

# **MYCOBACTERIUM 'HABANA' TMC 5135 COMO CANDIDATO VACUNAL CONTRA LA TUBERCULOSIS: EVIDENCIAS EXPERIMENTALES**

**Autoría principal:** Iliana del Carmen Valdés Hernández<sup>1</sup>

**Otros autores:** Rogelio Hernández-Pando, Lilian María Mederos Cuervo, Miguel Antonio Echemendía Font y José Antonio Valdivia Álvarez †

**Colaboradores:** Armando Acosta Domínguez, Dulce Mata-Espinoza y Jorge Barrios-Payán

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, La Habana, Cuba, PO Box: 601, Marianao 13. Teléfono: 255-3527. Fax. 204-6051

<sup>1</sup>Autor de correspondencia. Correo electrónico [iliana@ipk.sld.cu](mailto:iliana@ipk.sld.cu), [ivhdez@infomed.sld.cu](mailto:ivhdez@infomed.sld.cu)

**MSc. Iliana del C. Valdés Hernández** (70%). Diseño, ejecución del trabajo experimental, análisis de los resultados y redacción de los manuscritos a publicar.

**Dr.C. Rogelio Hernández-Pando** (15%). Diseño, análisis de los resultados y revisión de los manuscritos a publicar.

**MSc. Lilliam M. Mederos Cuervo** (5%). Selección de la cepa de M. 'habana', revisión de los manuscritos a publicar.

**Tec. Miguel A. Echemendía Font** (5%). Selección de la cepa de M. 'habana', revisión de los manuscritos a publicar.

**Dr.C. José A. Valdivia Álvarez** (5%). Generación del problema de investigación. Desaparecido físicamente en el comienzo del estudio.

## RESUMEN

**Antecedentes:** La BCG protege solo contra las formas graves de Tuberculosis en la infancia, lo que ha motivado la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. Se encuentra parcialmente reportada, la inmunogenicidad de *M. 'habana'* frente a varias enfermedades producidas por Micobacterias, aspecto que unido a la presencia en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis del IPK de un grupo de aislamientos de *M. 'habana'*, motivaron la realización del presente trabajo.

**Problema a resolver:** Un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*, aparecen más de 8 millones de casos nuevos y más de un millón de muertes anuales por esta enfermedad. Se carece de una vacuna efectiva para prevenir los casos de Tuberculosis pulmonar y reactivación en el adulto, lo que plantea la urgencia en la búsqueda de nuevas soluciones profilácticas. La demostración de la seguridad y protección generada por la vacunación experimental con *M. 'habana'* TMC 5135 permitirá asegurar la continuidad de su estudio como candidato vacunal contra la Tuberculosis.

**Objetivos:** Determinar el potencial vacunal de *Mycobacterium 'habana'* TMC 5135 contra la Tuberculosis experimental.

**Resultados:** Se demostró la seguridad, inmunogenicidad y protección que confiere la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 frente a la Tuberculosis experimental, con el empleo de nuevos modelos animales, el uso de técnicas morfométricas automatizadas y la determinación de factores inmunológicos, no antes descritos en la infección por este agente. Los estudios realizados permitieron contribuir al conocimiento de la biología y la respuesta inmune a este microorganismo. Se introdujo el reto intratraqueal con *M. tuberculosis* en los experimentos dedicados al estudio del potencial protector de *M. 'habana'*, lo que garantiza la simulación de la vía de infección natural. Se demostró que la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 es igualmente protectora que BCG, contra la TB, lo que garantiza la continuidad de su estudio como candidato vacunal en etapas posteriores del desarrollo preclínico. El resultado se encuentra avalado por 3 publicaciones nacionales y 2 publicaciones internacionales. De estas últimas, una corresponde a un capítulo de un libro especializado en el tema y la otra con un trabajo situado en la revista de mayor factor de impacto en el ámbito de las publicaciones experimentales en el campo de la Tuberculosis.

**Conclusiones:** *M. 'habana'* TMC 5135 es atenuada de forma natural, tras infectar modelos animales con inóculos elevados de esta micobacteria. Por su parte, la administración de la dosis vacunal de *M. „habana* TMC 5135 es igual de segura que BCG en modelos animales inmunodeficientes e igualmente protectora, que esta última, impidiendo la progresión de la Tuberculosis experimental. Estos

resultados resultan altamente promisorios y garantizan la continuidad hacia etapas posteriores del desarrollo preclínico de este candidato vacunal.

## COMUNICACIÓN CORTA

Más de cinco décadas han transcurrido desde la introducción de drogas potencialmente eficaces contra la Tuberculosis (TB) en los Programas Nacionales de Control. Sin embargo esta enfermedad continúa siendo un problema de salud a escala mundial constituyendo la segunda causa de muerte entre las enfermedades infecciosas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó, al cierre de 2011, la aparición de 8,7 millones de casos nuevos y 1.4 millones de muertes. A estas cifras se le añade que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, la emergencia de cepas multidrogasresistentes y extremadamente resistentes y el incremento de la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana, presentándose un nuevo escenario para el manejo y control de esta enfermedad (1).

La BCG (Bacilo Calmette-Guérin) continúa siendo la única vacuna disponible para prevenir la TB, desde su introducción en el año 1921. Esta tiene como ventajas su bajo costo y amplio historial de seguridad, a lo se le añade una eficacia protectora mayor del 80% en las formas graves de la enfermedad en la infancia. En contraste, las evidencias de protección contra la TB pulmonar en adolescentes y adultos son en extremo variables (2).

Esta es la principal razón del incremento registrado en los últimos 20 años, en la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. Estos comprenden diferentes estrategias, entre las que se destacan las vacunas vivas atenuadas obtenidas a partir de la inducción de mutaciones en genes que codifican para importantes factores de virulencia de *M. tuberculosis* o a través del uso de micobacterias no tuberculosas (3).

*Mycobacterium 'habana'* se aisló por primera vez por Valdivia *et al.*, en 1971, a partir de pacientes con enfermedad pulmonar indistinguible de una TB. A pesar de que su perfil bioquímico y serológico es similar al de *Mycobacterium simiae* serotipo I (4) existen diferencias antigénicas (5) e inmunogénicas (6) que permanecen sin explicación y se ha mantenido, en la literatura, la denominación *M. 'habana'* para aquellos aislamientos originales de Cuba (7,8).

Existen algunas evidencias que asocian en menor o mayor grado a *M. 'habana'* TMC 5135 con protección contra la infección por *M. tuberculosis* (5), *M. ulcerans* (9), *M. leprae* (10) y *Leishmania donovani* (11). Estos antecedentes sumados a poder contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis del Instituto "Pedro Kourí" (IPK), con aislamientos de *M. 'habana'* motivaron la realización del siguiente trabajo.

### Breve descripción de los principales resultados alcanzados:

*Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. Vol.4, No.2, Año 2014 3*

### **Virulencia de *M. 'habana'* TMC 5135 en un modelo experimental de TB pulmonar progresiva.**

Se realizó la infección intratraqueal de ratones BALB/c, con  $2,5 \times 10^5$  bacilos de la cepa *M. 'habana'* TMC 5135 según un modelo de TB pulmonar progresiva, previamente descrito (12). Paralelamente un grupo control se infectó, siguiendo el mismo protocolo, con *M. tuberculosis* H37Rv. Se determinaron los parámetros de sobrevida, carga bacteriana pulmonar, cambios histopatológicos, así como la expresión de factores inmunológicos tales como:  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , iNOS e IL-4.

La infección con *M. 'habana'* TMC 5135 permitió un 100% de sobrevida en los ratones infectados. En contraste, los animales pertenecientes al grupo control comenzaron a morir tempranamente y para la novena semana todos habían muerto ( $p < 0,05$ ). La carga bacilar pulmonar se correspondió con los resultados de sobrevida, de tal forma aquellos que recibieron la cepa de *M. 'habana'* mostraron valores significativamente menores de unidades formadoras de colonias (UFC) que los pertenecientes al grupo control ( $p < 0,05$ ) (13,14).

El porcentaje de superficie pulmonar afectado por neumonía se tomó como indicador del daño provocado por la infección. Estas se caracterizaron por la presencia de abundantes macrófagos vacuolados intra-alveolares con algunas células gigantes multinucleadas y numerosos linfocitos alveolares e intersticiales rodeando las áreas perivasculares y peribronquiales. Los ratones infectados con *M. 'habana'* TMC 5135 mostraron un porcentaje de consolidación pulmonar significativamente menor que el observado en el grupo inoculado con *M. tuberculosis* ( $p < 0,05$ ). En este último la neumonía abarcó, aproximadamente, un 40% del área pulmonar, luego de 2 meses de la infección intratraqueal (14).

Los granulomas constituyen un sello característico en la protección contra la infección por micobacterias (15). Estos comenzaron a aparecer tempranamente y su talla se incrementó de manera significativa a través del experimento en los ratones receptores de la cepa de *M. 'habana'*. El acmé de la respuesta protectora se alcanzó el día 21, cuando estas estructuras alcanzaron su plena maduración. Al finalizar el experimento los animales que recibieron la cepa TMC 5135 mostraron granulomas tres veces mayores que el grupo control ( $p < 0,05$ ) (14).

La expresión de ARNm específico para varios factores inmunológicos arrojó un incremento progresivo en la expresión de factores inmuno protectores como el  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  y la enzima iNOS, la cual resultó superior a la inducida por *M. tuberculosis* H37Rv. En contraste, se detectó mayor expresión de IL-4 en este último grupo, citoquina que se asocia con la inducción de una respuesta inmune no protectora frente a las micobacterias (14).

Los resultados de este estudio sugieren la atenuación natural de *M. 'habana'* TMC 5135.

### **Biodistribución e Inmunogenicidad de *M. 'habana'* TMC 5135 como vacuna viva en ratones BALB/c.**

Grupos de ratones BALB/c se vacunaron en la base de la sola con 8000 bacilos vivos de *M. 'habana'* TMC 5135. De forma simultánea un grupo control recibió igual dosis de BCG-Phipps (16). A los 15, 30 y 60 días posteriores a la vacunación, los animales se sacrificaron para determinar la biodistribución vacunal, así como la producción de  $\text{IFN-}\gamma$  en respuesta a antígenos relevantes en la protección contra *M. tuberculosis* (CFA, Ag85b y ESAT-6).

Los ganglios linfáticos inguinales, bazo y pulmones de los animales inmunizados con *M. 'habana'* y estimulados con CFA o con Ag85b produjeron niveles significativamente mayores de  $\text{IFN-}\gamma$  que los inmunizados con BCG, luego de 60 días post-vacunación. La estimulación con ESAT-6 indujo valores inferiores a los 15 pg/mL de  $\text{IFN-}\gamma$  en los tres órganos ensayados durante todo el experimento. Estos no mostraron diferencias significativas al compararlos con el grupo control, lo que hace pensar en la ausencia de los genes que codifican para esta proteína en *M. 'habana'*, al igual que sucede en BCG. Se constató diseminación de ambas cepas hacia los diferentes órganos estudiados y se cuantificaron bajas cargas bacilares con tendencia a la esterilización hacia el final del experimento en aquellos inmunizados con *M. 'habana'* TMC 5135 (14, 17). Estos hallazgos evidencian la mayor inmunogenicidad de esta cepa con respecto a la actual vacunación con BCG.

### **Seguridad de la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135 empleada como vacuna viva en ratones inmunodeficientes.**

Se investigó el potencial virulento de *M. 'habana'* TMC 5135 en comparación con BCG empleando un modelo de ratón inmunodeficiente (*nude*, *nu-/nu-*). Los animales inoculados con *M. 'habana'* sobrevivieron por tres semanas más que los que recibieron BCG, lo cual pudiera sugerir una a mayor atenuación de la primera, aunque estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (14, 18). Este comportamiento permite afirmar que *M. 'habana'* TMC 5135 cumple con el II Consenso de Ginebra para los candidatos vacunales vivos contra la TB, el cual plantea que estos deben ser a, al menos, igual de seguros que BCG

### **Protección conferida por la vacunación con la cepa viva '*M. habana'* TMC 5135 en ratones BALB/c tras el reto con *M. tuberculosis* H37Rv**

Se vacunaron subcutáneamente grupos de ratones BALB/c con 8000 bacilos de *M. 'habana'* TMC 5135 y BCG, respectivamente. Luego de dos meses los animales se retaron intratraquealmente con  $2,5 \times 10^5$  células vivas de *M. tuberculosis* H37Rv. En los dos y cuatro meses siguientes al reto se estudió la sobrevida, las cargas bacilares pulmonares, así como se cuantificaron los daños

provocados en el tejido y la respuesta histológica de los animales vacunados a la infección (12).

Todos los ratones vacunados con *M. 'habana'* TMC 5135 o con BCG-Phipps sobrevivieron al reto con *M. tuberculosis* H37Rv. Hacia el final del experimento, se pudo constatar que la carga bacteriana pulmonar no mostraba diferencias significativas entre los grupos de animales vacunados y si con el control sin vacunar, resultados que concuerdan con los niveles de afectación en el tejido, registrado en este último grupo. Se demostró la presencia de granulomas de mayor talla en animales inmunizados con *M. 'habana'*, sin embargo estos no resultaron diferentes del comportamiento de BCG para este parámetro (14). Estos resultados permiten inferir que la vacunación experimental con *M. 'habana'* TMC 5135 impide la progresión de la TB, en la misma medida que BCG y garantizan la continuidad de su estudio como candidato vacunal en etapas posteriores del desarrollo preclínico.

## Referencias bibliográficas

- (1) WHO. Global Tuberculosis Report 2012. ISBN 978 92 4 156450 2.
- (2) Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* 2009;5(2): 70-8.
- (3) van Helden PD, Hoal EG. A new TB vaccine: Fact or fiction?. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2013;36(3):287-94.
- (4) Meissner G, Schröder KH. Relationship between *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium habana*. *Am Rev Respir Dis* 1975;111(2):196-200.
- (5) Mederos LM, Valdivia JA, Sampere MA, Valero-Guillén PL. Analysis of lipids reveals differences between '*Mycobacterium habana*' and *Mycobacterium simiae*. *Microbiology* 1998;144(5):1181-8.
- (6) Gupta HP, Singh NB, Mathur IS, Gupta SK. '*Mycobacterium habana*', a new immunogenic strain in experimental tuberculosis of mice. *Indian J Exp Biol* 1979; 17(11):1190-3.
- (7) Mederos L, Valdivia JA, Valero-Guillén PL. New variants of polar glycopeptidolipids detected in *Mycobacterium simiae*, including „*habana*” strains, as evidenced by electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 2008;105:602–14.
- (8) Valdés I, Echemendía M, Mederos L, Valdivia JA, Montoro E. Aspectos relevantes en el uso de *Mycobacterium 'habana'* como candidato vacunal contra la tuberculosis. *VacciMonitor* 2011;20(3):34-9.
- (9) Singh NB, Mathur IS, Gupta HP, Srivastava A. A novel immunogenic strain '*Mycobacterium habana*' against *Mycobacterium ulcerans* (Buruli ulcer) infection in mice. *Curr Sci* 1981;50:994-6.
- (10) Singh NB, Celia TA, Lave RE, Rees RJW, Colston DMJ. Vaccination of mice against *Mycobacterium leprae* infection. *Infect Immun* 1989;57(2):653-5.
- (11) Anuradha A, Zehra K, Katiyar JC, Gupta HP, Singh NB. Vaccination of hamster with '*Mycobacterium habana*' against *Leishmania donovani* infection. *Current Science* 1995;69(1):90-3.
- (12) Hernández-Pando R, Orozco E, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva Sahd J *et al.* Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996;89:26–33.
- (13) Montoro E, Diaz R, Lemus D, Mederos LM, Valdés I, Martínez MR, Llop A, Valdivia JA. El Laboratorio Nacional de Referencia y su contribución a la eliminación de la tuberculosis en Cuba. *Rev cubana Salud Pub* 2012;38(2):214-29.
- (14) Valdés I, Montoro E, Mata-Espinoza D, Asín O, Barrios-Payán O, Francisco A, Valdivia JA, Hernández-Pando R. Virulence, immunogenicity and protection conferred by *Mycobacterium 'habana'* in a murine model of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (en prensa Septiembre,2013)*
- (15) Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. *Frontiers in Immunology* 2013;3:1-9.
- (16) Castillo-Rodal AI, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, 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):1718–24.

(17) Valdés I, Montoro E, Hernández-Pando R. Producción *in vitro* de interferón  $\gamma$  en ratones vacunados con *Mycobacterium 'habana'* frente a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev cubana Med Trop 2012;64(3):189-95.

(18) Valdés I, Mederos LM, Echemendía M, Valdivia JA, Montoro E. CHAPTER 5.8 *Mycobacterium 'habana'* as a live vaccine candidate against TB. En: Nor N, Acosta A, Sarmientos ME. The Art and Science of Tuberculosis Vaccine Development. pp682-95 (En prensa)

### **Novedad y aportes científicos**

Se demuestra la seguridad, inmunogenicidad y protección de *Mycobacterium 'habana'* TMC 5135 frente a la TB experimental, con el empleo de nuevos modelos animales, el uso de técnicas morfométricas automatizadas y la determinación de factores inmunológicos, no antes descritos en la infección por este agente. La introducción del reto intratraqueal con *Mycobacterium tuberculosis* supone una novedad con respecto a los estudios previos que explotan el reto endovenoso con *M. tuberculosis*, permitiendo simular la vía de infección natural que emplea este patógeno para producir la infección.

- Contribución al conocimiento de la biología y la respuesta inmune a *M. 'habana'* TMC 5135.
- Se estudia, por primera vez, la inducción de respuesta inmune cruzada contra antígenos relevantes para la protección frente a *M. tuberculosis*, la cual superó a la promovida por la vacunación con BCG.
- Se reporta, por primera vez, la seguridad de la vacunación con *M. 'habana'* TMC 5135, tomando como referente la vacunación con BCG, como establecen las normativas internacionales para el estudio de candidatos vacunales vivos contra la TB.
- La protección conferida por *M. 'habana'* TMC 5135 es igual a la inducida por BCG lo que garantiza la continuidad de su estudio como candidato vacunal en etapas posteriores del desarrollo preclínico.