

## Vacuna terapéutica antituberculosa: un “rutilante” futuro

Pere-Joan Cardona

Unitat de Tuberculosi Experimental. Servicio de Microbiología. Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. Barcelona. España.

Intentar relacionar el adjetivo “rutilante” con la tuberculosis es sin duda alguna un ejercicio provocador. No estamos atravesando precisamente un buen período en relación con la lucha contra esta enfermedad y seguimos con la nefasta estadística: un tercio de la población mundial (2.500 millones de personas) con infección tuberculosa latente (ITBL), que se halla en franco incremento (se generan anualmente 90 millones de casos nuevos) y provoca 9 millones de casos de tuberculosis activa y 2,5 millones de muertos al año<sup>1</sup>. La razón del adjetivo “rutilante” es combinar un juego de palabras y una nueva esperanza en el terreno del control de la ITBL. El pasado 23 de abril, Diada de Sant Jordi, en medio de un ambiente repleto de libros y rosas, la vacuna RUTI fue inoculada por primera vez en 6 voluntarios sanos. Se iniciaba la primera iniciativa mundial que combina quimioterapia con inmunoterapia para reducir el tratamiento estándar actual de la ITBL de 6-9 meses<sup>2</sup> a un mes, más la inoculación de 2 dosis de RUTI.

El desarrollo clínico de RUTI ha surgido tras llevar a cabo un esfuerzo integrador destinado a entender y ofrecer una visión más racional de los mecanismos implicados en la generación de la ITBL, con el fin de proporcionar una base para desarrollos futuros en este campo. Se trata de la elaboración de la “hipótesis dinámica”, en contraposición a la “hipótesis estática”, con la que clásicamente se ha intentado explicar el origen de la ITBL<sup>3</sup>.

En realidad, la hipótesis dinámica es la única que explica por qué el tratamiento durante 6-9 meses con isoniazida es capaz de evitar la generación de la tuberculosis a partir de la ITBL, de modo que descarta los fabulosos mecanismos fisiológicos que sostienen la hipótesis estática. Entre estos mecanismos cabe destacar el convencimiento de que tras la infección y diseminación inicial del bacilo se generan unos granulomas “blindados”, capaces de “contener” físicamente la diseminación del bacilo mediante la generación de un tejido

fibrótico que, a su vez, es capaz de inducir un ambiente anaeróbico<sup>4</sup>. La segunda asunción es que estos granulomas pueden permanecer inalterados en el tejido durante años<sup>5,6</sup>. La tercera premisa es que el bacilo latente ha de ser capaz de resistir este ambiente anaeróbico<sup>7</sup> y de reactivar su crecimiento al cabo de varios años, tras el contacto con un factor de resucitación<sup>6</sup>.

Por el contrario, la hipótesis dinámica contempla aspectos fisiológicos básicos del huésped, como los tiempos de vida media de las células o la regeneración de los tejidos lesionados, que hacen muy difícil la permanencia de un granuloma durante años<sup>3</sup>. En estos granulomas no se puede generar un ambiente anaeróbico, debido a que este proceso requiere un consumo continuo y constante de oxígeno (como en el caso de la flora bacteriana en los dientes<sup>8</sup> o en el intestino grueso<sup>9</sup>). Igualmente, nadie ha explicado “quién es el príncipe que besa al bacilo durmiente” para resucitarlo, es decir, cómo llega el factor resucitador a la fortaleza donde reside el bacilo latente, más aún teniendo en cuenta que este factor está producido por bacilos en crecimiento activo<sup>10</sup>. Por otra parte, la hipótesis dinámica considera que *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de generar la ITBL mediante la particular combinación de 3 propiedades “vulgares”: una velocidad de crecimiento muy lenta; la capacidad para producir necrosis tisular, y tener una pared celular gruesa e hidrófoba<sup>3</sup>.

De esta manera, cuando *M. tuberculosis* entra en el espacio alveolar, necesita ser fagocitado por el macrófago alveolar para evitar el ambiente hostil en que se encuentra, dominado por el surfactante y moléculas y enzimas que son capaces de destruir paulatinamente la gruesa pared celular del bacilo<sup>11</sup>. Una vez en el interior, un porcentaje bajo de estos bacilos pueden multiplicarse y con ello ser capaces de mantenerse en su huésped. Con el inicio del crecimiento exponencial (fase *log*), y su desarrollo activo, el bacilo evita la unión fagosomal y provoca la muerte del macrófago<sup>12</sup>. Esta destrucción perjudica al bacilo, ya que lo enfrenta de nuevo al medio extracelular, todavía más hostil debido a la liberación del contenido de estos macrófagos (junto con el de los neutrófilos), o sea, la presencia de radicales de oxígeno y nitrógeno, enzimas bactericidas y un pH ácido<sup>13</sup>. En este medio “estresante” el bacilo entra en una nueva fase estacionaria, hasta que es fagocitado de nuevo por otros macrófagos atraídos por el proceso infla-

Correspondencia: Dr. P.J. Cardona.  
Unitat de Tuberculosi Experimental. Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol.  
Ctra. del Canyet, s/n. 08916 Badalona. Barcelona. España.  
Correo electrónico: pjcardona.igtp.germanstrias@gencat.net.

Recibido: 11-5-2007; aceptado para su publicación: 25-5-2007.

matorio. Este ciclo se va reproduciendo, con lo que se generan, por un lado, bacilos en crecimiento exponencial y, por otro, una serie de bacilos en fase estacionaria, acumulados entre detritus celulares<sup>3</sup>. Estos restos celulares originarán cuerpos lipídicos en el interior de los macrófagos que los fagociten, los cuales acabarán convirtiéndose en macrófagos espumosos<sup>14</sup>.

Esta dinámica se interrumpe con la adquisición de la respuesta inmunitaria (dirigida principalmente contra los bacilos en crecimiento<sup>15</sup>) y, con ella, la activación de los macrófagos infectados, con lo que el crecimiento bacilar se detiene. En este momento empiezan a observarse más macrófagos espumosos, puesto que, al no ser destruidos por el crecimiento bacilar, tienen la oportunidad de acumular más y más cuerpos lipídicos con la fagocitosis del tejido necrótico y de los bacilos que contiene. Sin embargo, estos bacilos no se multiplican, pero tampoco son destruidos<sup>16</sup>. Ello es debido a que estos macrófagos, al ser estimulados por una gran cantidad de detritus celulares y bacilares, pueden generar óxido nítrico y, con ello, una concentración bacteriostática de radicales de nitrógeno<sup>16,17</sup>, pero que a la vez suprime la acción de los linfocitos específicos que quieran activarlos<sup>18</sup>. También es importante el hecho de que, con la enorme carga lipídica, la unión del fagolisosoma en estas células no sea tan eficaz<sup>19</sup>, o que tengan un mecanismo de presentación antigénica alterado y no puedan ser activadas por los linfocitos específicos<sup>20</sup>. Sea como fuere, los macrófagos espumosos empiezan a acumularse en el espacio alveolar que rodea al granuloma. En el interior de algunos de ellos se acumulan bacilos en fase estacionaria, que, de esta manera, son drenados (o se "escapan"). Este aspecto es muy importante en la hipótesis dinámica, que sustituye al príncipe azul que despertará al bacilo durmiente por un barrendero despreocupado que "confundiría" al bacilo con los propios restos celulares.

Sin embargo, también podría defenderse que el tal barrendero no fuera tan despreocupado y formara parte de una estrategia del huésped que incluye una respuesta inmunitaria potente, centrada en la identificación y eliminación de los bacilos en crecimiento, que son los más peligrosos (y vulnerables), y deja a la dinámica restauradora del parénquima la tarea de drenar los bacilos menos peligrosos (y más difíciles de destruir<sup>21</sup>), que son los que están en fase estacionaria. Por otra parte, el bacilo es capaz de adaptarse a esta situación y la utiliza para persistir en el tiempo. De esta manera, con la llegada al fluido alveolar, estos bacilos se trasladan hacia las vías respiratorias superiores con el objetivo de ser expulsados o deglutidos para ser destruidos en el estómago. Esta dinámica esconde un mecanismo muy conocido pero curiosamente poco integrado en la fisiopatología de la tuberculosis, que es la generación de los aerosoles. Los aerosoles se producen en las vías aéreas superiores con el objetivo de acondicionar (es decir, humidificar y calentar) el aire inspirado proveniente del exterior<sup>22</sup>. Por ello, los bacilos contenidos en el fluido alveolar, que proceden tanto de lesiones cavitadas como no cavitadas, o de las pequeñas lesiones generadas en la ITBL, forman parte de estos aerosoles. Evidentemente, en las 3 situaciones descritas la concentración bacilar en

el fluido será muy diferente y, por tanto, la capacidad de infección exógena será muy diferente en los 2 primeros casos y nula en el tercero<sup>23</sup>. Pero lo importante es el hecho de que el objetivo principal de los aerosoles es volver al propio espacio alveolar, concepto clave para explicar la hipótesis dinámica. También es muy interesante constatar que la baja velocidad de crecimiento del bacilo hace que la permanencia en el estado estacionario se prolongue<sup>24</sup> y, por tanto, tenga una mayor capacidad para inducir nuevas infecciones, puesto que los bacilos en este estado son mucho más resistentes al estrés que los que están en crecimiento activo<sup>21</sup>.

Así pues, la ITBL sería el fruto de una reinfección endógena, o diseminación y reactivación constantes, y por ello es posible explicar por qué la administración de isoniacida durante 6-9 meses es eficaz. En la hipótesis estática clásica se considera que, tras la diseminación de los bacilos, antes de la inducción de la inmunidad, se generan pequeños granulomas en los lóbulos pulmonares superiores, donde se acumulan los bacilos latentes, que podrán reactivar su crecimiento muchos años después, tras ser estimulados por un factor "resucitador" y potenciados por episodios de cierta inmunodepresión<sup>5,6</sup>. Sin embargo, de ser cierta esta hipótesis, el tratamiento de la ITBL actual sería inútil, debido al largo período en que estos bacilos permanecen en estado latente in situ. En este caso, para evitar esta reactivación la administración de isoniacida debería prolongarse durante muchos años, de por vida si tenemos en cuenta conceptos clásicos igualmente cuestionables<sup>25</sup>.

En la hipótesis dinámica no se discute el hecho de que la alta concentración de oxígeno hace de estos lóbulos superiores una localización privilegiada en que el bacilo puede crecer con mayor intensidad, hasta el punto de generar cavidades<sup>26,27</sup>. Lo que se postula con esta hipótesis es que la presencia del bacilo en esta localización es la consecuencia de la reinfección endógena constante, no el fruto de una persistencia del bacilo durante años en el ápex pulmonar, puesto que sería rápidamente drenado.

Así pues, con la hipótesis dinámica se considera que el tratamiento de 6-9 meses permite al hospedador llevar a cabo el drenaje natural de los bacilos en fase estacionaria, con lo que evita la posibilidad de que éstos reactiven su crecimiento y, por tanto, puedan perpetuar su persistencia.

La administración de quimioterapia también genera otro efecto beneficioso: eliminar la acumulación de macrófagos espumosos alrededor del granuloma, al evitar el crecimiento bacilar en su interior y reducir la respuesta inflamatoria<sup>28</sup>. Con ello se elimina una fuente de inmunodepresión local. Los macrófagos espumosos se caracterizan por generar óxido nítrico y, de este modo, suprimir los linfocitos efectores que intentan activarlos<sup>16,18</sup>. Por otra parte, la quimioterapia genera asimismo una inmunodepresión local más general. Puesto que los bacilos no pueden multiplicarse, la respuesta inmunitaria cede de manera generalizada en todo el granuloma<sup>28</sup>. Por ello el tratamiento quimioterápico corto no es eficaz. Los bacilos en fase estacionaria restantes pueden entonces reanudar su crecimiento debido a la falta de respuesta inflamatoria e inmunitaria local.

La estrategia de RUTI parte de la base de que el tratamiento antibiótico inicial es necesario para eliminar a los bacilos en crecimiento activo y reducir la presencia de macrófagos espumosos. Posteriormente, la inoculación de la vacuna RUTI consigue, en primer lugar, la reinducción de la respuesta inmunitaria contra los bacilos en crecimiento. Por otra parte, con la inducción de una respuesta inmunitaria celular y humoral poliantigénica también contra antígenos estructurales<sup>29-32</sup>, se consigue que los nuevos macrófagos que van a limpiar el tejido necrótico puedan reconocer a los bacilos en fase estacionaria y ser activados para destruirlos en su interior<sup>30</sup>.

Esta estrategia ha demostrado su utilidad en varios modelos de tuberculosis experimental, en ratones, cobayas y cabras<sup>29-32</sup>, y por ello estamos iniciando el desarrollo clínico con el objetivo de reducir el tratamiento antibiótico a un mes más 2 dosis de RUTI. El objetivo primordial y más necesario será comprobar la eficacia del planteamiento en quienes más lo necesitan, es decir, los pacientes con ITBL coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, que tienen un riesgo 20 veces superior de presentar una reactivación de la tuberculosis<sup>1</sup>. Una vez demostrado este extremo, en unos 5 años, esperamos poder afirmar con rotundidad que las perspectivas en la tuberculosis serán efectivamente rutilantes... gracias a RUTI.

#### BIBLIOGRAFÍA

- World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva: WHO; 2006.
- American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:S221-S47.
- Cardona PJ. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. Inflamm Allergy Drug Targets. 2007; 6:27-39.
- Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13:908-14.
- Grange JM. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. En: Davies PDO, editor. Clinical tuberculosis. London: Chapman & Hall; 1998. p. 113-27.
- Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. J Pathol. 2006;208:261-9.
- Barry CE III. Preclinical candidates and targets for tuberculosis therapy. Curr Opin Investig Drugs. 2001;2:198-201.
- Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. Clin Microbiol Rev. 2001;14:727-52.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 2005; 307:1915-20.
- Shleeva MO, Bagranyan K, Telkov MV, Mukamolova GV, Young M, Kell DB, et al. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. Microbiology. 2002;148:1581-91.
- Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. Faseb J. 1994;8:957-67.
- Gomes MS, Paul S, Moreira AL, Appelberg R, Rabinovitch M, Kaplan G. Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. Infect Immun. 1999;67:3199-206.
- Boros DL. The cellular immunological aspects of the granulomatous response. En: Boros DL, editor. Granulomatous infections and inflammations. Cellular and molecular mechanisms. Vol. 1. Boros DL, editor. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 1-20.
- D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. J Immunol. 2006;176:3087-97.
- Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol. 1997;45:115-31.
- Cardona PJ, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Amat I, Pallarés A, et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 2003;71: 5845-54.
- Brugmann WB, Firmani MA. Low concentrations of nitric oxide exert a hormetic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. J Clin Microbiol. 2005;43:4844-6.
- Strickland D, Kees UR, Holt PG. Regulation of T-cell activation in the lung: alveolar macrophages induce reversible T-cell anergy in vitro associated with inhibition of interleukin-2 receptor signal transduction. Immunology. 1996;87:250-8.
- Roth P, Celada A, Cruchaud A. Evaluation of human monocyte function in vitro. Ann Immunol (Paris). 1979;130C:611-20.
- Ordway D, Henao-Tamayo M, Orme IM, González-Juarrero M. Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. J Immunol. 2005;175:3873-81.
- Wallace JG. The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice. Am Rev Respir Dis. 1961;83:866-71.
- Bui TD, Dabdub D, George SC. Modeling bronchial circulation with application to soluble gas exchange: description and sensitivity analysis. J Appl Physiol. 1998;84:2070-88.
- Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis control. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1999.
- Garton NJ, Christensen H, Minnikin DE, Adegbola RA, Barer MR. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum. Microbiology. 2002;148:2951-8.
- Cardona PJ, Ruiz-Manzano J. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. Eur Respir J. 2004;24:1044-51.
- Pérez-Padilla R, Franco-Marina F. The impact of altitude on mortality from tuberculosis and pneumonia. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8:1315-20.
- Vargas MH, Furuya ME, Pérez-Guzmán C. Effect of altitude on the frequency of pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8:1321-4.
- Cardona PJ, Julián E, Valles X, Gordillo S, Muñoz M, Luquin M, et al. Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. Scand J Immunol. 2002;55:639-45.
- Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, et al. Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. Vaccine. 2005; 23:1393-8.
- Cardona PJ. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. Tuberculosis (Edinb). 2006;86:273-89.
- Cardona PJ, Amat I. Origen y desarrollo de RUTI, una nueva vacuna terapéutica contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Bronconeumol. 2006;42:25-32.
- Guirado E, Amat I, Gil O, Díaz J, Arcos V, Cáceres N, et al. Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. Microbes Infect. 2006;8: 1252-9.