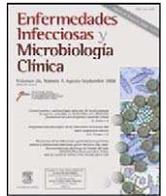


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

De la genética a la genómica en el diseño de nuevas vacunas contra la tuberculosis

Virgilio Bocanegra-García^a, Jorge Valencia-Delgadillo^b, Wendy Cruz-Pulido^a, Rubén Cantú-Ramírez^a, Gildardo Rivera-Sánchez^a y José Prisco Palma-Nicolás^{c,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Bioingeniería, UAM Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Tamaulipas, México

^b Department of Information Studies, The University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom

^c Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México DF, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de diciembre de 2010

Aceptado el 5 de abril de 2011

Palabras clave:

Tuberculosis
BCG
Bioinformática
Vacunas de DNA

Keywords:

Tuberculosis
BCG
Bioinformatics
DNA vaccine

R E S U M E N

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a seres humanos de todas las edades, y se considera que la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo de Koch. Aunque la vacuna BCG es aplicada sistemáticamente en áreas endémicas, su efectividad varía de 0-80% dependiendo de diversos factores que incluyen: la cepa vacunal utilizada, la exposición a micobacterias ambientales, e incluso a factores genéticos. La incidencia de la enfermedad va en aumento en todo el mundo, y es urgente contar con una vacuna alternativa a la BCG. En la presente revisión se hace una descripción de las estrategias moleculares puntuales y a escala genómica que se están llevando a cabo para el diseño de una nueva vacuna, y se pone de manifiesto la necesidad del uso de las nuevas tecnologías de alto rendimiento para lograr un diseño verdaderamente racional de una nueva vacuna contra la tuberculosis.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

From genetics to genomics in the rational design of new *Mycobacterium tuberculosis* vaccines

A B S T R A C T

Tuberculosis (TB) is an infectious disease affecting people from all ages all over the world. It is estimated that one third of the world population lives infected with the causal agent: *Mycobacterium tuberculosis*. Despite availability and systematic administration of BCG vaccine in endemic areas, TB transmission remains elusive to control, partly because BCG efficacy has been shown to have wide variability (0-80%). Such variability in protection is attributed to factors including: the BCG strain used for immunization, pre-existing exposure to environmental saprophytic *Mycobacterium* species, and host genetic factors. In this context, efforts regarding to re-engineering BCG vaccines with the ability to prevent latent TB reactivation, providing long lasting protection, and devoid from collateral effects in immunosuppressed people are urgent. In this work we review the actual molecular «gene-by-gene» strategies aimed at generating BCG alternatives, and discuss the urgent necessity of high throughput technology methods for a rational design for a new TB vaccine.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La tuberculosis pulmonar es la forma más común de tuberculosis, así como la forma más importante en términos epidemiológicos. Se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de Koch, y de acuerdo con cifras oficiales de la Organización Mundial de Salud (OMS), hay aproximadamente

ocho millones de nuevos casos de tuberculosis cada año, y dos millones de muertes en todo el mundo¹.

A fines del siglo XIX se comenzaron a evaluar alternativas para generar una vacuna contra la tuberculosis, una de éstas llevó a la formulación de la tuberculina, aunque también se llevaron a cabo inmunizaciones con bacilos muertos, atenuados y con micobacterias no tuberculosas (MNT). A principios del siglo XX Albert Calmette y Camille Guérin observaron que una cepa virulenta del bacilo *Mycobacterium bovis*, tras 232 pases sucesivos de cultivo en un medio líquido que contenía «bilis» perdía su virulencia al ser administrada en conejos y cobayas; lo anterior les permitió formular una vacuna experimental que se aplicó por primera vez en 1920

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jpalma@ifc.unam.mx (J.P. Palma-Nicolás).

Tabla 1
Antígenos potencialmente protectores para la generación de una nueva vacuna

Antígeno	Vacuna/tipo	Descripción	Fase clínica	Referencia
Ag85A	MVA85A-AERAS-485/viral	Vaccinia Ankara que expresa el antígeno 85A	FC II	20
	Ad35-AERAS-402/viral	Adenovirus 35 que expresa el Ag 85A, Ag85B y TB10.4	FC II	23
	AdAg85A/viral	Adenovirus 5 que expresa el Ag 85A	FC I	24
Ag85B y ESAT6	MVA/IL-15/5Mtb/viral	Vaccinia Ankara que expresa Ag85A/B, ESAT-6, HSP-65, e IL-15	Pre-C	60
	rBCG30/BCG atenuada	BCG que sobreexpresa el antígeno 85B	FC I	27
	ΔRD1 ΔpanCD/M.tb auxótrofa	<i>M. tuberculosis</i> auxótrofa para pantotenato, que carece de los genes de la región RD1	Pre-C	39
Mtb72f	H1-IC31/proteína	Proteína de fusión Ag85B-ESAT6 formulada con adyuvante IC-31	FC I	11,18
	H4-IC31/AERAS-404/proteína	Proteína de fusión Ag85B-TB10.4, formulada con adyuvante IC-31	FC I	10
MPT-64	Mtb72f-AS02/proteína	Proteína de fusión Rv1196+Rv0125, en adyuvante AS02	FC II	61
KatG	MPT-64/DNA	Plásmido administrado por vía intramuscular	Pre C	16
Hsp65/70	KatG/DNA	Plásmido administrado por vía intramuscular	Pre C	16
	Hsp65 y Hsp70/DNA	Plásmido administrado por vía intramuscular	Pre C	15

FC I: fase clínica 1; FC II: fase clínica 2; Pre C: fase preclínica.

con resultados satisfactorios². Esta vacuna viva atenuada (bacilo de Calmette-Guérin, o BCG) comenzó a usarse masivamente en Europa en 1921 para la prevención de la tuberculosis, y actualmente forma parte de los programas nacionales de vacunación en los países miembros de la OMS.

A pesar de que la vacuna BCG es segura para su administración en recién nacidos, (aproximadamente 100 millones de niños son inmunizados con BCG cada año), uno de los problemas que presenta es la amplia variabilidad en el grado de protección que se logra inducir, particularmente cuando se administra a personas en edad adulta³. Se ha determinado que la efectividad de dicha vacuna varía desde 0 hasta el 80% dependiendo de diversos factores como son: la cepa vacunal administrada, de la edad del paciente al momento de la aplicación, la exposición previa del paciente a micobacterias no tuberculosas presentes en el medio ambiente y desde luego a la participación de factores genéticos intrínsecos asociados al montaje de la respuesta inmune derivada de la vacunación⁴. Existen casos extremos como el de India (que presenta un incidencia de 1.900.000 casos/año) en el cual la vacunación con BCG no aporta protección significativa en contra de la enfermedad⁵.

Otros de los factores que impactan en la efectividad de BCG parece ser la localización geográfica de la población a la que se aplique. En términos generales el más alto grado de protección se obtiene en las poblaciones más alejadas del ecuador⁶. Por lo anterior, aunque la BCG se aplica de manera generalizada a los recién nacidos en países con incidencia de tuberculosis alta, como los ubicados en Asia y África, en países donde la incidencia de tuberculosis es baja (como en Austria, Finlandia, Gran Bretaña, etc.) ésta se recomienda solo a los individuos que se encuentren en situación de riesgo al contagio. En México la incidencia de tuberculosis se ha mantenido constante desde hace diez años (~15.000 casos nuevos/año) y la vacuna BCG es aplicada sistemáticamente al nacimiento en las instituciones médicas que integran el sector público (IMSS, ISSSTE y Centros de Salud).

Hacia una vacuna más eficiente: las actuales estrategias genéticas

Entre los requisitos que debería cumplir una nueva vacuna que eventualmente reemplace a la BCG se pueden citar: 1) Que proteja contra la tuberculosis por reactivación, que es la más frecuente en adultos; 2) Que confiera un mayor período de protección que la BCG, y 3) Que no presente efectos secundarios en individuos inmunocomprometidos. Las estrategias que se han seguido para generar una nueva vacuna se pueden dividir fundamentalmente en tres: 1) Los esfuerzos iniciales encaminados a identificar antígenos inmunoprotectores de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG mediante la purificación de proteínas y su uso en esquemas de inmunización en modelos experimentales; 2) Con el auge de la biología

molecular muchos de los genes que codifican para antígenos proteicos —potencialmente útiles en vacunación— se usaron como base para el diseño de vacunas de ADN, e incluso la clonación de nuevos genes permitió probar el potencial inmunoprotector de proteínas hasta entonces desconocidas, y 3) El surgimiento de la ingeniería genética hizo posible modificar intencionalmente el genoma de BCG agregando o eliminando genes de manera selectiva en busca de una mejor vacuna.

Desafortunadamente la cantidad de antígenos potencialmente útiles en vacunación no ha aumentado considerablemente (tabla 1), y las vacunas que hoy día se encuentran en etapas avanzadas en los estudios de fase clínica podrían no tener mucho más que ofrecer en términos de protección (aunque sí en cuanto a la seguridad de su administración, por ejemplo en pacientes inmunosuprimidos), ya que su diseño sigue estando limitado a no más de 10 antígenos potencialmente protectores, de los más de 4.000 antígenos potencialmente codificados en el genoma de *M. tuberculosis*.

Vacunas de subunidad

Esta estrategia se remonta a los primeros intentos de generación de vacunas en los que se utilizaban fracciones crudas de bacilos muertos por calor, lo que incluía paredes celulares o fracciones subcelulares separadas por centrifugación. Los primeros logros llegaron a mediados de la década de los 80 cuando se pudo describir parcialmente el contenido de las fracciones subcelulares, así como el de las proteínas del «filtrado del cultivo», las cuales son secretadas al medio de cultivo durante el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* en medios sintéticos⁷, y que se creía que eran un conjunto de antígenos que podrían inducir la inmunidad protectora.

La mayoría de los antígenos investigados hasta el momento son antígenos secretados de producción temprana durante la infección, como el antígeno 85 (Ag85), que es compartido con *M. bovis*-BCG y la proteína ESAT-6 que es un antígeno específico de *M. tuberculosis*⁸. Estas proteínas pueden ser administradas solas o bien mediante la construcción de proteínas de fusión, pero presentan la particularidad de requerir ser administradas con adyuvantes fuertes para estimular la respuesta celular Th1⁹. Un par de vacunas de subunidad de este tipo que se encuentran en estudios de fase clínica I. Están formadas por la fusión del Ag85B con ESAT-6 y otra con el antígeno TB10.4, ambas se administran con adyuvante y muestran una eficacia por lo menos equivalente al uso de la BCG^{10,11} (tabla 1).

Aunque las proteínas constituyen los antígenos principales en las vacunas de subunidad, la inclusión de otras moléculas como carbohidratos y glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* podrían mejorar la eficacia de las vacunas de subunidad por su conocida función como adyuvantes¹².

Vacunas de ADN

Debido a cuestiones de seguridad en la administración de vacunas vivas o atenuadas, particularmente en pacientes inmunosuprimidos, así como debido a algunos aspectos técnicos referentes a su manufactura, almacenamiento y transporte, las vacunas vivas atenuadas presentan limitaciones para su aplicación a gran escala. De ahí la necesidad de estudiar nuevas formas hacer llegar los antígenos vacunales de manera eficiente para que se lleve a cabo el montaje adecuado de una respuesta protectora. La base de esta estrategia radica en la capacidad del DNA desnudo para ser incorporado por las células adyacentes al sitio de inoculación, y de ser transcrito por la maquinaria de la célula para producir un péptido o una proteína completa, la cual se encuentra clonada en un vector de expresión. El antígeno traducido se procesa proteolíticamente y sus péptidos se presentan en el contexto de las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), o bien estos péptidos pueden ser liberados y posteriormente captados por células presentadoras profesionales de antígenos para su presentación a las células T, en el contexto de moléculas de clase II. Este sistema presenta varias ventajas, entre las que destacan el ser fáciles de construir masivamente mediante ingeniería genética. A pesar de ello, en los estudios preclínicos actuales las vacunas de ADN han presentado baja efectividad, necesitando de dosis altas de la vacuna para lograr un efecto protector¹³. En la *tabla 1* se muestra que los antígenos empleados para el diseño de una nueva vacuna de ADN son esencialmente los previamente descritos: el Ag85¹⁴, las proteínas de choque térmico de 65 y 70 kDa¹⁵, KatG, MPT64 y HBHA¹⁶. Mediante la fusión de las secuencias codificantes de más de un antígeno se han obtenido mejores resultados en los estudios de fase preclínica, como es el caso de la fusión de los ORFs Rv1196 + Rv0125 (Mtb72F)¹⁷. La vacuna de subunidad M72, que se encuentra en estudios de fase clínica II (*tabla 1*) está basada en el uso de estos antígenos formulados con el adyuvante AS02¹⁸.

Vacunas virales

En los sistemas vacunales de este tipo se emplean vectores virales en los que se expresan antígenos micobacterianos con probada capacidad inmunogénica. La vacuna más avanzada de este tipo es una basada en el virus Ankara (r-MVA), el cual ha sido modificado genéticamente para expresar el Ag85; esta vacuna ya ha entrado a estudios de fase clínica II^{19,20}, una vez que fue previamente demostrada su eficacia en fase pre-clínica, usando modelos experimentales de tuberculosis pulmonar en ratones²¹. Los ensayos clínicos muestran que puede ser administrada con seguridad a los seres humanos²². Otras vacunas virales candidatas muy prometedoras que también se encuentran en estudios de fase clínica, parcialmente basadas en el uso de la secuencia codificante del Ag85, hacen uso de los adenovirus 5 (AdAg85A) y 35 (Ad35-AERAS-402) como vectores vacunales virales de replicación defectiva (*tabla 1*)^{23,24}.

Vacunas vivas recombinantes derivadas de *M. bovis*-BCG

Por otro lado, el desarrollo de sistemas vacunales basados en vectores bacterianos se ha enfocado a modificar la BCG para mejorar su eficacia protectora. Entre los sistemas recombinantes basados en la cepa BCG (r-BCG) destaca un diseño en el que ha restituido la región de diferenciación 1 (RD1), la cual contiene al menos 11 genes, entre ellos los que codifican para las proteínas ESAT-6 y CFP10, y se ha demostrado que esta vacuna (BCG:RD1) confiere una protección ligeramente superior a la BCG en el modelo murino²⁵, en parte porque favorece el reclutamiento de células T efectoras activadas y células dendríticas a los pulmones de una manera más eficiente que la BCG²⁶, desafortunadamente uno de

los inconvenientes encontrados es que presenta mayor virulencia que la propia BCG en los ratones inmunocomprometidos.

Los mejores resultados que se han obtenido mediante la modificación de BCG derivan de la sobreexpresión del Ag85B (rBCG30), y de acuerdo con los estudios de fase clínica esta vacuna candidata presenta ligeramente mayor eficacia y seguridad en su administración que la propia BCG²⁷. Una variante de esta vacuna en la que se fusiona los antígenos 85B y ESAT-6 se encuentra en estudios de fase preclínica, aunque no muestra mejores resultados que la BCG convencional²⁸.

Otra estrategia adicional que se ha evaluado consiste en generar nuevas cepas recombinantes de *Mycobacterium bovis*-BCG que produzcan las citocinas asociadas a la protección contra la tuberculosis, como son IFN- γ , IL-2, IL-12 y GM-CSF, y aunque se ha demostrado que aventajan ligeramente a la BCG en su capacidad protectora²⁹⁻³¹, aún no hay resultados de su posible eficacia en humanos, ya que dichas vacunas no ha avanzado más allá de la fase preclínica. También, mediante la construcción de cepas r-BCG que expresan listeriolisina (de *Listeria monocitogenes*), se ha conseguido que las cepas vacunales rompan la pared fagosomal, favoreciendo su salida al citoplasma de los macrófagos. Con lo anterior se favorece la presentación de antígenos de clase I de la micobacteria a las células T CD8+, un proceso que se considera ineficiente durante el montaje de la respuesta inmune a la vacunación con BCG, y se ha demostrado que tales recombinantes inducen una mayor protección que *M. bovis*-BCG en el modelo murino³².

Mutantes auxotróficas de *M. tuberculosis*

Paradójicamente, se ha demostrado en el modelo murino que una infección primaria controlada, con una cepa virulenta de *M. tuberculosis* genera el mismo grado de protección que la inmunización con BCG ante un reto posterior (tuberculosis postprimaria)³³. La eficacia potencial de las mutantes de *M. tuberculosis* como vacunas aun no se conoce por completo. Las cepas auxotróficas no se replican *in vivo* ya que intencionalmente tienen afectada su capacidad para sintetizar aminoácidos esenciales, sin embargo mantienen la infección el tiempo suficiente para que el hospedero pueda montar una respuesta inmune adecuada³⁴. Otra estrategia utilizada es la generación de mutantes «knockout» de *M. tuberculosis* con alteraciones en el sistema *phoP/phoQ*, o deficientes en el metabolismo y/o transporte de lípidos. Estas cepas muestran un crecimiento reducido en los pulmones de ratones infectados experimentalmente y mantienen una persistencia menor que las cepas silvestres^{35,36}.

Sin embargo, a pesar de las ventajas que representa el uso de mutantes auxotróficas, siempre existe el riesgo de reversión al genotipo virulento, por lo que se ha optado por generar dobles mutantes. Una vacuna de este tipo es la *M. tuberculosis* Δ Pan-Leu-auxotrófica (auxotrófica para el pantotenato, un precursor esencial de la coenzima A y para la biosíntesis de leucina), con la que se ha demostrado seguridad y protección mediante el uso de ratones inmunodeficientes (SCID), así como una muy eficiente protección en el modelo de cobayas^{37,38}. Una variante de esta vacuna, en la que adicionalmente se han eliminado los genes de la región RD1 (Δ RD1 Δ panCD) se encuentra en estudios de fase preclínica en primates, y se ha demostrado que puede ser administrada con seguridad, aunque desafortunadamente su eficiencia protectora ante un reto con la cepa virulenta no es superior a la obtenida con la BCG³⁹.

Hacia una vacuna más eficiente: las nuevas estrategias genómicas

La búsqueda convencional de antígenos que puedan ser útiles para la vacunación se ha basado principalmente en el aislamiento e identificación de algunas proteínas mayoritariamente expresadas

por *M. tuberculosis* durante su cultivo en medios sintéticos, y dado que la respuesta protectora es de tipo celular (Th1), se buscan proteínas que tengan la capacidad de estimular *in vitro* la producción de IFN- γ por parte de las células T de ratones infectados con la micobacteria. Sin embargo, algunos inmunógenos que han demostrado cierto éxito como el Ag85, ESAT-6, o CFP-10, no alcanzan los niveles de protección deseables en una vacuna que pudiera eventualmente reemplazar a la BCG, y lo mismo ha ocurrido con las cepas recombinantes de BCG a las que se han introducido o eliminado genes específicos con la intención de aumentar su eficiencia como vacuna viva atenuada en la protección contra la tuberculosis. La dificultad de evaluar las poco más de 4.000 proteínas codificadas por el genoma de *M. tuberculosis* como posibles candidatos para vacunación se ha ido reduciendo gracias a la disponibilidad y anotación de la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* y otras micobacterias⁴⁰. Esto ha permitido replantear el problema de la búsqueda de antígenos útiles en vacunación, dejando atrás el reduccionismo extremo y permitiendo un abordaje más integral.

Atenuación sitio-dirigida a escala genómica

El conocimiento fino de la organización del genoma de *M. tuberculosis*, aunado al uso del sistema de mutación con transposones ha permitido generar mutaciones a escala genómica en el bacilo de Koch, habiéndose generado una mutante para cada gen⁴¹. Dichas colecciones de mutantes constituyen el punto de partida para evaluar *in vivo* el uso potencial de miles de clonas artificialmente atenuadas en busca de alguna que haya perdido su virulencia sin comprometer su potencial inmunogénico. Como resultado de estos mismos esfuerzos se han identificado 194 genes que parecen ser esenciales para el crecimiento *in vivo* de la micobacteria durante la infección en los modelos murinos de tuberculosis, y algunos de ellos se han postulado como probables factores de virulencia, como es el caso del gen *kefB* que codifica para una proteína de membrana implicada en el transporte de potasio (K⁺) y que parece jugar un papel importante en la resistencia al estrés oxidativo⁴². Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de dicha colección de mutantes de *M. tuberculosis*, aun no existe la posibilidad técnica de evaluar el potencial inmunogénico de cada mutante en un esquema de inmunización a gran escala.

Definiendo el interactoma

Durante el proceso que lleva al establecimiento de la infección por *M. tuberculosis* en el pulmón, se da una serie de eventos poco conocidos en los que el bacilo interactúa con diversos receptores celulares expresados en la superficie del macrófago, entre los que se encuentran CD14, TLR-2, CR3, y el receptor de manosa (CD206), entre otros⁴³. La interacción con dichos receptores es mediada por una gran diversidad de moléculas entre las que se encuentran proteínas, azúcares y lípidos de la pared celular de la micobacteria, y aunque no está plenamente demostrado, se considera que la micobacteria puede modular la fagocitosis para facilitar su entrada a través de «vías permisivas» para el establecimiento de la infección. Así, se sabe que la fagocitosis de la micobacteria a través del receptor para la fracción C3 del complemento (CR3) no genera señales intracelulares que conduzcan a la expresión de TNF- α , y que el reconocimiento de la micobacteria por el receptor para manosa (CD206) transduce señales negativas que evitan la adecuada activación de las vías de señalamiento que desencadenan las propiedades microbicidas del macrófago, como la producción de diversos radicales libres derivados del oxígeno y nitrógeno⁴⁴. En este contexto, el conocimiento más fino de los eventos asociados a la interacción hospedero-patógeno es de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan modular el montaje de la respuesta inmune en favor del hospedero, por ejemplo mediante el

uso de ligandos solubles que compitan con el bacilo y eviten su internalización por receptores que favorezcan su sobrevivencia. En este sentido, se han hecho esfuerzos puntuales en la identificación de adhesinas micobacterianas, entre las que se encuentran el lipoarabinomano, LAM⁴⁵ y la proteína de 19 kDa⁴⁶. Recientemente, mediante el uso de electroforesis bidimensional e identificación por espectrometría de masas se describieron 41 proteínas probablemente manosiladas, con base en su capacidad de unión a la concanavalina A (ConA), 34 de las cuales no se habían reportado previamente⁴⁷. Esta clase de estrategias globales que permitan la búsqueda de las moléculas que podrían interactuar (interactoma) durante las fases iniciales del encuentro de un patógeno con su célula hospedero es de gran importancia.

Redefiniendo el inmunoma de M. tuberculosis

Se ha descrito una gran diversidad de antígenos de TB con capacidad de generar una respuesta inmune tanto humoral como celular (inmunógenos). Aunque ya ha quedado demostrado que la respuesta humoral no contribuye significativamente a la protección^{48,49}, es factible su utilidad como herramienta diagnóstica mediante el diseño de ensayos serológicos en los que se busque la prevalencia de anticuerpos específicos en la población⁵⁰. Desafortunadamente se ha encontrado que la respuesta humoral que se monta contra la micobacteria es muy heterogénea, sin que hasta la fecha se haya logrado identificar un antígeno que sea mayoritariamente reconocido por los individuos infectados, lo que ha limitado los avances en la búsqueda de un método de diagnóstico más eficaz. Aunque los estudios sobre la heterogeneidad de la respuesta inmune celular son más bien escasos, parece ser que ésta no es tan alta como en el caso de la respuesta humoral, ya que existen evidencias de que los individuos pueden reconocer los mismos antígenos T a pesar de las diferencias haplotípicas en la composición de sus MHC⁵¹, lo que ha llevado al interés por definir subregiones de las proteínas del bacilo con capacidad de inducir una respuesta inmune celular. De igual forma, actualmente no existe la posibilidad de hacer un planteamiento global que permita localizar las regiones inmunodominantes dentro de un genoma (inmunoma), con excepción de las estrategias bioinformáticas que llevan a cabo predicciones *in silico*⁵².

La bioinformática en la predicción de nuevos epítomos antigénicos

La bioinformática ha sido determinante para el éxito de los proyectos genómicos, los cuales han generado una vasta cantidad de información que requiere ser clasificada, almacenada, y analizada en un contexto biológico adecuado (anotación). En este sentido, actualmente existen grandes bases de datos, muchas de ellas de libre acceso, en las cuales es posible llevar a cabo búsquedas específicas dentro de los genomas secuenciados, entre las cuales destacan la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), dependiente de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH), y la *Nucleotide Sequence Data Base* (EMBL-Bank) del *European Bioinformatics Institute* (EBI) con sede en el Reino Unido.

Otros campos importantes de más reciente desarrollo dentro de la bioinformática son el modelado de la estructura tridimensional de moléculas biológicas, así como la predicción de posibles interacciones del tipo ligando-receptor, o antígeno-anticuerpo, mediante la implementación de algoritmos de «*docking*». La dinámica molecular, el desarrollo de algoritmos genéticos, y los nuevos planteamientos en el campo de la teoría de autómatas celulares y redes neuronales, sin duda impactarán de manera positiva la forma en que se obtenga, analice y se interprete la información derivada de los proyectos genómicos.

En el campo de la inmunología, y particularmente en el campo del desarrollo de vacunas, la bioinformática también ha tenido un gran impacto. Actualmente se cuenta con diversos programas informáticos que integran complicados algoritmos que permiten realizar tamizajes «virtuales» de proteínas en busca de epítopos antigénicos. Uno de ellos, TEPITOPE, permite la búsqueda de epítopos T para alelos específicos HLA que pueden ser definidos por el usuario⁵³. En cuanto a las aplicaciones de la bioinformática en el desarrollo de una vacuna contra la tuberculosis mediante el uso de EpiMatrix, un programa que predice la unión de ligandos proteicos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), se han logrado avances significativos ya que se ha logrado generar una respuesta celular T específica contra antígenos de la micobacteria para ocho de 24 antígenos previamente seleccionados *in silico*^{54,55}.

Conclusiones

La investigación básica para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis ha sido extensa, sin embargo solo unas pocas vacunas candidato están ya en estudios de fase clínica⁵⁶; la explicación de este desfase depende de varios factores entre los que destaca el que los modelos experimentales existentes solo permiten hacer una evaluación profiláctica inmediata de la vacuna ante un reto con *M. tuberculosis*, pero no permiten derivar conclusiones sobre el efecto protector de esta en el largo plazo. Por otro lado, el desarrollo de una vacuna efectiva basada en una estrategia racional dependerá del conocimiento que se tenga sobre los productos génicos que contribuyen tanto a la patofisiología de la tuberculosis, así como al montaje de la respuesta inmune, y en este sentido se vuelve imprescindible el uso de las nuevas tecnologías de alto rendimiento, como la proteómica y la bioinformática en el estudio del proceso infeccioso, ya que las proteínas hasta ahora descritas con potencial inmunogénico constituyen apenas una minoría entre las más de 4.000 potencialmente codificadas en el genoma de *M. tuberculosis*. Una vacuna efectiva contra la tuberculosis tendrá que cumplir con varios objetivos: a) deberá prevenir la infección primaria, b) podrá controlar y eliminar una infección activa, así como c) ser efectiva contra la infección latente, y es deseable que sea capaz de potenciar el efecto de la quimioterapia convencional para el tratamiento en pacientes con tuberculosis multidrogoresistente^{57,58}. Aun contando con un verdadero diseño racional el panorama a corto plazo es aún incierto ya que la valoración de una nueva vacuna alternativa a la BCG en estudios de base poblacional deberá tener en cuenta la composición genética de las poblaciones de estudio⁵⁹. Adicionalmente, se requiere de mejores métodos para la detección de *M. tuberculosis* que permitan el diagnóstico oportuno y del uso de nuevas herramientas en el ámbito de la epidemiología molecular, ambos necesarios para poder llevar a cabo seguimientos más puntuales sobre la prevalencia de la infección y el efecto de las nuevas vacunas en el control de la pandemia.

Financiación

El presente trabajo recibió apoyo del Fondo Mixto (FOMIX) CONAcYT-Tamaulipas (Proyecto TAMPS-2005-C08-21).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. WHO. Vaccine-preventable diseases: monitoring system-2009 Global Summary; 2009.

2. Bonah C. The “experimental stable” of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921–1933. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2005;36:696–721.
3. Narayanan PR. Influence of sex, age & nontuberculous infection at intake on the efficacy of BCG: re-analysis of 15-year data from a double-blind randomized control trial in South India. *Indian J Med Res.* 2006;123:119–24.
4. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, et al. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun.* 2002;70:672–8.
5. Rook GA, Kim LU. Comments on the new analysis of the Chingleput BCG trial. *Indian J Med Res.* 2006;123:103–6.
6. Zedpey SP, Shrikhande SN. The geographic location (latitude) of studies evaluating protective effect of BCG vaccine and its efficacy/effectiveness against tuberculosis. *Indian J Public Health.* 2007;51:205–10.
7. Abou-Zeid C, Smith I, Grange JM, Ratliff TL, Steele J, Rook GA. The secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship to those recognized by the available antibodies. *J Gen Microbiol.* 1988;134:531–8.
8. Olsen AW, Williams A, Okkels LM, Hatch G, Andersen P. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun.* 2004;72:6148–50.
9. Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, et al. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine.* 2006;24:5452–60.
10. Aagaard C, Hoang TT, Izzo A, Billeskov R, Trout J, Arnett K, et al. Protection and polyfunctional T cells induced by Ag85B-TB10.4/IC31 against *Mycobacterium tuberculosis* is highly dependent on the antigen dose. *PLoS One.* 2009;4:e5930.
11. Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG, Andersen P. Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guérin immunity. *J Immunol.* 2006;177:6353–60.
12. Rosenkrands I, Agger EM, Olsen AW, Korsholm KS, Andersen CS, Jensen KT, et al. Cationic liposomes containing mycobacterial lipids: a new powerful Th1 adjuvant system. *Infect Immun.* 2005;73:5817–26.
13. Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2003;81:34–45.
14. Giri PK, Verma I, Khuller GK. Adjuvant immunotherapy with Ag85 complex proteins based subunit vaccine in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunotherapy.* 2009;1:31–7.
15. Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C, Lowrie DB, et al. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun.* 2004;72:6945–50.
16. Li Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collins F, Morris S. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect Immun.* 1999;67:4780–6.
17. Skeiky YA, Alderson MR, Owendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol.* 2004;172:7618–28.
18. van Dissel JT, Arend SM, Prins C, Bang P, Tingskov PN, Lingnau K, et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. *Vaccine.* 2010;28:3571–81.
19. McShane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 86A boost BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med.* 2004;10:1240–4.
20. De Cassan SC, Pathan AA, Sander CR, Minassian A, Rowland R, Hill AV, et al. Investigating the induction of vaccine-induced Th17 and regulatory T cells in healthy, *Mycobacterium bovis* BCG-immunized adults vaccinated with a new tuberculosis vaccine, MVA85A. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:1066–73.
21. Goonilleke NP, Mcshane H, Anderson CM, Brookes RH, Hill AV. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *M. tuberculosis* of bacilli Calmette Guérin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol.* 2003;171:1602–9.
22. Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Isaacs F, et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2010;40:279–90.
23. Radosevic K, Wieland CW, Rodríguez A, Weverling GJ, Mintardjo R, Gillissen G, et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect Immun.* 2007;75:4105–15.
24. Mu J, Jeyanathan M, Small CL, Zhang X, Roediger E, Feng X, et al. Immunization with a bivalent adenovirus-vectored tuberculosis vaccine provides markedly improved protection over its monovalent counterpart against pulmonary tuberculosis. *Mol Ther.* 2009;17:1093–100.
25. Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med.* 2003;9:533–9.
26. Majlessi L, Brodin P, Brosch R, Rojas MJ, Khun H, Huerre M, et al. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J Immunol.* 2005;174:3570–9.
27. Tullius MV, Harth G, Maslesa-Galic S, Dillon BJ, Horwitz MA. A Replication-Limited Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against tuberculosis

- designed for human immunodeficiency virus-positive persons is safer and more efficacious than BCG. *Infect Immun.* 2008;76:5200–14.
28. Badell E, Nicolle F, Clark S, Majlessi L, Boudou F, Martino A, et al. Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN- γ producing T-cells. *Vaccine.* 2009;27:28–37.
 29. Murray PJ, Aldovini A, Young RA. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacilli Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. *Prot Natl Acad Sci USA.* 1996;93:934–9.
 30. Luo Y, Chen X, Han R, O'Donnell MA. Recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing human interferon alpha 2B demonstrates enhanced immunogenicity. *Clin Exp Immunol.* 2001;123:264–70.
 31. Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, Luo Y, et al. Manipulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:209–15.
 32. Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 2005;115:2472–9.
 33. Mollenkopf HJ, Kursar M, Kaufmann SH. Immune response to postprimary tuberculosis in mice: *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin induce equal protection. *J Infect Dis.* 2004;190:588–97.
 34. Smith DA, Parish T, Stoker NG, Bancroft GJ. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun.* 2001;69:1142–50.
 35. Martín C, Williams A, Hernández-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, et al. The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine.* 2006;24:3408–19.
 36. Asensio JA, Arbués A, Pérez E, Gicquel B, Martín C. Live tuberculosis vaccines based on phoP mutants: a step towards clinical trials. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8:201–11.
 37. Sampson SL, Dascher CC, Sambandamurthy VK, Russel RG, Jacobs WR, Bloom BRJ, et al. Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of *M. tuberculosis* in guinea pigs. *Infect Immun.* 2004;72:3031–7.
 38. Sambandamurthy VK, Derrick SC, Jalapathy KV, Chen B, Russel RG, Morris SL, et al. Long term protection against tuberculosis following vaccination with severe attenuated double lysine and pantothenate auxotroph of *M. tuberculosis*. *Infect Immun.* 2005;73:1196–203.
 39. Larsen MH, Biermann K, Chen B, Hsu T, Sambandamurthy VK, Lackner AA, et al. Efficacy and safety of live attenuated persistent and rapidly cleared *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates in non-human primates. *Vaccine.* 2009;27:4709–17.
 40. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393:537–44.
 41. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol.* 2003;48:77–84.
 42. Sasseti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003b;100:12989–94.
 43. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998;66:1277–81.
 44. Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor- β 1. *J Infect Dis.* 1994;170:1229–37.
 45. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, et al. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med.* 2005;202:987–99.
 46. Díaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sánchez-González A, Esparza-Cerón MA, Pereira-Suárez AL, Bernal-Fernández G, et al. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog.* 2005;39:97–107.
 47. González-Zamorano M, Mendoza-Hernández G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo AJ, et al. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannosylated proteins. *J Proteome Res.* 2009;8:721–33.
 48. Kato K, Yamamoto K, Shibata M, Kurematsu S, Mitsuhashi O, Kuze A. IgG antibody level to mycobacterial glycoprotein in pulmonary tuberculosis by ELISA. *Eur Respir J.* 1987;7:37–41.
 49. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:514–32.
 50. Palma-Nicolás JP, Bocanegra-García V. Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:225–32.
 51. Adams E, Britton W, Morgan A, Sergeantson S, Basten A. Individuals from different populations identify multiple and diverse T-cell determinants on mycobacterial HSP70. *Scand J Immunol.* 1994;39:588–96.
 52. McMurry J, Sbai H, Gennaro ML, Carter EJ, Martin W, De Groot AS. Analyzing *Mycobacterium tuberculosis* proteomes for candidate vaccine epitopes. *Tuberculosis (Edinb).* 2005;85:95–105.
 53. Bian H, Hammer J. Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. *Methods.* 2004;34:468–75.
 54. De Groot AS, McMurry J, Marcon L, Franco J, Rivera D, Kutzler M, et al. Developing an epitope-driven tuberculosis (TB) vaccine. *Vaccine.* 2005;23:2121–31.
 55. McMurry JA, Kimball S, Lee JH, Rivera D, Martin W, Weiner DB, et al. Epitope-driven TB vaccine development: a streamlined approach using immuno-informatics. ELISpot assays, and HLA transgenic mice. *Curr Mol Med.* 2007;7:351–68.
 56. Walker KB, Brennan MJ, Ho MM, Eskola J, Thiry G, Sadoff J, et al. The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine.* 2010;28:2259–70.
 57. Castañón-Arreola M, López-Vidal Y. A second-generation anti TB vaccine is long overdue. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;3:10.
 58. Girard MP, Fruth U, Kieny MP. A review of vaccine research and development: tuberculosis. *Vaccine.* 2005;23:5725–31.
 59. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:2869–73.
 60. Kolibab K, Yang A, Derrick SC, Waldmann TA, Perera LP, Morris SL. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:793–801.
 61. Von Eschen K, Morrison R, Braun M, Ofori-Anyinam O, De Kock E, Pavithran P, et al. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: Tolerability and immunogenicity in humans. *Hum Vaccin.* 2009;5:475–82.