre-cultivo y escalamiento de cultivo de las cepas y las vacunas

Después de obtener una D.O. cercana a 0.6, se procedió a recuperar la bacteria en una campana de bioseguridad nivel III; se colectó el contenido de las botellas en tubos cónicos de 50 ml (Falcon BD), nuevos y estériles. Se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y al botón bacteriano se le agregaron 2ml de perlas de vidrio de 3 mm de diámetro estériles y 15 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfatos)- Tween 80 al 0.05%. El tubo con perlas se agitó en un Vortex® durante un minuto por un minuto de reposo y se repitió el ciclo de agitación y reposo 5 veces. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se recolectó en un tubo cónico nuevo y estéril. Estos últimos tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El botón que contenía a las bacterias se resuspendió y se le agregó PBS el cual se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm a 4°C para eliminar el Tween. Finalmente se desechó el sobrenadante y se realizó un último lavado con solución salina estéril, centrifugando a 2500 rpm y desechando el sobrenadante, pero esta vez el botón micobacteriano se resuspendió en 15 ml de solución salina.

Una vez teniendo a las micobacterias disgregadas en solución salina, se realizaron alícuotas en criotubos estériles de 1.5 mL. A cada tubo se le agregó 1 mL de la suspensión de bacterias teniendo 15 tubos del preparado, con un tubo inicial, uno medio y un final, se cerraron los tubos perfectamente y se colocaron en nitrógeno líquido para posteriormente guardarlos a -70°C.

1.4.- Titulación de las cepas y las vacunas por UFC

Después de 24 horas de congelación los tubos, inicial, medio y final se descongelaron gradualmente a -20°C, después a 4°C y finalmente se terminaron de descongelar dentro de la campana de bioseguridad nivel III a temperatura ambiente donde se realizó la titulación del nuevo lote de bacterias. Para el cual se realizaron

diluciones seriadas y se sembraron en medio 7H10, se incubaron durante 14 días, día en el cual se hizo un conteo preliminar del número de colonias el resultado final se obtuvo hasta el día 21, cuando se obtuvo la cuenta total de UFC's por ml.

2.- Vacunación de ratones

Se vacunaron vía subcutánea 96 ratones singénicos Balb/c, machos de 8 semanas. Se dividieron en 4 grupos de 24 ratones recibiendo un tratamiento diferente cada uno. El primer grupo recibió la vacuna 361, el segundo grupo la vacuna 261, el tercer grupo recibió la vacuna *BCG Phipps*, y el último grupo que fue el testigo recibió solución salina estéril. Las vacunas se inocularon vía subcutánea en la base de la cola. Se inyectaron con una jeringa de insulina con 50 µL de la vacuna disuelta en solución salina estéril.

3.- Reto con las cepas H37Rv y 5186

Un día antes de la infección se eligió al azar uno de los criotubos a -70°C y se llevó a -20°C. El día de la infección se pasó a 4°C y se terminó de descongelar dentro de la campana de bioseguridad nivel III a temperatura ambiente. Se realizó la dilución en solución salina estéril, en base a la cuenta del control de calidad para tener un concentración final de 250,000 UFC's por cada 100 µL de preparado. Esta última dilución se sembró de igual manera en cajas con medio 7H10 para el control de calidad. El volumen restante se utilizó para la infección de los ratones.

El grupo de 24 ratones vacunados con la cepa 361 se dividió a la mitad. 12 ratones recibieron la cepa H37Rv y los otros 12 restantes recibieron la cepa 5186.

Los ratones fueron anestesiados con sevofluorano. Posteriormente cada ratón anestesiado se colocó en una cama de la cual se le sujetaron los dientes superiores y se le introdujo una cánula por la tráquea para inocular 100µL de la bacteria respectiva para cada grupo. Los ratones infectados y recuperados de la anestesia se colocaron en cajas las cuales contenían grupos de 12 ratones.

Se realizó el mismo procedimiento para el grupo de los ratones vacunados con 261, *BCG Phipps*, y para los que recibieron *solución salina*.

Las cajas fueron colocadas en microaisladores conectados a un sistema de presión negativa. A partir de este momento se determinó la sobrevivencia de los ratones.

Todos los procedimientos fueron realizados dentro de una campana de bioseguridad nivel III.

4.- Sacrificio

A los 2 meses pos infección se sacrificaron 6 ratones de cada grupo y a los 4 meses pos infección se sacrificó el resto de los ratones. El sacrificio se realizó dentro de una campana de bioseguridad nivel III, por exsanguinación y anestesia con éter.

5.- Determinación de la carga bacteriana (UFC's)

Se tomó el pulmón izquierdo de los animales sacrificados y se colocó inmediatamente en nitrógeno líquido. Los pulmones fueron conservados a -70°C hasta su uso.

Para la determinación de la carga bacteriana los pulmones se descongelaron y se homogeneizaron con un politrón (Kinematica, Luzern, Suiza) en criotubos estériles y con un volumen de final de 1 mL de PBS-Tween 80 al 0.05%. Se realizaron diluciones seriadas de los tubos homogeneizados y se sembraron por duplicado en placas Petri con medio 7H10 y enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa. La cuenta del número de colonias se realizó a los 14 y 21 días después del sembrado.

6.- Preparación del tejido pulmonar para el estudio histológico y morfométrico

Para el estudio histológico, el pulmón derecho de cada ratón sacrificado, se fijó por perfusión intratraqueal con etanol absoluto. Posteriormente el tejido se deshidrató mediante tres pasajes por alcoholes, tres por xiloles, para finalmente ser embebidos en parafina. Una vez obtenidos los bloques, se cortaron en un micrótopo (*Leica, Microtome, RM2145*) dejando cortes de 4 micras de espesor, los cuales se montaron en portaobjetos limpios y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

El porcentaje del área del pulmón afectada por neumonía se midió utilizando un analizador de imágenes (*Q Win Leica, Milton Keynes, UK*) y la medición se realizó en micras cuadradas.

7.- Ensayo de atenuación

Se vacunaron grupos de 8 ratones desnudos *nu/nu* de 8 semanas de edad con las vacunas *261*, *361* y *BCG Phipps* para cada grupo. Se inocularon 8000 UFC's de cada vacuna en un volumen de 50µL por vía intradérmica en la base de la cola. Los ratones vacunados se colocaron en micro aisladores en un sistema de presión negativa (*Micro-VENT mouse Rack, Allentown. U.S.A.*) y se determinó la sobrevida durante 4 meses.

E.- Análisis estadístico

Para la determinación de la carga bacteriana (UFC's) y para el porcentaje de neumonía se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA), y la prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos. Para las curvas de sobrevida se utilizó la prueba Kaplan-Meyer. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

A. Determinación de sobrevida

Para la determinación de la sobrevida, se utilizaron 4 grupos de ratones vacunados e infectados con 12 ratones para cada grupo.

La figura 1 muestra la sobrevida de los ratones vacunados y retados con la cepa H37Rv. Todos los grupos sobrevivieron hasta los 4 meses post-reto, incluyendo el grupo de solución salina. La diferencia de sobrevida entre los grupos retados con esta cepa, no es significativo, ya que el porcentaje de sobrevida entre todas las vacunas está en un rango del 70 al 100 %, lo que implica la pérdida de 1 o 2 animales, que bien pudieron morir por alguna otra causa. Todos los animales se sacrificaron a los 4 meses post-reto, en donde concluyó el ensayo de sobrevida.

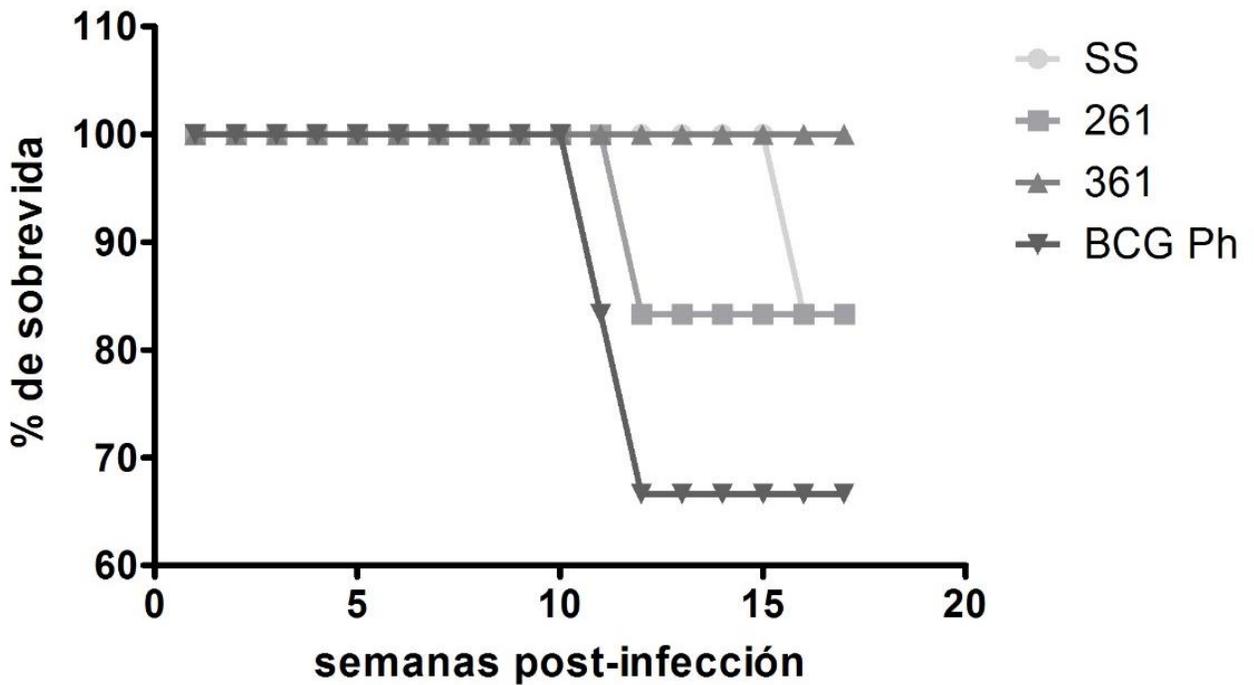


Figura 1. Sobrevida de los animales vacunados con 261, 361, BCG Phipps y el testigo de solución salina retados con la cepa H37Rv; Todos los grupos sobrevivieron hasta los 4 meses post-reto incluyendo el grupo de solución salina.

La sobrevivencia de los animales retados con la cepa 5186 (Figura 2), muestra que las vacunas 361 y 261 presentan el mismo comportamiento, en donde todos los ratones estaban muertos antes de los 4 meses post-reto, sin embargo ambas vacunas superaron el número de sobrevivientes de los animales que no recibieron vacuna, los cuales presentaban una sobrevivencia de 0% antes de los 2 meses post-reto. El grupo de BCG Phipps presentó un solo sobreviviente para el sacrificio de 4 meses.

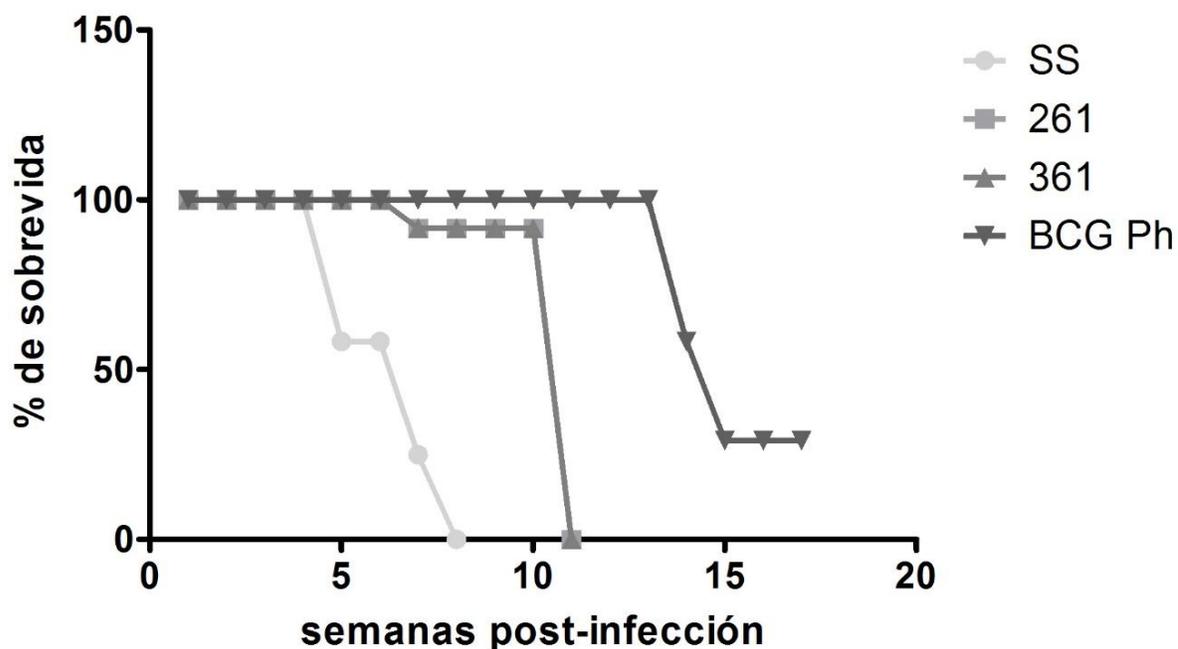


Figura 2. Sobrevivencia de los animales vacunados con 261, 361, BCG Phipps y el testigo de solución salina retados con la cepa hipervirulenta 5186; Las vacunas 261 y 361 presentaron el mismo comportamiento, sin embargo no llegaron a los 4 meses.

B. Determinación de la carga bacteriana (UFC's)

La carga bacteriana se determinó en pulmones de ratones sacrificados a los 2 y a los 4 meses post-infección, con las cepas H37Rv y 5186. La carga bacilar de los animales infectados con la cepa de referencia H37Rv a los 2 meses después de la infección, (Figura 3) muestra una diferencia significativa entre las vacunas en comparación con el testigo de solución salina. Las vacunas 261 y 361 así como

BCG Phipps, presentan menos de 2 millones de UFC's por pulmón, y no se observan diferencias relevantes entre estas tres.

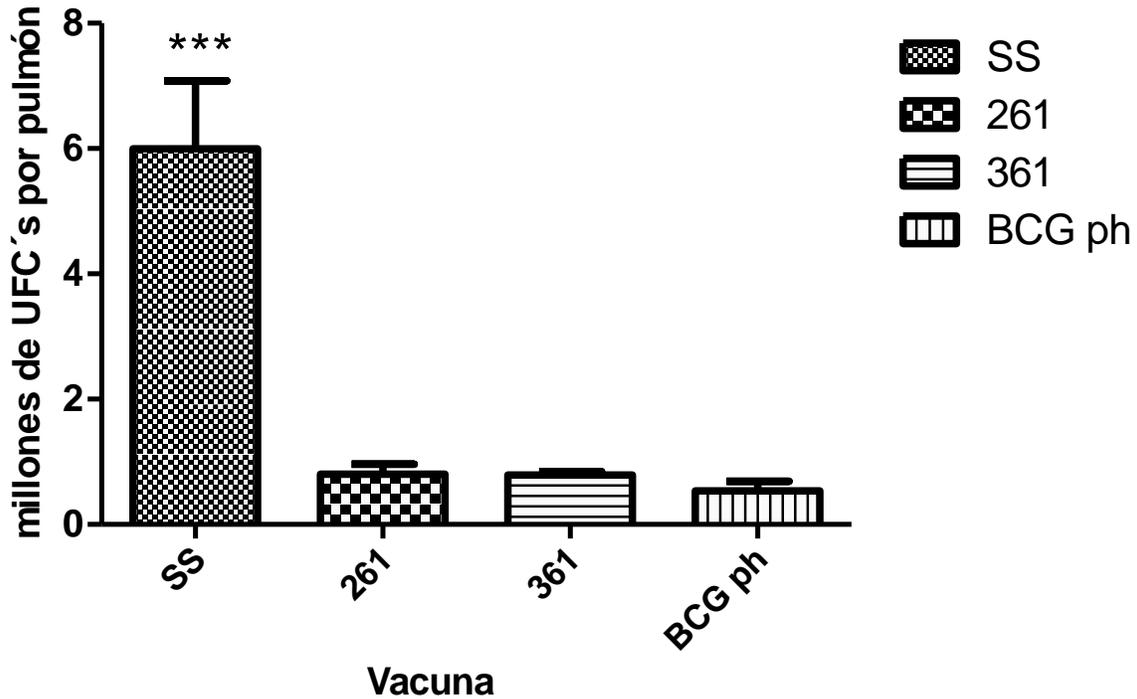


Figura 3. Carga bacteriana en pulmones, con la cepa H37Rv a los 2 meses post-infección
 *** $p < 0.05$ respecto a todos los grupos; Las vacunas 261, 361 y BCG Phipps, presentaron menos de 2 millones de UFC's por pulmón y no se observan diferencias significativas entre las 3 vacunas.

A diferencia de la Figura 3, de 2 meses post-reto, a los 4 meses post-infección, si se presentaron diferencias relevantes entre las vacunas (Figura 4), además de que los resultados son coherentes con la sobrevida de esta cepa. Las recombinantes 261 y 361 disminuyeron el número de UFC's con respecto al tiempo anterior de sacrificio (2 meses post-reto), ya que ambas vacunas presentaron menos de 2 millones de UFC's por pulmón; y por otro lado BCG Phipps incremento el número de UFC's, incluso superando los 2 millones por pulmón. Lo cual indica que si bien BCG Phipps presenta una buena protección a los 2 meses post-reto, no brinda una

memoria inmunológica tan prolongada, algo que si se observó con las vacunas evaluadas 261 y 361.

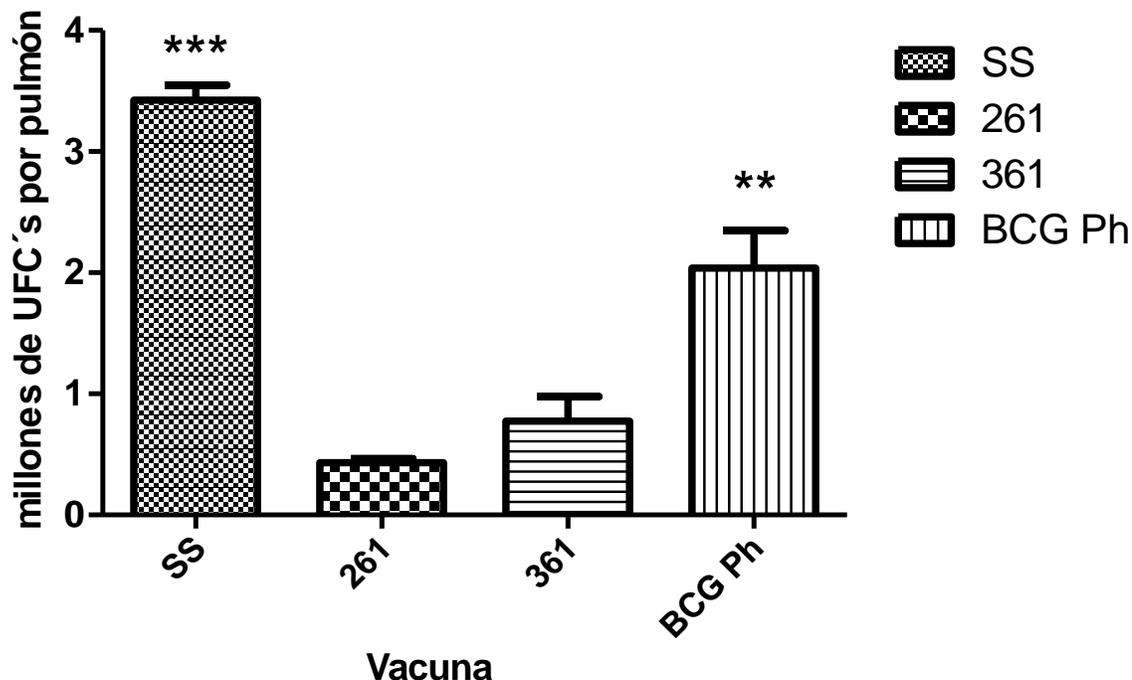


Figura 4. Carga bacteriana en pulmones, con la cepa H37Rv a los 4 meses post-infección.
 *** $p < 0.05$ respecto a todos los grupos.
 ** $p < 0.05$ respecto a 2 grupos (261 y 361); Las vacunas 261 y 361 disminuyeron el número de UFC's por pulmón para este tiempo, presentando una menor carga bacilar que BCG Phipps.

Con la cepa 5186, que es una cepa hipervirulenta, a los 2 meses después de la infección (Figura 5), se observó una menor carga bacilar en los ratones vacunados con 361 siendo esta menor a 4 millones de UFC's por pulmón y superando significativamente a la de los ratones vacunados con 261 que fue mayor a 20 millones de UFC's por pulmón. La vacuna 361 supero incluso la carga bacilar de la vacuna *BCG Phipps*, la cual presentó una cuenta de 16 millones de UFC's por pulmón, a pesar de haber presentado la mayor sobrevida con respecto a los otros grupos. Lo anterior indica que la vacuna 361 brinda una buena protección incluso frente a una cepa de mayor virulencia.

Con esta cepa hipervirulenta, 5186, no se tienen resultados del testigo con solución salina, ni del tiempo de 4 meses post-reto, ya que los animales de los diferentes grupos no lograron sobrevivir.

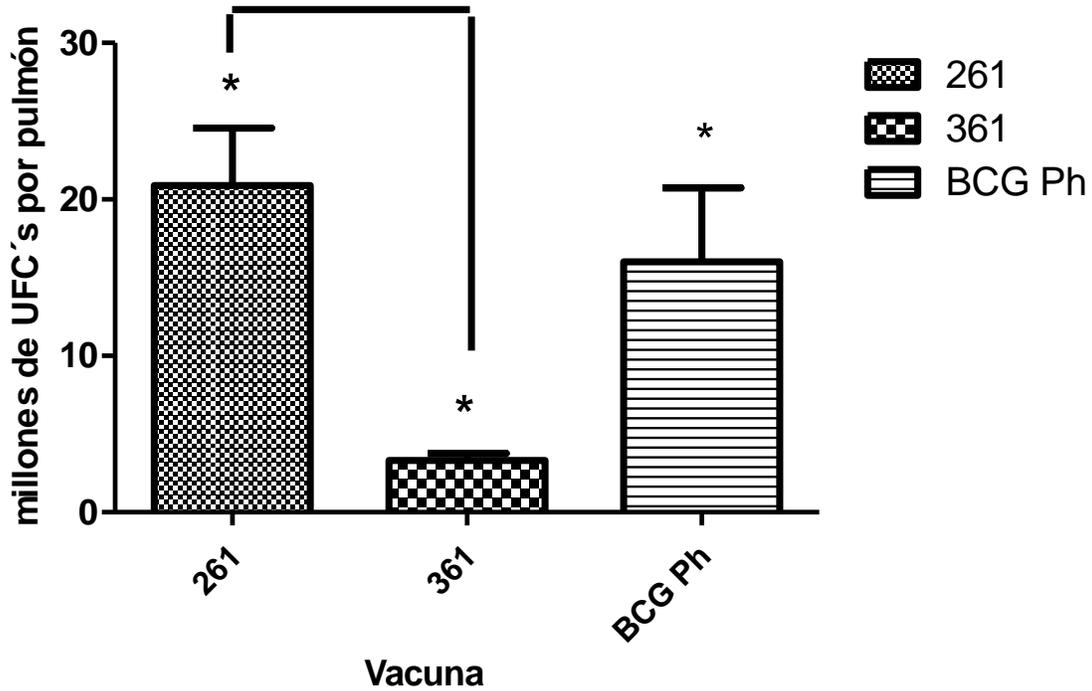


Figura 5. Carga bacteriana en pulmones, con la cepa 5186 a los 2 meses post-infección.

* $p < 0.05$ respecto a un grupo

* $p < 0.05$ con respecto a 361; con prueba T de student; La vacuna 361 presentó significativamente una menor carga bacilar con respecto a la vacuna 261 y con respecto a BCG Phipps.

C. Determinación del porcentaje de neumonía

El porcentaje de neumonía con la cepa H37Rv a los 2 meses post-infección, como se puede ver en la gráfica de la Figura 6, no muestra diferencias significativas en los grupos, ya que las tres vacunas, 361, 261 y BCG Phipps, presentan una buena protección en cuanto áreas neumónicas, que va del 7% para 361 a 14% para BCG Phipps, aunque se puede distinguir que la vacuna 361 es ligeramente más efectiva que las demás vacunas.

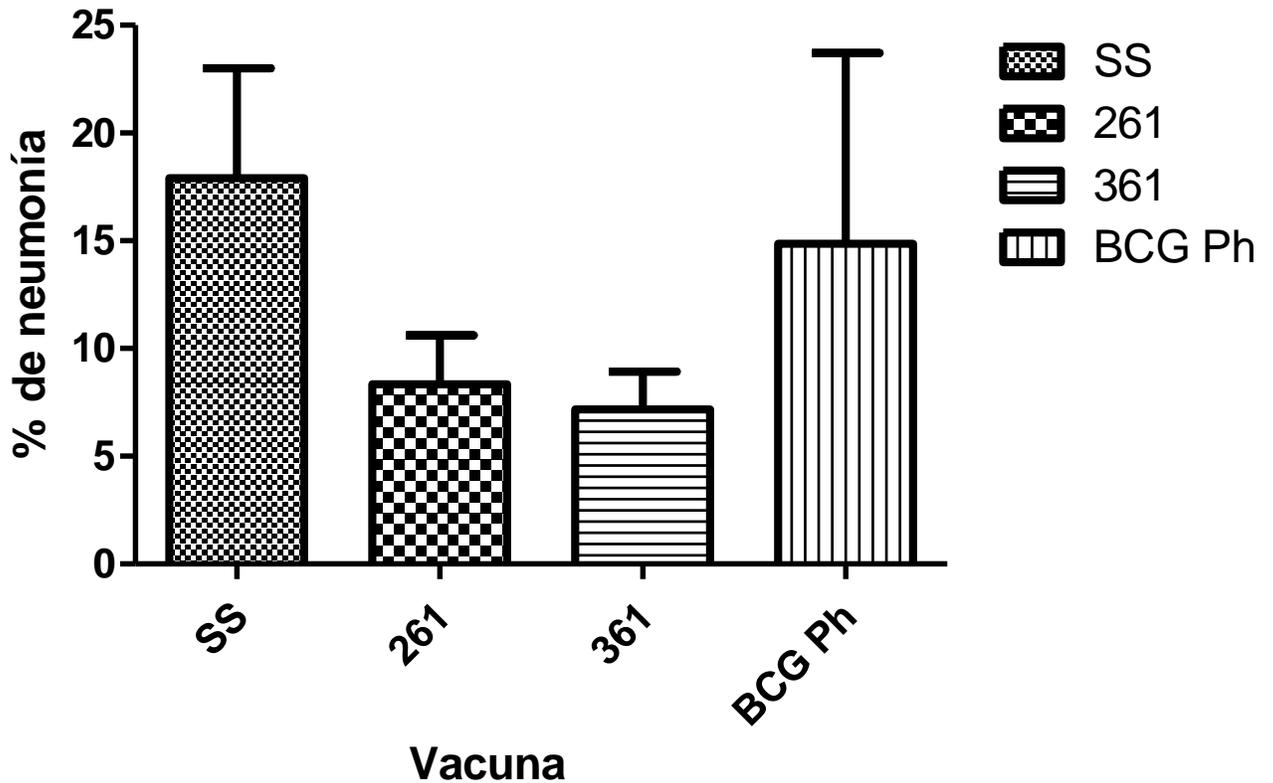


Figura 6. *Porcentaje de neumonía, con la cepa H37Rv a los 2 meses post-infección; No se observaron diferencias significativas entre los grupos, aunque se puede observar que la vacuna 361 ligeramente presenta un menor porcentaje de neumonía.*

A pesar de lo anterior, y en similitud con los resultados de la carga bacilar, a los 4 meses post-reto con la cepa H37Rv, la vacuna BCG phipps, aumenta el porcentaje de área neumónica incrementando a más de 28%, mientras que la vacuna 361 para este tiempo brinda un porcentaje menor a 7%, lo cual comprueba la corta memoria inmunológica que brinda la BCG Phipps.

Por otro lado, la vacuna 261, si bien supera la disminución de áreas neumónicas brindada por BCG Phipps, no supera la conferida por 361. Lo cual hace una distinción entre el nivel de protección conferido por las dos vacunas evaluadas.

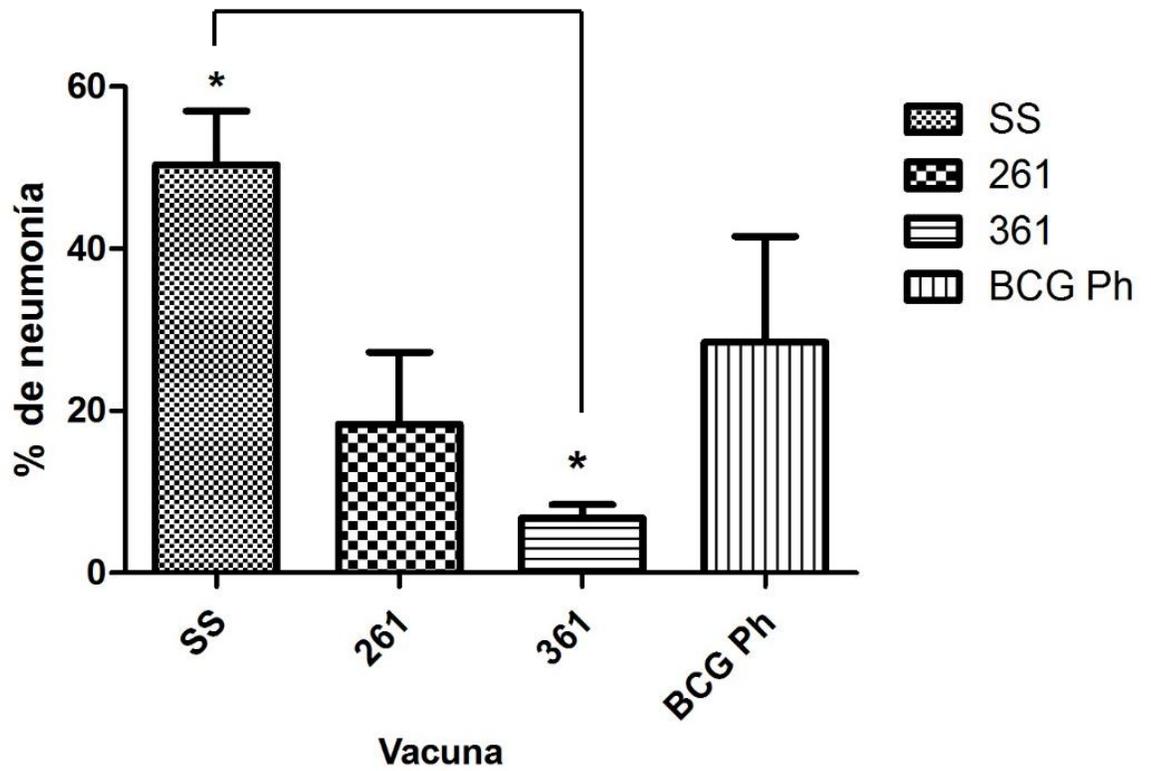


Figura 7. Porcentaje de neumonía de los ratones infectados con la cepa H37Rv a los 4 meses post-infección. La vacuna 361 presenta un menor porcentaje de neumonía respecto a los otros grupos.

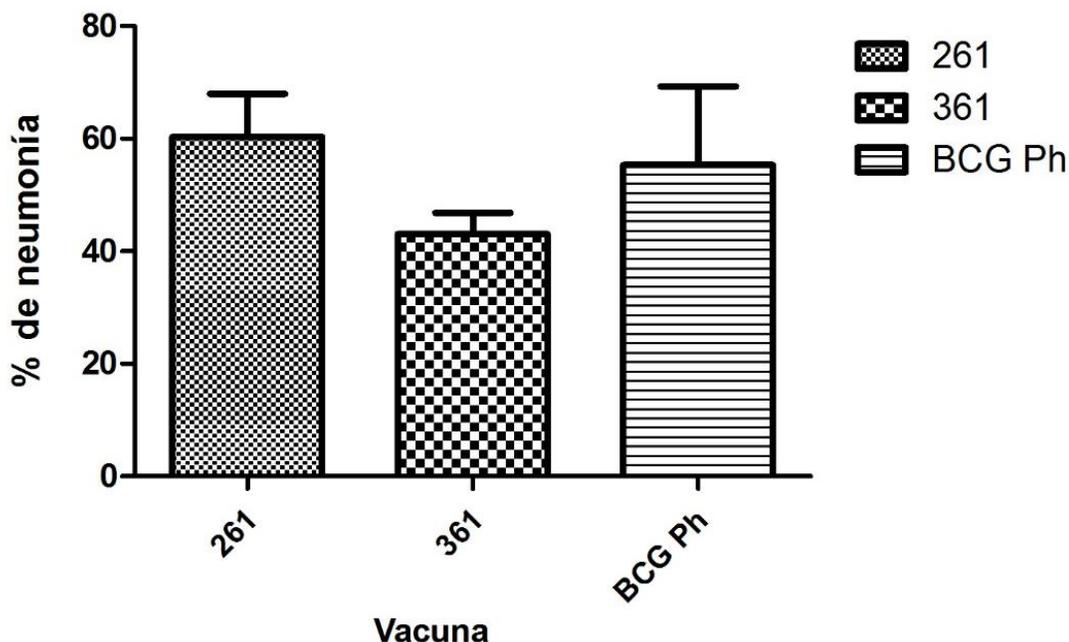


Figura 8. Porcentaje de neumonía de los ratones infectados con la cepa 5186 a los 2 meses post-infección; no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

En el porcentaje de neumonía con la cepa 5186 a los 2 meses post-reto, si bien no se observan diferencias significativas entre los grupos, se puede observar una tendencia con respecto a la carga bacilar, ya que entre las 3 vacunas, 361 se observa ligeramente menor en la gráfica, presentando un porcentaje por debajo del 50%, mientras que la vacuna BCG Phipps y 261, superan el 50% de áreas neumónicas por pulmón.

D. Ensayo de atenuación

La vacuna 361 presentó un grado de atenuación significativamente mayor al observado con la vacuna BCG Phipps, los cuales empezaron a morir a la semana 16 y para la 18 no había ningún sobreviviente. Los animales de la vacuna 361 se mantuvieron vivos incluso después del corte del experimento (24 semanas).

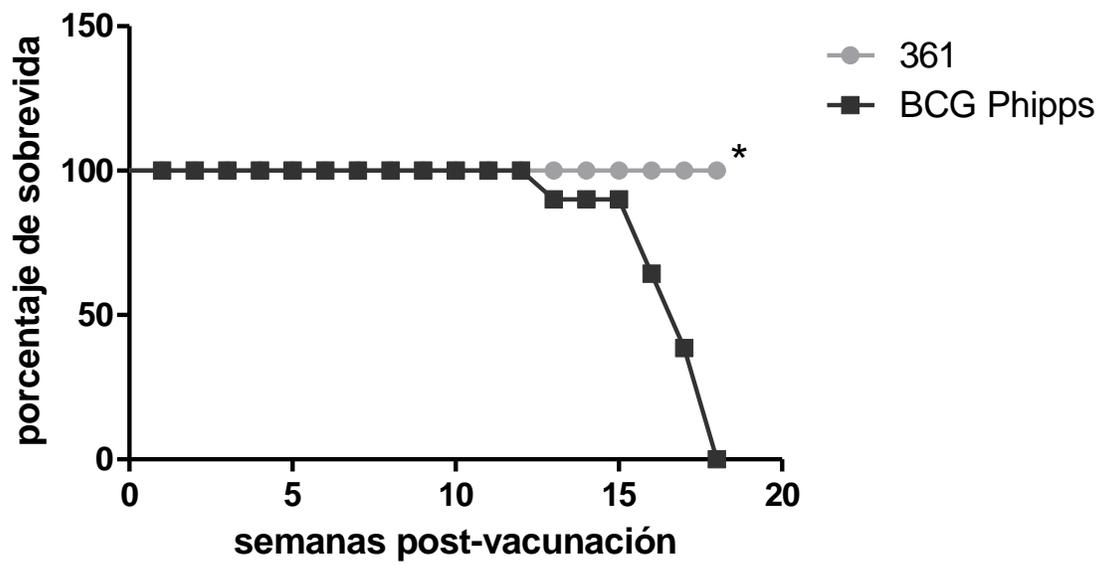


Figura 9. *Sobrevida de los animales vacunados con BCG Phipps y 361 en ratones desnudos nu/un; la vacuna 361 presentó significativamente una mejor supervivencia, con respecto a la vacuna BCG Phipps.*

DISCUSIÓN

En este trabajo, se evaluó la capacidad protectora de las vacunas recombinantes 361 y 261, que sobre expresan el antígeno HBHA, de manera integrada y episomal respectivamente en donde se obtuvieron resultados prometedores.

La proteína HBHA, como se mencionó anteriormente, presenta un dominio metilado, denominado dominio de espiral, el cual es responsable de inducir una fuerte respuesta inmune, estimulando la producción de INF γ , TNF α , y anticuerpos. Lo cual fue demostrado en un estudio realizado por Temmerman (2004), en donde células de sangre periférica humana fueron estimuladas *in vitro* con el antígeno HBHA purificado, mostrando altos niveles de INF γ , TNF α , y anticuerpos, en comparación con la proteína HBHA purificada des-metilada. (Temmerman et. al, 2004)

Este mismo dominio es responsable de la agregación de micobacterias patógenas, lo cual induce la formación de agregados bacilares que propician la colonización en el tejido del hospedero. En un estudio se observó que la proteína HBHA presenta una unión muy selectiva con inmunoglobulinas tipo IgM, en comparación con otras proteínas de superficie presentes en *M. tuberculosis*, incluso con el antígeno 85B que también está presente en la superficie de la micobacteria y que de igual forma se ha sido sugerido como candidato vacunal. Esta selectividad de IgM con la proteína HBHA, hace a la proteína un candidato más atractivo para ser utilizado como vacuna, ya que se observó que la unión con el anticuerpo se da específicamente en el dominio de espiral, responsable de la agregación bacilar (Shin, 2006; Cooper, et. al, 1997); lo que quiere decir que los anticuerpos que se unen más selectivamente a este antígeno de superficie, bloquearan el sitio N-terminal metilado, e impedirán que los bacilos formen agregados y colonicen al hospedero.

También se ha demostrado que la proteína HBHA, está muy involucrada en la estimulación de la producción de INF γ (Masungi, et. al, 2002), lo cual tiene bastante relevancia en nuestra vacunas recombinantes 361 y 261, ya que en la primera exposición con HBHA dentro del hospedero (en la vacunación), se formaran células

T de memoria, en un ambiente tipo Th1, y posteriormente en una segunda exposición, estas células de memoria generarán un respuesta tipo Th1, que estimulara una mayor producción de IFN γ , y logrará contener mejor la enfermedad ya que si recordamos *M. tuberculosis* es una bacteria intracelular y requiere de una respuesta inmune celular para ser eliminada.

En un experimento realizado por G. G. Guerrero, se utilizó el antígeno HBHA purificado y “des-metilado” de su N-terminal (rHBHA), como un refuerzo para la vacuna BCG Pasteur, mostrando que el refuerzo con la proteína aumentaba la protección a la enfermedad, disminuyendo el número de UFC´s en ratones Balb/c que recibían el refuerzo, con respecto a los que únicamente recibieron BCG (Guerrero y Loch, 2011).

Lo demostrado en aquel experimento es similar a los resultados mostrados en este estudio, donde se observó que las vacunas 361 y 261 que sobre expresan HBHA disminuyen significativamente el número de UFC´s, con respecto al grupo control vacunado con BCG Phipps (Figura 4), con la cepa H37Rv, a los 4 meses post-infección. Sin embargo el hecho de utilizar una vacuna recombinante que sobre exprese HBHA, suma la protección brindada por BCG mas la conferida por el antígeno, sin necesidad de posteriores refuerzos o adyuvantes, que podrían ser un impedimento debido al abandono de tratamiento por parte de los pacientes, además de que BCG, tiene una gran similitud genética con *M. tuberculosis*, y es una vacuna ya aprobada en humanos y segura.

Se ha sugerido que existen mecanismos específicos por los cuales las vacunas que sobre expresan proteínas de superficie de bacterias intracelulares son efectivas; el primero de estos mecanismos es que tales proteínas se encuentran intactas en el proceso de proteólisis, lo cual le permite a la célula fagocítica presentar el antígeno a células T. Otro mecanismo, es que las proteínas extracelulares de bacterias intracelulares, dentro de un hospedero “virgen al microorganismo”, pueden inducir una población de linfocitos capaces de ejercer una respuesta inmune en contra de la bacteria (Horwitz, 2005).

En otro estudio similar al nuestros reportado por Horwitz (2005), se determinó la capacidad protectora de la vacuna rBCG30, evaluando el daño pulmonar y las unidades formadoras de colonias, así como el nivel de atenuación de la vacuna; rBGC30 es una vacuna recombinante fabricada a partir de BCG Tice que sobre expresa los antígenos ESAT-6 y CFP-10 simultáneamente, y se observó una mejor protección de la vacuna recombinante con respecto a su parental (Horwitz, 2005).

En este estudio las vacunas recombinantes 361 y 261 se compararon con la vacuna BCG Phipps, ya que en un estudio realizado en este laboratorio, en el que se evaluaron 10 subcepas de BCG, se observó que la subcepa Phipps presentó la mejor protección contra la enfermedad, reflejándose en un menor número de UFC's, y porcentaje de neumonía, así como una mejor sobrevida (Castillo-Rodal, et. al, 2006). El hecho de que la vacuna 361 superara a la BCG Phipps en cuanto a carga bacilar (figura 4) es una observación muy importante ya que ésta última es una vacuna que destaca dentro de las subcepas BCG, por lo que la vacuna 361 estaría superando como mínimo a 10 BCG utilizadas en nuestro modelo murino.

Por otro lado resulta interesante observar la virulencia de la cepa con la que se retó a los animales vacunados. En el presente estudio los ratones vacunados con 361 y 261 se retaron con la cepa H37Rv, la cual es una cepa originalmente aislada en 1905 y usada muy comúnmente como cepa de referencia en laboratorios clínicos y de investigación. Su gran uso se debe a que es una cepa patógena de mediana virulencia, drogo-sensible y en animales presenta un comportamiento muy similar a la enfermedad en humanos (Bifani, et. al, 2000).

Además de H37Rv, también se utilizó el aislado clínico, 5186 (cepa 9005186) que es una cepa Latinoamericana (LAM), clasificada dentro del fenotipo 1, el cual se caracteriza por no inducir una respuesta inmune protectora y mostrar un incremento en la virulencia y la transmisibilidad, en comparación con la cepa de referencia H37Rv (Marquina-Castillo et al, 2008).

En ese mismo estudio realizado por Marquina-Castillo et al, (2008), se evaluaron 8 cepas de *M. tuberculosis*, y se mostró que ratones Balb/c de 8 semanas retados con la cepa 5186, empezaban a morir después de las 3 semanas de infectados y a

las 5 semanas presentaban una sobrevida del 0%, lo cual es similar a los resultados que mostramos en el presente estudio, donde los animales que no recibieron vacuna, y que fueron infectados con 5186, empezaron a morir antes de la semana 5 y para la semana 8 todos los ratones estaban muertos, dato que confirma que los ratones vacunados se estaban enfrentando a una cepa hipervirulenta. El hecho de que la vacuna 361 haya presentado una menor carga bacilar frente a una cepa hipervirulenta como se ve en la Figura 5, nos indica la buena capacidad de protección de la vacuna. Es importante mencionar que en esta comparación de BCG Phipps con respecto a 361, de la Figura 5, solo se observó diferencia significativa con la prueba estadística *T de student*.

En nuestro laboratorio se realizó un estudio por Aguilar et .al, (2005) donde se evaluaron cepas mutantes como candidatos a vacunas, para determinar su capacidad protectora, y al igual que nosotros utilizaron como grupo control la BCG Phipps. Se observó que al retar a los ratones vacunados con la cepa H37Rv, no existe una diferencia marcada entre la BCG Phipps y las cepas mutantes, pero cuando utilizan bacterias con genotipo Beijing de mayor virulencia, la vacuna BCG Phipps no brinda una protección tan efectiva, lo cual es similar a nuestros resultados.

La protección de BCG Phipps parece ser dependiente al tipo de cepa al que se expone, como bien se puede ver en los resultados obtenidos con las vacunas 361 y 261 de este estudio. En las figuras 3 y 5, se puede observar que cuando se retan animales con la cepa H37Rv y se determina la carga bacilar a los 2 meses post-reto, las vacunas 361 y BCG Phipps muestran una carga de menos de 2 millones de UFC's por pulmón; En cambio cuando se utiliza la cepa hipervirulenta 5186, al mismo tiempo post-infección, la BCG Phipps presenta más de 15 millones de UFC's por pulmón, mientras que la vacuna recombinante 361, presenta menos de 4 millones de UFC's. Lo cual confirma el hecho de que BCG Phipps no brinda una buena protección frente a una cepa de mayor virulencia. Por otro lado la vacuna 361 que incluso disminuyó significativamente la carga bacilar con respecto a 261, cuando se reta con la cepa 5186, por lo que 361 parece ser un mejor candidato a vacuna incluso frente a cepas de mayor virulencia.

Otra desventaja que se puede observar respecto a la vacuna BCG Phipps, es la memoria inmunológica que esta brinda. Como se puede observar en la carga bacilar con la cepa H37Rv, los ratones vacunados con BCG Phipps a los 2 meses post-infección presentan un nivel bajo de UFC's, pero a los 4 meses post-infección, la carga bacilar aumenta incluso duplicando el número de UFC's a los 2 meses post-infección, y los mismo ocurre con porcentaje de neumonía. Lo que indica que BCG Phipps, si bien presenta una buen protección en un inicio, no la mantiene a lo largo del tiempo, y es evidente que la vacuna 361 supera el tiempo de memoria inmunológica conferido por BCG Phipps, ya que como se ve en las Figuras 3 y 4 la vacuna 361, mantiene disminuido el número de UFC's tanto en los 2 meses como en los 4 meses post-infección.

Por otra parte encontramos diferencias entre las vacunas recombinantes 261 y 361 que sobre expresan HBHA en el nivel de protección. Como se mencionó anteriormente, la vacuna 261 presenta el cDNA de manera episomal, mientras que la vacuna 361 lo presenta de manera integrada el genoma de la bacteria, lo cual le brinda ciertas características más benéficas, como el hecho ser más estable a mutaciones, y de sobre expresarse de manera constante y no intermitente como en el caso de la 261. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, ya que si bien ambas vacunas presentaron un buen nivel de protección en la carga bacilar con la cepa de mediana virulencia H37Rv (Figura 3), con la cepa hipervirulenta 5186, existen diferencias significativas (Figura 5). Al retar a los ratones vacunados con 261 con una cepa muy virulenta, esta no tiene la capacidad de brindar un buen nivel de protección, dato que se corrobora con el porcentaje de neumonía (Figuras 6 y 8).

Una vez que observamos que 361 brinda una buena protección contra la tuberculosis pulmonar, fue importante evaluar el grado de atenuación de la vacuna.

Como se mencionó anteriormente, la vacuna se administra en recién nacidos, en donde el sistema inmune aún no se encuentra bien desarrollado, lo que contribuye a la susceptibilidad de diversos microorganismos patógenos (Gracia, Zarain &

Laguna, 2005). Debido a que el neonato no ha estado en contacto con ningún antígeno y no ha adquirido memoria inmunológica. Es importante que la vacuna que administremos se encuentre verdaderamente atenuada y no tienda a revertirse, para no causar enfermedad en el recién nacido.

En nuestro modelo el grado de atenuación se evaluó en ratones singénicos, desnudos *nu/nu*, de 8 semanas de edad, los cuales presentan una mutación en el gen *FOXN1^{nu} nude* (factor de transcripción que regula la expresión selectiva de queratina), fenotípicamente alopecicos y carecen de timo o presentan uno rudimentario, lo cual les impide la maduración de células T, que a su vez impide la estimulación de células B, que finalmente imposibilita la producción de anticuerpos (Fogh, 1978). Por lo que estos animales que se encuentran inmunodeficientes y son ideales para evaluar la atenuación de las vacunas mediante su sobrevida.

La vacuna 361 presentó significativamente una mejor sobrevida en el ensayo de atenuación con respecto a BCG Phipps, lo cual indica que la cepa mantiene el mismo grado de atenuación de BCG, o más prolongado y que nos encontramos frente a una vacuna que además de tener varias ventajas protectoras es segura y confiable.

La vacuna 361, parece brindar buena protección contra la tuberculosis pulmonar en modelo murino, además de que nuestros resultados concuerdan con otros hallazgos, ya reportados en la literatura. Si los resultados obtenidos en este trabajo, se mantienen constantes en posteriores repeticiones, entonces la vacuna 361 podría ser un candidato a fases pre-clínicas con animales de experimentación más complejos y cercanos al humano, para posteriormente ser evaluada en fases clínicas.

CONCLUSIONES

En este estudio se evaluaron dos vacunas que sobre-expresan el antígeno HBHA de manera episomal (261) e integrada (361); Los resultados obtenidos sugieren que la vacuna 361 es eficiente para la profilaxis de la tuberculosis pulmonar experimental cuando se reta con H37Rv, ya que presentó una mejor protección que BCG Phipps, la cual había demostrado ser la mejor vacuna en el modelo murino utilizado. A pesar de que la vacuna 261 también supero la protección conferida por BCG Phipps, cuando se reta con 5186, la vacuna 361 presentó mejores resultados. Los experimentos sugieren que la vacuna 361 podría ser un buen candidato para prevenir la enfermedad pulmonar, aunque aún faltan más estudios incluyendo fases pre-clínicas y clínicas.

PERSPECTIVAS

-Evaluar la capacidad protectora de la vacuna 361 frente a una bacteria con genotipo Beijing (más virulenta).

-Ya que antígeno HBHA está también implicado en la diseminación extra pulmonar es importante determinar la carga bacteriana en bazo y cerebros de los animales de estudio.

-Evaluar las vacunas recombinantes 261 y 361 pero derivadas de la vacuna BCG Phipps.

REFERENCIAS

Abbas K. A., Andrew H. Lichtman, Shiv P.; inmunología celular y molecular; Elsevier Saunders; 6ta edición; 2008

Aguilar L.D., Infante E., Bianco M.V., Cataldi A., Bigi F., Hernandez Pando R.; Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis mce-2* and *mce-3* mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis; Vaccine; 2005; 24 (2006) 2333–2342

Arráiz R., Romay B. z. y Faria M. N.; Evaluación de un ensayo de RPC múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia; Rev Chil Infect; 2007; 24(2): 99-105

Bifani P., Moghazeh S., Shopsin B., Driscoll J., Ravikovitch A., and Kreiswirth N.; molecular characterization of *mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain; J Clin Microbiol; 2000; 38 (9) : 3200-3204

Bocanegra-García V, et al; De la genética a la genómica en el diseño de nuevas vacunas contra la tuberculosis; Enferm Infecc Microbiol Clin; 2011

Cabello R. R.; Microbiología y parasitología humana; Medica Panamericana; 2007; 3ra edición; p181

Castillo-Rodal I. A., Castañon-Arreola M., Hernández-Pando R., Calva J. J., Sada-Díaz E. y López-Vidal Y. ; *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis; Infect Immun; 2006; 74 (3) : 1718-1724

Cooper A. J., Hayman W., Reed C., Kagawa H., Good M. F., and Saul A.; “Mapping of conformational B cell epitopes within alpha-helical coiled coil proteins; Mol Immunol; 1997; 34(6) 433–440.

Daniel M. Thomas The history of tuberculosis; Respiratory Medicine; 2006; 100, 1862–1870

Delogu G. and Brennan J. M.; Functional Domains Present in the Mycobacterial Hemagglutinin, HBHA; J Bacteriol; 1999; 181(24): 7464-7469

Dennehy M., Anna-Lise W.; Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines; vaccine; 2005; 23: 1209-1224.

Esposito C., Carullo P., Pedone E., Graziano G., Vecchio P., Berisio R.; Dimerisation and structural integrity of Heparin Binding Hemagglutinin A from *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for bacterial agglutination; FEBS Letters; 2010; 584: 1091-1096

Fainboim L., Geffner J.; introducción a la inmunología humana; Medica Panamericana; 2005; 5ta edición.

Fanlo P., Tiberio G.; Extrapulmonary tuberculosis; An. Sist. Sanit. Navar.; 2007; 30 (supl. 2): 143-162.

Finer R. Kim; Deadly Diseases and Epidemics; Tuberculosis; Infobase Publishing; 2009; pp 24-31

Flynn L. and Chan J.; Immunology of tuberculosis; Annu. Rev. Immunol; 2001; 19: 93-129.

Fogh Jorgen; The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research; Elsevier; 1978

Forbes A. B.; Diagnostico microbiológico; Médica Panamericana; 12 edición; 2007; p 492-493

Forrellad A. M., Laura I. Kleep, Gioffré A., Sabio J., Hector R. et, al; Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; Virulence; Landes Bioscience; 2013; 4:1, 1-64

Gracia R. R., Zarain L. P., Laguna M. Y.; Modelos de la patogénesis de las enfermedades infecciosas; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; Dirección de Fomento Editorial; 2005

Guerrero G. G. y Loch C.; Recombinant HBHA Boosting Effect on BCG-Induced Immunity against Mycobacterium tuberculosis Infection; Clin. Dev. Immunol.; 2011; Volume 2011, Article ID 730702, 8 pages

Horwitz M. A.; Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracelular proteins; Microbes Infect.; 2005; 7: 947-9

Kaufmann H. E. Stefan; Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later; Lancet. Infect. Dis.; 2011; 11:633-640

Kindt T. J., Goldsby A. R., Osborne B. A.; Inmunología de Kuby; McGraw-Hill Interamericana Editores; 2007; 6ta edición; pp 477-491

Kuby J., Goldsby R., Kindt T. J., Osborne B. A.; Inmunología; McGraw-Hill interamericana editores; 2003; 5ta edición

Labonne F.; historia de las vacunas; laboratorio de fisiología celular, Universidad Autónoma Metropolitana; 2005.

Lebrun P., Raze D., Fritzinger B., Jean-Michel W., Biet F., Dose A., et. al; Differential Contribution of the Repeats to Heparin Binding of HBHA, a Major Adhesin of *Mycobacterium tuberculosis*; Plos one; 2012; 7(3): 1-11

Liu J., Tran V., Leung S. A., Alexander D. C., Zhu B.; BCG Vaccines; Hum. Vaccines; 2009, 5:2, 70-18

Luna C.; A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians; International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2003; pp 22-26

Marquina-Castillo B., García G. L., Ponce-de-León A., Bobadilla-del Valle M., Sifuentes-Osornio J., Hernández-Pando R.; immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model; Virulence; British Society for Immunology; 2008; 128: 123-133

Masungi C., Temmerman S., Vooren JP., Drowart A., Pethe K., Menozzi F., et, al; Differential T and B Cell Responses against Mycobacterium tuberculosis Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin in Infected Healthy Individuals and Patients with Tuberculosis ; J. Infect. Dis.; 2002; 185:513–20

McShane H.; Tuberculosis vaccines: beyond bacile Calmette-Guérin; Phil. Trans. R. Soc. B; 2011: 366: 2782-2789

Menzioz F., Reddy V., Cayet D., Raze D., Debie AS., Dehouck MP., et, al; *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions; Microbes Infect.; 2006; 8: 1-9

Menzioz F., Rouse J., Alavi M., Laude-Sharp M., Muller J., Bischoff R., et, al; Identification of a Heparin-binding Hemagglutinin Present in Mycobacteria; J. Exp. Med.; 1996; 184: 993-1001

Mohamed S., Stevceva L., Agwale S., Lewis G., Hone D.; Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors; Mol. Med. Today; 2000; 6: 66-71

Organización Mundial de la Salud, hoja de información sobre las tasas observadas de reacciones a vacunas, Vacuna Bacilo de Calmette- Guérin (BCG); 2012

Organización Mundial de la Salud, La vacuna antituberculosa, Documento de posición de la OMS; 2001

Palomino J. C, Leao S., Ritacco V.; Tuberculosis 2007 From basic Science to patient care; 1ra edición; tomado de tuberculosis-textbook.com

Ramos G, Lado L., Bastida T., Bernal P., Barrón O.; Tratamiento actual de la tuberculosis; anales de medicina interna; 2003; 20 (2) 91-100

Rojas-Espinosa O.; Inmunología (de memoria); Médica panamericana; 2001; 2da edición.

Secretaría de Salud; 2013, obtenido de www.salud.gob.mx; 2013WHO

Secretaría de salud; Guía de práctica clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Casos Nuevos de Tuberculosis Pulmonar; 2009

Secretaría de Salud; Plataforma única de información; SUIVE; DGE; 2011

Shin AR., Lee KS., Lee JS., Kim SY.; Immunoglobulin M of Tuberculosis Patients Reacts Strongly with the Serum *Mycobacterium tuberculosis* HBHA Protein; *Clin. Vaccine Immunol.* 2006, 13(8):869

Singer S., Yee J., Nash T.; Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*; Mol. Biochem. Parasit.; 1998; 92: 59-69.

Smith H., Kremer K., Inwald J., Dale J., Driscoll R. J., Gordon V. S., et, al; Ecotypes of the Mycobacterium tuberculosis complex; J. Theor. Biol; 2006; 239: 220-225

Temmerman S., Pethe K., Parra M., Alonso S., Rouanet C., Pickett T., et, al; Methylation- dependent T cell immunity to Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin; Nat. Med.; 2004; 10 (9): 935-941

Todar K.; Online Textbook of Bacteriology; *Mycobacterium tuberculosis* and tuberculosis; 2008-2012; tomado de www.textbookofbacteriology.net

Triccas J.; Recombinant BCG as a vaccine vehicle to protect against tuberculosis; Bioeng. Bugs; 2010; 1:2, 110-115

Unnikrishnan M., Rappuoli R., Serruto D.; Recombinant bacterial vaccines; Curr. Opin. Immunol.; 2012; 24:337-342

Wieland M.L., Sia IG.; Current concepts in the management of tuberculosis; Mayo Clin. Proc.; 2011; 86(4): 348-361

World Health Organization, 2012. Global tuberculosis report

Zumla A., Raviglione M., Hafner R., Reyn F.; Tuberculosis current concepts; N. Engl. J. Med.; 2013; 368;8 745-755.