

Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar Revisión.

Bruno Rivas-Santiago¹, Patricia Vieyra-Reyes² y Zaida Araujo³.

¹Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. ²Instituto de Fisiología Celular.

Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México y

³Cátedra de Inmunología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Correo electrónico: zaraujo@telcel.net.ve

Palabras clave: Tuberculosis, respuesta de inmunidad celular (RIC), *Mycobacterium tuberculosis*, macrófagos alveolares, lavado bronquiolo alveolar (LBA), monocito (MN), macrófago (MA).

Resumen. La tuberculosis (TBC) pulmonar humana, un problema de salud pública en el mundo, es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Se conoce que una minoría de las personas que son infectadas por *M. tuberculosis* son capaces de progresar a enfermedad clínica. Se puede decir, en términos generales, que el 90% de las personas tendrán controlados los bacilos en estado latente para toda la vida, por medio de su sistema inmunológico. Un 5% presentará TBC primaria progresiva y el otro 5% presentará la enfermedad en estados tardíos de la vida, lo que se denomina TBC de reactivación o post-primaria. En los individuos resistentes, el control de la infección o de los bacilos tuberculosos que se encuentran en la región alveolar requiere principalmente del desarrollo de una respuesta de inmunidad celular (RIC) del tipo Th1. Este tipo de respuesta incluye la participación de los macrófagos alveolares, los linfocitos T CD4+ y CD8+, principalmente los linfocitos T $\gamma\delta$ y la producción de citocinas como: IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18 y TNF- α . Aunado están las quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8 que juegan un papel muy importante en la migración de las diferentes subpoblaciones celulares al sitio de infección para la formación del granuloma. Además, es primordial el papel de las células "natural killer" (NK), y de las células epiteliales como parte de la respuesta de inmunidad innata.

Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review.
Invest Clin 2005; 46(4): 391 - 412

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, alveolar macrophages, monocyte, macrophage.

Abstract. Human pulmonary tuberculosis (TB) is a worldwide public health problem, which is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. It is a fact that one third of the world's population is infected with this mycobacteria, however, only a minority of people infected by *M. tuberculosis* may develop a clinical disease. In general, about 90% have their bacilli under control in a latent state throughout their lives by means of their immune responses. About 5% will develop primary progressive TB and the remaining 5% will develop the disease in the later stages of their lives, which is known as reactivation or post-primary TB. In resistant individuals, control of the infection mainly requires development of a Th1 cell immunity response. This type of response involves participation of alveolar macrophages and T CD4+, CD8+ and T $\gamma\delta$ lymphocytes, and production of cytokines such as IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18 and TNF- α , as well as chemokines such as RANTES, MCP-1, MIP-1 α and IL-8 which play an important role in the migration of different cell subpopulations to the infection site for the formation of granuloma. In addition, the role of "natural killer" (NK) cells, along with epithelial cells, is essential as part of the innate immune response.

Recibido: 27-01-2005. Aceptado: 12-05-2005

INTRODUCCIÓN

La TBC es una enfermedad infecciosa causada principalmente por *M. tuberculosis*, aunque en raras ocasiones puede ser causada por *M. bovis* (1,2). Durante la última década a nivel mundial se registraron 90 millones de nuevos casos y aproximadamente 30 millones de muertes fueron causadas por esta enfermedad. Se ha estimado que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada por *M. tuberculosis*; sin embargo, solamente el 5-10% de esta población desarrolla la enfermedad en su forma activa dentro de los primeros 2 años (TBC primaria) o más tarde (reactivación) mostrando síntomas clínicos (1, 2).

Presumiblemente, esta población no tiene la capacidad para desarrollar una respuesta inmunitaria protectora que le permi-

ta controlar la infección inicial y prevenir el desarrollo de la enfermedad (3). Existen factores que determinan la susceptibilidad a esta enfermedad como son: socio-económicos, la edad y la predisposición genética del hospedador. Sin embargo, el resurgimiento de la TBC se encuentra estrechamente asociada a la epidemia causada por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y a la aparición de cepas multirresistentes a las drogas antituberculosas (4).

TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS Y FACTORES QUE FAVORECEN LA INFECCIÓN

M. tuberculosis y otras micobacterias productoras de TBC, se transmiten desde un paciente con TBC pulmonar infecciosa a través de pequeñas gotas de secreciones respi-

ratorias y saliva aerosolizadas por la tos, el estornudo o el habla. La tos puede generar 3000 gotitas infecciosas, hablar durante cinco minutos se asocia con igual cantidad y los estornudos producen una cantidad mucho mayor (5, 6). Una vez en el interior las gotas de secreción pierden una parte de su contenido acuoso por evaporación y dejan un núcleo de 1-2 μm de diámetro con pocos bacilos tuberculosos (7). Estas pequeñas gotas infectantes pueden permanecer suspendidas en el aire durante períodos prolongados.

La infección por el bacilo tuberculoso ocurre por la confluencia de factores exógenos como el contacto con un paciente infectante, el grado de intimidad con el mismo, duración del contacto, infectividad de la fuente y el ambiente donde se produce el contacto. En teoría, una sola gota infectante, conteniendo un bacilo tuberculoso es suficiente para producir la infección, pero en la práctica, se requiere una exposición prolongada y numerosas gotas infectantes para que se produzca el contagio (5, 6). Esta afirmación se basa en estudios realizados en contactos, donde se demostró que aquellos pacientes con TBC pulmonar cavitaria o de otro órgano del sistema respiratorio, cuyo esputo posee bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) visibles con el microscopio (más de 104 BAAR/mL de esputo) son los principales transmisores de la infección, que puede llegar a contagiar hasta un 50% de sus contactos (5). Por el contrario, a los pacientes cuyo extendido de esputo es negativo, con un cultivo positivo, se les asocia con transmisión de *M. tuberculosis* a 5% de sus contactos aproximadamente. Actualmente se considera que cada paciente tuberculoso infectante puede transmitir el agente causal a 20 contactos aproximadamente (5, 6). El hacinamiento es uno de los factores más importantes en la transmisión de los bacilos tuberculosos. Se calcula que aproximadamente el 27% de los

contactos que cohabitan con pacientes bacilíferos (extendido de esputo positivo) contraen la infección (5, 6).

Las enfermedades que producen alteración de la inmunidad celular favorecen el desarrollo de la TBC activa; entre ellos tenemos silicosis, linfomas, leucemia y otras enfermedades tumorales malignas, hemofilia, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitas y VIH/SIDA. El tratamiento inmunosupresor, trastornos asociados con derivación como gastrectomía y cirugía de derivación yeyuno-ileal, también se han relacionado con la enfermedad. La TBC no tratada suele ser mortal; cerca de un tercio de los pacientes muere durante el primer año después del diagnóstico y la mitad durante los cinco primeros años (5, 6).

FORMAS CLÍNICAS DE LA TUBERCULOSIS

Debido a que el agente causal penetra al organismo casi de forma exclusiva por la vía respiratoria, la TBC se localiza generalmente en los pulmones; sin embargo, en una proporción variable, dependiendo de factores predisponentes, se puede producir una diseminación hematógena, con siembras a distancia, que darán lugar a TBC en cualquier otro órgano. Basándose en esto, la TBC se clasifica en pulmonar y extrapulmonar (6, 7). En relación con esta última forma de TBC, desde el inicio de la epidemia de VIH/SIDA, se ha incrementado el número de casos de tuberculosis extrapulmonar; de hecho se considera que dos terceras partes de los pacientes con infección por VIH y tuberculosis presentan tuberculosis pulmonar y extrapulmonar o bien tuberculosis extrapulmonar aislada (5, 6). Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son los ganglios linfáticos, pleura, sistema genitourinario, sistema osteoarticular, meninges y peritoneo (5, 7).

TUBERCULOSIS PULMONAR

La TBC pulmonar es la principal forma de la enfermedad debido a que *M. tuberculosis* entra al organismo a través del tracto respiratorio y se establece primordialmente en los pulmones, ya que es un aerobio estricto y prefiere sitios con alta concentración de oxígeno. La TBC pulmonar se puede clasificar en primaria y postprimaria. La TBC pulmonar primaria se debe a la infección inicial por el bacilo tuberculoso. Esta forma clínica se observa con más frecuencia en niños. En un 25% de los casos, el foco primario es subpleural, en los segmentos pulmonares medios, donde el flujo aéreo es mayor y favorece el depósito de los bacilos inhalados. En la mayor parte de los casos, el foco pulmonar primario es una lesión solitaria, aunque en el 25% de los casos se observan varios focos. En estos focos se produce un infiltrado de linfocitos, monocitos (MN) y macrófagos (MA), dando origen a una neumonitis. Los macrófagos fagocitan a los bacilos y luego, por vía linfática, llegan a los ganglios linfáticos hiliares, mediastínicos y a veces supraclaviculares o retroperitoneales, ocasionando adenopatías (5-7).

En la mayor parte de los casos, las lesiones parenquimatosas y ganglionares curan de manera espontánea, con calcificación, visible radiológicamente, lo que se denomina complejo de Ghon. Algunas veces, las adenomegalias hiliares o mediastínicas pueden comprimir los bronquios y causar obstrucción, colapso segmentario o lobular, o erosión de la pared bronquial con diseminación distal de la infección. En pacientes con trastornos inmunitarios como el SIDA o en pacientes de edad avanzada, el foco primario puede transformarse en un área de neumonía activa llamada TBC primaria progresiva, que puede causar cavitación y diseminarse a través de los bronquios. En otros casos, la primoinfección tuberculosa se disemina por vía linfohematógena produciendo

do siembras en serosas, ganglios linfáticos y hasta diseminación miliar (5-7).

Durante las primeras fases de la enfermedad, los signos y síntomas suelen ser inespecíficos e insidiosos y consisten principalmente en fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, anorexia, malestar general y debilidad. Posteriormente se presenta tos con expectoración purulenta y hemoptisis. La hemoptisis se produce por erosión de un vaso sanguíneo en la pared de una cavidad y puede originar hemoptisis masiva, aunque esta última es más frecuente por la ruptura de un vaso sanguíneo dilatado en una cavidad (aneurisma de Rasmussen). En los casos de tuberculosis inactiva, la hemoptisis brusca y significativa puede deberse a sobreinfección por *Aspergillus* sp. en las cavidades residuales, formando aspergilomas. Los pacientes con lesiones parenquimatosas subpleurales pueden presentar dolor pleurítico, que también puede ser causado por la sobrecarga muscular secundaria a la tos persistente. Si la afección pulmonar es muy extensa se puede producir disnea y en raras ocasiones, síndrome de distress respiratorio del adulto (SDRA) (5-7).

La coinfección *M. tuberculosis* y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es una condición clínico epidemiológica grave. Los pacientes con VIH/SIDA presentan compromiso de la inmunidad celular, lo que favorece la susceptibilidad a la infección tuberculosa o la reactivación de una infección previa. La presentación de la TBC en estos pacientes varía según el grado de inmunosupresión. Cuando la inmunidad celular sólo está parcialmente comprometida, la tuberculosis pulmonar presenta el patrón típico de infiltrados en el lóbulo superior con cavitación, sin adenopatías importantes. En las fases avanzadas de la infección por VIH se observa una enfermedad no cavitaria, difusa, diseminada y rápidamente progresiva que a menudo es fatal (5, 6, 8).

En los individuos resistentes, el control de la infección o de los bacilos tuberculosos que se encuentran en la región alveolar requiere principalmente del desarrollo de una RIC del tipo Th1. Este tipo de respuesta incluye la participación de los MA, los linfocitos T CD4+, CD8+ y $\gamma\delta$, y la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18 y TNF- α . Aunado a esto están las quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8, que juegan un papel muy importante en la migración de las diferentes subpoblaciones celulares al sitio de infección para la formación del granuloma (Fig. 1). Sin embargo, los alvéolos están provistos de mecanismos innatos de defensa (9-12).

RESPUESTA DE INMUNIDAD INNATA

La naturaleza ha provisto al espacio alveolar con mecanismos innatos de defensa que involucran a los macrófagos alveolares, las células dendríticas, los neutrófilos, los linfocitos B, las células epiteliales, las células alveolares tipo I y tipo II y factores solubles como la mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2 inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y la eliminación de partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio (9-12).

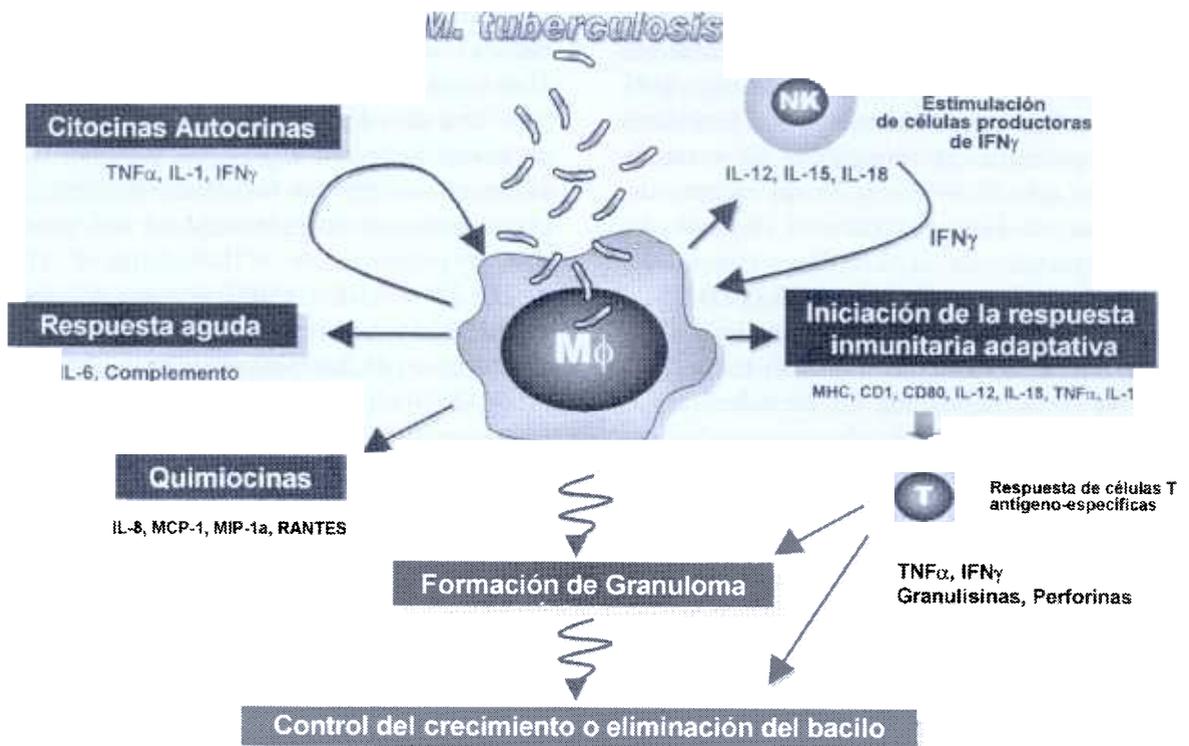


Fig. Mecanismos Inmunológicos Efectores en Tuberculosis. Se muestra la respuesta inflamatoria de los macrófagos durante la primo-infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El Macrófago reconoce y fagocita a la micobacteria, después los macrófagos inician una respuesta proinflamatoria donde las citocinas que actúan de manera autocrina o paracrina juegan el papel más importante. La producción de las citocinas dará lugar a la activación del macrófago con la consecuente muerte del bacilo o bien con el control del crecimiento de este. Esta producción de citocinas es acompañada por otro tipo de moléculas de la respuesta inmune innata tales como quimiocinas.

La llegada de *M. tuberculosis* hasta el espacio alveolar significa que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio; sin embargo, ahora se enfrenta a los MA que constituyen la primera línea de defensa y este primer contacto es crucial ya que va a definir el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad. La fagocitosis de *M. tuberculosis* es principalmente llevada a cabo por los MA a través de diversos mecanismos y es favorecida por el surfactante A producido por las células epiteliales alveolares tipo II ya que aumentan la interacción entre la micobacteria y los MA (11).

Al parecer *M. tuberculosis* ha desarrollado diferentes mecanismos para entrar a los MA, ya que induce su propia fagocitosis utilizando diferentes receptores como son: 1) CD14, 2) receptores para Fc cuando la micobacteria ha sido opsonizada con anticuerpos (Acs) producidos por los linfocitos B en el pulmón, 3) receptores de complemento, ya que al activarse la vía alterna del complemento C3b y C3bi son depositados en la superficie de la micobacteria y éstos son reconocidos por CR1 y CR3/CR4 presentes en la superficie en los MA. En ausencia de éstos factores (C3b y C3bi), un componente de la superficie de *M. tuberculosis* muy parecido a C4 puede unirse directamente a C2a para formar C3 convertasa que actúa sobre C3 y produce C3b que se une a la superficie de la micobacteria y facilita la unión con CR1, 4) receptores de manosa que interactúan con LAM 5) receptores scavengers y 6) receptores para el surfactante A (13, 14).

Algunos componentes de la micobacteria (arabinogalactanas, peptidoglicanos, LAM, proteínas) pueden interactuar con los Receptores Toll / TLR2/TLR4 de los MA e inducir la producción de IL-1 β y TNF- α . Tanto IL-1 β / IL-1R y el complejo TLR2/CD14/MD2/ Ag utilizan vías comunes de señalización intracelular que incluye principalmente la molécula adaptadora

MyD88; sin embargo algunos autores afirman que no es completamente necesaria la presencia de esta molécula para iniciar una respuesta inmune, no es así en el caso de los TLR's donde en ratones knock out para estos receptores muestran una susceptibilidad a la infección inmensamente mayor que los ratones normales (15), existen también otras moléculas relacionadas en la señalización de la respuesta inmune en tuberculosis tales como IRAK-1, TRAF6, NIK, IKK, NK- κ B, mientras que TNF- α interactúa con su receptor e inicia la señalización con proteínas diferentes (TRADD, TRAF2), teniendo el mismo factor de transcripción (NF- κ B) e induciendo la expresión de los genes que codifican para ciclooxigenasa, moléculas de adhesión celular, sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS2), proteínas de fase aguda, citocinas y quimiocinas (16).

Durante la fagocitosis, la micobacteria es incluida en un fagosoma y destruida en el fagolisosoma por enzimas lisosomales y algunos de sus antígenos (Ags) son procesados y presentados a linfocitos T CD4+ (MCH II) y CD8+ (MCH I), por lo que los MA además de ser células efectoras funcionan como células presentadoras de antígenos (APC) y pueden definir el curso de la respuesta de inmunidad adaptativa (Th1 o Th2). Este es el paso de transición entre la respuesta de inmunidad innata a la respuesta de inmunidad adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico entre diferentes células y la secreción de factores solubles como las citocinas y quimiocinas. En estudios recientes se ha observado que *M. tuberculosis* inhibe la expresión del gen HLA-DR, la cual está regulada normalmente por IFN- γ , lo que puede dar lugar al desarrollo de una infección latente (17), el por qué de que algunos individuos puedan presentar MHC I y controlar la infección mientras otros tantos son susceptibles a la inhibición de la expresión del gen por *M. tuberculosis*, necesita ser estudiado.

RESPUESTA DE INMUNIDAD CELULAR

La respuesta de inmunidad adaptativa es específica y su desarrollo depende en gran medida de la eficiencia de la respuesta de inmunidad innata, ya que si los MA no son capaces de controlar la infección se favorece una respuesta inmunitaria humoral (Th2), que no es protectora en TBC y que se caracteriza por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β , los cuales antagonizan la RIC tipo Th1, eficiente en infecciones causadas por microorganismos intracelulares y caracterizada por la producción de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 y TNF- α (18, 19).

En la TBC pulmonar, *M. tuberculosis* ingresa al organismo por vía aérea y alcanza a los alvéolos pulmonares en el espacio pulmonar interactuando con células epiteliales tanto del alveolo como del espacio peribronquial, las cuales pueden secretar quimiocinas y algunos péptidos antimicrobianos que eliminarán a algunas micobacterias (Rivas-Santiago B. En Prensa). Posteriormente, la micobacteria es fagocitada por los MA residentes no activados que tratan de controlar la infección y al mismo tiempo producen citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 TNF- α e IL-12 para el reclutamiento y activación de células del sistema inmunológico (Fig. 1).

La IL-12 es una citocina de producción temprana y es producida principalmente por los monocitos (MN), macrófagos (MA), neutrófilos y células dendríticas; estructuralmente, la IL-12 se encuentra constituida por dos subunidades, la p35 y la p40 que se unen covalentemente para formar la citocina biológicamente activa p70. Su producción es inducida por algunas citocinas como IFN- γ , TNF- α y GM-CSF, mientras que IL-10, IL4 y TGF- β tienen un efecto antagónico sobre esta citocina. La IL-12 juega un papel importante en el control de la infección, ya que favorece una RIC en la TBC debido a que tiene las siguientes funciones

importantes: 1) inducir la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4+, CD8+ y las células NK, 2) incrementar la proliferación de linfocitos T CD4+, 3) favorecer la expansión clonal de las células Th1 y 4) aumentar la citotoxicidad de los linfocitos CD8+ y las células NK (20).

Los trabajos realizados *in vitro* con MN humanos y MA muridos infectados con *M. tuberculosis*, *S. aureus* muerto y perlas de látex de diferente diámetro, han demostrado, mediante la técnica de RT-PCR y ELISA, que la fagocitosis constituye una potente señal para inducir la expresión y producción de la IL-12, mostrando que la expresión de la subunidad p40 empieza a las 3 h, alcanzando los máximos niveles a las 3-6 h y decayendo a las 18-24 h (20, 21). La IL-12 tiene un rol fundamental en la inducción de la producción de IFN- γ (20, 21), citocina esta que como se mencionó anteriormente desempeña un papel importante en la respuesta de tipo Th1 (12, 22). En tuberculosis, la IL-12 ha sido detectada en infiltrados pulmonares (23, 24), en líquido pleural (25), en granulomas (26), y en linfadenitis (27). La expresión de los receptores de la IL-12 está también incrementada en el sitio de la enfermedad (28). Estudios realizados en humanos que padecen infecciones recurrentes por micobacterias no tuberculosas están asociados con mutaciones en los genes que codifican para la IL-12p40 y el receptor de la IL-12 (29-32). Estos pacientes tienen una producción de IFN- γ deficiente (33). Se ha establecido que la IL-12 es una citocina regulatoria que conecta las respuestas inmunitarias innata y adaptativa contra micobacteria (34-36), principalmente porque ejerce su efecto protector a través de la inducción del IFN- γ (37). La producción de IL-12 es independiente de la naturaleza y viabilidad de la bacteria fagocitada; sin embargo, esto no es así para la producción de TNF- α que requiere de la infección con bacterias vivas (38, 39).

El efecto regulatorio de las citocinas IL10, TGF- β , IFN- γ y TNF- α sobre la IL-12 fue estudiado en MN humanos infectados *in vitro* con *M. tuberculosis* H37Ra. Los resultados mostraron que el pretratamiento de los MN con IFN- γ induce un incremento en la producción del IL-12, siendo más marcado el efecto sobre la subunidad p40, mientras que el pretratamiento con la IL-10 causa reducción en los niveles de la IL-12, confirmando de esta manera el efecto antagónico de esta citocina sobre la producción de IL-12 (40).

La importancia de la IL-12 en la TBC humana se ha puesto de manifiesto al demostrarse, mediante la técnica de ELISPOT, que hay un incremento en el número de células productoras de IL-12 en sangre periférica, mientras que en las células de lavados bronquiolo alveolares (LBA) se ha demostrado, con la técnica de hibridación *in situ*, un aumento en la expresión de mRNA de las dos subunidades, $\beta 1$ y $\beta 2$, del receptor para IL-12 en linfocitos T CD4+ y CD8+. Esto evidencia que durante el proceso infeccioso hay reclutamiento de linfocitos al pulmón y éstos son activados para mostrar el IL-12R que les permite interactuar con la IL-12, producida por los MA, y así constituir una fuente de IFN- γ (41, 42).

La inmunidad celular en la TBC es generada cuando los linfocitos T CD4+ ($\alpha\beta$ TCR) reconocen antígenos de *M. tuberculosis* presentados por los MA en el contexto de moléculas MHC II. Estos antígenos provienen del fagosoma, el cual constituye el hábitat preferido de la micobacteria, al mismo tiempo que tienen fácil acceso a la vía de las moléculas MHC II, de manera que pueden ser acoplados y presentados a los linfocitos T CD4+. Como resultado de esto, los linfocitos TCD4+ son activados y empiezan a producir IFN- γ , una citocina de gran importancia por su capacidad de incrementar la función microbicida de los macrófa-

gos. Por otra parte, otra citocina, la IL-1 producida por MA, promueve la producción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 con la subsecuente expansión clonal de los linfocitos T CD4+, así como también la IL-12 producida por MA (43).

En humanos, algunas evidencias experimentales sugieren que los linfocitos CD4+ pueden tener además una función citolítica, particularmente en la respuesta inmunitaria en el pulmón (44). Además de los linfocitos CD4+ y las células NK, otra fuente importante de IFN- γ la constituye los linfocitos T CD8+ ($\alpha\beta$ TCR), los cuales reconocen antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas MHC I o CD1 (43, 44), y además, tienen funciones citotóxicas sobre las células infectadas a través de un mecanismo dependiente de gránulos, lo cual implica el reconocimiento por las células CD8+ de los antígenos presentados por las APC en el contexto de moléculas MHC I o CD1 conllevando esto a la activación del linfocito, la producción de IFN- γ , la síntesis y producción de gránulos que son secretados al espacio intercelular y que, posteriormente, entran a la célula infectada para ejercer su acción citolítica (45, 46). En los gránulos se encuentran proteínas importantes como las perforinas, las cuales forman trímeros que se insertan en la membrana y facilitan la entrada de las granzimas y granzimas; a estas últimas se les ha asignado el rol de ser las responsables de la muerte de *M. tuberculosis* al actuar directamente sobre los lípidos en la pared de la micobacteria (47).

Junto con el TNF- α , el IFN- γ producido por las diferentes poblaciones de linfocitos T y las células NK interactúa con su receptor (IFN- γ -R), expresado en la membrana de los MA; este está formado por la cadena α y la cadena β (IFN- γ R1 y IFN- γ R2, respectivamente) y es el responsable de iniciar la señales intracelulares, lo cual dispara la expresión de una gran cantidad de genes invo-

lucrados en la activación de mecanismos bactericidas de los MFFF y APC, por lo que es una citocina a la que se le ha asignado una participación importante en el control de las infecciones causadas por bacterias intracelulares como es *M. tuberculosis*. El IFN- γ induce la producción de intermediarios del oxígeno (ROI), intermediarios del nitrógeno (RNI), la acidificación del fagosoma y la fusión fagosoma-lisosoma, la expresión de la iNOS2 para la producción de óxido nítrico (NO) utilizando L-arginina como sustrato, la reducción de Fe intracelular para limitar el desarrollo de la micobacteria a través de la desregulación del receptor para transferrina, el aumento de las moléculas MHC I y II involucradas en la presentación de antígenos, y el aumento en la capacidad para fagocitar, además de inducir la producción de IL-12 (19, 48).

En la TBC pulmonar humana existe una correlación entre la producción de IFN- γ y las manifestaciones clínicas de la enfermedad; mientras más severa es la enfermedad, las células mononucleares de sangre periférica producen niveles más bajos de IFN- γ (49); sin embargo a medida que avanza la quimioterapia, el gen de IFN- γ empieza a expresarse nuevamente (50).

La importancia del IFN- γ ha sido puesta de manifiesto en pacientes con alteraciones genéticas del IFN γ -R, al mostrar que estas personas tienen una gran susceptibilidad a infecciones diseminadas y que los MN/MFFF no pueden ser activados adecuadamente.

Estudios *in vitro* con células mononucleares de pacientes con infecciones micobacterianas causadas por BCG, *M. avium*, *M. abscessus* y otras micobacterias atípicas han demostrado la existencia de alteraciones genéticas que incluyen mutaciones puntuales, deleciones y sustituciones en los genes que codifican las subunidades del receptor IFN- γ (IFN- γ R1 y R2), generando

proteínas no funcionales que impiden la activación de los MN/MFFF, lo cual determina la susceptibilidad a infecciones diseminadas causadas por patógenos intracelulares. La diseminación es consecuencia de una falla en la formación de granuloma, debido a que no hay producción de las citocinas (principalmente TNF- α) y quimiocinas involucradas en este proceso. En este caso, el IFN- γ exógeno no tiene la capacidad de activar a los MN/MA, y como consecuencia pasan a ser células permisivas dentro de las cuales se multiplica la micobacteria (51).

Además de las alteraciones genéticas en el IFN γ -R, otros estudios han demostrado que las alteraciones genéticas de la subunidad p40 de IL-12 y de una subunidad de su receptor provocan una deficiente producción de IFN- γ facilitando las infecciones diseminadas por micobacterias (52). Los estudios mencionados nos proporcionan evidencias sobre la importancia de la interacción y co-regulación entre el IFN- γ y la IL-12, ya que cuando la producción de alguna de estas citocinas o sus receptores se encuentra alterada por procesos infecciosos o por alteraciones genéticas, se observa una ineficiente respuesta inmunitaria del hospedador ante infecciones intracelulares.

Otra citocina importante en la RIC contra *M. tuberculosis* es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos intracelulares, este mediador también es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves. La principal fuente celular de TNF son los MN/MA activados, aunque también puede ser secretado por linfocitos T estimulados por antígenos, células NK y mastocitos. El sinérgismo del TNF- α con el IFN- γ contribuye a la resistencia a *M. tuberculosis* al inducir la expresión de la enzima iNOS2 en los fagocitos mononucleares para producir NO y RNI, moléculas involucradas en la destrucción de la mi-

cobacteria. Hay evidencias experimentales que muestran la importancia del NO en la defensa del hospedador en la TBC pulmonar humana. Estudios histoquímicos han permitido detectar altos niveles de la iNOS2 en MA obtenidos de LBA de pacientes con TBC pulmonar, en comparación con los MA de sujetos sanos (53). Una de las funciones más importantes del TNF- α es la de inducir la formación del granuloma, que constituye un mecanismo de defensa para evitar la propagación de la infección. Además, el TNF- α induce la expresión de las quimiocinas que son factores quimiotácticos que reclutan células del sistema inmunológico al sitio de infección (Fig. 1).

Estudios realizados con MN y MA humanos de pacientes con TBC han demostrado que la infección *in vitro* con *M. tuberculosis* H37Ra induce la producción de quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1 α y IL-8, habiendo una diferencia en cuanto a los niveles de producción; los MA producen más cantidad de quimiocinas que los MN. Además, al analizar los concentrados de los fluidos del LBA se encontraron las mismas quimiocinas, sugiriendo que en la TBC pulmonar la infección induce la producción de múltiples quimiocinas involucradas en el reclutamiento de linfocitos, monocitos y neutrófilos para la formación del granuloma (54).

El epitelio pulmonar que cubre cerca de 70 m² del tracto respiratorio es otra fuente importante de quimiocinas durante la TBC pulmonar. Se ha demostrado que la línea de células epiteliales alveolares humanas tipo II (A549) son capaces de producir IL-8 al ser infectadas *in vitro* con diferentes concentraciones de *M. tuberculosis* H37Rv (10:1, 1:1 y 0. 1:1), de una manera dosis dependiente, dentro de las primeras 8 h después de la infección. El mecanismo de señalización intracelular involucrado en este evento es dependiente de la IL-1 β producida por los MN como consecuencia de la fa-

gocitosis de *M. tuberculosis*, teniendo como factor nuclear de transcripción al NF- κ B (55).

No todas las micobacterias inducen la secreción de quimiocinas; la infección con cepas vivas de *M. tuberculosis* H37Ra, H37Rv y aislados clínicos, pero no *M. avium* inducen la producción de MCP-1 e IL-8 a niveles comparables, mostrando así, que la cantidad de quimiocinas producida es independiente de la virulencia de *M. tuberculosis* y que la producción depende del crecimiento de las micobacterias, ya que la infección con micobacterias muertas no induce la producción de estas quimiocinas (55).

Ensayos de adherencia e invasión con las células A549 han puesto en evidencia que la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv es más eficiente que la cepa H37Ra, *M. avium* o que *E. coli* HB101 para invadir y replicarse en las células epiteliales a través de su unión con integrinas β 1 en la superficie de las células y que el mecanismo de invasión es dependiente de microfilamentos y microtúbulos (56). Esto pone de manifiesto cómo los microorganismos utilizan moléculas que normalmente son expresadas por las células para entrar a las células del hospedador.

A pesar de que se ha pensado que el primer evento en el alveolo es la fagocitosis de *M. tuberculosis* por los MA, también se ha sugerido que inicialmente la micobacteria está en contacto e infecta a las células epiteliales alveolares, como una alternativa para evadir las agresiones del medio y escapar de los MA. Debido a que al inicio de la infección hay relativamente pocos MA para fagocitar a la micobacteria, son las células epiteliales las que pueden ser invadidas en las primeras horas; sin embargo, la infección juega un papel muy importante en la repuesta inmunitaria, ya que las células epiteliales empezarán a secretar quimiocinas para el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y monocitos al pulmón (57). Así, las células epiteliales juegan un

papel importante en la respuesta de inmunidad innata en contra de *M. tuberculosis* por producir quimiocinas. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que estas células producen péptidos antimicrobianos durante la infección y que además éstos se relacionan con la micobacteria muchas veces causando su lisis (Rivas-Santiago B. y Sada E. En prensa).

Otra población de linfocitos que tiene una función importante en la TBC son los linfocitos T $\gamma\delta$, unas de las primeras células reclutadas hacia el sitio de la lesión y que secretan citocinas y quimiocinas. La subpoblación $V\gamma9+V\delta2+$ de linfocitos T $\gamma\delta$ ha sido implicada en la respuesta inmunitaria protectora contra *M. tuberculosis* por producir citocinas que tienen la capacidad de matar a MA infectados con *M. tuberculosis*, mediante mecanismos de citotoxicidad dependiente de gránulos similares al de los linfocitos TCD8+ (57). Sin embargo, estudios realizados en sangre periférica y LBA de pacientes con TBC han demostrado que la infección por *M. tuberculosis* induce una disminución de la población de linfocitos T $V\gamma9+ / V\delta2+$ en pacientes con TBC, en comparación con sujetos sanos y pacientes con enfermedades granulomatosas como la sarcoidosis (58), esto como consecuencia de la apoptosis inducida por la vía de Fas/Fas ligando de los linfocitos $TV\gamma9+ / V\delta2+$ reactivos a antígenos de *M. tuberculosis* (59).

Este mecanismo de apoptosis de los linfocitos T $\gamma\delta$ ha sido explotado por *M. tuberculosis* como un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria (60); sin embargo, se ha demostrado que el NO producido por la enzima iNOS de los MA infectados y activados protege a los linfocitos T $\gamma\delta$ de la apoptosis inducida por *M. tuberculosis* al bloquear la acumulación intracelular de ceramidas y la activación de caspasas involucradas en la apoptosis sin afectar la expresión de CD95 y CD95L (61).

La RIC en la TBC involucra la participación de los linfocitos CD4+ ($\alpha\beta$ TCR), CD8+ ($\alpha\beta$ TCR) y linfocitos T $\gamma\delta$ que tienen funciones similares, pero al mismo tiempo cada una de estas subpoblaciones tiene características particulares.

La primera diferencia es que los linfocitos CD8+ y $\gamma\delta$ tienen la ventaja sobre los CD4+ en su restricción a moléculas MHC I que son expresadas prácticamente por todas las células del hospedador, mientras que las moléculas MHC II son expresadas por ciertas células del hospedador, como los fagocitos mononucleares. Aunque *M. tuberculosis* reside principalmente en estos fagocitos, las células epiteliales alveolares del pulmón son infectadas, por lo que éstas podrían ser reconocidas por los linfocitos CD8+ y linfocitos T $\gamma\delta$ y no por los CD4+. La segunda diferencia es la cinética de activación, ya que los linfocitos T $\gamma\delta$ son los primeros en llegar al sitio de infección; CD4+ y CD8+ probablemente no tienen funciones efectoras tan efectivas, pero durante la TBC estas células aparecen subsecuentemente en el siguiente orden: PMN, células NK, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T $\alpha\beta$ (CD4+, CD8+) (62).

MECANISMOS MICOBACTERIANOS INVOLUCRADOS EN LA PERSISTENCIA Y LA LATENCIA

Hasta aquí se ha analizado una parte de la respuesta inmunitaria en el control de la infección por *M. tuberculosis*; sin embargo, de todo lo descrito anteriormente se confirma que la patogenicidad de las micobacterias es multifactorial y depende de los siguientes factores: capacidad de colonizar las superficies mucosas, penetración a la célula huésped, multiplicación en los tejidos del hospedador, resistencia, daño a los tejidos e interferencia con los mecanismos de defensa del hospedador (63). En relación con este último aspecto, es importante

mencionar los mecanismos que utiliza *M. tuberculosis* como estrategia para poder escapar de los mecanismos inmunológicos y sobrevivir en las células del hospedador.

La cápsula de las micobacterias patógenas influye notablemente en la resistencia pasiva a los mecanismos de defensa del huésped. A través de la microscopía electrónica, en células infectadas, se ha observado que la cápsula, vista como una zona electrotransparente, separa a las micobacterias del contenido fagolisosomal, potencialmente tóxico. Se presume que el contenido lipídico de la cápsula impide, por una parte, la degradación de la bacteria por las enzimas del huésped y por otra, debido a su impermeabilidad, impide el contacto de las enzimas con las estructuras bacterianas más fáciles de degradar. Además, en la cápsula existen sustancias como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y el sistema thioredoxina, que son capaces de inactivar radicales libres de oxígeno y otras sustancias que podrían atravesar la cápsula de la micobacteria (63, 64).

Componentes capsulares de la micobacteria poseen actividad inmunomoduladora. La linfoproliferación puede ser inhibida en forma no específica por glucolípidos fenólicos y el fosfatidil inositol es capaz de inhibir la proliferación de monocitos inducida por los antígenos de las micobacterias. La acción de estas sustancias trae como consecuencia un cambio en la producción de citocinas y la no activación de los MA, por lo tanto se inhiben los principales mecanismos bactericidas. El sulfátido SL-I y componentes del complejo antigénico85, específicamente las proteínas de 30-31 kDa inducen la secreción de TNF- α por los monocitos, que puede explicar parte de las manifestaciones de la patología como la formación de granulomas, fiebre y caquexia. También estimulan la secreción de IL-1 β que ocasiona el aumento de cortisol tisular, aumento de la producción de IL-10 y disfun-

ción de los MA (63, 64). Entre las sustancias tóxicas aisladas de cepas virulentas de *M. tuberculosis*, la más estudiada es el Factor Cordón o Trehalosa 6,6'-dimicolato, que forma parte de la cápsula. Esta sustancia permite que los bacilos se unan en forma paralela, compacta, formando cordones serpenteantes en los medios de cultivo. En los tejidos vivos, esta sustancia actúa sobre las mitocondrias inhibiendo la respiración y la fosforilación oxidativa, tiene actividad granulomagénica e inhibe la migración de leucocitos polimorfonucleares. Debido a que la trehalosa 6,6'-dimicolato se encuentra en las capas más profundas de la cápsula, su actividad tóxica solo la podría ejercer una vez que parte de las micobacterias infectantes hallan sido destruidas por el sistema inmune. La actividad de esta sustancia es potenciada por los sulfátidos constituyentes de la pared celular (63).

Las micobacterias patógenas son capaces de inhibir la fusión de los fagosomas y lisosomas. El fenómeno está asociado a la liberación bacteriana de derivados sulfatados a partir de una glicoproteína de su pared (trehalosa 2-sulfato), que detiene la maduración del lisosoma en el estadio de endosoma temprano. También la retención de la proteína de cubierta que contiene aspartato y triptofano (TACO) en el fagosoma previene la fusión con los lisosomas maduros (65). En caso de que ocurra la unión del fagosoma y el lisosoma, las micobacterias liberan grandes cantidades de amonio y alcalinizan el contenido intralisosomal, inactivando muchas enzimas (2, 19, 66, 68). La exportación de lípidos desde el interior de la micobacteria hacia la pared celular juega un papel importante en la evasión a la respuesta inmune de los macrófagos. Recientemente se ha identificado que una mutación en el gen *mmpL 7*, es responsable del transporte de ticocecol dimicoserosato (PDIM) hacia el exterior de la pared del bacilo, o mutaciones de genes fundamentales para la

síntesis de este lípido, impiden el crecimiento y persistencia de las micobacteria en tejido pulmonar (69).

El daño causado por el bacilo tuberculoso al tejido del huésped resulta de la combinación del efecto de sustancias tóxicas y de una respuesta inmune inadecuada. La micobacteria induce una disminución de las moléculas MHC II para prevenir la presentación de Ags para poder persistir dentro de su nicho (70). La micobacteria también induce la apoptosis de linfocitos T $\gamma\delta$ (65).

La micobacteria tiene un requerimiento obligado de Fe para sobrevivir, mientras que los MA requieren de hierro (Fe^{3+}) como cofactor en la inducción de mecanismos bactericidas, lo cual establece una competencia entre la célula del hospedador y *M. tuberculosis* por la adquisición de esta molécula esencial. La célula adquiere el Fe a través del receptor transferrina (TfR) que captura el Fe extracelular y lo internaliza unido a la transferrina y lactoferrina, después este complejo se dirige al compartimiento donde se reciclan los endosomas tempranos y las condiciones de pH facilitan la liberación de Fe de la transferrina. Existen algunas estrategias que *M. tuberculosis* ha desarrollado para tener acceso a esta fuente de Fe: a) el fagosoma micobacteriano está restringido en su maduración y permanece en la vía de reciclaje endosomal de manera que la micobacteria tiene libre acceso al TfR con el Fe unido a la transferrina. b) la micobacteria tiene moléculas especializadas que se unen al Fe denominadas sideróforos que tienen alta afinidad por el Fe intracelular, y lo transfieren a moléculas micobacterianas denominadas micobactinas, que son factores quelantes de Fe y que compiten con la ferritina y transferrina por captarlo; éstas se localizan en la pared celular de la micobacteria (17). Estudios *in vitro* utilizando galio que interfiere con el metabolismo del Fe adquirido por *M. tuberculosis*, han mostrado que los MA humanos

infectados y tratados con galio causan la muerte de la micobacteria (71).

Existen otros mecanismos de daño a los tejidos del huésped que no están bien aclarados. Entre ellos se encuentra la actividad hemolítica de contacto dependiente producida por las fosfolipasas micobacterianas y el escape de *M. tuberculosis* de los fagosomas y la subsecuente multiplicación extracelular (63).

VACUNACIÓN Y TUBERCULOSIS

La historia del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) comienza en 1908 cuando Albert Calmette y Camille Guérin iniciaron su trabajo a partir de una cepa virulenta de *Mycobacterium Boris* llamada Lait Nocard, ésta fue aislada por Nocard de una vaca con mastitis tuberculosa. Calmette y Guérin subcultivaron el organismo cada semana en un medio de papa glicerinada, medio prevalente de la época, al que añadieron bilis bovina para asegurar una mejor homogeneización del cultivo. La cepa que creció en ese medio se inyectó con regularidad en animales; para su sorpresa, la cepa perdió su virulencia luego del décimo quinto pasaje y no provocó lesiones en los conejos, cobayos y terneros en quienes se administró (72, 73).

En 1921 después de 13 años y 230 pasajes, BCG había perdido su virulencia en animales. El primer niño inmunizado con BCG en julio de 1921 fue un recién nacido cuya abuela padecía TBC. Ese mismo año, se empleó por primera vez en Francia la BCG por vía oral, con fines de vacunación. Desde entonces se han administrado más de 3.000 millones de dosis en el mundo. La BCG fue incorporada dentro del esquema de vacunación infantil del Programa de Vacunación Expandido (EPI) en 1974 (72).

La cepa original de BCG ha producido cientos de cepas "hijas" y es el progenitor de las vacunas mayormente empleadas. Las ce-

pas recientes de BCG fueron mantenidas como cultivos frescos a través de una serie de pasajes en un medio de papa-bilis o papa-Sauton. Esta repetición de subcultivos resultó en cepas de BCG que difieren marcadamente entre ellas. Características heterogéneas *in vitro* como la morfología de la colonia, la viabilidad en medios de cultivos, composición y actividad bioquímica, resistencia a drogas, inmunogenicidad en animales y humanos, y virulencia en animales, han sido encontradas entre las vacunas disponibles en la actualidad. En 1950 la Organización Mundial de la Salud (OMS) en un esfuerzo para limitar la variabilidad genética entre cepas de BCG, promulgó una serie de recomendaciones para su producción. La homogeneidad de la cepa de vacunas puede mantenerse con el uso de organismos que no son más de cuatro generaciones del primer lote de gérmenes (73, 74). En 1982 la responsabilidad para el control de calidad internacional de las vacunas de BCG fue dado al "Statens Serum Institut" en Copenhague, el cual supervisa la estandarización de BCG, distribuye gérmenes y provee entrenamiento para la producción de vacunas (73, 74).

La vacuna está contraindicada en pacientes con HIV o SIDA, recién nacidos con peso menor de dos kilogramos, pacientes inmunocomprometidos, pacientes que se encuentren durante la fase aguda de enfermedades energizantes, que presenten alguna afección cutánea grave, aquellos que estén sometidos a algún tratamiento prolongado con esteroides o drogas inmunodepresoras y enfermedades infecciosas (especialmente sarampión y varicela), embarazadas y personas con la prueba PPD positivo. Los individuos HIV positivos con ausencia de signos clínicos no son considerados una contraindicación (75). La vacuna de BCG es generalmente administrada para proteger contra la TBC; sin embargo, se ha encontrado también un rango amplio de protección contra la lepra que va desde un 20%

hasta un 80%; igualmente hay evidencias que la BCG aporta alguna protección contra la infección por *M. ulcerans* y contra enfermedades glandulares atribuibles a otras micobacterias, en particular *M. avium-intracellulare* (75).

En cuanto a la eficacia de la vacuna BCG, varias hipótesis se han propuesto para explicar la variabilidad en la eficacia de esta vacuna, una de éstas es que una infección con una micobacteria no tuberculosa confiere protección contra la TBC activa, teniendo así que una infección natural con estas micobacterias puede disminuir la susceptibilidad en el grupo no vacunado. Esto se demostró en pruebas realizadas en áreas donde las micobacterias no tuberculosas eran prevalentes, dando como resultado una baja eficacia de la vacuna. Otros sugieren que una infección previa con micobacterias puede aumentar u oponerse a la inmunidad protectora (75, 76). Dos tipos de respuestas celulares pueden ocurrir como resultado a una infección con micobacterias, el "fenómeno Koch" se desarrolla en animales cuatro a seis semanas después de la infección por *M. tuberculosis*, causando necrosis en el sitio de la prueba tuberculínica; la segunda respuesta celular, descrita como una respuesta tipo listeria, ocurre a los pocos días de la infección y se correlaciona con la aparición de macrófagos activando a linfocitos T, y no se observa necrosis posterior a la prueba de tuberculina. Se ha demostrado que diferentes especies de micobacterias son capaces de generar niveles variables de éstos dos tipos de respuesta en modelos animales, por ejemplo, la infección por *M. vaccae* o cualquiera de las micobacterias no tuberculosas que producen la respuesta tipo listeria, podrían potenciar el efecto protector de la BCG, en contraste, la infección por *M. scrofulaceum* u otras micobacterias que induzcan el "fenómeno Koch", pueden inhibir el desarrollo de la respuesta protectora inducida por la vacu-

nación con BCG, incrementando así la vulnerabilidad de padecer TBC (67, 76).

Diferencias en la potencia o inmunogenicidad de cepas individuales de la vacuna pueden determinar la variabilidad en la eficacia de ésta, así como la genética del huésped. Estudios demuestran que una dieta deficiente en proteínas moderadamente crónica, puede debilitar la habilidad de la vacuna de proteger a los conejillos de Indias en contra de la TBC. En modelos animales, la BCG protege contra la diseminación del microorganismo del foco de infección; la eficacia de la vacuna puede depender del mecanismo de patogenicidad, ya sea la reactivación endógena o la reinfección exógena. Se han reportado estudios que demuestran una disminución de la eficacia de la vacuna con la edad, hecho que se puede deber a que, a medida que el individuo envejece entra en contacto con una serie de micobacterias, lo cual podría interferir o enmascarar los efectos de la BCG; o que la vacuna es más eficaz en la protección contra la forma pulmonar de la enfermedad que contra su reactivación o reinfección (67, 76). La BCG es más efectiva contra de la TBC miliar y meningitis tuberculosa, las cuáles son el resultado de la diseminación hematogéna del organismo. La TBC pulmonar puede resultar de la reactivación de una infección latente por *M. tuberculosis*, una reinfección o la progresión de la infección primaria; estos mecanismos de patogenicidad pueden ser influenciados en menor proporción por la vacunación con BCG (67, 68, 76).

NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

Debido a la poca protección de la BCG en contra de la forma pulmonar de la TBC y debido a que es esta forma, una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, sobre todo en los países menos industrializados, es necesario encontrar

una nueva vacuna, la cual logre proteger contra la forma pulmonar de la mencionada enfermedad (73, 76).

Avances científicos recientes, como la secuenciación completa de varias especies de micobacterias, incluyendo la de *M. tuberculosis*, y *M. tuberculosis* H37Rv han aumentado significativamente la probabilidad de formular una vacuna más eficaz contra la TBC (77,78). Sin embargo, uno de los mayores retos será, el cómo evaluar una vacuna contra la forma pulmonar de la enfermedad en una población donde la BCG ha sido empleada ampliamente, donde hay una alta prevalencia de la sensibilidad no específica a la tuberculina y donde una alta proporción de adultos ha estado expuesto al bacilo de la TBC (76).

El desarrollo de nuevas vacunas ha progresado rápidamente, cientos de posibles vacunas están actualmente pasando por diferentes fases de investigación preclínica y clínica. La OMS juega un papel importante en varios aspectos de este proceso, como por ejemplo, en las áreas de identificación de los marcadores inmunes de protección, el diseño de las próximas fases de investigación y la identificación del sitio apropiado para llevarlas a cabo (76). Actualmente se estima que hay más de 268 vacunas candidatas, entre las más importantes están: vacunas recombinantes y vacunas de ADN (76).

VACUNAS RECOMBINANTES

Esfuerzos para modificar la BCG o el *M. tuberculosis* por la tecnología del ADN recombinante con el fin de producir una nueva vacuna atenuada en contra de la TBC están en progreso. Un método es expresar una variedad de antígenos heterólogos en BCG. Si se logran identificar los antígenos claves del *M. tuberculosis*, y expresarlos en BCG, esto daría una vacuna con organismos vivos atenuados más eficiente (75, 76).

Por otra parte, eliminar los genes del *M. tuberculosis* responsables de la virulencia o de su prolongada supervivencia en el interior de los macrófagos es una estrategia que está siendo empleada para producir una vacuna con *M. tuberculosis* vivos atenuados. El desarrollo de una técnica de mutagénesis para obtener recombinantes por cambios alélicos en *M. tuberculosis* ha sido recientemente desplegada, permitiendo producir *M. tuberculosis* recombinantes (75, 76). La seguridad de la BCG es una preocupación creciente, dado los niveles de infección por VIH en las personas que reciben esta vacuna. Para prevenir los potentes efectos adversos de la BCG en los individuos inmunocomprometidos, auxótrofos han sido desarrollados por la técnica explicada anteriormente. Los auxótrofos son mutantes que requieren un específico nutriente o metabolito que no es requerido por el tipo salvaje. Los resultados muestran que estas cepas son seguras en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) y demuestran la misma cantidad de protección en los ratones normales susceptibles a TBC, sugiriendo que este podría ser un método más seguro de vacunación (75, 76).

También se ha intentado obtener vacunas peptídicas efectivas, para esto, los antígenos específicos deben ser identificados, y su habilidad para inducir una inmunidad protectora debe ser confirmada. El factor más esencial, es probablemente obtener la presentación antigénica apropiada, y esto podría ocurrir más fácilmente con ciertas proteínas (76). *M. Tuberculosis* es conocido por expresar numerosas proteínas, algunas de las cuales son:

- ESAT-6
- 30/32 kDa (complejo 85)
- 38 kDa (lipoproteína)
- 19 kDa (lipoproteína)
- MPT64 (24 kDa)

- Proteínas del estrés (10 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 90 kDa).

Las proteínas de estrés 10 kDa, 30 kDa, 38 kDa y 65 kDa, fueron usadas como antígenos recombinantes, su capacidad para promover una respuesta proliferativa de células T humanas ha sido estudiada. Estos cuatro antígenos fueron similares al inducir una respuesta Th1 protectora, sugiriendo así que ninguno de ellos son inmunodominantes. Como se demostró que las células T son capaces de responder a más de un antígeno micobacteriano, un avance para desarrollar una vacuna efectiva será incorporar múltiples antígenos (76).

ESAT-6 es una proteína secretada de gran importancia. En animales de experimentación infectados con *M. tuberculosis*, tratados y re infectados, se observó que al momento de la re infección los animales desarrollaron una fuerte respuesta de células T al ESAT-6, haciendo así a esta proteína relevante como fuente de inmunidad protectora (76).

La proteína 30 kDa, también denominada antígeno 85 (Ag 85), es producida por *M. tuberculosis* en abundancia. Ha sido demostrado que proporciona inmunogenicidad en los conejillos de Indias infectados con *M. tuberculosis*. La importancia y relevancia de esta proteína se debe, probablemente, a su papel en la síntesis de la pared celular de la micobacteria. De igual manera, ha sido demostrado que cuando los MN humanos son infectados por *M. tuberculosis*, secretan el complejo 30 kDa, esto podría ser ventajoso en el desarrollo de una vacuna, puesto que la liberación de esta proteína es de suma importancia para el procesamiento intracelular (73, 76).

La MPT64 es una proteína clásica, no solo detectable en *M. tuberculosis*, sino también en algunas cepas de *M. bovis* BCG y *M. Boris*. Se ha demostrado la posibilidad de su uso como prueba diagnóstica (76). Aunque se ha demostrado que estos antígenos

nos son moléculas diana potentes en modelos animales, sigue en duda si son o no capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora en humanos.

La lipoarabinomano (LAM) es una cadena larga de poli-arabinosa cubierta con manosa, que se extiende a través de las capas de lípidos. LAM es conocida por tener muchos efectos biológicos en las células del huésped, especialmente macrófagos, esto hace posible que actúe como un factor virulento. Un enfoque diferente es intentar diseñar una vacuna de lipopolisacáridos (76).

Un nuevo abordaje en vacunas actualmente empleado en la búsqueda de un sustituto para la BCG son las vacunas de ADN. Generalmente, las vacunas de ADN incluyen el uso del ADN desnudo que codifica para el antígeno en una solución buffer o un vector viral codificando antígenos específicos. La posibilidad de usar vacunas de ADN es una alternativa comprometida, construida para codificar varios antígenos, los cuales pueden ser seleccionados para que no interfieran con las pruebas de sensibilidad cutánea (76). Esto proporcionaría al mundo una vacuna estable y sencilla de producir, la cual no interferiría con la prueba de la tuberculina. La selección del antígeno usado en las vacunas de ADN está limitada por la inmunogenicidad de la proteína. La inmunogenicidad de 2 antígenos de *M. tuberculosis* están siendo probados: la proteína de shock térmico 65 (hsp65) y el antígeno 85 (Ag85). Las proteínas del shock térmico son antígenos reconocidos en las respuestas inmunes a patógenos intracelulares, incluyendo las micobacterias. El Ag85 es un complejo proteico compuesto por 3 proteínas, Ag85A, Ag85B y Ag85C, este complejo Ag85 pertenece a un grupo de proteínas secretadas por micobacterias en procesos de división, las cuales estimulan temprana y fuertemente la respuesta celular en humanos y ratones infectados con *M. tuberculosis* (76). En un estudio que utilizó el ADN para

el Ag85 para inmunizar ratones; dos antígenos fueron empleados, el Ag85A secretado y la forma madura del Ag85A, en ambos casos la inmunización resultó en una disminución de la replicación del *M. tuberculosis* por un factor de 20 a 40, un resultado similar al obtenido en ratones vacunados con BCG. La respuesta celular y humoral inducida por la vacunación con ADN fue indicativa de una respuesta Th1, la cual se cree que es necesaria para la protección inmunológica contra *M. tuberculosis* (76).

CONCLUSIONES

La reciprocidad que se establece entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador determina el control o no de la infección. En relación con el humano, se ha establecido que tanto la respuesta innata como la adaptativa están involucradas. Después de la captura del *M. tuberculosis* por los macrófagos alveolares, puede ocurrir que la micobacteria sea destruida, en cuyo caso es la inmunidad innata la respuesta inmunitaria más importante; sin embargo, cuando la infección se establece, es la respuesta adaptativa la que conduce el control de la infección, siempre y cuando una adecuada respuesta inflamatoria local no específica se desarrolle luego que la invasión se establezca. El desarrollo de esta respuesta está regulado por un conjunto de mediadores solubles como son citocinas pro y anti inflamatorias y quimiocinas, los cuales en su mayoría son producidos por los macrófagos y las células dendríticas; con la excepción del IFN- γ que es producido principalmente por las células NK, las células $\gamma\delta$ y las células T restringidas por CD1. Esta respuesta inicial determina el establecimiento exitoso de la micobacteria, ya sea que se disemine o se contenga, esto último, limitando su crecimiento intracelular dentro de los macrófagos. Estas células fagocíticas, también juegan un rol im-

portante en la presentación antigénica y por ende en el inicio de la respuesta adaptativa o de células T. El *M. tuberculosis* a desarrollado muchas estrategias para escapar o antagonizar la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador; sin embargo, está establecido que las diferencias interindividuales observadas en el control de la infección por *M. tuberculosis* pueden ser explicadas por la eficiencia o no de la inmunidad innata que se establezca, esto especialmente mediado por la IL-12, la cual es el enlace que conllevan al desarrollo de la inmunidad adaptativa.

En la actualidad se tienen muchos conocimientos de la respuesta inmunitaria en la TBC humana; sin embargo, esta enfermedad sigue afectando a la humanidad, de allí que el control de la transmisión de *M. tuberculosis* es de extrema importancia en el control de la TBC. El diagnóstico precoz y la curación es, sin duda, la medida prioritaria por ser la única que consigue eliminar las fuentes de contagio mientras se siguen evaluando a aquellos Ags del bacilo que sean capaces de inducir una importante respuesta inmunitaria, menos limitada que la que induce la vacunación con BCG y que reduzca la posibilidad de que todo sujeto infectado sea un enfermo en potencia.

REFERENCIAS

1. Pacheco RC. Tuberculosis en adultos. En Enfermedades respiratorias agudas y crónicas, García G.M.L, Giono C.S., Pacheco C.R. Escobar G.A. y Valdespino G.JL., (ed). (INDRE), Secretaría de Salud, México, 1994, p 211-249.
2. Pacheco CR, Vázquez RV, Badillo V. Vacuna del bacilo Calmette y Guérin (BCG). En Vacunas, Ciencias y Salud, Escobar G.A. Valdespino G. JL. y Sepúlveda A.J. (ed), INDRE, Secretaría de Salud, México, 1992, p 187-198.
3. Collins HL, Kaufmann SH. The many faces of host responses to tuberculosis *Immunology* 2001; 103:1-9.
4. Snider DE, Raviglione M, Kochi A. Global burden of tuberculosis. In Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. Bloom B.R. (ed) American Society for Microbiology, USA, 1994, p 3-11.
5. Daffé M, Ettienne G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Dis* 1999; 79(3):153-169.
6. James BW, Williams A, Mash PD. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *J Appl Microbiol* 2000; 88:669-677.
7. Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Zinzer. Microbiología. (20a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 1994.
8. Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. (16ª ed.). Mexico: El Manual Moderno. 1999.
9. Knowels MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airway. *J Clin Invest* 2002; 109:571-577.
10. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J. Clin Invest* 2002; 109:693-697.
11. Freguson JS, Schelesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and pathogenesis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Dis* 2000; 80:173-184.
12. van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:294-309.
13. Ernest JD. Macrophages receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; 66:12377-12381.
14. Aderem A, Underhill D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593-623.
15. Doherty TM, Ardite M. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest*. 2004; 12:1699-1703.
16. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung *J Clin Invest* 2002; 109:699-705.
17. Wang Y, Curry HM, Zwilling BS, Lafuse WP. Mycobacteria Inhibition of IFN- γ In-

- duced HLA-DR Gene Expression by Up-Regulating Histone Deacetylation at the Promoter Region in Human THP-1 Monocytic Cells. *J Immunol.* 2005; 9:5687-5694.
18. Schlüger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2001; 2:157-163.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129.
20. Trinchieri G. Interleukin-12: A pro-inflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:251-276.
2. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky D. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: Role in normal and pathologic immune response. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:495-521.
- Orme I. Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr Op Microbiol.* 2004; 7:58-61.
23. Casarini M, Ameglio F, Alemanno L, Zangrilli P, Mattia G, Paone A, Bisetti A, Giosue S. Cytokine levels correlate with a radiologic score in active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:143-148.
24. Taha RA, Kotsimbos TC, Song YL, Hamid Q. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1135-1139.
25. Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Investig* 1994; 93:1733-1739.
26. Bergeron A, Bonay M, Kambouchner M, Lecossier D, Riquet M, Soler P, Hance A, Tazi A. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J Immunol* 1997; 159:3034-3043.
27. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; 64:1351-1356.
28. Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol* 1999; 162:2441-2447.
29. Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile J, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Doffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinl E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D, Casanova JL. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 1998; 280:1432-1435.
30. Altare F, Lammas D, Revy P, Jouanguy E, Doffinger R, Lamhamedi S, Drysdale P, Scheel Toellner D, Girdlestone J, Darbyshire P, Wadhwa M, Dockrell, H, Salmon M, Fischer A, Durandy A, Casanova JL, Kumararatne DS. Inherited interleukin-12 deficiency in a child with bacilli Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Investig* 1998; 102:2035-2040.
31. De Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, deBoer T, Vriesman PJC, Kabel PJ, Draaisma JMT, vanDissel JT, Kroon FP, Casanova JL, Ottenhoff THM. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998; 280:1435-1438.
32. Frucht DM, Holland SM. Defective monocyte co-stimulation for IFN-gamma production in familial disseminated *Mycobacterium avium* complex infection: abnormal IL-12 regulation. *J Immunol* 1996; 157:411-416.
33. Ottenhoff THM, Kumaratne D, Casanova JL. Novel human Immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998; 19:491-494.
34. O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects and plants. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 650-657.
35. Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, Wolf

- SF, Golkar L, Yamamura M, Yogi Y. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol* 1994; 153:3639-3647.
36. Trinchieri G. Interleukin-12: a pro-inflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-276.
 37. Cooper AM, Callahan JE, Keen M, Belisle JT, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997; 186:39-45.
 38. Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, Sieburth DS, Boom WH. Interleukin-12 production by human monocytes infected with *M. tuberculosis*: Role of phagocytosis. *Infect Immun* 1996; 64:2523-2531.
 39. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufman SH. Interleukin-12 secretion by *M. tuberculosis*-infected macrophages: *Infect Immun* 1997; 65:1936-1938.
 40. Fulton SA, Cross JV, Toosi Z, Boom H. Regulation of interleukin-12 by interleukin-10, transforming growth factor- β 1 tumor necrosis factor- α , and interferon- γ in human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* H 37Ra. *J Infect Dis* 1998; 178:1105-1114.
 41. Munk ME, Mayer P, Anding P, Feldmann K, Kaufmann SH. Increased numbers of interleukin-12-producing cells in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; 64:1078-1080.
 42. Taha RA, Eleanor M, Minshal M, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tsicopoulos A, Tonnel AB, Damia R, Menzeis D, Hamid QA. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1119-1123.
 43. Orme IA, Cooper AM. Cytokines/chemokines cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol today* 1999; 20:307-312.
 44. Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. Human alveolar T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T Cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* 2000; 159:290-297.
 45. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120:213-23.
 46. Kaufmann SHE. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:50-56.
 47. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Uszynsky S, Melián A, Bodgan C, Porcelli A, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282:121-125.
 48. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular response to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749-795.
 49. Sodhi A, Gong J, Silva C, Quian D, Barnes P. Clinical correlates of interferon- γ production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997; 25:617-620.
 50. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich E, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; 66:176-180.
 51. Dupuis S, Doffinger R, Picar C, Fieschi C, Altare F, Jouanguy E, Abel L, Casanova LJ. Human interferon γ mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol Rev* 2000; 178:129-137.
 52. Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Paller Altare F, Casanova LJ. IL-12 and IFN- γ host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:346-351.
 53. Nicholson S, Bonecini-Almeida G, Lapa JR, Nathan C, Xie Q, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Gen J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho J.L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996; 183:2293-2302.
 - 54.

- Sadek M, Sada E, Toosi Z, Schwander S, Rieh E. Chemokines induced by infections of mononuclear phagocytes with Mycobacteria and present in lung Alveoli during active pulmonary tuberculosis, *Am Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:513-521.
55. Wickremasinghe MI, Lynette HT, Friedland JS. Pulmonary epithelial cells are source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: Essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kB-dependent network *J Immunol* 1999; 163:3936-3947.
56. Bermudez L, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within Type II alveolar cells. *Infect Immun* 1996; 64:1400-1406.
57. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Bonneville M, Peyrat MA, Sireci G, Salemo A. $\gamma 9/\delta 2$ T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 2000; 30:1512-1519.
58. Li B, Rossman MD, Imir T, Oner-Eyuboglu F, Lee ChW, Biancaniello R, Carding SR. Disease-specific changes in $\gamma \delta$ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 1996; 157:4222-4229.
59. Li. B, Bassiri H, Rossman MD, Kramer P, Oner Eyuboglu F, Torres M, Sada E, Imir T, Carding SR. Involvement of the Fas/Fas Ligand pathway in activation-induced cell death of Mycobacteria-reactive human $\gamma \delta$ T cells: A mechanism for the loss of $\gamma \delta$ T cell in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 1998; 161:1558-1567.
60. Manfredi A, Healtai S, Rovera P, Rovere P, Sciorati C, Paolucci C, Galati G, Rugarli C, Vaiani R, Clementi E, Ferrarini M. *Mycobacterium tuberculosis* exploits the CD95/CD95 ligand system of $\gamma \delta$ T cell to cause apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; 28:1798-1806.
61. Sciorati C, Rovere P, Ferrarini M, Paolucci C, Heltai S, Vaiani R, Clementi E, Manfredi A. Generation of nitric oxide by the inducible nitric oxide synthase protects $\gamma \delta$ T cells from *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis. *J Immunol* 1999; 163:1570-1576.
62. Chan J, Kaufman SH. Immune mechanism of protection. In *Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control*. Bloom B.R. (ed), American Society for Microbiology, USA, 1994, p 389-415.
63. Daffé M, Ettienne G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease*. 1999; 79(3):153-169.
64. Maldonado J. (Editor) La tuberculosis vuelve a ser un grave problema de salud. Iladiba [On line] Disponible en: <http://www.iladiba.com>. 1999b.
65. Keane J, Katarzyna M, Balcewicz S, Remold H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophages apoptosis. *Infect Immun* 1997; 298:298-304.
66. Stugill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russel DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263:678-681.
67. Wallis RS, Fleischmann R, Barry CE, Kaplan G. Tuberculosis research at the millennium: a report from the four international conference on the pathogenesis of mycobacterial infection, Stockholm, Sweden. *Tubercle and Lung Disease* 2000; 80(2): 109-116.
68. Ulrich T, Faufmann SHE. Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci* 2002; 7:458-469.
69. Christensen, D. Know your enemy. Genetic studies of tuberculosis. *Science News* 2000; 158(17): 270-274.
70. Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies W, Jong G, Reiner NE. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature Class II heterodimers. *J Immunol* 1998; 162:4882-4893.
71. Olakanmi O, Britigan BE, Schlesinger LS. Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. *Infect Immun* 2000; 68: 5619-5627.

- Benenson A.** (Editor). Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16ª ed., Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1997.
- 73 **The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Program.** Focus: Tuberculosis. (On-line). Disponible en: DiseaseWatch.tb@who.int 2004.
- Mandell G, Bennett J, Dolin R,** (Editores). Principles and practice of infectious diseases. 4ª ed. New York Churchill Livingstone. Vol II, 1995.
- 75 **Paul E, Fine M.** BCG: The Challenge Continues. Scand J Infect Dis 2001; 33: 243-245.
- 76 **Huebner RE.** BCG Vaccination the Control of Tuberculosis in: Tuberculosis. Edited by Barry Bloom. American Society for Microbiology, Chapter 23:263- 279, 1994.
- 77 **Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eigmeier K, Gas S, Barry C E, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Dvlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail M.A, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393:537-544.
- 78 **Smith I.** *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:463-496.