

Informe final

1. **Título del proyecto.** Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos.

2. **Nombre completo del responsable técnico e institución de adscripción.** Dr. Rogelio Hernández Pando. Sección de Patología Experimental. Departamento de Patología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran"

3. **Período que se reporta.** Reporte final

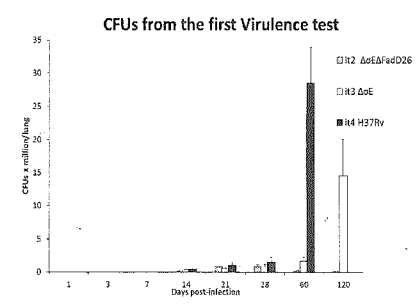
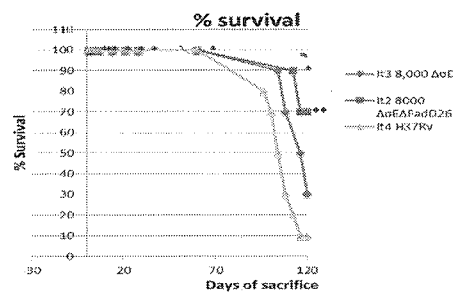
4. **Listado de los objetivos alcanzados.** Los objetivos propuestos fueron:  
Objetivos Generales: Obtener una bacteria mutante atenuada, una BCG recombinante y un esquema de vacunación usando péptidos solubles dializables de linfocitos como vacunas de subunidad para reforzar la vacuna BCG, que sean igual o más protectoras que la vacuna BCG convencional en ensayos preclínicos in-vivo

Todos estos objetivos fueron alcanzados en los experimentos realizados en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c como se describe a continuación en cada uno de los objetivos específicos

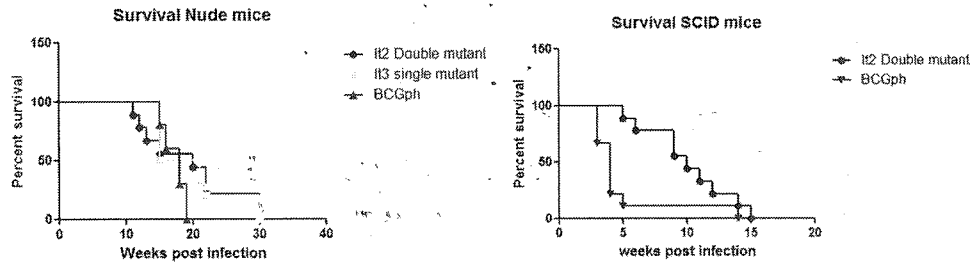
Objetivos específicos:

1.- Determinar el nivel de virulencia e inmunogenicidad de la bacteria doble mutante sigE/fadD26.

La sobrevivencia de los ratones infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de bacterias (250, 000), mostro que los ratones infectados con la doble mutante (cuadros rojos) sobrevivieron 70% después de 4 meses de infección, mientras que los infectados con las bacterias parentales (triángulos verdes) solo sobrevivieron el 10% y los infectados con la mutante sigE el 30%. Estos resultados correlacionaron bien con la determinación de la carga bacilar pulmonar (CFU), la cantidad de bacterias fue significativamente menor en los pulmones de los ratones infectados con las bacterias doble mutante sigE/fadD26.

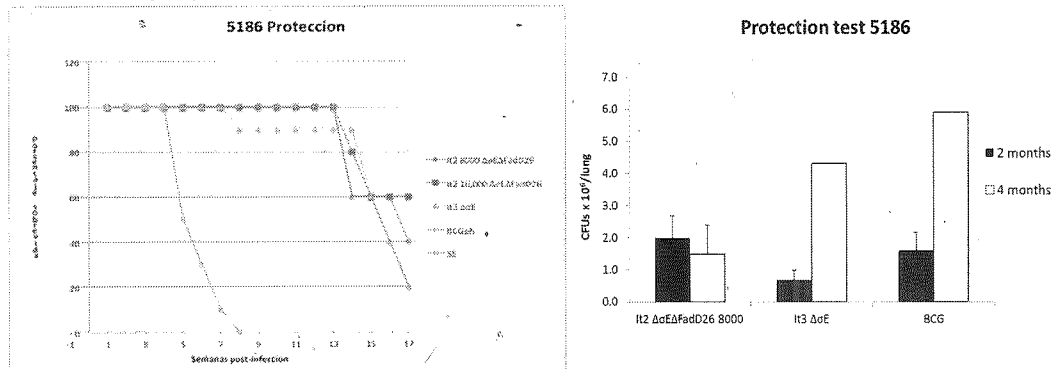


Estos resultados se confirmaron al vacunar por vía subcutánea con 8000 bacterias ratones inmunodeficientes de la inmunidad celular (desnudos) y de la inmunidad humoral y celular (scid), los animales vacunados con la bacteria mutante mostraron mejor sobrevivida que los vacunados con la vacuna BCG o con la mutante única del gen sigE. En conclusión, la bacteria doble mutante sigE/fadD26 es más atenuada que la vacuna convencional BCG y que la mutante exclusiva del gen sigE.



2.- Estudiar el nivel de protección conferido por la doble mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c retados con bacterias de virulencia intermedia y alta

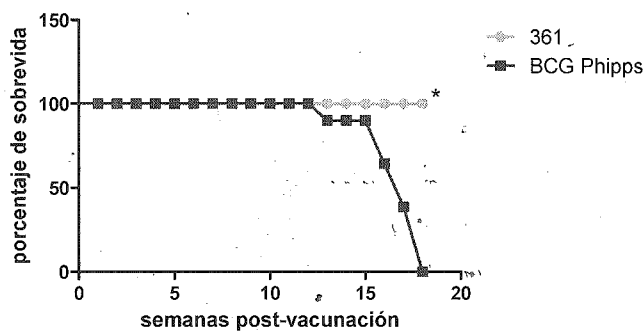
Para este experimento se vacunaron ratones BALB/c con 8000 bacterias por vía subcutánea y dos meses después se retaron con una dosis alta de bacterias de virulencia intermedia (cepa de referencia H37Rv) experimento que no mostro diferencias cuando se comparó con la vacuna BCG, pero cuando se retó con la bacteria hipervirulenta 5186 la sobrevivida fue del 60% después de 17 semanas del reto mientras que los animales vacunados con BCG solo sobrevivieron el 20% y los no vacunados todos murieron en la semana 8 (grafica izquierda). La carga bacilar pulmonar (UFC gráfica derecha) mostro menos bacterias vivas en los ratones vacunados con la doble mutante a los 4 meses después del reto que en los animales vacunado con la mutante sigE y la BCG. La conclusión es que la bacteria doble mutante confiere mejor protección que la vacuna BCG.



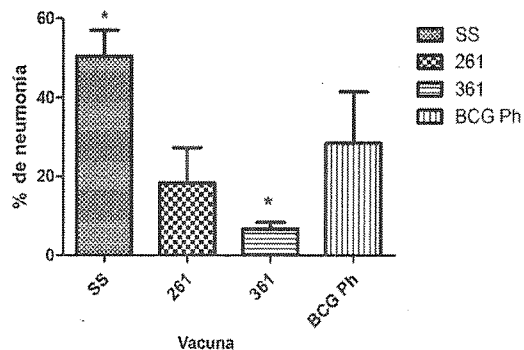
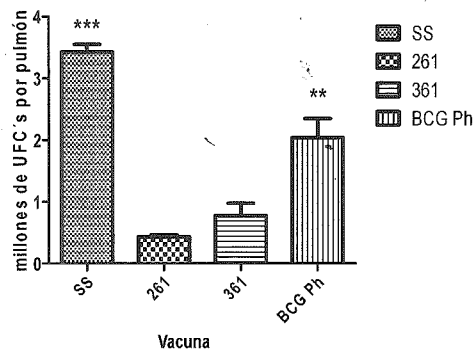
Un grupo en Inglaterra realizo el mismo experimento en ratones C57Bl infectándolos por medio de aerosoles con una baja dosis de M. tuberculosis H37Rv con resultados similares a los nuestros, también este mismo grupo obtuvo resultados similares en cobayos. Actualmente se está escribiendo el trabajo para enviarlo a publicación y la tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas del QFB Martin Becerril Zambrano esta en revisión.

3.- Establecer el nivel de protección conferido por la BCG recombinante del antígeno hemaglutinina asociado a heparina en ratones BALB/c retados con la cepa de referencia H37Rv y el aislado clínico hipervirulento y con aparente neurotropismo 209.

La hemaglutinina asociada a heparina (HAAH) es un antígeno de superficie de *M. tuberculosis* que tiene un peso molecular de 21kD, es capaz de agregar bacterias y aglutinar eritrocitos, tiene un dominio rico en lisinas y prolinas que le permite adherirse a células epiteliales e invadir las, además es un antígeno muy inmunogenico que induce la formación de anticuerpos y citocinas como IFN. El gen que codifica esta proteína fue clonado y transfectado a BCG Pasteur para producir BCG recombinantes, las cuales fueron de dos tipos, la vacuna 261 que tiene el gen transfectado de forma episomal y la 361 que tiene el gen inserto en el DNA, ambas vacunas se probaron en nuestro modelo murino de tuberculosis. Cuando se probó su nivel de atenuación en ratones desnudos, la vacuna 361 administrada subcutáneamente (8000 bacterias) indujo menos mortalidad que la BCG convencional:

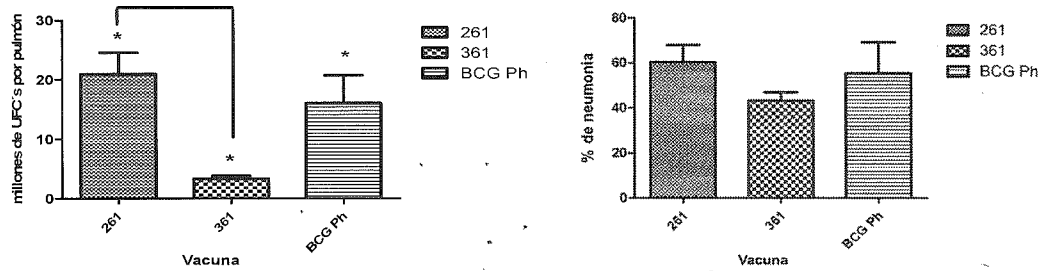


Para evaluar su capacidad protectora, se vacunaron ratones con las dos vacunas individualmente por la vía subcutánea y dos meses después se retaron con una dosis alta (250,000) de la bacteria de referencia H37Rv que es de virulencia intermedia, después de 4 meses del reto los animales se sacrificaron y en los pulmones se determinó la cantidad de bacterias vivas (UFC). Los resultados mostraron menor cantidad de bacterias y daño tisular (neumonía) en estos ratones que en los animales vacunados con la BCG convencional.



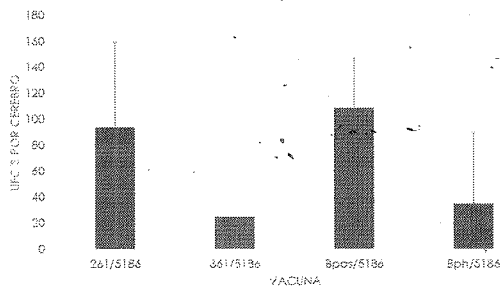
El mismo efecto de mayor protección pero solamente con la vacuna 361 se observó cuando a los ratones vacunados de la misma forma, se les reto con bacterias muy virulentas como

la cepa 5186. La conclusión es que la vacuna BCG recombinante 361 que tiene el gen que codifica HAAP de forma integrada confiere mayor protección que la BCG convencional.



De manera interesante, también estas vacunas recombinantes previnieron significativamente la diseminación hematogena e infección cerebral que en comparación con la vacuna BCG convencional.

Exp. 2 UFC's cerebros. 2 meses. Cepa 5186

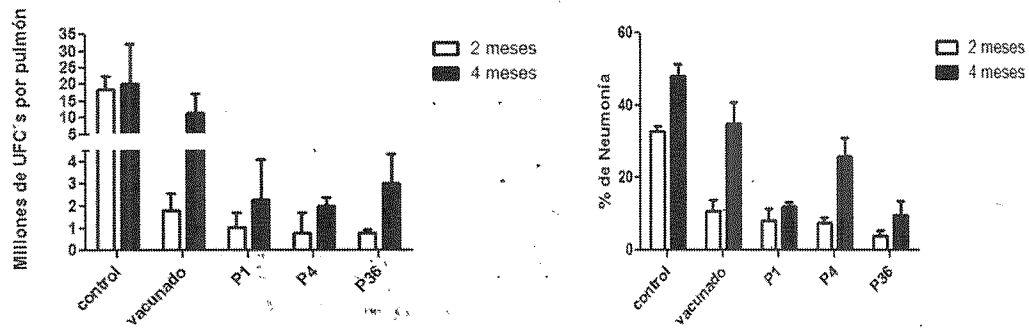


La conclusión es que la vacuna BCG recombinante 361 que tiene el gen que codifica HAAP de forma integrada confiere mayor protección que la BCG convencional. El manuscrito está actualmente en proceso de escritura, la QFB Karen Magdalena García Rodríguez obtuvo su título de Licenciatura con este proyecto.

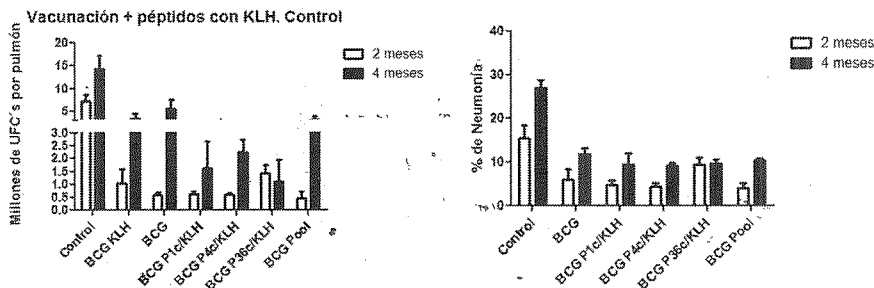
5.- Evaluar el nivel de protección conferido por los péptidos 1, 4 y 36 administrados solos o en sistemas adyuvantes en ratones BALB/c vacunados con BCG.

Grupos de ratones BALB/c fueron vacunados por vía subcutánea en la base de la cola con 8000 bacterias BCG Phipps que en nuestro modelo es la más eficiente para conferir protección. Dos meses después se les administro cada semana por vía subcutánea en la ingle 1 microgramo por separado de los péptidos: 1, 4 y 36 obtenidos del dializado de linfocitos de acuerdo al protocolo de obtención del factor de transferencia. Dos meses después, se retó a los animales por vía intratraqueal con una dosis alta (250,000) de bacterias cepa H37Rv de virulencia intermedia, Grupos de 6 ratones se sacrificaron 2 y 4 meses después del reto, sus pulmones se usaron para determinar la carga bacilar (UFC) y la extensión del daño histológico (neumonía).

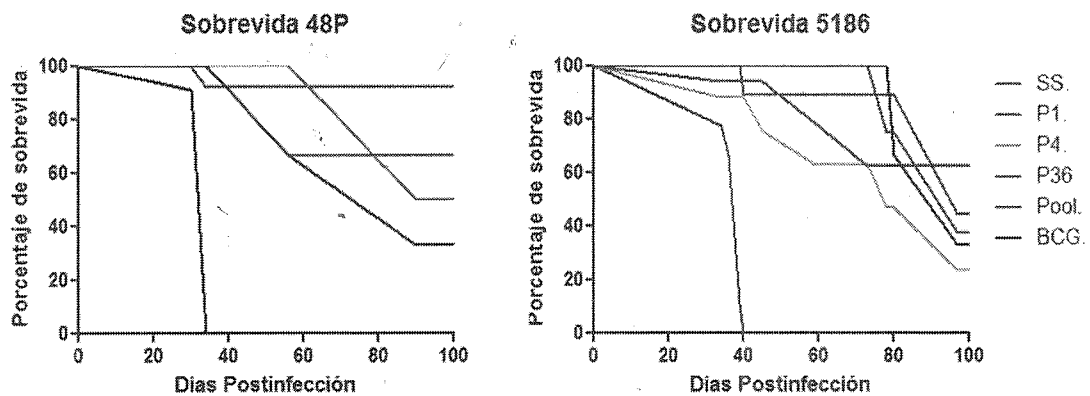
Los resultados mostraron que en comparación con el control no vacunado y el vacunado solamente con BCG, los ratones vacunados con BCG y que recibieron refuerzos con cualquiera de los péptidos tuvieron una significativa menor cantidad de bacterias vivas y daño tisular.



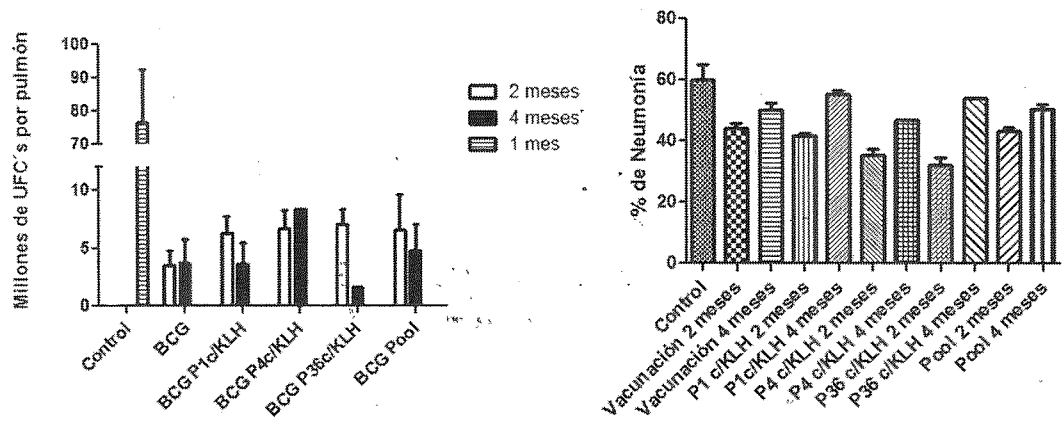
Para tratar de inducir mayor inmunogenicidad y actividad protectora, los mismos péptidos se asociaron al adyuvante KLH (keyhole limpet hemocyanin), un componente proteico de la hemolinfa de crustáceos. Bajo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, se vacunaron ratones que se retaron con la cepa H37Rv. El nivel de protección fue similar al mostrado por los animales del experimento anterior en el que las proteínas no se asociaron a ningún adyuvante. En este experimento se agregó un grupo vacunado con los 3 péptidos mezclados (pool),



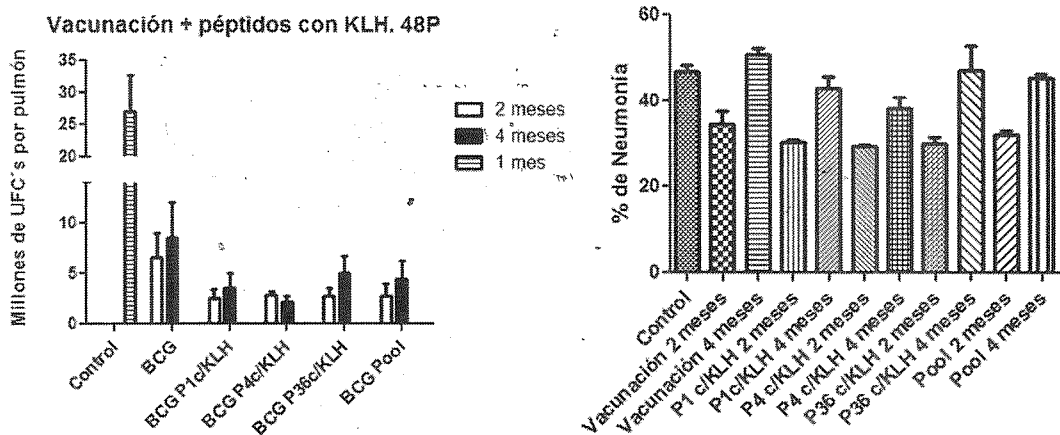
En el siguiente experimento, grupos de ratones fueron vacunados con BCG y con refuerzos vacunales siguiendo el mismo protocolo pero después de dos meses del último refuerzo, los animales se retaron con una cepa hipervirulenta del genotipo latinoamericano-mediterráneo (LAM cepa 5186) genotipo prevalente en Latinoamérica y otro grupo fue retado con bacterias del genotipo Beijing (48) prevalente en Asia. Los resultados mostraron mejor sobrevivencia en los animales que recibieron refuerzo con los péptidos 1 o 36.



La carga bacilar pulmonar también fue menor en los ratones que recibieron los refuerzos con los péptidos obtenidos de los dializados de linfocitos, en el caso del reto con la cepa 5186, solo el péptido 36 fue eficiente.



Cuando los animales vacunados se retaron con la cepa hipervirulenta Beijing 48, todos los péptidos confirieron mejor protección que la vacuna BCG sola, el péptido 4 fue el más eficiente. El control no vacunado solo se muestra el primer mes post-reto debido a que no hubo animales sobrevivientes posteriormente.



En conclusión, los péptidos seleccionados de los dializados linfocitarios usados para reforzar la vacuna BCG confirieron mejor protección que la vacunación solo con BCG, lo cual es importante porque en países endémicos como el nuestro todos los recién nacidos durante el primer mes de vida se deben de vacunar con BCG, teóricamente la administración de estos péptidos durante la adolescencia permitirían reforzar la vacuna BCG y así prolongar su efecto protector durante la vida adulta. Los péptidos seleccionados se caracterizan por estar localizados en la superficie de la bacteria y además de acuerdo a información bioinformática, tienen una capacidad de más del 80% para asociarse a el complejo mayor de histocompatibilidad clase I. El defecto principal de la vacuna BCG es inducir memoria inmunológica corta y estimular poco la actividad de las células T citolíticas CD8, teóricamente estas carencias de la vacuna BCG pueden ser compensadas por la administración de estos péptidos, aunque falta por probar esas hipótesis y actualmente estamos trabajando en ese

aspecto para concluir con este trabajo. El MC Héctor Mayoral obtuvo el grado de Maestría en Investigación Biomédica otorgado por la Escuela Superior de Medicina del IPN con este trabajo.

5. Cumplimiento de las metas alcanzadas en el periodo reportado con respecto a las metas comprometidas en el protocolo del proyecto. 6. Descripción de los resultados obtenidos en el periodo (incluyendo detalles, fotos, diagramas, gráficas, etc.), señalando el objetivo y meta correspondientes.

Estos dos aspectos fueron respondidos en el punto 4.

7. Relación de los entregables alcanzados en el periodo, con sus respectivos comprobantes, válidos únicamente con los créditos y agradecimientos al ICyTDF: a) En educación: Relación de los becarios que obtuvieron en este periodo el grado de licenciatura, maestría o doctorado; publicaciones que generaron y congresos u otros eventos en los que participaron. Adjuntar los comprobantes: copias de tesis, artículos, constancias de participación, memorias, entre otros. b) En investigación: Relación de los artículos científicos, libros, capítulos de libro y otros productos publicados por alguno de los participantes del proyecto. Adjuntar sus respectivos comprobantes. c) En divulgación científica: Relación de las presentaciones en congresos, coloquios y otros eventos; relación de los artículos de divulgación, conferencias, talleres, entrevistas, charlas, cursos, programas educativos, materiales didácticos, manuales, entre otros.

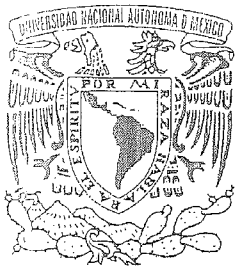
Adjuntar los comprobantes correspondientes: copias de los textos, memorias, presentaciones, videos, materiales, publicaciones de entrevistas, manuales, entre otros. d) En desarrollo tecnológico: Relación de los prototipos, kits diagnósticos, mapas, vacunas, software, equipos, dispositivos, entre otros. Adjuntar los comprobantes aplicables, fotografías, copias de planos, dibujos, entre otros. e) En propiedad intelectual: Relación de las solicitudes de patente y de derechos de autor, dibujos industriales, entre otros. Adjuntar los comprobantes: copias de las solicitudes, memorias técnicas, u otros. 8. Relación de los becarios de licenciatura, maestría o doctorado (nombre, grado en curso, título de la tesis) y de los profesores visitantes y posdoctorantes (nombre y plan de trabajo), adjuntando el formato de evaluación de desempeño de cada becario. 9. Informe de actividades y descripción de las contribuciones al proyecto del personal contratado por honorarios. 10. Porcentaje de avance del proyecto (sombrear la barra). 0% 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90% 100% 11. Desviaciones y/o modificaciones en el periodo y las acciones derivadas, para encauzar los resultados y entregables comprometidos. 12. Cronograma de actividades y compromisos para el siguiente periodo (objetivos, metas, resultados y entregables), en caso de haberse presentado desviaciones y/o modificaciones (señaladas en el punto 11).

Los resultados obtenidos se presentaron en el Congreso Nacional de Microbiología Clínica realizado en la ciudad de San Luis Potosí y en el congreso internacional Vaccinepharma en Varadero Cuba (se anexan comprobantes)

No existió ninguna desviación o modificación del trabajo propuesto, todos los estudiantes se graduaron y actualmente se están preparando los manuscritos para ser enviados a publicación, en relación con el trabajo experimental solo queda por realizar los estudios de inmunogenicidad de los péptidos obtenidos de los dializados de linfocitos. Actualmente existe la tendencia de demostrar la existencia de células T cooperadoras o citolíticas multifuncionales que se caracterizan por expresar

IFN, TNF e IL-2 en el citoplasma de la misma célula demostrado por citometria de flujo, ese estudio está actualmente en su inicio y existe un estudiante de Maestría inscrito en el programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM que lo realizara. Debido a que la BCG recombinante que expresa hemaglutinina asociada a heparina se realizó con BCG Pasteur, se realizaron experimentos en los que los animales control se vacunaron con esta subcepa de BCG además del grupo vacunado con la subcepa BCG Phipps que como se comento es la más eficiente en conferir protección de 10 subcepas diferentes probadas en nuestro sistema experimental. Estos experimentos mostraron que ciertamente la BCG Phipps produce mejor protección pero tiene menos memoria que la BCG Pasteur, actualmente se están realizando experimentos vacunando ratones con una mezcla de las dos subcepas de BCG con resultados muy satisfactorios, será entonces interesantes vacunar con la mezcla de las dos BCG o con la mutante doble sigE/fadD26 y reforzar con los péptidos obtenidos de los dializados leucocitarios, lo cual puede mejorar aún más el nivel de protección para esta importante enfermedad infecciosa. Estos experimentos están en curso y se considera que forman también parte de este proyecto.





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DEL POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

Por el presente informo a ustedes que el día 10 de septiembre del 2015 a las 15:00 horas se verificará en la Sala de Examen D-208 de la Unidad de Posgrados, el examen de grado del:

CE

que presenta la tesis titulada:  
"Protección inducida por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv doble mutante sigE y fadD26 en un modelo murino de tuberculosis pulmonar".  
Dirigida por el Dr. Rogelio Hernández Pando.  
Para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D.F., a 9 de septiembre de 2015.

COORDINADORA DE ENTIDAD

DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

Firma de enterado del jurado:

Presidente

Dr. José Pedraza Chaverri

Vocal

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

Vocal

Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán

Vocal

Dra. Bertha González Pedrajo

Secretario

Dra. Bertha Josefina Espinosa Gutiérrez

No. 410900521561



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

CONSTANCIA DE  
EXAMEN

Dra. Bertha Josefina Espinosa Gutiérrez, secretario del jurado

que examinó a  OE

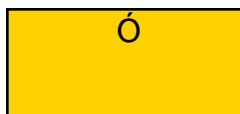
para optar por el grado de Maestro

en Ciencias

hace constar que el jurado resolvió Aprobarlo

Cd. Universitaria, D.F., a 10 de septiembre de 2015.

EL SECRETARIO DEL JURADO



No. 410900521561

Al cabo de 90 días hábiles posteriores al Examen de Grado, el interesado deberá comunicarse al programa "Tramitel", cuyos teléfonos son: 56 22 55 68 al 72, para recabar informes sobre su Título, proporcionando su nombre y no. de cuenta. Cuando tenga la indicación por vía telefónica de pasar a recoger su Título, deberá presentarse en el Programa "Tramitel" ubicado en el Edificio de la DGAE, Circuito de la Investigación Científica entre la parada CU del metro Universidad y el Centro de Desarrollo Infantil (CENDI), en Ciudad Universitaria.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



México, D.F. a 28 de noviembre del 2014

Por medio de la presente nos permitimos solicitar que se autorice la confidencialidad por tres años, a partir de esta fecha, de la información generada en el trabajo de investigación de la tesis que tiene por título Efecto inmunoproláctico de péptidos purificados del factor de transferencia en el desarrollo de tuberculosis pulmonar en un modelo murino de vacunación con bacilo Calmette Guerin (BCG), que fue realizado por el estudiante Héctor Antonio Mayoral Reyes, inscrito al programa de Maestría en Ciencia de la Salud de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Dicha solicitud obedece a que los péptidos empleados están en proceso de patente, siendo fundamental en este proceso la confidencialidad de los datos encontrados.

De antemano agradecemos su atención, y quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración.

ATENTAMENTE

Directores de Tesis:

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando

Dr. Edgar Abarca Rojano

Ó

CE

Estudiante de la Maestría en Ciencias de la Salud

Firma

Firma

Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal

Coordinador del Programa Académico de la  
Maestría en Ciencias de la Salud



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Noviembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

**"EFECTO INMUNOPROFILÁCTICO DE PÉPTIDOS PURIFICADOS DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA EN EL DESARROLLO DE TUBERCULOSIS PULMONAR EN UN MODELO MURINO DE VACUNACIÓN CON BACILO CALMETTE-GUERÍN (BCG)"**

Presentada por el alumno:

CE					
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)			

Con registro: 


B	1	2	0	2	8
---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA  
Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Edgar Abarca Rojano

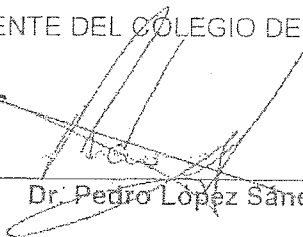
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rafael Campos Rodríguez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Sara Huerta Yépez

•PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Pedro López Sánchez



ESCUELA SUPERIOR DE NEUMOLOGÍA  
I.P.N.  
SECRETARÍA DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



XXI Congreso Nacional  
de Inmunología, A.C.



Simposio Internacional sobre Inmunidad con la  
Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI)

6 AL 10 DE MAYO DE 2014 • QUERÉTARO, QRO.

LA SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA, A.C.  
OTORGA LA PRESENTE:

# CONSTANCIA

A: CE MATA ESPINOSA  
DULCE, BARRIOS PAYAN JORGE, MARQUINA  
CASTILLO BRENDA, HERNANDEZ PANDO ROGELIO

POR LA PRESENTACIÓN DEL CARTEL "EVALUACIÓN DE NUEVAS VACUNAS PARA PREVENIR LA  
TUBERCULOSIS PULMONAREN UN MODELO MURINO"

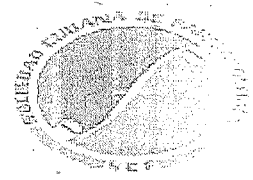
DR. JESÚS MARTÍNEZ BARNETCHE  
SECRETARIO/ TESORERO DE  
LA SOCIEDAD MEXICANA DE  
INMUNOLOGÍA, A.C.

DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA  
PRESIDENTE DE  
LA SOCIEDAD MEXICANA DE  
INMUNOLOGÍA, A.C.

DR. LUIS F. GARCÍA  
PRESIDENTE DE  
LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA  
DE INMUNOLOGÍA



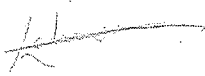
First International Convention  
**IMMUNOPHARMACOLOGY -**  
**VACCIPHARMA 2015**




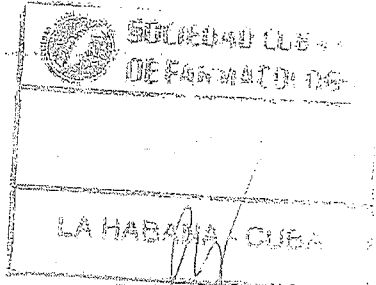
To: Immunogenicity and protection induced by a Mycobacterium tuberculosis sigE/fadD26 double mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis

Rogelio Hernández Pando, Barios Payan J, Mata Espinoza D,  
 Marquina B, Manganelli R

- ATTENDANCE
- PLENARY/ KEY LECTURE
- ORAL PRESENTATION
- POSTER
- SESSION CHAIR
- SPONSOR
- SCIENTIFIC COMMITTEE
- ORGANIZING COMMITTEE

  
 Dr. Mario L. Chovel Cuervo  
 President, Organizing Committee

  
 Dr. René Delgado Hernández  
 President  
 Cuban Society of Pharmacology

  
 Dr. Idania Rodeiro  
 Secretary, Cuban Society of Pharmacology

Academic Scores: Resolution N° \_\_\_\_\_ scores conferred \_\_\_\_\_ Certified Signature \_\_\_\_\_

# Certificate

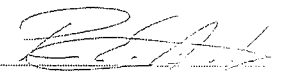
We certify


**Rogelio Hernandez-Pando**

participated in the VII MEETING OF THE SLAMTB, September 14-17, 2014, at Continental Hotel, Canela, RS, Brazil, as Guest Speaker about "HOST-PATHOGEN INTERACTION with the Lecture: The effect of BCG vaccination on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*"

Canela, September 14<sup>th</sup>, 2014

  
Dr. Patricia Del Portillo  
President of Scientific Committee

  
Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida d.  
President of the SLAMTB and of the Organizers



**VII MEETING OF THE  
SLAMTB**

SOCIEDAD LATINOAMERICANA  
DE TUBERCULOSIS  
Y OTRAS MICOBACTERIOSIS

SEPTEMBER 14 TO 17 2014  
HOTEL CONTINENTAL CANELA | RS, BRAZIL

PROFESSORS  
SLAMTB  
SOCIETY OF TUBERCULOSIS AND OTHER MYCOBACTERIOSIS  
PROFESSORS AND CLINICAL PRACTITIONERS

SUPPORT



FEPPS



GOVERNO DO ESTADO DO  
RIO GRANDE DO SUL



ASOCIACIÓN MEXICANA DE INFECTOLOGÍA Y  
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, A.C.

14 de Mayo del 2015.

**MESA DIRECTIVA**

**Presidente**

Dr. Sergio A. Lazo de la Vega  
Jasso

**Vicepresidente**

Dra. Noris Pavia Ruz

**Secretario General**

Dr. Luis Fernando Pérez  
González

**Tesorero**

Dr. José Doris Hernández  
**Secretario Académico**  
Dra. Patricia Cornejo Juárez

Dr. Rogelio Hernández Pando,  
Jefe de la División de Patología Experimental,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Estimado Dr. Hernández:

A nombre de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C. le agradecemos profundamente haber aceptado participar como profesor en nuestro congreso anual, a realizarse del 27 al 30 de Mayo próximos, en el Centro de Convenciones de la ciudad de San Luis Potosí.

**VOCALES**

**Microbiología**

Dr. Fernando Tuz Dzib  
**VIH**

Dr. Santiago Pérez Patrigeon

**Infecciones Nosocomiales**

Dra. Alethse de la Torre Rosas

**Antibióticos**

Dr. Alfredo Ponce de León

**Educación Continua**

Dr. Rafael Valdez Vázquez

**Salud Pública**

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

Su intervención se tiene programada el Sábado 30 de Mayo, de 8:30 a 10:00 hrs ponente en el simposio "Avances recientes en Tuberculosis", junto con el Dr. José Sifuentes Osornio y la Dra. Lourdes García García. Su tema es "Horizontes de la vacunación en Tuberculosis". Contará con 25 minutos para su exposición y 5 minutos para preguntas. Los coordinadores serán los Dres. Guillermo Ruiz Palacios y Alfredo Ponce de León.

Es para nosotros un verdadero honor contar con su presencia ya que existe un enorme interés en que nos comparta su experiencia en este interesante campo de las enfermedades infecciosas.

**COMITÉ EJECUTIVO**

Dr. José Sifuentes Osornio

Dr. Eduardo Rodríguez Noriega

Dr. Guillermo Ruiz-Palacios

Dr. José I. Santos Preciado

Dr. Fortino Solórzano Santos

Este evento es la actividad académica mas importante de la Infectología a nivel nacional. Tendremos una audiencia constituida por médicos especialistas en enfermedades infecciosas, residentes de la especialidad, médicos en el área de la medicina interna, estudiantes de medicina, personal de control de infecciones hospitalarias y de laboratorios de microbiología.

**Revista de Infectología y  
Microbiología Clínica**

Dr. Fortino Solórzano Santos

Será un gusto poderle saludar en San Luis Potosí.

Atentamente,

Dr. Sergio Lazo de la Vega Jasso.  
Presidente.  
AMIMC, AC.





## IMMUNOLOGICAL ASPECTS

## *Mycobacterium smegmatis* proteoliposome induce protection in a murine progressive pulmonary tuberculosis model



Yanely Tirado<sup>a</sup>, Alina Puig<sup>a</sup>, Nadine Alvarez<sup>a</sup>, Reinier Borrero<sup>a</sup>, Alicia Aguilar<sup>a</sup>, Frank Camacho<sup>a</sup>, Fatima Reyes<sup>a</sup>, Sonsire Fernandez<sup>a</sup>, Jose Luis Perez<sup>a</sup>, Reynaldo Acevedo<sup>a</sup>, Dulce Mata Espinoza<sup>b</sup>, Jorge Alberto Barrios Payan<sup>b</sup>, Maria de los A. Garcia<sup>a</sup>, Ramlah Kadir<sup>c</sup>, María E. Sarmiento<sup>c</sup>, Rogelio Hernandez-Pando<sup>b</sup>, Mohd-Nor Norazmi<sup>c, d, \*\*</sup>, Armando Acosta<sup>d, \*</sup>

<sup>a</sup> Institute Finlay, La Habana, Cuba

<sup>b</sup> Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubiran", D.F. Mexico, Mexico

<sup>c</sup> School of Health Sciences, Universiti Sains Malaysia, Kelantan, Malaysia

<sup>d</sup> INFORMM, Universiti Sains Malaysia, Kelantan, Malaysia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 April 2016

Received in revised form

28 July 2016

Accepted 31 July 2016

## Keywords:

*Mycobacterium smegmatis*

Proteoliposomes

Tuberculosis

Vaccines

Challenge

## SUMMARY

Tuberculosis (TB) remains an important cause of mortality and morbidity. The TB vaccine, BCG, is not fully protective against the adult form of the disease and is unable to prevent its transmission although it is still useful against severe childhood TB. Hence, the search for new vaccines is of great interest. In a previous study, we have shown that proteoliposomes obtained from *Mycobacterium smegmatis* (PLMs) induced cross reactive humoral and cellular response against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigens. With the objective to evaluate the protective capability of PLMs, a murine model of progressive pulmonary TB was used. Animals immunized with PLMs with and without alum (PLMs/PLMsAL respectively) showed protection compared to non-immunized animals. Mice immunized with PLMsAL induced similar protection as that of BCG. Animals immunized with BCG, PLMs and PLMsAL showed a significant decrease in tissue damage (percentage of pneumonic area/lung) compared to non-immunized animals, with a more prominent effect in BCG vaccinated mice. The protective effect of the administration of PLMs in mice supports its future evaluation as experimental vaccine candidate against Mtb.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) remains as one of the most important causes of morbidity and mortality associated with infectious diseases [1–4]. BCG, the vaccine in use for the prevention of TB has a limited impact in the prevention of adult TB and transmission of the

disease [5,6]. Thus, multiple strategies are being implemented for the development of new vaccines against TB [7].

The membrane and cell wall components of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) have been evaluated as experimental vaccine candidates with different strategies, demonstrating their potential for the elicitation of protective immune responses [8–11].

OMV released spontaneously (natural) from mycobacteria, have demonstrated protective capacity in challenge models in mice [10]. In a previous report by our group, OMV obtained from BCG using detergents (Proteloliposomes, PLBCG) showed protection against Mtb in mice [11]. The previous results with OMVs, natural or detergent-prepared, demonstrated the potential of these strategies as vaccine candidates against TB [10,11].

Bacterial PL has demonstrated protective capacity against different infectious diseases, as well as adjuvant effects [12–17]. PL from BCG protected mice in a challenge model with Mtb and induced better protection than BCG administered in a prime-boost

**Abbreviations:** TB, tuberculosis; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; PL, proteoliposomes; BCG, Bacillus Calmette–Guerin; CFU, Colony Forming Unit; PLMs, proteoliposomes obtained from *Mycobacterium smegmatis*; PLMsAL, PLMs adjuvanted with alum; OMV, outer membrane vesicles.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. School of Health Sciences, Universiti Sains Malaysia, Kelantan, Malaysia.

E-mail addresses: [norazmim@usm.my](mailto:norazmim@usm.my) (M.-N. Norazmi), [ducmar13@gmail.com](mailto:ducmar13@gmail.com) (A. Acosta).

scheme [10]. Bioinformatics studies predicted the presence in PLMs of Mtb epitopes expressed during infection in vivo [18]. PLMs are immunogenic and induce cross reactive responses against Mtb in mice [18,19]. Considering these antecedents, the aim of the present work was to evaluate the protective capacity of PLMs in a challenge model with Mtb in mice, demonstrating the protective effect of the administration of this formulation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains

BCG Moreau strain (Enterprise of Production of Biologicals, Carlos J Finlay, La Habana, Cuba) and *Mycobacterium smegmatis* (Ms) mc<sup>2</sup>155 strain [20] were used.

### 2.2. PLMs

Ms culture was grown in 1% (w/v) yeast extract (Merck, Germany), 0.5% (v/v) glycerol (Riedel de Haen, Germany), 0.05% (v/v) Tween 80 (Fluka, Germany), in 8% (w/v) nutrient broth (Biocen, Cuba) for 48 h with agitation (200 rpm; 37 °C). The purity of the culture was evaluated by Ziehl–Neelsen staining [21]. Proteoliposomes were produced as previously reported [19].

### 2.3. Mice

Balb/c mice (male, 6–8 weeks) were housed in special micro-isolator cages coupled to a negative-pressure system.

### 2.4. Challenge study

The protective capacity of PLMs was studied in an intra-tracheal model of progressive TB in mice. Four groups (n = 4 mice in each group) were inoculated subcutaneously with the following inocula (100 µL): **1. PBS**; **2. BCG**: BCG (single inoculation,  $8 \times 10^3$  CFU); **3. PLMs**: PLMs (50 µg), and **4. PLMsAL**: PLMs (50 µg) + Alum (1 mg; Alhydrogel, Sigma). Two doses were administered with an interval of 3-weeks in the last two groups. Mice were challenged with  $2.5 \times 10^5$  CFU of H37Rv Mtb strain in PBS (100 µL) by the intra-tracheal route, as previously described, two months after the last inoculation [22,23]. Two months later, animals were euthanized under anaesthesia with pentobarbital [22,23] for downstream experiments. Two independent experiments were performed. All procedures were performed in a class III cabinet in a biosafety level III facility following the guidelines of care and use of experimental animals [24] and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubirán” of Mexico.

### 2.5. Bacilli load

Four lungs per group were homogenized separately in a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Rexleid, Canada) in isotonic salt solution (1 ml) containing 0.05% Tween 80 (Sigma). These homogenates (100 µL) were serially diluted (10 fold), plated on Bacto Middlebrook 7H10 agar (Difco, USA) and incubated at 37 °C for Mtb CFU determination. Colonies were counted after 21 days of incubation.

### 2.6. Histopathology and morphometric studies

The right lung was perfused via the trachea with 100% ethanol (J.T. Baker, Mexico City, Mexico), embedded in paraffin (Oxford Labware, St Louis, MO, USA), sectioned and stained with

haematoxylin and eosin (HE). The percentages of the lung surfaces affected by pneumonia were determined using an automated image analyzer (Q Win Leica, Milton Keynes, Cambridge, UK). Briefly, the whole lung was photographed at 25× magnification by a camera system to obtain the image of the total lung which corresponded to the 100% area. Then, the pneumonic patches, which correspond to lung areas with inflammatory infiltrate that occupied alveolar lumens and alveolar-capillary interstitium were delimited and measured with the software analyzer. Finally, the percentage of the lung surface area affected by pneumonia was determined. The percentage data are reported as the mean values ± SD from three different mice at each time-point in two independent experiments.

### 2.7. Data analyses

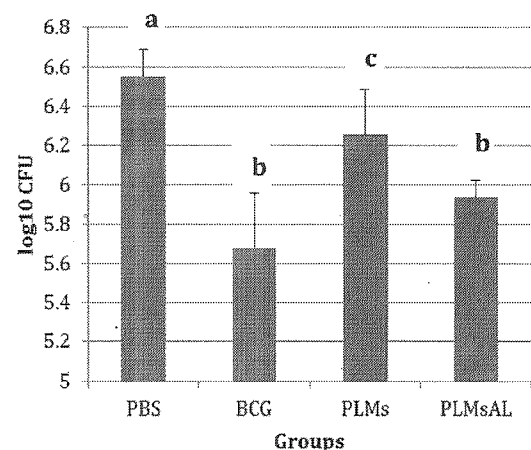
One way ANOVA and Multiple Range test were used for the analysis of bacteria burden and pneumonic area in lungs. Measurements were made blind. Data of log<sub>10</sub> CFU and percentage of pneumonic area/lung were expressed as the mean ± SD.

## 3. Results and discussion

PLMs are spherical particles of homogenous diameter, as determined by Transmission electron microscopy and verified by exclusion size chromatography [19] and by spectroscopy of photonic correlation (unpublished results). PLMs contain proteins mainly in the range of 25–67 kDa and the presence of lipids were demonstrated by indirect evidences based on the recognition of Ms lipids by the sera of mice immunized with PLMs [19].

We have previously demonstrated that PLMs elicited cross-reactive responses against Mtb in mice [19]; in this study we evaluated the protective effect of the administration of PLMs in a challenge model with Mtb. The bacterial loads, histopathological changes and the tissue damage in lungs (percentage of pneumonia) were determined in immunized animals compared to mice receiving PBS and BCG.

All the immunized groups showed significant decreases in the bacterial load in lungs compared to mice receiving PBS (Figure 1) ( $p < 0.001$ ). Animals immunized with BCG and PLMsAL had



**Figure 1.** CFU in lungs of mice challenged with Mtb. Groups: **PBS**; **BCG**: BCG ( $8 \times 10^3$  CFU), one inoculation; **PLMs**: PLMs (50 µg), and **PLMsAL**: PLMs (50 µg) + Alum (1 mg, Alhydrogel, Sigma). Two doses were administered with an interval of 3-weeks in the last two groups. One way ANOVA and Multiple Range test were used for the analysis. Each bar represents the mean ± SD. Different letters denotes significant statistical difference between the groups.  $p < 0.001$  (n = 4 per group).

# Protective capacity of proteoliposomes from *Mycobacterium bovis* BCG in a mouse model of tuberculosis

Yanely Tirado<sup>1</sup>, Alina Puig<sup>1</sup>, Nadine Álvarez<sup>1</sup>, Reinier Borrero<sup>1</sup>, Alicia Aguilar<sup>1</sup>, Frank Camacho<sup>1</sup>, Fatima Reyes<sup>1</sup>, Sonsire Fernández<sup>1</sup>, José Luis Pérez<sup>1</sup>, Dulce Mata Espinoza<sup>4</sup>, Jorge Alberto Barrios Payán<sup>4</sup>, María Elena Sarmiento<sup>1,2</sup>, Mohd-Nor Norazmi<sup>2,3,\*</sup>, Rogelio Hernández-Pando<sup>4</sup>, and Armando Acosta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute Finlay, La Habana, Cuba; <sup>2</sup>School of Health Sciences; University Sains Malaysia; Kelantan, Malaysia; <sup>3</sup>INFORMM; University Sains Malaysia; Kelantan, Malaysia; <sup>4</sup>Experimental Pathology Section; Department of Pathology; National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán"; D.F. Mexico, Mexico.

**Keywords:** BCG, prime-boost, proteoliposomes, Tuberculosis, vaccines

**Abbreviations:** TB, Tuberculosis; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; PL, Proteoliposomes; BCG, Bacillus Calmette-Guerin; PBS, Phosphate Buffer Solution; CFU, Colony Forming Unit; PLBCG, Proteoliposomes obtained from BCG; PLBCG-AI, PLBCG adjuvanted with aluminum; SD, standard deviation

Tuberculosis (TB) is one of the most important causes of mortality and morbidity due to infectious diseases. BCG, the vaccine in use, is not fully protective against TB. In a previous study, we have shown that proteoliposomes (outer membrane extracts), obtained from BCG (PLBCG) were able to induce humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigens. With the objective to evaluate the protective capability of PLBCG alone or as a booster with BCG, a murine model of progressive pulmonary TB was used. Animals immunized with PLBCG adjuvanted with alum (PLBCG-AI) showed similar protection to that conferred by BCG. The group immunized with PLBCG-AI as a booster to BCG gave superior protection than BCG as evidenced by a reduction of bacterial load in lungs 2 months after infection with Mtb. Animals immunized with BCG, PLBCG-AI and this formulation as a booster of BCG, showed a significant decrease of tissue damage (percentage of pneumonic area/lung) compared with non-immunized animals. These results demonstrate that immunization with PLBCG-AI alone or as a booster to BCG induce appropriate protection against challenge with Mtb in mice and support the future evaluation of PLBCG as a promising vaccine candidate against Mtb.

## Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most important causes of mortality and morbidity due to infectious diseases.<sup>1–5</sup> Bacillus Calmette-Guerin (BCG) is the current vaccine approved for human use against TB.<sup>1–5</sup> It is most effective in protecting children from the severe forms of the disease; while its efficacy in adults is poor especially against pulmonary TB.<sup>1–5</sup> It has been suggested that boosting of the primary BCG vaccination may produce enhanced protection against TB.<sup>4,5</sup> Many studies support the role of mycobacterial cell wall components in the development of TB pathogenesis and therefore have been a prime target for the identification and characterization of antigens with potential application in vaccine development.<sup>6–9</sup> Proteoliposomes (PL) are detergent outer membrane extracts of bacteria that contain proteins, lipids and native lipopolysaccharides.<sup>10</sup> Only a few PL-based vaccines are licensed, one of

them, VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, is a vaccine composed of PL obtained from the outer membrane of *Neisseria meningitidis* serogroup B.<sup>11</sup> This PL has been shown to have high efficacy in controlling meningococcal disease and exhibited adjuvant effect when used with other antigens.<sup>11,12</sup> BCG has high genome and antigenic homology to that of Mtb.<sup>13–15</sup> We reported that PLBCG induced humoral immune responses against Mtb antigens in mice.<sup>16</sup> In this study, we evaluated the protective effect of PLBCG in a murine model of intratracheal infection and its potential use as a booster to BCG vaccination.

## Materials and Methods

### Organism

BCG Moreau strain, (Enterprise of Production of Biologicals, Carlos J Finlay, La Habana, Cuba).

© Yanely Tirado, Alina Puig, Nadine Álvarez, Reinier Borrero, Alicia Aguilar, Frank Camacho, Fatima Reyes, Sonsire Fernández, José Luis Pérez, Dulce Mata Espinoza, Jorge Alberto Barrios Payán, María Elena Sarmiento, Mohd-Nor Norazmi, Rogelio Hernández-Pando, and Armando Acosta

\*Correspondence to: Mohd-Nor Norazmi; Email:norazmimn@usm.my

Submitted: 08/31/2014; Revised: 10/13/2014; Accepted: 11/20/2014

<http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1011566>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

## PLBCG

The BCG culture was centrifuged at  $17,700 \times g$  for 30 min at 4°C. After two washes, the pellet was resuspended in buffer solution (30 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8.5) in the presence of sodium deoxycholate [5-15% (w/v)] (0.1-0.25 ml/g biomass). One hour later, the sample was centrifuged as above and the supernatant collected and ultracentrifuged at  $50,000-70,000 \times g$  for 2-8 h at 4°C. Finally the pellet was resuspended in buffer solution, filtered (Sartorius Minisart-plus 0.45 and 0.2  $\mu\text{m}$  filters) and stored at 4°C. Characterization was carried out as described.<sup>16,17</sup>

## Animals

Sixteen male Balb/c mice (6-8 weeks) were used in this study. The animals were kept in special boxes coupled to a negative-pressure micro-isolator.

## Challenge study

Protection induced by the PLBCG was evaluated against Mtb infection in mice. Mice were distributed in 4 groups ( $n = 4$ ) and were inoculated subcutaneously with 100  $\mu\text{L}$  of the following inocula: PBS, BCG ( $10^6$  CFU of BCG, single inoculation), PLBCG-Al [50  $\mu\text{g}$  PLBCG + 1 mg Alum (Alhydrogel, Sigma), 2 doses were administered with an interval of 3-weeks], and BCG+PLBCG-Al ( $10^6$  CFU of BCG and 3 weeks later 50  $\mu\text{g}$  PLBCG-Al). Two months after the last inoculation, mice were challenged with  $2.5 \times 10^5$  CFU of H37Rv Mtb strain in 100  $\mu\text{L}$  of PBS by the intratracheal route as previously described.<sup>18,19</sup> All animals were euthanized 2 months after Mtb infection under anesthesia with pentobarbital.<sup>18,19</sup> All procedures were performed in a class III cabinet in a biosafety level III facility according to the guidelines<sup>20</sup> and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán" (INCMNSZ) of Mexico.

## Bacilli load

The bacilli load was determined by CFU of Mtb in lung homogenates. Four lungs per group were disrupted separately in a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Rexleid, Canada) in 1 ml of isotonic salt solution containing 0.05% Tween 80 (Sigma), and 100  $\mu\text{L}$  of this homogenate in fold 10- serial dilutions were plated on Petri dishes containing Bacto Middlebrook 7H10 agar (Difco, USA) and incubated at 37°C. Colonies were counted twice under a stereoscopic microscope after 14 d of incubation.

## Histopathology and morphometric studies

The right lung of 3 mice per group was perfused via the trachea with 100% ethanol and processed for histological studies. Sections were stained with haematoxylin and eosin.<sup>19</sup> The pneumonic areas were measured and analyzed using Leica Q-win system software (Leica Microsystems Imaging Solutions LTD, Cambridge, UK, 25x).

## Data management

Measurements were made blind, and data of  $\log_{10}$ CFU and percentage of pneumonic area/lung are expressed as the mean  $\pm$  SD. One way ANOVA and Multiple Range test were used for the determination of significant differences.

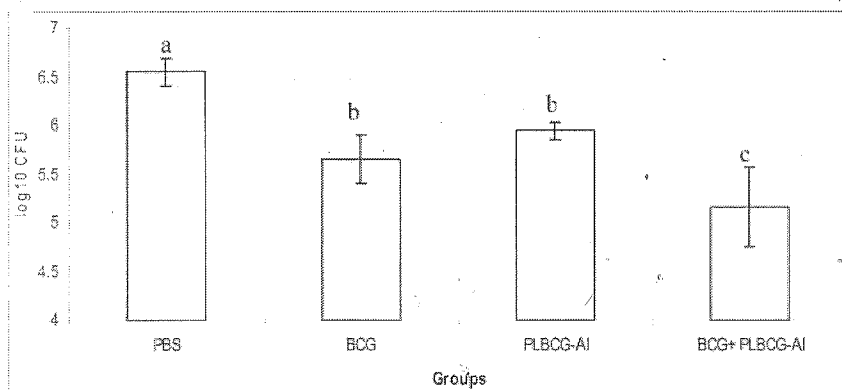
## Results and discussion

Mtb cell wall components have been suggested to contain virulence factors and protective antigens.<sup>6-9,21</sup> Taking into consideration the high antigenic and genetic homology between Mtb and BCG<sup>13-15</sup> and our previous results eliciting cross reactive immune responses after the immunization with PLBCG-Al,<sup>16</sup> it is reasonable to assume that PLBCG-Al can be a potential vaccine candidate against TB.

In this paper we evaluated the protective effect of PLBCG-Al in a mouse model of intratracheal infection and its potential to be used as a booster to BCG vaccination. The protective effect was measured by determining the bacterial load and the tissue damage (percentage of pneumonic area) in the lungs of immunized mice compared to PBS group and with animals receiving BCG.

Taking into consideration that the evaluation of protection was carried out 2 months after challenge and the fact that the mortality in the model used appears between 2 and 4 months post-challenge, the study of survival was not included in this experiment.

As shown in Figure 1, PLBCG-Al and BCG+PLBCG-Al groups were capable of significantly reducing the bacterial load in the lungs in comparison with non-treated



**Figure 1. Determination of bacterial load in lungs of mice challenged with Mtb.** Mice were challenged by intratracheal route 2 months after inoculation. Groups: PBS, BCG ( $10^6$  CFU of BCG, one inoculation), PLBCG-Al [50  $\mu\text{g}$  PLBCG + 1 mg Alum (Alhydrogel, Sigma), 2 doses administered in a 3-week interval], and BCG+PLBCG-Al ( $10^6$  CFU of BCG and 3 weeks later 50  $\mu\text{g}$  PLBCG-Al). The statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Multiple Range test. Each bar represents the mean  $\pm$  SD. Different letters denotes significant statistical difference between the groups.  $P < 0.001$ . ( $n=4$  per group)

## Research Article

# Protective Effect of a Lipid-Based Preparation from *Mycobacterium smegmatis* in a Murine Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis

Maria de los Angeles García,<sup>1</sup> Reinier Borrero,<sup>1</sup> Maria E. Lanio,<sup>2</sup> Yanelly Tirado,<sup>1</sup> Nadine Alvarez,<sup>1</sup> Alina Puig,<sup>1</sup> Alicia Aguilar,<sup>1</sup> Liem Canet,<sup>2</sup> Dulce Mata Espinoza,<sup>3</sup> Jorge Barrios Payán,<sup>3</sup> Maria Elena Sarmiento,<sup>1,4</sup> Rogelio Hernández-Pando,<sup>3</sup> Mohd-Nor Norazmi,<sup>4,5</sup> and Armando Acosta<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Instituto Finlay, 11600 Havana, Cuba

<sup>2</sup> Center for Protein Studies, Faculty of Biology, Havana University, 10400 Havana, Cuba

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000 México, DF, Mexico

<sup>4</sup> School of Health Sciences, Universiti Sains Malaysia, Malaysia

<sup>5</sup> Institute for Research in Molecular Medicine, Universiti Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia

Correspondence should be addressed to Mohd-Nor Norazmi; [norazmimn@usm.my](mailto:norazmimn@usm.my)

Received 21 July 2014; Revised 11 September 2014; Accepted 15 September 2014; Published 7 December 2014

Academic Editor: Kota V. Ramana

Copyright © 2014 Maria de los Angeles García et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A more effective vaccine against tuberculosis (TB) is urgently needed. Based on its high genetic homology with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the nonpathogenic mycobacteria, *Mycobacterium smegmatis* (Ms), could be an attractive source of potential antigens to be included in such a vaccine. We evaluated the capability of lipid-based preparations obtained from Ms to provide a protective response in Balb/c mice after challenge with Mtb H37Rv strain. The intratracheal model of progressive pulmonary TB was used to assess the level of protection in terms of bacterial load as well as the pathological changes in the lungs of immunized Balb/c mice following challenge with Mtb. Mice immunized with the lipid-based preparation from Ms either adjuvanted with Alum (LMs-AL) or nonadjuvanted (LMs) showed significant reductions in bacterial load ( $P < 0.01$ ) compared to the negative control group (animals immunized with phosphate buffered saline (PBS)). Both lipid formulations showed the same level of protection as Bacille Calmette and Guerin (BCG). Regarding the pathologic changes in the lungs, mice immunized with both lipid formulations showed less pneumonic area when compared with the PBS group ( $P < 0.01$ ) and showed similar results compared with the BCG group. These findings suggest the potential of LMs as a promising vaccine candidate against TB.

## 1. Introduction

Bacille Calmette and Guerin (BCG), the only anti-TB vaccine currently available, seems to be only effective against severe childhood forms of the disease but not against adult pulmonary TB and for the control of the transmission. Therefore, there is an urgent need for new improved vaccines against TB [1, 2].

Lipids are considered important molecules involved in the pathogenesis of TB [3–5]. Many of these molecules are

localized at the cell surface and are components of the cell wall of mycobacteria [3–5]. The localization of such molecules as well as the fact that they constitute important virulence factors makes them potential valuable targets for the host immune system [3–5]. Although most subunit TB vaccines (with few exceptions) that are in different phases of evaluation are based primarily on proteins [6], we hypothesize that mycobacterial lipid antigens could also be effective vaccine candidates against Mtb infection. In fact, the protective effect against Mtb of a liposome formulation composed of total

lipids of Mtb has been reported in the guinea pig model [7]. Liposomes containing lipid fractions of Mtb have been reported to confer specific humoral and cellular immune responses, as well as protection upon Mtb challenge in guinea pigs [8, 9].

Our group has previously reported on the capability of preparations containing chloroform extractable lipids from *Mycobacterium smegmatis* (Ms) to induce specific IgG antibodies as well as a cross-reactive response against a mixture of Mtb antigens in Balb/c mice [10, 11]. Additionally, proteoliposomes from Ms and BCG elicited cross reactive responses against antigenic fractions from Mtb, demonstrating the antigenic similarities between the cell wall components of these non-pathogenic mycobacteria and Mtb [12, 13].

In this study, we evaluated whether a lipid-based preparation from Ms could provide protection against the virulent laboratory Mtb H37Rv strain in Balb/c mice by using the intratracheal progressive pulmonary TB infection model.

In fact, the current study shows that lipid extracts obtained from Ms either adjuvanted with Alum (LMs-AL) or nonadjuvanted (LMs) were able to provide similar protection against Mtb compared to that provided by BCG.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Bacterial Strains.** Ms mc<sup>2</sup>155 strain was obtained from the collection of the National Reference Laboratory of Tuberculosis, Pedro Kouri Institute, Cuba. BCG (Phipps) was kindly provided by Marcel A. Behr from the McGill General Hospital, Montreal, Canada.

**2.2. LMs.** Ms was grown in 8% nutrient broth (BIOČEN, Cuba) containing 1% (w/v) yeast extract (Merk, Germany), 0.5% (v/v) glycerol (Riedel de Haen, Germany), and 0.4% (v/v) Tween 80 (Fluka, Germany) for 48 h with continuous agitation (200 rpm) at 37°C. The Mtb H37Rv and BCG Phipps strains were grown to early mid-log phase in Middlebrook 7H9 medium (Difco, Detroit, MI) supplemented with ADC (BBL, Cockeysville, MD) and 0.05% Tween 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and with continuous agitation. Ziehl-Neelsen staining was performed to determine the presence of mycobacteria in the culture [14]. Lipids from Ms were extracted according to the method of Bligh and Dyer [15] and liposome-like particles were prepared by dehydration and rehydration using the method described previously [16].

**2.3. Mice.** Female Balb/c mice (6–8 weeks) were used for immunization. Mice were maintained in cages fitted with microisolators connected to negative pressure.

**2.4. Challenge Study.** Four groups of mice ( $n = 5$  each) were inoculated subcutaneously (100  $\mu$ L) with either PBS (PBS), BCG (BCG Phipps,  $8 \times 10^3$  CFU), LMs (1 mg of total lipid preparation from Ms), or LMs-AL (1 mg LMs + 1 mg Alum Alhydrogel, Sigma). The animals received two doses of PBS, LMs, and LMs-AL at 0 and 21 days whereas the group immunized with BCG received a single dose on day

0. Two months after the last immunization, all mice were challenged simultaneously by intratracheal exposure to Mtb H37Rv ( $2.5 \times 10^5$  CFU) as described [17, 18]. All procedures were performed in a laminar flow cabinet in a biosafety level III facility.

**2.5. Bacilli Load.** Two months after challenge, the mice were euthanized and one lung from each animal was aseptically removed and homogenized with a Polytron in sterile isotonic saline solution containing 0.05% Tween 80 (Sigma). Homogenized lungs were serially diluted and plated in duplicates on 7H10 agar (Difco Lab cod) plates. The plates were incubated for 3 weeks at 37°C and colonies were counted to determine the total CFU in lungs.

**2.6. Histopathology and Morphometric Studies.** Lung samples (the other lung from each infected Balb/c mouse) were dehydrated and embedded in paraffin. The lung tissues were sectioned at 5  $\mu$ m thick and stained with haematoxylin and eosin [18]. The areas affected by pneumonia which correspond to alveolar spaces occupied by inflammatory cells were measured and analyzed using Leica Q-win system software (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK, 25X). First, the whole area of the lung was measured. Then the areas affected by pneumonia were determined, and the percentage of lung surface affected by pneumonia was calculated in each mouse from the different groups.

**2.7. Data Management.** Measurements were made blind, and data of log<sub>10</sub> CFU and percentage of pneumonic area/lung are expressed as the mean  $\pm$  SD. One way ANOVA and Multiple Range tests were used for the determination of significant differences between the groups.

All the procedures were carried out according to the guidelines [19] and approved by the Ethical Committee for Experimentation in Animals of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán" (INCMNSZ) of Mexico.

## 3. Results and Discussion

In the present study, the protective capability against TB in mice of a lipid preparation from Ms (LMs-AL and LMs) using PBS as negative control and BCG as the gold standard was evaluated.

As shown in Figure 1, mice immunized with LMs-AL and LMs had significantly reduced bacterial load in the lungs compared to those immunized with PBS ( $P < 0.01$ ). LMs-immunized mice, with and without Alum, showed similar levels of lung CFU compared with each other and with BCG-vaccinated animals (Figure 1).

We have previously shown that mice immunized with LMs produced a significantly higher level of specific IgG response compared to animals receiving PBS alone [10]. We also demonstrated that immunization with this formulation elicited a cross-reactive IgG response against a cell wall fraction from Mtb [10]. Animals receiving the same formulation in combination with Alum or Montanide did



# ACUSE

2017 "Año del Centenario de la Proclamación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

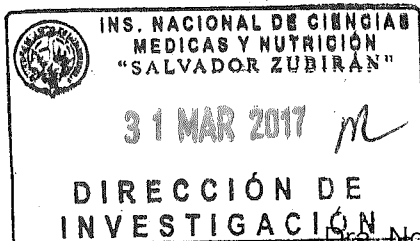
CDMX 30 de marzo del 2017.

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
Depto. Patología Experimental  
Presente

Estimada Dr. Hernández:

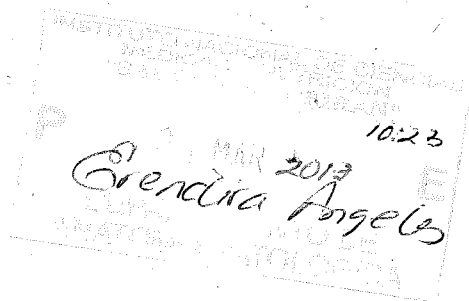
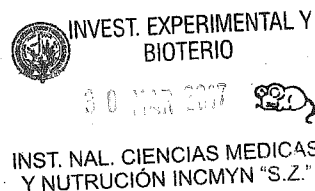
Por este medio solicito a usted el informe final del protocolo "ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE LA EFICIENCIA DE VACUNAS PARA PREVENIR LA TUBERCULOSIS BASADAS EN BACTERIAS MUTANTES, BCG RECOMBINANTE Y MOLÉCULAS DERIVADAS DE EXTRACTOS SOLUBLES DIALIZABLES DE LINFOCITOS", con registro CINVA: PAT-973-13-1, concluido el pasado 28 de febrero del 2017.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.



Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la CINVA



Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

Dr. Gerardo Gamba Ayala.- Director de Investigación y Presidente de la CINVA  
MVZ Mariela Contreras Escamilla.- Jefa del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

ACUSE

"2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

México D. F. a 28 de febrero de 2017.

**Dra. Norma Bobadilla Sandoval**  
**Coordinadora de la CINVA**  
Presente

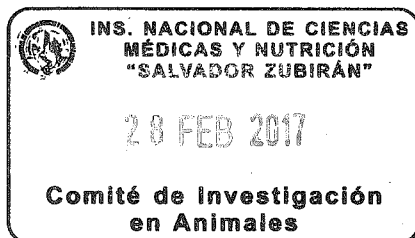
Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "ENSAYOS PRE-CLINICOS DE LA EFICIENCIA DE VACUNAS PARA PREVENIR LA TUBERCULOSIS BASADAS EN BACTERIAS MUTANTES, BCG RECOMBINANTE Y MOLÉCULAS DERIVADAS DE EXTRACTOS SOLUBLES DIALIZABLES DE LINFOCITOS", con No. de Registro Clave: PAT-973-1315-1, CINVA 973 debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

**Dr. Rogelio Hernández Pando**  
Investigador en Ciencias Médicas F  
Departamento de Patología  
Sección de Patología Experimental



C.c.p: **Dr. Gerardo Gamba Ayala** – Director de Investigación  
**Dra. Ma. Elena Flores Carrasco** – Encargada del Depto. de Invest. Exp. Y Bioterio





"Año del centenario de la promulgación de la constitución política de los Estados Unidos Mexicanos"

# ACUSE

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 23 de Febrero de 2017

**Dra. Rogelio Hernández Pando**  
Depto. de Patología Experimental  
Presente

1277  
INVEST. EXPERIMENTAL Y  
BIOTERIO BDE  
20170227 BDE  
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

Estimado Dr. Hernández.:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: "ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE LA EFICIENCIA DE VACUNAS PARA PREVENIR LA TUBERCULOSIS BASADAS EN BACTERIAS MUTANTES, BCG RECOMBINANTE Y MOLÉCULAS DERIVADAS DE EXTRACTOS SOLUBLES DIALIZABLES DE LINFOCITOS", con registro CINVA PAT-973-13/15-1, debido a que el periodo de realización y la prórroga correspondiente autorizado por la CINVA ha concluido. Favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente. De no recibir el formato de su parte en el plazo de 15 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular, por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

patología  
Brenda Margueta  
24/feb/2017

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación  
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom

Alexis  
23-02-17

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

México D.F. a 29 de Mayo de 2014

Dra. Norma A Bobadilla Sandoval.  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales.  
**PRESENTE:**

Estimada Dra. Norma Bobadilla:

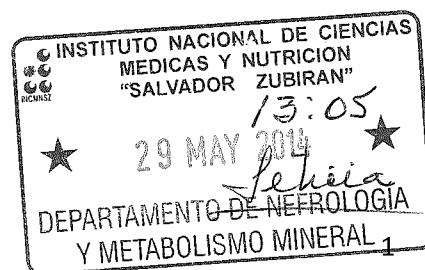
Muchas gracias por autorizar la prorroga del proyecto "Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos" con número de registro PAT-973-13/15-1.

Las líneas que están directamente relacionadas con este proyecto y que se estudiarán en esta prorroga son:

1.- Administración de fagos que expresan proteínas inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Vacuna	Fago	H37Rv	5186	
BCG Phipps	V1	48	48	480
	V2	48	48	
	V3	48	48	
	V4	48	48	
	CONTROL	48	48	
BCG Pasteur	V1	48	48	480
	V2	48	48	
	V3	48	48	
	V4	48	48	
	CONTROL	48	48	
			1er exp	960 ratones
			Repetición	1920 ratones

Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
México, D. F. 14000  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

2.- Vacunas de subunidad (nanotecnología). Administración de almidón asociado al antígeno inmunodominante alfa-cristalina de *M. tuberculosis*.

Vacuna	Grupos	H37Rv	5186	
BCG Phipps	Almidon/alfa-cris	18	18	108
	Almidon	18	18	
	Vehículo	18	18	
BCG Pasteur	Almidon/alfa-cris	18	18	108
	Almidon	18	18	
	Vehículo	18	18	
Sanos	Almidon/alfa-cris	18	18	108
	Almidon	18	18	
	Vehículo	18	18	
			1er exp	324 ratones
			Repetición	648 ratones

3.- Uso de una BCG recombinante que expresa el antígeno Hemoglobina Asociado a Heparina (HBHA).

Grupos	583	5186	
BCG Phipps-261	18	18	36
BCG Pasteur-361	18	18	36
BCG Phipps	18	18	36
BGC Pasteur	18	18	36
SSI	18	18	36
		1er exp	180 ratones
		rep	360 ratones

Se probaran varias estrategias vacunales y cada una debe ser probada independientemente en animales previamente vacunados con BCG Phipps y BCG Pasteur (cepas normales y recombinantes, las cuales confieren una memoria inmunológica que brinda una protección aguda y crónica respectivamente) en la cinética establecida en nuestros experimentos, cada cinética necesita 48 ratones (6 por tiempo de sacrificio, 8 tiempos), en los experimentos 2 y 3 solo se probaran 3 tiempos



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

*"2014, Año de Octavio Paz"*

de sacrificio con igual número de animales por tiempo. La duración de nuestros experimentos varía de 6-9 meses, razón por la cual solicitamos al bioterio nos proporcione cajas con microaisladores para guardar animales infectados en nuestras instalaciones dentro del bioterio y también para el área de reproducción, estas cajas nuevas facilitarían la depuración de muchas cajas que ya cumplieron con su vida útil y que necesitan ser cambiadas.

Sin más por el momento me despido de Usted, quedando a sus órdenes.

Atentamente

**Dr. Rogelio Hernández Pando**

Investigador en Ciencias Médicas "F"

Sección de Patología Experimental

Departamento de Patología

C.c.p. **Dr. Gerardo Gamba** – Director de Investigación

**Dr. Rafael Hernández González** – Jefe del Depto. de Investigación Experimental y Bioterio



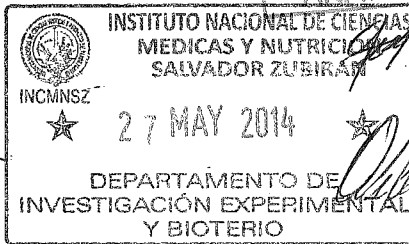
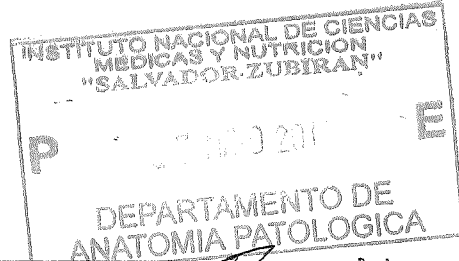
“2014, Año de Octavio Paz”

*Acuse*

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F., a 23 de Mayo del 2014

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Investigador en Ciencias Médicas F  
Departamento de Patología  
Presente.



Estimado Doctor Hernández Pando:

Por este conducto me dirijo a usted para informarle ha sido autorizada la prórroga solicitada hasta diciembre del 2016 para su proyecto intitulado “Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos” con número de registro PAT-973-13/15-1. Sólo es necesario que nos envíe una descripción detallada de los grupos de estudio y como se utilizarán los 1500 ratones solicitados.

Respecto a las cajas con microaislador para ratones que nos está solicitando, haremos una evaluación de cuantos proyectos que requieren ratones se están llevando a cabo en el bioterio y de acuerdo a esta evaluación se realizará una repartición equitativa de las nuevas cajas que se han recibido recientemente en el bioterio.

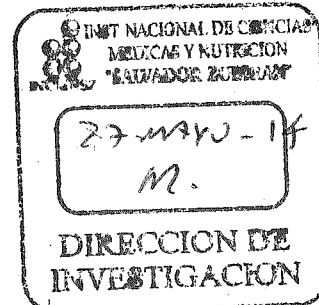
Sin otro particular me despido de usted enviándole un cordial saludo.

Atentamente,

*[Handwritten signature]*

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Vasco de Quiroga No. 15 Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación  
Colonia Sección XVI Dr. Rafael Hernández, Jefe del Bioterio  
Delegación Tlalpan  
México, D. F. 14000  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx



*01/2015*



"2014, Año de Octavio Paz"

México, D.F., a 20 de mayo de 2014

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

**DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO**  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS F  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Estimado Dr. Hernández,

Por este conducto acuso recibo de su comunicación recibida el 19 de mayo del presente referente a su solicitud para incrementar el número de animales en 1500 ratones por año y ampliar la vigencia del proyecto de investigación: "Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basada en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos" con número de registro PAT-973-13/15-1, en la que se incluye la petición de 150 cajas tipo microaislador para el mismo proyecto.

Le comunico que tanto su solicitud anterior, como la referida en este documento que amplía la información sobre el proyecto de investigación en que serán utilizados los animales y el uso de las cajas solicitadas, se presentarán a la CINVA para su revisión en la próxima sesión. En cuanto se téngala la instrucción tanto de la CINVA como de la Dirección de Investigación, se dará pronta respuesta a su solicitud.

Sin otro particular,  
Atentamente

**DR. RAFAEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
COORDINADOR DE LA COMISIÓN DE INVESTIACIÓN EN ANIMALES

C.c.p. Dr. Gerardo Gamba. Director de Investigación.

Dra. Norma Bobadilla. Miembro de la CINVA

Dra. Nimbe Torres. Miembro de la CINVA

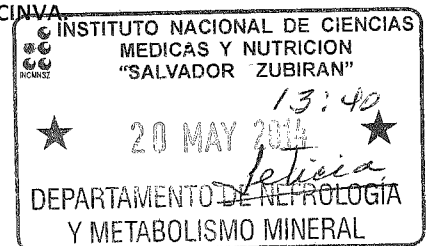
M en C María de la Luz Streber. Miembro de la CINVA

Dr. Gonzalo Torres. Miembro de la CINVA

Dr. Jorge Barrios. Miembro de la CINVA

Dr. Emiliano Tesoro Cruz. Miembro de la CINVA

Dr. Octavio Villanueva. Secretario de la CINVA





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México D.F. a 16 de Mayo de 2014

Dr. Rafael Hernández G.  
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales.  
**PRESENTE:**

Estimados miembros de la CINVA, a través de la presente deseo comentarles que nuestra línea de investigación "Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos" con número de registro PAT-973-13/15-1, recientemente ha aportado resultados de interés para la comunidad científica tanto nacional como internacional, situación que nos ha impulsado a ampliar nuestras investigaciones y por ende a aumentado nuestra necesidad de reproducir y almacenar más animales. Las nuevas líneas de experimentación que se han originado de este proyecto son: 1.- Administración de fagos que expresan proteínas inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis*. 2.- Administración de almidón asociado al antígeno inmunodominante alfa-cristalina y 3.- Nueva rBCG que expresa el antígeno HBHA. Para el desarrollo de estos experimentos serán necesarios 1500 animales por año y ampliar la vigencia del proyecto hasta 2016. Cabe mencionar que no se plantea la modificación de ninguno de los objetivos del proyecto planteados y aprobados por la CINVA.

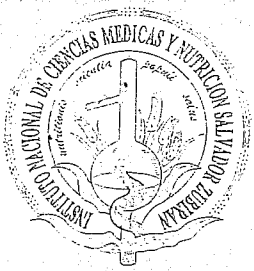
La enfermedad que estudiamos es crónica, por lo que generalmente nuestros experimentos son muy largos y los ratones pueden estar alojados hasta por 9 meses en los microaisladores. Las cajas que tenemos las hemos comprado nosotros y algunas de ellas ya están muy deterioradas, es por este motivo que amablemente solicitamos al bioterio nos proporcione 150 cajas con microaislador, 100 serán para guardar animales en nuestras instalaciones dentro del bioterio y 50 para el área de reproducción, estas cajas nuevas facilitarán la depuración de muchas cajas que ya cumplieron con su vida útil y que necesitan ser cambiadas.

Sin más por el momento me despido de Usted, quedando a sus ordenes.

Atentamente

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Investigador en Ciencias Médicas "F"  
Sección de Patología Experimental  
Departamento de Patología

016/2015



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

010/2014 9

Septiembre 13, 2013

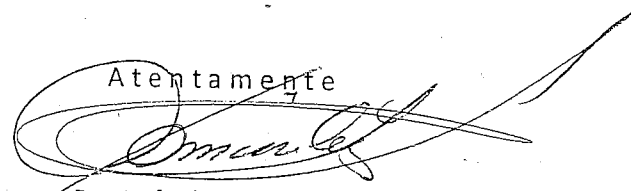
Dr. Rogelio Hernández Pando  
Investigador en Ciencias Médicas F  
Departamento de Patología y Anatomía Patológica  
Sección Patología Experimental  
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: **"Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos"**.

Registro CINVA: 973

Clave: PAT-973-13/15-1

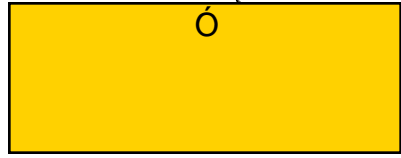
La Comisión de Investigación en Animales (CINVA) revisó el proyecto, y se decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente  


Dr. Rafael Hernández González  
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación  
MVZ.M.en C. Octavio Villanueva Sánchez. Secretario de la Comisión de  
Investigación en Animales

MVZ. Griselda Salmerón Estrada.- CINVA  
Dra. Nimbe Torres y Torres.- CINVA  
MVZ.M.C. Ma. de la Luz Streber J.- CINVA  
Dr. Gonzalo M. Torres Villalobos.- CINVA  
Dr. Emiliano Tesoro Cruz.- CINVA

17-Sep-2013  
0  


010/2015



prot.  
externo

## DATOS DEL PROYECTO

**# DE PROYECTO:** PICSA12-173

**PROGRAMA:**

CIUDAD SALUDABLE

**TEMA:**

VALIDACIÓN PRE-CLÍNICA Y CLÍNICA DE VACUNAS DE USO HUMANO Y VETERINARIO.

**TÍTULO DEL PROYECTO:**

ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE LA EFICIENCIA DE VACUNAS PARA PREVENIR LA TUBERCULOSIS BASADAS EN BACTERIAS MUTANTES, BCG RECOMBINANTE Y MOLÉCULAS DERIVADAS DE EXTRACTOS SOLUBLES DIALIZABLES DE LINFOCITOS

**ACRÓNIMO:** TB VAC

**DURACIÓN DEL PROYECTO:** 2 años

**RESUMEN:**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica de gran importancia clínica y epidemiológica particularmente en países en vías de desarrollo. Aunque existe tratamiento eficiente, este consiste en la administración de 4 antibióticos por un largo tiempo, lo que provoca abandono, recaídas y emergencia de cepas drogo-resistentes, además la vacuna BCG que es la única en uso en humanos, es extraordinariamente irregular en su nivel de protección particularmente en países subdesarrollados. Por estos motivos es importante la producción de nuevas vacunas o esquemas de vacunación. Las estrategias actuales más utilizadas para la producción de nuevas vacunas son la generación de bacterias vivas atenuadas, BCG recombinantes y vacunas de subunidad que se basan en la administración de antígenos solos o asociados a adyuvantes. En el presente proyecto se propone estudiar en un modelo murino bien caracterizado de TB pulmonar, la atenuación, inmunogenicidad y capacidad protectora de una cepa doble mutante del gen que codifica el factor sigma E esencial en mecanismos de adaptación de la bacteria para sobrevivir stress extracelular y del gen fadD26 que codifica para una enzima clave en la síntesis de lípidos complejos de pared celular (dimicocerosatos). Se propone también estudiar a una BCG recombinante a la que se le transfecto el gen que codifica para el antígeno hemaglutinina asociado a heparina, el cual contribuye a la invasividad de la bacteria y estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que bacterias que sobrepresan este gen se diseminan rápidamente e infectan al cerebro, por lo que esta BCG recombinante pudiera ser una forma mejorada de vacuna que podría ser más eficiente que la BCG convencional para evitar formas graves de TB como la meníngea. Finalmente, proponemos estudiar vacunas monoméricas usando proteínas purificadas de dializados solubles de linfocitos que han mostrado en nuestro modelo experimental buena actividad terapéutica y en experimentos preliminares usándolos como refuerzo en ratones vacunados con BCG han reducido significativamente la cantidad de bacterias cuando se compara con ratones solamente vacunados con BCG. Nuestro grupo de investigación tiene más de 20 años de experiencia trabajando en la inmunopatología de la tuberculosis experimental y el diseño y prueba de regímenes inmunoterapéuticos y vacunas, se cuenta con la infraestructura y amplia experiencia y capacidad para realizar este tipo de trabajo.

**INTRODUCCIÓN:**

La tuberculosis (TB) es una importante enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones. El agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un microorganismo patógeno intracelular facultativo que puede producir tanto enfermedad progresiva como infección latente asintomática (1). Generalmente la infección inicial se lleva a cabo en los pulmones durante la niñez y en la mayoría de los casos es controlada por el sistema inmunológico. Anualmente esta enfermedad produce cerca de 2 millones de defunciones a nivel mundial, con 9 millones de nuevos casos y un tercio de la humanidad tiene infección latente, lo cual la convierte en la enfermedad infecto-contagiosa más relevante a nivel mundial. A pesar de que actualmente la TB es curable, se necesita de 4 antibióticos administrados por 6 a 9 meses, lo que redundará en una alta tasa de abandono. Esta situación ha promovido recaídas y el surgimiento de cepas resistentes a varios antibióticos, lo cual complica aún más el tratamiento al incrementar su costo y toxicidad. La emergencia de cepas resistentes, la pandemia VIH/SIDA y el deterioro de los sistemas de salud pública en los países subdesarrollados han contribuido a empeorar la situación, de hecho es en los países en vías de desarrollo en donde ocurren el 95% de los casos de TB activa y el 98% de todas las defunciones (2). El consenso mundial es que para que exista un eficiente control de la TB se requiere de diagnóstico y tratamiento oportuno, quimioprofilaxis y vacunación eficiente la cual debería ser el más importante elemento. Sin embargo la vacuna actual BCG (Bacilo de Calmette Guerin) está lejos de ser la vacuna ideal y es por eso muy importante producir mejores y más eficientes vacunas y/o esquemas de vacunación. La BCG es una cepa *Mycobacterium bovis* viva y atenuada que ha sido utilizada desde el año 1921. La BCG se usa rutinariamente en los países subdesarrollados con TB endémica aplicándola una sola vez por vía subcutánea en el periodo neonatal y es de hecho la vacuna más aplicada en la historia de la humanidad. Las complicaciones de la BCG son raras, es relativamente barata y aparentemente eficiente para controlar formas graves de TB en la niñez como la miliar o cerebral, pero su eficiencia es limitada para prevenir la forma pulmonar en adultos en regiones en donde la TB es endémica (3), principalmente porque su eficiencia protectora es muy irregular, del 0 al 80% de acuerdo a diversos estudios (3). Los avances recientes en la inmunología y la genética molecular de Mtb, así como el desarrollo tecnológico de la biología molecular han contribuido a la generación de nuevos candidatos vacunales. Actualmente existen dos estrategias para la producción de vacunas, la primera es con bacterias vivas atenuadas como lo son las producidas por la eliminación de genes relacionados con virulencia (micobacterias atenuadas auxotróficas) (4), o subcepas BCG que han sido genéticamente manipuladas para que sobreexpresen antígenos inmunodominantes (BCG recombinantes) (5); la segunda estrategia es el uso de componentes moleculares no vivos, como las vacunas de DNA y antígenos puros inmunodominantes (vacunas de subunidad).

#### **ANTECEDENTES DIRECTOS:**

**Micobacterias mutantes atenuadas** La secuencia completa del genoma de Mtb y las técnicas para manipularlo han permitido caracterizar genes asociados con la virulencia. Una de las estrategias para estudiar la virulencia ha sido la producción de bacterias mutantes a las que se les han eliminado uno o más genes e infectar con estas animales de experimentación (6). Con este tipo de estudios se han reportado varias bacterias mutantes con diferentes grados de atenuación e inmunogenicidad, algunas se han probado como vacunas. La ventaja de estas bacterias es que generalmente expresan los más de 100 genes que perdió la BCG durante su atenuación. Nuestro grupo ha probado varias bacterias mutantes como vacunas en un modelo murino de TB, algunas de las cuales producen protección similar (6) o mejor que la BCG (7). Mtb es un patógeno capaz de adaptarse y sobrevivir agresiones de su medio ambiente debido a una red compleja de regulación que induce la expresión de genes esenciales para su supervivencia. Los factores sigma son importantes en este proceso y de estos el factor E es el mejor estudiado, al eliminarlo por mutación dirigida se produjo notable atenuación, además los ratones

infectados con estas bacterias sobre-expresan los factores protectores interferon gamma (IFN), factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (8). En comparación con la vacunación con BCG, los ratones vacunados con bacterias mutantes sigE y retados con bacterias de virulencia intermedia o alta, tuvieron sobrevivida mayor y menor carga bacilar y daño tisular (8). Por estos resultados el grupo Europeo de vacunas integró a esta mutante en su lista de vacunas nuevas de alto potencial. Recientemente este grupo decidió que es necesaria una segunda mutación para inducir mayor atenuación, aunque esta puede afectar su inmunogenicidad. La mutante sigE fue producida por el Prof Manganeli de la Universidad de Padua Italia y nuestro grupo probó su eficiencia vacunal en el modelo murino (8). El grupo italiano ya ha producido la doble mutante, eliminando al gen fadD26 en la misma mutante sigE y nos la han enviado para estudiarla en el modelo murino. La mutante-fadD26 fue producida por la Prof Gicquel del Instituto Pasteur y también nuestro grupo la estudio en el modelo murino (9). La mutante fadD26 tiene eliminado el gen que codifica la enzima clave para la producción del tiocerol dimicocerosato, un componente estructural y funcional importante de la pared bacteriana. La mutante fadD26 es atenuada y como vacuna mostro mejor actividad protectora que BCG (9) BCG recombinantes La BCG fue obtenida a partir de un aislado clínico de *M. bovis*, el cual se atenuó después de 230 pases durante 13 años (1908-1921). Posteriormente esta BCG se distribuyó a diferentes países en donde se creció y subcultivo muchas veces, produciéndose varias subcepas las cuales son genética y antigénicamente distintas entre ellas y con la original. Al probar 10 de estas subcepas en el modelo murino se observó que todas protegen pero en diverso grado, siendo la subcepa Phipps la más eficiente (10). En nuestro sistema experimental siempre usamos la subcepa Phipps como control e idealmente se debería usar esta para la producción de BCG recombinantes. Existen tres variantes de BCG recombinante, la primera se basa en la restauración de los genes que la BCG perdió durante su atenuación; la segunda es la transfección de genes que codifican citocinas protectoras y la tercera es la transfección de antígenos muy inmunogenicos que expresa poco o no expresa la BCG (4). Uno de los antígenos que *Mtb* expresa en la superficie de la pared celular y que es esencial para la invasión y diseminación es la hemaglutinina asociada a heparina (heah), este antígeno es muy inmunogenico y buen candidato para producir una BCG recombinante que lo sobreexpres. Desde hace algunos años hemos estado estudiando la influencia de la diversidad genética de *Mtb* en la virulencia y respuesta inmunológica, principalmente usando aislados clínicos obtenidos de estudios epidemiológicos (11). En un estudio epidemiológico realizado en Colombia se obtuvieron aislados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con TB meníngea, una de las formas más graves de la enfermedad. En este estudio se observó que algunas de estas cepas tenían un patrón genotípico diferente a las aisladas del pulmón y cuando tres de estas se usaron para infectar por vía intratraqueal ratones BALB/c, las tres se diseminaron rápidamente por vía hematogena e infectaron al cerebro (12). Nuestros resultados experimentales recientes han mostrado que el gen que más expresa la bacteria durante la infección al tejido nervioso es la heah. Una de las principales cualidades que tiene BCG para justificar su uso actual es que previene las formas graves de TB, en particular la forma diseminada y meníngea; sin embargo hay aéreas del mundo en donde se usa la BCG y los casos de TB meníngea son relativamente frecuentes. Es entonces interesante la posibilidad de producir una BCG recombinante que sobreexpres la heah, la cual teóricamente sería una vacuna mejorada más eficiente para prevenir la TB meníngea. En colaboración con el Dr M A Flores del CIATEJ en Guadalajara Jal, se han obtenido dos recombinantes BCG que sobre-expresan heah y podemos determinar el grado de protección conferida por estas en ratones vacunados y retados con una cepa *Mtb* aparentemente neurotrópica que es además hipervirulenta (cepa LAM 209). Vacunas de subunidad Estas corresponden a antígenos inmunodominantes de *Mtb*, como lo son ESAT-6 y Ag85b que confieren protección en ratón y cuando son fusionados y acompañados con adyuvantes producen un nivel de protección similar a la BCG. Con el objetivo de inducir memoria a más largo plazo y un mayor nivel de protección se han usado también las vacunas de subunidad como

refuerzo post-vacunal a la administración de BCG con buenos resultados. Es importante considerar que en estudios en los que se ha revacunado con BCG se induce menos o no hay cambio en comparación con la protección producida por una sola administración, además en países con TB endémica como el nuestro la mayoría de los sujetos ya están vacunados o tienen infección latente, en consecuencia una buena alternativa es reforzar la vacunación hecha con BCG administrando refuerzos con vacunas de subunidad. En el presente proyecto se usarán péptidos purificados de productos dializables solubles de linfocitos como vacunas de subunidad y refuerzos en animales previamente vacunados con BCG. Los productos solubles derivados de dializados de linfocitos, también conocidos como factor de transferencia, son moléculas de bajo peso obtenidas de linfocitos de sangre periférica que son capaces de transferir la capacidad de expresar inmunidad mediada por células de sujetos sensibilizados a personas no inmunizadas. Hasta el momento actual no se ha caracterizado la naturaleza bioquímica y el mecanismo molecular de su actividad, pero se han utilizado ampliamente en el tratamiento de diversas enfermedades. En colaboración con el Dr B Anton del InstNac de Psiquiatría y los Dres Estrada Parra y Estrada García del IPN, se ha realizado un extenso estudio de purificación y caracterización molecular de estos productos dializables de leucocitos. Más de 500 péptidos se han identificado y 50 de ellos se han probado en su capacidad terapéutica en nuestro modelo de TB. Diez péptidos tuvieron actividad terapéutica significativa y recientemente los hemos usado en un experimento preliminar como vacunas de subunidad en ratones previamente vacunados con BCG. En estos experimentos los ratones vacunados con BCG y después reforzados con 4 péptidos diferentes mostraron 400% menos bacterias vivas en los pulmones que animales que recibieron solamente BCG.

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Obtener una bacteria mutante atenuada, una BCG recombinante y un esquema de vacunación usando péptidos solubles dializables de linfocitos como vacunas de subunidad para reforzar la vacuna BCG, que sean igual o más protectoras que la vacuna BCG convencional en ensayos preclínicos in-vivo

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

##### **OBJETIVO: 1**

##### **DESCRIPCIÓN:**

Determinar el nivel de virulencia e inmunogenicidad de la bacteria doble mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c

##### **DISEÑO PARTICULAR DE LA INVESTIGACIÓN DEL OBJETIVO:**

Ratones machos BALB/c se infectan por vía intratraqueal con 250,000 bacterias/100µl de PBS. Grupos de 50 ratones se infectarán: 1) cepa doble mutante sigE/fadD26, 2) cepa parental no mutada y 3) cepa mutante a la que se le restituyeron los genes eliminados. Grupos de 6 ratones se sacrificarán por exsanguinación los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. Cuatro pulmones se usarán para determinar carga bacilar, daño tisular por morfometría y expresión de citocinas por RT-PCR tiempo real

##### **OBJETIVO: 2**

##### **DESCRIPCIÓN:**

Estudiar el nivel de protección conferido por la doble mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c retados con bacterias de virulencia intermedia y alta

**DISEÑO PARTICULAR DE LA INVESTIGACIÓN DEL OBJETIVO:**

Grupos de 12 animales se vacunaran por vía subcutánea con la dosis de bacterias mutantes o BCG recombinante que haya producido el mayor nivel de IFN. El grupo control recibirá solo el vehículo o se vacunara con BCG Phipps. Después de dos meses, los animales se infectan por vía intratraqueal con 250,000 bacterias cepa H37Rv de virulencia intermedia y cepa LAM hipervirulenta. Grupos de 6 ratones se sacrifican 2 y 4 meses después; en los pulmones se determinara carga bacilar y daño histológico

**OBJETIVO: 3****DESCRIPCIÓN:**

Determinar la capacidad de crecimiento, diseminación e inmunogenicidad de la BCG transfectada con el gen que codifica la hemaglutinina asociada a heparina.

**DISEÑO PARTICULAR DE LA INVESTIGACIÓN DEL OBJETIVO:**

Grupos de ratones se vacunaran con diferentes dosis de bacterias mutantes o BCG recombinante. Después de 1, 2, 4 y 8 semanas, se sacrificaran y los ganglios linfáticos, bazo y pulmones se dividirán para determinar UFC y suspensiones celulares que se estimulan con antígenos de Mtb en los sobrenadantes se cuantificara IFN. Con esto se define la dosis de vacuna para los experimentos de reto y la capacidad de proliferación y diseminación de la BCG recombinante y doble mutante

**OBJETIVO: 4****DESCRIPCIÓN:**

Establecer el nivel de protección conferido por la BCG recombinante del antígeno hemaglutinina asociado a heparina en ratones BALB/c retados con la cepa de referencia H37Rv y el aislado clínico hipervirulento y con aparente neurotropismo 209

**DISEÑO PARTICULAR DE LA INVESTIGACIÓN DEL OBJETIVO:**

Grupos de 12 animales se vacunaran por vía subcutánea con la mejor dosis de BCG recombinante, el grupo control recibirá el vehículo solamente, otro grupo control de máxima protección se vacunara con BCG Phipps. Después de dos meses, los animales se anestesian e infectan por vía intratraqueal con 250,000 bacterias vivas cepa H37Rv de virulencia intermedia, cepa LAM y 209 hipervirulenta, en los pulmones se determinara carga bacilar y daño tisular 2 y 4 meses después del reto

**OBJETIVO: 5****DESCRIPCIÓN:**

Evaluar el nivel de protección conferido por los péptidos 1, 4, 35 y 36 administrados solos o en sistemas adyuvantes en ratones BALB/c vacunados con BCG

**DISEÑO PARTICULAR DE LA INVESTIGACIÓN DEL OBJETIVO:**

Se vacunaran ratones con BCG Phipps y dos meses después se les administrara subcutáneamente 1µg de los péptidos en dos refuerzos, solos o acoplados a hemocianina. Después de dos meses del último refuerzo, los animales se infectan por vía intratraqueal con 250,000 bacterias vivas cepa H37Rv o LAM hipervirulenta. Grupos de 6 ratones se sacrificaran a los 2 y 4 meses post reto, para determinar la cantidad de bacterias vivas y el daño tisular

## **METAS:**

### **META: 1**

#### **DESCRIPCIÓN:**

Determinar nivel de atenuación y protección de la doble mutante sigE/fadD26, se espera que sea mejor que la BCG convencional

### **META: 2**

#### **DESCRIPCIÓN:**

Determinar la protección de la BCG recombinante heah, se espera que sea más eficiente para evitar la diseminación y desarrollo de tuberculosis extrapulmonar que la BCG convencional

### **META: 3**

#### **DESCRIPCIÓN:**

Confirmar que la administración de péptidos solubles de dializados de linfocitos usados para reforzar la vacunación con BCG sean más eficientes para producir protección que la vacuna BCG sola.

## **JUSTIFICACIÓN:**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica de gran importancia clínica y epidemiológica que afecta sobre todo a países en vías de desarrollo, en donde la vacuna BCG la única actualmente en uso es ineficiente en proteger el desarrollo de tuberculosis pulmonar en población adulta. Es por lo tanto necesario desarrollar nuevas vacunas o esquemas de vacunación que sean más eficientes que la vacuna BCG, que primero deben evaluarse pre-clínicamente en modelos experimentales bien caracterizados

## **DESCRIPCIÓN:**

### **A) EL PROBLEMA PRÁCTICO O CIENTÍFICO QUE MOTIVÓ A LA PROPUESTA:**

Varios grupos de investigación en diversas partes del mundo han estado trabajando en producir nuevas y más eficientes vacunas para prevenir la tuberculosis, incluido el nuestro que en colaboración internacional con diferentes grupos se han estudiado el nivel de atenuación y protección conferida por bacterias mutantes atenuadas, en particular la mutante sigE y fadD26 han producido mayor protección que la BCG en un modelo murino de tuberculosis. Contamos actualmente con la doble mutante sigE/fadD26 que teóricamente debe de ser más atenuada y quizás induzca más protección que las mutantes con eliminación única de los mismos genes. Otra estrategia utilizada para producir vacunas más eficientes es la tranfección de genes que codifican antígenos inmunodominantes a la vacuna BCG, con lo cual esta BCG recombinante producirá mas antígenos específicos que induzcan respuestas inmunológicas eficientes, un antígeno importante de virulencia por su capacidad de conferir invasión y diseminación es la hemaglutinina asociada a heparina, contamos con una BCG recombinante que sobrepresa este antígeno y es necesario probarla en un modelo in-vivo para definir si esta es más capaz de evitar sobre todo la diseminación e infección sobre todo del tejido nervioso. Finalmente, el esquema de vacunación basado en administrar primero BCG y después reforzar con la administración de vacunas de subunidad es otra estrategia de gran potencialidad y resultados preliminares nuestros muestran que haciendo esto con péptidos dializables de linfocitos produce una respuesta protectora significamente

mejor que la BCG sola. La posibilidad de mejorar la respuesta protectora utilizando sistemas adyuvantes a estos péptidos es una atractiva posibilidad que debe de experimentarse.

#### **B) EL DISEÑO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN:**

Para evaluar la atenuación, inmunogenicidad y nivel de protección se usara un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c ampliamente caracterizado. Para determinar la atenuación de la bacteria mutante, se infectaran ratones por via intraqueal con la cepa mutante, cepa parental no mutante y cepa complementada (mutante a la que se le transfectoron los genes eliminados para reconstituir su funcionalidad) y se determinara la sobrevida de los animales infectados, en diferentes tiempos se sacrificaran y se determinara la cantidad de bacterias vivas en los pulmones por conteo de unidades formadoras de colonia y la extensión del daño tisular por la cuantificación del porcentaje del pulmon afectado por neumonía usando morfometria automatizada. Grupos de ratones inmunodeficientes se vacunaran con estas bacterias y su sobrevida se determinara. Para evaluar la inmunogenicidad, los pulmones colectados en diferentes tiempos se usaran para purificar RNA total y por RT-PCR en tiempo real se cuantificara la expresión de los genes que codifican IFN y TNF. Para evaluar la inmunogenicidad in-vitro, ratones BALB/c son vacunados por via subcutánea y en diferentes tiempos se sacrificaran para obtener ganglios linfáticos, bazo y pulmon, de los cuales se hacen suspensiones celulares que se estimulan con antígenos totales e inmunodominantes de *M. tuberculosis*, en los sobrenadantes se medira IFN por ELISA, la dosis que haya producido mas IFN se usa para vacunar ratones y dos meses después se evaluara la protección al retar con *M. tuberculosis* de virulencia intermedia e hipervirulentas, determinando la sobrevida, carga bacilar pulmonar y daño tisular en ratones sacrificados 2 y 4 meses después del reto, comparándolos con controles no vacunados o vacunados con BCG

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.-Rook GAW, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. Annual Rev Microbiol 1996, 50: 259-284.
- 2.- World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB endemics. Geneva. WHO. 1994
- 3.- Fine, P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 1991; 346: 1339-1345
- 4.- Hernández Pando R, Castañón M, Espitia C, Lopez Vidal Y. Recombinant BCG vaccines. Current Molecular Medicine 2007; 7: 365-372.
- 5.-Hernández Pando R, Aguilar LD, Infante E, Cataldi A, Bigi F, Martín C, Gicquel B. The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. Tuberculosis 2006; 86: 203-210.
- 6.- Martín C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, Soto CY, Clark S, Hatch GJ, Aguilar D, Ausina V, Gicquel B. 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: 3408-3419.
- 7.- Aguilar LD, Infante E, Bianco MV, Cataldi A, Bigi F, Hernandez Pando R. Immunogenicity and protection induced by Mycobacterium tuberculosis *mce-2* and *mce-3* mutants in a Balb/c model of progressive pulmonary tuberculosis. Vaccine 2006; 24: 2333-2342.
- 8., Hernandez Pando R, Aguilar D, Smith I, Manganeli R. Immunogenicity and protection induced by a Mycobacterium tuberculosis *sigE* mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. Infection & Immunity 2010, Jul;78(7):3168-76.
- 9.- Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Hernández Pando R. Immunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium tuberculosis *fadD26* mutant. Clin Exp Immunol 2005; 141: 21-28.
- 10.- Castillo-Rodal A, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva Mercado J, Sada D E, López-Vidal Y. BCG sub-strains confers different protection against Mycobacterium tuberculosis infection in BALB/c model of progressive pulmonary

tuberculosis. Infection and Immunity 2006; 74: 1718-1724. 11.- Hernández Pando R, Marquina B, Barrios J, Mata D. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of Mycobacterium tuberculosis. Infection Genetics and Evolution 2012, 12: 725-731. 12.- Hernandez Pando R, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Aguilar D, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Experimental model of extensive M. tuberculosis dissemination with brain infection induced by specific bacterial genotype. Tuberculosis (Edinb) 2010 Jul 90: 268-77

## ENTREGABLES

### 1.- Educación

Sub Categoría	Semestre de entrega	Descripción
Seminario	4to. Semestre	Presentación de resultados en foros organizados por el ICyTDF tales como el Seminario Permanente de Investigación de Ciencia y Tecnología o en la Semana de la Ciencia y la Innovación como ya se tuvo el honor de participar en octubre de 2011.
Congreso internacional	3er. Semestre	Presentación de los resultados en un congreso internacional sobre vacunas
Maestría	4to. Semestre	El Médico Cirujano Hector Mayoral egresado de la ENEP Iztacala UNAM ha sido recientemente aceptado como estudiante de Maestría en Ciencias Médicas en la Escuela Superior de Medicina del IPN, el desarrollara como proyecto de tesis el estudio con las vacunas subunidad. De acuerdo al programa terminara sus estudios y obtendrá el grado al finalizar el proyecto en el cuarto semestre, por lo que nos comprometemos a entregar la Tesis de Maestría "Efecto inmunoproliferativo de péptidos purificados del factor de transferencia en la tuberculosis pulmonar en un modelo murino



## 1.- Educación

Sub Categoría	Semestre de entrega	Descripción
		de vacunación con BCG". El QFB Martin Becerril Sambrano egresado de la Universidad la Salle aprobó recientemente el exámen de ingreso a la Maestría en Ciencias Bioquímicas en la UNAM, el desarrollara como proyecto de tesis el estudio con la mutante sigE/fadD26. De acuerdo al programa terminara sus estudios y obtendrá el grado al finalizar el proyecto en el cuarto semestre. Por lo que nos comprometemos a entregar la Tesis de Maestría "Actividad inmunoprotectora de la bacteria doble mutante sigE/fadD26 en un modelo experimental de tuberculosis"

## 2.- Investigación científica

Sub Categoría	Semestre de entrega	Descripción
Artículo en revista indexada	4to. Semestre	Se publicaran 3 trabajos internacionales, uno por cada modalidad de vacuna en el cuarto semestre del proyecto.
Solicitud Nacional	4to. Semestre	Se solicitara una patente ante el IMPI para proteger la vacuna con la micobacteria recombinante BCG conjuntamente con el CIATEJ.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES Y TAREAS

**ACTIVIDAD O TAREA****ENTREGABLE****SEMESTRE DE ENTREGA**

Estudio de la virulencia de la bacteria mutante Durante el primer semestre se realizaran los experimentos de virulencia, consistentes en infectar por via intratraqueal la bacteria mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c, se determinara la sobrevida y estudios cinéticos de carga bacilar y daño tisular comparándola con la cepa parental y complementada. Ratones desnudos se vacunaran con las mismas cepas y su sobrevida se registrara para construir curvas de sobrevida. Se determinara la inmunogenicidad y la capacidad de proliferacion y diseminación de las dos BCG recombinantes en ratones vacunados a los que se les sacrificara en diferentes tiempos y los ganglios linfáticos, bazo y pulmon se obtendrán para determinar la cantidad de BCG por UFC y en suspensiones celulares la cantidad de IFN producido por la incubación con antígenos micobacterianos inmunodominantes. El mismo tipo de estudios se realizara en ratones vacunados con los 4 péptidos que se usaran como vacunas de subunidad en animales inicialmente vacunados con BCG, comparando a los péptidos solos con los incorporados con hemocianina como adyuvante.

Maestría

1er. Semestre

Durante el segundo semestre se repetirán los experimentos descritos para el primer semestre para confirmar reproducibilidad Los resultados obtenidos durante los tres primeros semestres se analizaran y organizaran para ser presentados en el International Congress of Vaccination

Maestría

2do. Semestre

Durante el tercer semestre se realizaran los estudios de protección, vacunando animales con la dosis de la bacteria mutante, BCG recombinante y péptidos de subunidad que hayan inducido la máxima cantidad de IFN y que con esto sugiera que es la dosis idónea. Dos meses después se retaran con bacterias de virulencia intermedia y alta y se sacrificaran a los 2 y 4 meses para evaluar en los pulmones la cantidad de bacterias vivas por UFC y la extensión del daño histológico, siempre comparando con animales no vacunados y vacunados con BCG. Los resultados preliminares se presentaran en un congreso internacional

Maestría

3er. Semestre

Durante los cuatro semestres que durará este trabajo, se organizaran los resultados obtenidos para poder presentarlos de manera actualizada en foros organizados por el ICyTDF.

Seminario

4to. Semestre

Si los resultados son satisfactorios, la patente en Europa que ya existe con la mutante sigE se pueden ampliar para esta doble mutante. La recombinante BCG también es patentable en conjunto con el CIATEJ.

Solicitud Nacional

4to. Semestre

Los resultados del nivel de atenuación e inmunogenicidad de la bacteria doble mutante sigE/fadD26, asi como su capacidad para proteger comparada con BCG después de retar ratones con cepas de virulencia alta e intermedia se publicaran en un trabajo en una.

Articulo en revista indexada

4to. Semestre

**ACTIVIDAD O TAREA****ENTREGABLE****SEMESTRE  
DE  
ENTREGA**

revista internacional. La capacidad de la BCG recombinante para proliferar y diseminarse, así como su inmunogenicidad y capacidad protectora para evitar sobre todo la diseminación e infección del cerebro producida por una cepa hipervirulenta y neurotrópica comparada con la BCG convencional serán los resultados para publicar un segundo artículo La inmunogenicidad y capacidad protectora de 4 péptidos diferentes obtenidos como productos dializables de leucocitos será determinada en animales previamente vacunados con BCG y retados con cepas de virulencia intermedia y alta, comparando con animales solo vacunados con BCG y con el mismo sistema pero con péptidos unidos a hemocianina como adyuvante serán los resultados que se informaran en una tercera publicación.

Durante el cuarto semestre se repetirán los experimentos de reto/protección descritos en el semestre anterior para confirmar reproducibilidad, se escribirán los artículos correspondientes para enviarlos a publicación y las tesis de los estudiantes, así como el reporte final del proyecto

Maestría

4to. Semestre

**FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO****MONTO TOTAL SOLICITADO:****\$ 850,000.00****RUBRO****TOTAL****JUSTIFICACIÓN****CANTIDAD**

Gasto corriente

\$ 650,000.00

Animales de Experimentacion. Para el estudio de virulencia se requerirá de grupos de ratones BALB/c machos de 8 semanas para ser infectados con cada grupo con la cepa mutante, cepa parental, cepa complementada y el control cepa H37Rv, cada cepa requiere de 50 ratones que se sacrifican en grupos de 6 en los días postinfeccion: 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días y se realizan dos experimentos

**RUBRO**

**TOTAL**

**JUSTIFICACIÓN**

**CANTIDAD**

independientes, se dejan 10 animales por cepa para realizar curvas de sobrevida. En total para este experimento se necesitaran 500 ratones. Se usaran además 160 ratones desnudos, 20 por grupo para cada cepa para evaluar sobrevida en dos experimentos independientes. Para los estudios de inmunogenicidad, de los experimentos anteriores se obtendrán los pulmones para determinar expresión de citocinas, para hacer la inmunogenicidad in-vitro se necesitaran 170 ratones, 10 animales se sacrifican los días 7, 15, 30 y 60 después de la vacunación para obtener suspensiones celulares y estimularlas con antígenos bacterianos, las bacterias por estudiar son la mutante, parental, complementada y el control con BCG, son dos experimentos independientes. Para el experimento con la BCG recombinante se realizara un experimento similar estudiando la BCG recombinante (tenemos 2 cepas), BCG transfectada con el plasmido vacio y BCG sin transfectar, son 170 ratones mas. Para el

RUBRO

TOTAL

JUSTIFICACIÓN

CANTIDAD

experimento de inmunogenicidad en animales vacunados con BCG que reciben refuerzos con vacunas de subunidad, tenemos 4 vacunas y el grupo control vacunado solamente con BCG, el total de animales estimado es de 200 para dos experimentos independientes. Para el experimento de reto/protección, se usaran 40 ratones para sacrificar 10 a los 2 meses y otros 10 a los 4 meses después del reto con una bacteria de virulencia intermedia y otra muy virulenta, por cada vacuna en dos experimentos independientes son 80 ratones, el total es 1120 ratones. El gran total de animales requeridos será de 2000 ratones, estos experimentos requieren que en promedio los animales por experimento se mantengan hasta por 6 meses en el bioterio, tiempo en el que se requiere de alimento y cambio de cama. Total 350000.00 pesos. Material de laboratorio. Para cultivo de bacterias (medios de cultivo, cajas de petri), estudios histológicos (fijadores,

RUBRO	TOTAL	JUSTIFICACIÓN	CANTIDAD
-------	-------	---------------	----------

parafina, colorantes, laminillas etc), cultivo de células e inmunología (medio de cultivo, suero fetal bovino, kits de ELISA) y de biología molecular (RT-PCR para la expresión de citocinas). Total 300000.00 pesos

Gasto de inversión \$ 200,000.00


Hace aproximadamente 15 años se obtuvo con un apoyo de CONACyT un equipo de análisis de imagen el cual ha sido muy útil para el tipo de trabajo de investigación que realizamos. Después de ese tiempo este equipo es obsoleto, usa discos de 3/4 para almacenar información y estos ya no existen en el comercio, además la cámara asociada al microscopio es muy antigua y de poca resolución. Se solicita la renovación de este equipo lo cual es mucho más económico que un equipo nuevo y la compañía Aspelab que nos lo vendió nos ofrece un descuento especial como lo muestra la cotización anexa. Total: 150000.00 pesos Los animales para ser infectados se requiere que se anestesien con sevofloran el cual es volátil y este se usa virtiendolo en algodón

RUBRO	TOTAL	JUSTIFICACIÓN	CANTIDAD
		<p>en una caja de acrilico en donde se ingresa el raton, es un sistema eficiente pero se podria hacer este trabajo mucho mejor con un vaporizador termocompensado,el cual es un aparato que calienta al anestesico para su optima vaporizacion y lo mezcla con oxigeno permitiendo un periodo mas prolongado, controlado y eficiente del anestesico, ademas permite un substancial ahorro del anestesico que es muy costoso Total 50000.00 pesos</p>	
	<b>Total:</b> \$ 850,000.00		

## ARCHIVOS

Nombre	Archivo
Carta de protección de datos personales	PICSA12-173_FPDP.pdf
Carta protesta	PICSA12-173_FCP.pdf
Carta de la empresa o institución responsable	PICSA12-173_FCE.pdf
Carta compromiso	PICSA12-173_FCC.pdf

(2447)

 <p>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición <b>Salvador Zubirán</b></p>	<p>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN</p> <p>SALVADOR ZUBIRAN</p> <p>Dirección de Investigación</p> <p>FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS</p>
---	---

FECHA DE RECEPCIÓN: 28/05/2013

CLAVE: PAT-973-13/15-1

TÍTULO: Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: HERNANDEZ PANDO ROGELIO

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL DISTRITO FEDERAL	\$ 850,000.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 30/10/2013 al 30/11/2015

	Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4
Primer año	\$ 850,000.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 200,000.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		FIRMAS	
Materiales	\$ 300,000.00	○	○
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de Departamento
Animales	\$ 350,000.00		○
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Estudios	\$ 0.00	○	○
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		Director de Investigación	Director General
Viaticos	\$ 0.00	○	○



**Titulo: Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos.**

**Resumen**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica de gran importancia clínica y epidemiológica particularmente en países en vías de desarrollo. Aunque existe tratamiento eficiente, este consiste en la administración de 4-3 antibióticos por un largo periodo de tiempo, lo que provoca abandono y en consecuencia recaídas y emergencia de cepas drogo-resistentes, además la vacuna BCG que actualmente es la única en uso en la población humana es extraordinariamente irregular en el nivel de protección que confiere y es específicamente poco protectora en países en vías de desarrollo. Por estos motivos es importante la producción de nuevas vacunas o esquemas de vacunación para controlar a esta importante enfermedad infecciosa. Las estrategias actuales más frecuentemente utilizadas para la producción de nuevas vacunas anti-TB son: la generación de bacterias vivas atenuadas por eliminación de genes asociados a virulencia sin que afecte o incluso incremente su inmunogenicidad; BCG recombinantes producidas por la transfección de genes de la bacteria que codifican antígenos inmunodominantes y vacunas de subunidad, que se basan en la administración de antígenos monoméricos solos o asociados a adyuvantes.

En el presente proyecto se propone estudiar en un modelo ampliamente caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones singénicos, la atenuación, inmunogenicidad y capacidad protectora de una cepa doble mutante del gen que codifica el factor sigma E esencial en mecanismos de adaptación de la bacteria para sobrevivir stress extracelular y del gen fadD26 que codifica para una enzima esencial en la síntesis de lípidos complejos de pared celular (dimicocerosatos). Es importante mencionar que las mutantes de cada gen por separado son muy atenuadas y confieren importante protección cuando se usan como vacunas. Se propone también estudiar a una BCG recombinante a la que se transfecto el gen que codifica para el antígeno hemaglutinina asociado a heparina, el cual contribuye a la invasividad de la bacteria y estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que bacterias que sobrepresan este gen se diseminan rápidamente por vía hematogena e infectan al cerebro, por lo que esta BCG recombinante pudiera ser una forma mejorada de vacuna que podría ser más eficiente que la BCG convencional para evitar formas graves de TB como la cerebral o meníngea. Finalmente, proponemos también estudiar vacunas monoméricas usando proteínas purificadas de dializados solubles de linfocitos que han mostrado en nuestro modelo experimental buena actividad terapéutica y en experimentos preliminares usándolos como refuerzo en ratones vacunados con BCG han reducido hasta cuatro veces la cantidad de bacterias cuando se compara con ratones solamente vacunados con BCG. Nuestro grupo de investigación tiene más de 20 años de experiencia trabajando en la inmunopatología de la tuberculosis experimental y el diseño y prueba de regímenes inmunoterapéuticos y vacunas, se cuenta con la infraestructura, experiencia y capacidad para realizar este tipo de trabajo..

## Introducción

La tuberculosis (TB) es una importante enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones (1). El agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un microorganismo patógeno intracelular facultativo que puede producir tanto enfermedad progresiva como infección latente asintomática (1). Generalmente la infección inicial se lleva a cabo en los pulmones durante la niñez y en la mayoría de los casos es controlada por el sistema inmunológico (2). Anualmente esta enfermedad produce cerca de 2 millones de defunciones a nivel mundial, con 9 millones de nuevos casos y un tercio de la humanidad tiene infección latente, lo cual la convierte en la enfermedad infecto-contagiosa más relevante a nivel mundial (3).

A pesar de que actualmente la TB es curable, se necesita de 4 antibióticos administrados por 6 a 9 meses, lo que redundo en una alta tasa de abandono. Esta situación ha promovido recaídas y el surgimiento de cepas resistentes a varios antibióticos, lo cual complica aún más el tratamiento al incrementar su costo y toxicidad (4). La emergencia de cepas resistentes, la pandemia VIH/SIDA y el deterioro de los sistemas de salud pública en los países subdesarrollados han contribuido a empeorar la situación, de hecho es en los países en vías de desarrollo en donde ocurren el 95% de los casos de TB activa y el 98% de todas las defunciones (3). El consenso mundial es que para que exista un eficiente control de la TB se requiere de diagnóstico y tratamiento oportuno, quimioprofilaxis y vacunación eficiente la cual debería ser el más importante elemento. Sin embargo la vacuna actual BCG (Bacilo de Calmette Guérin) está lejos de ser la vacuna ideal y es por eso muy importante producir mejores y más eficientes vacunas y/o esquemas de vacunación.

La BCG es una cepa *Mycobacterium bovis* viva y atenuada que ha sido utilizada desde el año 1921. La BCG se usa rutinariamente en los países subdesarrollados con TB endémica aplicándola una sola vez por vía subcutánea en el periodo neonatal y es de hecho la vacuna más aplicada en la historia de la humanidad (5). Las complicaciones de la BCG son raras (6), es relativamente barata y aparentemente eficiente para controlar formas graves de TB en la niñez como la miliar o cerebral, pero su eficiencia es limitada para prevenir la forma pulmonar en adultos en regiones en donde la TB es endémica (7), principalmente porque su eficiencia protectora es muy irregular, del 0 al 80% de acuerdo a diversos estudios (7, 8).

Los avances recientes en la inmunología y la genética molecular de Mtb, así como el desarrollo tecnológico de la biología molecular han contribuido a la generación de nuevos candidatos vacunales. Actualmente existen dos estrategias para la producción de vacunas, la primera es con bacterias vivas atenuadas como lo son las producidas por la eliminación de genes relacionados con virulencia (micobacterias atenuadas auxotróficas) (10), o subcepas BCG que han sido genéticamente manipuladas para que sobreexpresen antígenos inmunodominantes (BCG recombinantes) (9); la segunda estrategia es el uso de componentes moleculares no vivos, como las vacunas de DNA y antígenos puros inmunodominantes (vacunas de subunidad).

## **Antecedentes directos**

### **Micobacterias mutantes atenuadas**

El conocimiento de la secuencia completa del genoma de Mtb (11) y las técnicas moleculares que permiten la manipulación de su material genético, han contribuido al descubrimiento de genes asociados con la virulencia (12, 13). Uno de las estrategias más utilizadas para estudiar la virulencia ha sido la producción de bacterias mutantes a las cuales se les han eliminado uno o más genes e infectar con estas animales de experimentación, determinando la sobrevivencia, crecimiento de las bacterias mutantes y daño tisular (10). Con este tipo de estudios se han reportado varias bacterias mutantes con diferentes grados de atenuación e inmunogenicidad, y algunas se han probado como vacunas. La ventaja de estas bacterias es que generalmente expresan los más de 100 genes que perdió la BCG durante su proceso de atenuación (14). Nuestro grupo ha probado varias bacterias mutantes como vacunas en un modelo murino de TB, algunas de las cuales producen protección similar (15) o incluso mejor que la BCG (16).

Mtb es un patógeno capaz de adaptarse y sobrevivir ante las agresiones del sistema inmune. Dicha adaptación se debe a una red compleja de regulación genética transcripcional, que inducen la expresión selectiva de un grupo de genes esenciales para su sobrevivencia (17). Los factores sigma son importantes en este proceso, debido a su capacidad para unirse a la RNA polimerasa aportándole especificidad para promotores específicos, con lo cual regulan la expresión de genes cuyos productos re-direccionan la actividad metabólica permitiendo que la bacteria se adapte al stress de su medio ambiente (18). El factor sigma E es el mejor estudiado y al eliminarlo por mutación dirigida se produce notable atenuación, los ratones infectados con estas bacterias tuvieron largas sobrevivencias y elevada expresión de los factores protectores interferon gamma (IFN), factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (20). En comparación con la vacunación con BCG, los ratones vacunados con bacterias mutantes sigE y después retados con bacterias de virulencia intermedia o alta, tuvieron sobrevivencia mayor y la carga bacilar pulmonar y daño tisular fueron significativamente menores (20). Por estos resultados el grupo Europeo de vacunas integro a esta mutante en su lista de vacunas nuevas de alto potencial. Recientemente este grupo decidió que es necesaria una segunda mutación para inducir mayor atenuación y tener una bacteria más segura, aunque esta segunda mutación podría afectar la inmunogenicidad.

La mutante sigE fue producida por el grupo del Prof Manganeli de la Universidad de Padua Italia y nuestro grupo probó su eficiencia vacunal en el modelo en ratón (20). Dicho grupo ha producido la doble mutante, eliminando al gen fadD26 en la misma mutante sigE y recientemente nos la han enviado para estudiarla en el modelo murino. La mutante fadD26 fue producida por el grupo de la Prof Gicquel del Instituto Pasteur y también nuestro grupo la estudio en el modelo murino (21). La mutante fadD26 tiene eliminado el gen que codifica la enzima clave de la producción del tiocerosato, un componente estructural y funcional importante de la pared bacteriana (22, 23). La mutante

fadD26 es atenuada y al ser probada como vacuna también mostro una mejor actividad protectora que BCG (21)

### **BCG recombinantes**

La BCG fue obtenida a partir de un aislado clínico de *M. bovis* en un caso de mastitis en vaca, este aislado se atenuó después de 230 pases en medio de cultivo especial después de 13 años (1908-1921). Posteriormente esta BCG se distribuyo a diferentes países en donde se creció y subcultivo muchas veces, generando en consecuencia varias subcepas las cuales son genética y antigénicamente distintas entre ellas y con la original (14). Al probar 10 de estas subcepas en el modelo murino se pudo observar que todas protegen pero en diverso grado, siendo la subcepa Phipps la más eficiente (24). En nuestro sistema experimental siempre usamos la subcepa Phipps como control e idealmente se debería usar esta para la producción de BCG recombinantes.

Existen tres variantes de BCG recombinante, la primera se basa en la restauración de los genes que la BCG perdió durante su proceso de atenuación; la segunda es la transfección de genes eucariontes que codifican para citocinas protectoras y la tercera es la transfección de antígenos muy inmunogenicos que expresa poco o no expresa la BCG (9). Uno de los antígenos que *Mtb* expresa en la superficie de la pared celular y que es esencial para la invasión y diseminación de la bacteria es la hemaglutinina asociada a heparina (heah), este antígeno es muy inmunogenico y puede ser un buen candidato para clonar su gen y transfectarlo a BCG, produciendo así una BCG recombinante.

Una de nuestras principales líneas de investigación es la caracterización de la respuesta inmunológica que confiere protección y progresión de la TB usando modelos experimentales en ratón (25). Desde hace algunos años hemos estado estudiando la influencia de la diversidad genética de *Mtb* en la virulencia y respuesta inmunológica, principalmente usando aislados clínicos obtenidos de estudios epidemiológicos amplios (26). En un estudio epidemiológico realizado en Colombia se obtuvieron aislados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con TB meníngea, una de las formas más graves de la enfermedad. En este estudio se observó que algunas de estas cepas tenían un patrón genotípico diferente a las aisladas del pulmón y cuando tres de estas se usaron para infectar por vía intratraqueal ratones BALB/c, las tres se diseminaron rápidamente por vía hematogena e infectaron al cerebro (27, 28). Nuestros resultados experimentales recientes han mostrado que el gen que más expresa la bacteria durante la infección al tejido nervioso es la heah. Consideramos que esta es una observación importante pues una de las principales propiedades que tiene BCG para justificar su uso actual es que esta previene las formas graves de TB, en particular la forma diseminada y meníngea, sin embargo hay aéreas del mundo en donde se usa la BCG y los casos de TB meníngea son relativamente frecuentes, como sucede en Vietnam y Malasia (29). Es entonces interesante la posibilidad de producir BCG recombinante que sobreexpresa la heah, la cual teóricamente sería una vacuna mejorada más eficiente para prevenir la TB meníngea que la BCG convencional. En colaboración con el Dr M A Flores del CIATEJ en Guadalajara Jal, se han obtenido dos recombinantes BCG que sobre-expresan heah y podemos determinar el grado de protección conferida por esta BCG en ratones vacunados y retados con una cepa *Mtb* aparentemente neurotrópica que es además hipervirulenta (cepa LAM 209).

### **Vacunas de subunidad**

Estas corresponden a antígenos inmunodominantes de *Mtb*, como lo son ESAT-6 y Ag85b que confieren cierto grado de protección en ratón (30) y cuando son fusionados y

acompañados con adyuvantes producen un nivel de protección similar a la BCG y con un buen nivel de memoria (31).

Con el objetivo de inducir memoria a más largo plazo y un mayor nivel de protección se han usado también las vacunas de subunidad como refuerzo post-vacunal a la administración de BCG, este tipo de estrategia ha dado buenos resultados como lo fue con el Ag85A (33). Es importante considerar que en estudios en los que se ha revacunado con BCG se induce menos o no hay cambio en comparación con la protección producida por una sola administración (34), además en países con TB endémica como el nuestro la mayoría de los sujetos ya están vacunados o tienen infección latente, en consecuencia una buena alternativa es reforzar la vacunación hecha con BCG administrando refuerzos con vacunas de subunidad. En el presente proyecto se usaran péptidos purificados de productos dializables solubles de linfocitos como vacunas de subunidad y refuerzos en animales previamente vacunados con la subcepa de BCG-Phipps.

Los productos solubles derivados de dializados de linfocitos, también conocidos como factor de transferencia, son moléculas de bajo peso obtenidos de linfocitos de sangre periférica que son capaces de transferir la capacidad de expresar respuestas de hipersensibilidad retardada e inmunidad mediada por células de sujetos sensibilizados a personas no inmunizadas (35). Hasta el momento actual no se ha caracterizado la naturaleza bioquímica y el mecanismo molecular de su actividad, pero se han utilizado ampliamente en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, neoplásicas e inmunodeficiencias (36). En colaboración con el Dr B Anton del Instituto Nacional de Psiquiatría y los Dres S Estrada Parra y I Estrada García del IPN, se ha realizado un extenso estudio de purificación y caracterización molecular de estos productos dializables de leucocitos. Más de 500 péptidos se han identificado y 50 de ellos se han probado en su capacidad terapéutica en nuestro modelo de TB progresiva. Diez péptidos tuvieron actividad terapéutica significativa y recientemente los hemos usado en un experimento preliminar como vacunas de subunidad en ratones previamente vacunados con BCG. En estos experimentos, ratones BALB/c se vacunaron por vía subcutánea con BCG y después de dos meses se administró por vía peritoneal y por separado 5 péptidos diferentes en dos refuerzos con cada uno y dos meses después se retaron los animales con una dosis alta (250,000) de bacterias vivas y virulentas cepa H37Rv.. Los ratones vacunados con BCG y después reforzados con los péptidos 1, 4, 35 y 36 mostraron en comparación con los vacunados solamente con BCG, una disminución significativa de la carga bacilar, del 50 y 400% menos a los dos y cuatro meses después del reto respectivamente. Estos son resultados alentadores que motivan a continuar realizando experimentos con esta estrategia.

#### **Hipotesis:**

La micobacteria doble mutante sigE/fadD26, la BCG transfectante que sobre-expresa el antígeno hemaglutinina asociado a heparina y los péptidos 1, 4, 35 y 36 del dializado de linfocitos, inducirán un nivel mayor de protección que la conferida por BCG en ratones BALB/c retados con la cepa de referencia H37Rv y con aislados clínicos hipervirulentos.

#### **Objetivos:**

**General:** Obtener una bacteria mutante atenuada, una BCG recombinante y un esquema de vacunación usando péptidos solubles dializables de linfocitos como vacunas de subunidad

para reforzar la vacuna BCG, que sean igual o más protectoras que la vacuna BCG convencional en ensayos preclínicos in-vivo

Específicos:

- 1.- Determinar el nivel de virulencia e inmunogenicidad de la bacteria doble mutante sigE/fadD26.
- 2.- Estudiar el nivel de protección conferido por la doble mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c retados con bacterias de virulencia intermedia y alta
- 3.- Determinar la capacidad de crecimiento, diseminación e inmunogenicidad de la BCG transfectada con el gen que codifica la hemaglutinina asociada a heparina
- 4.- Establecer el nivel de protección conferido por la BCG recombinante del antígeno hemaglutinina asociado a heparina en ratones BALB/c retados con la cepa de referencia H37Rv y el aislado clínico hipervirulento y con aparente neurotropismo 209.
- 5.- Evaluar el nivel de protección conferido por los péptidos 1, 4, 35 y 36 administrados solos o en sistemas adyuvantes en ratones BALB/c vacunados con BCG

### **Estrategia Experimental**

#### **Estudio de virulencia:**

Ratones machos singénicos BALB/c de 8 semanas se anestesian con isoflurano y por vía intratraqueal se administrarán 250,000 bacterias suspendidas en 100µl de PBS, los animales infectados se almacenan en un sistema de microaisladores con flujo constante y filtración de aire. El proceso de infección y sacrificio se realiza en campanas de bioseguridad 3. Grupos de 50 ratones se infectarán con la cepa doble mutante sigE/fadD26, otro grupo con el mismo número de animales se infectará con la cepa parental no mutada y un tercer grupo de ratones se infectará con la cepa mutante a la que se le restituyeron los genes eliminados (cepa complementada). Grupos de 6 ratones se sacrificarán por exsanguinación los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 después de la infección, 4 pulmones derechos o izquierdos se destinarán para determinar carga bacilar por unidades formadoras de colonia (UFC), otros 4 pulmones se perfundirán con formaldehído al 10% amortiguado en PBS y en estos se medirá por morfometría automatizada el porcentaje de pulmón afectado por neumonía y tamaño de granulomas; 4 pulmones más se usarán para purificar RNA total y por RT-PCR en tiempo real se determinará la expresión de los genes que codifican TNF, IFN e iNOS. Diez animales más se infectarán y se dejarán para recabar la sobrevivencia y con esta información construir gráficas de sobrevivencia.

En este tipo de vacunas es fundamental realizar experimentos con ratones inmunodeficientes, para este experimento se vacunarán por vía subcutánea en la base de la cola 8000 bacterias vivas mutantes sigE/fadD26 y se fechará la muerte espontánea de los ratones durante 4 meses, como control se usará otro grupo de 10 animales que se inocularán con la cepa parental no mutada (H37Rv) y un grupo más vacunado con BCG Phipps.

#### **Estudio de inmunogenicidad**

Grupos de 40 ratones se vacunarán por vía subcutánea con 8000, 5000 y 2500 bacterias vivas cepa doble mutante sigE/fadD26, otro grupo de animales recibirán las mismas dosis

de BCG transfectada con el gen de la heah y el grupo control que se vacunara con 8000 bacterias cepa BCG Phipps. Después de 1, 2, 4 y 8 semanas, grupos de 10 ratones se sacrificaran por exsanguinación y los ganglios linfáticos cercanos al sitio de vacunación (inguinales), el bazo y los pulmones se disecarán y dividirán en dos, la mitad se congelara de inmediato para después hacer homogenizados y determinar las UFC y la otra mitad se prepararan para hacer suspensiones celulares, las cuales serán estimuladas con los antígenos totales de Mtb obtenidos por sonicación y los antígenos inmunodominantes recombinantes ESAT-6, Ag85b y heah. Después de 48 hr se colectaran los sobrenadantes y en ellos se cuantificara IFN por ELISA, siguiendo los procedimientos publicados por nuestro grupo (20). Con estos experimentos se escogerá la dosis de vacuna que induce la máxima producción de IFN para usar esta en los experimentos de reto. La cuantificación de bacterias por UFC en los diferentes órganos y tiempos nos permitirá determinar la capacidad de proliferación y diseminación de la BCG recombinante y la doble mutante, siempre haciendo la comparación con los grupos vacunados con BCG Phipps, que como se menciono es la mejor confiriendo protección en este modelo experimental (24).

#### **Estudio de reto para determinar la capacidad de protección**

Grupos de 12 animales se vacunaran por vía subcutánea con la dosis de bacterias mutantes y BCG recombinante que haya producido el mayor nivel de IFN. El grupo control recibirá el vehículo solamente (solución salina), otro grupo control de máxima protección se vacunara con BCG Phipps (24). En relación con el experimento con vacunas monoméricas, se vacunaran ratones con BCG Phipps y dos meses después se les administrara por vía subcutánea 1µg de cada uno de los péptidos, solos o acoplados a hemocianina. La hemocianina es una proteína de la hemolinfa de crustáceos que tiene una potente actividad adyuvante. El Dr B Anton del Instituto Nacional de Psiquiatría ha usado con muy buenos resultados la hemocianina para producir vacunas anti-adicción; anticuerpos anti cocaína o nicotina, ambas son moléculas hapténicas que unidas a la hemocianina son capaces de inducir la producción de altos títulos de anticuerpos y de células T activadas cooperadoras y citotóxicas. Por estos antecedentes se considera que la hemocianina es un sistema adyuvante idóneo para tratar de mejorar aun más la capacidad protectora de estos péptidos. El grupo del Dr Anton se ha encargado de producir estos péptidos y acoplarlos a hemocianina, los 4 péptidos ya están en este sistema y listos para usarlos en el modelo murino.

Después de dos meses del último refuerzo, los animales se anestesian e infectan por vía intratraqueal con 250,000 bacterias vivas cepa H37Rv de virulencia intermedia, cepa LAM hipervirulenta y cepa 209 hipervirulenta y con aparente neurotropismo. Grupos de 6 animales se sacrificaran a los 2 y 4 meses posteriores al reto, 6 pulmones derechos se usaran para determinar la cantidad de bacterias vivas por cuantificación de unidades formadoras de colonia y en 6 pulmones izquierdos se perfundiran con formaldehído al 10% en PBS para medir el daño tisular por la cuantificación del porcentaje de área pulmonar afectado por neumonía (20). Otro grupo de 10 animales se dejaran intactos y en ellos se determinara la mortalidad para después construir curvas de sobrevivida.

Durante más de 20 años el grupo de investigación de la Sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de la Nutrición se ha dedicado a estudiar la inmunopatología experimental de la tuberculosis, mas de 100 publicaciones en revistas internacionales se han producido y una red extensa de colaboraciones internacionales y nacionales se ha establecido. Se cuenta con la infraestructura para realizar este tipo de estudios con bacterias

altamente patógenas que es única en México y Latinoamérica, se tiene por lo tanto la experiencia y la infraestructura necesaria para poder realizar este proyecto con éxito

### Referencias.

1. Rook GAW, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol* 1996, 50: 259-284.
2. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998; 6:107-12.
3. World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB endemics. Geneva. WHO. 1994
4. Goldman RC, Plumley KV, Laughon BE. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. *Infect Disord Drug Targets*. 2007 Jun;7(2):73-91.
5. Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience; implications for future vaccines against tuberculosis. En Bloom BE, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*: Washington (DC). American Society for Microbiology; 1994, p 531-57.
6. Wadell RD, Lishimpi K, von Reyn CF. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis*. Bacille Calmette-Guerin (BCG) among HIV-positive children and adults in Zambia. *AIDS* 2001; 15: 55-60.
7. Fine, P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1991; 346: 1339-1345
8. Andersen P, Doherty TM: The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3:656-662
9. Hernández Pando R, Castañón M, Espitia C, Lopez Vidal Y. Recombinant BCG vaccines. *Current Molecular Medicine* 2007; 7: 365-372.
10. Hernández Pando R; Aguilar LD, Infante E, Cataldi A, Bigi F, Martin C, Gicquel B. The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 203-210.
11. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garmier T, Chinchic C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
12. Camacho LR, Emsergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999;34:257-67.



13. Cox JS, Chen B, Mc Neil M, Jacobs WR. Complex lipid determines tissue specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999;402:79–83.
14. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Small P. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520–3.
15. Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, Soto CY, Clark S, Hatch GJ, Aguilar D, Ausina V, Gicquel B. 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: 3408-3419.
16. Aguilar LD, Infante E, Bianco MV, Cataldi A, Bigi F, Hernandez Pando R. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis mce-2* and *mce-3* mutants in a Balb/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine* 2006; 24: 2333-2342.
17. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:463–496.
18. Browning, D. F., and S. J. Busby. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:57–65.
19. Dona, V., S. Rodrigue, E. Dainese, G. Palu, L. Gaudreau, R. Manganelli, and R. Provvedi. 2008. Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 190:5963–5971.
20. Hernandez Pando R, Aguilar D, Smith I, Manganelli R. Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis sigE* mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection & Immunity* 2010, Jul;78(7):3168-76.
21. Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Hernández Pando R. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis fadD26* mutant. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 21-28.
22. Daffè M, Lanèlle MA. Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J Gen Microbiol* 1988; 134:2049–55.
23. Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Lanèlle MA, Triccas JA, Gicquel B. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability. *J Biol Chem* 2001; 276:19845–54.
24. Castillo-Rodal A, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva Mercado J, Sada D E, López-Vidal Y. BCG sub-strains confers different protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity* 2006; 74: 1718-1724.
25. Hernandez-Pando R, Orozco H, Aguilar D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009 Sep-Oct;57(5):355-67.
26. Hernández Pando R, Marquina B, Barrios J, Mata D. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Genetics and Evolution* 2012, 12: 725-731.
27. Hernandez Pando R, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Aguilar D, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Experimental model of extensive *M. tuberculosis* dissemination with brain infection induced by specific bacterial genotype. *Tuberculosis (Edinb)* 2010 Jul 90: 268-77
28. Hernandez Pando R. Modelling of cerebral tuberculosis: hoping for continuous research in solving the enigma of the bottom billion's disease. *Malaysian J Med Sci.* Jan-Mar 2011; 18(1): 12-15
29. Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn T, Ngoc NT, Tuong NT, Stepniewska K, Huyen M, Bang N, Loc T, Gagneux S, van Soolingen D, Kremer K, van den Sande M, Small P, et al. The

- influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008; 4: 1-9.
30. Olsen AW, Hansen PR, Owendale PJ, Andersen P. Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by a vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen.
  31. Weinreich Olsen A, van Pixteren LA, Meng Okkels L, Anderson P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun* 2001; 69: 2773-2778.
  32. Martin C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Respir J* 2005; 26: 162-167.
  33. Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Orme IJ. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69: 2714-2717
  34. Basarava RJ, Izzo A, Brandt L, Orme I. Decreased survival of guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis* after multiple BCG vaccinations. *Vaccine* 2006; 24: 280-286.
  35. Lawrence HS. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to Streptococcal M substances and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest* 1955; 34:219-30.
  36. Fudenberg HH, Pizza G. Transfer factor 1993. *New frontiers. Prog Drug Res* 1993; 42:309-400.
  37. Hernandez-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89:26-33.

**Metas:** Determinar la eficiencia vacunal de la bacteria doble mutante sigE/fadD26, esperando que esta sea más protectora que la BCG convencional

Determinar la eficiencia vacunal de la BCG recombinante que sobre-expresa el antígeno hemaglutinina asociado a heparina y que este sea más eficiente para evitar la diseminación y desarrollo de tuberculosis extrapulmonar particularmente en el cerebro

Confirmar que la administración de vacunas de subunidad basadas en péptidos solubles de dializados de linfocitos usadas para reforzar la vacunación con BCG sean más eficientes para producir protección que la vacuna BCG sola

**Justificación:**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica de gran importancia clínica y epidemiológica que afecta sobre todo a países en vías de desarrollo, en donde la vacuna BCG la única actualmente en uso es ineficiente en proteger el desarrollo de tuberculosis pulmonar en población adulta. Es por lo tanto necesario desarrollar nuevas vacunas o esquemas de vacunación que sean más eficientes que la vacuna BCG

**Descripción**

Problema práctico o científico que genero el proyecto.

Varios grupos de investigación en diversas partes del mundo han estado trabajando en producir nuevas y más eficientes vacunas para prevenir la tuberculosis, incluido el nuestro que en colaboración internacional con diferentes grupos se han estudiado el nivel de atenuación y protección conferida por bacterias mutantes atenuadas, en particular la mutante sigE y fadD26 han producido mayor protección que la BCG en un modelo murino

de tuberculosis. Contamos actualmente con la doble mutante sigE/fadD26 que teóricamente debe de ser más atenuada y quizás induzca más protección que las mutantes con eliminación única de los mismos genes. Otra estrategia utilizada para producir vacunas más eficientes es la tranfección de genes que codifican antígenos inmunodominantes a la vacuna BCG, con lo cual esta BCG recombinante producirá mas antígenos específicos que induzcan respuestas inmunológicas eficientes, un antígeno importante de virulencia por su capacidad de conferir invasión y diseminación es la hemaglutinina asociada a heparina, contamos con una BCG recombinante que sobreexpresa este antígeno y es necesario probarla en un modelo in-vivo para definir si esta es más capaz de evitar sobre todo la diseminación e infección sobre todo del tejido nervioso. Finalmente, el esquema de vacunación basado en administrar primero BCG y después reforzar con la administración de vacunas de subunidad es otra estrategia de gran potencialidad y resultados preliminares nuestros muestran que haciendo esto con péptidos dializables de linfocitos produce una respuesta protectora significativamente mejor que la BCG sola. La posibilidad de mejorar la respuesta protectora utilizando sistemas adyuvantes a estos péptidos es una atractiva posibilidad que debe de experimentarse.

#### **Diseño general:**

Para evaluar la atenuación, inmunogenicidad y nivel de protección se usara un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c ampliamente caracterizado. Para determinar la atenuación de la bacteria mutante, se infectaran ratones por via intraqueal con la cepa mutante, cepa parental no mutante y cepa complementada (mutante a la que se le transflectaron los genes eliminados para reconstituir su funcionalidad) y se determinara la sobrevida de los animales infectados, en diferentes tiempos se sacrificaran y se determinara la cantidad de bacterias vivas en los pulmones por conteo de unidades formadoras de colonia y la extensión del daño tisular por la cuantificación del porcentaje del pulmon afectado por neumonía usando morfometria automatizada. Grupos de ratones inmunodeficientes se vacunaran con estas bacterias y su sobrevida se determinara. Para evaluar la inmunogenicidad, los pulmones colectados en diferentes tiempos se usaran para purificar RNA total y por RT-PCR en tiempo real se cuantificara la expresión de los genes que codifican IFN y TNF. Para evaluar la inmunogenicidad in-vitro, ratones BALB/c son vacunados por via subcutánea y en diferentes tiempos se sacrificaran para obtener ganglios linfáticos, bazo y pulmon, de los cuales se hacen suspensiones celulares que se estimulan con antígenos totales e inmunodominantes de M. tuberculosis, en los sobrenadantes se medira IFN por ELISA, la dosis que haya producido mas IFN se usa para vacunar ratones y dos meses después se evaluara la protección al reto con M. tuberculosis de virulencia intermedia e hipervirulentas, determinando la sobrevida, carga bacilar pulmonar y daño tisular en ratones sacrificados 2 y 4 meses después del reto, comparándolos con controles no vacunados o vacunados con BCG

Criterios que se considerarán para establecer los puntos terminales humanitarios que determinaran que se sacrifique al animal por presentar dolor o sufrimiento durante el procedimiento experimental, le enlistamos los siguientes puntos:

- Dificultad para alimentarse o beber agua.
- Pérdida de peso mayor al 20%.
- Dificultad para respirar.
- Disminución de la actividad.
- Piloerección.
- Postura anormal o espalda arqueada.

## ANEXO TÉCNICO

<b># DE PROYECTO:</b>	PICSA12-173
<b>TÍTULO DEL PROYECTO:</b>	ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE LA EFICIENCIA DE VACUNAS PARA PREVENIR LA TUBERCULOSIS BASADAS EN BACTERIAS MUTANTES, BCG RECOMBINANTE Y MOLÉCULAS DERIVADAS DE EXTRACTOS SOLUBLES DIALIZABLES DE LINFOCITOS
<b>OBJETIVO GENERAL:</b>	Obtener una bacteria mutante atenuada, una BCG recombinante y un esquema de vacunación usando péptidos solubles dializables de linfocitos como vacunas de subunidad para reforzar la vacuna BCG, que sean igual o más protectoras que la vacuna BCG convencional en ensayos preclínicos in-vivo
<b>RESPONSABLE DEL PROYECTO:</b>	<b>GRADO:</b> Dr (a).
<b>INSTITUCIÓN, EMPRESA U ORGANIZACIÓN RESPONSABLE:</b>	<b>NOMBRE:</b> ROGELIO HERNANDEZ PANDO <b>RAZÓN SOCIAL:</b> INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN" <b>ACRÓNIMO:</b> INCMNSZ <b>RFC:</b> RAMH440325E61

## ENTREGABLES

### 1.- Educación

Sub Categoría	Semestre de entrega	Descripción
Seminario	4to. Semestre	Presentación de resultados en foros organizados por el ICyTDF tales como el Seminario Permanente de Investigación de Ciencia y Tecnología o en la Semana de la Ciencia y la Innovación como ya se tuvo el honor de participar en octubre de 2011.
Congreso internacional	3er. Semestre	Presentación de los resultados en un congreso internacional sobre vacunas
Maestría	4to. Semestre	El Médico Cirujano Hector

## 1.- Educación

### Sub Categoría

### Semestre de entrega

### Descripción

Mayoral egresado de la ENEP Iztacala UNAM ha sido recientemente aceptado como estudiante de Maestría en Ciencias Medicas en la Escuela Superior de Medicina del IPN, el desarrollara como proyecto de tesis el estudio con las vacunas subunidad. De acuerdo al programa terminara sus estudios y obtendrá el grado al finalizar el proyecto en el cuarto semestre, por lo que nos comprometemos a entregar la Tesis de Maestría "Efecto inmunoprolifativo de peptidos purificados del factor de transferencia en la tuberculosis pulmonar en un modelo murino de vacunación con BCG". El QFB Martin Becerril Sambrano egresado de la Universidad la Salle aprobó recientemente el exámen de ingreso a la Maestría en Ciencias Bioquimicas en la UNAM, el desarrollara como proyecto de tesis el estudio con la mutante sigE/fadD26. De acuerdo al programa terminara sus estudios y obtendrá el grado al finalizar el proyecto en el cuarto semestre. Por lo que nos comprometemos a entregar la Tesis de Maestría "Actividad inmunoprotectora de la bacteria doble mutante sigE/fadD26 en un modelo experimental de tuberculosis"

## 2.- Investigación científica

Sub Categoría	Semestre de entrega	Descripción
Artículo en revista indexada	4to. Semestre	Se publicaran 3 trabajos internacionales, uno por cada modalidad de vacuna en el cuarto semestre del proyecto.
Solicitud Nacional	4to. Semestre	Se solicitara una patente ante el IMPI para proteger la vacuna con la micobacteria recombinante BCG conjuntamente con el CIATEJ.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES Y TAREAS

ACTIVIDAD O TAREA	ENTREGABLE	SEMESTRE DE ENTREGA
Estudio de la virulencia de la bacteria mutante Durante el primer semestre se realizaran los experimentos de virulencia, consistentes en infectar por via intratraqueal la bacteria mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c, se determinara la sobrevida y estudios cinéticos de carga bacilar y daño tisular comparándola con la cepa parental y complementada. Ratones desnudos se vacunaran con las mismas cepas y su sobrevida se registrara para construir curvas de sobrevida. Se determinara la inmunogenicidad y la capacidad de proliferacion y diseminación de las dos BCG recombinantes en ratones vacunados a los que se les sacrificara en diferentes tiempos y los ganglios linfáticos, bazo y pulmon se obtendrán para determinar la cantidad de BCG por UFC y en suspensiones celulares la cantidad de IFN producido por la incubación con antígenos micobacterianos inmunodominantes. El mismo tipo de estudios se realizara en ratones vacunados con los 4 péptidos que se usaran como vacunas de subunidad en animales inicialmente vacunados con BCG, comparando a los péptidos solos con los incorporados con hemocianina como adyuvante.	Maestría	1er. Semestre
Durante el segundo semestre se repetirán los experimentos descritos para el primer semestre para confirmar reproducibilidad	Maestría	2do. Semestre
Los resultados obtenidos durante los tres primeros semestres se analizaran y organizaran para ser presentados en el International Congress of Vaccination	Congreso internacional	3er. Semestre

ACTIVIDAD O TAREA	ENTREGABLE	SEMESTRE DE ENTREGA
<p>Durante el tercer semestre se realizaran los estudios de protección, vacunando animales con la dosis de la bacteria mutante, BCG recombinante y péptidos de subunidad que hayan inducido la máxima cantidad de IFN y que con esto sugiera que es la dosis idónea. Dos meses después se retaran con bacterias de virulencia intermedia y alta y se sacrificaran a los 2 y 4 meses para evaluar en los pulmones la cantidad de bacterias vivas por UFC y la extensión del daño histológico, siempre comparando con animales no vacunados y vacunados con BCG. Los resultados preliminares se presentaran en un congreso internacional</p>	Maestría	3er. Semestre
<p>Durante los cuatro semestres que durará este trabajo, se organizaran los resultados obtenidos para poder presentarlos de manera actualizada en foros organizados por el ICyTDF.</p>	Seminario	4to. Semestre
<p>Si los resultados son satisfactorios; la patente en Europa que ya existe con la mutante sigE se pueden ampliar para esta doble mutante. La recombinante BCG también es patentable en conjunto con el CIATEJ.</p>	Solicitud Nacional	4to. Semestre
<p>Los resultados del nivel de atenuación e inmunogenicidad de la bacteria doble mutante sigE/fadD26, así como su capacidad para proteger comparada con BCG después de retar ratones con cepas de virulencia alta e intermedia se publicaran en un trabajo en una revista internacional. La capacidad de la BCG recombinante para proliferar y diseminarse; así como su inmunogenicidad y capacidad protectora para evitar sobre todo la diseminación e infección del cerebro producida por una cepa hipervirulenta y neurotrópica comparada con la BCG convencional serán los resultados para publicar un segundo artículo La inmunogenicidad y capacidad protectora de 4 péptidos diferentes obtenidos como productos dializables de leucocitos será determinada en animales previamente vacunados con BCG y retados con cepas de virulencia intermedia y alta, comparando con animales solo vacunados con BCG y con el mismo sistema pero con péptidos unidos a hemocianina como adyuvante serán los resultados que se informaran en una tercera publicación.</p>	Artículo en revista indexada	4to. Semestre
<p>Durante el cuarto semestre se repetirán los experimentos de reto/protección descritos en el semestre anterior para confirmar reproducibilidad, se escribirán los artículos correspondientes para enviarlos a publicación y las tesis de los estudiantes, así como el reporte final del proyecto</p>	Maestría	4to. Semestre

## FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO



**MONTO TOTAL SOLICITADO:**

**\$ 850,000.00**

**RUBRO**

**TOTAL**

**JUSTIFICACIÓN**

**CANTIDAD**

Gasto corriente

\$ 650,000.00

Animales de Experimentación. Para el estudio de virulencia se requerirá de grupos de ratones BALB/c machos de 8 semanas para ser infectados con cada grupo con la cepa mutante, cepa parental, cepa complementada y el control cepa H37Rv, cada cepa requiere de 50 ratones que se sacrifican en grupos de 6 en los días postinfección: 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días y se realizan dos experimentos independientes, se dejan 10 animales por cepa para realizar curvas de sobrevida. En total para este experimento se necesitarán 500 ratones. Se usarán además 160 ratones desnudos, 20 por grupo para cada cepa para evaluar sobrevida en dos experimentos independientes. Para los estudios de inmunogenicidad, de los experimentos anteriores se obtendrán los pulmones para determinar expresión de citocinas, para hacer la inmunogenicidad in-vitro se necesitarán 170 ratones, 10 animales se sacrifican los días 7, 15, 30 y 60 después de la vacunación para obtener

RUBRO

TOTAL

JUSTIFICACIÓN

CANTIDAD

suspensiones celulares y estimularlas con antígenos bacterianos, las bacterias por estudiar son la mutante, parental, complementada y el control con BCG, son dos experimentos independientes. Para el experimento con la BCG recombinante se realizara un experimento similar estudiando la BCG recombinante (tenemos 2 cepas), BCG transfectada con el plasmido vacío y BCG sin transfectar, son 170 ratones más. Para el experimento de inmunogenicidad en animales vacunados con BCG que reciben refuerzos con vacunas de subunidad, tenemos 4 vacunas y el grupo control vacunado solamente con BCG, el total de animales estimado es de 200 para dos experimentos independientes. Para el experimento de reto/protección, se usaran 40 ratones para sacrificar 10 a los 2 meses y otros 10 a los 4 meses después del reto con una bacteria de virulencia intermedia y otra muy virulenta, por cada vacuna en dos experimentos independientes son 80

RUBRO	TOTAL	JUSTIFICACIÓN	CANTIDAD
-------	-------	---------------	----------

ratones, el total es 1120 ratones. El gran total de animales requeridos será de 2000 ratones, estos experimentos requieren que en promedio los animales por experimento se mantengan hasta por 6 meses en el bioterio, tiempo en el que se requiere de alimento y cambio de cama. Total 350000.00 pesos.

Material de laboratorio. Para cultivo de bacterias (medios de cultivo, cajas de petri), estudios histológicos (fijadores, parafina, colorantes, laminillas etc), cultivo de células e inmunología (medio de cultivo, suero fetal bovino, kits de ELISA) y de biología molecular (RT-PCR para la expresión de citocinas). Total 300000.00 pesos

Gasto de inversión	\$ 200,000.00		
--------------------	---------------	--	--

Hace aproximadamente 15 años se obtuvo con un apoyo de CONACyT un equipo de análisis de imagen el cual ha sido muy útil para el tipo de trabajo de investigación que realizamos. Después de ese tiempo este equipo es obsoleto, usa discos de 3/4 para almacenar información y estos ya no existen en el comercio, además la cámara asociada al

RUBRO

TOTAL

JUSTIFICACIÓN

CANTIDAD

microscopio es muy antigua y de poca resolución. Se solicita la renovación de este equipo lo cual es mucho más económico que un equipo nuevo y la compañía Aspelab que nos lo vendió nos ofrece un descuento especial como lo muestra la cotización anexa. Total: 150000.00 pesos Los animales para ser infectados se requiere que se anestesien con sevofloran el cual es volátil y este se usa virtiéndolo en algodón en una caja de acrilico en donde se ingresa el raton, es un sistema eficiente pero se podria hacer este trabajo mucho mejor con un vaporizador termocompensado el cual es un aparato que calienta al anestesico para su optima vaporizacion y lo mezcla con oxigeno permitiendo un periodo mas prolongado, controlado y eficiente del anestesico, ademas permite un substancial ahorro del anestesico que es muy costoso Total 50000.00 pesos

**Total:** \$ 850,000.00

## COMPROBANTE DE REGISTRO

NO. DE PROYECTO:

PICSA12-173

RESPONSABLE DEL PROYECTO	
Nombre:	Rogelio Hernandez Pando
Teléfono:	0
E-mail:	0

EMPRESA O INSTITUCIÓN	
Tipo de empresa o institución:	Empresa Gubernamental
Nombre de la empresa:	INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN"
Teléfono	54870900

PROYECTO			
Fecha de envío del proyecto:	23-10-12	Hora de envío:	10:10
Tema:	Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos		
Entregables en:			

Número de participantes:	2
Partipantes:	DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN

## PROPUESTA

<b># DE PROYECTO:</b>	PICSA12-173
<b>TÍTULO DEL PROYECTO:</b>	
ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DE LA EFICIENCIA DE VACUNAS PARA PREVENIR LA TUBERCULOSIS BASADAS EN BACTERIAS MUTANTES, BCG RECOMBINANTE Y MOLÉCULAS DERIVADAS DE EXTRACTOS SOLUBLES DIALIZABLES DE LINFOCITOS	
<b>ACRÓNIMO:</b>	TB VAC
<b>RESPONSABLE DEL PROYECTO</b>	
<b>GRADO CIENTÍFICO:</b>	Dr (a).
<b>NOMBRE:</b>	ROGELIO HERNANDEZ PANDO
<b>TELÉFONO:</b>	54853491
<b>NIVEL SNI:</b>	III
<b>CORREO ELECTRÓNICO:</b>	Ø
<b>NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN O EMPRESA DE ADSCRIPCIÓN:</b>	INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN";
<b>TIPO DE INSTITUCIÓN O EMPRESA:</b>	EMPRESA GUBERNAMENTAL

## DATOS DEL/LA RESPONSABLE DEL PROYECTO

<b>GRADO CIENTÍFICO:</b>	Dr (a).	<b>NIVEL SNI:</b>	III
<b>NOMBRE COMPLETO:</b>	ROGELIO HERNANDEZ PANDO		
<b>DOMICILIO:</b>	PROLONGACIÓN MORELOS #11, Col.SAN MIGUEL TOPILEJO, Del.Tlalpan, C.P. 14500		
<b>TELÉFONO:</b>	Ø		
<b>CORREO ELECTRÓNICO:</b>	Ø		
<b>CURP:</b>	HEPR560304HDFRNG06		
<b>NÚMERO DE PUBLICACIONES EN REVISTAS DE IMPACTO EN EL TEMA:</b>	104		
<b>NÚMERO DE PUBLICACIONES EN OTRAS REVISTAS:</b>	94		
<b>NÚMERO DE TESIS DE DOCTORADO DIRIGIDAS:</b>	10		
<b>NÚMERO DE TESIS DE MAESTRÍA DIRIGIDAS:</b>	10		
<b>NÚMERO DE TESIS DE LICENCIATURA DIRIGIDAS:</b>	2		
<b>CURRICULUM VITAE RESUMIDO:</b>	PICSA12-173_CVR_RP.pdf		
<b>CURRICULUM VITAE EXTENSO:</b>	PICSA12-173_CVE_RP.pdf		
<b>IDENTIFICACIÓN OFICIAL:</b>	PICSA12-173_IFE_RP.pdf		

**Titulo: Ensayos pre-clínicos de la eficiencia de vacunas para prevenir la tuberculosis basadas en bacterias mutantes, BCG recombinante y moléculas derivadas de extractos solubles dializables de linfocitos.**

**Resumen**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica de gran importancia clínica y epidemiológica particularmente en países en vías de desarrollo. Aunque existe tratamiento eficiente, este consiste en la administración de 4-3 antibióticos por un largo periodo de tiempo, lo que provoca abandono y en consecuencia recaídas y emergencia de cepas drogo-resistentes, además la vacuna BCG que actualmente es la única en uso en la población humana es extraordinariamente irregular en el nivel de protección que confiere y es específicamente poco protectora en países en vías de desarrollo. Por estos motivos es importante la producción de nuevas vacunas o esquemas de vacunación para controlar a esta importante enfermedad infecciosa. Las estrategias actuales más frecuentemente utilizadas para la producción de nuevas vacunas anti-TB son: la generación de bacterias vivas atenuadas por eliminación de genes asociados a virulencia sin que afecte o incluso incremente su inmunogenicidad; BCG recombinantes producidas por la transfección de genes de la bacteria que codifican antígenos inmunodominantes y vacunas de subunidad, que se basan en la administración de antígenos monoméricos solos o asociados a adyuvantes.

En el presente proyecto se propone estudiar en un modelo ampliamente caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones singénicos, la atenuación, inmunogenicidad y capacidad protectora de una cepa doble mutante del gen que codifica el factor sigma E esencial en mecanismos de adaptación de la bacteria para sobrevivir stress extracelular y del gen *fadD26* que codifica para una enzima esencial en la síntesis de lípidos complejos de pared celular (dimicocerosatos). Es importante mencionar que las mutantes de cada gen por separado son muy atenuadas y confieren importante protección cuando se usan como vacunas. Se propone también estudiar a una BCG recombinante a la que se transfecto el gen que codifica para el antígeno hemaglutinina asociado a heparina, el cual contribuye a la invasividad de la bacteria y estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que bacterias que sobreexpresan este gen se diseminan rápidamente por vía hematogena e infectan al cerebro, por lo que esta BCG recombinante pudiera ser una forma mejorada de vacuna que podría ser más eficiente que la BCG convencional para evitar formas graves de TB como la cerebral o meníngea. Finalmente, proponemos también estudiar vacunas monoméricas usando proteínas purificadas de dializados solubles de linfocitos que han mostrado en nuestro modelo experimental buena actividad terapéutica y en experimentos preliminares usándolos como refuerzo en ratones vacunados con BCG han reducido hasta cuatro veces la cantidad de bacterias cuando se compara con ratones solamente vacunados con BCG. Nuestro grupo de investigación tiene más de 20 años de experiencia trabajando en la inmunopatología de la tuberculosis experimental y el diseño y prueba de regímenes inmunoterapéuticos y vacunas, se cuenta con la infraestructura, experiencia y capacidad para realizar este tipo de trabajo..



**Introduccion**

La tuberculosis (TB) es una importante enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones (1). El agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un microorganismo patógeno intracelular facultativo que puede producir tanto enfermedad progresiva como infección latente asintomática (1). Generalmente la infección inicial se lleva a cabo en los pulmones durante la niñez y en la mayoría de los casos es controlada por el sistema inmunológico (2). Anualmente esta enfermedad produce cerca de 2 millones de defunciones a nivel mundial, con 9 millones de nuevos casos y un tercio de la humanidad tiene infección latente, lo cual la convierte en la enfermedad infecto-contagiosa más relevante a nivel mundial (3).

A pesar de que actualmente la TB es curable, se necesita de 4 antibióticos administrados por 6 a 9 meses, lo que redundaría en una alta tasa de abandono. Esta situación ha promovido recaídas y el surgimiento de cepas resistentes a varios antibióticos, lo cual complica aún más el tratamiento al incrementar su costo y toxicidad (4). La emergencia de cepas resistentes, la pandemia VIH/SIDA y el deterioro de los sistemas de salud pública en los países subdesarrollados han contribuido a empeorar la situación, de hecho es en los países en vías de desarrollo en donde ocurren el 95% de los casos de TB activa y el 98% de todas las defunciones (3). El consenso mundial es que para que exista un eficiente control de la TB se requiere de diagnóstico y tratamiento oportuno, quimioprofilaxis y vacunación eficiente la cual debería ser el más importante elemento. Sin embargo la vacuna actual BCG (Bacilo de Calmette Guerin) está lejos de ser la vacuna ideal y es por eso muy importante producir mejores y más eficientes vacunas y/o esquemas de vacunación.

La BCG es una cepa *Mycobacterium bovis* viva y atenuada que ha sido utilizada desde el año 1921. La BCG se usa rutinariamente en los países subdesarrollados con TB endémica aplicándola una sola vez por vía subcutánea en el periodo neonatal y es de hecho la vacuna más aplicada en la historia de la humanidad (5). Las complicaciones de la BCG son raras (6), es relativamente barata y aparentemente eficiente para controlar formas graves de TB en la niñez como la miliar o cerebral, pero su eficiencia es limitada para prevenir la forma pulmonar en adultos en regiones en donde la TB es endémica (7), principalmente porque su eficiencia protectora es muy irregular, del 0 al 80% de acuerdo a diversos estudios (7, 8).

Los avances recientes en la inmunología y la genética molecular de Mtb, así como el desarrollo tecnológico de la biología molecular han contribuido a la generación de nuevos candidatos vacunales. Actualmente existen dos estrategias para la producción de vacunas, la primera es con bacterias vivas atenuadas como lo son las producidas por la eliminación de genes relacionados con virulencia (micobacterias atenuadas auxotróficas) (10), o subcepas BCG que han sido genéticamente manipuladas para que sobrexpresen antígenos inmunodominantes (BCG recombinantes) (9); la segunda estrategia es el uso de componentes moleculares no vivos, como las vacunas de DNA y antígenos puros inmunodominantes (vacunas de subunidad).

## **Antecedentes directos**

### **Micobacterias mutantes atenuadas**

El conocimiento de la secuencia completa del genoma de Mtb (11) y las técnicas moleculares que permiten la manipulación de su material genético, han contribuido al descubrimiento de genes asociados con la virulencia (12, 13). Uno de las estrategias más utilizadas para estudiar la virulencia ha sido la producción de bacterias mutantes a las cuales se les han eliminado uno o más genes e infectar con estas animales de experimentación, determinando la sobrevivencia, crecimiento de las bacterias mutantes y daño tisular (10). Con este tipo de estudios se han reportado varias bacterias mutantes con diferentes grados de atenuación e inmunogenicidad, y algunas se han probado como vacunas. La ventaja de estas bacterias es que generalmente expresan los más de 100 genes que perdió la BCG durante su proceso de atenuación (14). Nuestro grupo ha probado varias bacterias mutantes como vacunas en un modelo murino de TB, algunas de las cuales producen protección similar (15) o incluso mejor que la BCG (16).

Mtb es un patógeno capaz de adaptarse y sobrevivir ante las agresiones del sistema inmune. Dicha adaptación se debe a una red compleja de regulación genética transcripcional, que inducen la expresión selectiva de un grupo de genes esenciales para su sobrevivencia (17). Los factores sigma son importantes en este proceso, debido a su capacidad para unirse a la RNA polimerasa aportándole especificidad para promotores específicos, con lo cual regulan la expresión de genes cuyos productos re-direccionan la actividad metabólica permitiendo que la bacteria se adapte al stress de su medio ambiente (18). El factor sigma E es el mejor estudiado y al eliminarlo por mutación dirigida se produce notable atenuación, los ratones infectados con estas bacterias tuvieron largas sobrevivencias y elevada expresión de los factores protectores interferon gamma (IFN), factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (20). En comparación con la vacunación con BCG, los ratones vacunados con bacterias mutantes sigE y después retados con bacterias de virulencia intermedia o alta, tuvieron sobrevivencia mayor y la carga bacilar pulmonar y daño tisular fueron significativamente menores (20). Por éstos resultados el grupo Europeo de vacunas integro a esta mutante en su lista de vacunas nuevas de alto potencial. Recientemente este grupo decidió que es necesaria una segunda mutación para inducir mayor atenuación y tener una bacteria más segura, aunque esta segunda mutación podría afectar la inmunogenicidad.

La mutante sigE fue producida por el grupo del Prof Manganeli de la Universidad de Padua Italia y nuestro grupo probó su eficiencia vacunal en el modelo en ratón (20). Dicho grupo ha producido la doble mutante, eliminando al gen fadD26 en la misma mutante sigE y recientemente nos la han enviado para estudiarla en el modelo murino. La mutante fadD26 fue producida por el grupo de la Prof Gicquel del Instituto Pasteur y también nuestro grupo la estudio en el modelo murino (21). La mutante fadD26 tiene eliminado el gen que codifica la enzima clave de la producción del tiocerol dimicocerosato, un componente estructural y funcional importante de la pared bacteriana (22, 23). La mutante fadD26 es atenuada y al ser probada como vacuna también mostro una mejor actividad protectora que BCG (21)

### **BCG recombinantes**

La BCG fue obtenida a partir de un aislado clínico de *M. bovis* en un caso de mastitis en vaca, este aislado se atenuó después de 230 pases en medio de cultivo especial después de 13 años (1908-1921). Posteriormente esta BCG se distribuyo a diferentes países en donde se creció y subcultivo muchas veces, generando en consecuencia varias subcepas las cuales son genética y antigénicamente distintas entre ellas y con la original (14). Al probar 10 de estas subcepas en el modelo murino se pudo observar que todas

protegen pero en diverso grado, siendo la subcepa Phipps la más eficiente (24). En nuestro sistema experimental siempre usamos la subcepa Phipps como control e idealmente se debería usar esta para la producción de BCG recombinantes.

Existen tres variantes de BCG recombinante, la primera se basa en la restauración de los genes que la BCG perdió durante su proceso de atenuación; la segunda es la transfección de genes eucariontes que codifican para citocinas protectoras y la tercera es la transfección de antígenos muy inmunogénicos que expresa poco o no expresa la BCG (9). Uno de los antígenos que Mtb expresa en la superficie de la pared celular y que es esencial para la invasión y diseminación de la bacteria es la hemaglutinina asociada a heparina (heah), este antígeno es muy inmunogénico y puede ser un buen candidato para clonar su gen y transfectarlo a BCG, produciendo así una BCG recombinante.

Una de nuestras principales líneas de investigación es la caracterización de la respuesta inmunológica que confiere protección y progresión de la TB usando modelos experimentales en ratón (25). Desde hace algunos años hemos estado estudiando la influencia de la diversidad genética de Mtb en la virulencia y respuesta inmunológica, principalmente usando aislados clínicos obtenidos de estudios epidemiológicos amplios (26). En un estudio epidemiológico realizado en Colombia se obtuvieron aislados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con TB meníngea, una de las formas más graves de la enfermedad. En este estudio se observó que algunas de estas cepas tenían un patrón genotípico diferente a las aisladas del pulmón y cuando tres de estas se usaron para infectar por vía intratraqueal ratones BALB/c, las tres se diseminaron rápidamente por vía hematogena e infectaron al cerebro (27, 28). Nuestros resultados experimentales recientes han mostrado que el gen que más expresa la bacteria durante la infección al tejido nervioso es la heah. Consideramos que esta es una observación importante pues una de las principales propiedades que tiene BCG para justificar su uso actual es que esta previene las formas graves de TB, en particular la forma diseminada y meníngea, sin embargo hay aéreas del mundo en donde se usa la BCG y los casos de TB meníngea son relativamente frecuentes, como sucede en Vietnam y Malasia (29). Es entonces interesante la posibilidad de producir BCG recombinante que sobreexpresa la heah, la cual teóricamente sería una vacuna mejorada más eficiente para prevenir la TB meníngea que la BCG convencional. En colaboración con el Dr M A Flores del CIATEJ en Guadalajara Jal, se han obtenido dos recombinantes BCG que sobre-expresan heah y podemos determinar el grado de protección conferida por esta BCG en ratones vacunados y retados con una cepa Mtb aparentemente neurotrópica que es además hipervirulenta (cepa LAM 209).

### **Vacunas de subunidad**

Estas corresponden a antígenos inmunodominantes de Mtb, como lo son ESAT-6 y Ag85b que confieren cierto grado de protección en ratón (30) y cuando son fusionados y acompañados con adyuvantes producen un nivel de protección similar a la BCG y con un buen nivel de memoria (31).

Con el objetivo de inducir memoria a más largo plazo y un mayor nivel de protección se han usado también las vacunas de subunidad como refuerzo post-vacunal a la administración de BCG, este tipo de estrategia ha dado buenos resultados como lo fue con el Ag85A (33). Es importante considerar que en estudios en los que se ha revacunado con BCG se induce menos o no hay cambio en comparación con la protección producida por una sola administración (34), además en países con TB endémica como el nuestro la mayoría de los sujetos ya están vacunados o tienen infección latente, en consecuencia una buena alternativa es reforzar la vacunación hecha con BCG administrando refuerzos con vacunas de subunidad. En el presente proyecto se

usaran péptidos purificados de productos dializables solubles de linfocitos como vacunas de subunidad y refuerzos en animales previamente vacunados con la subcepa de BCG Phipps.

Los productos solubles derivados de dializados de linfocitos, también conocidos como factor de transferencia, son moléculas de bajo peso obtenidos de linfocitos de sangre periférica que son capaces de transferir la capacidad de expresar respuestas de hipersensibilidad retardada e inmunidad mediada por células de sujetos sensibilizados a personas no inmunizadas (35). Hasta el momento actual no se ha caracterizado la naturaleza bioquímica y el mecanismo molecular de su actividad, pero se han utilizado ampliamente en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, neoplásicas e inmunodeficiencias (36). En colaboración con el Dr B Anton del Instituto Nacional de Psiquiatria y los Dres S Estrada Parra y I Estrada Garcia del IPN, se ha realizado un extenso estudio de purificación y caracterización molecular de estos productos dializables de leucocitos. Más de 500 péptidos se han identificado y 50 de ellos se han probado en su capacidad terapéutica en nuestro modelo de TB progresiva. Diez péptidos tuvieron actividad terapéutica significativa y recientemente los hemos usado en un experimento preliminar como vacunas de subunidad en ratones previamente vacunados con BCG. En estos experimentos, ratones BALB/c se vacunaron por vía subcutánea con BCG y después de dos meses se administro por vía peritoneal y por separado 5 péptidos diferentes en dos refuerzos con cada uno y dos meses después se retaron los animales con una dosis alta (250,000) de bacterias vivas y virulentas cepa H37Rv.. Los ratones vacunados con BCG y después reforzados con los péptidos 1, 4, 35 y 36 mostraron en comparación con los vacunados solamente con BCG, una disminución significativa de la carga bacilar, del 50 y 400% menos a los dos y cuatro meses después del reto respectivamente. Estos son resultados alentadores que motivan a continuar realizando experimentos con esta estrategia.

#### **Hipotesis:**

La micobacteria doble mutante sigE/fadD26, la BCG transfectante que sobre-expresa el antígeno hemaglutinina asociado a heparina y los péptidos 1, 4, 35 y 36 del dializado de linfocitos, inducirán un nivel mayor de protección que la conferida por BCG en ratones BALB/c retados con la cepa de referencia H37Rv y con aislados clínicos hipervirulentos.

#### **Objetivos:**

**General:** Obtener una bacteria mutante atenuada, una BCG recombinante y un esquema de vacunación usando péptidos solubles dializables de linfocitos como vacunas de subunidad para reforzar la vacuna BCG, que sean igual o más protectoras que la vacuna BCG convencional en ensayos preclínicos in-vivo

#### **Específicos:**

- 1.- Determinar el nivel de virulencia e inmunogenicidad de la bacteria doble mutante sigE/fadD26.
- 2.- Estudiar el nivel de protección conferido por la doble mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c retados con bacterias de virulencia intermedia y alta

11/01/2014

3.- Determinar la capacidad de crecimiento, diseminación e inmunogenicidad de la BCG transfectada con el gen que codifica la hemaglutinina asociada a heparina

4.- Establecer el nivel de protección conferido por la BCG recombinante del antígeno hemaglutinina asociado a heparina en ratones BALB/c retados con la cepa de referencia H37Rv y el aislado clínico hipervirulento y con aparente neurotropismo 209.

5.- Evaluar el nivel de protección conferido por los péptidos 1, 4, 35 y 36 administrados solos o en sistemas adyuvantes en ratones BALB/c vacunados con BCG

### **Estrategia Experimental**

#### **Estudio de virulencia:**

Ratones machos singenicos BALB/c de 8 semanas se anestesian con isofluorano y por vía intratraqueal se administraran 250,000 bacterias suspendidas en 100µl de PBS, los animales infectados se almacenan en un sistema de microaisladores con flujo constante y filtración de aire. El proceso de infección y sacrificio se realiza en campanas de bioseguridad 3. Grupos de 50 ratones se infectaran con la cepa doble mutante sigE/fadD26, otro grupo con el mismo número de animales se infectara con la cepa parental no mutada y un tercer grupo de ratones se infectara con la cepa mutante a la que se le restituyeron los genes eliminados (cepa complementada). Grupos de 6 ratones se sacrificaran por exsanguinacion los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 después de la infección, 4 pulmones derechos o izquierdos se destinaran para determinar carga bacilar por unidades formadoras de colonia (UFC), otros 4 pulmones se perfundiran con formaldehído al 10% amortiguado en PBS y en estos se medirá por morfometria automatizada el porcentaje de pulmón afectado por neumonía y tamaño de granulomas; 4 pulmones mas se usaran para purificar RNA total y por RT-PCR en tiempo real se determinara la expresión de los genes que codifican TNF, IFN e iNOS. Diez animales más se infectaran y se dejaran para recabar la sobrevida y con esta información construir graficas de sobrevida.

En este tipo de vacunas es fundamental realizar experimentos con ratones inmunodeficientes, para este experimento se vacunaran por vía subcutánea en la base de la cola 8000 bacterias vivas mutantes sigE/fadD26 y se fechara la muerte espontanea de los ratones durante 4 meses, como control se usara otro grupo de 10 animales que se inocularan con la cepa parental no mutada (H37Rv) y un grupo más vacunado con BCG Phipps.

#### **Estudio de inmunogenicidad**

Grupos de 40 ratones se vacunaran por vía subcutánea con 8000, 5000 y 2500 bacterias vivas cepa doble mutante sigE/fadD26, otro grupo de animales recibirán las mismas dosis de BCG transfectada con el gen de la heah y el grupo control que se vacunara con 8000 bacterias cepa BCG Phipps. Después de 1, 2, 4 y 8 semanas, grupos de 10 ratones se sacrificaran por exsanguinacion y los ganglios linfáticos cercanos al sitio de vacunación (inguinales), el bazo y los pulmones se diseccionan y dividirán en dos, la mitad se congelara de inmediato para después hacer homogenizados y determinar las UFC y la otra mitad se prepararan para hacer suspensiones celulares, las cuales serán estimuladas con los antígenos totales de Mtb obtenidos por sonicación y los antígenos inmunodominantes recombinantes ESAT-6, Ag85b y heah. Después de 48 hr se colectaran los sobrenadantes y en ellos se cuantificara IFN por ELISA, siguiendo los procedimientos publicados por nuestro grupo (20). Con estos experimentos se escogerá la dosis de vacuna que induce la máxima producción de IFN para usar esta en los

experimentos de reto. La cuantificación de bacterias por UFC en los diferentes órganos y tiempos nos permitirá determinar la capacidad de proliferación y diseminación de la BCG recombinante y la doble mutante, siempre haciendo la comparación con los grupos vacunados con BCG Phipps, que como se menciona es la mejor confiriendo protección en este modelo experimental (24).

#### **Estudio de reto para determinar la capacidad de protección**

Grupos de 12 animales se vacunaran por vía subcutánea con la dosis de bacterias mutantes y BCG recombinante que haya producido el mayor nivel de IFN. El grupo control recibirá el vehículo solamente (solución salina), otro grupo control de máxima protección se vacunara con BCG Phipps (24). En relación con el experimento con vacunas monoméricas, se vacunaran ratones con BCG Phipps y dos meses después se les administrara por vía subcutánea 1µg de cada uno de los péptidos, solos o acoplados a hemocianina. La hemocianina es una proteína de la hemolinfa de crustáceos que tiene una potente actividad adyuvante. El Dr B Anton del Instituto Nacional de Psiquiatría ha usado con muy buenos resultados la hemocianina para producir vacunas anti-adicción; anticuerpos anti cocaína o nicotina, ambas son moléculas hapténicas que unidas a la hemocianina son capaces de inducir la producción de altos títulos de anticuerpos y de células T activadas cooperadoras y citotóxicas. Por estos antecedentes se considera que la hemocianina es un sistema adyuvante idóneo para tratar de mejorar aun más la capacidad protectora de estos péptidos. El grupo del Dr Anton se ha encargado de producir estos péptidos y acoplarlos a hemocianina, los 4 péptidos ya están en este sistema y listos para usarlos en el modelo murino.

Después de dos meses del último refuerzo, los animales se anestesian e infectan por vía intratraqueal con 250,000 bacterias vivas cepa H37Rv de virulencia intermedia, cepa LAM hipervirulenta y cepa 209 hipervirulenta y con aparente neurotropismo. Grupos de 6 animales se sacrificaran a los 2 y 4 meses posteriores al reto, 6 pulmones derechos se usaran para determinar la cantidad de bacterias vivas por cuantificación de unidades formadoras de colonia y en 6 pulmones izquierdos se perfundiran con formaldehído al 10% en PBS para medir el daño tisular por la cuantificación del porcentaje de área pulmonar afectado por neumonía (20). Otro grupo de 10 animales se dejaran intactos y en ellos se determinara la mortalidad para después construir curvas de supervivencia.

Durante más de 20 años el grupo de investigación de la Sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de la Nutrición se ha dedicado a estudiar la inmunopatología experimental de la tuberculosis, mas de 100 publicaciones en revistas internacionales se han producido y una red extensa de colaboraciones internacionales y nacionales se ha establecido. Se cuenta con la infraestructura para realizar este tipo de estudios con bacterias altamente patógenas que es única en México y Latinoamérica, se tiene por lo tanto la experiencia y la infraestructura necesaria para poder realizar este proyecto con éxito

"010/2014 f"

## **Descripcion**

Problema practico o científico que genero el proyecto.

Varios grupos de investigación en diversas partes del mundo han estado trabajando en producir nuevas y más eficientes vacunas para prevenir la tuberculosis, incluido el nuestro que en colaboración internacional con diferentes grupos se han estudiado el nivel de atenuación y protección conferida por bacterias mutantes atenuadas, en particular la mutante sigE y fadD26 han producido mayor protección que la BCG en un modelo murino de tuberculosis. Contamos actualmente con la doble mutante sigE/fadD26 que teóricamente debe de ser más atenuada y quizás induzca más protección que las mutantes con eliminación única de los mismos genes. Otra estrategia utilizada para producir vacunas más eficientes es la tranfeccion de genes que codifican antígenos inmunodominantes a la vacuna BCG, con lo cual esta BCG recombinante producirá mas antígenos específicos que induzcan respuestas inmunológicas eficientes, un antígeno importante de virulencia por su capacidad de conferir invasión y diseminación es la hemaglutinina asociada a heparina, contamos con una BCG recombinante que sobreexpresa este antígeno y es necesario probarla en un modelo in-vivo para definir si esta es más capaz de evitar sobre todo la diseminación e infección sobre todo del tejido nervioso. Finalmente, el esquema de vacunación basado en administrar primero BCG y después reforzar con la administración de vacunas de subunidad es otra estrategia de gran potencialidad y resultados preliminares nuestros muestran que haciendo esto con péptidos dializables de linfocitos produce una respuesta protectora significamente mejor que la BCG sola. La posibilidad de mejorar la respuesta protectora utilizando sistemas adyuvantes a estos péptidos es una atractiva posibilidad que debe de experimentarse.

## **Diseño general:**

Para evaluar la atenuación, inmunogenicidad y nivel de protección se usara un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c ampliamente caracterizado. Para determinar la atenuación de la bacteria mutante, se infectaran ratones por via intraqueal con la cepa mutante, cepa parental no mutante y cepa complementada (mutante a la que se le transfetaron los genes eliminados para reconstituir su funcionalidad) y se determinara la sobrevivida de los animales infectados, en diferentes tiempos se sacrificaran y se determinara la cantidad de bacterias vivas en los pulmones por conteo de unidades formadoras de colonia y la extensión del daño tisular por la cuantificación del porcentaje del pulmon afectado por neumonía usando morfometria automatizada. Grupos de ratones inmunodeficientes se vacunaran con estas bacterias y su sobrevivida se determinara. Para evaluar la inmunogenicidad, los pulmones colectados en diferentes tiempos se usaran para purificar RNA total y por RT-PCR en tiempo real se cuantificara la expresión de los genes que codifican IFN y TNF. Para evaluar la inmunogenicidad in-vitro, ratones BALB/c son vacunados por via subcutánea y en diferentes tiempos se sacrificaran para obtener ganglios linfáticos, bazo y pulmon, de los cuales se hacen suspensiones celulares que se estimulan con antígenos totales e inmunodominantes de M. tuberculosis, en los sobrenadantes se medira IFN por ELISA, la dosis que haya producido mas IFN se usa para vacunar ratones y dos meses después se evaluara la protección al retar con M. tuberculosis de virulencia intermedia e hipervirulentas, determinando la sobrevivida, carga bacilar pulmonar y daño tisular en

ratones sacrificados 2 y 4 meses después del reto, comparándolos con controles no vacunados o vacunados con BCG

Financiamiento:

Total: 1,000,000

**Gasto corriente:**

**Animales de Experimentación**

Para el estudio de virulencia se requerirá de grupos de ratones BALB/c machos de 8 semanas para ser infectados con cada grupo con la cepa mutante, cepa parental, cepa complementada y el control cepa H37Rv, cada cepa requiere de 50 ratones que se sacrifican en grupos de 6 en los días postinfección: 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días y se realizan dos experimentos independientes, se dejan 10 animales por cepa para realizar curvas de sobrevivencia. En total para este experimento se necesitarán 500 ratones. Se usarán además 160 ratones desnudos, 20 por grupo para cada cepa para evaluar sobrevivencia en dos experimentos independientes.

Para los estudios de inmunogenicidad, de los experimentos anteriores se obtendrán los pulmones para determinar expresión de citocinas, para hacer la inmunogenicidad in-vitro se necesitarán 170 ratones, 10 animales se sacrifican los días 7, 15, 30 y 60 después de la vacunación para obtener suspensiones celulares y estimularlas con antígenos bacterianos, las bacterias por estudiar son la mutante, parental, complementada y el control con BCG, son dos experimentos independientes. Para el experimento con la BCG recombinante se realizará un experimento similar estudiando la BCG recombinante (tenemos 2 cepas), BCG transfectada con el plásmido vacío y BCG sin transfectar, son 170 ratones más. Para el experimento de inmunogenicidad en animales vacunados con BCG que reciben refuerzos con vacunas de subunidad, tenemos 4 vacunas y el grupo control vacunado solamente con BCG, el total de animales estimado es de 200 para dos experimentos independientes.

Para el experimento de reto/protección, se usarán 40 ratones para sacrificar 10 a los 2 meses y otros 10 a los 4 meses después del reto con una bacteria de virulencia intermedia y otra muy virulenta, por cada vacuna en dos experimentos independientes son 80 ratones, el total es 1120 ratones.

El gran total de animales requeridos será de 2000 ratones, estos experimentos requieren que en promedio los animales por experimento se mantengan hasta por 6 meses en el bioterio, tiempo en el que se requiere de alimento y cambio de cama.

Total 500, 000 pesos

**Material de laboratorio**

Para cultivo de bacterias (medios de cultivo, cajas de petri), estudios histológicos (fijadores, parafina, colorantes, laminillas etc), cultivo de células e inmunología (medio de cultivo, suero fetal bovino, kits de ELISA) y de biología molecular (RT-PCR para la expresión de citocinas).

Total 300, 000 pesos

**Equipo de laboratorio**



Hace aproximadamente 15 años se obtuvo con un apoyo de CONACyT un equipo de análisis de imagen el cual ha sido muy útil para el tipo de trabajo de investigación que realizamos. Después de ese tiempo este equipo es obsoleto, usa discos de 3/4 para almacenar información y estos ya no existen en el comercio, además la cámara asociada al microscopio es muy antigua y de poca resolución. Se solicita la renovación de este equipo lo cual es mucho mas económico que un equipo nuevo y la compañía Aspelab que nos lo vendió, nos ofrece un descuento especial como lo muestra la cotización anexa.

Total: 150, 000 pesos

#### **Asistencia a congresos**

Se solicita para presentar los resultados en un congreso internacional especializado en vacunas

Total 50, 000 pesos

#### **Entregables:**

##### **Educacion**

**Subcategoría:** Grado de Mestria (estudiante Martin Becerril Sambrano)

**Semestre de entrega**

Cuarto semestre

**Descripción:**

El QFB Martin Becerril Sambrano egresado de la Universidad la Salle aprobó recientemente el exámen de ingreso a la Maestria en Ciencias Bioquimicas en la UNAM, el desarrollara como proyecto de tesis el estudio con la mutante sigE/fadD26. De acuerdo al programa terminara sus estudios y obtendrá el grado al finalizar el proyecto en el cuarto semestre

##### **Educacion**

**Subcategoría:** Grado de Mestria (estudiante Hector Mayoral)

**Semestre de entrega**

Cuarto semestre

**Descripción:**

El Médico Cirujano Hector Mayoral egresado de la ENEP Iztacala UNAM ha sido recientemente aceptado como estudiante de Maestria en Ciencias Medicas en la Escuela Superior de Medicina del IPN, el desarrollara como proyecto de tesis el estudio con las vacunas subunidad. De acuerdo al programa terminara sus estudios y obtendrá el grado al finalizar el proyecto en el cuarto semestre

##### **Ciencia**

Se publicaran 3 trabajos internacionales, uno por cada modalidad de vacuna en el cuarto semestre del proyecto. En el tercer semestre se presentaran los resultados en un congreso internacional sobre vacunas

##### **Cronograma de Actividades**

**Subtipo**

Estudio de la virulencia de la bacteria mutante

Durante el **primer semestre** se realizaran los experimentos de virulencia,

consistentes en infectar por vía intratraqueal la bacteria mutante sigE/fadD26 en ratones BALB/c, se determinará la sobrevivencia y estudios cinéticos de carga bacilar y daño tisular comparándola con la cepa parental y complementada. Ratones desnudos se vacunarán con las mismas cepas y su sobrevivencia se registrará para construir curvas de sobrevivencia.

Se determinará la inmunogenicidad y la capacidad de proliferación y diseminación de las dos BCG recombinantes en ratones vacunados a los que se les sacrificará en diferentes tiempos y los ganglios linfáticos, bazo y pulmón se obtendrán para determinar la cantidad de BCG por UFC y en suspensiones celulares la cantidad de IFN producido por la incubación con antígenos micobacterianos inmunodominantes. El mismo tipo de estudios se realizará en ratones vacunados con los 4 péptidos que se usarán como vacunas de subunidad en animales inicialmente vacunados con BCG, comparando a los péptidos solos con los incorporados con hemocianina como adyuvante.

Durante el **segundo semestre** se repetirán los experimentos descritos para el primer semestre para confirmar reproducibilidad

Durante el **tercer semestre** se realizarán los estudios de protección, vacunando animales con la dosis de la bacteria mutante, BCG recombinante y péptidos de subunidad que hayan inducido la máxima cantidad de IFN y que con esto sugiera que es la dosis idónea. Dos meses después se retarán con bacterias de virulencia intermedia y alta y se sacrificarán a los 2 y 4 meses para evaluar en los pulmones la cantidad de bacterias vivas por UFC y la extensión del daño histológico, siempre comparando con animales no vacunados y vacunados con BCG. Los resultados preliminares se presentarán en un congreso internacional

Durante el **cuarto semestre** se repetirán los experimentos de reto/protección descritos en el semestre anterior para confirmar reproducibilidad, se escribirán los artículos correspondientes para enviarlos a publicación y las tesis de los estudiantes, así como el reporte final del proyecto

**Referencias.**

- 1.-Rook GAW, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol* 1996, 50: 259-284.
- 2.- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998;6:107-12.
- 3.- World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB epidemics. Geneva. WHO. 1994
- 4.- Goldman RC, Plumley KV, Laughon BE. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. *Infect Disord Drug Targets*. 2007 Jun;7(2):73-91.
- 5.- Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience; implications for future vaccines against tuberculosis. En Bloom BE, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington (DC). American Society for Microbiology; 1994, p 531-57.
- 6.- Wadell RD, Lishimpi K, von Reyn CF. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis*. *Bacille Calmette-Guerin (BCG) among HIV-positive children and adults in Zambia*. *AIDS* 2001; 15: 55-60.
- 7.- Fine, P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1991; 346: 1339-1345
- 8.- Andersen P, Doherty TM: The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:656-662
- 9.- Hernández Pando R, Castañon M, Espitia C, Lopez Vidal Y. Recombinant BCG vaccines. *Current Molecular Medicine* 2007; 7: 365-372.
- 10.-Hernández Pando R, Aguilar LD, Infante E, Cataldi A, Bigi F, Martin C, Gicquel B. The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 203-210.
- 11.- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garmier T, Chinchur C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
- 12.- Camacho LR, Emsergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999;34:257-67.
- 13.- Cox JS, Chen B, Mc Neil M, Jacobs WR. Complex lipid determines tissue specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999;402:79-83.
- 14.- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Small P. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520-3.

15. - Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, Soto CY, Clark S, Hatch GJ, Aguilar D, Ausina V, Gicquel B. 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: 3408-3419.
- 16.- Aguilar LD, Infante E, Bianco MV, Cataldi A, Bigi F, Hernandez Pando R. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* mce-2 and mce-3 mutants in a Balb/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine* 2006; 24: 2333-2342.
- 17.- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:463-496.
- 18.- Browning, D. F., and S. J. Busby. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:57-65.
- 19.- Dona, V., S. Rodrigue, E. Dainese, G. Palu, L. Gaudreau, R. Manganelli, and R. Provvedi. 2008. Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 190:5963-5971.
- 20,. Hernandez Pando R, Aguilar D, Smith I, Manganelli R. Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection & Immunity* 2010, Jul;78(7):3168-76.
21. - Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Hernández Pando R. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* fadD26 mutant. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 21-28.
- 22.- Daffè M, Lanèlle MA. Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J Gen Microbiol* 1988; 134:2049-55.
- 23.- Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Lanèlle MA, Triccas JA, Gicquel B. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability. *J Biol Chem* 2001; 276:19845-54.
- 24.- Castillo-Rodal A, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva Mercado J, Sada D E, López-Vidal Y. BCG sub-strains confers different protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity* 2006; 74: 1718-1724.
- 25.- Hernandez-Pando R, Orozco H, Aguilar D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009 Sep-Oct;57(5):355-67.
- 26.- Hernández Pando R, Marquina B, Barrios J, Mata D. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Genetics and Evolution* 2012, 12: 725-731.
- 27.- Hernandez Pando R, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Aguilar D, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Experimental model of extensive M. tuberculosis dissemination with brain infection induced by specific bacterial genotype. *Tuberculosis (Edinb)* 2010 Jul 90: 268-77
- 28.- Hernandez Pando R. Modelling of cerebral tuberculosis: hoping for continuous research in solving the enigma of the bottom billion's disease. *Malaysian J Med Sci.* Jan-Mar 2011; 18(1):

12-15

29.- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn T, Ngoc NT, Tuong NT, Stepnelewska K, Huyen M, Bang N, Loc T, Gagneux S, van Soolingen D, Kremer K, van den Sande M, Small P, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008; 4: 1-9.

30.- Olsen AW, Hansen PR, Ovendale PJ, Andersen P. Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by a vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen.

31.- Weinreich Olsen A, van Pixteren LA, Meng Okkels L, Anderson P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun* 2001; 69: 2773-2778.

32.- Martin C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Respir J* 2005; 26: 162-167.

33.- Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Orme IJ. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69: 2714-2717

34.- Basarava RJ, Izzo A, Brandt L, Orme I. Decreased survival of guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis* after multiple BCG vaccinations. *Vaccine* 2006; 24: 280-286.

35.- Lawrence HS. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to Streptococcal M substances and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest* 1955; 34:219-30.

36.- Fudenberg HH, Pizza G. Transfer factor 1993. New frontiers. *Prog Drug Res* 1993; 42:309-400.

37.- Hernandez-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89:26-33.

**Metas:** Determinar la eficiencia vacunal de la bacteria doble mutante sigE/fadD26, esperando que esta sea más protectora que la BCG convencional

Determinar la eficiencia vacunal de la BCG recombinante que sobre-expresa el antígeno hemaglutinina asociado a heparina y que este sea más eficiente para evitar la diseminación y desarrollo de tuberculosis extrapulmonar particularmente en el cerebro

Confirmar que la administración de vacunas de subunidad basadas en péptidos solubles de dializados de linfocitos usadas para reforzar la vacunación con BCG sean más eficientes para producir protección que la vacuna BCG sola

**Justificación:**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica de gran importancia clínica y epidemiológica que afecta sobre todo a países en vías de desarrollo, en donde la vacuna BCG la única actualmente en uso es ineficiente en proteger el desarrollo de tuberculosis pulmonar en población adulta. Es por lo tanto necesario desarrollar nuevas vacunas o esquemas de vacunación que sean más eficientes que la vacuna BCG

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- D) SE TESTA NÚMERO TELEFÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**