

Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente

Nadine Álvarez¹, Reinier Borrero¹, Fátima Reyes¹, Frank Camacho¹, Norazmi Mohd², María Elena Sarmiento¹, Armando Acosta¹

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación–Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba. AP. 16017, CP11600.

² School of Health Sciences, University Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Malaysia.

email: nalvarez@finlay.edu.cu

Mycobacterium tuberculosis, el agente causal de la tuberculosis, infecta aproximadamente alrededor de 54 millones de personas en todo el mundo cada año y constituye una de las principales causas de muerte entre las enfermedades infecciosas. La mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan una infección latente, etapa en la que este microorganismo sobrevive dentro del hospedero, evadiendo los mecanismos de defensa del sistema inmune del portador. La terapia actual de la tuberculosis comprende la administración de cuatro antimicrobianos durante seis meses. No obstante, *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir después de varios meses de tratamiento con esa terapéutica antimicrobiana combinada. Existen evidencias de que el bacilo tuberculoso, durante la fase estacionaria de crecimiento, incrementa su tolerancia a los ambientes de estrés. El costo de los fármacos empleados para el tratamiento y el incremento de cepas de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes constituyen uno de los motivos principales para desarrollar una nueva vacuna contra la tuberculosis. Sin embargo, su erradicación está afectada por la capacidad que posee el bacilo tuberculoso de sobrevivir en estado de latencia durante décadas, en las condiciones de hipoxia y causar infecciones recurrentes.

Palabras clave: Tuberculosis, genes de latencia, persistencia, reactivación.

Introducción

La tuberculosis (TB) representa uno de los problemas más graves de salud en la actualidad. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, considerándose que es responsable de nueve millones de casos nuevos y de más de dos millones de muertes anuales en el mundo (1). La mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan una infección latente, proceso en el que este microorganismo persiste en un estado de latencia durante períodos prolongados (2). En una proporción relativamente pequeña de esta población la infección puede reactivarse y causar una TB activa. Los mecanismos por los cuales *M. tuberculosis* permanece latente y luego se reactiva no están bien dilucidados y pueden atribuirse a factores propios del microorganismo y a la respuesta inmune del hospedero (3).

A pesar de que a partir del bacilo de Calmette-Guérin, *Mycobacterium bovis* (BCG), se obtiene la única vacuna que se aplica contra la TB en el mundo, se ha podido demostrar su gran variabilidad de protección, la que en ocasiones puede ser nula contra las formas más frecuentes de la enfermedad (TB pulmonar en los adultos), comportamiento que se atribuye en la mayoría de los casos a la reactivación de una infección latente. El BCG no protege contra la TB pulmonar ni contra la fase latente de la enfermedad. Una de las causas que atenta contra la protección del BCG es la amplia gama de cepas de

M. bovis que se emplean para la obtención de esa vacuna (4).

En estos momentos, la emergencia de cepas de *M. tuberculosis* extremadamente resistentes a las drogas antituberculosas de primera y segunda línea (XDR-TB), incrementa la necesidad de desarrollar una vacuna más eficaz contra la TB, con el adecuado control de la misma y que sea efectiva contra la latencia de *M. tuberculosis* (5). A nivel experimental existen muchos intentos de desarrollar nuevos candidatos vacunales, sin embargo, ninguno ha demostrado una protección efectiva contra la TB latente (6).

Mecanismos de escape de *M. tuberculosis* a la respuesta inmune del hospedero

M. tuberculosis, durante la infección en los humanos, atraviesa por diferentes estados o fases, etapas que pueden agruparse en: una fase activa o replicativa, caracterizada por la replicación inicial de *M. tuberculosis* que estimula la inmunidad mediada por células; una fase de latencia, período donde disminuye la maquinaria metabólica celular, pero que no se detecta la presencia del bacilo y, finalmente, una fase de reactivación, estado que se establece en el 10% de los individuos inmunocompetentes. Este proceso de reactivación tiene una mayor incidencia en individuos inmunológicamente suprimidos (7).

La infección por *M. tuberculosis* es un proceso complejo. Luego de la exposición inicial, el bacilo puede penetrar y replicarse dentro de los macrófagos no activados. Subsecuentemente, la respuesta inmune del hospedero mediada por los linfocitos T auxiliares tipo I (Th1), con la liberación de IL-12, IFN- γ y TNF- α , resulta en la formación del granuloma, tejido constituido por macrófagos y linfocitos que rodean un área central de necrosis (8). Otros estudios señalan la presencia del bacilo tuberculoso latente, no sólo en los macrófagos de los granulomas, sino también en las células fagocíticas no profesionales. De hecho *M. tuberculosis* se aísla de biopsias de pulmón con una apariencia normal (9).

El granuloma se caracteriza por poseer un ambiente hipóxico, situación responsable de mantener bajos los niveles de replicación bacteriana. Así mismo, en su interior pueden formarse lesiones necróticas que permiten la presencia de *M. tuberculosis* en el espacio extracelular, favoreciéndose la existencia de microambientes con áreas anaeróbicas. De este modo, la adaptación a los bajos niveles de oxígeno es un factor importante que incrementa la capacidad de *M. tuberculosis* para persistir en el hospedero. Sin embargo, el desarrollo de la necrosis no conduce necesariamente a la diseminación y puede proveer un ambiente que prevenga la transmisión y dispersión de la TB (10). En modelos animales se demuestra que el TNF- α desempeña un papel esencial en la respuesta inmune del hospedero contra la TB, incluyendo la formación del granuloma y la contención de la enfermedad (11).

La mayor parte de los componentes estructurales de las micobacterias son de naturaleza sacarídica, estructuras reconocidas por diversos receptores en los macrófagos y otros tipos celulares (linfocitos T) (12). Algunas de estas estructuras moleculares de las micobacterias son también responsables de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, pues son capaces de inhibir o interferir con los mecanismos microbicidas del macrófago infectado (13).

El medio intracelular confiere ventajas importantes a las micobacterias debido a que quedan protegidas de los mecanismos efectores de la respuesta inmune del hospedero, como la lisis por el complemento; además, las características estructurales de su envoltura le proporcionan resistencia a los agentes microbicidas, a los fármacos y a la destrucción por el calor (14). El establecimiento de la infección también depende de la interacción inicial entre los componentes de superficie de las micobacterias con los receptores de la célula hospedera.

Al utilizar receptores como el CR3, la entrada de las micobacterias patógenas puede inhibir los mecanismos microbicidas del macrófago, de manera que esta interacción inicial resulta crítica en la patogénesis de la TB y en la persistencia de la bacteria en el interior de la célula hospedera (15).

Latencia

La fisiología de *M. tuberculosis* durante el estado latente de la infección ha sido difícil de esclarecer. La carencia de modelos animales accesibles que reproduzcan las condiciones que se ponen de manifiesto durante la enfermedad latente, obstaculiza la aplicación de técnicas genéticas convencionales para la identificación de genes claves involucrados en la supervivencia de *M. tuberculosis* durante este estadio.

La latencia en la infección por *M. tuberculosis* es un término definido por Amberson (16) como la presencia de cualquier lesión tuberculosa incapaz de producir síntomas que indiquen su presencia. Algunas de las personas expuestas a *M. tuberculosis* desarrollan una elevada respuesta inmune mediada por células que contrarresta el progreso de la infección, limitándolo así al sitio de invasión inicial en el parénquima del pulmón y los linfonodos locales, estructura también llamada como "complejo de Ghon" (17). Sin embargo, en la mayoría de los casos es muy difícil la erradicación completa de *M. tuberculosis*. La infección latente puede reactivarse luego de varios años e incluso tras décadas de persistencia subclínica, conduciendo a la enfermedad progresiva y a la transmisión activa de este patógeno.

Se asume, de forma general, que el establecimiento de una TB latente es consecuencia de la cura incompleta de las lesiones tuberculosas, lesiones que constituyen los sitios de persistencia del bacilo de la TB latente y donde la relación entre el hospedero y la bacteria estimula el proceso de reactivación. La interrogante consiste en cómo vincular este suceso con el hecho de que el sistema inmune humano es capaz de ofrecer una respuesta vigorosa contra *M. tuberculosis*. Aunque localmente destructiva, la respuesta necrotizante puede conducir a una fibrosis de las lesiones tuberculosas, a la necrosis de tipo caseosa y a la calcificación de los tejidos cercanos (18).

Estudios previos plantean que tanto las células T CD4⁺ como CD8⁺ y las citoquinas (IFN- γ y TNF- α) desarrollan un papel importante en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* y en el control de la infección latente (19). Durante la infección latente, el bacilo tuberculoso capaz de persistir en el organismo se somete a condiciones limitantes de nutrientes y oxígeno, así como de moléculas microbicidas (intermediarios del nitrógeno y de oxígeno reactivo). Otros estudios confirman que *M. tuberculosis* puede experimentar cambios en la composición de su pared celular, variaciones que influyen en el establecimiento del estado de latencia de la infección por este microorganismo.

Como resultado de esta variación se pueden falsear los resultados de la tinción de Ziehl-Neelsen, obteniéndose resultados negativos en el diagnóstico de pacientes que padecen una TB activa (20); resultados que se han podido confirmar mediante un método dependiente de la

composición de la pared celular de *M. tuberculosis*, conocido como “tinción fluorescente con rodamina/auramina”, técnica comúnmente empleada para detectar micobacterias y que tiene en cuenta sus propiedades ácidas (21). Tales alteraciones pueden producirse por pérdida o reorganización de los componentes de la pared celular, lo que se traduce en la no retención de la tinción en el soma del bacilo tuberculoso y repercute en el diagnóstico, la quimioterapia y el desarrollo de las estrategias vacunales.

Modelos in vivo e in vitro de la infección latente con *M. tuberculosis*

Se han realizado numerosos estudios que pretenden simular in vivo e in vitro las condiciones establecidas durante el estado de latencia de la infección por *M. tuberculosis*. Estos modelos pueden agruparse en cuatro tipos: hipoxia, inanición, persistencia en los macrófagos e infección murina. Cada uno de estos sistemas mimetiza algunas de las manifestaciones de la enfermedad clínica, sin embargo, ninguno reproduce totalmente las condiciones establecidas durante la infección latente. En combinación con estos modelos se emplean diversas y modernas tecnologías que incluyen, entre otras, los microarreglos, el análisis proteómico y la reverso transcripción cuantitativa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, con el objetivo de caracterizar *M. tuberculosis* en diferentes modelos de persistencia (22).

Aunque prevalece el consenso general de que la TB en el adulto se produce por la reactivación de la infección latente asociada con alguna inmunodeficiencia predisponente, existe controversia con el hecho de que algunos pacientes inmunocompetentes sanos con una prueba de tuberculina (PPD) positiva, pueden reinfectarse de forma exógena. Desafortunadamente, los experimentos diseñados para esclarecer dicha contradicción han fracasado por las insuficiencias de los modelos existentes para estudiar la infección latente (23).

Los modelos in vitro desarrollados para estudiar la TB latente demuestran que el microambiente del hospedero es rico en intermediarios del nitrógeno, pero deficiente en los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (24), sugiriéndose que el bacilo tuberculoso persiste en forma metabólicamente inactiva.

El modelo de Wayne o de persistencia no replicativa, refleja algunos de los aspectos de la situación in vivo, representando la naturaleza hipóxica del granuloma, sin embargo carece del efecto de la respuesta inmune, la fagocitosis por los macrófagos y la eventual liberación al medio extracelular (25). Este modelo se basa en el crecimiento de *M. tuberculosis* con niveles de oxígeno disminuidos, ambiente microaerofílico donde la micobacteria se transforma en una forma persistente no replicativa.

Para los estudios in vivo, el ratón constituye el modelo experimental más utilizado para simular la patogénesis de la TB, sin embargo, existen otros modelos potenciales (curieles, conejos y primates) (26). Adicionalmente, la aplicación de nuevas tecnologías posibilita analizar la fisiología de *M. tuberculosis* directamente de los tejidos obtenidos a partir de los humanos infectados.

El modelo murino se emplea con el objetivo de reproducir el estado de latencia y de reactivación de la TB, con el objetivo de conocer la respuesta inmunológica que se produce en ambas fases de la infección. Sin embargo, a pesar de que dicho modelo replica muchas características de la respuesta inmune en los humanos (27), no muestra granulomas bien formados y carece del centro necrótico caseoso característico de la infección (28). Poco se conoce sobre la naturaleza de la infección latente in vivo.

Se plantea que el bacilo latente es metabólicamente menos activo y que su velocidad de replicación disminuye drásticamente comparado con el comportamiento del bacilo en la infección activa (29). Así mismo, está establecido que el control de la replicación bacteriana en los modelos animales de latencia requiere de un sistema inmune funcional que incluya la producción de IFN- γ , TNF- α y de óxido nítrico (30).

Genes de latencia

La capacidad que posee *M. tuberculosis* para sobrevivir dentro de las células es el resultado de un complejo y exquisito control de su regulación genética. La expresión diferencial de algunos genes regulatorios puede ser determinante en la infección por el patógeno o para su capacidad de persistir dentro del hospedero. En los últimos años se realizan numerosas investigaciones que constatan la correlación existente entre los diferentes reguladores transcripcionales y la diversidad de condiciones ambientales que pueden originar un estrés celular. Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la micobacteria persiste en presencia de diferentes situaciones de estrés (cambios bruscos de temperatura, hipoxia, ausencia de hierro o zinc, presencia de óxido nítrico y estrés oxidativo) (31, 32).

La expresión de los genes de *M. tuberculosis* se evalúa, estudiando secciones del tejido pulmonar de pacientes con una TB activa crónica mediante el análisis por RT-PCR o por hibridación *in situ* ARN-ARN. En el caso de los modelos animales de experimentación, una de las técnicas desarrolladas para estudiar la expresión de estos genes ha sido la formación de granulomas artificiales, tejido donde se pueden medir los niveles de expresión en los diferentes intervalos de tiempo (33). Los estudios de la expresión genética permiten la identificación de los genes involucrados en la adaptación de *M. tuberculosis* al ambiente del pulmón durante la infección.

La distribución específica de la expresión de los genes sugiere que existen diferentes microambientes dentro del granuloma, condición que le permite al bacilo adoptar diversos estados metabólicos. La habilidad para adaptarse a los diversos microambientes promueve la supervivencia frente al sistema inmune del hospedero, así como al estrés producido por los agentes quimioterapéuticos.

Publicaciones anteriores refieren la expresión de genes de latencia in vivo durante la infección tuberculosa activa en los humanos y los ratones, demostrándose que los genes de latencia no son exclusivos de esta fase de la enfermedad, sino que algunos pueden expresarse en la fase activa y de latencia. Se demuestra que la respuesta inicial de *M. tuberculosis* a la hipoxia se regula por dos componentes del regulón dosR, también llamados devR, Rv3133c (34).

La fosforilación de dosR, por cualesquiera de los dos sensores de histidina kinasas, dosS o dosT, conduce a la inducción de 50 genes (Tabla 1) (35), muchos con función desconocida. Además, se conoce la existencia de genes que inducen una respuesta transcripcional más duradera que la estimulada por el regulón dosR en respuesta a las condiciones de hipoxia (36). El regulón dosR se induce también en respuesta al óxido nítrico, en los cultivos estacionarios donde se generan gradientes de hipoxia, y luego de la infección de los macrófagos, ratones y curieles (37).

Algunas de estas condiciones están influenciadas por el grado de replicación del bacilo tuberculoso, sugiriendo que el rol de dosR puede no ser específico en la latencia y que otros factores pueden estar también involucrados en la respuesta a la latencia de *M. tuberculosis*.

Así mismo, Hampshire, *et al*, señalaron cuatro genes sobreexpresados en relación con la respiración anaerobia (*narG*, *cysH*, *nirA* y *fdhF*) y cinco cuya manifestación se reprime con la respiración aerobia (*nuoA/D/J/L* y *glpD2*), aún en presencia de elevados niveles de oxígeno (38). Se sugiere, además, que los regulones asociados con la hipoxia pueden regularse de forma independiente como consecuencia del estado metabólico relacionado con la fase estacionaria.

Otro grupo de genes, además de regularse en el pulmón del ratón, se ajustan durante la estimulación in vitro de *M. tuberculosis*, en modelos donde existen condiciones de estrés tales como la hipoxia, carencia de nutrientes, exposición al óxido nítrico (39), o la supervivencia dentro del microambiente del macrófago (40). Estos genes incluyen los homólogos de la isocitrato liasa (*aceA*) o isocitrato deshidrogenasa (*icd*), además de los que codifican las proteínas involucradas en la respiración aerobia/anaerobia. Estudios realizados en los tejidos humanos, demuestran que el aumento de los niveles de isocitrato liasa, en respuesta a la ingestión de macrófagos, conduce a la supervivencia del bacilo vía β -oxidación de los ácidos grasos (41).

Tabla 1. Genes del regulón dosR de *Mycobacterium tuberculosis* expresados durante las condiciones de hipoxia.

ID	Gen	Función	ID	Gen	Función
Rv0079	Rv0079	Proteína hipotética	Rv2029c	pfkB	Fosfofructoquinasa
Rv0080	Rv0080	Proteína hipotética	Rv2030c	Rv2030c	Proteína hipotética
Rv0081	Rv0081	Proteína reguladora transcripcional	Rv2031c	hspX	Proteína de estrés térmico al calor
Rv0082	Rv0082	Oxidorreductasa	Rv2032	Acg	Proteína transportadora
Rv0083	Rv0083	Oxidorreductasa	Rv2623	TB31.7	Proteína hipotética
Rv0569	Rv0569	Proteína hipotética	Rv2624c	Rv2624c	Proteína hipotética
Rv0570	nrdZ	Involucrada en la replicación del ADN	Rv2625c	Rv2625c	Proteína hipotética
Rv0571c	Rv0571c	Proteína hipotética	Rv2626c	Rv2626c	Proteína hipotética
Rv0572c	Rv0572c	Proteína hipotética	Rv2627c	Rv2627c	Proteína hipotética
Rv0574c	Rv0574c	Proteína hipotética	Rv2628	Rv2628	Proteína hipotética
Rv1733c	Rv1733c	Proteína transmembrana	Rv2629	Rv2629	Proteína hipotética
Rv1734c	Rv1734c	Proteína hipotética	Rv2630	Rv2630	Proteína hipotética
Rv1736c	narX	Nitrato reductasa	Rv2631	Rv2631	Proteína hipotética
Rv1737c	nark2	Transportador de nitrito/nitrato	Rv2830c	Rv2830c	Proteína hipotética
Rv1738	Rv1738	Proteína hipotética	Rv3126c	Rv3126c	Proteína hipotética
Rv1812c	Rv1812c	Deshidrogenasa	Rv3127	Rv3127	Proteína hipotética
Rv1813c	Rv1813c	Proteína hipotética	Rv3128c	Rv3128c	Proteína hipotética
Rv1996	Rv1996	Proteína hipotética	Rv3129	Rv3129	Proteína hipotética
Rv1997	ctpF	Transportadora de cationes metálicos	Rv3130c	Tgs1	Síntesis de trimetil guanosina
Rv2003c	Rv2003c	Proteína hipotética	Rv3131	Rv3131	Proteína hipotética
Rv2004c	Rv2004c	Proteína hipotética	Rv3132c	devS	Proteína quinasa
Rv2005c	Rv2005c	Proteína hipotética	Rv3133c	devR	Proteína reguladora
Rv2006	otsB1	Involucrada en la biosíntesis de trealosa	Rv3134c	Rv3134c	Proteína hipotética
Rv2007c	fdxA	Involucrada en la transferencia de electrones	Rv3841	bfrB	Bacterioferritina
Rv2028c	Rv2028c	Proteína hipotética			

Los factores sigma, debido a su importante rol en la regulación genética de *M. tuberculosis* en respuesta al estrés ambiental, son objeto de investigaciones encaminadas al estudio de la virulencia (42). Se demuestra que el principal factor sigma micobacterial, RpoV, confiere virulencia a una cepa de *M. bovis* atenuada en un modelo de TB en curieles (43).

Los factores sigma *sigB*, *sigE* y *sigH* modifican la expresión de un subgrupo de genes necesarios para la adaptación al estrés in vivo (44) y su regulación se asocia con algunos tipos de estrés. Por otro lado, el estudio de los niveles de expresión de *rpoA*, cuyo incremento sugiere que el funcionamiento de las ARN polimerasas es vital en la supervivencia de la población estacionaria, indica que el bacilo tuberculoso persistente es transcripcionalmente activo (45).

De forma adicional, la enzima *rel* de *M. tuberculosis* está relacionada con la adaptación inicial al exceso de nutrientes y por consecuencia, se requiere para la supervivencia de la micobacteria durante largos períodos en condiciones de ayuna in vitro (46).

Otra proteína de especial interés es la *hspX* o *Acr*, detectada en niveles elevados durante la fase estacionaria (47) y media exponencial del cultivo de *M. tuberculosis* (48). Evidencias experimentales indican que esta proteína se necesita para el crecimiento de la micobacteria en cultivo de los macrófagos y que se induce en condiciones de hipoxia (49).

Nuevas estrategias para el control de la infección latente por *M. tuberculosis*

Aún cuando BCG es la vacuna más ampliamente usada para el control de la TB en el mundo, debido a su eficacia altamente variable, se hace muy necesario el desarrollo de una vacuna contra la TB pulmonar, capaz de reemplazar a la actual BCG (50). Los avances en la caracterización de genes y antígenos de *M. tuberculosis* y el desarrollo tecnológico (51), con la posterior secuenciación del genoma de diferentes especies de micobacterias (52), han contribuido al diseño de vacunas de nueva generación contra la TB. A esto se suma el mayor entendimiento de los mecanismos básicos de la respuesta inmune involucrados en la infección por *M. tuberculosis*, así como la posibilidad de manipular genéticamente el microorganismo, permitiendo la inactivación de genes seleccionados y hasta la atenuación del bacilo (53).

En la actualidad existen algunos candidatos vacunales en etapas de preclínica avanzada o en ensayo clínico, con el objetivo de desarrollar una vacuna que pueda reemplazar al BCG. Entre las nuevas estrategias se encuentran candidatos de vacunas de subunidades mediante el empleo de antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis* como por ejemplo ESAT-6, el cual confiere cierto grado de protección contra la infección por *M. tuberculosis* en ratones (54) y en primates no humanos (55).

Otra de las estrategias más ampliamente utilizada para desarrollar una vacuna consiste en el desarrollo de antígenos de BCG recombinantes, dentro de las cuales se encuentra la vacuna de BCG recombinante (rBCG30). Dicha vacuna expresa y secreta la proteína de 30 kDa de *M. tuberculosis*, la cual se ha demostrado que está relacionada con la supervivencia en modelos de experimentación luego de la infección con BCG (56).

Por otro lado, también se trabaja en las estrategias basadas en vacunas vivas a partir de la atenuación de *M. tuberculosis*, donde se ha demostrado, entre otros resultados, que la no expresión de genes como *Mce* de *M. tuberculosis*, disminuye los niveles de virulencia e incrementa la inmunogenicidad, proporcionando una elevada protección contra la TB en el

modelo murino (57). Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado una vacuna experimental que resulte más eficaz que el BCG en los modelos animales, por lo que tal vez el enfoque más atractivo consista en enriquecer el BCG con epítopes de proteínas claves involucradas en la patogénesis de *M. tuberculosis*.

Entre las variantes de obtención de nuevos candidatos vacunales contra la infección latente de la TB, una de las estrategias con grandes avances es la vacuna denominada RUTI, preparado terapéutico obtenido por Cardona (58). Este inmunógeno se elabora a partir de fragmentos de células de *M. tuberculosis*, detoxificados y liberados en liposomas, y se administra de forma combinada con la quimioterapia a corto plazo, como parte del tratamiento de la infección latente por *M. tuberculosis*.

El diseño de la terapia combinada se basa en las propiedades bactericidas de la quimioterapia para matar los bacilos en crecimiento activo, eliminar la capa más externa de los macrófagos esponjosos característicos de lesiones de los pacientes con TB y reducir la respuesta inflamatoria local. Además, RUTI puede emplearse con el objetivo de reducir la probabilidad de reactivación del crecimiento de los bacilos tuberculosos latentes.

Esta vacuna demuestra su eficacia en el control de la infección latente en los modelos experimentales de ratón y curiel, luego de un corto período de quimioterapia, mostrando la inducción mixta de respuesta Th1, Th2 y Th3 (59), sin toxicidad local o sistémica. Los modelos experimentales utilizados en ratones y curieles infectados por aerosoles, con pequeñas dosis de *M. tuberculosis*, demuestran una reducción de la carga bacilar y una disminución del porcentaje de infiltración granulomatosa pulmonar después del tratamiento con esa vacuna. Al estudiar la respuesta inmune celular, se señala que el efecto terapéutico de RUTI, está ligado no sólo a la inducción de la respuesta Th1, sino también a la estimulación de una rápida y fuerte respuesta inmune específica frente a los antígenos estructurales y relacionados con el crecimiento que reduce tanto la carga bacilar como la patología pulmonar (60).

La obtención de nuevas drogas y vacunas contra la TB es difícil debido a que no existe una correlación directa entre los resultados obtenidos en los modelos experimentales utilizados y el curso real de la infección en el humano. La carencia de una correlación clara entre la efectividad de nuevas vacunas en los modelos animales y en los humanos, significa que la validación de nuevas terapias en modelos experimentales debe interpretarse con extrema precaución.

La infección latente de *M. tuberculosis* representa uno de los mayores obstáculos que dificultan el control y erradicación de la TB en el mundo. Se conoce muy poco aún sobre el estado del bacilo durante la latencia y en la actualidad continúan desarrollándose estudios de mutagénesis y del

perfil de expresión de diversos reguladores activos durante el crecimiento de *M. tuberculosis* en los macrófagos y en los órganos de los modelos animales de experimentación. Un elemento clave que permitirá profundizar en los mecanismos utilizados por *M. tuberculosis* para persistir en el hospedero será el desarrollo de nuevos modelos experimentales (in vitro e in vivo) que reproduzcan, con mayor fidelidad, las condiciones establecidas durante la infección latente de la TB. El estudio *in silico* de los diferentes genes involucrados en el establecimiento de la latencia, aportará una mayor información sobre los cambios que experimenta la bacteria en el estado de persistencia y evasión de la respuesta inmune del hospedero, conocimientos que podrán utilizarse para el desarrollo de nuevos tratamientos, métodos de diagnóstico y vacunas contra la TB.

Referencias

- Cegielski JP, Chin DP, Espinal MA, Frieden TR, Cruz RR, Talbot EA, et al. The global tuberculosis situation: progress and problems in the 20th century, prospects for the 21st century. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16:1-7.
- Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1(2):97-105.
- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998; 6(3):107-12.
- Lawn SD, Wilkinson R. Extensively drug resistant tuberculosis. *BMJ* 2006; 333:559-60.
- Skeidy YA, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:469-76.
- Quirós AB. Nuevas vacunas contra la tuberculosis obtenidas a partir de los avances inmunitarios y genéticos. *Bol Pediatr* 2006; 46:7-22.
- Honer zu BK, Russell DG. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol* 2001; 9:597-605.
- Fenhalls G, Stevens L, Moses L, Bezuidenhout J, Betts JC, van Helden P, et al. In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infections and Immunity* 2002; 70(11):6330-8.
- Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, Rook GA, et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000;356:2133-8.
- Raupach B, Kaufman SHE. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:417-28.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscro H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002;168:4620-7.
- Ernest JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;66:1277-81.
- Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996; 64:683-90.
- Wolinsky E. Mycobacterium. En: Davis B, Dublecco R, Eisen H, Ginisber H. Tratado de microbiología. México: Salvat; 1990:589-604.
- Besra GS, Chatterjee J. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. ASM Press;1994:285-306.
- Amberson JB. The significance of latent forms of tuberculosis. *N Engl J Med* 1938; 219:572-6.
- Ghon A. The primary complex in human tuberculosis and its significance. *Am Rev Tuberc* 1923;7:314-7.
- Josephine E. Clark-Curtiss and Shelley E. Haydel. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. 2006;57:517-49.
- Leyten EMS, Lin MY, Franken KLMC, Friggen AH, Prins C, van Meijgaarden KE, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigenic encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* 2006; 8:2052-60.
- Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, Pradl, Jorg S, Krenn V, Morawietz L, Kaufmann SHE Aichele P. Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infections. *JID* 2003;188:1326-31.
- Kommareddi S, Abramowsky C, Swinehart G, Hrabak L. Nontuberculous mycobacterial infections: comparison of the fluorescent auramine-O and Ziehl-Neelsen techniques in tissue diagnosis. *Hum Pathol* 1984;15:1085-9.
- Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis* 2004;84:218-27.
- Kashino SS, Ovendale P, Izzo A, Campos-Neto A. Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006;13:1014-21.
- Betts JC, Luckey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 2002;43:717-31.
- Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 1996;64:2062-9.
- Abbott A. Live lung tissue enlisted in fight against tuberculosis. *Nature* 2002;415:823.
- Boshoff HI, Barry CE. Tuberculosis metabolism and respiration in the absence of growth. *Nt Rev Microbiol* 2005;3:70-80.
- Rhoades ER, Frank AA, Orme IM. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1997;78(1):57-66.

29. Wayne LG, Sohskey CD. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55:139-63.
30. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun* 2001;69:4195-201.
31. Rodríguez GM, Smith I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Mol Microbiol* 2003; 47:1485-94.
32. Geiman DE, Raghunan TR, Agarwal N, Bishai WR. Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis* whiB-like genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2836-41.
33. Karakousis PC, Yoshimatsu T, Lamichhane G, Woolwine SC, Nuermberger EL, Grosset J, Bishai WR. Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. *J Exp Med* 2004;200:647-57.
34. Park HD, Guinn KM, Harrell MI, Liao R, Voskuil MI, Tompa M, et al. Rv3133c/ dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2003;48:833-43.
35. Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, Hol WG, Sherman DR. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2004;279:23082-7.
36. Rustad TR, Harrell MI, Liao R, Sherman DR. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 2008; 3(1):e 1502. doi/10.1371/journal.pone.0001502.
37. Sharma D, Bose A, Shakila H, Das TK, Tyagi JS, Ramanathan VD. Expression of mycobacterial cell division protein, FtsZ, and dormancy proteins, DevR and Acr, within lung granulomas throughout guinea pig infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48:329-36.
38. Hampshire T, Soneji S, Bacon J, James BW, Hinds J, Laing K, et al. Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms? *Tuberculosis* 2004; 84:228-38.
39. Schnappinger D, Ehrst S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, et al. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med* 2003; 198:369-704.
40. Talaat AM, Ward SK, Wu CW, Rondon E, Tavano C, Bannantine JP, et al. Mycobacterial bacilli are metabolically active during chronic tuberculosis in murine lungs: insights from genome-wide transcriptional profiling. *J Bacteriol* 2007; 189:4265-74.
41. McKinney JD, Honer zu BK, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000; 406:735-8.
42. Gómez JE, Chen, Bishai WR. Sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1997;78:175-83.
43. Gómez M, Doukhan L, Nair G, Smith I. sigA is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 1998; 29:617-28.
44. Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Dubnau E, Gomez M, Smith I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma (H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expresión. *Mol Microbiol* 2002; 45:365-74.
45. Hu Y, Mangan JA, Dhillon J, Sole KM, Mitchison DA, Butcher PD, Crates AR. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. *J Bacteriol* 2000;182:6358-65.
46. Primm TP, Andersen SJ, Mizrahi V, Avarbock D, Rubin H, Barry CE. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long term survival. *J Bacteriol* 2000;182:4889-98.
47. Desjardin LE, Hayes LG, Sohaskey CD, Wayne LG, Eisenach KD. Microaerophilic induction of the α -crystallin chaperone protein homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2001;183:5311-6.
48. Yuan Y, Crane DD, Barry CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis* of the mycobacterial α -crystallin homolog. *J Bacteriol* 1996;178:4484-92.
49. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR and Barry CE. The 16-kDa α -crystallin (Acr) Protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for the growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9578-83.
50. Kaufmann SH, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* 2005; 11:S33-S44.
51. Clark-Curtiss JE, Haydel SE. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:517-49.
52. 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.
53. Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs WR, Gicquel B, Guilhot C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10955-60.
54. 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.
55. Langermans JA, Doherty TM, Vervenne RA, van der Laan T, Lyashchenko K, Greenwald R, et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* 2005; 23:2740-50.
56. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13853-8.
57. Aguilar LD, Infante E, Bianco MV, Cataldi A, Bigi F, Pando RH. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* mce-2 and mce-3 mutants in a Balb/c mouse

- model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine* 2006; 24:2333-42.
58. Cardona PJ. RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis* 2006; 86(3-4):273-89.
59. Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, et al. Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* 2005; 23:1393-8.
60. Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona PJ. Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1229-37.

Mechanisms of evasion and persistence of *Mycobacterium tuberculosis* during the latency state and potential strategies to control latent infection

Abstract

Mycobacterium tuberculosis, the causative agent of tuberculosis, infects approximately 54 million people around the world each year and is a leading cause of death among infectious diseases. Most individuals infected with *M. tuberculosis* develop a latent infection stage at which this organism survives within the host, evading the defense mechanisms of the host immune system. Current TB therapy involves administration of four antibiotics for six months. However, *M. tuberculosis* is able to survive after several months of treatment with this antimicrobial combination therapy. There is evidence that the TB bacilli during the stationary phase of growth, increases tolerance to stress environments. The cost of drugs used for treatment and the increase of *M. tuberculosis* multidrug resistant strains, is one of the main reasons for developing a new vaccine against tuberculosis. However, the elimination of the disease has been prevented by the ability of the bacillus to both survive in latency for decades, under conditions of hypoxia and to cause recurrent infections.

Keywords: Tuberculosis, latency genes, persistence, reactivation.

Recibido: Octubre de 2008

Aceptado: Febrero de 2009