



Fundació Institut d'Investigació en Ciències  
de la Salut Germans Trias i Pujol

# **Mecanismes de Control de la Infecció Tuberculosa Latent a través de la Teràpia amb la Vacuna RUTI®**

**Olga Gil Sánchez**

**Unitat de Tuberculosi Experimental**

**Memòria de tesi presentada per obtenir el grau de Doctor en Microbiologia per la  
Universitat Autònoma de Barcelona**

**Director de tesi: Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias**



Unitat de Tuberculosi Experimental

El Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias, Investigador Principal de la Unitat de Tuberculosi Experimental, de la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol,

FA CONSTAR:

que el treball experimental i la redacció de la memòria de tesi doctoral titulada:

***Mecanismes de control de la Infecció Tuberculosa Latent a través de la Teràpia amb la Vacuna RUTI®***

han estat realitzats per Olga Gil Sánchez i considera que és apta per a la lectura i defensa pública davant d'un tribunal, per a optar al grau de Doctor en Microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que quedi constància, signa aquest document.

Badalona,                    de                    del

Dr. Pere-Joan Cardona  
Investigador Principal  
Unitat de Tuberculosi Experimental



*Per tots aquells que durant tot aquest procés han intentat fer-me creure que comprenien el que estava fent i el sacrifici que per a ells i per a mi mateixa suposava. Sense el seu recolzament, no ho hauria aconseguit mai.*



*"La veritat en ciència pot ésser definida com la hipòtesi de treball que millor s'ajusta per obrir el camí a la següent millor ajustada."*

*Konrad Lorenz*





## *Agraïments*

Una de les coses que sempre m'ha fet més por després del moment de la defensa és l'escriptura dels agraïments de la tesi. Realment, no és una por com la que és té quan es veu una peli d'en Freddy Krueger. És més una por com la que tenen les núvies el dia del casament de què tot surti bé, tothom estigui content i, el més important, que a tothom li agradi la taula de convidats en la que els has assegut.

Doncs així és com em sento ara mateix. Em sento com elles. No vull oblidar-me de ningú i no vull que ningú se senti molest si per culpa de l'Alzheimer incipient que pateixo, me n'oblido de plasmar el seu nom. No vull, perquè tots aquells que m'han ajudat són importants i m'agradaria així fer-s'ho arribar. En tots aquests anys hi ha hagut molta gent que m'ha ajudat, ja sigui ajudant-me en els experiments, en l'anàlisi, en la interpretació o, simplement, acompanyant-me a fer un *cortadillo* quan ja no podia més i necessitava un descans o volia criticar al *jefe* sense que ell em sentís, a la sala del cafè a on ell mai no hi baixava.

Primer de tot, donar les gràcies a tota la gent del servei de *micro* que amablement ens van fer un lloc als del grup i ens cedien els seus aparells, espais, materials, etc... Sempre ens van fer sentir molt integrats.

Voldria agrair la paciència de tota la gent que hi havia al passadís del davant, quan encara no estàvem a l'IGTP. Davant del passadís de *micro* hi havia la gent d'*immuno* amb els que jo vaig passar moltes hores treballant, ensenyant resultats, discutint gràfiques o, inclòs, explicant-nos acudits. Tots em van adoptar i tots em van ajudar, deixar material de laboratori i milions de coses més que pot fer un company per tu, però en especial recordo al Joan Verdaguer (santa paciència amb mi), al LAB 3 (en Jorge, la M<sup>a</sup> Carmen, la Raquel, l'Aurora i al Xavi). He escrit LAB3 en majúscules perquè és el que es mereixen.

Una mica més a la dreta hi havia la Mar i el Marco, als que també vaig molestar molt. En realitat, els dono a tots els d'allà les gràcies per escoltar-me, ajudar-me i dir-me que no molestava. Segur que els ha crescut el nas.

Una mica més enllà a la zona de pas cap a la sortida, hi havia unes persones que jo veia però no coneixia i que, gràcies al trasllat a l'IGTP, vaig tenir la sort de compartir espais

amb ells/es. Quan dic que vaig tenir la sort de compartir espais amb ells/es ho dic perquè la Sònia, la Maribel, la Laura, l'Anna, l'Aïda, el Pepe i el Pedro han fet que em sentís realment a gust a la feina i que pogués presumir de bon ambient i bon rotllo laboral.

La gent de digestiu, també està molt present en molts dels records que tinc de les meves estades a *l'estabu*. Encara recordo una anècdota quan feia poc que estava a Can Ruti, un dia que buscava a l'Eli Pedrosa i com que no estava a l'estabulari la vaig trucar a un número de telèfon del Departament de Digestiu. L'Eli no hi era i una noia em va dir que estava a la NASA (que és com li diuen a la seva unitat de recerca, però jo encara no ho sabia). Imagineu-vos la cara que vaig posar. Beneïda innocència...

Durant tots aquests anys, he pogut col·laborar amb molts grups de recerca (la gent d'Archivel, del CReSA, del grup del Carlos Martín, l'equip de l'StopLatent, la gent del MycoSpain, el Gustavo Tapia (*Gus*), el Narcís Saubí de l'Hospital Clínic de Barcelona, etc...). De tots ells m'emporto el que m'han ensenyat a nivell laboral i els bons moments de treballar junts. En especial, dir que la gent del CReSA, amb els que m'hi he passat moltes hores, són un equip increïble que sempre em van fer sentir com si estigués a casa. Sempre que he tingut l'oportunitat, he felicitat al Mariano per la qualitat humana de la gent que treballa amb ell. També vull agrair-li al *Gus* el que m'ha ensenyat d'histologia i la paciència que tenia amb mi i amb la Neus. El pobre, a vegades s'atrevia a rebre'ns a mi i a la Neus juntes i així no havia d'explicar les coses dos vegades. Jo crec que s'ho passava bé amb nosaltres.

Encara recordo quan a Archivel eren quatre gats. La Isabel i el Jaume Amat, la Virgínia Arcos i el Pepe. Amb la Virgínia i la Isabel em vaig passar moltes hores rient mentre jo feia experiments amb la vacuna i elles la desenvolupaven. Encara no sabien el que se'ls hi vindria a sobre. Moltes felicitats a elles i a tots el que han entrat després. Tots han treballat molt per arribar a la Fase II d'assaigs clínics.

Arribant a la gent del meu equip, encara me'n recordo de quan vaig entrar a la UTE. Hi havia el Pere-Joan (PJ pels amics) a la galeria de *micro*. Fumava pipa mentre escrivia un article i escoltava els U2 amb els cascs posats, però jo també els sentia. Em va semblar una persona molt excèntrica i no m'equivocava. És d'aquelles persones diferents. La seva forma d'ensenyar, bàsicament era no ensenyar. Ens deixava lliures.

Jo no ho sabia però gràcies a ell vaig aprendre a espavilar-me sola. Ara que ja no estic a la UTE, he entès que m'ha anat molt bé.

També hi havia el *Gordillo*, el veterà. Només entrar al grup li vaig fer una broma davant de tothom. Ell, que és súper vergonyós, es va posar vermell però crec que li va fer molta gràcia. Al cap de pocs mesos va deixar l'equip. Va ser culpa meva?

El Jorge, el meu germanet. Li tinc un *carinyo* molt especial. Es feia l'interessant quan m'ensenyava tot el que sabia. Moltes gràcies Jorge.

I l'Evelyn que ara fa un post-doc a Ohio, *la tia*. *Yo de mayor quiero ser como ella*.

Érem quatre gats, però va ser arribar jo i la cosa es va *desmadrar*. En qüestió de dos anys va entrar a treballar amb nosaltres la Neus. Quant ens hem rigut juntes...

La Neus és una persona molt especial quan aprens a portar-la o, més ben dit, que ella et porti. Crec que mai no he rigut tant, ni he fet tant el pallaso com quan estava amb ella.

La Cris intentava fer-me madurar. D'ella m'emporto que: *Hi ha vegades a la vida, que un ha de posar-se corbata*. A la meva nova feina, he entès el que em volia dir.

La Vane i l'Encarni, súper treballadores ajudant al Jorge a l'estabulari. El tres feien la feina bruta que no es veu. Ens preparaven tot per a què anéssim com reiets a *l'estabu* a fer experiments. Ens cuidaven els animals, els tractaven, netejaven ja sabeu què, etc... Per últim, el Sergio Pinto. *El Pinto*. Pobre noi! Quina paciència! Era el meu confident i, tot i que jo també l'aguantava a ell, jo sóc molt xerraire així que el pobre m'escoltava fins que a un dels dos ens pitava el *timer* i ja no quedava temps pels seu problemes. Gràcies *Pinto*!

Per últim i segurament els més importants, agraeixo als meus pares i les meves germanes que em deien que feia una feina molt xula. Jo crec que, ben bé, encara no entenen què és, però sigui com sigui, saben que és dur i sempre m'han donat molt de suport. També, als meus avis que em feien sentir molt especial per fer el que feia. Els pobres creien i, la iaia que viu encara ho creu, que jo era molt llesta. Si sabessin quanta gent fa el doctorat. Pobres... millor que no ho sabessin perquè eren molt feliços quan fardaven de neta.

En especial, vull agrair al Julio els ànims que sempre em donava, la paciència que tenia quan arribava tard a casa o treballava els caps de setmana. Els ànims que em donava quan em posava nerviosa perquè no sabia si em donarien *La beca*. Ell sempre estava

tranquil. Sempre estava segur de què me la donarien i si no deia que ja ens arreglariem. Crec que entenia i entén lo important que era per mi. Moltes, moltíssimes gràcies Julio per haver-me ajudat tant i per aguantar els comentaris de la família o dels amics que no entenien res .

Amb tot això, espero no haver-me oblidat de ningú i si ho he fet no és per res, és culpa de l'Alzheimer.

## ***Informe sobre la unitat estructural de la memòria de tesi i la idoneïtat de la seva presentació com a compendi d'articles.***

És ben sabut que el bacil tuberculós té la capacitat de generar ITBL. Això és degut a l'habilitat que té d'escapar dels atacs del sistema immune. No es coneixen bé els mecanismes, però se sap que d'alguna manera, el sistema immune només *veu* els bacils en multiplicació activa, sent capaç de destruir-los. Hi ha una petita proporció de bacils que resten *invisibles* i que es mantenen durant molts anys al cos de l'hostatger.

Un dels dogmes més establerts en la història natural de la infecció per MTB, postulava que el bacil tuberculós persistia per la seva capacitat de romandre en forma latent al interior de les lesions tuberculoses o granulomes.

L'observació en el model murí d'ITBL de bacils tuberculosos no replicatius, drenats contínuament pels macròfags escumosos, va permetre entendre que la ITBL era un procés inflamatori crònic amb contínua generació de lesions i destrucció cel•lular. Aquestes observacions van portar a desenvolupar la Hipòtesi Dinàmica que explicaria per què la INH és el tractament estàndard de la infecció latent, tot i que tan sols és efectiva contra els bacils en creixement actiu i, per tant, no funcional en el cas de bacils encapsulats dins d'un granuloma estàtic amb bacils latents i no replicatius.

La ITBL afecta a un terç de la humanitat. La manca d'un tractament eficaç per disminuir el reservori d'ITBL fa que cada any es diagnostiquin nou milions de nous casos i que es produeixin de dos a tres milions de morts.

En el nostre grup es va desenvolupar, anteriorment a aquesta tesi, una vacuna terapèutica contra la infecció tuberculosa latent en humans. En publicacions anteriors, ja s'havia demostrat la seva eficàcia terapèutica en el model experimental de ratolí en fase crònica de la infecció i s'havia començat a estudiar el mecanisme d'acció de la vacuna en aquest model. Mancava continuar treballant en l'estudi dels mecanismes d'acció de la vacuna, així com avaluar la seva eficàcia terapèutica en models animals evolutivament més propers als humans i més semblants a nosaltres en quant a la immunologia i/o fisiologia.

Aquesta tesi doctoral que es presenta per compendi d'articles, es basa en tres publicacions:

- ✚ *Enhanced gamma interferon responses of mouse spleen cells following immunotherapy for tuberculosis relapse. Clinical Vaccine Immunology. 2008 Novembre; Vol.15, Num 11, p. 1742–1744*
- ✚ *Effectiveness and safety of a treatment regimen based on isoniazid plus vaccination with Mycobacterium tuberculosis cells' fragments: field-study with naturally Mycobacterium caprae-infected goats. Scandinavian Journal of Immunology. 2009 Març; Vol. 69, Num 6, p. 500-507*
- ✚ *Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. PlosOne. 2010 Abril; Vol. 4, Num 4*

Aquests treballs es van dur a terme per tal d'ampliar els nostres coneixements sobre els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI® en model murí i continuar amb els estudis pre-clínic d'eficàcia en altres models experimentals de major volum. Per a dur a terme l'avaluació de l'eficàcia de la vacuna en altres models animals, diferents als ratolins i més semblants als humans, es va fer un treball de camp utilitzant un ramat de cabres naturalment infectades per bacteries del gènere *Mycobacterium* i un altre en *minipigs spf* infectats experimentalment.

Donades les limitacions de l'estudi immunopatològic de la ITBL en el model murí es va desenvolupar un model experimental d'ITBL en *minipigs*, que no només va permetre l'estudi de l'eficàcia terapèutica de la vacuna, sinó que també va permetre fer el seguiment immunològic de la infecció, així com l'evolució de la infecció a nivell histològic, en un model molt semblant a l'humà.

Cada un d'aquests estudis amb els diferents models animals, ha permès avançar una mica més en el coneixement de la vacuna. Cal remarcar que, en aquesta tesi doctoral, s'ha desenvolupat un nou model experimental de tuberculosi latent en *minipigs spf*, que serviria d'eina d'estudi de diferents estratègies terapèutiques contra la ITBL.

Principals conclusions i aportacions de cada una de les publicacions que componen aquesta tesi doctoral

✚ ***Enhanced Gamma Interferon Responses of Mouse Spleen Cells following Immunotherapy for Tuberculosis Relapse.***

***Gil O., Vilaplana C., Guirado E., Díaz J., Cáceres N, Singh M, Cardona PJ.***

*Clinical Vaccine Immunology. 2008 Novembre;Vol.15, Num 11,p. 1742–1744*


La vacuna RUTI® en un model murí humanitzat actua fent *boosting* al sistema immune contra antígens secretats per bacils en multiplicació activa i contra antígens estructurals dels bacils latents del teixit necròtic. Per tant, col·labora en la disminució de càrrega bacteriana disminuint la reactivació de la infecció fent un *boosting* del sistema immune eliminant el període refractari després del tractament antibiòtic.

✚ ***Effectiveness and Safety of a Treatment Regimen Based on Isoniazid Plus Vaccination with Mycobacterium Tuberculosis cells' Fragments: Field-Study with Naturally Mycobacterium caprae-Infected Goats.***

***Domingo M., Gil O., Serrano E., Guirado E., Nofrarias M., Grassa M., Cáceres N., Pérez B., Vilaplana C., Cardona PJ.***

*Scandinavian Journal of Immunology. 2009 Març; Vol. 69, Num 6, p. 500-507*

L'estudi de camp usant un model animal més gran i naturalment infectat per *Mycobacterium caprae* va permetre demostrar la manca de toxicitat de la vacunació amb RUTI® i l'efectivitat terapèutica d'aquesta contra la ITBL, en aquest model, administrada després de tractament de curta duració amb INH.

 ***Granuloma Encapsulation Is a Key Factor for Containing Tuberculosis Infection in Minipigs.***

*Gil O., Díaz I., Vilaplana C., Tapia G., Díaz J., Fort M., Cáceres N., Pinto S. Caylà J. Corner L., Domingo M., Cardona P.J.*

*PlosOne. 2010 Abril; Vol. 4, Num 4*

Desenvolupament d'un model d'ITBL molt semblant, en volum i fisiologia, a l'humà. Aquest model va permetre demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la ITBL i comprendre els mecanismes de control de la infecció en humans. L'administració de la vacuna terapèutica RUTI® va resultar ser eficaç contra la ITBL i no tòxica, en aquest model.



## ***Resum***

En el nostre grup, la Unitat de Tuberculosi Experimental, es va desenvolupar una vacuna terapèutica contra la ITBL humana, anomenada RUTI®. Anteriorment, s'havia demostrat la seva eficàcia en el model experimental d'ITBL en ratolí.

L'objectiu d'aquest treball va ser l'estudi del mecanisme d'acció de la RUTI®, l'avaluació de l'eficàcia terapèutica d'aquesta contra la ITBL, així com desenvolupar un model experimental que ens permetés demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la ITBL i avaluar l'eficàcia i toxicitat de la vacuna.

Per a l'assoliment d'aquest objectiu, en aquest projecte de tesi doctoral es va treballar amb diferents models experimentals d'ITBL com ratolins, cabres i porcs.

Havent demostrat, en treballs anteriors, la seva eficàcia en models experimentals de volum petit com ratolins i cobais, en aquest treball es va realitzar estudis amb ratolí per tal d'entendre millor els mecanismes d'acció de la vacuna, en aquest model. A més, es va plantejar provar la vacuna en models grans fisiològicament més semblants als humans. Així doncs, es va realitzar un estudi de camp amb cabres latentment infectades amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia i bioseguretat de la vacunació amb RUTI®. També es va treballar en el desenvolupament d'un model experimental d'ITBL en *minipigs* que ens ajudaria a estudiar la histopatologia de la ITBL humana i serviria d'eina d'estudi de diferents estratègies terapèutiques contra aquesta. En aquest model més humanitzat, es va assajar l'eficàcia i bioseguretat de la vacunació amb RUTI®, així com també es va estudiar la fisiologia bàsica de la ITBL.



# *ÍNDEX*



<b>ÍNDEX</b> .....	1
<b>ABREVIATURES</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	13
<b>I. Història de la TB</b> .....	15
1. La TB als temps antics [19].....	17
2. Naturalesa contagiosa de la infecció [19].....	19
3. Història dels tractaments antituberculosos .....	20
4. La polèmica del tractament amb les tuberculines .....	25
4.1. Tuberculines. Després de Koch .....	27
4.2. Tuberculines arreu del món .....	27
4.3. Pautes terapèutiques.....	28
4.4. La mala fama del tractament amb tuberculines .....	31
<b>II. Gènere <i>Mycobacterium</i></b> .....	33
1. Característiques del gènere <i>Mycobacterium</i> .....	35
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	35
3. Estructura de la paret cel·lular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36
<b>III. La tuberculosi</b> .....	37
1. Introducció.....	39
2. Bacil de Koch .....	39
2.1. Postulats de Koch.....	39
3. Distribució geogràfica .....	40
4. Infecció.....	40
5. La immunitat contra la infecció tuberculosa .....	43
5.1. <i>The Vicious Cycle of TB</i> .....	43
<b>IV. Immunologia de la infecció</b> .....	45
1. La immunitat innata. Primera línia de defensa.....	47
2. Transició entre controlar o no la infecció.....	49
3. La immunitat adaptativa. Establiment i manteniment de la latència .....	49
3.1. Cèl·lules implicades en aquesta resposta.....	50
4. TB activa vs TB latent. Visió immunològica.....	51
5. El <i>Vicious cycle</i> . Visió immunològica .....	53
6. De la latència a la TB. Risc de reactivació.....	55
<b>V. ITBL</b> .....	57
1. Problema de salut pública.....	59
2. Prova de la tuberculina .....	59
3. <i>TIGRAs</i> .....	59
4. Evidències clíniques de la ITBL .....	60
5. Probabilitat de reactivació de la ITBL .....	60
6. Experiments in vitro per a determinar la naturalesa del bacil latent .....	60
7. Models experimentals. Latència.....	61
8. Hipòtesi Dinàmica de la ITBL .....	63
8.1. Teoria clàssica de la ITBL .....	63
8.2. Teoria Dinàmica de la ITBL.....	64
8.3. Èxit del tractament de la ITBL amb INH.....	66
8.4. Evidències que recolzen la Hipòtesi Dinàmica.....	67
<b>VI. L'efecte tòxic del tractament amb tuberculines</b> .....	69
1. Fenomen de Koch.....	71
<b>VII. Tractament de la TB</b> .....	73
1. Tractament actual de la TB .....	75

1.1. Pautes terapèutiques.....	75
2. Tractament actual de la ITBL.....	76
<b>VIII. Vacunes.....</b>	<b>77</b>
1. Introducció.....	79
2. BCG. La vacuna actual.....	80
2.1. Història de la BCG.....	80
2.2. Punts febles de la vacunació amb BCG.....	82
2.3. Punts forts de la vacunació amb BCG.....	82
2.4. Les diferents soques de la BCG.....	82
3. Actualitat i futur.....	83
4. Obstacles en el desenvolupament de vacunes. La immunologia.....	83
5. Obstacles en el desenvolupament de vacunes. Models animals.....	83
6. Biomarcadors.....	85
6.1. Correlació amb protecció.....	85
6.2. Biomarcadors en TB.....	85
6.3. Avaluació de l'eficiència protectora de les noves vacunes.....	85
7. Estratègies actuals.....	86
8. Vacunes proteiques: Proteïnes recombinants / Bactèries mortes i/o fragmentades.....	87
8.1. Bacil en multiplicació activa vs bacil latent.....	88
<b>IX. La RUTI®.....</b>	<b>91</b>
1. Escurçament del tractament de la ITBL.....	93
2. Desenvolupament de la RUTI®.....	93
2.1. Bacils no replicatius.....	93
2.2. El cicle de la ITBL.....	94
2.3. La immunitat cel·lular i durada del tractament amb INH.....	95
3. Origen de la vacuna RUTI®.....	96
4. Escurçament del tractament quimioteràpic. Vacunació amb RUTI®..	96
5. Per què cal tractament antibiòtic previ a la vacunació?.....	96
6. Què fa exactament la RUTI®?.....	97
6.1. Esquema del mecanisme d'acció.....	98
7. Estudis pre-clínic.....	98
7.1. Avaluació de l'efectivitat i toxicitat de la RUTI® en model murí i cobai.....	98
7.2. Teoria dels volums.....	99
7.2.1... Evolució de la tuberculosi en el context de dany-resposta.....	100
8. Immunitat generada per la RUTI®.....	101
9. Futur.....	101
10. Avaluació de la toxicitat de la RUTI® i la immunitat generada en individus sans en humans (Fase I).....	102
10.1. Immunitat.....	103
10.2. La tuberculina del segle XXI.....	103
<b>X. Models animals.....</b>	<b>105</b>
1. A tenir en compte.....	107
2. Models animals en TB.....	107
3. Els clàssics.....	108
3.1. Model murí.....	108
3.2. Conill porquí.....	109

3.3. Conills.....	110
4. Altres models.....	110
4.1. Macac.....	110
4.2. Vaques.....	111
4.3. <i>Zebrafish</i> .....	112
5. El model experimental correcte.....	113
<b>HIPÒTESIS I OBJECTIUS</b> .....	115
1. Hipòtesis.....	117
2. Objectius.....	119
<b>RESULTATS</b> .....	121
<b>I. Avaluar els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI® en el model murí d'ITBL infectat intraperitonealment, com a complement de la quimioteràpia.</b> .....	123
1. Experiment.....	126
2. Determinació de la càrrega bacteriana en melsa.....	127
3. Determinació de la secreció d'IFN- $\gamma$ induïda per la vacunació amb RUTI®.....	128
<b>II. Valorar l'eficàcia terapèutica de la RUTI® després d'un tractament antibiòtic de curta duració (1 mes) en cabres naturalment infectades i amb un baix grau d'afectació patològica.</b> .....	131
1. Experiment.....	134
2. Disseny de l'experiment.....	134
3. Estudi de la correlació entre la resposta a ESAT-6 i el grau d'afectació patològica (n(20-1)=19).....	135
4. Resultats de l'estudi de correlació.....	138
5. Estudi de l'eficàcia de la vacunació amb RUTI® (n=42).....	139
6. Resultats de l'estudi d'eficàcia.....	141
7. Estudi de la bioseguretat de la vacunació amb RUTI® (n=10).....	144
8. Resultats de l'estudi de bioseguretat.....	145
<b>III. Desenvolupar un model experimental d'ITBL en <i>minipigs spf</i> que permeti estudiar la immunopatologia de la infecció tuberculosa humana i demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la latència. Aquest model hauria de servir d'eina per a avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de futurs candidats a vacuna o tractament contra la ITBL, a més de servir per avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de la RUTI®.</b> .....	147
1. Experiment.....	150
2. Estudi preliminar. Ruta d'infecció transtoràcica vs intratraquial... ..	152
3. Evolució de la infecció. Estudi microbiològic i resposta immunològica.....	153
3.1. Resultats de la determinació de la càrrega bacteriana.....	153
3.2. Resultats dels estudis immunològics.....	155
3.2.1.. Secreció d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 i IL-12 en resposta ESAT-6 i PPD per ELISA.....	155
3.2.2.Avaluació de les Unitats Formadores d'Spots en resposta a PPD, ESAT-6, Ag 85B, Ag 16 kDa o BCG per ELISPOT.....	156
3.2.3.Anticossos específics contra PPD RT-49.....	157
4. Resultats dels estudis histològics.....	158
4.1. Avaluació macroscòpica del número de lesions a pulmó i del tamany d'aquestes ( <i>slicing</i> ). Evolució de les lesions a nivell macroscòpic i àrea afectada.....	158

4.2. Avaluació microscòpica.....	163
4.3. Dinàmica de formació de granulomes .....	167
4.4. Cinètica de la disseminació.....	168
4.5. Encapsulament de les lesions.....	169
5. Benestar animal i bioseguretat de les teràpies testades .....	172
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	175
<b>I. Avaluar els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI® en el model murí d'ITBL infectat intraperitonealment, com a complement de la quimioteràpia</b> .....	177
Conclusions.....	184
<b>II. Valorar l'eficàcia terapèutica de la RUTI® després d'un tractament antibiòtic de curta duració (1 mes) en cabres naturalment infectades i amb un baix grau d'afectació patològica</b> .....	185
Conclusions.....	191
<b>III. Desenvolupar un model experimental d'ITBL en <i>minipigs spf</i> que permeti estudiar la immunopatologia de la infecció tuberculosa humana i demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la latència. Aquest model hauria de servir d'eina per a avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de futurs candidats a vacuna o tractament contra la ITBL, a més de servir per avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de la RUTI®</b> .....	193
Conclusions.....	205
<b>CONCLUSIONS GENERALS</b> .....	207
Conclusions generals .....	209
<b>REFERÈNCIES</b> .....	211
<b>ARTICLES ANNEXATS</b> .....	225



## ***ABREVIATURES***



*Abreviatures*

<b>aC</b>	<i>Abans de Crist</i>
<b>Ag</b>	<i>Antigen</i>
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>BAL</b>	<i>Bronchoalveolar lavage</i>
<b>BCG</b>	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CFP-10</b>	<i>10 kDa Culture Filtrate Protein</i>
<b>CFPs</b>	<i>Culture Filtrate Proteins</i>
<b>CreSA</b>	<i>Centre de Recerca en Sanitat Animal</i>
<b>CT</b>	<i>Control</i>
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
<b>DNA</b>	<i>Àcid desoxirribonucleïc</i>
<b>DO</b>	<i>Densitat Òptica</i>
<b>DTH</b>	<i>Delayed-type hypersensitivity</i>
<b>DVR-spiligotyping</b>	<i>Direct Variable Repeat Spacer Oligonucleotide Typing</i>
<b>EDO</b>	<i>Enfermedad de Declaración Obligatoria</i>
<b>EEUU</b>	<i>Estats Units d'Amèrica</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>ELISPOT</b>	<i>Interferon-Gamma Enzyme-Linked Immunospot</i>
<b>ESAT-6</b>	<i>6 kDa Early Secretory Antigenic Target</i>
<b>ETH</b>	<i>Etambutol</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FMtbC</b>	<i>Fragmented M. tuberculosis Cells</i>
<b>foxP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>

*Abreviatures*

<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>Hsp</b>	<i>Heat shock protein</i>
<b>I+D</b>	Investigació & Desenvolupament
<b>IFN</b>	Interferó
<b>Irgm1</b>	Immunity-related GTPase family M member 1
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INH</b>	Isoniazida
<b>iNOS</b>	Òxid Nítric Sintasa induïble
<b>IRN</b>	Intermediaris Reactius de Nitrogen
<b>IRO</b>	Intermediaris Reactius d'Oxigen
<b>ITBL</b>	Infecció Tuberculosa Latent
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>KO</b>	<i>Knock out</i>
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanà
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>MDR</b>	<i>Multi-drug resistant</i>
<b>MET</b>	Metronidazol
<b>MPL</b>	<i>Monophosphoryl lipid</i>
<b>mRNA</b>	Àcid ribonucèic missatger
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NO</b>	Òxid Nítric
<b>NOS</b>	Òxid Nítric Sintasa
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>PBMCs</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

*Abreviatures*

<b>PD-1</b>	<i>Programmed Death 1</i>
<b>PMNs</b>	Polimorfonuclears
<b>PPD</b>	<i>Protein Purified Derivates</i>
<b>PZA</b>	Pirazinamida
<b>RD1</b>	<i>Region of Difference-1</i>
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>rRNA</b>	Àcid ribonucèic ribosòmic
<b>Rpf</b>	<i>Resuscitation Promoting Factor</i>
<b>RPT</b>	Rifapentina
<i>spf</i>	<i>Specific Pathogen Free</i>
<b>STR</b>	Estreptomicina
<b>T.T.</b>	Transtoràica
<b>TB</b>	Tuberculosi
<b>TDO</b>	Tractament Directament Observat
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>Th</b>	<i>T helper cells</i>
<b>TIGRAs</b>	<i>T cell Interferon-Gamma Release Assay</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like Receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>Treg</b>	Cèl·lules T reguladors
<b>TST</b>	<i>Tuberculin Skin Test</i>
<b>UFC</b>	Unitas Formadores de Col·lònies
<b>UFS</b>	Unitats Formadores d'Spots
<b>UI</b>	Unitats Internacionals
<b>UK</b>	<i>United Kingdom</i>

*Abreviatures*

<b>UT</b>	Unitats
<b>VIH</b>	Virus de la Immunodeficiència Humana
<b>VIS</b>	Virus de la Immunodeficiència dels Simis
<b>vs</b>	<i>versus</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>
<b>XDR</b>	<i>Extensively-drug resistant</i>

## *INTRODUCCIÓ*





***I. Història de la TB***



## 1. La TB als temps antics [19]

La TB és una malaltia molt antiga present a la història de la humanitat des del Neolític. Paul Bartels, en un article del 1907, va descriure la troballa d'unes restes humanes d'un adult jove del 5000 aC. amb la destrucció parcial de les vèrtebres dorsals IV i V, mantenint intactes la III i la VI. També detectà una deformitat cifòtica angular. Aquest quadre s'associà amb el mal de Pott, també anomenat TB òssia.

A la literatura assírio-babilònica es van trobar algunes referències a la TB. Per exemple, al Codi d'Hammurabi no es parlava directament de TB, però sí es feia servir el terme *febre* que podria referir-se a aquesta malaltia.

Als textos Egipcis no hi ha referències clares a la TB però, per contrapartida, es va confirmar la presència de la malaltia a aquella societat per evidències a les representacions artístiques i a les restes humanes. Al 1881, Grebart va descobrir 44 mòmies a prop de Tebes que pertanyien a sacerdots i sacerdotesses del 1000 aC. Elliot Smith i Sir Armand Ruffer van estudiar amb detall una d'aquelles mòmies el 1939, determinant que es tractava d'un home adult que es deia *Nesperehan* i que presentava cifosi angular i un abscess al múscul *psoes* dret. A partir d'aquesta troballa, es van trobar d'altres tant a Egipte com a Núbia. Es va demostrar que la TB òssia ja existia en aquella zona des del Neolític, així com també es van trobar lesions que van fer sospitar de TB pulmonar, ganglionar i intestinal a mòmies de l'antic Egipte.

Les primeres referències de TB a la Grècia Clàssica daten del 481 aC. Als texts d'Heròdot s'explica com un dels generals de l'exèrcit de Xerxes no va poder-se incorporar a la guerra contra Grècia perquè patia *tisi*. Als escrits hipocràtics com el *Tractat Sobre Malalties, Llibre I*, es parlava de la *tisi* com una de les malalties mortals de l'època. En els seus tractats es troben descripcions patogèniques de les lesions tuberculoses anomenades *phuma*.

En aquesta època encara no es parlava de la naturalesa contagiosa de la malaltia, encara que es sabia que es manifestava en forma d'esclats epidèmics i com a tractament de la *tisi* es recomanava repòs, banys i una dieta líquida.

A la medicina grega i romana es recomanaven viatges per mar, un canvi a un clima sec, repòs i una dieta saludable com a tractament de la TB.

Pràcticament no es va avançar gaire en el coneixement de la TB fins al segle XVII, època en què es creu que la incidència de TB va ser alta.

L'inici de les pràctiques d'autòpsies va permetre que es pogués relacionar els nòduls que es trobaven als pulmons amb la simptomatologia de la *tisi* que el pacient havia patit en vida. Es van descriure els símptomes relacionats amb la *tisi*, que es van incloure a l'obra *Phthisiologia* (1720) de Richard Morton (1637-1698). També va ser en aquesta època que Pierre Dessault (1675-1737) va proposar l'esput com el vehicle de contagi de la TB, però això va resultar inacceptable per la comunitat científica de llavors i es va descartar aquesta idea.

Durant el Romanticisme, la TB va ser la malaltia de moda donat l'aspecte insalubre dels malalts. En aquesta època romàntica de la *tisi*, se la considerà una malaltia de rics, joves i dones.

Cap a mitjans del segle XIX es produeix un canvi a la societat i la TB passa a ser una malaltia a amagar. D'aquella època ja es tenen estadístiques més fiables de la incidència de la TB a aquella societat i se sap que va esdevenir la principal causa de mort entre el 1850 i el 1900. Va deixar de ser considerada una malaltia de rics per passar a ser una malaltia de pobres relacionada amb les condicions de vida més miserables. Un exemple clar és que als barris més baixos de París on s'amuntegaven els obrers, la incidència era de 104 casos per 10.000 habitants. En canvi, al barri de la *Madeleine* era de 20 casos per 10.000 habitants i als Camps Elisis la incidència era de 11 casos per 10.000 habitants. L'any 1839, per primera vegada va sorgir el terme de TB per a totes les manifestacions de la *tisi* on fos present el tubercle, que era el nom que se li donava als nòduls o lesions (granulomes) degudes a la infecció.

Al segle XIX, abans del descobriment del bacil tuberculós per Robert Koch i, per tant, abans del coneixement de l'agent causal de la TB, la incidència havia començat a retrocedir. Alguns autors ho relacionaren amb un augment del nivell de vida i d'altres, amb l'aïllament dels malalts en centres sanitaris, evitant el contacte dels malalts amb els individus sans.

## **2. Naturalesa contagiosa de la infecció [19]**

Encara a principis del segle XIX hi havia molta controvèrsia sobre si la infecció tuberculosa era contagiosa o no i es van fer molts experiments per intentar demostrar la contagiositat d'aquesta malaltia.

Jean Antoine Villemin (1827-1892) va fer experiments en conills i va concloure que la TB era una malaltia inoculable i que havia de ser inclosa en el grup de malalties virulentes. Aquesta comunicació no va ser gaire ben rebuda per la comunitat científica perquè s'enfrontava amb la creença ferma de l'època de què la TB era una malaltia hereditària. Tot i així, Villemin va continuar els seus experiments i al 1868 va publicar un llibre titulat *Études sur la tuberculose: preuves rationnelles et expérimentale de sa spécificité et de son inoculabilité* on presentava els resultats dels seus experiments que una altra vegada conclouien que la TB era una enfermetat transmissible. Després d'ell es van fer molts experiments en animals que demostraven la transmissibilitat de la malaltia a partir de material contaminat obtingut de mostres humanes.

Al 1881, Robert Koch (1843-1910) va començar la seva investigació sobre l'agent causal de la TB. Va ser ell qui va descobrir les propietats peculiars de la tinció d'aquests bacils i ho va atribuir a les característiques cel·lulars d'aquests. Així ho va dir a la seva primera publicació sobre aquest tema: *Hom diria que el bacil tuberculós està envoltat per una paret especial amb propietats inhabituals i que la penetració d'un col·lorant a través d'ella, només es produeix en presència d'un àlcali, de l'anilina, o d'una substància similar*. Després de tenir un mètode de tinció que el permetés veure els bacils en teixits infectats, va concloure que l'agent causal de la TB era una bactèria. Només li faltava aïllar-la en cultiu i demostrar-ho.

Més endavant, va aconseguir fer créixer el bacil tuberculós a partir de teixit tuberculós procedent d'animals, en sèrum sanguini coagulat. Va poder observar l'aparició de col·lònies tènues al cap de dues setmanes de cultiu. Un cop aïllat l'agent causal de la TB, va inocular cobais i va veure que desenvoluparen les mateixes lesions que els animals que eren inoculats amb material tuberculós humà.

El 24 de març de l'any 1882, Robert Koch va presentar els seus resultats a la Sala de Lectures de l'Institut de Fisiologia de la Universitat de Berlín a on van ser ben acceptats per quasi tota la comunitat científica amb molt poques excepcions.

Gràcies a Paul Ehrlich en poc temps es va millorar la tinció dels bacils amb blau de metilè, afavorit per d'addició d'anilina en lloc d'un àlcali mineral. Franz Ziehl va comprovar que l'àcid fènic encara era millor que l'anilina i Friedrich Neelsen va introduir la tinció amb fucsina bàsica. Així, es va establir el mètode de tinció de Ziehl-Neelsen que encara avui en dia s'usa.

Koch, que va seguir treballant en aquesta línia d'investigació, va publicar els seus resultats al 1884 a la revista *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt*, on va publicar també els coneguts Postulats de Koch.

Aviat, les millores de les condicions higièniques, laborals, nutricionals i les millores en el diagnòstic de la TB per la introducció de la tecnologia dels raigs X descoberts per Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) van permetre la disminució de la incidència de la malaltia fins ben bé mitjans del segle XX.

### **3. Història dels tractaments antituberculosos**

Es té coneixement de les primeres accions terapèutiques antituberculosos des del 460-370 aC. D'ençà fins a l'època actual s'ha avançat molt poc en aquest sentit i ha estat en els últims anys en els que s'han aconseguit els avenços més importants.

No es té coneixement de terapèutica antituberculosa fins que Hipòcrites i l'escola d'en Kos estableixen el concepte de *tisi* (caquèxia progressiva, tos, hemoptisi, etc...) causat per la supuració d'úlceres pulmonars.

En aquella època es confiava en els recursos curatius de la pròpia natura, sobretot en les fases més inicials de la malaltia. El tractament que es recomanava era repòs absolut i una dieta sana i equilibrada. Es donava molta importància a les propietats curatives de la llet, recomanant-se la ingesta de llet de vaca, cabra o de dona.

Com a mesura activa contra la TB es practicaven sangries, cataplasmes toràcics, inhalacions de vapors amb sandàcara (resina obtinguda de les plantes cupressàcies), instil·lació de vi aigualit a través de la tràquia per provocar tos i, per tant, drenatge dels abscessos pulmonars i toracocentesi per drenar els empiemes.

Durant l'època Mitjana no es va avançar gaire en la terapèutica antituberculosa. El més important va ser la fundació dels primers hospicis-hospitals. En aquesta època es continuava recomanant la ingestió de llet barrejada amb sal i mel, com es pot

comprovar en un dels versos del *Flos sanitatis* (conjunt d'aforismes redactats en versos lleonins):

*Lac, sal miel iunge; bibat contra consumptus abunde.*

*Lac nutrit, sal traducit, lac melli lisquecit.*

*Lac si caprinum, melius tamen est asinimum.*

A l'edat Mitjana i fins a principis del segle XIX, es va començar a practicar un procediment terapèutic que es coneixia amb el nom de *cura del toc reial* i que consistia en un privilegi que tenien alguns reis on *Déu et curava*. Les primeres notícies d'aquest tipus de cura es tenen del segle XI, sent els primers Robert el Piatós a França i Eduard el Confessor a Anglaterra. El dia triat per la cura es congregaven multituds vingudes de tota Europa i es realitzava el *toc reial*. Amb el temps, es va arribar a l'especialització de diverses monarquies sent per exemple: la icterícia, l'especialitat del rei d'Hongria, la bogeria, la del rei d'Espanya, l'escròfula i l'epil·lèpsia la dels reis d'Anglaterra i França.

Els àrabs van assimilar gran part dels coneixements clàssics dels texts d'Hipòcrites, Aristòteles i Galeno. Per tant, pel tractament de la *tisi* recomanaven repòs i bona alimentació afegint la infusió ensucrada de pètals de roses com a activador de la cura.

Al Renaixement es van iniciar els primers estudis anatomopatològics però no es va avançar gaire en terapèutica. En aquesta època s'utilitzaven tota classe de plantes amb propietats balsàmiques i expectorants. Es receptaven aquests tractaments en fórmules bigarrades i de manera poc ortodoxa com el tractament amb *Pulmonarilso*, perquè la planta tenia una forma semblant a la dels pulmons sans.

La persona més notable d'aquest període va ser Jerónimo Fracastoro (1478-1553) de Verona, autor de la teoria dels *Seminaria contagiosum* que deia que la TB era una malaltia contagiosa a través dels *seminaria* (gèrmens que penetrarien a l'organisme a través de la respiració per ser posteriorment absorbits i transportats per la sang, als òrgans).

Durant els segles XVI i XVII es va usar sofre, arsènic i mercurials, així com tot tipus de plantes procedents del Nou Món tals com la quina, el té, el cacau i el tabac, però sense cap mena de resultat positiu.

Al segle XVIII, a alguns països de la ribera mediterrània (Espanya i Itàlia), es van començar a aplicar i redactar normes profilàctiques molt avançades ja que existia la creença popular de la contagiositat de la *tisi*. Aquestes normes consistien en la declaració obligatòria dels nous casos, aïllament dels malalts, crema dels objectes personals dels morts, etc...

Després no hi va haver gaires canvis en el tractament fins ben entrat el segle XIX. Va ser en aquesta època que es va demostrar que la TB era una malaltia infecto-contagiosa. Va ser gràcies a Villemin al 1865 que va demostrar la contagiositat i a Robert Koch que va poder aïllar i cultivar per primera vegada el bacil tuberculós. Encara i així, es van seguir utilitzant medicaments molt diversos i ineficaços com l'arsènic, el iode i inclòs alcohol després de la publicació de Leuder al 1864, que deia que *la tisi era menys freqüent als bevedors, que no pas als abstemis*.

Els tractaments i les recomanacions que feien els metges eren tan aberrants que s'arribava a recomanar als malalts més podents viatjar a països exòtics en busca d'una cura impossible. Inclòs, durant un temps es va posar molt de moda viatjar a Roma o Venècia perquè es deia que les emanacions pal·lúdiques d'aquestes ciutats eren molt beneficioses ja que es considerava que la malària era una malaltia antagònica de la TB.

Cap al 1860, l'alemany Hermann Brehmer va inaugurar el primer centre per cures de repòs a Göbersdorf amb la idea d'utilitzar l'aire pur de les muntanyes i també la sobrealimentació per enfortir als malalts en llocs que semblaven hotels de luxe més que hospitals. El seu deixeble, Peter Dettweiler, va fundar al 1876 un altre centre famós a Falkenstein, sent el primer en usar el nom de sanatori per a aquests centres de cura. Així, *la cura* es va estendre per Europa i Amèrica i va ser el mètode prescrit pel metge durant molt de temps.

Per altra banda, a principis del 1822 James Carson (1772-1843) va dur a terme experiments en conills demostrant que fent una incisió a la paret toràcica es produïa pneumotòrax i col·lapse pulmonar sense interferir apreciablement en l'activitat dels animals. Ell va pensar en la possibilitat de produir pneumotòrax artificial en humans, tot i ser conscient del risc que comportava. El 26 de setembre va persuadir a un col·lega cirurgià, el Sr. Henry Bickersteth, per produir un pneumotòrax en dos pacients tuberculosos, però la incisió a través de la pleura parietal no va produir pneumotòrax



degut a les adherències pleurals. Després d'aquest intent fallit, la tècnica del col·lapse pulmonar va caure en l'oblit.

Al 1888, l'italià Carlo Forlanini va practicar pneumotòrax artificial terapèutic mitjançant la punció aguda de la cavitat pleural i posterior inoculació de nitrogen, basant-se en les observacions d'Emilio Toussaint. Aquest no era partidari de practicar pneumotòrax artificial com a mesura terapèutica sobre l'efecte beneficiós de l'evolució de les lesions tuberculoses en produir-se un pneumotòrax espontani en 24 casos de *tisi*, presentat a la seva tesi doctoral per a Medical Doctor (París, 1880).

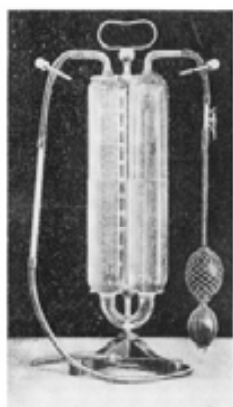


Fig 2. Forlanini's original apparatus for artificial pneumothorax. From Forlanini C. *Die Therapie der Lungentuberculose* 1908, 48-49. Reproduced by courtesy of the Wellcome Institute Library, London.

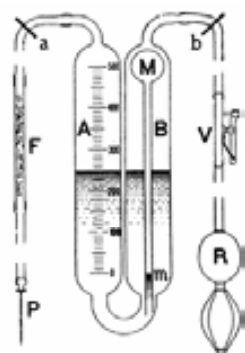


Fig 3. Diagram of Forlanini's original apparatus. A—nitrogen reservoir; B—control reservoir; M—manometer; a—B-valve; V—valve; R—double form pump; F—bar; P—manometer. Reproduced by courtesy of the Wellcome Institute Library, London (from same paper as Fig 2).



Fig 4. Forlanini administering artificial pneumothorax. From *Am Rev Tuberc* 1928; 18: 101. Reproduced by courtesy of Wellcome Institute Library, London.

### *Tècnica del pneumotòrax de Forlanini*

En aquesta mateixa època, el cirurgià nord-americà J. B. Murphy practicava la teràpia del col·lapse pulmonar usant una tècnica diferent introduint un tròcar a través d'una incisió a la cavitat toràcica [20].

Poc després es va començar a practicar la col·lapsoteràpia quirúrgica. Al 1907, Friedrich va ser el primer en practicar toracoplasties fent reseccions costals. Aquesta tècnica provocava una elevada mortalitat, així que amb els anys es van començar a fer toracoplasties parcials que eren menys agressives i donaven igual resultats. Així doncs, ja al 1930 la TB pulmonar s'havia convertit en una malaltia quirúrgica.

Al 1920, el microbiòleg A. Calmette i el seu ajudant, el veterinari C. Guerin van aconseguir una soca atenuada de *M. bovis*, la BCG, després de 13 anys de cultius continuats. Ja fa molts anys que s'usa com a vacuna profilàctica contra la infecció per MTB en humans.

Poc després del descobriment de la penicil·lina l'any 1943, Selman A. Waksman va comprovar que uns fongs del gènere *Streptomyces* (*S. griseus*) inhibien el creixement del cultius de MTB. Aquest antibiòtic es va anomenar estreptomycin i el 1946 es va començar a produir industrialment i a administrar-se massivament com a fàrmac antituberculós. No obstant, aviat es va poder comprovar que després de la quimioteràpia molts malalts tractats reactivaven degut a l'aparició de soques de MTB mutants. Al 1952, es va redescobrir la INH (sintetitzada al 1912 por Meyer y Malley), facilitant la curació de la majoria de casos de TB.

En aquesta època hi havia el problema de la llarga durada del tractament per a poder esterilitzar tots els reservoris bacil·lars. El 1965, després de l'aïllament de la RIF (derivat semisintètic de la rifamicina S, de *S. mediterrani*) per Pietro Sensi, es van poder escurçar el règims terapèutics. Va suposar una revolució terapèutica, sobretot si s'administrava conjuntament amb la PZA, medicament de primera línia que es va començar a introduir a finals de la dècada dels 70 contra poblacions intracel·lulars. A partir d'aquest moment, es van començar les pautes curtes de sis mesos de durada.

A la dècada dels 80, l'arribada de la infecció pel VIH va trencar amb els avenços que s'estaven aconseguint en la lluita contra la TB, produint un rebrot epidemiològic a nivell mundial.

L'aparició de soques de MDR i XDR indica que no s'ha de baixar la guàrdia i que s'ha de treballar en el desenvolupament de noves teràpies, nous fàrmacs i noves vacunes profilàctiques contra la TB.

#### 4. La polèmica del tractament amb les tuberculines



*Vial de old-tuberculin de Koch*

El 4 d'agost de 1890 Robert Koch va presentar els resultats que havia obtingut dels experiments duts a terme en cobais inoculats amb una substància que encara no es deia com ara la coneixem (tuberculina) i que podia prevenir el creixement del bacil tuberculós, tant *in vitro* com *in vivo*. Sembla ser que Koch considerava que els seus resultats eren preliminars però els va haver de publicar per la pressió que el govern alemany exercia sobre ell [18].

Immediatament es va veure obligat a assajar aquest producte en humans en un estudi dirigit per Ernest von Bergman (1836-1907), cirurgià de la Charité de Berlín. Aquest estudi va demostrar que la inoculació de la tuberculina en malalts de TB produïa una reacció inflamatòria important, coneguda amb el nom de Fenomen de Koch.

Més endavant, Koch va demanar al govern Prussià que l'alliberessin de la direcció de l'Institut d'Higiene, sent substituït temporalment per Von Esmarch amb l'objectiu de poder centrar-se en el desenvolupament i estudi d'aquesta substància.

Cap al 1890-1891 van començar a créixer les opinions negatives sobre el caràcter curatiu de la substància de Koch, però es va començar a valorar la seva capacitat diagnòstica. De fet, l'ajudant de Bergman, en Koehler, responsable dels casos quirúrgics de TB, va resumir l'opinió de la majoria de metges de Berlín al 1890 de la següent manera:

*És cert que el líquid de Koch permet descobrir dipòsits tuberculosos en llur primera fase de desenvolupament i casos de TB desconeguts. En casos de coincidència de diverses malalties amb símptomes similars als de la TB, és un medi segur de diagnòstic diferencial. El remei de Koch, per més que no aporti tots els beneficis esperats, sobretot pel gran públic, cal considerar-lo com un descobriment dels més importants realitzats tot al llarg de la història de la medicina.*

Al gener de 1891, Koch va enunciar que el fracàs del tractament amb la seva substància era provocat per l'administració d'aquesta en casos massa avançats de la malaltia, basant-se en el resultat comparatiu al tractar cobais sans vs cobais infectats. Un mes després, Koch i el Dr. Libbertz van consensuar que aquesta substància es diria tuberculina després d'haver estat anomenada de diverses maneres, com ara *metgia* (terme general, que s'usava al principi), *limfa de Koch*, *fluid de Koch*, *kochina* o *Bacil·linum* (al final de 1890).

Koch creia fermament en la capacitat curativa de la tuberculina i va treballar molts anys en la seva millora, però després de l'acumulació de molts fracassos va arribar a la conclusió de què no era possible obtenir la immunitat contra la TB mitjançant el bacil o productes derivats. El projecte de trobar una teràpia contra la TB es va convertir en un repte personal i va ocupar fins l'últim dels seus dies en la recerca de noves tuberculines.

Es buscava una explicació de les reaccions adverses provocades pel tractament amb tuberculina: sinèrgia entre les toxines contingudes a la tuberculina i les de l'hostatger infectat, lisi de la tuberculina en petites toxines a dins del cos del malalt, desequilibri en les antitoxines de l'hostatger per culpa de la tuberculina injectada, etc... No va ser fins al 1906 quan C. Von Pirquet va descriure el concepte d'al·lèrgia que no es va poder explicar el mecanisme d'acció de la tuberculina, que encara avui dia és el *gold standard* en el diagnòstic de TB.

#### **4.1. Tuberculines. Després de Koch**

Durant molts anys es va treballar en la millora de la formulació de la tuberculina de Koch, la *old tuberculin*, que estava basada en cultius de bacils obtinguts de mostres humanes crescuts en medi amb 5% de glicerina. El cultiu s'esterilitzava, filtrava i s'afegia un 0,5% de fenol per tornar a ser evaporat.

El mateix Koch, com ja s'ha comentat amb anterioritat, va treballar tota la seva vida en aquest projecte fins l'any que va precedir a la seva mort (1909). Ell mateix va desenvolupar noves versions de la seva tuberculina, com ara cultius crescuts i esterilitzats per calor i barrejats amb glicerina per obtenir la part insoluble del cultiu bacterià (1897) o emulsions dels bacils cultivats que consistien en cultius liofilitzats i resuspesos en una barreja 1:1 de glicerina i aigua destil·lada, per obtenir una emulsió.

Un dels grans seguidors d'en Koch va ser Sir Almrod Wright, director del Departament d'Inoculacions Terapèutiques a l'hospital St. Mary's de Londres i cap del Dr. Alexander Fleming. Aquest va usar la tècnica d'en Koch per a desenvolupar una vacuna per a tractar sèpsies estafil·locòcciques [21].

La teràpia amb tuberculines es va generalitzar a Europa i als Estats Units als anys 20 [21]. De fet, en aquella època un 30% dels metges dels Estats Units utilitzava la tuberculina com a teràpia antituberculosa. Una prova de la generalització de l'ús d'aquestes és l'aparició de diversos manuals en què es parlava de diferents tipus de tuberculines i pautes de dosificació.

#### **4.2. Tuberculines arreu del món**

Es van desenvolupar noves tuberculines per molts científics, com ara la tuberculina de Beraneck que consistia en un cultiu bacterià crescut en un medi sense albúmina, filtrat i al que s'afegia un extracte de bacils fragmentats en un 1% d'àcid fosfòric [22, 23]

A tot arreu van desenvolupar-se noves tuberculines com la de Hunter, von Ruck, Behring, i d'altres [24], com es mostra a la següent figura amb les tuberculines a disposició del metge al 1918:

*A. Tuberculinas conteniendo sólo las exotoxinas:*

- 1. T.A. (antigua tuberculina) de Koch*
- 2. Tuberculina de Klebs*
- 3. Tuberculina para uso médico del Instituto Pasteur*
- 4. Caldo filtrado de Denys*
- 5. Tuberculina de Jacob*

*B. Tuberculinas conteniendo sólo las endotoxinas:*

- 1. T.R. (neotuberculina) de Koch*
- 2. Tuberculinasin albumosa de Koch*
- 3. Endotina (Tuberculinum purum)*

*C. Tuberculinas conteniendo una mezcla de endotoxinas y exotoxinas:*

- 1. T.B.E. de Koch (emulsión bacilar)*
- 2. T.B.K. Tuberculina de Beranek*
- 3. T.C.L. Tuberculina de Calmette, de Lille*
- 4. Nueva tuberculina de Vallée*

*Figura de Cardona, 2006 [18]*

Malauradament, totes les tuberculines van fracassar i van provocar pràcticament les mateixes reaccions que la de'n Koch.

### ***4.3. Pautes terapèutiques***

Un altre tema de discussió era la dosi i la pauta terapèutica a triar.

*1. Según Koch:*

- a) Dosis inicial: 1/100 a 1/1000 de miligramo*
- b) Dos inyecciones semanales*
- c) Progresión de dosis: 1/1000; 2/1000, 8/1000, 1/100, 2/100, 4/100, 8/100*
- d) Dosis terminales: 10 a 10 mg/semana durante un tiempo bastante largo*

2. Según Wright:

- a) Dosis inicial: 1/1000 a 1/100000 de miligramo
- b) Una inyección por semana aumentando cada vez de 1/5 a 1/6 de dosis
- c) Dosis terminales: 1/100, 2/100, o 4/100 de miligramo durante muchos meses

3. Según Wolf-Eisner:

- a) Empieza por 1/100 de miligramo de tuberculina antigua, o mejor de una mezcla de esta última con la nueva
- b) Continúa la misma dosis semanalmente aumentándola poco a poco, sin pasar jamás de 3 mg.

Figura de Cardona, 2006 [18]

Es discutia sobre si era millor immunitzar amb dosis altes o baixes de tuberculina. Koch creia que la millor opció era la d'immunitzar amb dosis altes; mentre que d'altres com Erlich creien que era millor immunitzar amb dosis baixes i creixents en intervals curts (1891), com es mostra a la següent figura.

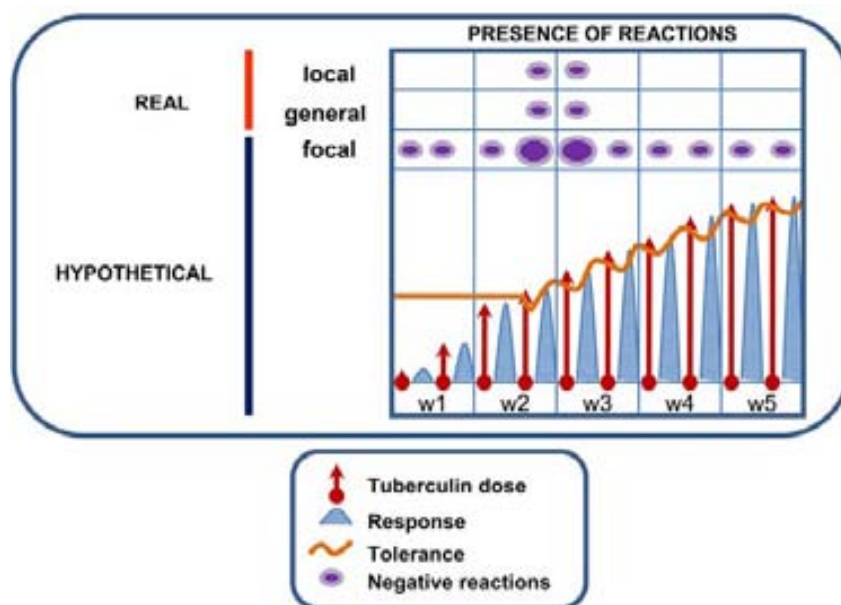


Figura de Vilaplana et al., 2010 [14]

Al 1901, Goetsch va introduir la pauta terapèutica llarga, després Petrushky va introduir la terapèutica interrompuda i Sir Almroth Wright el tractament amb dosis baixes i espaiades. A. Wright va usar la tuberculina com a vacuna terapèutica, tenint en

compte que les vacunes no sols es podien fer servir per a prevenir les infeccions, sinó que també es podien usar com a teràpia. El mecanisme era fer un *boosting* dels nivells de la *substància protectora*. Ell va descriure un empitjorament dels individus tractats després d'un temps de ser inoculats. Va anomenar a aquest fenomen *Fase Negativa* i es va atribuir a l'esgotament de la *substància protectora* [25]. Després de la *Fase Negativa*, en administrar una altra vegada tuberculina a dosi més elevada, apareixia una nova fase que ell va anomenar *Fase Positiva* en la que l'individu tornava a estar protegit.

Ell mateix va descriure que la intensitat de les dues fases i la seva llargada estava relacionat amb la dosi de tuberculina inoculada. Així doncs, si la dosi era molt baixa, la *Fase Negativa* disminuïa i podia no aparèixer la *Fase Positiva*. En canvi, si la dosi era alta, la *Fase Negativa* seria molt llarga i la *Fase Positiva* podia trigar en aparèixer o, fins i tot, no aparèixer [26].

Ell va atribuir les reaccions adverses de la tuberculina a l'acumulació de *Fases Negatives*. Així que va buscar una pauta terapèutica en la que les *Fases Negatives* fossin curtes i les *Fases Positives* llargues i intenses. La seva proposta va ser la de fer inoculacions separades per intervals llargs i a la mateixa dosi.

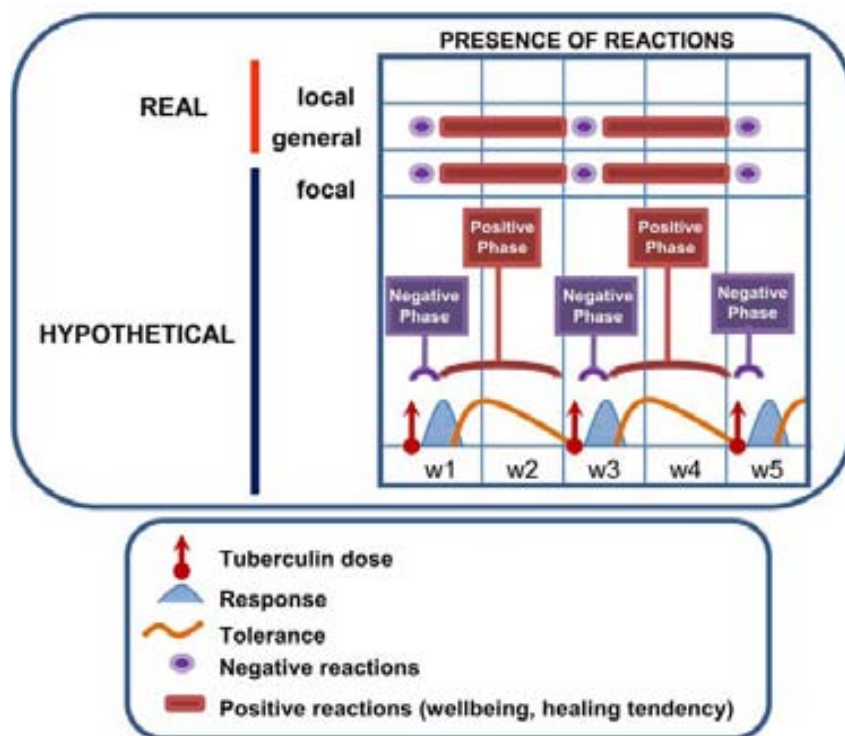


Figura de Vilaplana et al., 2010 [14]



La terapèutica de Wright es basava en la necessitat de fer un *boosting* de la immunitat per tal de prevenir la replicació dels bacils al focus infeccios i la seva disseminació [26].

Després de tants anys de feina en aquesta línia d'estudi, no es va poder implantar la tuberculina com a terapèutica antituberculosa. En canvi, es va poder establir com a eina diagnòstica de la TB després de què Von Pirquet demostrés que la reactivitat a la tuberculina indicava un contacte previ amb MTB i va introduir el concepte de *reacció tuberculínica* sent actualment el *gold standard* en el diagnòstic de la infecció tuberculosa [27].

#### ***4.4. La mala fama del tractament amb tuberculines***

Tot i la mala reputació que se li va donar al tractament amb tuberculines, hi ha estudis que demostren els bons resultats obtinguts amb aquesta teràpia. Al 1910, al Congrés de Barcelona, es van presentar dades sobre l'ús de les tuberculines del Dispensari de Maria Cristina de Madrid, que demostraven els beneficis de l'ús de la *Tuberculina Antiga de Koch* en pacients en fases inicials de TB i també en pacients en fases avançades de TB pulmonar. Un altre exemple és un article de Riviére, en què es constata un *sentiment general* a favor de l'ús de la tuberculina com a teràpia antituberculosa [28].

A Europa i als EEUU, per exemple, que és on més es va generalitzar l'ús d'aquesta teràpia, va haver una davallada important de la mortalitat per TB durant el període 1890-1950, abans de la generalització de la vacunació amb BCG i del tractament amb quimioteràpia.



## ***II. Gènere Mycobacterium***



## **1. Característiques del gènere *Mycobacterium***

Dins del gènere *Mycobacterium* hi ha nombroses espècies. En general, són bacils rectes (0,2-0,6 µm x 1-10 µm), gram positius (encara que es tenyeixen amb dificultat amb aquesta tinció), aerobis, immòbils, de creixement lent i que acostumen a necessitar de medis de cultiu especials degut als seus requeriments nutritius.

La tinció clàssica que es fa servir per a tenyir les bactèries d'aquest gènere és la de Ziehl-Neelsen, que posa de manifest una de les seves característiques diferencials que és l'àcid-alcohol resistència. Aquesta característica fa que tinguin la capacitat de resistir a la decoloració amb una solució d'àcid i alcohol una vegada tenyides amb un colorant com la fucsina. Una altra tinció que també posa de manifest aquesta característica és la tinció fluorescent d'auramina.

Les bactèries d'aquest gènere es divideixen per fissió binària i tenen una paret cel·lular gruixuda i d'estructura complexa.

El metabolisme pot variar molt entre espècies, trobant des de bactèries de creixement ràpid en medis simples; espècies com *M. leprae* que no és cultivable en medis acel·lulars; o MTB que per a ser cultivada al laboratori requereix més de 15 dies de cultiu en medis sòlids i molt rics.

Dins d'aquest gènere, els agents etiològics causants de la TB en humans són *M. tuberculosis*, *M. bovis* i *M. africanum*, que formen part del MTB complex.

*M. leprae* és el causant de la lepra i les micobactèries atípiques, que són les que no formen part del MTB complex ni del *M. leprae* complex, poden causar també malalties a l'home.

Dins del MTB complex, el principal causant de TB a l'home és MTB, encara que menys freqüentment *M. bovis* també pot produir TB a l'hostatger humà.

## **2. *Mycobacterium tuberculosis***

MTB que és l'agent causal de la TB en humans, és un bacil recte o lleugerament corb d'aspecte filamentós, aerobi estricte, àcid-alcohol resistent, no formador d'espores, no encapsulat, de creixement lent (2-3 setmanes per a formar col·lònies visibles), molt

resistent a la dessecació i més resistent a la desinfecció química que altres bacteries no esporulades. És comú la tendència a créixer en forma d'agregats trenats que es coneixen com a *cordes de serpentina*.

En quant a la seva estructura, és característica l'abundància de lípids a la paret cel·lular que li confereixen la seva qualitat d'àcid-alcohol resistència. Entre els lípids de la paret destaca la presència d'àcids micòlics i el *cord factor*, gràcies al que creix formant cordes.

### 3. Estructura de la paret cel·lular de *Mycobacterium tuberculosis*

La paret cel·lular de MTB té una estructura complexa formada per nombrosos sucres com el LAM i l'arabinogalactà i un alt contingut lipídic, predominant els àcids micòlics, que són els responsables de la forta resposta inflamatòria generada per la infecció tuberculosa. Els àcids micòlics estan units a la capa d'arabinogalactà que està unida a la capa de pèptidglicà subjacent per enllaços tipus éster de fòsfor, concretament en la subunitat d'àcid muràmic.

Segons l'estructura de la paret, es tractaria d'una bactèria Gram positiva, però l'alt contingut lipídic de la paret cel·lular la fan resistent als colorants d'aquesta tinció i, també resistent a la decoloració amb àcid-alcohol.

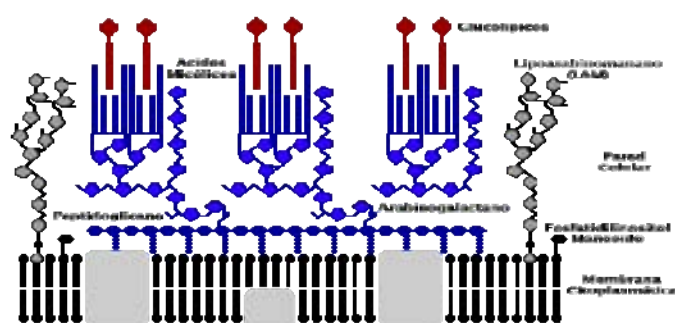


Figura de Fenton et al., 1996 [10]

### ***III. La tubercolosi***





## 1. **Introducció**

La TB es coneixia antigament amb el nom de tisi, del llatí *phthisis*. És una malaltia infecciosa causada per diverses espècies del gènere *Mycobacterium*. L'espècie que més habitualment infecta als humans és MTB. D'altres que són menys prevalents, però que també infecten als humans són *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* i *M. microtii*.

La localització principal de la TB són els pulmons, seguit dels budells, els ganglis limfàtics, la pell (lupus tuberculós), els òrgans genito-urinaris i els ossos (osteo-artritis tuberculosa, espondilitis o Mal de Pott).

## 2. **Bacil de Koch**

És el nom que se li dona també a MTB. Robert Koch va descobrir l'any 1882 l'agent causal de la TB i va aïllar el bacil tuberculós fent-lo créixer en cultiu pur. La seva idea era després poder infectar conills porquins i comprovar que aïllava, de nou, el mateix microorganisme dels animals infectats al laboratori. Gràcies a ell, es va demostrar el que ja es postulava des de feia uns anys, que la TB era una malaltia contagiosa. Després de l'aïllament de *Bacillus anthracis*, Koch va escriure els seus famosos postulats que va fer servir per a aïllar MTB i altres agents infecciosos.

### 2.1. **Postulats de Koch**

- L'agent causal ha d'estar present en tots els casos de malaltia i absent a les persones sanes.
- L'agent no pot aparèixer en una altra malaltia de manera fortuïta ni sapròfita.
- L'agent s'ha de poder aïllar del cos, en cultiu pur, a partir de les lesions causades per la malaltia.
- L'agent ha de provocar la malaltia quan és inoculat en un animal susceptible.
- L'agent ha de poder aïllar-se de nou, de les lesions produïdes als animals infectats experimentalment.

### 3. Distribució geogràfica

La distribució de la TB per la geografia mundial és un reflex de la situació socio-econòmica del món, sent els països més pobres els més afectats.

- El 65% dels nous casos es produeixen a països amb pocs recursos econòmics.
- El 30% a països en vies de desenvolupament.
- El 5% a països desenvolupats.

El 80% dels nous casos es reparteixen entre 22 països només, sent Àsia, Àfrica, Sud-Amèrica i Europa de l'est, les regions del món més afectades. Espanya és un dels països europeus amb una incidència més elevada de TB (30 casos / 100.000 habitants), sent el doble que a França i la meitat que al Marroc.

### 4. Infecció

El bacil tuberculós es transmet per l'aire i la infecció és per inhalació d'aerosols que transporten bacils. A més de la via aèria, existeixen altres rutes d'infecció per MTB com són la via digestiva (*M. bovis* i *M. avium-intracellulare*), la via urogenital, la cutaneomucosa i la via transplacentària (menys comú).

La probabilitat de transmetre la infecció depèn de diversos factors, com són:

- El número de bacils de la font d'infecció (pacients amb bacil·loscòpia positiva són els més infectius).
- Severitat i freqüència de la tos dels individus bacil·lífers.
- Volum de les secrecions.
- Estat immune dels individus exposats al focus infecciós.
- Ús de quimioteràpia (al cap de 2 setmanes de tractament, es produeix una reducció del 99% de la càrrega bacteriana i la probabilitat d'infectar-se es redueix).
- Factors ambientals com: ventilació de l'habitació a on hi ha el malalt, ús de mascaretes per part del malalt, etc...

- Exposició (proximitat al malalt i temps compartit amb el cas índex).

I els factors de risc relacionats amb una major probabilitat d'infectar-se per MTB són:

- Biològics: VIH i altres immunosuppressions, deficiències de vitamina D, factors genètics, patir alguna malaltia de base diferent de TB.
- Conductuals: tabaquisme, alcoholisme i altres toxicomanies.
- Socials: condicions de vida insalubres, pobresa, institucions tancades.
- Ambientals: silicosi, asbestosi.

La TB pot cursar amb símptomes sistèmics (febre, sudoració nocturna, anorèxia, pèrdua de pes i debilitat) i en un 80-84% dels casos, amb símptomes específics de localització pulmonar (tos de més de 2 setmanes, dolor pleural i hemoptisi) i extrapulmonar (limfàtica, pleural i òssia o articular).

Una de les característiques més importants de la infecció per MTB és la seva capacitat de desenvolupar ITBL.

Després d'infectar-se per MTB, només un 10% dels individus desenvoluparan la malaltia mentre que la resta d'individus resoldran la infecció de manera assintomàtica. Un 50% d'aquests individus desenvoluparà la malaltia durant els 2 primers anys després de la infecció i l'altre 50% al llarg de la seva vida.

Les persones que tenen un risc més elevat de desenvolupar la malaltia són:

- Les persones coinfectades pel VIH.
- Les persones amb radiografies de tòrax que facin sospitar que han passat una TB al llarg de la seva vida i mai no han rebut tractament.
- Les persones en les que es demostrï una infecció tuberculosa recent.
- Les persones immunocompromeses.
- Els nens menors de 5 anys.

Existeixen signes clínics que ens indiquen si el pacient té una TB activa o una pateix una ITBL, com es mostra a la taula d'abaix:

<b>Persones amb tuberculosi latent</b>	<b>Persones amb malaltia tuberculosa</b>
Assimptomàtiques	Tenen símptomes de TB, com: Tos productiva durant 2 setmanes o més Mal de cap Souts espesos o amb sang Debilitat i fatiga Pèrdua de pes Pèrdua de la gana Calfreds Febre Suors a la nit
No es troben malament	Es troben malament
No són contagiosos	Poden contagiar als altres
Normalment són TST+ o positius pels <i>TIGRA</i> s	Normalment són TST+ o positius pels <i>TIGRA</i> s
Placa de tòrax normal i esput negatiu	Placa de tòrax alterada i normalment són bacil·lífers
Necessiten tractament de la TB latent per a prevenir la reactivació	Tractament de la malaltia

La TB requereix del compliment d'un tractament llarg i estudi de contactes fent que sigui una malaltia de declaració obligatòria.

L'edat d'aparició de malaltia tuberculosa depèn de la situació geogràfica. En països amb una alta prevalença, afecta més a persones més joves, mentre que a països amb menor prevalença afecta a persones grans.

És predominant al sexe masculí i s'associa a factors de risc com infecció pel VIH, alcoholisme, drogoaddicció, silicosi/asbestosi, diabetis, insuficiència renal i neoplàsies.

La TB constitueix un problema important de salut pública, fent que l'any 1993 l'OMS la declarés un problema d'emergència global i que l'objectiu actual de l'OMS sigui l'eliminació de la TB com a problema de salut pública (1 cas per cada 1.000.000 d'habitants). Aquest objectiu necessita el desenvolupament de nous mètodes de diagnòstic, fàrmacs i vacunes.

## 5. La immunitat contra la infecció tuberculosa

Malgrat fa més de 100 anys que hom estudia la infecció tuberculosa, encara és la infecció bacteriana més important al món degut a l'elevada incidència i mortalitat anual.

A la majoria d'individus que són infectats per MTB el sistema immune és capaç d'aturar el patogen, tot controlant la infecció i portant-lo al desenvolupament d'una ITBL.

### 5.1. The Vicious Cycle of TB

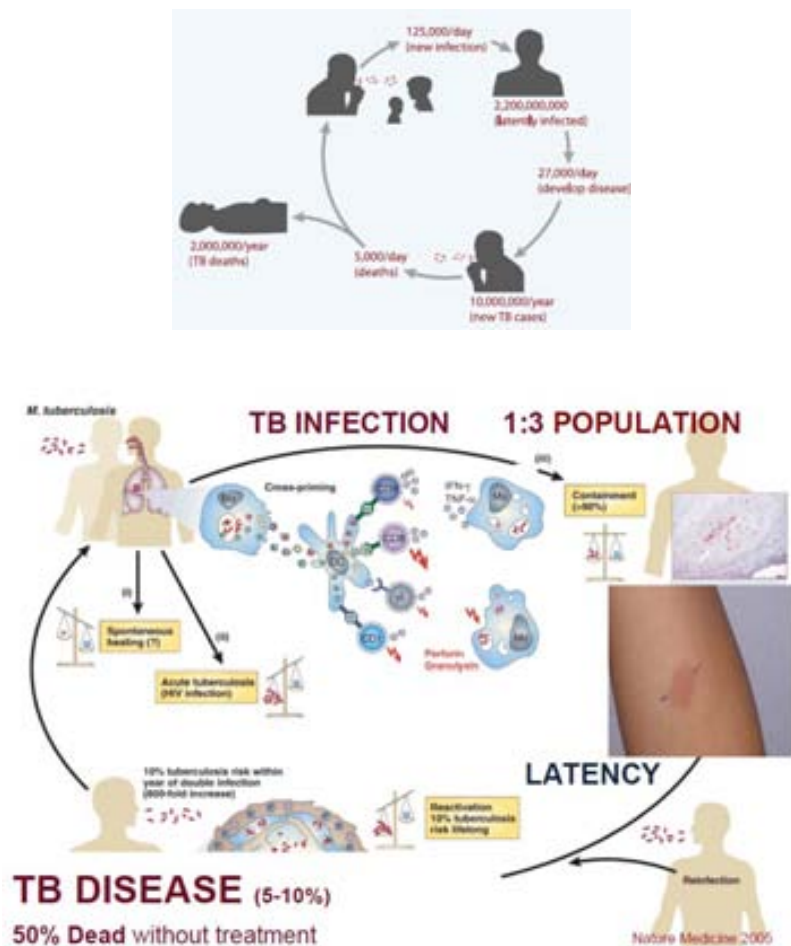


Figura de Lonnroth et al., 2008 [15]

A la figura anterior es representa els valors diaris de la infecció amb :

- Nous casos d'infecció diaris.
- Valors d'individus latentment infectats al món.
- Persones que desenvolupen TB diàriament.
- Nous casos de TB anuals.
- Morts per TB diaris i anuals.

El risc de desenvolupar TB activa varia en cas de què l'individu tingui alguna malaltia immune o infecció per VIH, augmentant el risc en aquest últim cas al 10% anual. Això demostra la importància de la immunitat adquirida per a controlar la infecció durant el període de latència.

De totes maneres, encara que gràcies a la immunitat adaptativa podem controlar el bacil tuberculós i arribar a un equilibri en la lluita immunitat-bacil, podent controlar la infecció durant la fase de latència, no és ni molt menys la primera barrera que es troba el bacil quan infecta l'hostatger. Les primeres cèl·lules amb les que es troba el bacil són les de la immunitat innata, majoritàriament macròfags, cèl·lules dendrítiques i neutròfils. De fet, els estudis de contactes revelen que un tant per cent molt baix de persones exposades al cas índex desenvolupen ITBL. Encara que és molt difícil de demostrar, això indica que hi ha persones que són resistents a la infecció i que la immunitat innata juga un paper molt important, controlant el desenvolupament de la infecció a l'inici.

#### ***IV. Immunologia de la infecció***





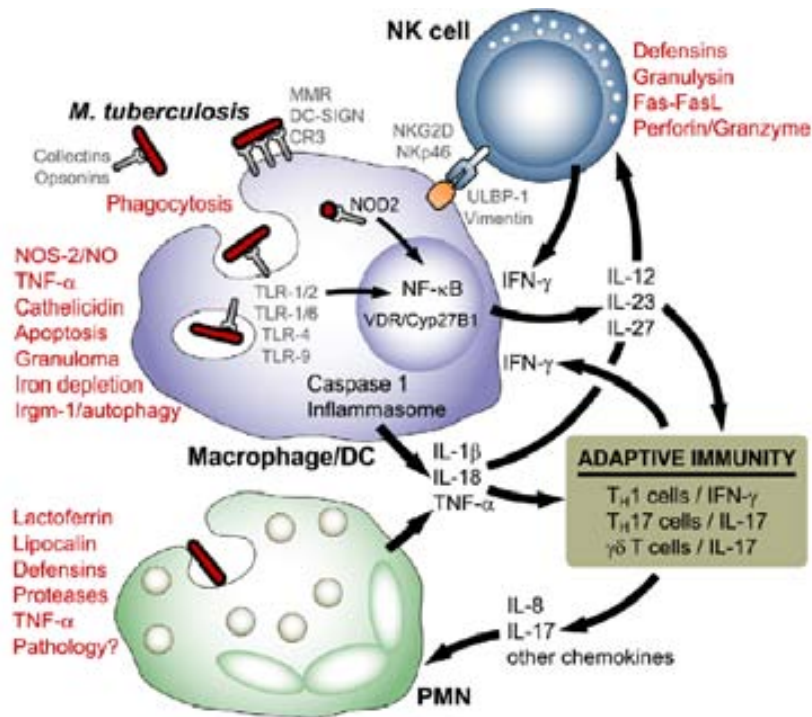
## **1. La immunitat innata. Primera línia de defensa**

La resistència de l'hostatger a MTB comença amb la immunitat innata. Després de superar diverses barreres físiques, MTB acaba arribant als pulmons, via aerosols. Un cop als pulmons, les primeres cèl·lules que troben els bacils tuberculosos són els macròfags alveolars i les cèl·lules dendrítiques tissulars.

MTB pot persistir a dins dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques gràcies a diferents mecanismes d'evasió com neutralització del pH del fagosoma, inhibició de la fusió fagosoma-lisosoma, etc... Durant la seva estada a l'interior d'aquestes cèl·lules pot envair el citosol [29] i pot ser transportat a altres zones del parènquima pulmonar, romanent dins dels macròfags infectats [17], podent sobreviure i proliferar dins d'aquestes cèl·lules.

Els TLRs són uns receptors molt importants en el reconeixement de la infecció per MTB. De fet, la interacció dels macròfags amb MTB via TLRs és molt important per a definir el perfil de citocines que es secretaran per lluitar contra la infecció. S'ha descrit que polimorfismes genètics dels TLRs s'associen amb risc més elevat d'infecció o de patir malaltia [30] [31] [32]. Els lligands dels TLRs de MTB promouen la inflamació per alliberament de quimiocines i citocines pro-inflamatòries, mol·lècules d'adhesió, etc... que atrauen a macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules PMNs, majoritàriament neutròfils, sent totes aquestes cèl·lules la primera línia de defensa contra la infecció tuberculosa.

Les micobactèries que entren als pulmons a través d'aerosols són fagocitades i els seus lligands es reconeixen via TLRs i receptors NOD2, induint la translocació del factor de transcripció nuclear NF- $\kappa$ B, que finalment porta a la secreció de citocines (IL-1 $\beta$ , IL-18 i TNF- $\alpha$ ), quimiocines i mol·lècules antimicrobianes com la catelidina.



Imatge de Korbel et al., 2008 [12]

La IL-12 i la IL-18 activen a les cèl·lules NK, induint l'activitat citotòxica contra les cèl·lules infectades amb micobactèries i la secreció d'IFN- $\gamma$ , per exemple.

L'IFN- $\gamma$  secretat activa la capacitat bactericida dels macròfags fent que expressin òxid nítric sintasa (NOS2), induint la maduració del fagosoma, l'autofàgia mediada per Irgm1, etc... A més, els macròfags activats també secretaran TNF- $\alpha$  que contribueix a la seva pròpia activació, destrucció de cèl·lules infectades i formació del granuloma [33].

Finalment, s'activa la resposta immune adaptativa, predominantment de tipus T, gràcies a citocines de la família de la IL-12 (IL-12, IL-18, IL-23 i IL-27). Les cèl·lules Th1 secreten IFN- $\gamma$  ajudant a l'activació dels macròfags infectats a destruir les bactèries fagocitades.

En molts models animals, un cop infectats, la càrrega bacteriana augmenta logarítmicament fins arribar a un *plateau*, coincidint amb l'aparició de la resposta de cèl·lules T (immunitat adaptativa). És en aquest moment, quan els granulomes es poden veure amb tincions histològiques [34].

De fet, els granulomes no són més que un focus d'acumulació de cèl·lules inflamatòries, que tenen una estructura específica en cada espècie animal. El manteniment d'aquests és un procés dinàmic en el que s'arriba a un equilibri entre el control immunològic de la infecció i la replicació de la bactèria.

## **2. Transició entre controlar o no la infecció**

Es coneixen ben poc els factors que determinen que després de la infecció per MTB es desenvolupi TB activa o es controli la infecció desenvolupant ITBL. Aquest fet és degut sobretot, a la manca de models animals apropiats. L'únic model en el que s'han pogut estudiar la infecció activa i la latent ha estat en *Cynomologus macaque* infectats amb una dosi baixa de MTB [35].

Gràcies a estudis en macacs s'ha demostrat que la probabilitat de desenvolupar malaltia depèn de la dosi [36] i de factors específics de l'hostatger [37].

En el model amb *Cynomologus macaque* es va veure que els animals que presenten una major secreció d'IFN- $\gamma$  específica per part dels PBMCs estimulats *ex vivo* eren els que després desenvolupaven TB activa [38]. Això correlaciona amb els resultats dels estudis de contactes en humans, en els que una major resposta a ESAT-6 correlaciona amb una major probabilitat de desenvolupar TB activa en els següents dos anys post-infecció [39]. L'augment en la secreció d'IFN- $\gamma$  està relacionat amb una major càrrega bacteriana. Per tant, el control inicial de la replicació bacteriana per part de la immunitat innata juga un paper molt important en l'establiment d'infecció latent enlloc de desenvolupar malaltia.

## **3. La immunitat adaptativa. Establiment i manteniment de la latència**

Després de l'aparició de la immunitat adaptativa, la càrrega bacteriana arriba a un *plateau* i comença el període d'infecció latent caracteritzat per un equilibri entre la resposta immune i la replicació bacil·lar. En aquest període, la immunitat s'activa i es suprimeix localment de manera cíclica, controlant la replicació i disseminació dels bacils. A més, les cèl·lules reguladores i citocines supressores de la inflamació com la IL-10 i el TGF- $\beta$  controlen la magnitud de la resposta immunopatològica per tal de que sigui suficient per a mantenir la latència sense que provoqui un dany tissular

desmesurat. Aquest equilibri es pot mantenir durant anys, però alteracions en l'estat immune de l'hostatger poden trencar-lo, provocant una reactivació de la infecció.

### **3.1. Cèl·lules implicades en aquesta resposta**

Les cèl·lules que es troben als granulomes són cèl·lules T, de tipus CD4 i CD8, cèl·lules B, macròfags, neutròfils, fibroblasts i cèl·lules gegants multinucleades.

Les cèl·lules T de tipus CD4 són molt importants en el control de la infecció, com s'ha pogut demostrar en el model murí, en el que s'ha vist que són importants en el control de la infecció en la fase aguda i en la fase crònica [40].

Aquestes cèl·lules són les principals secretores d'IFN- $\gamma$ , contribueixen a la producció de TNF- $\alpha$  i són importants per a la funcionalitat de les cèl·lules CD8. És per això que en pacients infectats per VIH, el risc a desenvolupar TB activa augmenta de manera directament proporcional a la disminució del comptatge de CD4 [41].

Aquest fenomen també s'ha demostrat en macacs infectats pel VIS, en els que la disminució del comptatge de CD4 està relacionat amb un escurçament del temps en què reactiven la infecció latent [42].

Pel que fa a les cèl·lules T CD8, encara que inicialment hi havia certa controvèrsia en referència al paper d'aquestes cèl·lules en la lluita contra la infecció tuberculosa, alguns estudis en el model murí han demostrat la seva importància. Per exemple, en ratolins amb una càrrega bacteriana baixa post-tractament antibiòtic, la depleció de les cèl·lules CD8 va resultar en una reconstitució de la infecció [43].

Encara que al principi només es coneixia la seva capacitat citotòxica, es va demostrar que aquestes cèl·lules també secreten IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , igual que fan les CD4 però en menys quantitat [44]. La seva funció específica és la capacitat citotòxica contra les cèl·lules infectades, secretant perforina que forma un por a la membrana de la cèl·lula infectada i alliberen proteïnes com, per exemple, el *granzym*, que indueixen l'apoptosi de la cèl·lula diana. En humans, també produeixen granulisina, que té una activitat bactericida directa [45] i també són citotòxiques i produeixen IFN- $\gamma$  [46].

Sigui com sigui, l'IFN- $\gamma$  que secreten les cèl·lules T i la citotoxicitat de les cèl·lules CD8 tenen una diana clara, els macròfags infectats.

L'activació dels macròfags per l'IFN- $\gamma$  secretat, porta a la potenciació de la seva capacitat bactericida. En ratolins, s'ha vist que l'activació dels macròfags per aquesta via porta a l'activació de la NOS, generant-se intermediaris reactius de nitrogen que són importants durant la fase aguda i la fase crònica de la infecció [47] [48] [49].

#### **4. TB activa vs TB latent. Visió immunològica**

Hi ha varis estudis en els que s'ha intentat estudiar la diferència entre la TB activa i la TB latent a nivell immunològic. El problema d'aquests estudis és que és molt difícil treure conclusions perquè la resposta immune és multifactorial i mai no se sap si el que s'observa és una causa o un efecte d'un factor específic, entre els molts que intervenen. S'han fet estudis usant els TIGRAs com a eina per a buscar diferències en la quantitat d'IFN- $\gamma$  secretat específicament a la infecció activa vs la infecció latent [50] [51] [52] [53]. En general, s'associa una major secreció d'IFN- $\gamma$  als casos de TB activa comparat amb els individus latentment infectats [52] [53] [54]. De totes maneres, aquesta dada té un valor predictiu baix perquè hi ha molta variabilitat en el resultat individual i també es veu afectat per la prevalença de la malaltia a cada àrea geogràfica [55].

En estudis de contactes també es va veure que resultats més alts de secreció d'IFN- $\gamma$  en resposta a ESAT-6 o CFP-10 es corresponien amb un risc més elevat de desenvolupar TB [39] [56], igual que s'ha observat en un estudi en model experimental de mico [35].

En un estudi de contactes, analitzant marcadors moleculars en sang total es va veure que els contactes amb nivells més elevats de resposta a ESAT-6 tenien nivells més elevats, també, de mRNA per TNF- $\alpha$  i Fas, semblants als casos de TB activa [57]. En un altre estudi amb individus amb TB activa, es va veure que els casos amb malaltia més severa tenien nivells més elevats de TNF- $\alpha$  i TNFR1 [58] [59].

En humans amb TB activa, s'ha vist que les cèl·lules T secretores d'IFN- $\gamma$  tenen el marcador d'esgotament (*exhaustion*) PD-1 sobreexpressat. Aquests resultats suggereixen que, possiblement, l'expressió d'aquest marcador és un mecanisme de control de la immunitat disminuint la potència d'aquesta i portant a una absència de control [60].

De totes maneres, la funció de l'expressió d'aquest marcador en cèl·lules T específiques de MTB no és clar. De fet, en estudis amb ratolins s'ha demostrat que l'expressió d'aquest marcador juga un paper molt important en el manteniment de la fase crònica de la infecció [61].

Les noves tecnologies han permès avançar en l'estudi immunològic de la TB, descobrint per exemple les cèl·lules T multifuncionals que s'anomenen així per la seva capacitat per secretar diferents citocines simultàniament. Últimament, s'està donant molt d'èmfasi a aquestes cèl·lules però el seu paper en la lluita contra la infecció encara és molt controvertit per la dificultat d'interpretar els resultats que s'obtenen. Estudis en el model murí han suggerit que l'eficàcia de les vacunes antituberculooses depèn de la presència de cèl·lules T multifuncionals [62]. Tot i així, hi ha altres estudis que contradiuen la funció protectora de les cèl·lules T multifuncionals. Per exemple, en un estudi de contactes es va veure que la freqüència de cèl·lules T CD4 multifuncionals, secretores de TNF- $\alpha$ , IL-2 i IFN- $\gamma$  era major en els casos de TB, que no pas en els contactes [63].

Realment, la complexitat de la immunitat fa difícil treure conclusions i assignar una funció positiva o negativa a un tipus de resposta. És difícil perquè la vertadera resposta depèn del context específic de cada granuloma individualment i de l'hostatger en general.

## 5. El Vicious cycle. Visió immunològica

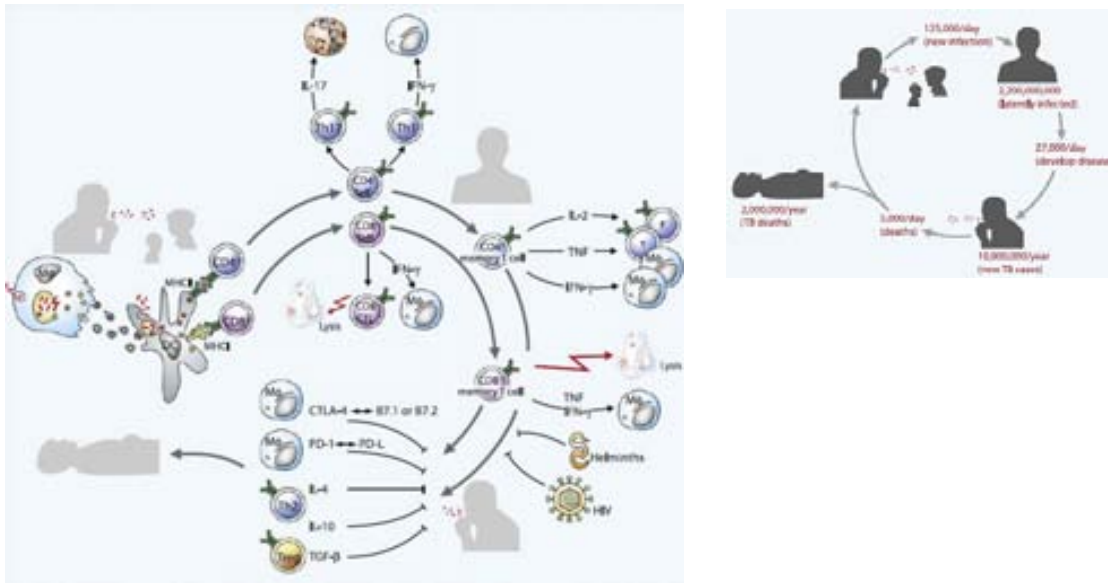


Figura de Lonnroth et al., 2008 [15]

MTB entra als pulmons per inhalació d'aerosols de 1-3mm, que contenen pocs bacils que arriben als alvèols pulmonars i són fagocitats pels macròfags alveolars, com ja s'ha explicat abans. Alguns bacils són transportats als limfonodes més propers a través de cèl·lules dendrítiques, per a presentar els antígens i activar les clones reactives de cèl·lules T. Aquestes clones de cèl·lules T CD4+ i CD8+ que s'activen i proliferen van a parènquima i són activades per les cèl·lules presentadores d'antigen (majoritàriament macròfags i cèl·lules dendrítiques).

Durant la seva estada als fagosomes, les micobactèries secreten proteïnes que són processades i presentades per mol·lècules de MHC de classe II, activant els limfòcits CD4+ del granuloma.

Pel que fa a l'activació dels limfòcits CD8+, cal presentació per mol·lècules de MHC de classe I. Per a ser presentat per aquesta via, MTB hauria de ser un patogen intracel·lular amb localització citosòlica. De fet, hi ha estudis que demostren aquesta localització de la bactèria. S'ha vist que les bactèries tuberculoses poden sortir al citosol en cèl·lules dendrítiques [29], per exemple. Una altra via de presentació per MHC de classe I, seria el mecanisme del *crosspriming* [64]. Aquest mecanisme requereix de l'apoptosi dels macròfags infectats, alliberant vesícules apoptòtiques amb

antígens tuberculosos que són fagocitades per les cèl·lules dendrítiques properes que presenten els antigen via MHC II i MHC I a les cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, respectivament [65].

Després d'activar-se les cèl·lules específiques de la resposta adaptativa, es desenvolupen diferents mecanismes immunològics, per a combatre la infecció a nivell de cada granuloma, individualment.

Les cèl·lules CD4<sup>+</sup> són polaritzades cap a una resposta Th1 o Th17. Les cèl·lules Th1 són molt importants en la protecció de la infecció tuberculosa [66]. Pel que fa al paper que juga la resposta de tipus Th17, no es té gaire clar malgrat es creu que juga un paper molt important en la immunitat protectora a l'inici de la infecció al pulmó, en humans, com ja s'ha comentat abans [67] [68] [66].

Les cèl·lules polaritzades cap a una resposta de tipus Th2 secreten, entre d'altres citocines, IL-4 i IL-23, afectant negativament la resposta protectora de tipus Th1, disminuint l'apoptosi de cèl·lules infectades mediada pel TNF- $\alpha$ , disminuint l'activitat de la iNOS i afectant a la capacitat d'autofàgia de bacils per part dels macròfags i la seva capacitat bactericida [69] [70] [71] [72]. El TGF- $\beta$  està relacionat, també, amb la formació de l'anell fibròtic que envolta el granuloma [73].

Per altra banda, les cèl·lules CD8<sup>+</sup>, un cop activades, contribueixen a la protecció per la seva capacitat de secretar IFN- $\gamma$  i la seva activitat citolítica contra les cèl·lules infectades, secretant perforina i granulisina, com ja s'ha explicat abans [74] [45].

Després de l'activació de la resposta immune adaptativa, el 90% dels individus infectats controlaran la infecció i desenvoluparan una TB latent, apareixent les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de memòria que són multifuncionals, secretores d'IL-2, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  [75] o les CD8<sup>+</sup> de memòria que també són multifuncionals i tenen la capacitat de secretar mol·lècules citolítiques, IFN- $\gamma$  i TNF-  $\alpha$ .

Durant la latència, la micobactèria s'enfronta a un context d'estrès provocat per un ambient d'hipòxia i deficiència de nutrients, fent que es transformi en latent amb un



metabolisme lent i amb baixa activitat replicativa, esdevenint poc visible pel sistema immune, com es demostra en experiments *in vitro* [76] [77] [78].

Durant aquest període també hi ha autocontrol per part del sistema immune arribant a un punt d'equilibri en el que es controla la infecció, evitant un dany tissular excessiu.

Poden haver determinats factors que trenquin l'equilibri hostatger-patogen tant important pel manteniment de la latència, com coinfeccions amb helmints, VIH, etc..., inhibició endògena per sobreexpressió d'IL-4, IL-10 i TNF- $\alpha$ , expressió de receptors inhibidors de membrana, com CTLA-4 i PD-1, fent que les cèl·lules T adquireixin un fenotip de cèl·lules exhaustes [79] [80] [81] [82] [83] [60] [84] o la supressió per part de les *Treg*, que secreten citocines supressores com IL-10 i TGF- $\beta$  [71] i expressen CD25, que és un receptor que capta IL-2 amb alta afinitat, podent ser alliberat a la circulació a on capta aquesta citocina disminuint la seva concentració, podent provocar una disminució de l'activitat de les cèl·lules T [85] [86] [87].

Això podria suposar la reactivació de la infecció latent causant malaltia i, en alguns casos, provocant la mort de l'hostatger. En aquest cas, el sistema immune falla en el seu control de la infecció i creixen els centres necròtics dels granulomes esdevenint caseosos. El fenomen de cavitació es veurà en aquells casos en què hi hagi una resposta immune aberrant. Quan això passa, la càrrega bacteriana augmenta enormement, trobant de l'ordre de  $10^{12}$ - $10^{14}$  UFCs. En aquests casos, es diu que els individus pateixen una TB activa (excessiu dany tissular amb radiografia de tòrax alterada, disseminació de la infecció a altres òrgans, individus que esdevenen contagiosos amb símptomes de malaltia, etc...)

## **6. De la latència a la TB. Risc de reactivació**

La ITBL és un procés dinàmic d'equilibri entre la lluita del bacil per persistir, havent-se demostrat la seva persistència a l'hostatger durant dècades [88] [89] i del sistema immune per a controlar la càrrega bacteriana sense que suposi muntar una resposta inflamatòria molt intensa que sigui hostil per a l'hostatger.

Hi ha certs factors de risc que poden trencar aquest equilibri fent que la infecció reactivi. Aquests factors són la infecció per VIH, malnutrició, tabaquisme, alcoholisme, silicosi, diabetis tipus II, fallada renal, tractaments immunosupressors,

etc... [15] [90]. Els factors de risc més ben descrits han estat el tractament amb anti-TNF-  $\alpha$  i la infecció per VIH.

El tractament amb inhibidors de TNF-  $\alpha$ , que està establert fa més d'una dècada, va fer augmentar la incidència de reactivació en els pacients tractats [91] [92]. Aquest mateix efecte s'ha descrit també en model de macac latentment infectat però, no s'ha pogut demostrar en ratolins.

En el model de macac es va poder veure que la inhibició de TNF-  $\alpha$  resultava en una alteració en l'expressió de receptors de certes quimiocines i també del reclutament de certs tipus cel·lulars com cèl·lules T als focus infectats, provocant en una incidència de TB extrapulmonar més elevada de l'esperada. De totes maneres, no tots els macacs reactivaven la infecció latent (incidència de reactivació era molt alta 65%), indicant que el TNF-  $\alpha$  és una citocina important en el manteniment de la latència, però no és un factor únic [93].

Pel que fa a la infecció per VIH, el risc de reactivació de la infecció en individus latentment infectats és 10 vegades superior al de la població normal.

El major risc de reactivació en aquests malalts es troba en els casos en què el comptatge de CD4+ és inferior a 200 cèl·lules CD4+/mL, malgrat la instauració de tractament antiretroviral, suggerint que aquestes cèl·lules són molt importants en el manteniment de la latència. Tot i que, com sempre, hi ha l'excepció. Hi ha casos en els que encara que els nivells de CD4+ millorin, el risc de reactivació continua sent alt, indicant que el risc de reactivació en pacients infectats per VIH no es deu només a la disminució dels limfòcits T CD4+ [94] [95].

En resum, la immunologia front la infecció tuberculosa latent és difícil d'estudiar per la seva complexitat. El fet de no poder disposar de mostres directes dels focus infecciosos i la manca de bons models de TB latent fan més difícil l'estudi immunològic d'aquest procés.

Seria molt interessant poder disposar de bons models experimentals que ens permetessin estudiar amb detall el fenomen de latència, per a poder desenvolupar teràpies i estratègies que poguessin prevenir la reactivació, així com per poder *boostejar* el sistema immune per tal que es pogués esterilitzar i acabar amb la infecció latent, disminuint el reservori de TB humà.

**V. *ITBL***



## 1. *Problema de salut pública*

La ITBL és un problema de salut pública per diverses raons:

- Els individus latentment infectats per TB representen el major reservori per a desenvolupar TB activa en un futur.
- El tractament és car, tòxic i llarg pel que hi ha molts problemes d'incompliment.
- Els mètodes de diagnòstic TST i TIGRA són logística i costosament difícils i són proves de difícil interpretació que tampoc aporten una evidència clara i directa de la presència del bacil latent als teixits del pacient.

## 2. *Prova de la tuberculina*

A Espanya es recomana usar la tuberculina PPD-RT23 amb Tween 80 del *Statens Serum Institute*. S'ha d'inocular 2 UT en 0,1mL per via intradèrmica. El major inconvenient d'aquesta prova és que les proteïnes presents al PPD no són específiques de MTB. Això fa que la prova sigui poc específica i que s'obtinguin falsos positius per exposició a altres micobactèries o per vacunació amb BCG.

La interpretació de la prova es fa al cap de 48-72h després de la inoculació de la tuberculina, mesurant el diàmetre (en mm) transversal de la induració a l'eix longitudinal del braç. Si hi ha eritema però no induració, la prova es considera negativa.

## 3. *TIGRA*s

Mesura de la secreció d'IFN- $\gamma$  per cèl·lules T efectores de sang perifèrica respondores a ESAT-6, CFP-10 i TB7.7. Aquests antigens estan presents al MTB complex, excepte en *M. bovis* BCG, així com tampoc està present a les micobactèries ambientals, excepte *M. kansasii*, *M. marinum* i *M. szulgai*. Així, els resultats d'aquestes proves no es veuen afectats per la vacunació amb BCG ni per una infecció prèvia amb una micobactèria ambiental excepte les mencionades anteriorment.

#### **4. Evidències clíniques de la ITBL**

La ITBL es caracteritza per cursar asimptomàticament i per no existir evidències radiològiques d'infecció. Els individus latentment infectats no són bacil·lífers i, per tant, no poden infectar els contactes. Es desenvolupa en un context immune que tot i que pot controlar la infecció, no la pot eliminar totalment. Els primers indicis de l'existència de la ITBL es van obtenir a partir de la instauració de la teràpia amb combinació d'antibiòtics per prevenir l'aparició de mutants resistents a la quimioteràpia. La latència era l'única explicació de les reactivacions que s'observaven en aquells pacients que havien seguit el tractament correctament, ja que s'aïllaven soques sensibles als fàrmacs usats [96].

#### **5. Probabilitat de reactivació de la ITBL**

Les dades epidemiològiques indiquen que el risc major de patir TB es troba just després d'una infecció. Les dades recollides d'estudis sobre quimioprofilaxi en pacients no tractats en contacte amb un focus infeccios a l'àmbit domèstic, indicaren que la probabilitat de què aparegués la malaltia era del 74% durant el 1er i 2on any, del 31% entre el 3er i 5è any i del 16% durant el 6è i 7è any. Aquestes dades s'ajusten a una recta de regressió lineal per la que es prediu que la probabilitat de desenvolupar TB a partir del 8è any després de la infecció és nul·la [97].

#### **6. Experiments *in vitro* per a determinar la naturalesa del bacil latent**

Poc després de la introducció del concepte d'ITBL en l'àmbit clínic va aparèixer la RIF. Aquest nou fàrmac va permetre l'escurçament del tractament de la ITBL. Buscant l'explicació de per què la RIF permetia escurçar el tractament, Mitchinson i Dickinson van desenvolupar experiments en els que van observar que en un cultiu de MTB a 4°C, ni la INH ni la RIF aconseguien disminuir la concentració bacil·lar, mentre que quan es posava el cultiu a 37°C, els dos fàrmacs tenien una capacitat bactericida semblant. Llavors, van desenvolupar un sistema de cultiu amb incubació intermitent a 37°C (6h) i 8°C (18 h) que els va permetre demostrar que la RIF tenia major activitat bactericida que la INH, usant aquest sistema de cultiu [98]. En aquell curt espai de temps en què el metabolisme es recuperava (37°C, 6 hores), es mostrava la diana terapèutica contra la que era activa la RIF (inhibició de la RNA polimerasa per unió a la seva subunitat  $\beta$ ),

mentre que la INH (inhibició de la síntesi de l'àcid micòlic de la paret) requeria molt més temps.

Gràcies a aquests experiments, es van assentar les bases sobre les diferents poblacions bacil·lars que es troben als granulomes, definides per les seves diferents velocitats de proliferació [99, 100]. Els bacils amb una velocitat de creixement més elevada eren altament sensibles a la quimioteràpia, mentre que les poblacions sotmeses a pH àcid o compostes per bacils sensibles a la PZA o la RIF, però no a la INH, tenien una velocitat de creixement inferior.

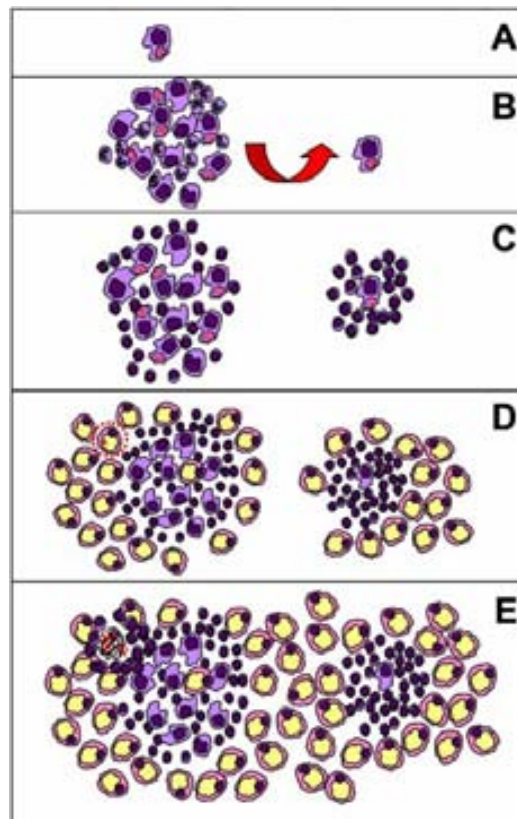
Diversos autors han demostrat que els bacils presenten una major capacitat d'adaptar-se a les condicions adverses en fase estacionària de creixement comparat amb l'exponencial [101]. Se sap que els cultius convencionals entren en fase estacionària quan les condicions comencen a ser adverses: per esgotament de nutrients, acumulació de toxines producte del seu propi metabolisme, etc... Les bactèries alenteixen el seu metabolisme per adaptar-se a les noves condicions que els són nocives i que es podria comparar al que els passa als bacils tuberculosos quan estan al medi extracel·lular, immersos en el teixit necròtic.

## **7. Models experimentals. Latència**

El model del Cornell va ser la primera prova experimental *in vivo* de l'existència de latència. En aquest model s'inoculaven de  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  UFCs d'H37Rv per via intravenosa a ratolins experimentals. 20 minuts més tard es començava el tractament antibiòtic amb INH (25mg/kg) i PZA (1g/kg) que s'allarga 12 setmanes. En acabar el tractament antibiòtic no es podien aïllar bacils cultivables de cap teixit, però 90 dies després d'acabar el tractament antibiòtic es podien aïllar bacils a la melsa, fetge i pulmons en un terç dels ratolins i al cap de 12 setmanes en dos terços.

En el model de Cornell modificat, en administrar cortisona (1mg/dia) durant 4 setmanes, es van poder aïllar bacils cultivables als ratolins a partir del segon mes i sobretot a partir del tercer a tots els ratolins.

En el nostre grup, hi ha evidències de l'escapament de MTB dels granulomes transportats per macròfags escumosos.



*Esquema basat en les referències Green et al., 1973; Cardona et al., 2000 [6] [7]*

Després de la infecció dels macròfags alveolars i de la formació dels primers granulomes, es produeix la disseminació pel parènquima pulmonar formant-se nous granulomes en el context d'immunitat cel·lular. Els macròfags escumosos que fagociten el material necròtic poden fagocitar bacils latents i transportar-los cap a fora de la lesió.

Els macròfags s'activen pels limfòcits específics o per la fagocitosi de material necròtic i components de la paret cel·lular dels bacils, que hi ha en aquest [102], però sembla que els bacils latents poden sobreviure al seu interior, podent escapar de la resposta immune. Així doncs, alguns bacils són capaços de créixer a dins dels macròfags i atraure limfòcits començant la formació d'un nou granuloma.



## 8. Hipòtesi Dinàmica de la ITBL

Clàssicament, es postulava que una vegada un individu s'infectava per MTB, el bacil romandria en estat dorment en lesions antigues, permetent que l'individu tingués bacils latents als seus teixits durant tota la seva vida.

Aquest bacil latent seria el que podria reactivar i causar TB activa gràcies a l'ajuda dels *Rpf* i a l'elevada pressió d'oxigen als lòbuls apicals del pulmó que permet un creixement actiu del bacil tuberculós i, per contrapartida, una supressió de la resposta immune podent arribar a la formació de lesions cavitades.

### 8.1. Teoria clàssica de la ITBL

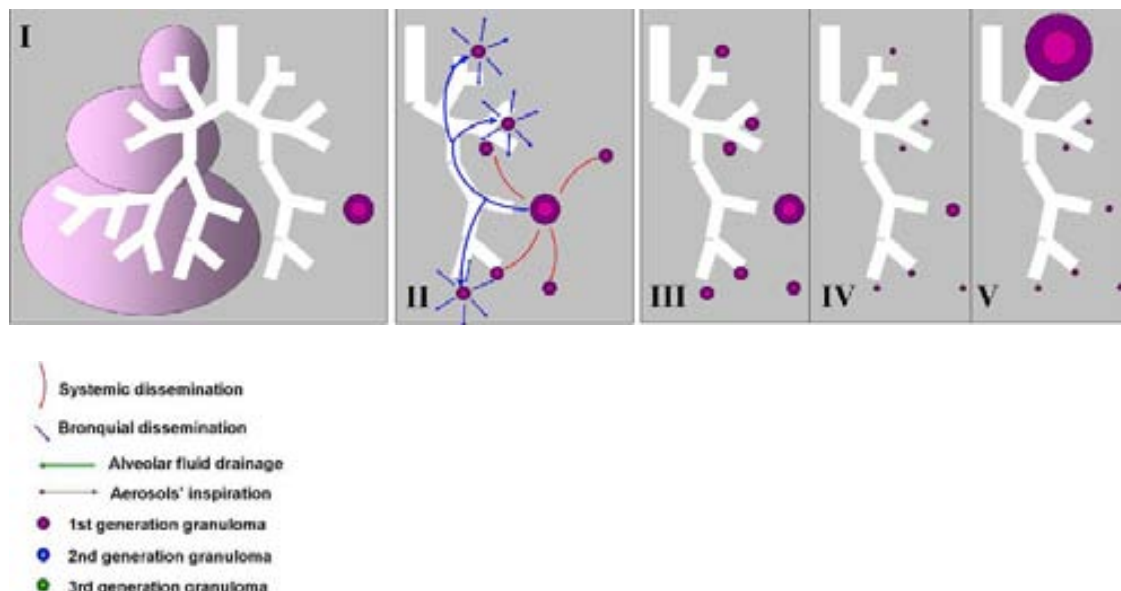


Figura de Cardona, 2009 [11]

Una vegada l'individu s'infecta i es forma la primera lesió (I), hi ha disseminació bronquial (fletxes blaves) i hematògena (fletxes vermelles) que acaba generant lesions secundàries (II). Aquest procés de disseminació inicial s'atura amb l'aparició de la resposta immune cel·lular adaptativa (III). Les lesions romanen estàtiques al pulmó de l'individu, amb bacils latents dorments (IV) esperant el moment de reactivar, gràcies a *Rpf* (V).

## 8.2. Teoria Dinàmica de la ITBL

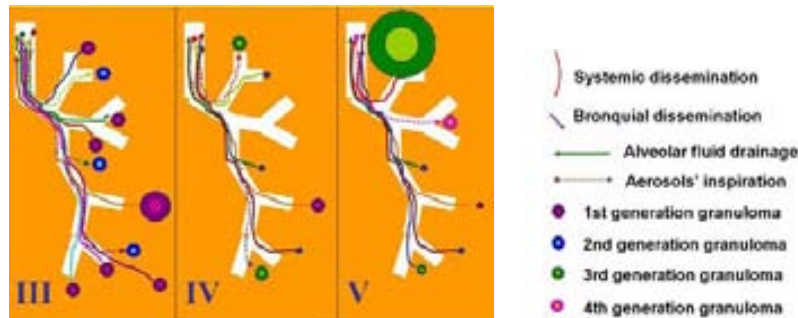


Figura de Cardona, 2009 [11]

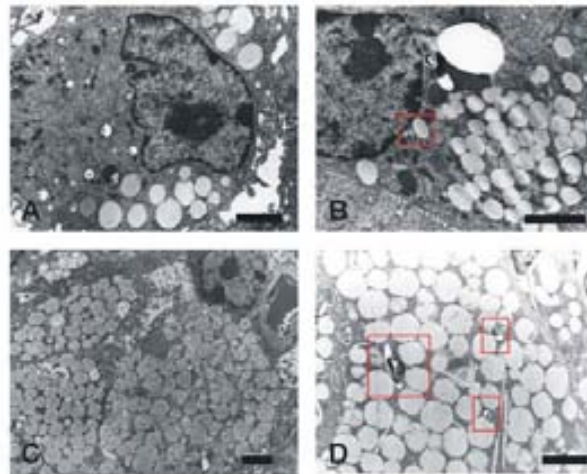
El que s'hipotetitza és que després de la formació de les lesions secundàries hi ha un drenatge constant de bacils transportats pels macròfags escumosos a través de l'arbre bronquial (línies contínues) i que aquests bacils retornen amb l'aire inhalat (línies discontinúes) (III-IV). En aquest procés, el parènquima pulmonar es reinfecta i fa lesions en altres localitzacions, mentre que les més antigues es van resolent. Si durant aquest procés es dona el cas de què la reinfecció tingui lloc a l'àpex pulmonar, aleshores el bacil latent pot dividir-se més eficientment donat les condicions favorables amb què es troba i pot aparèixer lesió cavitada (V).

La Hipòtesi Dinàmica, com es mostra a la figura anterior, suggereix que la ITBL es deu a una reinfecció constant del parènquima amb bacils latents. Aquests, en el seu camí cap a l'esòfag, immersos en el fluid alveolar que constantment es drena cap a nivell bronquial superior, tenen l'oportunitat de tornar al parènquima pulmonar i reinfectar-lo. Això és degut a què en aquest fluid és on es generen els aerosols provocats a l'inhalat aire de l'exterior ja que és més fred i més sec i donada la seva entrada de manera turbulenta als bronquis es generen els aerosols, en aquest cas infectats.

Aquesta hipòtesi es va poder formular gràcies a les observacions en models animals. Al model murí d'ITBL, un cop apareix la immunitat cel·lular adaptativa, es poden observar macròfags escumosos a la perifèria de les lesions ocupant els espais alveolars [7] [102].

Els macròfags escumosos, que no són exclusius de la ITBL sinó que s'han observat a molts altres processos inflamatoris [6], es generen per l'acumulació de cossos lipídics després de fagocitar el material necròtic de les lesions granulomatoses.

En la figura següent es mostra l'acumulació de vesícules lipídiques a dins dels macròfags escumosos segons progressa la infecció a ratolins DBA/2 a les setmanes 2 (A), 3 (B), 5 (C) i 9 (D) post-infecció.



*Figura de Càceres et al., 2009 [3]*

En el model murí és molt fàcil veure aquests macròfags perquè els espais alveolars són més petits i, per tant, s'hi acumulen allà. En el model de conill porquí i altres models experimentals més grans o, fins i tot en humans, no és tan fàcil veure'ls degut a que aquests espais són fins a 10 vegades més grans i els macròfags escumosos simplement són drenats.

Com ja s'ha comentat amb anterioritat, aquests macròfags escumosos fagociten bacils no replicatius que hi ha immersos al material necròtic del centre de les lesions. En el seu viatge cap a l'esòfag per l'arbre bronquial, aquests bacils que transporten poden passar a formar part dels aerosols que es generen per condicionar l'aire inspirat [103].

Un cop el bacil es troba a l'espai alveolar serà drenat cap a les vies respiratòries superiors amb la mucositat per a ser expulsat o deglutit. La inspiració d'aire fred i sec provoca la formació d'aerosols des de la capa mucosa cap al lumen de l'arbre bronquial, donant una possibilitat a la reinfecció endògena. Durant l'expiració el refredament de l'aire condensa novament els aerosols i una porció d'aquests torna cap a la capa mucosa.

Aquests aerosols que transporten els bacils no replicatius són el vehicle que permeten al bacil, durant la propera inspiració, tenir l'oportunitat de reinfectar el parènquima pulmonar i tornar a començar el cicle, generant noves lesions.

Amb aquesta nova visió del bacil latent, que constantment va reactivant i reinfectant el parènquima pulmonar, és més fàcil d'entendre el per què de l'èxit del tractament clàssic de la ITBL que només és bactericida front els bacils que s'estan multiplicant.

Amb aquest tractament, el bacil continua escapant de les lesions a dins dels macròfags escumosos i reinfectant el teixit generant noves lesions, però una vegada reactivi serà eliminat pel tractament antibiòtic. Així, la càrrega bacteriana cada vegada serà inferior i les lesions més antigues s'aniran resolent durant el curs del tractament de la ITBL. El tractament amb INH durant 9 mesos permet a l'hostatger drenar els bacils no replicatius i restaurar el teixit pulmonar malmès.

### 8.3. Èxit del tractament de la ITBL amb INH

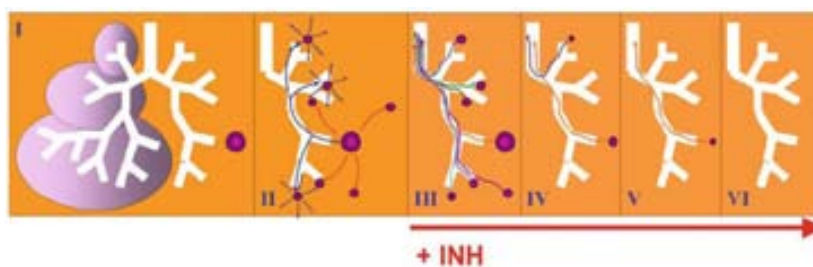


Figura de Cardona, 2009 [11]

La INH sols té activitat bactericida contra els bacils que estan en multiplicació activa (Fox, Ellard et al. 1999) i és impossible que sigui bactericida contra el bacil latent que es queda al interior de les lesions, esperant dels *Rfps* a què el reactivin. S'entén que mentre aquest bacil latent no prolifera, la INH no podria exercir el seu efecte

bactericida i, per tant, s'hauria de donar durant tota la vida del pacient en previsió del moment en què el bacil latent pogués reactivar

La teoria clàssica de la ITBL implicava que una vegada l'hostatger s'infecta, estaria infectat tota la vida perquè els bacils latents romanen a l'hostatger fins que poden reactivar. La Hipòtesi Dinàmica contraria aquest fet.

S'ha de tenir clar que la ITBL es genera en un context immune. Així doncs, quan els bacils latents infecten una nova zona i es divideixen a dins dels macròfags, aquests seran activats més ràpidament podent matar als bacils del seu interior més eficientment i generant-se una resposta inflamatòria menor cada vegada. La càrrega bacteriana a la nova zona que s'infecta, serà menor degut a què molts dels bacils no replicatius s'hauran eliminat en el procés de drenatge i deglució del moc o pel sistema immune. Això explicaria el per què de la disminució de la probabilitat de desenvolupar TB activa després de la infecció amb el pas del temps [104].

#### ***8.4. Evidències que recolzen la Hipòtesi Dinàmica***

És ben sabut que els TIGRAs mesuren de manera directa (ELISPOT) o indirecta (QuantiFERON TB Gold In Tube) la presència de cèl·lules T efectores secretores d'IFN- $\gamma$  en resposta a antígens secretats per les bactèries en multiplicació activa i que els individus infectats latentment per MTB són positius per aquestes proves. Que hi hagi resposta efectora contra antígens secretats per bacils que es multipliquen és una evidència claríssima de la presència d'aquests bacils multiplicant-se en el moment de la mesura.

En un estudi recent s'ha pogut demostrar la presència de cèl·lules T efectores de memòria secretores d'IFN- $\gamma$  i IL-2 en resposta a antígens secretats pels bacils en multiplicació activa, en individus que van curar la TB en la era pre-antibiòtica. Això suggereix la persistència d'aquests antígens secretats i, per tant, la presència de bacils vius i multiplicant-se en aquests individus latentment infectats des de fa més de 50 anys [105]. A més, el mecanisme pel qual els bacils latents escapen de les lesions i migren cap a l'espai alveolar a través de macròfags escumosos, ha estat demostrat en ratolins i conills porquins [3], així com en humans [106].



**VI. *L'efecte tòxic del tractament amb tuberculines***





## 1. *Fenomen de Koch*

La necrosi intragranulomatosa, característica de la TB humana i d'alguns models animals com els conills i els cobais però no dels ratolins, s'ha relacionat amb el Fenomen de Koch des del primer moment.

Koch va veure que en infectar conills porquins intradèrmicament amb TB, apareixia una lesió ulcerosa al punt d'inoculació al cap de 10-14 dies. Existia una posterior disseminació dels bacils als ganglis limfàtics regionals i disseminació sistèmica, provocant la mort dels animals en 3-4 mesos post-infecció. Va observar que si es reinfectaven els animals per la mateixa via d'infecció en una altre localització, apareixia una lesió necrosada al punt d'inoculació. Aquesta lesió es resolía i no hi havia disseminació sistèmica de la infecció.

Després d'aquests experiments, Koch va reproduir aquest fenomen amb bacils morts i més tard va desenvolupar la *Old tuberculin*, que com ja s'ha dit anteriorment, va ser un fracàs en el tractament d'alguns casos de TB més avançats.

Gràcies a Von Pirquet, se li va poder donar una utilitat diagnòstica a la tuberculina. Ell va descriure que existia una reacció positiva a la injecció de tuberculina si la persona havia estat prèviament infectada per MTB. Aquesta reacció, que es va aprofitar com a eina diagnòstica, es va catalogar com a una reacció d'hipersensibilitat retardada. En 48-72 hores es genera una reacció inflamatòria per l'acumulació de macròfags, predominantment, limfòcits i leucòcits PMNs al lloc d'inoculació, produint edema i induració local degut a la extravassació de fluid provocat per la sortida de cèl·lules des dels vasos sanguinis.

Se sabia que la hipersensibilitat retardada era la causa de la necrosi caseosa, però es desconeixia el mecanisme. Rook i al Attiyah van enunciar una teoria basada en la reacció de Shwartzman, descrita als anys 30 [107].

La reacció de Shwartzman es basava en la reactivitat local de la pell després d'una inoculació intradèrmica d'endotoxina (injecció preparatòria), seguida per la inoculació intravenosa (injecció provocadora) d'endotoxina també a les 18-24 hores. Al cap de 4 hores després de la segona inoculació d'endotoxina, es produïa necrosi hemorràgica al punt d'inoculació amb acumulació de cèl·lules PMNs. Rook i al Attiyah van fer el

símil del granuloma tuberculós, on el macròfags locals secretaven TNF- $\alpha$  preparant la zona (en el sentit que donà Shwartzman en descriure la seva reacció) per a necrosar-se en arribar nous macròfags que s'activarien amb el limfòcits locals i secretarien TNF- $\alpha$ .

**VII. *Tractament de la tuberculosi***



## **1. Tractament actual de la TB**

Tot i que es disposa de bones combinacions d'antibiòtics, la TB continua sent un problema de salut a tot el món. Això es deu principalment a la llarga durada del tractament que genera problemes d'adherència (no compliment de la pauta completa). Això, juntament amb les males prescripcions d'antibiòtics, ha fet que hagin aparegut soques resistents als fàrmacs de primera línia.

Al nostre medi hi ha una alta incidència de TB que no es correspon amb el nostre nivell de desenvolupament econòmic. Això és degut al retard diagnòstic, que permet la transmissió de la malaltia per part dels individus malalts no tractats, al mal ús de les pautes antibiòtiques instaurades i també a l'abandonament i mal seguiment de la pauta per part dels pacients.

Per tant, es necessiten noves mesures profilàctiques i terapèutiques per poder combatre la TB. La línia actual de treball contra la TB abarca diferents fronts d'investigació:

- Nous mètodes diagnòstics més ràpids i fàcils d'aplicar.
- Nous medicaments que escurcin la duració del tractament.
- Noves vacunes.

### **1.1. Pautes terapèutiques**

La pauta terapèutica que es fa servir actualment en el nostre medi en malats inicials de TB (malalts que no hagin estat tractats mai o que portin menys d'un mes de tractament) és 2mesos amb INH, RIF, ETH, PZA + 4 mesos amb INH, RIF. Sempre que es pugui, s'eviten les monoteràpies i s'administren combinacions de 3 o 4 fàrmacs assegurant-se de què s'arribi a les dosis necessàries per evitar l'aparició de mutants resistents.

Totes les pautes de tractament inicial no multiresistent presenten una primera fase de dos mesos de durada amb un mínim 3 o 4 fàrmacs i una fase de manteniment amb 2 fàrmacs que es poden administrar diàriament o intermitentment 2 cops per setmana. La pauta intermitent és igual d'efectiva que la diària però s'ha de realitzar sota observació

TDO. S'observa, doncs, que el tractament de TB és llarg i requereix de la combinació de diversos fàrmacs.

## ***2. Tractament actual de la ITBL***

Contràriament al que passa amb el tractament de la TB i donat que la població bacil·lar als teixits és més baixa, no cal donar tants fàrmacs per evitar la selecció de resistències. Ara bé, cal distingir els subjectes amb ITBL i amb TB per evitar precisament fer una monoteràpia en pacients amb TB. Quan es parla del tractament de la ITBL, en realitat es fa referència al tractament preventiu que es du a terme com a mesura de control epidemiològic de la TB.

El tractament clàssic de la ITBL es basa en l'administració de INH durant 6-12 mesos [108] i de 9-12 mesos en cas de coinfecció amb el VIH [109], existint nombroses modificacions per a aquests últims. Poden existir variacions d'aquesta teràpia en funció del context clínic del pacient.

La llarga durada del tractament de la ITBL condueix a fracassos terapèutics que dificulten l'erradicació de la TB.

***VIII. Vacunes***





## 1. Introducció

Les vacunes poden ser profilàctiques o terapèutiques i els antígens inoculats poden ser els mateixos patògens atenuats, morts o inactivats, així com també proteïnes purificades o recombinants.

A Europa hi ha molt d'interès en la recerca en el desenvolupament de vacunes tant en el sector públic com en el privat. Dues tercers parts dels projectes globals de recerca (I+D) en vacunes són dirigits per institucions europees i aproximadament el 90% de la producció de vacunes es dona a Europa [110].

En el *Sixth Framework Programme for Research* (FP6, 2002-2006) de la Comissió Europea es van invertir més de 210 milions d'euros per iniciar uns 66 projectes relacionats amb recerca en vacunes, dels que quasi 20 es van dedicar a vacunes antituberculosos. En el pressupost del FP7 (2007-2013) (6 bilions d'euros) també s'han inclòs molts milions en la recerca en vacunes i es creu que en moltes de les vacunes promesa del FP6 s'obtidran resultats aplicables.

Project acronym	EC contribution (EUR)	Partner	Type	Key words	Website
<b>Basic vaccinology</b>					
Muvapred	15,250,000	29	IP	Mucosal	<a href="http://www.mucosalimmunity.org/muvapred">www.mucosalimmunity.org/muvapred</a>
Savinmucopath	1,699,908	8	STREP	Mucosal	<a href="http://www.greenhillsbiotech.com/eu_projects">www.greenhillsbiotech.com/eu_projects</a>
MuNanoVac	1,505,702	8	STREP	Mucosal	<a href="http://www.munanovac.eu">www.munanovac.eu</a>
EP-VAC	2,400,000	7	STREP	Delivery	NA
CompuVac	7,969,442	15	IP	Genomic	NA
BacAbs	2,269,999	9	STREP	Genomic	<a href="http://www.bacabs.org">www.bacabs.org</a>
Microarray	1,401,002	9	NoE	Genomic	NA
Dec-Vac	3,400,000	10	IP	Dendritic cells	<a href="http://www.rubr.uni-bochum.de">www.rubr.uni-bochum.de</a>
Theravac	2,267,000	7	STREP	Dendritic cells	NA
DC-Vacc	2,000,000	9	STREP	Dendritic cells	<a href="http://www.biopolo.it">www.biopolo.it</a>
Innovac	2,000,000	7	STREP	Platform	NA
VaccTIP	1,000,000	5	STREP	Platform	<a href="http://www.rntc.ki.se/groups/liljestrom/vaccTip/index">www.rntc.ki.se/groups/liljestrom/vaccTip/index</a>
Mvector	1,000,000	4	STREP	Platform	<a href="http://www.pei.de">www.pei.de</a>
AIDS-CoVAC	958,000	3	STREP	Platform	<a href="http://www.ha-sg.ch">www.ha-sg.ch</a>
HIVAB	950,000	7	STREP	Platform	NA
ImmunoGrid	1,950,000	8	STREP	Virt. immune system	<a href="http://www.immunogrid.org">www.immunogrid.org</a>
<b>Disease specific projects</b>					
AVIP	10,300,000	15	IP	HIV/AIDS	<a href="http://www.avip-eu.org">www.avip-eu.org</a>
RMVHIV	5,500,000	6	IP	HIV/AIDS	NA
Auto/Allo cell-HIV	1,700,000	6	STREP	HIV/AIDS	NA
Pox-gene	1,180,000	6	STREP	HIV/AIDS	NA
Allomicrovac	1,100,000	7	STREP	HIV/AIDS	NA
VIAV	1,000,000	5	STREP	HIV/AIDS	NA
HIV virosomes	973,930	7	STREP	HIV/AIDS	NA
TIP-VAC	951,650	7	STREP	HIV/AIDS	<a href="http://www.rubr.uni-bochum.de/virologie/TIP-VAC/TIP-">www.rubr.uni-bochum.de/virologie/TIP-VAC/TIP-</a>
EP-VAC	911,050	5	STREP	HIV/AIDS	<a href="http://www.dbm.unima.it">www.dbm.unima.it</a>
EMVDA	13,500,000	13	IP	Malaria	<a href="http://www.emvda.org">www.emvda.org</a>
Pribomal	2,345,358	7	STREP	Malaria	NA
SME-malaria	1,700,000	5	STREP	Malaria	<a href="http://www.malariaSTREP.eu">www.malariaSTREP.eu</a>
Malinv	587,000	5	STREP	Malaria	NA
TB-VAC	17,000,000	33	IP	Tuberculosis	<a href="http://www.tb-vac.org">www.tb-vac.org</a>
NEOTIM	2,000,000	8	STREP	Tuberculosis	<a href="http://www.euprojekt.su.se">www.euprojekt.su.se</a>
Vaccines4TB	1,053,445	4	STREP	Tuberculosis	<a href="http://www.biocompetence.eu">www.biocompetence.eu</a>
Immuno VacTB	857,298	4	STREP	Tuberculosis	NA
Fluvacc	9,200,000	8	IP	Influenza	<a href="http://www.greenhillsbiotech.com/eu_projects">www.greenhillsbiotech.com/eu_projects</a>
FluVac	3,500,000	6	STREP	Influenza	<a href="http://www.fluvac-project.eu">www.fluvac-project.eu</a>

Panfluvac	3,334,798	9	STREP	Influenza	<a href="http://www.panfluvac.org">www.panfluvac.org</a>
Intranasal H5vaccine	2,680,400	6	STREP	Influenza	<a href="http://www.greenhillsbiotech.com/eu_projects">www.greenhillsbiotech.com/eu_projects</a>
Chimeric vaccines	1,384,945	7	SME COOP	Influenza	<a href="http://www.greenhillsbiotech.com/eu_projects">www.greenhillsbiotech.com/eu_projects</a>
Universal vaccine	1,154,717	6	SME COOP	Influenza	<a href="http://www.universalvaccine.org">www.universalvaccine.org</a>
Novaduck	1,416,380	8	STREP	Avian Flu	<a href="http://www.novaduck.eu">www.novaduck.eu</a>
AIV Vacc diagnosis	1,372,890	3	SSA	Avian Flu	<a href="http://www.aiv-vacc-diagnosis.com">www.aiv-vacc-diagnosis.com</a>
Hepacivac	8,800,000	12	IP	Hepatitis C	<a href="http://www.altweb.eu/hepacivac">www.altweb.eu/hepacivac</a>
Dissect	2,375,892	10	STREP	SARS	<a href="http://www.cnb.uam.es/~webcoron/EUprojectdissect/">www.cnb.uam.es/~webcoron/EUprojectdissect/</a>
Sarsvac	1,200,000	4	STREP	SARS	NA
Sars/Flu vaccine	1,607,500	6	STREP	SARS + FLU	<a href="http://www.greenhillsbiotech.com/eu_projects">www.greenhillsbiotech.com/eu_projects</a>
Scott	2,800,000	10	STREP	Helminths	NA
Tranchi	1,950,000	7	STREP	Helminths	<a href="http://www.tranchi.org">www.tranchi.org</a>
Bovac	1,355,443	6	STREP	Lyme disease	<a href="http://www.bovac.org">www.bovac.org</a>
Omvac	2,320,000	7	STREP	Otitis media	NA
Sopasalvac	2,440,670	10	STREP	Diarrhoea	NA
Hevar	1,539,999	8	STREP	Diarrhoea	NA
Trypadvac2	900,000	12	STREP	Trypanosome	<a href="http://www.trypadvac2.eventos.usb.ve">www.trypadvac2.eventos.usb.ve</a>
Cancerimmunotherapy	12,185,302	22	IP	Cancer	<a href="http://www.cancerimmunotherapy.eu">www.cancerimmunotherapy.eu</a>
Dendritophages	1,999,900	6	STREP	Cancer	NA
Lcvac	1,231,269	5	SME COOP	Cancer	<a href="http://www.lcvac.org">www.lcvac.org</a>
Vital	2,050,000	7	STREP	Cancer	<a href="http://www.cro.sanita.fvg.it/progetti/vital/index">www.cro.sanita.fvg.it/progetti/vital/index</a>
Mimovax	2,370,155	7	STREP	Alzheimer's	<a href="http://www.mimovax.eu">www.mimovax.eu</a>
Capacity building and clinical research					
Europeise	15,500,000	36	NoE	HIV/AIDS	<a href="http://www.altweb.it/europrise/neutnet">www.altweb.it/europrise/neutnet</a>
DC-Thera	7,600,000	34	NoE	Cancer	<a href="http://www.dc-thera.org">www.dc-thera.org</a>
ENACT	4,166,513	13	STREP	Cancer	<a href="http://www.enactcancerresearch.org">www.enactcancerresearch.org</a>
Neutnet	299,000	7	SSA	HIV/AIDS	NA
Eurhavac	260,000	1	SSA	Malaria	<a href="http://www.emvi.org/eurhavac">www.emvi.org/eurhavac</a>
Pahpv	132,000	3	SSA	HPV	N/A
Advac-EC	390,000	2	SSA	Training	<a href="http://www.advac.org">www.advac.org</a>
Coinfect	290,000	4	SSA	Training	<a href="http://www.coinfect.eu">www.coinfect.eu</a>
Rebavac	121,200	1	SSA	Training	<a href="http://www.altweb.eu/rebavac">www.altweb.eu/rebavac</a>
Total	210,609,557	581			

## 2. BCG. La vacuna actual

La *M. bovis* BCG (Bacil de Calmette Guérin) és una vacuna viva atenuada a partir d'una soca de *M. bovis* i actualment és l'única vacuna contra la TB. Ara fa quasi 100 anys des de la primera vegada que es va fer servir l'any 1921 i es calcula que s'ha administrat uns 4 bilions de vegades en aquests anys d'ús [111].

### 2.1. Història de la BCG

L'èxit de la vacunació de la verola, desenvolupada pel científic Edward Jenner (1749-1823) a partir de les pústules de les lesions adquirides en munyir les vaques infectades, va inspirar científics del segle XIX. Es van dur a terme estudis de protecció conferida per la vacunació amb *M. bovis*, però els resultats van ser molt dolents degut a què es va veure que *M. bovis* era tan virulenta com MTB.



*Institut Pasteur. Albert Calmette i Camille Guérin*

Albert Calmette i Camille Guérin, treballadors de l'Institut Pasteur, van desenvolupar la BCG atenuant una soca de *M. bovis* aïllada d'una vaca amb TB. La seva feina es va basar en subcultivar diferents soques virulentes de *M. bovis* en diferents medis de cultiu. Van observar que els bacils crescuts en una barreja de glicerina, bilis i patata eren menys virulents que la soca original. Després d'aquesta observació, van variar la seva línia de recerca i van començar a subcultivar aquesta soca repetides vegades en aquest medi per veure si podien aconseguir una soca suficientment atenuada com per a ser usada com a vacuna en humans. Així, van subcultivar la soca cada 3 setmanes durant 13 anys fins l'any 1919, en què es va veure que la soca que es va aconseguir ja no era capaç de causar TB a animals, com ara vaques o cobais.

Durant aquest 13 anys es va aconseguir una soca genèticament diferent de l'original i es va anomenar *M. bovis* BCG. Aquests canvis genètics no només feien que la BCG fos menys virulenta, sinó que també van provocar canvis fenotípics, fent que les col·lònies fossin més llises que les de la soca original.

No va ser fins l'any 1921 que no es va començar a usar la vacuna en humans. Al 1928, va ser acceptada per *The League of Nations* (predecessor de l'OMS), però no es va començar a usar extensament fins els anys 1945-1948. La seva acceptació va costar molt, i el fet que l'estiu de 1930 morissin 72 nounats de 240 vacunats a Lübeck no va facilitar-ho. La raó va ser la contaminació del cultiu de la soca de BCG usada amb una soca virulenta que havia estat incubant-se a la mateixa estufa.

Actualment, és l'única vacuna de què es disposa. És molt eficaç en els casos més severos de TB en nens com el casos amb meningitis tuberculosa, però la seva eficàcia contra la TB pulmonar és variable [112]. A més, s'ha vist que l'ús d'aquesta vacuna en immunocompromesos pot causar infecció per la pròpia BCG [113] [114].

## **2.2. Punts febles de la vacunació amb BCG**

Malgrat el gran nombre de vacunacions amb BCG que s'han portat a terme en els últims anys, no sembla que hagi tingut un impacte molt elevat en la disminució de la incidència mundial de TB.

- No és efectiva contra la TB pulmonar post-primària en adults.
- No protegeix contra la ITBL.
- No es recomana l'ús en infants i persones infectades per VIH.

## **2.3. Punts forts de la vacunació amb BCG**

És efectiva contra els casos més severes de TB pediàtrica i per tant, ha de continuar sent usada mentre no es tingui cap altra vacuna millor.

## **2.4. Les diferents soques de la BCG**

Els primers cultius de la BCG es van mantenir a l'Institut Pasteur, però després es va repartir per diferents laboratoris del món on es va continuar subcultivant per mantenir la soca vacunal. Al cap dels anys, es va veure que les soques que van sorgir dels diferents laboratoris no eren genèticament idèntiques. A més a més, es va veure que la BCG mantinguda al mateix Institut Pasteur havia canviat genèticament durant els subcultius necessaris per a mantenir la viabilitat i tampoc era idèntica a la BCG inicial.

Després d'aquesta observació va canviar el protocol de manteniment de la soca. Avui en dia, la majoria de laboratoris treballen a partir d'un *master seed lot* liofilitzat i cada nou lot de BCG es crea a partir d'un vial d'aquest lot. Per tant, cada nou lot sorgeix de les mateixes cèl·lules que l'anterior.

Actualment, es disposa de diferents soques de BCG degut a la divergència que va resultar de mantenir-la a diferents laboratoris. Les diferents soques de BCG s'anomenen usant el nom del lloc on es produeixen. Així doncs, es disposa de la BCG\_Paris, BCG\_Copenhaguen, BCG\_Tice, BCG\_Montreal, BCG\_Moreu, BCG\_Russia, etc... No es tenen clares les diferències en quant a eficàcia i seguretat en

humans, però es coneixen algunes diferències a nivell genètic i mol·lecular entre les diferents soques, tot i que encara que no està clar quina BCG és millor.

### **3. Actualitat i futur**

Els objectius que han de perseguir les noves vacunes són:

- Eliminar la TB com a una amenaça mundial per a la Salut Pública en línia amb els objectius globals (<1 cas/milió), juntament amb els nous medicaments i mètodes diagnòstics.
- Ser biosegura i efectiva.
- Protegir de totes les formes de TB, inclòs MDR i XDR.

### **4. Obstacles en el desenvolupament de vacunes. La immunologia**

Malgrat que els últims anys s'ha avançat molt en el desenvolupament de vacunes antituberculoses, encara no existeix cap vacuna que pugui substituir la BCG. El major problema és, com ja s'ha comentat en altres apartats, la dificultat per entendre la resposta immunològica generada per la infecció tuberculosa que està composta per molts tipus cel·lulars, citocines i factors involucrats. Aquesta resposta tan complexa és eficaç en la majoria dels casos per a controlar el patogen i generar una ITBL, però no és capaç d'erradicar el patogen de l'hostatger. Generalment, aquest es manté latentment infectat mentre l'individu es manté immunocompetent. Tot i així, el bacil pot reactivar quan l'hostatger es troba immunocompromès.

### **5. Obstacles en el desenvolupament de vacunes. Models animals**

Les soques de ratolins *inbred* han estat molt usades en el cribatge de nous candidats a vacuna antituberculosa. En aquest model es mesura l'eficàcia de les vacunes segons la seva capacitat de reduir la càrrega bacteriana a pulmó i melsa. En quant a la patogènia de la infecció, els granulomes dels ratolins són diferents als dels humans. Tot i així, és un model molt usat degut a què és econòmicament i logísticament fàcil d'utilitzar. A més, es disposa de soques tolerants i sensibles, així com soques *KO* que permeten

estudiar determinats factors per separat per a poder entendre la immunitat generada per la vacuna.

Els cobais són molt susceptibles a la infecció tuberculosa, però són molt útils perquè desenvolupen granulomes humanitzats (sòlids i caseosos) amb presència de cèl·lules gegants multinucleades de Langhans. Pel que fa a l'assaig de vacunes en cobais, per a avaluar la seva eficàcia es fan estudis de supervivència igual que en ratolins, a més de l'avaluació de la protecció a nivell histològic.

La infecció tuberculosa en el model experimental de conill és més semblant a la patologia humana. Aquest model experimental desenvolupa lesions semblants a les humanes, trobant necrosi caseosa i lesions cavitades. Per tant, seria un model que s'ajustaria més al humà a diferència dels dos anteriors, però que per problemes logístics no és tan usat.

Pel que fa als macacs, la fisiologia i patologia de la infecció tuberculosa és molt semblants a la dels humans. Tot i així, no és un dels models més emprats en l'avaluació pre-clínica de candidats a vacuna humana degut a l'alt cost que suposa treballar amb aquest model.

Un model molt útil en l'avaluació de vacunes en nounats són les vaques. És un model molt útil per a aquesta aplicació degut a què també presenten una eficàcia variable a la vacunació amb BCG i a què les vaques recent nascudes ja estan sensibilitzades amb micobactèries ambientals, igual que passa en humans. El problema d'usar vaques és que el seu patogen natural és *M. bovis* i no *M. tuberculosis*.

No hi ha un model universal que serveixi per tot. Cada model experimental té els seus avantatges i desavantatges. L'experimentador ha de conèixer bé la fisiologia del model triat i el fenomen que vol estudiar, per a triar correctament i treure conclusions fiables. A més, cal tenir en compte la logística i despeses econòmiques que suposa treballar amb un o altre model.

## **6. Biomarcadors**

El principal objectiu en un assaig clínic és demostrar que el candidat a vacuna és segur i eficaç contra la infecció a la que va dirigida. Així doncs, el segon objectiu és el d'elaborar un biomarcador que guardi correlació amb protecció. Una vegada ja s'ha definit el biomarcador i s'ha establert la correlació amb l'eficàcia de la vacuna, els resultats dels individus inclosos a l'assaig ja serveixen per a poder determinar si la vacuna és eficaç o no contra el procés infecciós avaluat.

### **6.1. Correlació amb protecció**

La FDA defineix *correlació amb protecció* com a aquell paràmetre determinat al laboratori i extret de resultats d'assajos clínics que ha demostrat estar relacionat amb protecció front la malaltia infecciosa [115].

### **6.2. Biomarcadors en TB**

L'ús de biomarcadors en TB té tres àrees d'aplicació:

- Pacients amb TB activa: ajudant a predir la durada del tractament per a evitar futures recaigudes.
- Pacients amb ITBL: per a poder determinar el risc de reactivació i poder instaurar una acció terapèutica correcte.
- Avaluació de l'eficiència protectora de les noves vacunes (tractat a continuació).

### **6.3. Avaluació de l'eficiència protectora de les noves vacunes**

En TB, encara no hi ha biomarcadors que es puguin correlacionar amb protecció. Hi ha evidències de possibles biomarcadors, però encara no s'han establert globalment.

Per exemple, se sap que tant la infecció natural com la vacunació amb BCG indueixen un augment de cèl·lules específiques secretores d'IFN- $\gamma$ . Ha estat un dels biomarcadors

més usats degut a la importància de les cèl·lules Th1 en la lluita del sistema immune contra la infecció.

Últimament, s'ha vist que la presència de cèl·lules multifuncionals correlaciona millor amb protecció, però encara falta acumular resultats i analitzar els obtinguts dels *Clinical trials* per a poder usar-lo com a biomarcador i valorar la protecció induïda per la vacunació. De fet, hi ha algunes publicacions que, precisament, demostren que els pacients amb TB tenen una elevada proporció d'aquestes cèl·lules [116].

En el camp de la TB s'han dut a terme experiments d'aquest tipus avaluant la capacitat bactericida de cèl·lules mononuclears o de sang total, induïda per la vacunació [117] [118] [119] [120]. De totes maneres, el seu valor predictiu per a poder ser usat com a biomarcador en l'avaluació clínica de candidats a vacuna antituberculosa en humans encara ha de ser estudiat.

## 7. Estratègies actuals

Les vacunes antitubercloses poden tenir diferents dianes d'actuació, com es mostra en el següent esquema dels diferents punts d'actuació d'aquestes.

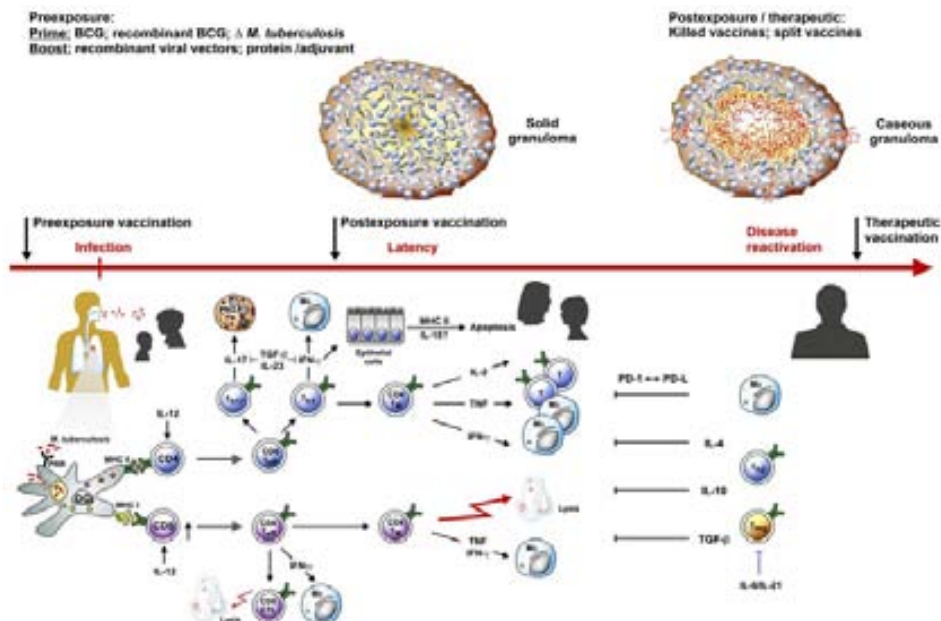


Figura de Parida et al., 2010 [13]



El desenvolupament i ús de les noves vacunes antituberculoses per a prevenir la malaltia a la infància i a adults, reduir la incidència de TB en coinfectats VIH-TB i escurçar la durada del tractament antibiòtic, ajudarà a controlar la infecció tot pensant en erradicar aquesta malaltia cap a l'any 2050.

Moltes de les vacunes que s'estan generant segueixen l'estratègia *heterologous prime-boost* complementant la immunitat generada per la vacunació prèvia amb BCG. En aquesta mateixa estratègia i enlloc de la BCG, també es poden usar vacunes vives recombinants generades per modificació de la pròpia BCG o d'una altre soca que es modifica per a atenuar-la i fer el *prime*, seguit de la inoculació d'una altra vacuna diferent que faria el *boost* de la immunitat generada per la primera (pre-exposició). També es pot fer el *booster* de la immunitat generada per la pròpia infecció (post-exposició).

## **8. Vacunes proteiques: Proteïnes recombinants / Bactèries mortes i/o fragmentades**

Durant dècades es pensava que les vacunes vives com la BCG eren l'única estratègia per a generar una resposta immunitària estable i mantinguda en el temps necessària per a combatre la infecció tuberculosa.

L'any 1994, Andersen *et al.* van publicar un treball sobre la capacitat protectora de les CFPs per bacils cultivats *in vitro* en fase logarítmica [121]. La publicació d'aquest treball demostrava que la immunització amb una vacuna no viva generada a partir de proteïnes secretades pels bacils tuberculosos conferia capacitat protectora en ratolins i cobais infectats amb MTB. Això va portar a l'inici de programes de recerca per a trobar antígens immunodominants útils en el desenvolupament de vacunes proteiques.

Els primers antígens amb els que es va treballar s'aïllaven de proteïnes filtrades dels sobrenedants de bactèries en creixement actiu *in vitro*. Es pensava que mimetitzaria la immunitat generada per les proteïnes secretades pels bacils vius a dins dels fagosomes a l'inici de la infecció i que es potenciaria la immunitat al principi de la infecció [121] [122].

Durant aquests últims anys, s'ha pogut veure que dins del conjunt de CFPs, hi ha antígens més immunogènics com ESAT-6, Ag85A, Ag85B i TB10.4. De fet, vacunes basades en aquests antígens estan actualment en assajos clínics seguint l'estratègia de fer *boosting* de la vacunació prèvia amb BCG [123] [124] [125] [126].

La mesura de l'eficàcia d'aquestes vacunes es basa primordialment en la seva capacitat per a controlar el creixement bacterià i la disseminació inicial. Els estudis preliminars sobre la seva eficàcia contra el bacil latent suggereixen que tenen una activitat limitada contra aquest. Tot i que s'ha demostrat l'eficàcia d'aquestes vacunes, s'ha de tenir en compte que el que fan és potenciar la immunitat que l'hostatger és capaç de generar a l'inici de la infecció i que el bacil tuberculós és capaç d'esquivar i generar una ITBL sobrevivint intracel·lularment gràcies a canvis en l'expressió genètica i per tant, en el repertori antigènic presentat al sistema immune. Les estratègies actuals en el desenvolupament de noves vacunes tenen en compte aquest detall, assumint que els antígens que s'afegeixen a les vacunes que s'haurien d'usar en individus latentment infectats no són els mateixos que a l'inici de la infecció. Per a generar una immunitat eficaç contra la ITBL s'haurien d'afegir els antígens expressats específicament pels bacils latents.

### ***8.1. Bacil en multiplicació activa vs bacil latent***

Una vacuna antituberculosa eficaç hauria de tenir en compte la complexitat del cicle vital del bacil tuberculós. A la fase aguda de la infecció, el bacil es multiplica ràpidament i l'hostatger desenvolupa una immunitat basada principalment en el reconeixement de bacils en multiplicació activa [121] [122] [127] [128].

Macròfags i limfòcits són reclutats al focus infeccions resultant en la formació dels granulomes. A partir d'aquest moment, a la majoria dels casos hi ha un control de la infecció per part del sistema immune, però com ja es coneix, el patogen no és eliminat i s'estableix un equilibri dinàmic hostatger-patogen molt important pel manteniment de la latència.

Durant la latència, el bacil es troba amb un ambient hostil en el que ha de sobreviure, suposant canvis en el seu metabolisme, expressió genètica i, per tant, en el repertori antigènic [129] [76] [130] [131].

Tenint en compte els canvis fenotípics que pateix el bacil tuberculós des de què infecta l'hostatger fins a l'establiment de la latència, una vacuna prometedora hauria de ser capaç de potenciar la resposta del sistema immune i presentar-li a aquest un ampli ventall d'antígens, incloent els expressats per les bacteries en multiplicació activa i aquelles en latència. Caldria doncs conèixer les condicions que fan que la bactèria canviï a un estat latent per tal de poder provocar aquests canvis *in vitro* i poder estudiar el perfil d'antígens expressat en aquestes condicions.

Se sap que el control del bacil latent en models experimentals requereix de la presència d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i NO [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [81]. L'exposició *in vitro* de la bactèria o de cèl·lules infectades a aquests factors i/o a concentracions baixes d'oxigen, ferro i manca de nutrients, provoca disminució de l'expressió de gens que estan sobreexpressats en les bacteries de pacients tuberculosos a l'inici de la infecció [76] [129].

S'ha treballat molt en aquesta línia per tal de generar condicions *in vitro* que simulin l'ambient en què es troba el bacil latent i poder estudiar els canvis que pateix. Wayne *et al.* van demostrar que una deprivació gradual d'oxigen en cultius *in vitro*, feia que la bactèria canviï el seu metabolisme respiratori reduint nitrats. Això suposava canvis metabòlics, cromosòmics i estructurals [139] [140] [141]. S'han identificat uns 4200 gens, l'expressió dels quals es veu ràpidament alterada en condicions d'hipòxia. 48 d'aquests gens estan regulats pel reguló *dosR*, que es sobreexpressa quan la bactèria detecta concentracions baixes (no tòxiques) de NO i sembla que la prepara per a la latència [142] [143] [144].

Una altra condició que es troba el bacil latent és la manca de nutrients. Duncan *et al.* van generar un model *in vitro* de latència (*non-replicating persistence*), provocant el creixement del bacil en condicions de manca de nutrients (*starvation*) i van poder detectar molts canvis transcripcionals. Van veure que alguns gens del reguló *dosR* també es sobreexpressaven però el perfil de gens dels quals es modificava la seva

expressió era diferent que en condicions d'hipòxia, suggerint per tant la intervenció d'un reguló diferent [76]. Molts dels canvis estaven relacionats amb el metabolisme de lípids, consistent amb la troballa de què els bacils de ratolins crònicament infectats expressaven isocitrat-liasa, que és un enzim essencial per a metabolitzar àcids grassos [145]. Les bactèries a dins dels macròfags activats (condicions de manca de nutrients), canvien el seu metabolisme i són capaces de degradar àcids grassos usant-los de font de carboni. De fet, s'ha vist que les bactèries crescudes a dins de macròfags murins activats o als pulmons de ratolins infectats, expressen enzims relacionats amb el metabolisme dels àcids grassos i també sideròfors per a poder captar el ferro més eficientment [143].

Sembla evident, doncs, que la bactèria latent s'adapta a les condicions hostils de la vida intracel·lular a través de múltiples canvis transcripcionals que s'han de tenir en compte en el disseny de vacunes, per tal que ajudin al sistema immune fent-lo capaç de localitzar al bacil latent i poder atacar-lo.

***IX. La RUTI®***



## **1. Eскурçament del tractament de la ITBL**

Durant la trajectòria del nostre grup, s'ha treballat en l'estudi de la ITBL i en el desenvolupament d'una vacuna terapèutica antituberculosa que permetés l'escurçament del tractament antibiòtic.

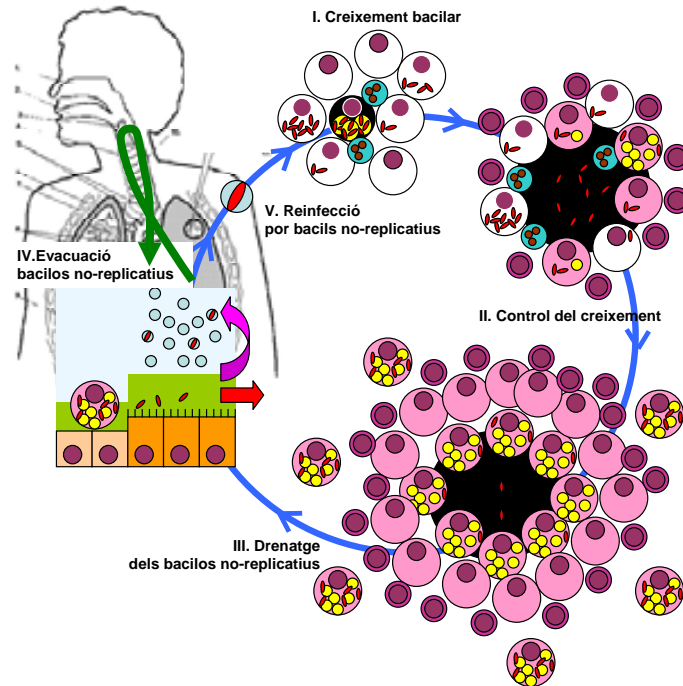
## **2. Desenvolupament de la RUTI®**

### **2.1. Bacils no replicatius**

Una vegada els bacils són inhalats i entren a l'espai alveolar, són fagocitats pels macròfags alveolars. A dins dels macròfags alveolars no activats, els bacils estan protegits del medi exterior hostil i allà podran replicar multiplicant-se de manera exponencial i provocant la necrosi d'aquests [146]. Els bacils s'alliberaran a l'espai extracel·lular, on seran fagocitats per nous macròfags que han estat reclutats al parènquima infectat atrets per quimiocines secretades pels macròfags infectats. Aquests macròfags tornaran a iniciar el procés fagocitant els bacils que s'alliberen al medi extracel·lular i sent destruïts pel creixement bacil·lar al seu citoplasma [147]. Així comença el procés inflamatori i la generació dels granulomes per acumulació de cèl·lules inflamatòries. Amb la mort cel·lular, s'alliberen enzims bactericides citoplasmàtics al teixit necròtic que es va envoltant d'una matriu de col·lagen. Tot això fa que aquest medi extracel·lular cada vegada sigui més hostil pels bacils (baixa pressió d'oxigen, pH àcid, etc...) [148].

És en aquest medi extracel·lular on els bacils alenteixen el seu metabolisme per a protegir-se de les condicions adverses que es troben, entren en un estat no replicatiu, fent-se *no visibles* pel sistema immune.

## 2.2. El cicle de la ITBL



Els bacils entren als alvèols pulmonars via aerosols. (I) Aquí són fagocitats pels macròfags alveolars (I) i comença la resposta immune per controlar la infecció. Un cop fagocitats, els bacils es divideixen a dins d'aquestes cèl·lules provocant la seva necrosi. Amb la necrosi dels macròfags infectats, els bacils que resten en estat no replicatiu són alliberats a l'espai extracel·lular i són fagocitats altre cop (II). Els macròfags infectats que es transformen en macròfags escumosos drenen els bacils no replicatius que han estat alliberats a l'espai extracel·lular i han estat fagocitats per ells. Un cop a l'espai alveolar passen a formar part del fluid alveolar (III), que ascendeix cap a l'espai bronquial superior, passant a l'esòfag i sent deglutits o tornant a formar part dels aerosols (IV). Aquests podran ser inhalats i tornar al parènquima pulmonar (IV) reinfectant-lo (V).



### 2.3. La immunitat cel·lular i durada del tractament amb INH

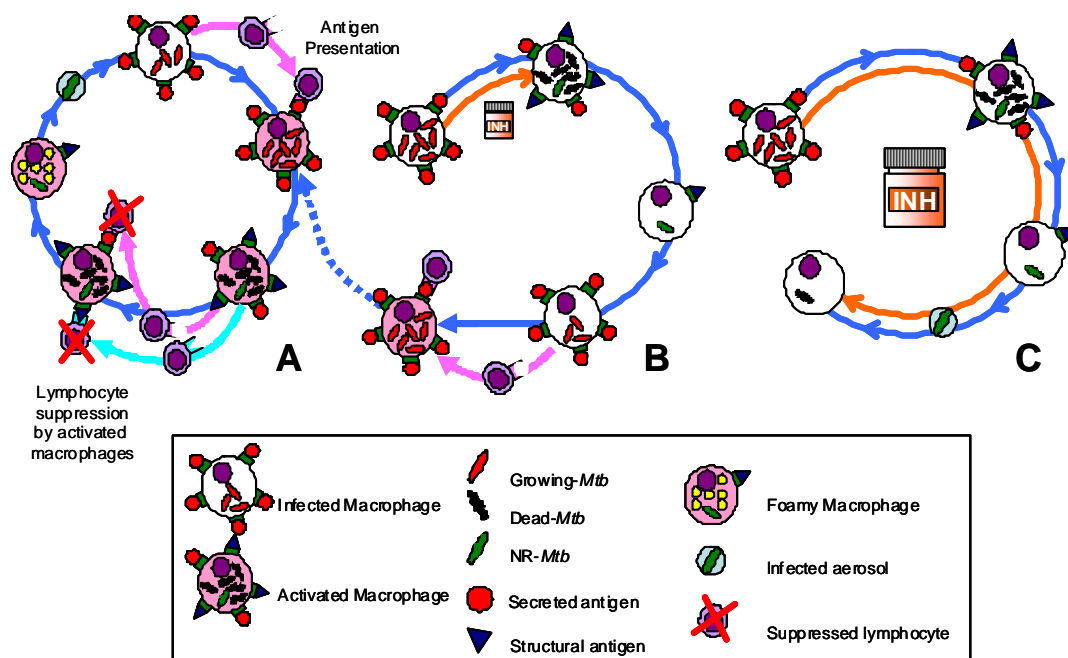


Figura de Cardona et al., 2011 [9]

Els macròfags activats presenten antígens secretats pels bacils vius en multiplicació activa. La prioritització de la resposta immune cap a aquests tipus d'antígens més immunogènics fa que no es respongui front antígens estructurals, permetent que els bacils no replicatius es puguin escapar i amagar de la immunitat generada contra la infecció (A). Tractaments curts amb INH destrueixen els bacils vius que es divideixen, però no així els bacils no replicatius, permetent que puguin reactivar un cop s'abandona el tractament (B). Per contrapartida, tractaments més llargs amb INH permeten destruir els bacils no replicatius un cop són fagocitats i comencen a dividir-se a dins del macròfag, reduint la càrrega de bacils no replicatius i el risc de reactivació un cop es retira el fàrmac (C).

La RUTI® és una vacuna terapèutica antituberculosa que està feta a partir de bacils crescuts en condicions progressives d'estrès (baixa pressió d'oxigen, baix pH, etc...). Aquestes condicions d'estrès es generen pel propi creixement del bacil en medi sòlid 7H11. S'ha demostrat que la generació progressiva d'aquestes condicions és favorable pels bacils perquè els permet preparar-se per a possibles condicions més severes, alentint el seu metabolisme com a la fase crònica de la infecció tuberculosa en ratolins. Aquestes condicions són també les que es troben els bacils als granulomes de

l'hostatger, sota un context d'immunitat activa, resposta inflamatòria força important, necrosi, fibrosi de la lesió, etc...

Per a fabricar la vacuna a partir d'aquests bacils *estressats*, aquests es van fragmentar, detoxificar i liposomar. La idea de fragmentar-los radicava en propiciar una millor presentació dels antígens de la paret cel·lular. Es detoxificaren (deslipidificaren) per tal d'eliminar els glicolípid superficials, com el LAM, que poden actuar d'endotoxina. També es van liposomar per tal d'afavorir la presentació antigènica. Com que la paret cel·lular de MTB té propietats adjuvants, no va ser necessari afegir cap adjuvant [149]. Després d'haver estat avaluada en models experimentals petits i haver superat tota la fase d'avaluació pre-clínica, es va dur a terme un assaig clínic de Fase I en humans i actualment està en Fase II.

### **3. Origen de la vacuna RUTI®**

La idea del desenvolupament de la RUTI® va néixer de l'observació de què els bacils extracel·lulars no replicatius no eren reconeguts pel sistema immune i escapaven de les lesions, drenats a dins dels macròfags escumosos. És per això que per a produir la vacuna es va partir d'un cultiu de bacils en fase estacionària que imités les condicions en què aquests es troben *in vivo*. D'aquesta manera, es potenciaria la immunitat contra aquells bacils que la resposta immune no és capaç de reconèixer i atacar.

### **4. Eскурçament del tractament quimioteràpic. Vacunació amb RUTI®**

El que es pretén amb la RUTI® és escurçar el tractament de la ITBL de 9 mesos a 1 mes, evitant els problemes de manca d'adherència i de toxicitat. Després del tractament antibiòtic es faria un *boosting* de la immunitat a través de la vacunació amb RUTI®.

### **5. Per què cal tractament antibiòtic previ a la vacunació?**

El que es pretén amb el tractament antibiòtic previ a la vacunació amb RUTI® és reduir la càrrega bacteriana inicial i homogeneïtzar totes les lesions. El que s'aconsegueix amb el tractament és aconseguir bacils latents a totes les lesions. A més, es redueix la càrrega bacteriana als teixits i, per tant, la resposta inflamatòria, tot reduint la presència de macròfags escumosos a les lesions. Aquests macròfags

escumosos són immunosupressors (A) i, per tant, si es vacunés amb RUTI® abans de fer el tractament antibiòtic no es podria fer el *boosting* dels limfòcits. Aquests serien suprimits localment permetent que els bacils latents s'escapessin i tornessin a començar el cicle.

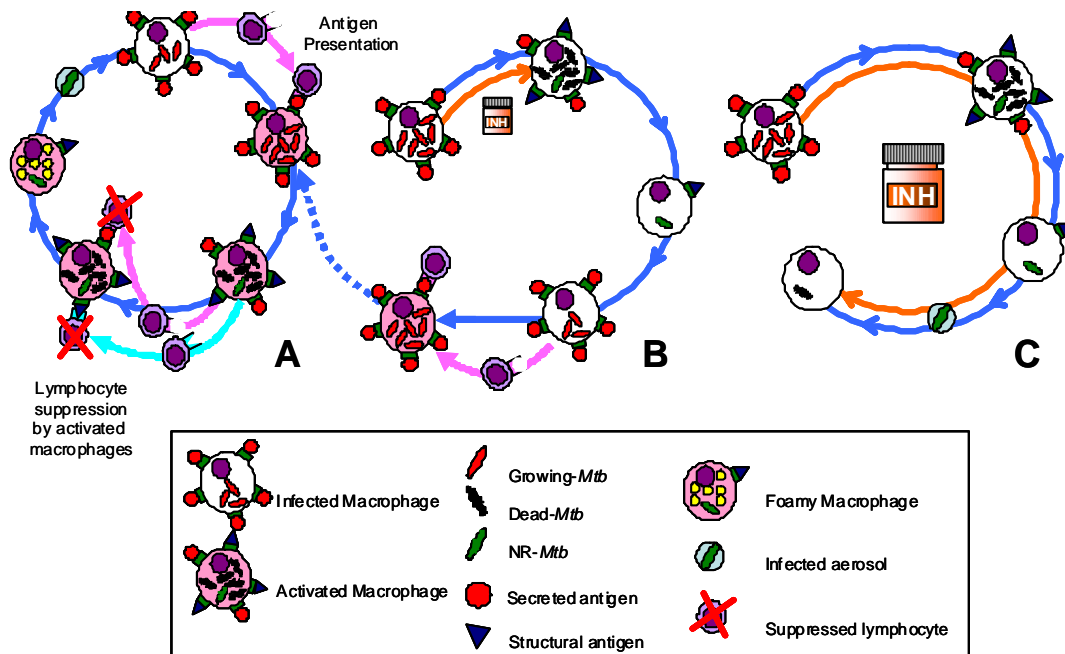


Figura de Cardona et al., 2011 [9]

Amb el tractament antibiòtic també es redueix la resposta inflamatòria, afavorint la reabsorció del teixit malmès i disminuint la probabilitat de què la vacunació amb RUTI® indueixi el Fenomen de Koch, si s'entén aquest com a una reacció d'Schwartzman. En reduir la resposta inflamatòria, la lesió deixa de ser una *zona preparada* i per tant, la vacuna tampoc seria la *injecció provocadora*, tenint en compte, també, que s'ha eliminat l'endotoxina.

## 6. Què fa exactament la RUTI®?

El que es fa amb la RUTI® és activar la immunitat contra aquells bacils que els limfòcits no veuen perquè no repliquen i no són reconeguts per la pròpia immunitat. Des del punt de vista de l'hostatger, és més important generar immunitat contra els bacils que estan en multiplicació activa perquè un ràpid augment de la càrrega bacteriana pot generar excessiu dany tissular.

### 6.1. Esquema del mecanisme d'acció

La següent figura representa l'estratègia del tractament de curta duració (1 mes) més la inoculació de la vacuna RUTI®. Si s'usés una pauta de quimioteràpia curta, els bacils no replicatius que sobreviuen al tractament, reactivarien en retirar els fàrmacs. Per tant, és necessària la vacunació amb RUTI® *a posteriori*.

Si no es vacunés després del tractament curt amb antibiòtic els bacils latents (no replicatius) que quedessin al pulmó sortirien de la fase *lag* i reactivarien, multiplicant a dins dels macròfags alveolars i tenint l'oportunitat d'infectar una nova zona del pulmó.

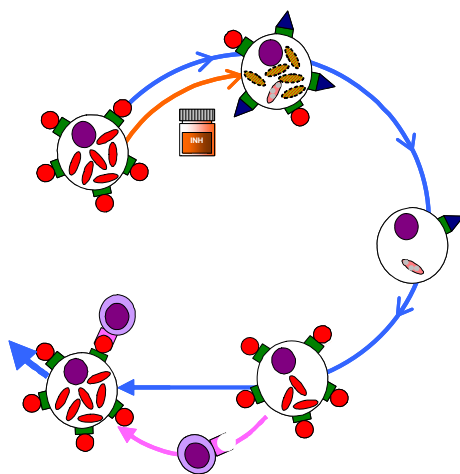


Figura de Cardona et al., 2011 [9]

## 7. Estudis pre-clínic

### 7.1. Avaluació de l'efectivitat i toxicitat de la RUTI® en model murí i cobai

Per a l'avaluació pre-clínica de l'eficàcia de la RUTI® com a vacuna terapèutica contra la ITBL, es va triar el model d'ITBL (crònic) en ratolí que desenvolupa una infecció crònica després de la infecció per aerosol amb una baixa dosi de bacils (50 UFCs a pulmó), amb una soca virulenta de MTB (H37Rv). Aquest és un model molt tolerant a la infecció tuberculosa, en el que per avaluar l'eficàcia de tractaments antituberculosos s'ha d'avaluar la seva capacitat per a reduir la càrrega bacteriana (més que per a esterilitzar) i el temps que perdura el control abans no reactiva la infecció.

En aquest model, la RUTI® va demostrar la seva eficàcia reduint la càrrega bacteriana significativament allargant el control de la infecció abans de la reactivació fins a 11 setmanes després de l'última inoculació de RUTI® [5], així com la seva capacitat per a induir una resposta immune contra antígens secretats pels bacils en multiplicació activa i antígens estructurals [150].

També es van portar a terme experiments per a avaluar l'eficàcia terapèutica de la RUTI® en el model de cobai. Degut a què és un animal més gran pot desenvolupar una resposta inflamatòria més potent, podent *permetre's* destruir una major àrea de parènquima pulmonar (segons la Teoria dels volums de l'hostatger). A més, no és tan tolerant a la infecció tuberculosa com el ratolí, convertint-lo en un model més semblant a l'humà que no pas el ratolí.

En aquest model animal, tot i que els animals no vacunats controlaven la infecció i no reactivaven, la RUTI® va ajudar a disminuir la càrrega bacteriana post-tractament antibiòtic [150].

Pel que fa a la bioseguretat de l'administració de la RUTI®, no es va observar cap efecte tòxic a nivell sistèmic (pèrdua de pes, augment de la temperatura general, signes de malestar animal) i que només es va observar inflamació local i transitòria al lloc d'inoculació, en el model de cobai.

## 7.2. Teoria dels volums

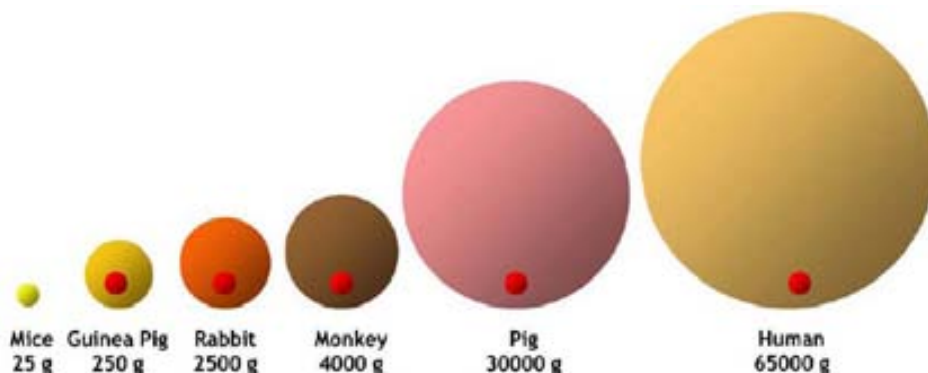


Figura de Cardona, 2006 [1]

En la figura anterior es pot veure una representació a escala basant-se en el volum total de cada model experimental/hostatger. En vermell es representa el volum que ocuparia una caverna tuberculosa.

Es pot veure que un ratolí no es pot *permetre el luxe* de desenvolupar una resposta inflamatòria potent induint la formació d'una caverna tuberculosa perquè l'espai pulmonar seria totalment ocupat. És per això que el ratolí és un model experimental molt tolerant, que malgrat tenir càrregues bacterianes molt elevades, no desenvolupa necrosi intragranulomatosa.

### 7.2.1. Evolució de la tuberculosi en el context de dany-resposta

Respostes dèbils a la infecció són insuficients (no suficient com per a beneficiar l'hostatger en la seva lluita particular amb l'agent infeccios), mentre que respostes excessivament fortes també són inapropiades (massa fortes, podent causar dany al propi hostatger).

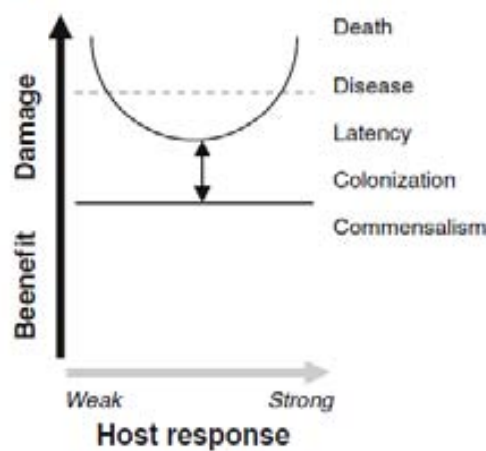


Figura de Cardona, 2010 [2]

L'eix d'ordenades representa la progressió del dany i el d'abscisses la intensitat de la resposta de l'hostatger. Amb una fletxa s'indica que la posició de la corba és variable i depèn de la interacció hostatger-patogen, sent diferent en cada hostatger en particular.

## **8. Immunitat generada per la RUTI®**

En experiments previs duts a terme en el model murí d'ITBL, es va poder comprovar que la inoculació de tres dosis de RUTI® separades per dues setmanes després de la finalització del tractament antibiòtic, generava una resposta poliantigènica de tipus Th1, Th2 i Th3 [5].

En estudis posteriors en els que es pretenia examinar la immunitat cel·lular generada per la RUTI®, es va comprovar que la inoculació de dos dosis de RUTI® espaiades 3 setmanes després del tractament antibiòtic, produïa un augment de 10 vegades el percentatge de cèl·lules T CD4+ secretores d'IFN- $\gamma$  en resposta a PPD, a l'igual que la vacunació amb BCG post-tractament antibiòtic. A diferència de la BCG, la RUTI® va provocar també un augment de 10 vegades dels nivells de CD8+ secretors d'IFN- $\gamma$  en resposta a PPD, ESAT-6, Ag 85B i els antígens estructurals de 16KDa i 38KDa [150].

En un altre estudi dut a terme amb ratolins *SCID*, es va demostrar que els anticossos del sèrum (com a teràpia després de 3 setmanes d'evolució de la infecció i 5 de tractament amb INH+RIF) de ratolins immunocompetents que havien estat infectats i tractats amb quimioteràpia+RUTI®, disminuïa la disseminació bacil·lar i l'àrea de parènquima pulmonar afectada [151].

## **9. Futur**

Encara que s'ha pogut avançar molt en l'estudi dels mecanismes d'acció i protecció de la RUTI®, encara falta molta feina per fer. Es necessita desenvolupar models experimentals amb una millor correlació entre els resultats i el que realment passa en humà. Per això caldria treballar amb models animals més humanitzats i de major volum que els ratolins i els cobais. Aquests ajudarien a entendre millor la immunopatologia humana deguda a la infecció i també poden desenvolupar una resposta inflamatòria major ajudant a l'avaluació de la toxicitat i l'absència del Fenomen de Koch.

### 10. Avaluació de la toxicitat de la RUTI® i la immunitat generada en individus sans en humans (Fase I)

Es va dur a terme un estudi de Fase I d'assaigs clínics amb placebos i doble-cec randomitzat per a determinar la bioseguretat de la inoculació de la vacuna RUTI® i la resposta immune de cèl·lules T. Es va seguir un total de 24 voluntaris durant 6 mesos després de la primera inoculació de la vacuna [4]. Es van avaluar 4 dosis diferents de la vacuna (5µg, 25µg, 100µg i 200µg) en grups de 4 voluntaris sans i 2 placebos per a cada dosi testada.

Aquest va ser el disseny experimental:

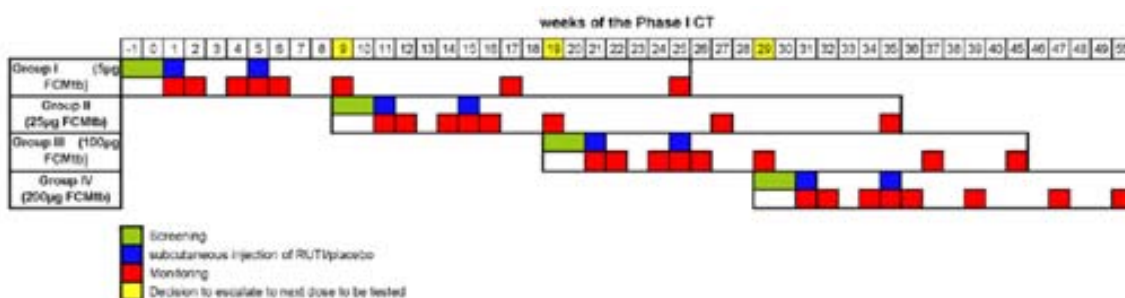


Figura de Vilaplana et al., 2010 [4]

En cap dels voluntaris no es va observar efectes tòxics sistèmics relacionats amb la vacunació. Només es van descriure els següents efectes sistèmics amb rellevància clínica: *exudative tonsillitis* i *salival litiasis*, però no es va relacionar amb la vacunació.

Systemic adverse events.

Preferred term	Causality	Intensity	Placebo (n=8)/5 (%)	RUTI® doses (in µg of FCMB)			
				5 (n=4)/5 (%)	25 (n=4)/5 (%)	100 (n=4)/5 (%)	200 (n=4)/5 (%)
Feeling of body T° change	Possibly	Mild	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Vasovagal Syncope	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	2/1 (25%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Rhinorrhea	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)
Sneezing	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)
Lymphadenopathy	Possibly	Mild	1/1 (12.5%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Nasopharyngitis	Possibly	Mild	1/1 (12.5%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Skin rash	Possibly	Mild	2/2 (25%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)

Number (%) of subjects reporting one or more treatment-emergent adverse events and number of AE occurrences by preferred term, possible or probable causality of the treatment and intensity (0= occurrences; 5= Subjects).

Figura de Vilaplana et al., 2010 [4]

Pel que fa als efectes locals al lloc d'inoculació de la vacuna, es va veure una relació directa amb la dosi testada (sent majors a dosis superiors). El més freqüent va ser *twitching* al lloc de la inoculació observant-se en tots el grups. També es va descriure eritema i inflamació moderada al lloc de la inoculació, sent major (p<0,05) als voluntaris inoculats amb les dos dosis més altes.



En dos voluntaris (un del grup de la dosi de 100µg i l'altre de la de 200µg) es va haver de biopsiar la lesió local al punt d'inoculació perquè es va observar *swelling* i es va demostrar que en els dos casos no hi havia bacils tuberculosos. Es va poder relacionar la reacció a una paniculitis granulomatosa que es va resoldre abans d'un mes.

Local adverse events.

Preferred term	Causality	Intensity	Placebo (n=8)(0)(%)	RUTI® doses (in µg of FCMtb)			
				5 (n=4)(0)(%)	25 (n=4)(0)(%)	100 (n=4)(0)(%)	200 (n=4)(0)(%)
Injection site pain	Possibly	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	1/1 (25%)
Twitching	Possibly	Mild	7/4 (50%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	10/4 (100%)	4/3 (75%)
Panniculitis	Probably	Mild	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)
	Possibly	Moderate	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)	1/1 (25%)	0/0 (0%)

Number (N) of subjects reporting one or more treatment-emergent adverse events and number of AE occurrences by preferred term, possible or probable causality of the treatment and intensity (0 = occurrences; 5 = Subjects).

Figura de Vilaplana et al., 2010 [4]

### 10.1. Immunitat

Es va avaluar la secreció d'IFN-γ per ELISA i ELISPOT i es va observar un augment de la secreció d'aquesta citocina, de manera dosi depenent. També es va poder comprovar que la RUTI® indueix una resposta poliantigènica i cèl·lules de memòria immunològica, tot i que no se sap quant temps perdura més enllà del que va durar la Fase I perquè no es va seguir als voluntaris després.

### 10.2. La tuberculina del segle XXI

Un dels objectius proposats en desenvolupar la RUTI® va ser el d'intentar evitar el Fenomen de Koch, causa del fracàs de la teràpia amb tuberculines. Havent-se identificat els lípids superficials dels bacils tuberculosos com a inductors d'aquest, es va eliminar els lípids superficials, com el LAM, de l'extracte de la vacuna, que podien actuar com a endotoxines i provocar una necrosi intragranulomatosa desmesurada (Fenomen de Koch).

La RUTI® ha demostrat la seva eficàcia en models animals com el ratolí i el cobai i ha superat una Fase I d'assaig clínics.



***X. Models animals***



## **1. A tenir en compte**

Tot investigador que treballi amb models animals ha de conèixer la fisiologia de cada un dels models i les seves limitacions. També s'ha de conèixer profundament la fisiopatologia del procés humà que es vulgui estudiar. Només així es podrà triar el model experimental que millor s'adapti a les seves necessitats.

No només s'ha de saber triar l'espècie animal amb la que treballar, sinó que també és molt important triar la via d'inòcul, la durada de l'experiment, els paràmetres que s'han d'estudiar i amb quina finalitat concreta, per tal de poder respondre a les preguntes que es plantegen abans de començar l'experiment.

Degut a què els models experimentals són meres aproximacions del que passa en humans, moltes vegades aporten indicis parcials del procés que s'està estudiant i requereixen de bon coneixement del model experimental per tal de poder obtenir conclusions correctes.

## **2. Models animals en TB**

Els models animals més usats en l'estudi d'aquesta patologia han estat el ratolí, cobai i conill. Malgrat que la susceptibilitat i la simptomatologia, d'aquestes tres espècies, a la infecció per MTB és molt diferent, les conclusions obtingudes dels estudis amb totes elles han servit per a conèixer la immunopatogènia, influència de les característiques genètiques de l'hostatger en la infecció, l'eficàcia de la teràpia antimicrobiana, interaccions hostatger-patogen, etc...

Aquests models animals han estat els més emprats en l'estudi *in vivo* de la TB, per diverses raons:

- Possibilitat d'infectar-los per la ruta d'infecció natural en humans.
- Desenvolupen immunitat innata i adquirida front la infecció tuberculosa.
- Inicialment controlen la infecció a pulmó (model d'ITBL).

A més d'aquestes tres espècies animals, els models experimentals de mico i vaques també han estat molt usats en l'estudi de la TB. Cada model té les seves peculiaritats i els seus mèrits en l'estudi de la TB humana.

### **3. Els clàssics**

#### **3.1. Model murí**

És un dels models experimentals més usats i no només per a TB perquè és barat, fàcil d'estabular i mantenir en condicions *spf* i en laboratoris de nivell 3 de bioseguretat pel seu tamany reduït.

Concretament com a model de TB, ha estat un model molt útil per a l'estudi de l'eficàcia de candidats a vacuna antituberculosa, mecanismes de la immunitat contra la infecció tuberculosa, contribució de mecanismes genètics en la susceptibilitat/resistència a la infecció, relació hostatger-patogen, etc....

És un model fàcil d'infectar per aerosol, en cas de tenir una màquina d'aerosolització. Aquesta ruta d'infecció permet infectar els animals d'una manera molt semblant a la via d'infecció natural en humans, podent inocular els bacils tuberculosos directament a pulmó i amb una dosi baixa. En aquest model, quan es parla de resistència realment es fa referència a la seva tolerància al bacil. El model murí és capaç de controlar la infecció, estabilitzant-se la càrrega bacteriana un cop s'estableix la resposta Th1 entrant en fase crònica.

Pel que fa a la resposta immune que desenvolupa, és molt semblant a la humana (cèl·lules CD4, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ) i per això ha estat molt útil per a l'avaluació de teràpies antituberculosos i vacunes profilàctiques i/o terapèutiques. Sobretot ha estat un model molt usat en les primeres fases d'avaluació de l'eficàcia de candidats a vacuna antituberculosa. Aquelles vacunes que presenten bons resultats en aquest model són posteriorment avaluades en d'altres.

Quant a la histopatologia, els granulomes tuberculosos que s'observen als ratolins en fase crònica de la infecció, són lleugerament diferents als humans. Es troben lesions

sense necrosi intragranulomatosa, amb una reacció fibròtica discreta, no encapsulades i amb presència de limfòcits, predominantment al centre de la lesió.

Degut al coneixement del genoma del ratolí, s'han pogut desenvolupar ratolins *KO* per a diferents gens i han permès estudiar la influència de diferents factors individualment, o desenvolupar models que permeten estudiar la infecció d'una manera més còmode.

### ***3.2. Conill porquí***

És un model que a l'igual que el ratolí, és fàcil d'infectar via aerosol per a poder simular millor la ruta d'infecció humana. És un animal menys tolerant a la infecció i, per tant, limita la durada dels experiments. Aquest model mimetitzava molts aspectes de la infecció tuberculosa en humans (especialment nens i malalts tuberculosos immunosupressors) i desenvolupa una forta resposta de tipus DTH [152].

Es caracteritza per desenvolupar una forta resposta inflamatòria a diferència del model murí, observant-se necrosi intragranulomatosa amb mineralització i fibrosi, sense encapsulament de les lesions. A l'igual que en humans, es poden observar macròfags al centre de les lesions i també cèl·lules gegants o cèl·lules de Langhans molt característiques de les lesions humanes.

Degut a la forta resposta inflamatòria que genera front la infecció tuberculosa, és un model molt útil per a avaluar teràpies antituberculosos i candidats a vacuna que hagin donat bon resultat en el model murí, en el qual el paràmetre d'estudi seria la reducció del dany tissular.

El punt feble d'aquest model és que a diferència dels humans en els quals la gran majoria de persones infectades poden controlar la infecció, aquest és un model susceptible. És més car que el ratolí, més difícil d'infectar i no es disposa de gaires reactius per poder avaluar la resposta immunològica que es desenvolupa.

### 3.3. Conills

Aquest model es caracteritza per desenvolupar lesions molt semblants a les humanes i tenir una capacitat molt elevada de controlar la infecció. Els experiments de Lurie *et al* van portar a la descripció de dues soques de conill: els susceptibles (*inbred*) i els resistents (*outbred*) a la infecció per aerosol. Es va veure que les soques resistents eren capaces de desenvolupar lesions cavitades.

Encara que la infecció per MTB porta a la formació de lesions cavitades, eventualment poden arribar a curar la infecció [153]. Els conills són més susceptibles a la infecció per *M. bovis* i la patologia pulmonar que desenvolupen després de la infecció per aquesta micobactèria és més semblant a la infecció humana per MTB que la desenvolupada pels ratolins o els cobais [153].

Igual que pels conills porquins, no hi ha gaires reactius disponibles al mercat per a poder estudiar la resposta immunològica. A més, és difícil trobar soques *inbred* i s'han de fer els experiments amb conills *outbred*, fet que fa que hi hagi molta variabilitat en els resultats obtinguts. El fet que siguin més cars de mantenir i necessitin espais més grans per a ser estabulats, fa que no sigui un model experimental tan extensament usat en l'estudi *in vivo* de la infecció tuberculosa, com ho són els ratolins i els conills porquins.

## 4. Altres models

### 4.1. Macac

Les dues espècies de macac que han estat més emprades per a estudis experimentals d'infecció tuberculosa han estat *Macaca mulatta* (*Rhesus*) i *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*), sent aquesta última la més resistent i en la que es veu una millor protecció per la BCG.

El model de mico, degut a la seva proximitat filogenètica amb els humans, és un model molt útil per a poder estudiar la immunogenicitat i patogènia de la infecció tuberculosa. Aquest fet i l'àmplia disponibilitat de reactius, fan que sigui un model del que es poden treure resultats fàcilment extrapolables als humans.



S'infecten amb una dosi baixa de bacils i desenvolupen una ITBL amb reactivació espontània igual que en humans. Encara que és possible infectar-los per aerosol, és necessari disposar d'equipament especialitzat.

Un dels inconvenients d'aquest model és que és molt car i per això s'usa per candidats a vacuna que ja han estat avaluats amb èxit en altres models menys cars. A més, per estabular-los, infectar-los, etc... calen instal·lacions molt especialitzades i una inversió important.

No es disposa de soques *inbred*, així que tots els treballs s'han fet amb *outbred*, fent que hi hagi més variabilitat en els resultats però alhora aquests són més representatius d'una població humana normal.

És un bon model susceptible a la infecció per MTB, que desenvolupa infecció latent en un 60% dels casos i que transmet la infecció horitzontalment, per aerosols. La transmissió horitzontal per via aèria és molt més freqüent en aquest model i no pas a ratolins, cobais i conills [154].

#### **4.2. Vaques**

Un dels grans avantatges d'aquest model és poder treballar amb l'hostatger natural, donant-li un valor afegit perquè la interpretació dels resultats dels estudis de protecció de les vacunes es fan sobre el mateix tàndem hostatger-patogen que a la infecció natural. La patogènia de la infecció és molt semblant a la humana, desenvolupant lesions granulomatoses similars. A més, és un bon model d'ITBL en el que la malaltia tuberculosa triga molts anys en desenvolupar-se i que desenvolupa lesions granulomatoses i una resposta immune molt semblants als humans.

Un altre avantatge és que les vaques són immunocompetents en el moment de néixer, igual que els humans i, estan exposades a antígens de micobactèries ambientals també des del primer moment, fent possible els estudis de vacunes en etapa neonatal.

Com a desavantatges d'aquest model, dir que són ruminants i per tant, tenen una fisiologia bastant diferent a la nostra. A més, la micobactèria que es fa servir en aquest

model és *M. bovis* enlloc de MTB. No desenvolupen lesions cavitades i el cost que suposa mantenir aquests animals és molt alt.

Degut als paral·lelismes entre la TB bovina i la humana i a l'interès de la comunitat veterinària en eliminar la TB bovina de les granges, s'han fet molts estudis de camp amb aquest model que ha estat molt usat per a l'estudi de vacunes vives atenuades de *M. bovis*, vacunes DNA i vacunes proteiques [155] [156].

Hi ha alguns reactius disponibles al mercat per a l'estudi de la immunitat en aquest model. De fet, una de les eines diagnòstiques que s'estan usant actualment en humans pel diagnòstic de la ITBL es va desenvolupar per a ser usada en aquest model.

### **4.3. Zebrafish**

Aquest model permet estudiar les interaccions hostatger-patogen durant la resposta innata abans que es desenvolupi la resposta adaptativa. L'avantatge d'aquest model és la transparència de l'animal ja que permet estudiar a temps real la formació del granuloma *in vivo*. Va servir per a demostrar que els granulomes eren estructures dinàmiques i no lesions estanques com es creia antigament.

L'espècie de micobactèria que es fa servir per a infectar aquest model animal és *M. marinum* ja que el *Zebrafish* és naturalment susceptible a la infecció per aquesta espècie. Això fa que es pugui treballar amb aquest model sense necessitat de disposar d'instal·lacions amb nivell de bioseguretat 3.

*M. marinum* és una espècie filogenèticament molt propera a MTB [157]. Quan *M. marinum* infecta els ectotèrms dels *Zebrafish*, és fagocitat pels macròfags i replica a dins d'ells igual que MTB [158].

El fet diferencial d'aquest model és que durant les primeres fases de desenvolupament de l'embrió aquest és transparent i ens permet estudiar a temps real el que passa a l'hostatger a mesura que es desenvolupa la infecció. L'embrió disposa de macròfags competents circulants ja des de l'inici del desenvolupament encara que no disposi

d'immunitat adaptativa. Això permet monitoritzar intravitalment els inicis de la infecció, així com la immunopatogènia de la immunitat innata i de l'adaptativa.

Una de les aplicacions d'aquest model, gràcies a la seva qualitat de transparència dels embrions, és la identificació visual de la interacció entre la bactèria i el sistema immune des del primer moment de la infecció. Alguns dels problemes de l'ús d'aquest model és la manca de reactius, així com d'animals transgènics i soques *inbred*.

### ***5. El model experimental correcte***

Encara que tenim diversos models experimentals disponibles per a estudiar el desenvolupament de la infecció, la patogènia de la malaltia, avaluació de vacunes, quimioteràpics i diferents pautes terapèutiques, cap model mimetitzava al 100% el que realment passa en humans. Per tant, l'avaluació de tractaments i vacunes s'hauria de fer en més d'un model experimental. La tria d'un o d'altre model depèn del preu dels animals, espai requerit i disponible, del nivell de bioseguretat requerit a les instal·lacions, necessitat de personal específicament entrenat, etc...



## ***HIPÒTESIS I OBJECTIUS***



## **1. Hipòtesis**

Les hipòtesis plantejades abans de dissenyar els experiments duts a terme en aquesta tesi doctoral varen ser:

- La RUTI® és una vacuna poliantigènica generada a partir de bacils crescuts en condicions estressants que podrà ajudar al sistema immune a reconèixer els bacils no replicatius que escapen de la immunitat.
- La inoculació de la RUTI® en models experimentals filogenèticament més propers als humans i que poden desenvolupar una resposta inflamatòria i patogènica semblant a la dels humans no provocarà Fenomen de Koch degut a la detoxificació de l'extracte i als bons resultats obtinguts en model murí i en un model més susceptible com el cobai.
- La inoculació de la RUTI® en models experimentals filogenèticament més propers als humans, en comparació amb els ratolins o els cobais, com és el model de cabra naturalment infectada, demostrarà l'eficàcia de la vacuna RUTI® en humans.
- El desenvolupament d'un model experimental d'ITBL amb porcs, que són fisiològicament i immunològicament molt semblants als humans, permetrà l'establiment d'un model que mimetitzarà el que passa en humans i servirà d'eina per a l'estudi de futurs candidats a vacuna o tractament, així com l'avaluació de l'eficàcia terapèutica de la RUTI®.
- La ITBL és una conseqüència de constants reinfeccions endògenes.





## **2. Objectius**

Per a poder demostrar cada una de les hipòtesis plantejades es van dur a terme diferents estudis amb objectius concrets:

- Avaluar els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI® en el model murí d'ITBL infectat intraperitonealment, com a complement de la quimioteràpia.
- Valorar l'eficàcia terapèutica de la RUTI® després d'un tractament antibiòtic de curta duració (1 mes) en cabres naturalment infectades i amb un baix grau d'afectació patològica.
- Desenvolupar un model experimental d'ITBL en *minipigs spf* que permeti estudiar la immunopatologia de la infecció tuberculosa humana i demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la latència. Aquest model hauria de servir d'eina per a avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de futurs candidats a vacuna o tractament contra la ITBL, a més de servir per avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de la RUTI®.



## ***RESULTATS***



*1. Avaluar els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI® en el model murí d'ITBL infectat intraperitonealment, com a complement de la quimioteràpia.*



L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI®, com a complement de la quimioteràpia amb INH i RPT en el model murí infectat intraperitonealment amb MTB H37Rv.

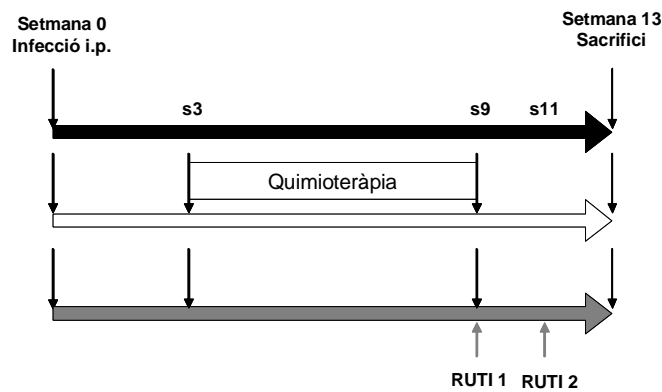
Ja s'havia demostrat amb anterioritat que la RUTI® potenciava la resposta immunològica contra antígens secretats per bacteries en multiplicació activa, tenint un efecte protector en el model murí d'ITBL infectat per aerosol amb baixa dosi de bacils [5] [150].

En aquest estudi es va voler usar el model d'infecció intraperitoneal perquè es va pensar que podria ser adequat per a reduir la durada de l'experiment, perquè aquesta via d'infecció accelera la presentació antigènica. Després de la injecció intraperitoneal de substàncies inerts, materials radioactius, proteïnes i bacteries, aquestes són absorbides ràpidament (2 hores en el cas de les bacteries) i drenades als limfonodes i arribant als pulmons en 24 hores. Així, s'aconsegueix més ràpidament un model de TB latent, havent-se demostrat anteriorment que ratolins inoculats amb  $4 \times 10^4$  i  $4 \times 10^5$  UFCs intraperitonealment, desenvolupaven una infecció crònica (latent) sense reactivar durant 107 setmanes [159].

En aquest estudi, els animals es van infectar amb  $1 \times 10^5$  UFCs provinents d'un cultiu de bacteries crescudes en medi líquid Proskauer-Beck fins a fase logarítmica de creixement. Aquest va ser alíquotat i congelat a  $-70^\circ\text{C}$  fins al moment de la infecció, permetent la presència d'un alt percentatge de bacils morts a la suspensió bacteriana inoculada.

## 1. Experiment

Ratolins femella de 7 setmanes d'edat, de la soca C57/BL6 *resistent* a TB [102], varen ser infectats intraperitonealment amb  $1 \times 10^5$  UFCs. Després d'infectar els animals, es van dividir en tres grups experimentals i es va deixar progressar la infecció fins a la setmana 13 post-infecció, que és quan es varen sacrificar per sobredosi d'isofluorà, per tal de determinar la càrrega bacteriana a melsa, a les setmanes 3, 9 i 11.



**Figura 1.** Esquema del disseny experimental.

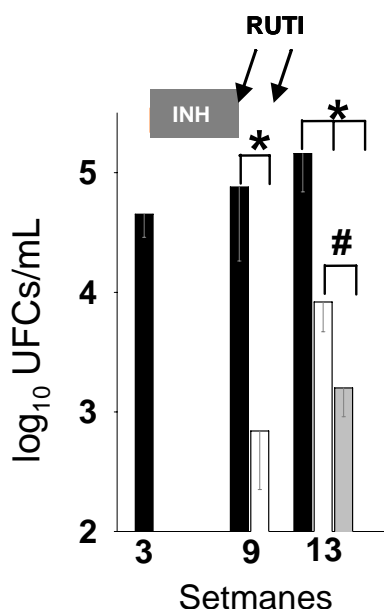
Un cop infectats, es va dividir els animals en 3 grups experimentals:

- Grup control (negre): infectats i no tractats.
- Grup tractat amb quimioteràpia (blanc): infectats i tractats amb INH (25 mg/kg) + RPT (10mg/kg) un cop per setmana, de la setmana 3 a la 9.
- Grup vacunat amb RUTI® (gris): infectats i tractats amb INH (25 mg/kg) + RPT (10mg/kg) un cop per setmana, de la setmana 3 a la 9, més dos inoculacions de RUTI®, la primera a la setmana 9 i la segona a la setmana 11.



## 2. Determinació de la càrrega bacteriana en melsa

Després de sacrificar els animals, es va recollir la melsa i es va disgregar mecànicament i homogeneïtzar en aigua destil·lada estèril, per tal de poder-la sembrar en plaques de medi sòlid 7H11 i poder calcular la càrrega bacteriana.



**Figura 2.** Representació de la càrrega bacteriana ( $\log_{10}$ ) a melsa a la setmana 13 post-infecció. En negre es representen els resultats del grup control infectat i no tractat. En blanc el grup tractat amb quimioteràpia i en gris el grup vacunat amb RUTI®. Les barres representen el valor de la mitjana del  $\log_{10}$  de les UFCs/mL  $\pm$  desviació estàndard. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) amb el grup control es representen amb un \* i amb el grup tractat amb quimioteràpia amb una #.

Després de sembrar les plaques, es van incubar quatre setmanes (37°C) i es van comptar les UFCs/mL de teixit homogeneïtzat. Es va poder observar que el tractament antibiòtic va reduir la càrrega bacteriana de  $4,88 \pm 0,62 \log_{10}$  UFCs/mL al grup control a  $2,84 \pm 0,49 \log_{10}$  UFCs/mL al grup tractat amb quimioteràpia, a la setmana 9 post-infecció.

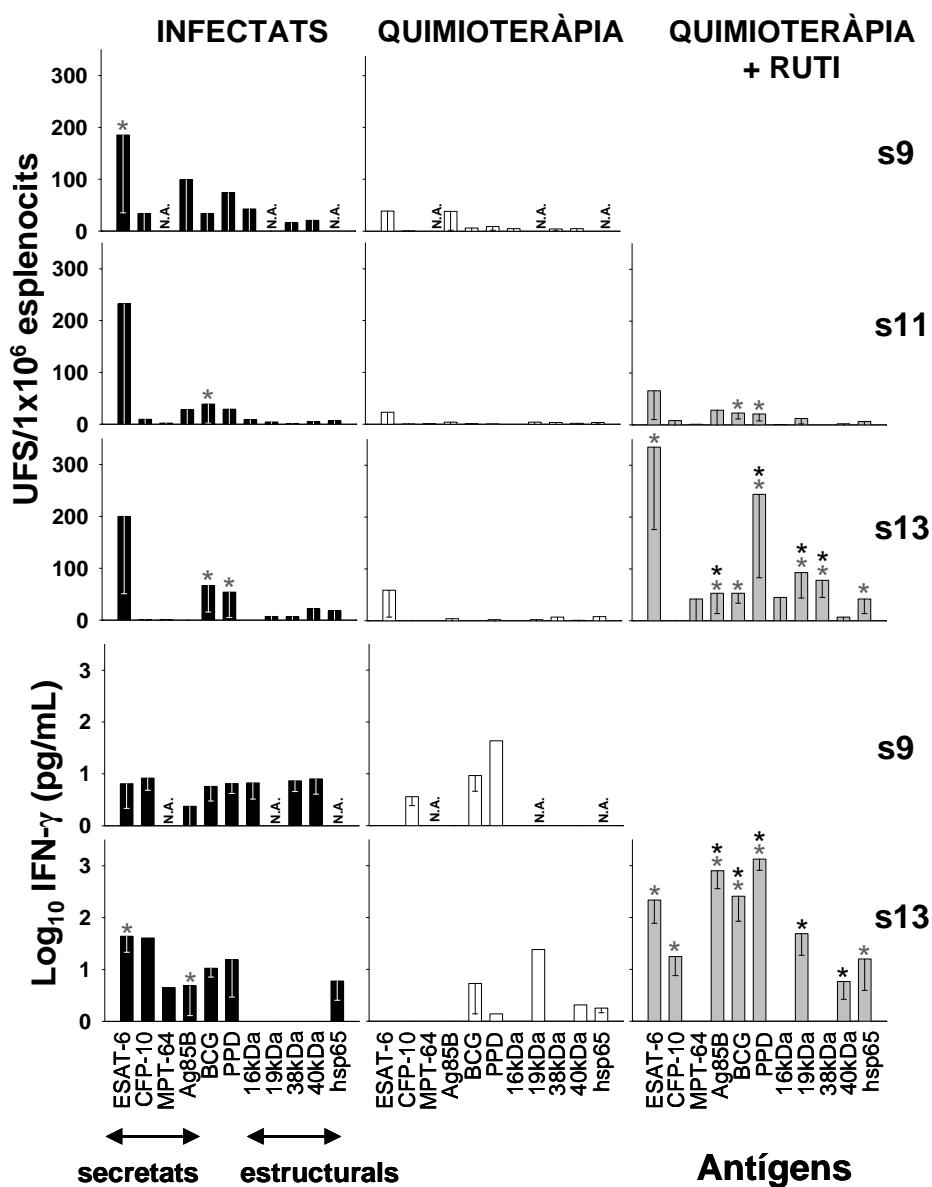
Quatre setmanes després de finalitzar el tractament antibiòtic (s13), en els animals del grup tractat amb quimioteràpia es va veure una reactivació de la infecció, trobant  $3,92 \pm 0,25 \log_{10}$  UFCs/mL vs els  $2,84 \pm 0,49 \log_{10}$  UFCs/mL obtinguts just finalitzar el tractament antibiòtic. Tot i així, la càrrega bacteriana continuava sent més baixa que al grup control, que tenien  $5,16 \pm 0,32 \log_{10}$  UFCs/mL.

La vacunació subcutània de RUTI® a les setmanes 9 i 11 va ajudar a controlar la reactivació post-quimioteràpia, fent que els animals d'aquest grup presentessin la càrrega bacteriana més baixa a setmana 13, sent de  $3,23 \pm 0,24 \log_{10}$  UFCs/mL.

### 3. Determinació de la secreció d'IFN- $\gamma$ induïda per la vacunació amb RUTI®

Es van dur a terme experiments *ex vivo* per tal de determinar el número de UFS o cèl·lules secretores d'IFN- $\gamma$  per ELISPOT, i la producció d'IFN- $\gamma$  per ELISA, per part dels esplenòcits.

Per a dur a terme aquestes dues determinacions, es van cultivar les cèl·lules 16h en cas de l'ELISPOT i es van recollir sobrenedants de cultius de 72h per a determinar l'IFN- $\gamma$  per ELISA. Els estímuls usats en aquests cultius *ex vivo* varen ser PPD (10  $\mu$ g/mL), BCG (10<sup>6</sup> UFCs), ESAT-6, CFP-10, MPT-64, Ag 85B, Ag 16kDa, Ag 19kDa, Ag 38kDa, Ag 40kDa, i Hsp65 (5  $\mu$ g/mL).



**Figura 3.** Representació de les UFS i de l'IFN- $\gamma$  secretat pels esplenòcits mitjançant la tècnica de l'ELISPOT (adalt) i d'ELISA (abaix). En negre es representen els resultats del grup control infectat i no tractat. En blanc el grup tractat amb quimioteràpia i en gris el grup vacunat amb RUTI. A la dreta de la gràfica es pot veure la setmana en què es va dur a terme l'assaig i a la part inferior de la figura, els antígens usats per als cultius *ex vivo*. En tots els casos i, per ambdues tècniques, es va restar el valor basal obtingut de la resposta sense estímul. Les barres representen el valor de la mitjana del paràmetre representat a cada una de les tècniques  $\pm$  desviació estàndar. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) amb el grup control es representen amb un \* i amb el grup tractat amb quimioteràpia amb un \*. N.A. vol dir No Avaluat.

Es va veure que la resposta dels esplenòcits als estímuls emprats va ser major en el grup d'animals vacunats amb RUTI® que als altres dos, tant per ELISPOT com per ELISA.

D'aquesta observació es va deduir que la RUTI® fa un *boosting* de la immunitat generada per la pròpia infecció (antígens secretats) i per la quimioteràpia (antígens estructurals) i que la resposta generada per la RUTI® és poliantigènica tant pel que fa als antígens secretats, com pel que fa als antígens estructurals.



***II. Valorar l'eficàcia terapèutica de la RUTI® després d'un tractament antibiòtic de curta duració (1 mes) en cabres naturalment infectades i amb un baix grau d'afectació patològica.***



L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar un nou règim terapèutic contra la ITBL, basat en l'administració de quimioteràpia seguit de vacunació amb RUTI®, en models experimentals d'ITBL més semblants als humans.

Aquest règim terapèutic permet reduir la càrrega bacteriana i la població de bacils en multiplicació activa, inicialment. A més, redueix la resposta inflamatòria i l'ambient immunosupressor local (al granuloma) pel drenatge del macròfags escumosos, gràcies a la quimioteràpia. En una segona etapa, quan es retira la quimioteràpia i s'administra la vacuna terapèutica RUTI®, es genera una immunitat cel·lular en contra de bacils *latents* (no replicatius) [1], gràcies al *boosting* de immunitat contra antígens estructurals, degut a la vacunació amb RUTI® [160].

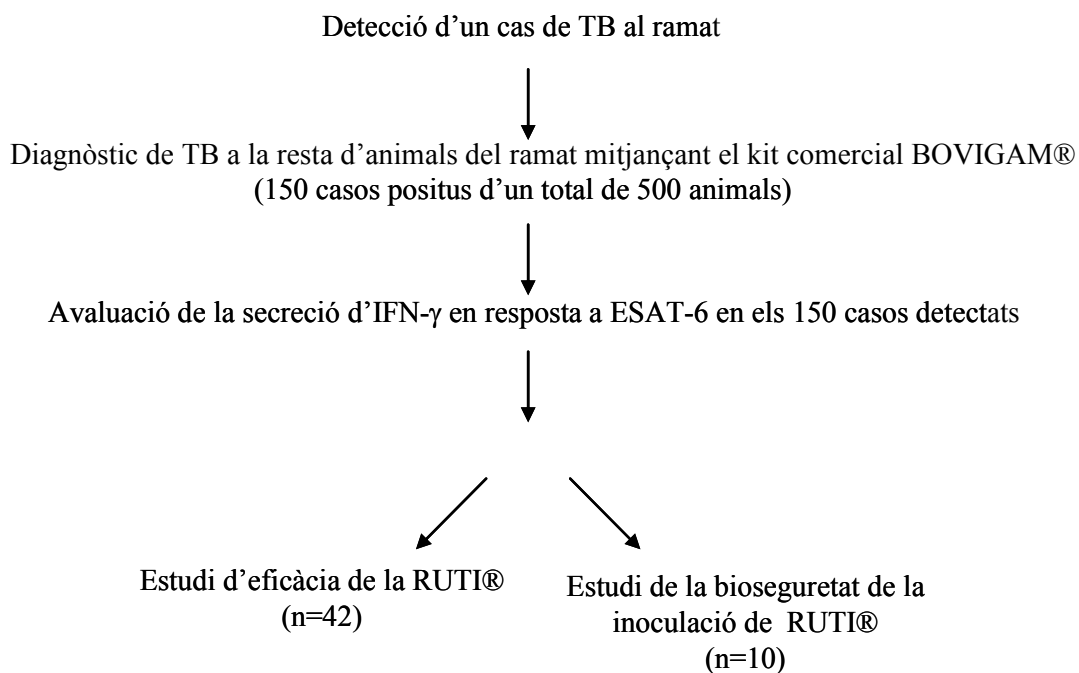
Ja s'havia demostrat l'eficàcia d'aquest règim terapèutic en estudis anteriors en models experimentals de tamany petit com ratolí i cobai [5] [1] [150], però es necessitava avaluar-lo en models experimentals majors que poguessin desenvolupar una resposta inflamatòria major i, per tant, permetessin avaluar no només l'eficàcia terapèutica, sinó també la bioseguretat de l'administració de RUTI® en humans.

## 1. Experiment

Aquest estudi es va dur a terme amb cabres naturalment infectades per *M. caprae* (membre de *MTB complex*). Tant en el cas d'infecció experimental com natural, aquests animals desenvolupen TB pulmonar amb afectació dels ganglis de drenatge pulmonar i, també, TB disseminada apareixent lesions a fetge i melsa.

Basant-nos en un estudi anterior en què es va demostrar la correlació entre la resposta a ESAT-6 i el grau d'afectació patològica pulmonar [16], es va fer servir la mesura de la secreció d'IFN- $\gamma$  específica en resposta a ESAT-6, juntament amb l'examen radiològic com a paràmetres d'*screening* dels animals, per tal de dividir-los en diferents grups experimentals i dur a terme els estudis d'eficàcia i bioseguretat de la vacunació amb RUTI®.

## 2. Disseny de l'experiment



**Figura 4.** Esquema del disseny experimental



Després de detectar un cas de TB en un ramat de cabres femella a Viladordis (Manresa, Barcelona), es va testar a la resta d'animals estimulant sang total amb PPD-A i PPD-B i mesurant la secreció d'IFN- $\gamma$  post-estimulació, usant el kit d'ELISA comercial BOVIGAM®. Així, es van poder detectar un total de 150 animals infectats, dels que després es va demostrar que l'agent causal era *M. caprae*.

En els animals infectats, es va tornar a fer l'ELISA comercial BOVIGAM® de mostres de sang total estimulades amb ESAT-6, per tal de poder avaluar la secreció d'IFN- $\gamma$  *ex vivo*. Gràcies als resultats d'aquesta determinació es va poder classificar els animals segons la magnitud d'aquesta resposta. D'aquesta manera, es van poder dividir els animals en 3 grups:

- Animals amb diferents nivells de resposta a ESAT-6, per a l'estudi de correlació entre aquesta resposta i el grau d'afectació patològica. (n=20)
- Animals amb nivells de resposta baixos a ESAT-6, per a l'estudi de l'eficàcia de la vacuna. (n=42)
- Animals amb diferents nivells de resposta a ESAT-6, per a l'estudi de la bioseguretat de la vacunació. (n=10)

### **3. Estudi de la correlació entre la resposta a ESAT-6 i el grau d'afectació patològica (n(20-1)=19)**

Es va triar un total de 20 animals amb diferents nivells de secreció d'IFN- $\gamma$  específica, en resposta a l'estimulació *ex vivo* de sang total amb ESAT-6 i es van sacrificar per tal d'examinar exhaustivament l'afectació patològica mesurant el número de lesions i la descripció histològica d'aquestes als diferents lòbuls pulmonars, fetge, melsa i diferents ganglis pulmonars (traqueobronquial, cranial i caudal mediastínic) i extrapulmonars (mesentèric, hepàtic i retrofaringi).

Una vegada obtingut el bloc pulmonar sencer de cada animal, es va avaluar la presència de lesions perifèriques i després es va tallar en seccions de 2mm de gruix (*slicing*), per tal d'avaluar les lesions internes.

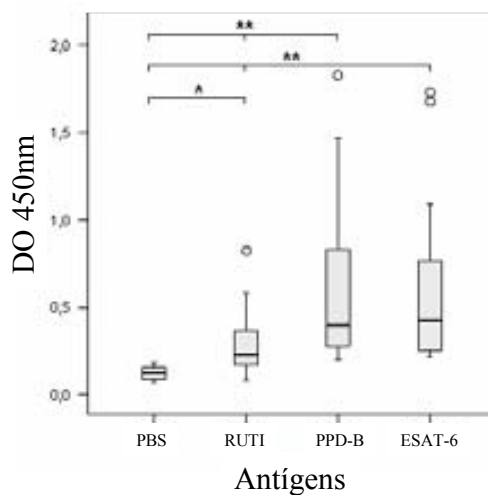
El grau d'afectació patològica es va calcular segons els valors descrits anteriorment (veure taula).

Grau d'afectació patològica	Tipus de lesió
0	Absència de lesions visibles
1	Lesions de <10mm de diàmetres que sols són evidents si es fa l' <i>slicing</i> de la mostra.
2	≤5 lesions de <10mm de diàmetre
3	>5 lesions de <10mm de diàmetre o 1 lesió de ≥10mm de diàmetre
4	>1 lesió de ≥10mm de diàmetre
5	Lesions coalescents

**Figura 5.** Taula feta servir pel càlcul del grau d'afectació patològica. De Voredermeier et al., 2002 [16]

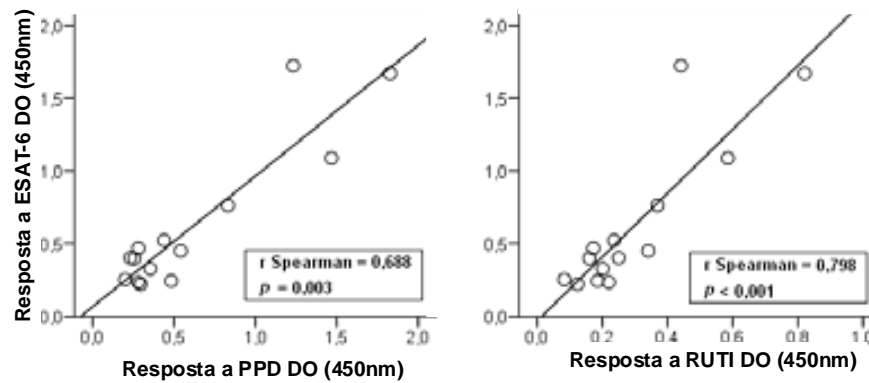
Per a poder dur a terme l'estudi de correlació es va fer un experiment amb l'objectiu de triar l'estímul a usar en els cultius *ex vivo*. Es va estimular sang total de 14 animals amb PBS (control, resposta basal), PPD-B (10 µg/mL), ESAT-6 (5 µg/mL) i RUTI® (20 µg/mL). Després de 18 hores d'estimulació, es va recollir el sobrenedant i es va avaluar l'IFN-γ secretat, per ELISA.

No es van veure diferències estadísticament significatives entre la resposta a PPD-B i ESAT-6, mentre que ambdues respostes van ser superiors a la resposta basal i a la resposta a RUTI®.



**Figura 6.** Representació de l'alliberament d' $IFN-\gamma$  comparant 3 antígens diferents utilitzats com a estímul i PBS com a control sense estimular. La quantitat de  $IFN-\gamma$  va ser mesurada per ELISA DO(450nm). Els antígens utilitzats van ser els següents: PBS (control negatiu), RUTI® (20 $\mu$ g/ml), PPD-B (10 $\mu$ g/ml) i ESAT-6 (5 $\mu$ g/ml). \* $p=0,003$  i \*\* $p=0,001$  pel test de Mann-Whitney-Wilcoxon.

A més de l'avaluació de la magnitud de la resposta a cada un d'aquests antígens, també es va avaluar la correlació entre la resposta a tots ells amb la de l'ESAT-6 i es va veure que tant la resposta a PPD-B, com la resposta a RUTI® presentaven una correlació positiva amb l'obtinguda usant ESAT-6.

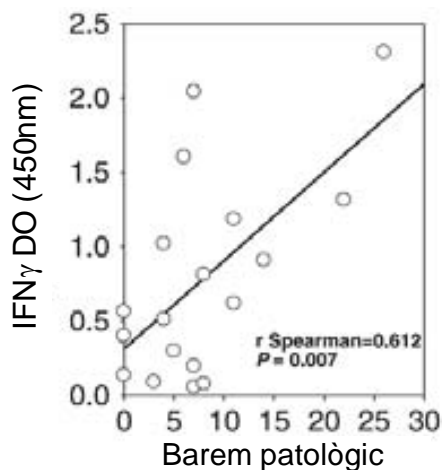


**Figura 7.** Correlació positiva entre la resposta individual de secreció d' $IFN\gamma$  en resposta a ESAT-6 (5 $\mu$ g/ml) i a PPD-B (10 $\mu$ g/ml) (esquerra) o entre la secreció de  $IFN-\gamma$  induït per ESAT-6 (5 $\mu$ g/ml) i RUTI® (20 $\mu$ g/ml) (dreta). L'alliberament de  $IFN-\gamma$  es va quantificar per ELISA DO(450nm) a partir del plasma sobrenedant de sang estimulada durant 24h.

Donat que hi havia correlació positiva entre la resposta a ESAT-6 i els altres dos i que existia bibliografia en què s'havia demostrat la correlació entre la resposta a aquest antigen i el *scoring* patològic [16], l'estudi de correlació es va fer sols amb aquest antigen, com a estímul *ex vivo*.

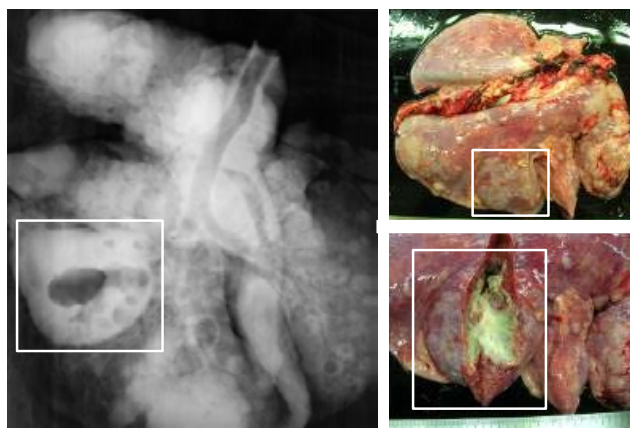
#### 4. Resultats de l'estudi de correlació

A la següent figura es pot veure com la resposta a ESAT-6 *ex vivo* augmentava proporcionalment amb la severitat de l'afectació patològica.

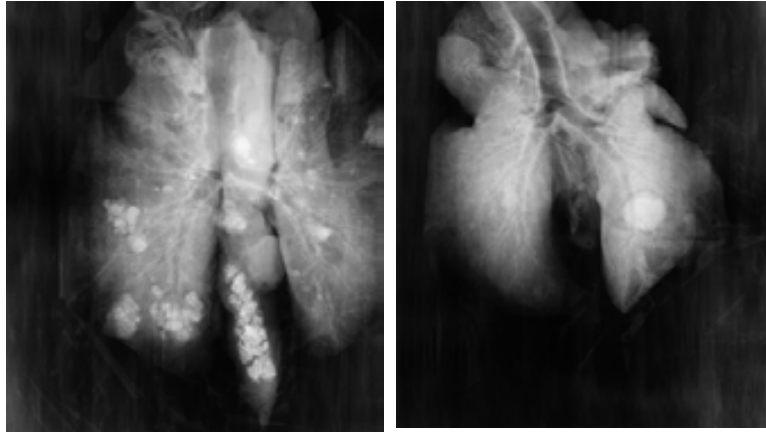


**Figura 8.** A l'eix d'ordenades es representa la mesura de l'IFN $\gamma$  secretat després d'estimular sang total amb ESAT-6 (5  $\mu$ g/mL) durant 16 hores. El paràmetre representat és DO(450nm) de les mostres de sèrum avaluades amb l'ELISA comercial BOVIGAM®. A l'eix d'abscisses es representa el barem patològic seguint el criteri d'avaluació representat a la taula anterior (Figura 5).

Es veu, doncs, que existeix una correlació positiva ( $r$  Spearman=0,612;  $p=0,007$ ) entre els dos paràmetres estudiats. Cal esmenar que un dels 20 animals inclosos en aquest estudi va haver de ser descartat dels resultats perquè es tractava d'un animal anèrgic, degut a què presentava un valor d'infiltració massiva amb un *scoring* patològic de 49 i, en canvi, una resposta a ESAT-6 inferior a 0,1 ( $n(20-1)=19$ ).



**Figura 9.** Lesió cavitada de l'animal anèrgic que es va excloure de l'estudi.



**Figura 10.** Radiografia pulmonar de dos animals inclosos a l'estudi de correlació.

Aquestes dues imatges són representatives de la correlació positiva existent entre el barem patològic i la resposta a ESAT-6 *ex vivo*. A l'esquerra es mostra la imatge de la radiografia d'un animal amb nombroses lesions calcificades, que va presentar un *scoring* patològic de 22 i una resposta a l'ELISA d'IFN- $\gamma$  de DO(450nm)>1, mentre que a la dreta es mostra la radiografia d'un altre animal amb un barem patològic de 11 i resposta a ESAT-6 de DO(450nm)>0,5.

### **5. Estudi de l'eficàcia de la vacunació amb RUTI® (n=42)**

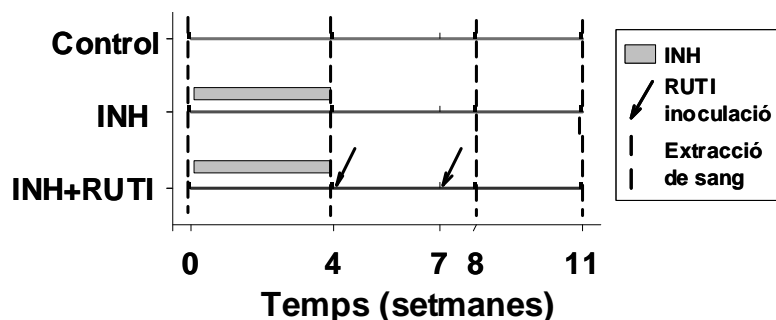
Després de comprovar la correlació entre la resposta a ESAT-6 i la magnitud de l'afectació patològica, es van seleccionar els animals amb DO(450nm)<2,0 i radiografies pulmonars normals. Aquestes mesures eren indicatives de ITBL i per això es van fer servir aquests animals per a avaluar l'eficàcia de la nostra vacuna.



**Figura 11.** Realització de radiografia de tòrax als animals.

Els 42 animals triats per a ser inclosos en aquest estudi es van distribuir aleatòriament en 3 grups de 14 animals cada un.

- Grup control (negre): infectats i no tractats.
- Grup tractat amb quimioteràpia (gris): infectats i tractats amb INH (300 mg injectada intramuscularment a la regió cervical, dos cops per setmana), de la setmana 0 a la 4.
- Grup vacunat amb RUTI® (ratllat): infectats i tractats amb INH (300 mg injectada intramuscularment a la regió cervical, dos cops per setmana), de la setmana 0 a la 4, seguit de dos inoculacions subcutànies de RUTI® a les setmanes 4 i 7.

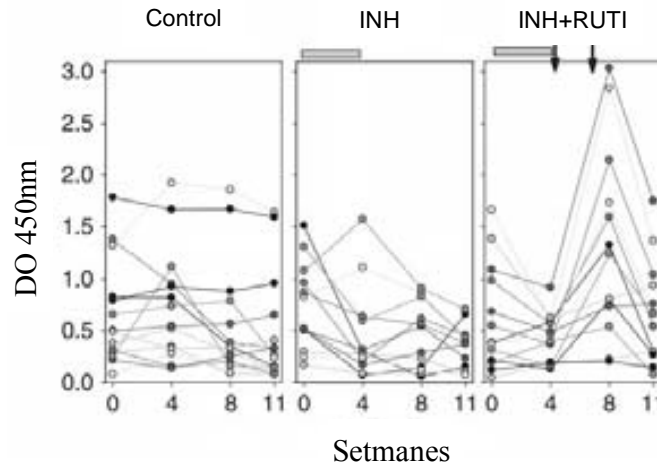


*Figura 12. Esquema del disseny experimental.*

Es va monitoritzar la resposta cel·lular avaluant la secreció d'IFN- $\gamma$  *ex vivo* a les setmanes 0, 4, 8 i 11, cultivant 0,5 mL de sang heparinitzada amb RUTI®, PPD-B i ESAT-6 durant 18h i mesurant els nivells de la citocina als sobrenedants d'aquests cultius.

A la setmana 11 es va donar per finalitzat l'estudi d'eficàcia i es van sacrificar els animals. Es va fer radiografia dels pulmons sencers extrets dels animals i es va avaluar el *scoring* patològic, histologia de les lesions i càrrega bacteriana d'una secció d'1cm<sup>3</sup> (~1g) dels ganglis mediastínics, descontaminada i sembrada en plaques de medi sòlid 7H11.

## 6. Resultats de l'estudi d'eficàcia

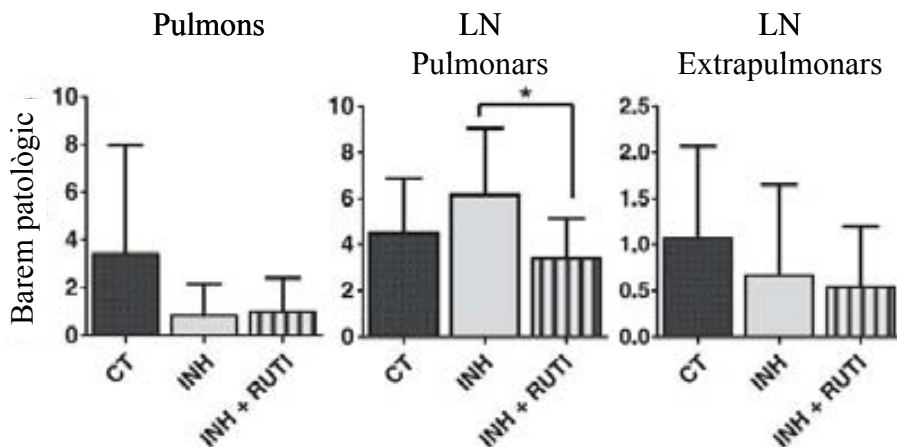


**Figura 13.** Avaluació de la secreció d'IFN- $\gamma$  en resposta a ESAT-6 ( $5\mu\text{g/mL}$ ) *ex vivo* a les setmanes 0, 4, 8 i 11. L'alliberament d'IFN $\gamma$  es va mesurar per ELISA DO(450nm).

Comparant la resposta dels tres grups experimentals es va poder veure que mentre que els animals del grup control no seguien un patró concret, els animals tractats amb quimioteràpia van reduir la resposta a ESAT-6 al llarg de la durada del tractament antibiòtic. Aquest fenomen també es va observar en els animals del grup de vacunació durant el tractament antibiòtic, observant-se un *boosting* de la resposta post-vacunació, arribant a ser, en quasi tots els casos, superior a la resposta a l'inici de l'experiment (setmana 0).

Per a l'avaluació del barem patològic, diferents mostres van ser recollides *post-mortem* i es van englobar en tres grups:

- Pulmó (resultat del *scoring* calculat de tots els lòbuls pulmonars).
- Limfonodes pulmonars (mediastínic i traqueobronquial).
- Extrapulmonars (fetge, melsa i limfonodes mesentèric, hepàtic i retrofaringi).



**Figura 14.** Resultats de l'avaluació del barem patològic calculat seguint la mateixa taula que a l'estudi de correlació (mirar figura 5), a la setmana 11 després de sacrificar els animals.

Aquests resultats demostren que el tractament amb INH o INH+RUTI® ajuda a controlar la infecció localment a pulmó i la disseminació extrapulmonar. En canvi, el grup tractat només amb INH sense vacunació, va presentar un grau d'afectació dels ganglis pulmonars major que els animals del grup RUTI®.

Pel que fa a la determinació de la càrrega bacteriana als limfonodes mediastínic, no es van obtenir resultats estadísticament significatius. Possiblement va ser degut a la manca de suficients mostres ja que la majoria de cultius bacterians van resultar contaminats per la manca d'assèpsia en la forma de recollir les mostres, com es pot comprovar a la següent figura.



**Figura 15.** Fotografia realitzada durant la necròpsia dels animals.

De totes maneres, a les mostres de ganglis mediastínic en les que sí es va poder obtenir creixement micobacterià i absència de contaminants, es va veure que la càrrega bacteriana era de  $2 \times 10^2$  UFCs/mL, independentment del grup.



Els aïllats que es van poder obtenir es van remetre a un laboratori extern per tal que fossin identificats per PCR (amplificació del fragment dels gens específics del MTB complex que codifiquen pel 16S rRNA i la proteïna MPB70) i per la tècnica del *DVR-spoligotyping*, podent-se identificar un únic spoligotipus (Spc-2) pertanyent a l'espècie *M. caprae*, en tots els casos.

Referencia	Código muestra	PCR TBMUL <sup>a</sup>	Perfil de spoligo <sup>b</sup>	Identificación
MI06/01485	6619-I			
MI06/01486	6789-S2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01487	5702-A2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01488	5864-G			
MI06/01489	9019-R			
MI06/01490	9073-U	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01491	9319-W	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01492	5796-G2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01493	5711-C2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01494	6806-T2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01495	5876-M2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01496	5/8 C	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>
MI06/01497	5/8 B			
MI06/01498	6700-P2	1	Spc-2	<i>M. caprae</i>

<sup>a</sup> PCR TBMUL: P. Pendiente; 1. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*; 2. Género *Mycobacterium*; 0. No se observan bandas.

<sup>b</sup> Si la muestra es positiva a complejo *M. tuberculosis* se realizará la caracterización molecular mediante la técnica de DVR-spoligotyping. P. Pendiente. Spb. Perfil de spoligo de *M. bovis*; Spc. Perfil de spoligo de *M. caprae*; Spt. Perfil de spoligo de *M. tuberculosis*; -. No aplicable.

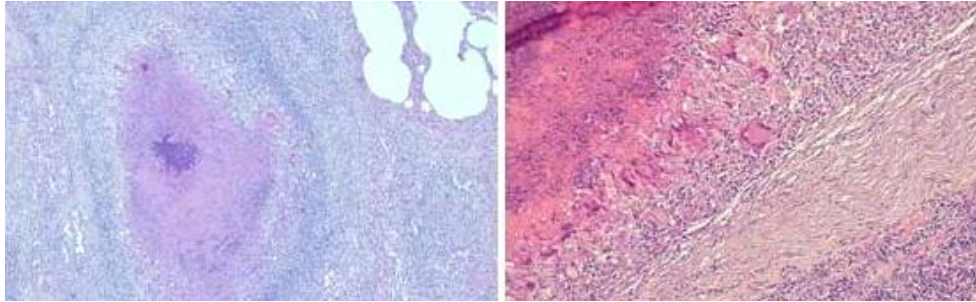
**Figura 16.** Resultat de la identificació dels aïllats enviats al “Laboratorio de vigilancia Sanitaria. Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense (Madrid)”.

Els ganglis mediastínic presentaven lesions calcificades en quasi tots els casos independentment del grup, com es mostra a la següent figura.



**Figura 17.** Fotografia representativa d'un gangli mediastínic calcificat.

L'estudi microscòpic de les lesions pulmonars demostrava la presència de lesions granulomatoses compatibles amb infecció tuberculosa. L'avaluació histològica d'aquestes lesions va demostrar que eren molt semblants a les desenvolupades pels humans, sent lesions molt organitzades amb un centre necròtic important rodejat per macròfags i algunes cèl·lules gegants i envoltades per un anell fibròtic important.



**Figura 18.** Fotografies microscòpiques de tincions d'H&E de lesions.

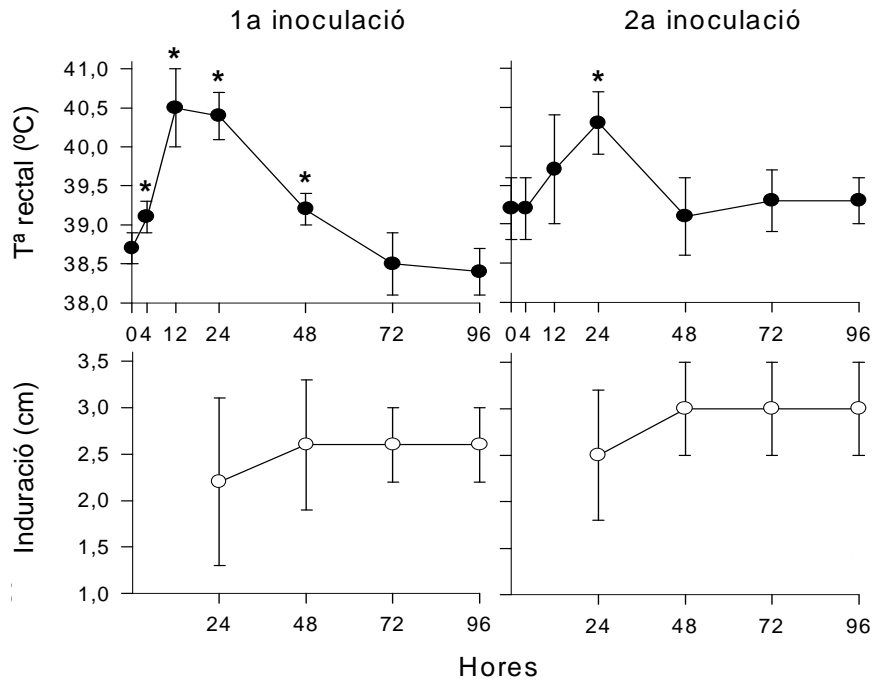
### **7. Estudi de la bioseguretat de la vacunació amb RUTI® (n=10)**

En l'estudi de bioseguretat es volia comprovar l'absència de reaccions relacionades amb el Fenomen de Koch a més de qualsevol altra reacció negativa a nivell local o sistèmic, deguda a la vacunació amb RUTI®.

Per a dur a terme aquest estudi, es van triar 10 animals amb diferents nivells de resposta a l'estimulació amb ESAT-6 *ex vivo* i se'ls va administrar la vacuna per inoculació subcutània a la regió cervical. Es van vacunar 2 cops amb 3 setmanes de diferència entre les inoculacions.

Després de la vacunació es va monitoritzar la temperatura rectal dels animals, a més de realitzar l'examen físic del punt d'inoculació. La temperatura rectal es va mesurar a les 0, 4, 12 i 24 hores post-inoculació els dies 2, 3 i 4 després de la vacunació. En canvi, la regió on es va injectar la vacuna subcutàniament es va observar cada 24 hores durant 4 dies després de cada vacunació, tenint en compte qualsevol alteració.

## 8. Resultats de l'estudi de bioseguretat

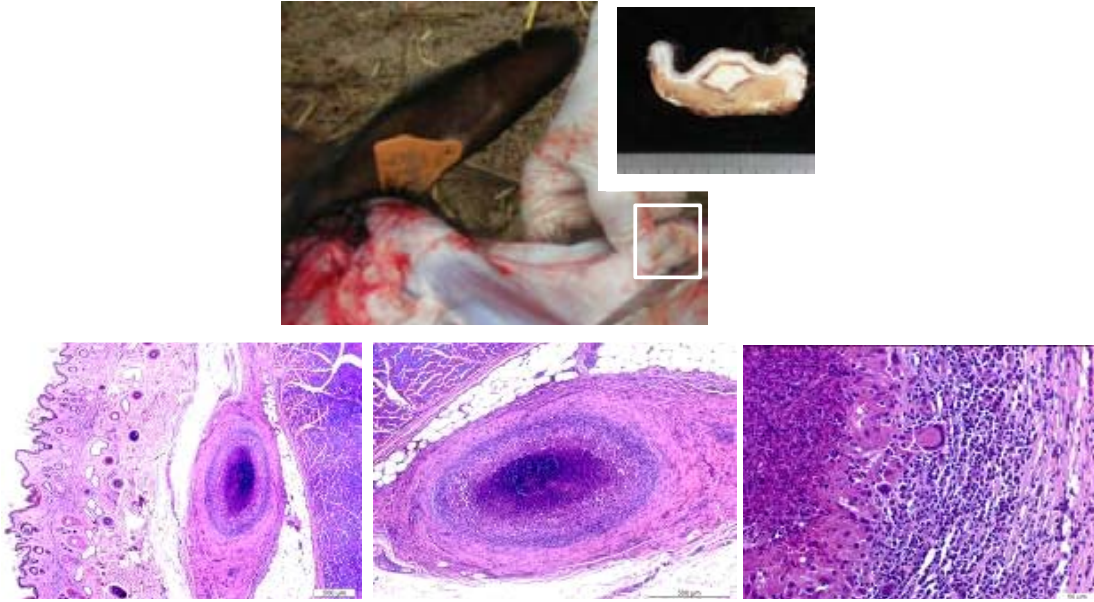


**Figura 19.** Resultat del seguiment de la temperatura rectal (adult) i induració de la zona d'inoculació de la vacuna (abaix) 96 hores després de la injecció en animals no tractats amb INH prèviament. A les gràfiques de l'esquerra es mostra el resultat del seguiment després de la 1a inoculació i a la dreta el de la 2a inoculació.

En cap dels animals de l'estudi es va observar ni mortalitat ni toxicitat relacionada amb la vacunació, tot i ser animals amb valors diferents de resposta a ESAT-6 i, per tant, amb diferents graus de *scoring* patològic.

Com es pot veure a la Figura 19, es va produir un augment transitori de la temperatura rectal (1-2 °C) durant les primeres 24 hores després de cada inoculació. També apareixia induració al punt d'inoculació, que s'estabilitzava a les 48 hores després de la vacunació.

En sacrificar els animals es va recollir una mostra del punt d'inoculació per a poder fer l'estudi histològic de les lesions, comprovant que es tractava de lesions *granuloma-like* sense presència de bacils tuberculosos al seu interior, com es pot veure a la següent figura.



**Figura 20.** Induració al punt d'inoculació (adult) i tincions d'H&E d'aquest, mostrant la seva aparença de lesió granuloma-like.

En general, la vacunació amb RUTI® va ser ben tolerada i no va provocar toxicitat en cap dels animals d'aquest estudi de bioseguretat.

A més, als animals de l'estudi d'eficàcia amb radiografia de tòrax suggerent d'ITBL, l'administració de dos dosis de la vacuna després del tractament antibiòtic tampoc va provocar toxicitat, només un augment transitori de la temperatura rectal i induració al punt d'inoculació, a les 48 hores.

Pel que fa a la mortalitat, durant l'estudi de l'eficàcia de RUTI® van morir tres animals. Dos dels animals eren del grup control i van morir perquè patien una TB avançada. El tercer animal, que es va haver de sacrificar abans del final de l'estudi per raons ètiques, pertanyia al grup INH+RUTI® i es va poder demostrar que la causa de l'agreujament de l'estat de salut d'aquest animal va ser una esteatosi hepàtica (no relacionada amb la vacunació).

***III. Desenvolupar un model experimental d'ITBL en minipigs spf que permeti estudiar la immunopatologia de la infecció tuberculosa humana i demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la latència. Aquest model hauria de servir d'eina per a avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de futurs candidats a vacuna o tractament contra la ITBL, a més de servir per avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de la RUTI®.***



El diagnòstic de la ITBL en humans està basat en mètodes indirectes. La ITBL es diagnostica quan la prova de la tuberculina és positiva, radiografia de tòrax normal i una manca de signes clínics o de símptomes compatibles amb TB activa. A més, en els últims anys s'ha començat a usar els TIGRAs, però no es coneix amb profunditat l'evolució de les lesions i de la histopatologia de la ITBL. Pel que fa a l'estructura del parènquima pulmonar, en humans i altres espècies d'animals grans està septat per teixit connectiu, ajudant possiblement al control de la disseminació tuberculosa. Aquestes estructures no estan presents al teixit pulmonar d'espècies animals petites com ratolí, cobai i macacs, però sí a altres espècies més grans com porc, vaques i cavalls.

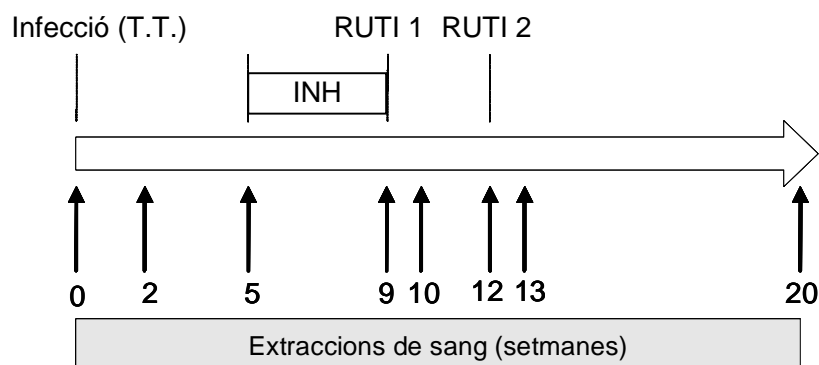
L'objectiu d'aquest estudi va ser desenvolupar un model experimental d'ITBL en *minipigs spf*. L'interès en aquest model animal va ser degut al seu tamany i a què fisiològicament i immunològicament és molt semblant als humans. Aquest model d'ITBL humanitzat serviria d'eina per a avaluar nous tractaments i pautes terapèutiques contra la infecció tuberculosa latent.

A més de desenvolupar aquest nou model experimental d'ITBL humanitzat, es va avaluar l'eficàcia del tractament de curta durada amb INH més dos inoculacions de RUTI® per tal de poder predir els efectes que aquest tractament tindria en els casos d'ITBL en humans.

## 1. Experiment

Per a dur a terme aquest experiment es va treballar amb *minipigs spf* de 1,5 mesos d'edat a l'inici de l'estudi (n=36). Després d'una setmana en observació per a assegurar el bon estat de salut dels animals i eliminar l'estrès del transport i canvi d'estabulari, es va infectar els animals amb  $2 \times 10^3$  UFCs/2mL de la soca MTB H37Rv, per la ruta d'infecció T.T. entre les costelles 8 i 9, al lòbul pulmonar basal esquerre. Després de la infecció dels animals, aquests es van separar en tres grups experimentals.

- Grup control (negre): infectats i no tractats. (n=15)
- Grup tractat amb quimioteràpia (blanc): infectats i tractats amb INH (300 mg de Cemidon, administrat intramuscularment a la regió cervical dos cops per setmana), de la setmana 5 a la 9 post-infecció. (n=12)
- Grup vacunat amb RUTI® (gris): infectats i tractats amb INH (300 mg de Cemidon, administrat intramuscularment a la regió cervical dos cops per setmana), de la setmana 5 a la 9 post-infecció seguit de dos inoculacions subcutànies de RUTI®, la primera una inoculació a la setmana 9 i l'altra la setmana 12 post-infecció. (n=6)



**Figura 21.** Esquema del disseny experimental.



Després d'infectar els animals, es va deixar evolucionar la infecció i es va recollir mostra de sang total a les setmanes 0, 2, 5, 9, 10, 12, 13 i 20, per tal d'avaluar:

- La secreció d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 i IL-12 en resposta a ESAT-6 i PPD, per ELISA.
- La resposta immunològica generada per la infecció. Es van avaluar les UFS en resposta a PPD, ESAT-6, Ag 85B, Ag 16 kDa o BCG, per ELISPOT.
- La resposta humoral mitjançant l'avaluació d'anticossos específics contra PPD RT-49.

També es van sacrificar animals a les setmanes 5, 9, 13 i 20 post-infecció, per tal de fer un seguiment de:

- La càrrega bacteriana als diferents lòbuls pulmonars, ganglis pulmonars i extrapulmonars (axil·lar dret i esquerre, inguinal dret i esquerre, mesentèric, hepàtic, retrofaringi dret i esquerre, tonsil·la dreta i esquerra, traquebronquial i mediastínic caudal) i al BAL. Evolució de la infecció.
- Avaluació macroscòpica del número de lesions a pulmó i del tamany d'aquestes (*slicing*). Evolució de les lesions a nivell macroscòpic i àrea afectada.
- Avaluació histològica de totes les mostres per les que es va determinar la càrrega bacteriana. Evolució de les lesions a nivell histològic.
- Anàlisi immunohistoquímic dels granulomes pulmonars en diferents fases d'evolució d'aquestes lesions.
- Anàlisi per microscopia electrònica d'alguns granulomes pulmonars i de les cèl·lules presents al BAL.

## 2. Estudi preliminar. Ruta d'infecció transtoràcica vs intratraquial

Es va dur a terme un estudi preliminar amb porcs de granja convencional (no *spf*), per tal de determinar la ruta d'infecció a usar, comparant la ruta d'infecció I.T. vs T.T.

Com es pot veure a les següents fotografies, el mètode més segur pel personal de laboratori era la inoculació T.T., ja que no implicava l'exposició del veterinarí als aerosols generats per la respiració de l'animal.

I.T.

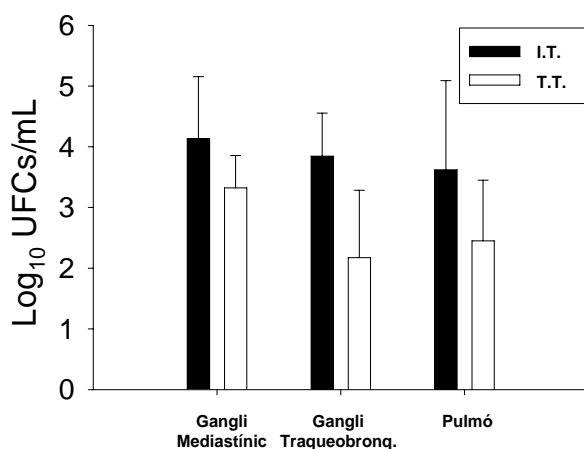


T.T.



**Figura 22.** Fotografies realitzades durant la infecció dels animals. Infecció I.T. vs T.T.

Pel que fa a la quantificació de les UFCs, tot i que van ser més baixes per la ruta T.T. a setmana 5 post-infecció, en cap dels casos hi va haver diferències estadísticament significatives.



**Figura 23.** Resultat de la determinació de la càrrega bacteriana ( $\log_{10}$ ) a la setmana 5 post-infecció en les diferents mostres obtingudes per a la comparativa de les dues rutes d'infecció. En negre es representen els resultats de la infecció per la ruta I.T. i en blanc els de la ruta T.T. Les barres representen el valor de la mitjana del  $\log_{10}$  de les UFCs/mL  $\pm$  desviació estàndar.

Per tant, no va haver diferències estadísticament significatives en les UFCs/mL determinades a setmana 5 post-infecció, comparant les dues rutes d'infecció. A més, la ruta T.T. era més segura pel personal de laboratori i més reproduïble perquè ens permetia controlar la dosi de l'inòcul i el punt d'inoculació. Això va fer que triéssim aquesta, enlloc de la ruta I.T., per a dur a terme els experiments posteriors ja usant *minipigs spf*.

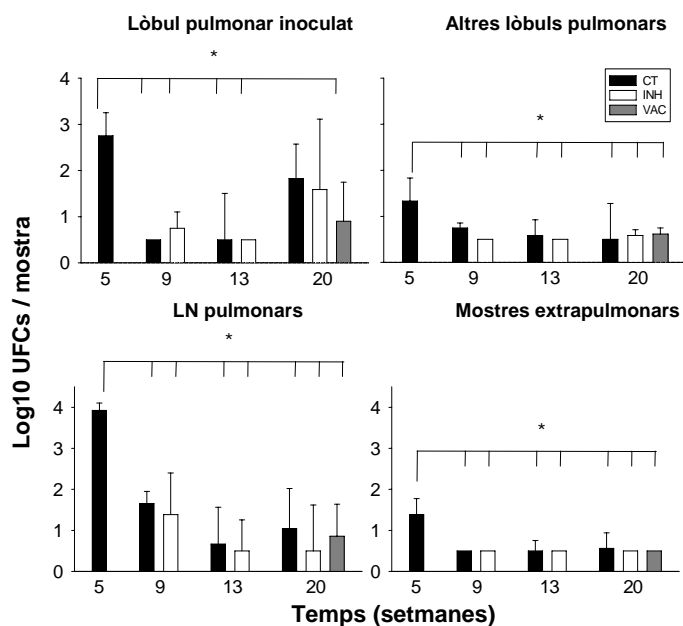
### 3. Evolució de la infecció. Estudi microbiològic i resposta immunològica

#### 3.1. Resultats de la determinació de la càrrega bacteriana

Limfonodes extrapulmonars	Mesentèric
	Hepàtic
Limfonodes pulmonars	Retrofaringi medial (Dret+Esquerre)
	Traqueobronquial
	Mediastínic caudal
Lòbuls pulmonars	Cranial dret
	Medial dret
	Caudal dret
	Accessori
	Cranial esquerre
	Medial esquerre
	Caudal esquerre (inòcul)

**Figura 24.** Llistat de totes les mostres que es van recollir per cada animal per a realitzar l'estudi histològic i bacteriològic.

De totes les mostres que es detallen a la taula anterior (Figura 24), es va agafar la meitat per a l'estudi histològic i l'altra meitat per a l'avaluació de la càrrega bacteriana, sembrant els teixits homogeneïtzats en medi 7H11 i cultivant les plaques durant 4 setmanes a 37°C.



**Figura 25.** Representació de la càrrega bacteriana en totes les mostres avaluades. Les barres representen el valor de la mitjana del  $\log_{10}$  de les UFCs/mL  $\pm$  desviació estàndard. Les diferències estadísticament significatives es representen amb un \* (one-way ANOVA,  $p < 0,005$ ).

En la figura anterior es pot observar que després del primer *timepoint* en què es va avaluar la càrrega bacteriana (setmana 5 post-infecció), va haver un control de la infecció. Només es van trobar diferències estadísticament significatives a la setmana 5 post-infecció.

Independentment del tractament antibiòtic o de la vacunació amb RUTI®, la càrrega bacteriana es va estabilitzar a la setmana 9, i es va mantenir constant a les setmanes 13 i 20. Per tant, aquest model experimental va controlar la infecció per si sol sense necessitat de tractaments terapèutics.

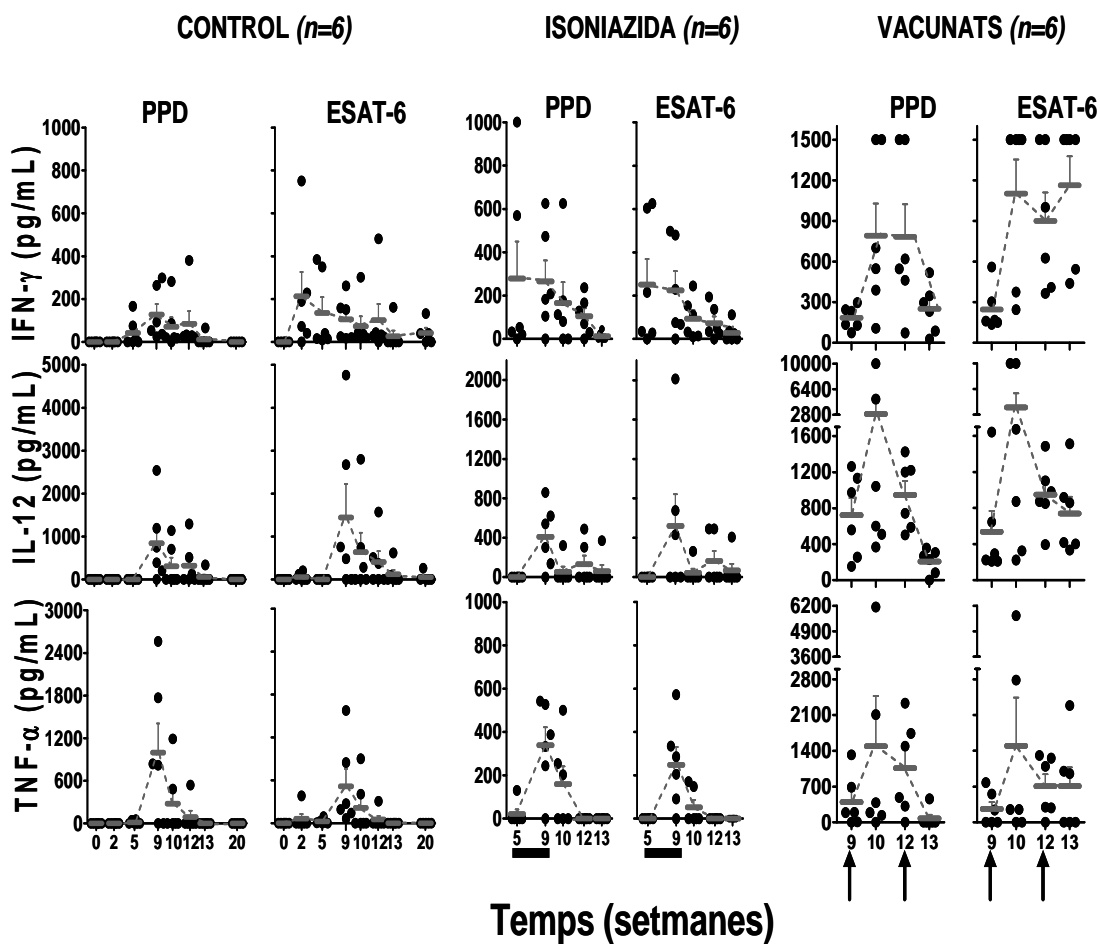
La vacunació amb RUTI® va ajudar a controlar la infecció localment, fent que la càrrega bacteriana al lòbul d'inoculació a la setmana 20 post-infecció fos més baixa en aquest grup comparat amb el grup control i el tractat amb quimioteràpia sols. Va ser l'únic grup que va presentar diferències estadísticament significatives amb respecte al grup control a setmana 5 post-infecció.

Pel que fa a la determinació de la càrrega bacteriana al BAL i a sang total, només es van trobar bactèries tuberculosos al BAL d'un animal (CROTAL:79919) del grup

control a setmana 5 post-infecció i a la sang d'un altre animal (CROTAL:109471) del grup INH a setmana 9 post-infecció.

### 3.2. Resultats dels estudis immunològics

#### 3.2.1. Secreció d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 i IL-12 en resposta ESAT-6 i PPD per ELISA



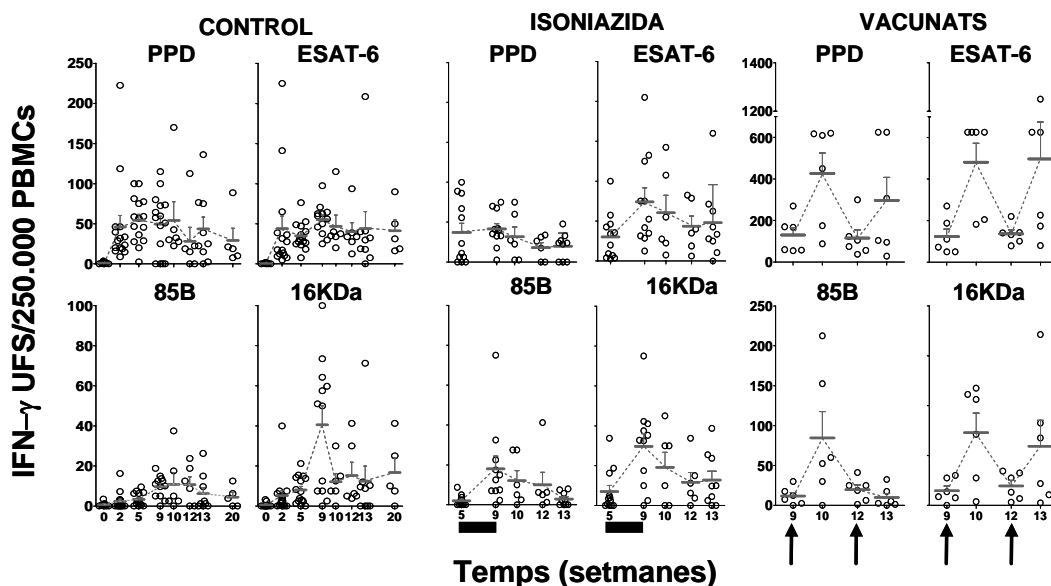
**Figura 26.** Representació de la mitjana  $\pm$  desviació estàndard de la secreció d'IFN- $\gamma$ , IL-12 i TNF- $\alpha$  en resposta a PPD (10  $\mu$ g/mL) i ESAT-6 (5  $\mu$ g/mL), per part dels PBMCs específics. Les barres horitzontals que hi ha sota l'eix d'abscisses representen la durada del tractament antibiòtic amb INH, mentre que les fletxes verticals representen les inoculacions de RUTI®.

Al grup control s'observa un pic de secreció d'IL-12 i TNF- $\alpha$  a la setmana 9 post-infecció, independentment de l'antigen usat per a fer l'estimulació *ex vivo*. La secreció d'IFN- $\gamma$  va ser més temprana, observant-se un pic a setmana 2, en el cas de l'estimulació amb ESAT-6.

Pel que fa al tractament antibiòtic, dir que els nivells de secreció d'IL-12 i TNF- $\alpha$  van ser considerablement més baixos que els del grup control, presentant també un pic a la setmana 9, però més discret que al grup control. La secreció d'IFN- $\gamma$  va ser lleugerament més elevada després de la setmana 9 en el grup tractat amb INH, comparat amb el grup control.

La vacunació amb RUTI® va provocar un augment de la secreció de les 3 citocines avaluades, provocant un augment de la secreció d'IL-12 i TNF- $\alpha$  després de la primera inoculació i d'IFN- $\gamma$  després de cada una de les inoculacions de la vacuna.

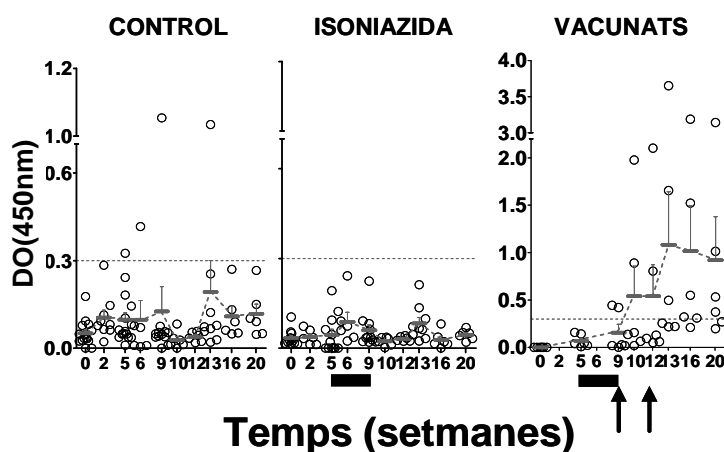
### 3.2.2. Avaluació de les Unitats Formadores d'Spots en resposta a PPD, ESAT-6, Ag 85B, Ag 16 kDa o BCG per ELISPOT



**Figura 27.** Representació de la mitjana +/- desviació estàndard de la resposta cel·lular mesurada per ELISPOT, després d'estimular PBMCs amb PPD (10  $\mu$ g/mL), ESAT-6 (5  $\mu$ g/mL), Ag85B (5 $\mu$ g/mL) i 16 kDa (5  $\mu$ g/mL). Les barres horitzontals que hi ha sota l'eix d'abscisses representen la durada del tractament antibiòtic amb INH, mentre que les fletxes verticals representen les inoculacions de RUTI®.

Mentre que no hi havia gaires diferències en la resposta a PPD, ESAT-6, Ag 85B i 16kDa entre els animals del grup control i els tractats amb quimioteràpia, els animals vacunats amb RUTI® van presentar una resposta més elevada a tots els antígens. No només es va observar una magnitud major de la resposta generada per la vacunació amb RUTI®, sinó que es va produir un pic d'aquesta després de cada vacunació, excepte en el cas de l'estimulació *ex vivo* amb Ag85B, en què no es va detectar un augment després de la segona inoculació de la vacuna.

### 3.2.3. Anticossos específics contra PPD RT-49



**Figura 28.** Representació de la mitjana +/- desviació estàndard de la resposta humoral contra PPD. En línia discontinua s'ha representat el background, sent positives totes les respostes per sobre d'aquesta línia. Les barres horitzontals que hi ha sota l'eix d'abscisses representen la durada del tractament antibiòtic amb INH, mentre que les fletxes verticals representen les inoculacions de RUTI®.

Només un animal del grup control va generar anticossos contra PPD a partir de la setmana 5 post-infecció i es va mantenir positiu fins la setmana 13. Els animals del grup vacunat van desenvolupar resposta humoral contra PPD, seroconvertint gairebé tots els animals després de la segona inoculació. 2 animals d'aquest grup ja eren positius abans de la inoculació de la primera dosi de RUTI® i van ser els que van presentar respostes més elevades després de les vacunacions, fins al final de l'experiment.

#### **4. Resultats dels estudis histològics**

Per a dur a terme l'estudi histològic, en el moment del sacrifici dels animals es van extreure i fixar en formol lesions granulomatoses dels pulmons, més la meitat de cada un dels ganglis que es van extreure. L'altre meitat es va usar per a l'estudi microbiològic. També es van recollir mostres de melsa i de fetge, a més d'incloure tot el bloc pulmonar en formol, pel posterior estudi macroscòpic del grau d'afectació d'aquest òrgan.

##### **4.1. Avaluació macroscòpica del número de lesions a pulmó i del tamany d'aquestes (slicing). Evolució de les lesions a nivell macroscòpic i àrea afectada**

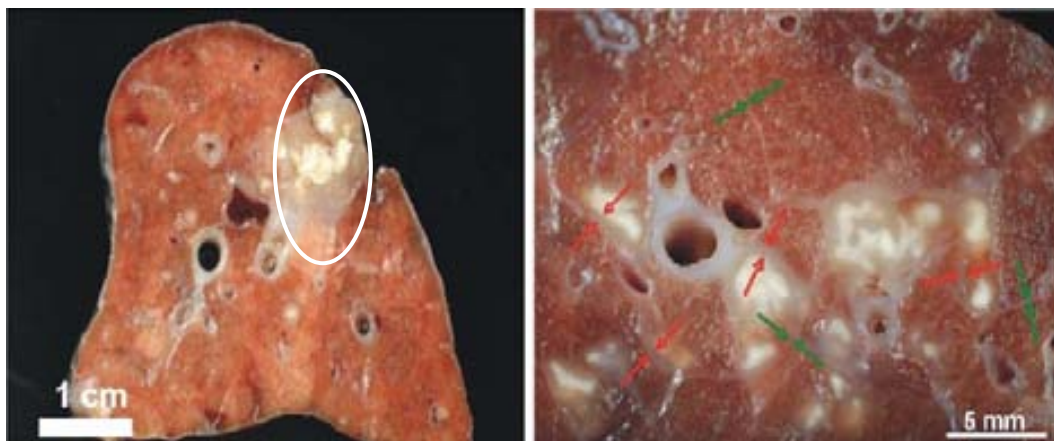
En el moment del sacrifici dels animals, després d'agafar mostra per a l'estudi bacteriològic i de recollir el BAL, es va insuflar formol per la tràquia i es va escanyar aquesta per evitar l'escapament del fixador. Posteriorment es va extreure tot el bloc pulmonar i es va submergir en un recipient que contenia formol.

Quan el teixit ja estava fixat, es va fer l'anàlisi macroscòpic de l'àrea afectada, tallant cada un dels lòbuls pulmonars en seccions de 2mm de gruix que ens permetessin comptar i mesurar el diàmetre de totes les lesions granulomatoses (tècnica d'*slicing*).



**Figura 29.** A l'esquerra es mostra un bloc pulmonar fixat en formol amb la lligadura a la tràquia abans de ser tallat en petites seccions de 2mm de gruix, que permetien analitzar l'àrea afectada (imatge de la dreta).





**Figura 30.** Aquestes dues imatges són un exemple del que es podia observar en seccionar els lòbuls pulmonars. A l'esquerra veiem una imatge d'una lesió granulomatosa coalescent, corresponent al punt d'inoculació (lòbul caudal esquerre) de la suspensió amb MTB a l'inici de l'experiment. Aquest tipus de lesions només es van trobar en aquest lòbul pulmonar. També es van poder observar lesions granulomatoses, de diferents tamanys (0.5–2 mm de diàmetre). Són un exemple del tipus de lesions que es van trobar a l'examinar macroscòpicament el parènquima pulmonar. A la imatge de la dreta, el que es mostra és una ampliació d'una d'aquestes seccions de 2mm de gruix, que permet veure el septe pulmonar, que divideix els lòbuls pulmonars en zones d'àrea més petita. Les fletxes verdes indiquen un septe normal i les vermelles mostren un exemple d'un septe engruixit per la reactivitat provocada per la seva proximitat i contacte amb una lesió tuberculosa. Aquest engruiximent del septe pulmonar es va veure fins i tot en el cas de contacte amb lesions molt petites.

Per tal de classificar les lesions en diferents tipus, es van avaluar vàries característiques que es podien determinar macroscòpicament i es detallen a continuació:

Fase	Marge Irregular	Necrosi	Calcificació	Consistència cartilaginosa	Halus perifèric respecte la necrosi
I*	+	-	-	-	N.E.**
II	-	+	+/-	-	+++
III	-	++	++	+	++
IV	-	+++	+++	+	+

**Figura 31.** Taula resum dels criteris seguits per tal de classificar les lesions en diferents tipus segons l'etapa evolutiva en la que es trobessin. \*Les lesions de fase I es subdivideixen en dos (**a** o **b**) segons si estaven en contacte amb el septe pulmonar o no. Les lesions **Ib** sí estaven en contacte. \*\* N.E. no avaluable.

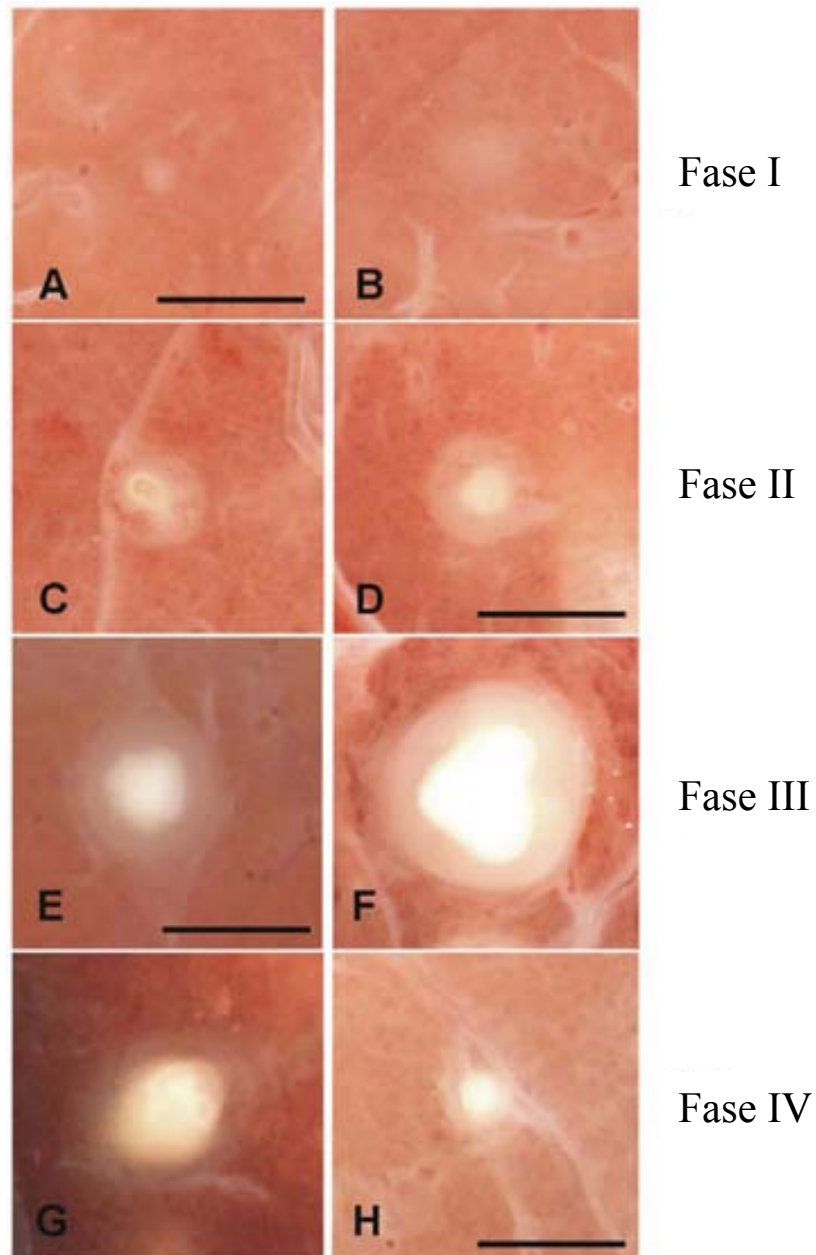
Fase I: Granulomes molt inicials amb un infiltrat irregular i absència de necrosi intragranulomatosa. Macroscòpicament es presentaven com un núvol blanquinós i difós al parènquima pulmonar.

Fase II: Lesions estructurades amb necrosi intragranulomatosa, en les que macroscòpicament s'observava una zona més opaca al centre.

Fase III: Lesions calcificades amb mineralització. Es veia una zona opaca que brillava en observar-la amb la lupa binocular. Aquestes lesions oferien resistència en prémer-les amb les pinces, pels marges. Això indicava que eren lesions fibrosades, pel que tenien aquesta consistència cartilaginosa al pressionar-les amb les pinces.

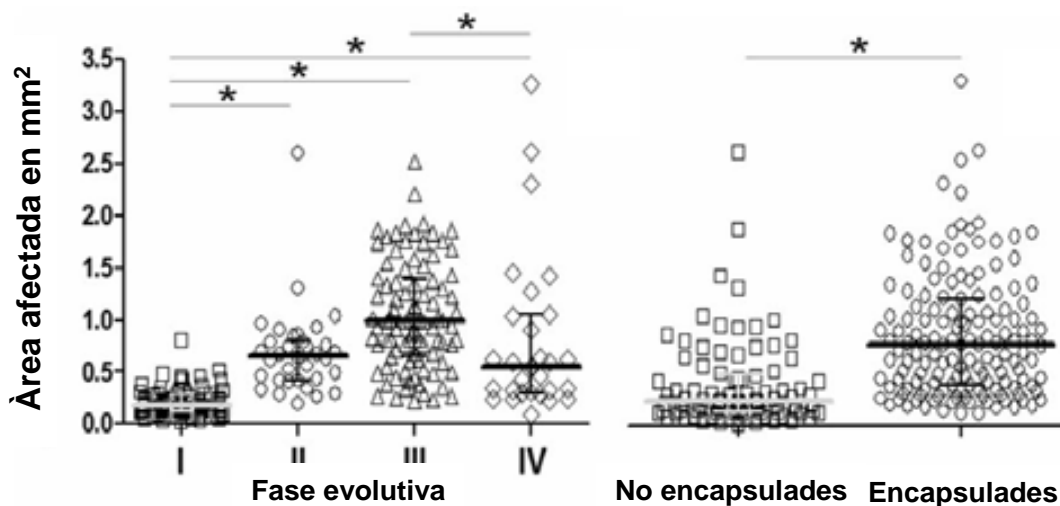
Fase IV: Lesions més petites i pràcticament mineralitzades amb un anell d'infiltració perifèrica molt discret.

En cas de trobar dos o més lesions juntes, es van classificar com a lesió coalescent.



**Figura 32.** Fotografies representatives dels diferents tipus de lesions. Imatges realitzades amb lupa binocular amb un augment de 10 vegades el tamany original. Les barres en negre, indiquen 1mm a aquests augments. Es pot deduir que les lesions que es van trobar eren molt petites (0.5-2mm).

A la vegada que es caracteritzaren macroscòpicament 235 lesions classificant-les segons l'etapa d'evolució en què es trobaven, es mesurava els dos diàmetres per tal de poder calcular l'àrea de cada una d'aquestes lesions.



**Figura 33.** Representació de l'àrea individual de cada lesió avaluada, la mitjana i els quartils. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre grups es van determinar pel test "Dunn's One Anova on ranks" i es representen amb un \*.

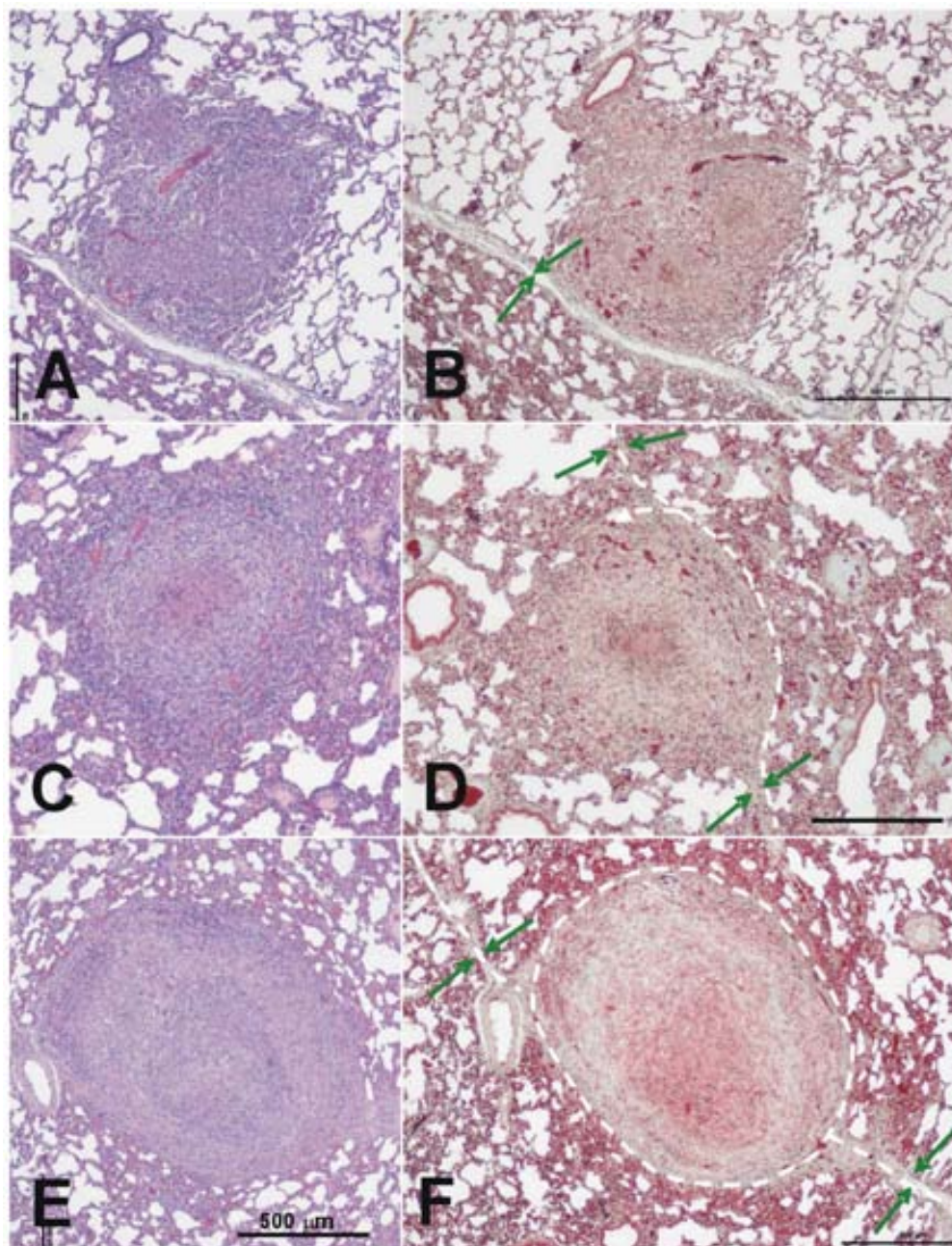
Segons es mostra en aquesta figura, les lesions augmentaven de tamany a mesura que maduraven, excepte a la fase IV, que correspon a lesions que quasi són cicatrius mineralitzades i estan en regressió. Aquestes lesions tenien un tamany inferior que les lesions de fase III.

A més d'avaluar les diferències d'àrea segons la fase d'evolució dels granulomes, també es van avaluar les diferències en l'àrea en funció de si les lesions estaven encapsulades o no. Com es pot observar a la figura anterior, les lesions que estaven encapsulades tenien una àrea major que les lesions que no ho estaven.

#### 4.2. Avaluació microscòpica

Es van agafar mostres de diferents tipus de lesions per a dur a terme l'anàlisi histològic d'aquestes.

Avaluant les etapes inicials de formació dels granulomes, es va observar que els granulomes de fase I (A-D) eren infiltrats irregulars (granulomes no estructurats) sense necrosi intragranulomatosa (granulomes *mouse-like*), mentre que els de fase II (E-F) tenien una estructura esfèrica més definida i amb necrosi intragranulomatosa incipient.

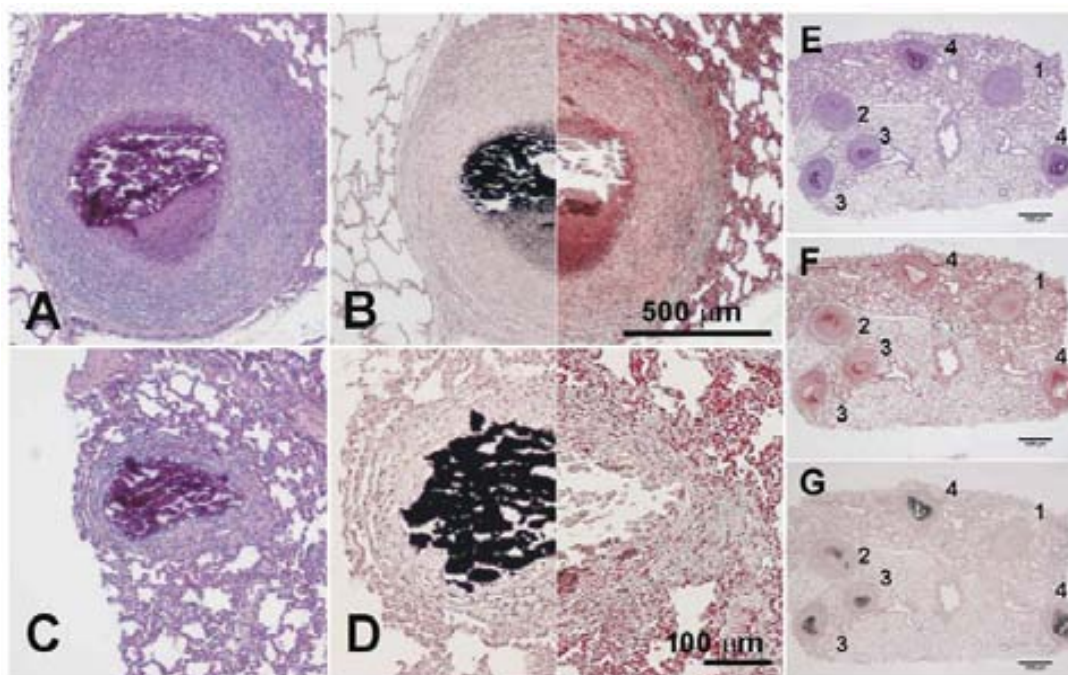


**Figura 34.** Les imatges de l'esquerra corresponen a tincions d'H&E, mentre que les de la dreta corresponen a tincions amb tricròmic de Masson. Les fletxes verdes mostren el septe, mentre que les línies blanques discontinües mostren la trajectòria de la càpsula de col·lagen que acabarà englobant la lesió. En aquesta figura també es pot veure que una vegada els granulomes toquen el septe interlobular (A i B), aquest s'activa i comença a haver proliferació dels fibroblasts veient-se un engruiximent del septe (C i D) que comença a envoltar la lesió (línia discontinüa) acabant per englobar-la del tot (E i F).

Es va poder calcular el percentatge de lesions encapsulades i es va observar que un 44,1 % de les lesions de Fase II estaven encapsulades, el 92,5% de lesions en Fase III també ho estaven i en la Fase IV el 93,1%.

Aquestes lesions encapsulades estaven totalment estructurades, amb miofibroblasts envoltant-les i una capa poc important de limfòcits rodejant els macròfags escumosos i cèl·lules apoptòtiques (predominantment neutròfils) al voltant del centre necròtic.

Amb la tinció de Von Kossa, es va poder veure que totes les lesions de fase III estaven mineralitzades. A més, per H&E es va observar que existia una capa discreta de limfòcits rodejant la càpsula i l'àrea mineralitzada.



**Figura 35.** Tincions d'H&E (A, C i E), Von Kossa (B, D a l'esquerra i G) i tricròmic de Masson (B i D a la dreta i F). A i B corresponen a imatges d'una lesió en Fase III i C i D a una de Fase IV. A les figures E-G es mostren lesions en Fase II (1 i 2) i lesions en Fase III (3 i 4) tenyides per H&E (E), Tircròmic de Masson (F) i Von Kossa (G). S'observava que les lesions en Fase III estaven ben estructurades i amb un centre necròtic mineralitzat. Es mostra una lesió en Fase IV que pràcticament és acel·lular, consistint en un centre necròtic mineralitzat i un anell fibròtic prou important.

Un cop es va haver definit els diferents tipus de lesions, es van analitzar un total de 4981 lesions per tal de poder determinar la dinàmica de formació dels granulomes en diferents fases i poder calcular la cinètica de la disseminació (Figura 35).

**Figura 35.** Resultat de l'anàlisi de 4981 lesions, representat per setmanes i per grups experimentals.

<b>Setmana 5</b>							
<b>CONTROL</b>							
Fase	Total de lesions			Agrupades		Ratio de Disseminació	
	n	mitjana	25-75 per.	mitjana	25-75 per.	mitjana	25-75 per.
la	422	158	(90,5 - 186,5)	387	(174 - 411)	22,77	(10,76 - 44,32)
lb	280	89	(46,25 - 141,5)				
II	207	64	(18,25 - 121)				
III	81	17	(5,75 - 50,75)				
Coalescent	0	0	0				
IV	0	0	0	17	(5,75 - 50,75)		
Total	990	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 404 (180-462)					

<b>Setmana 9</b>							
<b>CONTROL</b>							
la	34	8	(5,75 - 17,75)	45	(18 - 63,75)	0,86	(0,78 - 0,97)
lb	28	8	(4,25 - 14,75)				
II	62	29	(8 - 31,25)				
III	138	48	(18,75 - 72,75)				
Coalescent	12	0	(0 - 9)				
IV	0	0	(0 - 0)	60	(21,75 - 75,75)		
Total	274	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 105 (39,8-140)					

<b>ISONIAZIDA</b>							
la	22	11	(4 - 18)	17	(7 - 27)	4,85	(2,7 - 7)
lb	4	2	(0 - 4)				
II	8	4	(3 - 5)				
III	10	5	(1 - 9)				
Coalescent	0	0	(0 - 0)				
IV	1	0,5	(0 - 1)	5,5	(1 - 10)		
Total	45	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 22,5 (8-37)					

Resultats

**Setmana 13**

**CONTROL**

la	53	4	(1 - 37,75)	13	(4 - 153,3)	0,464	(0,43 - 0,87)
lb	31	1	(0,25 - 22,75)				
II	130	8	(2,75 - 92,75)				
III	487	20	(5,75 - 354,5)	28	(7,75 - 361,8)		
Coalescent	4	1	(0,25 - 2,5)				
IV	11	4	(1 - 6,25)				
Total	716	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 41 (11,8-515)					

**ISONIAZIDA**

la	103	0	(0 - 77,25)	6	(1,5 - 93,75)	0,35	(0,09 - 1,9)
lb	7	2	(0,5 - 4,25)				
II	19	4	(1 - 12,25)				
III	61	14	(3,5 - 38,75)	17	(4,25 - 42,5)		
Coalescent	7	3	(0,75 - 3,75)				
IV	0	0	(0 - 0)				
Total	197	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 23 (5,75-136)					

**Setmana 20**

**CONTROL**

la	165	7	(5 - 9)	9	(10 - 60)	0,39	(0,22 - 0,53)
lb	68	3	(0 - 7)				
II	472	6,5	(3 - 48)				
III	700	48,5	(22 - 178)	17	(24 - 270)		
Coalescent	45	3,5	(1 - 16)				
IV	109	3	(1 - 31)				
Total	1557	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 76 (34-330)					

**ISONIAZIDA**

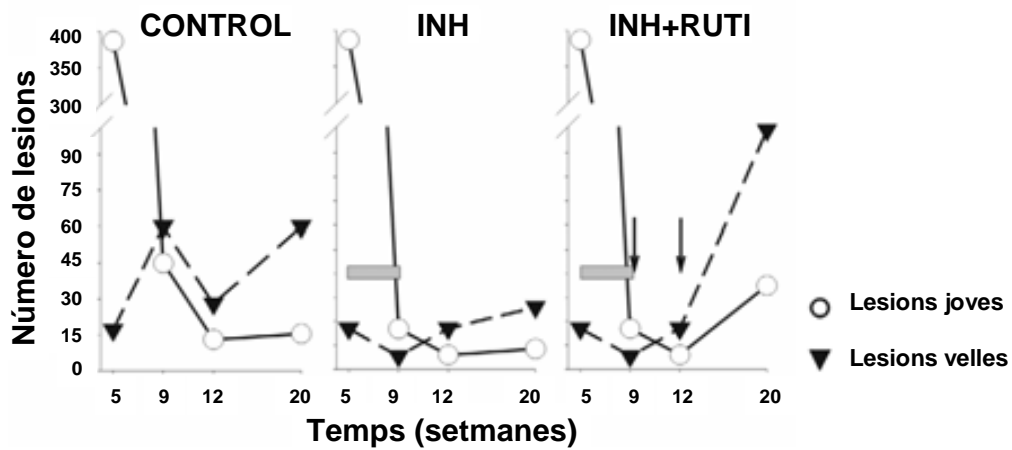
la	131	4	(0 - 15)	8,5	(4 - 55)	0,412	(0,32 - 0,83)
lb	25	1,5	(1 - 9)				
II	48	4	(2 - 6)				
III	121	11	(3 - 26)	26	(6 - 37)		
Coalescent	47	3	(1 - 9)				
IV	45	8,5	(3 - 11)				
Total	417	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 38 (11-155)					

**VACUNATS**

la	54	9	(3 - 11)	35	(7 - 41)	0,195	(0,18 - 0,32)
lb	38	7,5	(0 - 11)				
II	78	12,5	(4 - 18)				
III	389	54	(15 - 128)	99,5	(36 - 176)		
Coalescent	26	4,5	(1 - 7)				
IV	198	27	(7 - 47)				
Total	783	Mitjana de lesions per animal i percentils (25-75) = 142,5 (44-214)					



### 4.3. Dinàmica de formació de granulomes

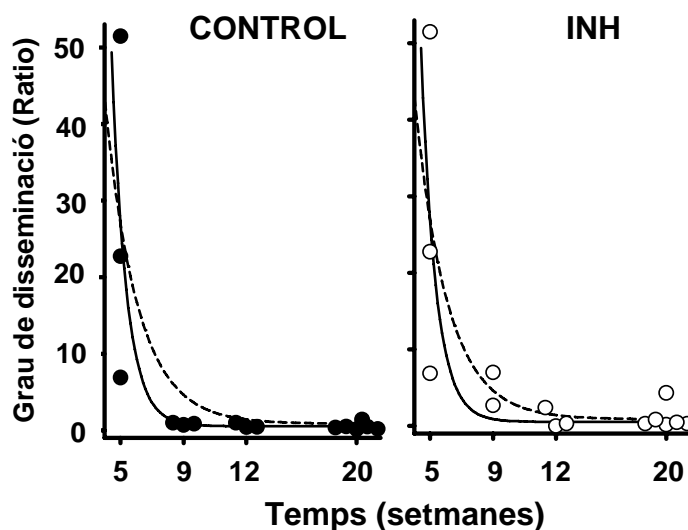


**Figura 36.** Dinàmica de la formació dels granulomes. Representació del valor de la mitjana (mirar Figura 35). La barra gris representa la durada del tractament antibiòtic i les fletxes negres, les inoculacions de la vacuna RUTI®.

Com es pot veure a la figura anterior, a l'inici de la infecció predominaven les lesions joves, incloent en aquest grup lesions de fase I i II. El número de lesions en aquestes dues etapes de formació disminuïen cap a la setmana 9, donant pas a l'augment de lesions en fases III i IV (lesions velles), fent evident la maduració de les lesions joves cap a lesions velles.

Dividint el número de lesions joves entre les velles es va calcular el grau de disseminació a cada setmana i es va representar la cinètica de disseminació.

#### 4.4. Cinètica de la disseminació



**Figura 37.** Representació de la cinètica de la disseminació. La línia contínua representa l'evolució en el grup control ( $y=(5621-0.5460)^{-1.071x} + 0.5460$ ) i la discontinua la del grup tractat amb isoniazida ( $y=(296.5-0.8793)^{-0.4848x} + 0.8793$ ). Comparant estadísticament l'evolució en els dos grups, es van trobar diferències estadísticament significatives ( $p < 0,0001$ ).

Es va veure que el període de disseminació més important a nivell local (lesions avaluades només a pulmó) era des de l'inici de la infecció fins a setmana 9 en què esdevenia constant (entre 0,8 i 0,34). Aquest resultat concordava amb l'anterior, en el qual es va veure que el número de lesions joves era major al principi i després baixava a la setmana 9, quan començaven a augmentar el número de lesions velles.

Tenint en compte que les lesions joves no estan encapsulades si són de fase I i que només un 44,1% de les de fase II ho estan, s'entén que en el període en el que hi havia més lesions joves, el grau de disseminació era major i que, donat que a partir de setmana 9 el grau de disseminació era menor, en aquest moment hi hagués un major control de la càrrega bacteriana a pulmó.

Es va intentar comptar el número de bacils a dins de les lesions en cada fase evolutiva, però val a dir que donada la baixa càrrega bacteriana amb què es va infectar els animals i el control de la disseminació pel propi model, va ser realment difícil trobar

bacils a dins de les lesions. Per tant, no es va poder establir una relació entre el número de bacteries i la fase evolutiva de la lesió.

#### **4.5. Encapsulament de les lesions**

Després de tenir tots aquest resultats i entendre la importància de l'evolució de les lesions cap a fases més madures, convertint-se en lesions encapsulades que dificultaven la disseminació bacil·lar, es va estudiar l'encapsulament d'aquestes lesions.

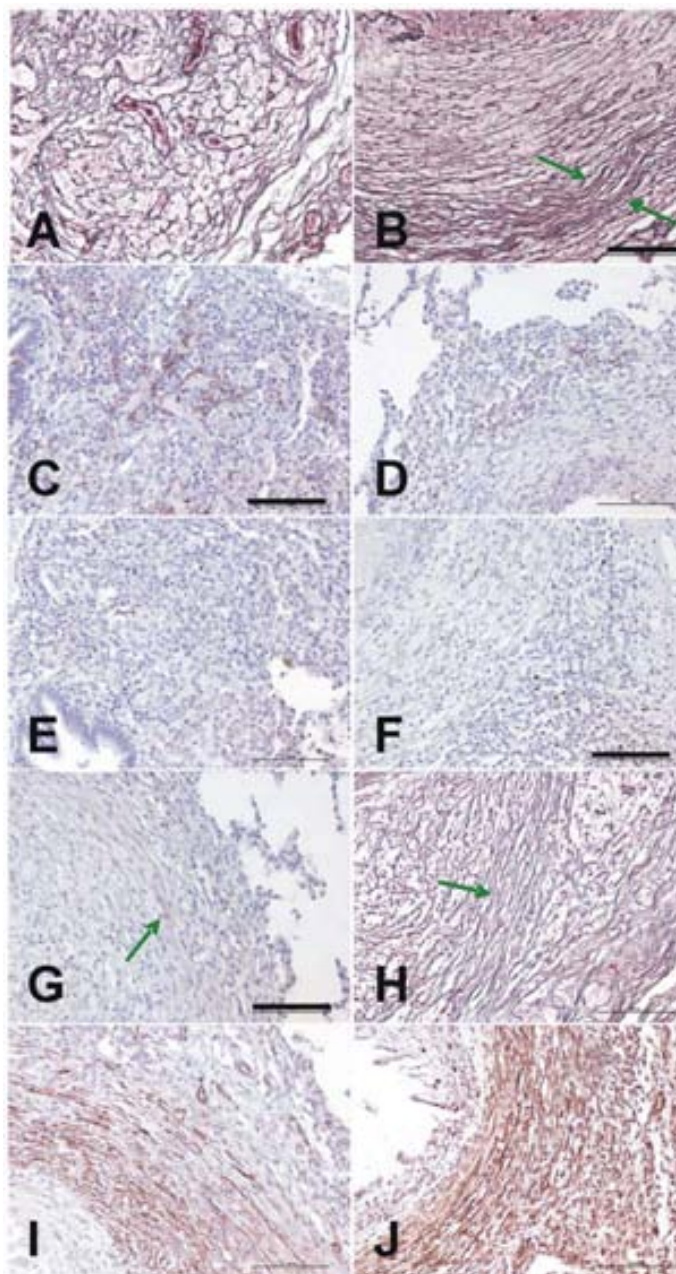
Es varen fer seccions de 4µm de gruix de diferents tipus de lesions. Per una banda es varen tenyir amb la tinció de plata per a reticulina que principalment tenyeix les fibres de col·lagen tipus III, per altra banda es van fer tincions per immunohistoquímica per tal de detectar CD10, Ki67, col·lagen tipus I, actina i  $\alpha$ -actina de múscul llis.

Seguint l'evolució dels granulomes joves cap a lesions més madures, es van poder distingir dos patrons de fibrosi:

1. Fibrosi interna basada en la producció de col·lagen tipus III organitzat per miofibroblasts.
2. Fibrosi externa relacionada amb el contacte amb el septe interlobular, formada per fibres de col·lagen tipus I.

Inicialment (granulomes en fase I), es va veure una xarxa desorganitzada de fibres de reticulina, majoritàriament de col·lagen tipus III amb fibroblasts actius expressant CD10 i proliferatius (Ki67+).

En el cas de granulomes en fase II, es van trobar miofibroblasts ( $\alpha$ -actina de múscul llis) organitzant la xarxa de reticulina. Les cèl·lules proliferatives que expressaven CD10 es van trobar a la perifèria de la lesió, on per tinció de tricròmic de Masson i de reticulina, es podien trobar fibres de col·lagen gruixudes, que es van poder identificar com a fibres de col·lagen tipus I, com les del septe interlobular.



**Figura 38.** Tinció de reticulina representativa d'una lesió de fase I (A) i una altra de fase III (B i H). Les fletxes verdes indiquen la càpsula perifèrica de reticulina. En les figures C (fase I) i D (fase III) es mostren les imatges de tincions amb CD10, al centre de la lesió en granulomes de fase I i a la perifèria en granulomes de fase III.

A les fotografies E (fase I) i F (fase III) es mostra el resultat de tincions amb anticossos anti-Ki 67. A les fotografies G, I i J es mostra el resultat de la tinció amb anticossos anti-col·lagen tipus I (G), tincions amb anticossos anti-múscul llis i anti-HHF35 per la identificació de miofibroblasts (I i J).

Degut a la gran importància que semblava tenir el procés d'encapsulament de les lesions en la seva maduració i, per tant, en el control de la disseminació de la infecció, es va intentar trobar quins eren els factors relacionats amb aquest procés. Es va estudiar la possible relació entre l'encapsulament de les lesions i la seva fase evolutiva, mida, contacte amb la pleura, vasos sanguinis o bronquíols, amb el septe interlobular i/o amb teixit connectiu.

Resultats

VARIABLE	ANÀLISI UNIVARIAT			ANÀLISI MULTIVARIAT	
	Encapsulació Total (% encapsulades)	Valor de <i>p</i>	OR (95% CI)	Valor de <i>p</i>	OR Adjustat (95% CI)
Fase Evolutiva:					
I	79 (24,1)	<0,001	1	<0,001	1
II	34 (44,1)		2,5 (1,0–6,4)		2,5 (1,0–5,9)
III	93 (92,5)		38,8 (14,2–110,5)		41,6 (16,2–107,3)
IV	29 (93,1)		42,6 (8,6–268,8)		39,2 (8,5–181,7)
Contacte amb pleura:					
No	217 (62,7)	1	1		
Yes	18 (61,1)		0,94 (0,3–2,8)		
Contacte amb vassos sanguinis/bronquíols					
No	79 (45,6)	<0,001	1		
Yes	156 (71,2)		3,00 (1,62–5,4)		
Contact amb el septe interlobular:					
No	117 (55,6)	0,03	1	0,045	1
Yes	118 (69,5)		1,8 (1,0–3,2)		2,1 (1,0–4,3)
Contact amb teixit connectiu:					
No	29 (34,5)	0,02	1		
Yes	206 (66,5)		3,8 (1,6–9,3)		
Mida (àrea en mm <sup>2</sup> ):					
0–0.23	60 (23,3)	<0,001	1		
0.24–0.49	58 (63,8)		5,8 (2,4–14,1)		
0.50–0.97	59 (74,6)		9,6 (3,9–24,5)		
0.98–3.27	58 (89,7)		28,5 (9,2–93,2)		

OR: Odds ratio. CI: Confidence Interval.

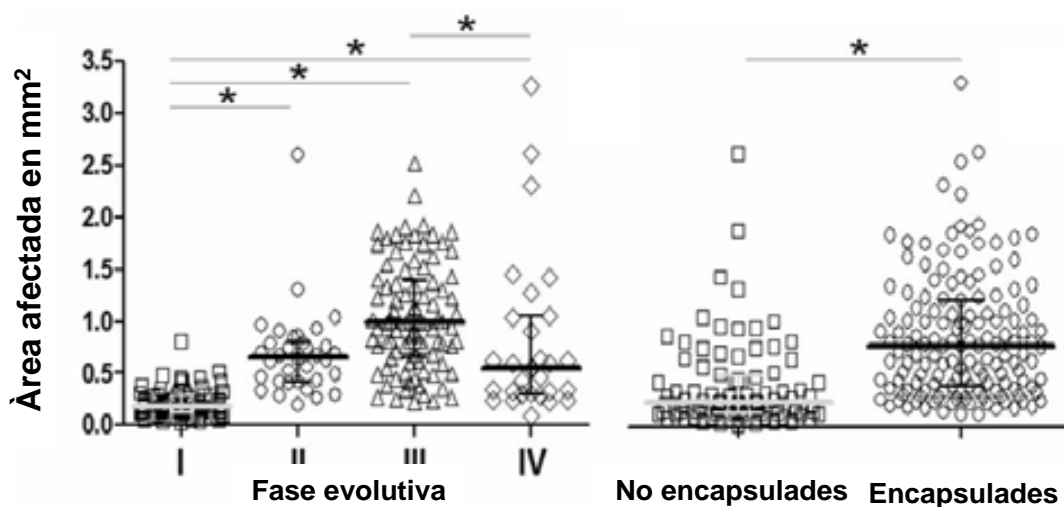
**Figura 39.** Taula amb el resultat de l'estudi estadístic univariat i multivariat de com afecten diversos factors en l'encapsulament de les lesions granulomatoses en aquest model experimental de ITBL.

En l'estudi univariat dels factors que estaven relacionats amb el procés d'encapsulament, es va trobar que aquest procés estava relacionat amb la fase evolutiva de les lesions, el seu tamany, el contacte amb teixit connectiu, el septe interlobular, els vasos i els bronquíols. Els resultats van evidenciar que el contacte amb la pleura no afectava a la formació de la càpsula perifèrica de les lesions.

Pel que fa a l'estudi multivariat, es va confirmar que el contacte amb el septe i la fase evolutiva eren els factors relacionats amb l'encapsulament de les lesions, com ja es podia preveure dels resultats de l'examen histològic.

És important remarcar que ja que aquesta avaluació es va fer seguint un mètode 2D (talls consecutius de les diferents lesions), es va subestimar el número de contactes quantificats amb la pleura, vasos sanguinis, etc...

Pel que fa a l'àrea de les lesions, no es van trobar diferències estadísticament significatives però sí que es va trobar una relació positiva entre el tamany dels granulomes i la presència d'encapsulament, sent més grans les lesions encapsulades que les que no ho estaven (0,76 vs 0,23 mm<sup>2</sup>, p<0,001).



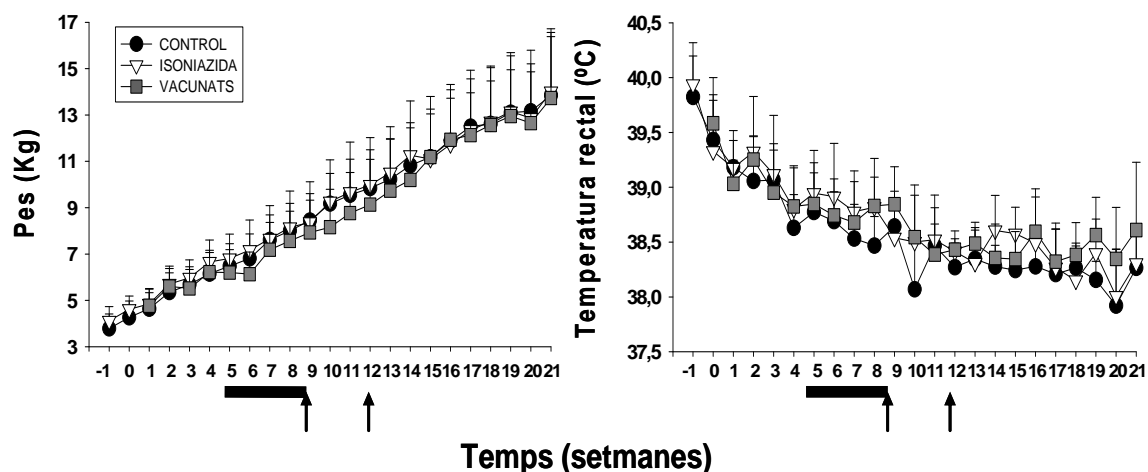
**Figura 40 (Repetició Fig.33).** Representació de l'àrea individual de cada lesió. Avaluació de la mitjana i els quartils. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre grups es van determinar pel test "Dunn's One Anova on ranks" i es representen amb un \*.

La relació existent entre el contacte amb el septe interlobular i el procés d'encapsulament de les lesions va fer que es trobessin lesions que, malgrat ser de fase I, estiguessin encapsulades (24,1%).

## 5. Benestar animal i bioseguretat de les teràpies testades

Els animals eren observats diàriament per tal d'assegurar el seu benestar i poder detectar qualsevol signe de patiment. En cas d'haver detectat que algun animal no hagués estat en bones condicions de salut com per a poder-lo mantenir viu sense patiment, s'hauria sacrificat abans de temps seguint els protocols aprovats pel Comitè Ètic de la Universitat Autònoma de Barcelona d'acord amb la legislació europea.

A més d'observar diàriament els animals per a comprovar el seu benestar, es van pesar i es va mesurar la seva temperatura rectal setmanalment per comprovar l'absència de toxicitat sistèmica, deguda al tractament o per descartar malestar degut a la pròpia infecció.



**Figura 41.** Representació del seguiment setmanal del pes i la temperatura rectal dels animals, com a mesura indicativa del benestar animal. Es mostren els resultats del grup control (rodona negra), tractat amb INH (triangle blanc) i tractas amb INH+RUTI (quadrat negra). A cada punt s'ha representat el valor de la mitjana  $\pm$  desviació estàndar. Les barres horitzontals que hi ha sota l'eix d'abscisses, representen la durada del tractament antibiòtic amb INH, mentre que les fletxes verticals representen les inoculacions de RUTI®.

Com es mostra a la figura anterior, els animals van continuar guanyant pes durant tot l'experiment, indicant un bon estat general. Pel que fa a la temperatura rectal, aquesta va anar baixant amb el temps, mantenint-se després estable a 38°C i sempre dins dels rangs fisiològics de normalitat.

Després de cada vacunació amb RUTI® es va revisar el punt d'inoculació diàriament durant la primera setmana i no es va detectar cap signe de toxicitat local en cap dels animals vacunats.





## *DISCUSSION*



*1. Avaluar els mecanismes d'acció de la vacuna RUTI® en el model murí d'ITBL infectat intraperitonealment, com a complement de la quimioteràpia.*



El *gold standard* del tractament de la ITBL és l'administració d'INH durant 9 mesos [161]. Curiosament, l'efecte bactericida del tractament amb aquest antibiòtic ocorre en els primers 15 dies del tractament. El fet d'haver d'allargar aquest tractament durant tant de temps, es deu a què és efectiu sols contra bacteries en multiplicació activa.

En el model murí de tuberculosi latent infectat amb baixa dosis de MTB, per aerosol, quan es retira la quimioteràpia al cap d'un més de tractament, les bacteries no replicatives poden reactivar, aprofitant el *gap* immunològic que provoca el tractament. És per això que just en aquest moment s'administra la vacuna RUTI®, per tal de fer un *boosting* de la immunitat.

Se sap que la immunitat cel·lular que provoca la infecció tuberculosa va dirigida contra antígens secretats per les bacteries en multiplicació activa, perquè són més immunogènics i, per tant, es focalitza justament cap a aquest bacils que estan dividint-se [162].

Existeixen exemples d'immunomodulació deguda als antígens secretats per MTB. Per exemple, s'ha demostrat que l'antigen secretat CFP-10 pot unir-se a la superfície dels macròfags estimulant la síntesi de citocines proinflamàtores com el TNF- $\alpha$ . A més, aquest antigen pot fer sinèrgia amb l'IFN- $\gamma$ , estimulant l'activitat microbicida dels macròfags, per exemple promovent la secreció de NO [163].

Donat que el sistema immune és més eficient en el reconeixement dels bacils en multiplicació activa, la RUTI® es va dissenyar per tal d'estimular el sistema immune i ajudar-lo a reconèixer els bacils en creixement actiu així com també els bacils no replicatius (*latents*) [5], disminuint la probabilitat de reactivació post-tractament antibiòtic. Anteriorment, ja s'ha demostrat la seva eficàcia en el control de la reactivació post-tractament antibiòtic de curta durada [5] i la seva capacitat de fer el *boosting* de la immunitat ajudant al sistema immune a veure els bacils en multiplicació [150] en model murí infectat per aerosol amb baixa dosi de bacils tuberculosos.

Tot i que la RUTI® és una vacuna desenvolupada a partir de cultius de micobacteries crescudes sota condicions d'estrès i que al *cocktail* antigènic que la compon hi ha bona part dels antígens estructurals de MTB, no es va poder demostrar un nivell alt de resposta a antígens estructurals amb el model de ratolí infectat per aerosol.

En aquest estudi, es va desenvolupar un model en el que es pogués avaluar la resposta immune generada per la RUTI® i que ajudés al sistema immune a reconèixer els bacils no replicatius. Aquest model es basava en la injecció intraperitoneal de bacils tuberculosos morts, com a font d'antígens estructurals. Es va utilitzar aquesta via d'infecció perquè és una ruta que permet una absorció ràpida dels antígens inoculats, degut a la gran superfície d'absorció i la gran vascularització de la zona.

En aquest estudi, es va poder demostrar que la vacunació amb RUTI® disminuïa la reactivació bacil·lar post-tractament antibiòtic obtenint  $5,16 \pm 0,32 \log_{10}$  UFCs/mL (melsa) al grup control,  $3,92 \pm 0,25$  UFCs/mL al grup tractat amb quimioteràpia i  $3,2 \pm 0,24$  UFCs/mL al grup vacunat amb RUTI®.

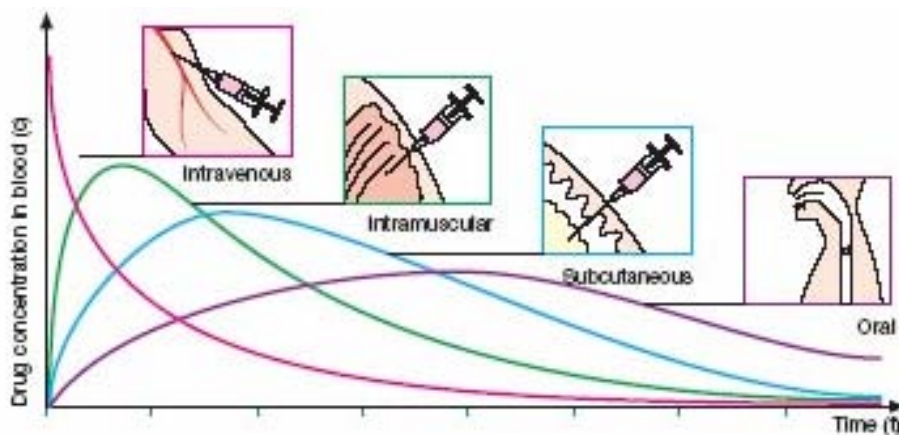
Aquest resultat no eren novedosos, ja que anteriorment s'havia demostrat la capacitat de la RUTI® per a controlar la reactivació de la infecció, post-tractament antibiòtic. El que no s'havia pogut demostrar encara, era la capacitat de la vacuna a ajudar al sistema immune a reconèixer els bacils no replicatius, que són justament els que s'escapen del control immunològic de l'hostatger i fan que la infecció cronifiqui durant la vida de l'hostatger.

Es va determinar el número de cèl·lules secretores d'IFN- $\gamma$  i la concentració d'aquesta citocina al sobrenedant dels cultius *ex vivo* d'esplenocits estimulats amb un ample ventall d'antígens tuberculosos com: PPD, antígens secretats per les bacteries replicatives (ESAT-6, CFP-10, MPT-64 i Ag85B) i antígens estructurals (16KDa, 19KDa, 38KDa, 40KDa i hsp65). Així, es va poder demostrar que la vacunació amb RUTI® ajuda al sistema immune a reconèixer els antígens estructurals, ajudant al sistema immune a veure la població de bacils no replicatius, que és just la que s'escapa de l'atac de la immunitat natural generada per la pròpia infecció.

En aquest model experimental, es va injectar una quantitat important de bacils no replicatius (antígens estructurals) a peritoneu, mimetitzant el que ocorre en humans: generació de necrosi intragranulomatosa quasi des del principi de la infecció a limfonodes i pulmons [164] generant una gran quantitat d'antígens estructurals (bacils extracel·lulars morts) que poden arribar a la melsa, induint la generació d'immunitat cel·lular contra aquests.

En el nostre grup d'investigació, s'aliquoten i congelen a  $-70^{\circ}\text{C}$  les suspensions de bacteries tuberculosos, fins al moment del seu ús. El fet de congelar els cultius, fa disminuir  $1 \log_{10}$  la concentració inicial de bacteries, degut a la mort cel·lular pel procés de congelació i descongelació. Per tant, a l'infectar els animals s'estaven inoculant al peritoneu una alta concentració d'antígens estructurals, provinents de les bacteries mortes. Degut a la ruta usada per a dur a terme la infecció, aquests antígens estructurals eren ràpidament presentats, estimulando la immunitat de l'hostatger abans de què els bacils vius comencessin a replicar i secretar antígens més immunogènics, desviant l'atenció del sistema immune cap a aquests i no pas cap als estructurals.

Per tant, l'èxit d'aquest estudi es va basar en l'ús de la ruta intraperitoneal com a via d'infecció i en l'administració de bacils morts com a font d'antígens estructurals que arribaven ràpidament a sang, generant-se resposta contra aquests antígens, abans de què els bacils vius comencessin a replicar.



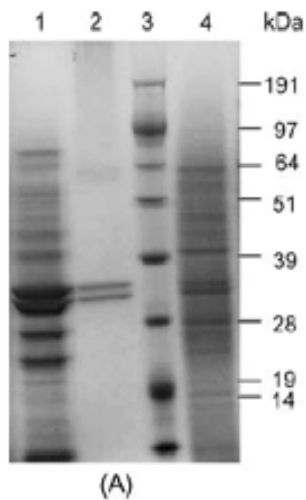
**Figura 42.** Esquema de la cinètica d'absorció dels medicaments segons la ruta d'administració

Gràcies a això, es va poder veure que la vacuna RUTI® ajuda al sistema immune a veure els bacils no replicatius, ajudant a entendre per què la vacunació fa disminuir la reactivació post-tractament. La vacunació amb RUTI® permet al sistema immune a veure els bacils que s'amaguen al material extracel·lular, esperant a ser fagocitats per a poder replicar i generar nous focus infecciosos, cronificant la infecció.

La capacitat de la RUTI® per a estimular la immunitat contra antígens estructurals de bacils no replicatius es deu al seu procés de fabricació. Les bacteries es fan créixer en condicions d'estrès per a poder obtenir bacils en fase estacionària (imitant l'estat en què es troben *in vivo*) aconseguint l'expressió d'antígens expressats pels bacils latents. Anteriorment ja s'ha demostrat que les condicions de cultiu determinen la composició d'antígens expressats per les bacteries [165] [166].

En el procés de fabricació de la RUTI®, un cop es tenen els cultius crescuts en plaques de medi 7H11, es rasca el cultiu de la placa, es fragmenten les col·lònies mecànicament en un *buffer* de PBS amb un 4% de Tritó-X114 i es recupera el sobrenedant que és centrifugat a 27000g 2 vegades i rentat amb PBS per a eliminar la fracció lipídica. En aquests passos de rentat es perd part de la fracció d'antígens secretats, quedant bàsicament els estructurals.

Tot i així, a l'extracte proteic que compon la vacuna hi ha antígens que provenen de la fracció d'antígens secretats pels bacils en multiplicació, que han quedat al producte final. És per això que la RUTI® també fa *boosting* de la immunitat contra antígens secretats.



**Figura 43.** Figura de Cardona et al., 2005 [5]. Es mostra l'anàlisi per Western blot de la composició proteica:

(1) CFPs, que es perden als sobrenedants que s'eliminen en centrifugar per deslipidificar.

(2) Ag85

(3) Patró de pes molecular

(4) FMtbC. Fracció proteica de la vacuna liposomada.

Si després del tractament antibiòtic, amb el consegüent drenatge dels macròfags escumosos responsables de la immunosupressió local, es fa un *boosting* de la immunitat contra els antígens estructurals, s'ajuda a què els nous macròfags que van a les lesions a netejar el teixit necròtic siguin capaços de reconèixer aquesta població bacil·lar no replicativa. Així, els podran destruir al seu interior després de fagocitar-los amb el material extracel·lular, disminuint la població bacilar capaç de reactivar en retirar la quimioteràpia.



Si en el moment de retirar la quimioteràpia s'administra la nostra vacuna terapèutica, s'ajuda al sistema immune a reconèixer aquells bacils que no repliquen i que, per tant, són invisibles al sistema immune. Segurament, aquesta és la raó de l'èxit de la nostra vacuna, perquè està composta principalment per antígens estructurals i perquè la pròpia infecció ja genera immunitat contra antígens secretats (bacils replicatius) fracassant en l'eliminació del patogen.

Se sap que durant la ITBL les clones de cèl·lules T específiques contra MTB van dirigides principalment contra els bacils replicatius, segurament per la pressió de les constants reactivacions dels bacils, per tal de mantenir la infecció latent. Aquest fet faria que la immunitat es focalitzi, principalment, cap a la destrucció d'aquests bacils, aparentment més perillosos perquè són els que repliquen [167].

Degut a què un terç de la població mundial està latentment infectada i que un 10% d'aquests desenvoluparan TB al llarg de la seva vida per la reactivació de la infecció latent en cas d'immunosupressió de l'hostatger, podent infectar a nous individus i, per tant, disseminant i mantenint la infecció a la societat, hi ha una necessitat molt important de disminuir el nombre d'individus latentment infectats ja que aquesta població és el reservori de TB en humans.

Els bacils no replicatius que s'escapen de la immunitat natural generada per la pròpia infecció són els responsables de la ITBL i són una diana molt important per a futures teràpies antituberculosos.

## Conclusions

- L'administració de RUTI® després d'una pauta curta de tractament antibiòtic, ajuda a disminuir la càrrega de bacil·lar i controlar la reactivació de la infecció, en aquest model.
- La vacuna RUTI® fa un *boosting* de la immunitat cel·lular contra antígens estructurals de MTB.
- La vacuna RUTI® pot fer *visibles* els bacils no replicatius, al sistema immune.
- La vacuna RUTI® és una vacuna terapèutica contra els bacils latents que podria ajudar a disminuir el número d'individus latentment infectats, disminuint el reservori natural de TB a la població humana.

***II. Valorar l'eficàcia terapèutica de la RUTI® després d'un tractament antibiòtic de curta duració (1 mes) en cabres naturalment infectades i amb un baix grau d'afectació patològica.***



A Europa encara no s'ha erradicat la tuberculosi als ramats de cabres. La Generalitat de Catalunya, a través del seu Departament de Pesca i Agricultura junt amb la Universitat Autònoma de Barcelona, a través del CreSA, treballen en un programa de detecció de ramats infectats per tal de controlar la disseminació de la infecció tuberculosa pels ramats catalans. La presència de tuberculosi a les explotacions ramaderes té una gran repercussió econòmica degut a l'obligació del sacrifici dels animals infectats a més de la prohibició del moviment dels animals, per les campanyes de control i erradicació.

En aquesta campanya d'erradicació de la TB dels ramats catalans, es fa el test d'*screening* de la TB anomenat BOVIGAM® per tal de detectar els animals i intentar evitar el sacrifici dels animals sans.

Gràcies a la bona relació que mantenim des de fa anys amb el CReSA, es va poder tenir accés a un ramat de cabres infectades amb *M. caprae*, que ens van servir per a dur a terme l'avaluació de l'eficàcia de la nostra vacuna terapèutica contra la ITBL.

La troballa d'aquest ramat de cabres naturalment infectades i la possibilitat de poder disposar d'elles per a l'estudi de l'eficàcia terapèutica de la RUTI®, va suposar una gran oportunitat per a nosaltres ja que abans de dur a terme assaigs clínics d'avaluació de l'eficàcia de vacunes en humans, s'han de dur a terme estudis en models experimentals grans i fins a aquest moment, tots els estudis pre-clínics que s'havien dut a terme en el nostre grup, s'havien desenvolupat usant el model murí i el de cobai. A més, la TB caprina i la humana són molt similars tant pel que fa a la via d'infecció com pel que fa a la histopatologia.

En estudis anteriors amb models experimentals de menor volum, ja s'havia pogut demostrar l'eficàcia terapèutica de la vacuna RUTI® i descriure el mecanisme d'acció [5] [1] [150], però encara existien algunes incògnites importants que no es podien estudiar en aquests models de poc volum com, per exemple, la generació de Fenomen de Koch.

El model de cabra també ens va semblar un model interessant perquè són animals grans i, per tant, segons la *Teoria dels volums* [1], poden desenvolupar una resposta inflamatòria major. Per aquesta raó, aquest model era interessant per a avaluar la possible toxicitat provocada per la vacunació, així com la generació de Fenomen de

Koch. Per tant, les conclusions que obtindríem d'aquest estudi ens ajudarien a tenir una idea bastant propera a la realitat del potencial del tractament que es proposava al nostre grup contra la ITBL, com a teràpia humana.

El fet de què no s'usés un model experimental i que les cabres ja estiguessin naturalment infectades, va fer que aquest estudi tingués la limitació de l'heterogeneïtat de la població, que se sumava a la dificultat per a discernir entre les cabres latentment infectades i les que tenien TB activa.

Gràcies als treballs anteriors d'estudis pre-clínic d'avaluació de vacunes antituberculosos sobretot en model boví [168] i un altre estudi amb vaques, en el que es va demostrar la correlació entre la producció d'IFN- $\gamma$  en resposta a ESAT-6 i la severitat de l'afectació patològica [16], es va poder dividir la població en diferents grups més o menys homogenis, usant com a criteri d'agrupació el grau d'afectació. Per a la tria d'animals i separació d'aquests en diferents grups, no només es va usar el paràmetre obtingut de l'avaluació de la resposta a ESAT-6 sinó que també es va usar el resultat obtingut de l'examen radiològic dels animals igual que es fa en humans, per a diferenciar entre TB activa o ITBL.

Un cop es van dividir els animals en diferents grups, es va dur a terme l'estudi d'avaluació de l'eficàcia de la vacunació i el d'avaluació de la bioseguretat de l'administració de la vacuna.

Per a dur a terme l'estudi de l'eficàcia de la vacunació, es va tractar els animals amb INH per tal d'eliminar la població de macròfags escumosos acumulats al voltant del centre necròtic i poder, així, avaluar l'efecte local de l'estimulació dels limfòcits gràcies a la vacunació amb RUTI®.

Els estudis pre-clínic amb ratolins i cobais duts a terme en el nostre grup abans d'aquest assaig amb cabres, havien demostrat l'efecte terapèutic sinèrgic entre l'administració de quimioteràpia de curta duració junt amb l'administració de la vacuna RUTI®.

Anteriorment, es va demostrar la necessitat de la quimioteràpia abans de la vacunació amb RUTI® per a disminuir la càrrega bacteriana, disminuint la resposta inflamatòria (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) [169] i per tant, eliminant la població de macròfags escumosos encarregats de netejar el teixit necròtic generat per la resposta inflamatòria local a les

lesions granulomatoses. L'absència d'aquestes cèl·lules a les lesions faria que disminuís la població de macròfags escumosos responsable de la immunosupressió dels limfòcits que van a les lesions a activar als macròfags infectats [102] [170] i, per tant, no emmascararia l'efecte *boosting* provocat per la vacunació amb RUTI®.

Respecte als resultats obtinguts de l'estudi d'eficàcia dir que no es van obtenir diferències estadísticament significatives entre el grup tractat amb quimioteràpia i el tractat amb quimioteràpia més RUTI®, pel que fa a la determinació del barem patològic i a la càrrega bacteriana. Aquest resultat va ser sorprenent donat que en el model murí infectat amb baixa dosi per aerosol, es troben disminucions significatives de la càrrega bacteriana i del percentatge d'àrea afectada [150].

Donat que el model murí no desenvolupa necrosi intragranulomatosa, perquè és un model tolerant que controla la resposta inflamatòria que genera perquè no es pot permetre el luxe de destruir molt parènquima pulmonar per raons descrites a la *Teoria dels volums* [1], s'intuïa que a l'avaluar RUTI® en models capaços de generar una resposta inflamatòria major, l'efecte provocat per la RUTI® també augmentaria, però això no va ser així. L'absència de diferències significatives pot ser, precisament, pel fet de que els animals grans controlen la infecció per si sols i, per tant, els efectes de la vacunació no són tant notables. De totes maneres, una altra explicació podria ser que les cabres estaven infectades amb *M. caprae* i que la vacuna està desenvolupada amb un *background* genètic MTB, podent no ser igual d'eficient amb aquesta espècie tot i formar part del MTB complex.

És possible que si s'hagués allargat la durada de l'experiment s'hauria pogut veure l'eficàcia de la RUTI® en el control de la reactivació bacteriana post-tractament antibiòtic. En model murí, aquest efecte es veu ja a les 4 setmanes post-tractament precisament per la tolerància del ratolí front la infecció tuberculosa. En un model major, menys tolerant, és possible s'hagués hagut d'allargar més el temps d'evolució de la infecció post-tractament.

No només no es van veure diferències estadísticament significatives comparant el dos règims terapèutics avaluats en aquest estudi (INH o INH + RUTI®) sinó que tampoc es van trobar diferències entre aquests dos grups i el grup control infectat i no tractat. De

totes maneres, sí es va detectar una tendència a disminuir el barem patològic a pulmó i teixits extrapulmonars. El tractament amb INH+RUTI® va ajudar al control del dany tissular a limfonodes pulmonars i extrapulmonars, podent-se interpretar que ajuda al control de la disseminació bacteriana localment i extrapulmonarment.

En quant a la secreció d'IFN- $\gamma$  en resposta a l'estimulació *ex vivo* amb ESAT-6, PPD-B o RUTI® com a mesura de la resposta cel·lular, la vacunació va provocar un augment d'aquesta mesura demostrant l'efecte *boosting* de la vacunació, tot potenciant la resposta específica contra MTB. Pel que fa al tractament amb INH, en altres estudis s'havia demostrat l'augment d'aquesta resposta durant el tractament antibiòtic [171] degut a l'augment d'antígens estructurals disponibles, induït per la destrucció bacteriana per part del tractament antibiòtic. En aquest estudi es va veure l'efecte contrari. És a dir, una disminució de la resposta degut a què no es va determinar la resposta cel·lular durant el tractament sinó abans i després d'aquest. A més, es va estimular les cèl·lules amb ESAT-6 i no amb antígens estructurals disponibles per la mort bacteriana. Aquesta disminució de la resposta després de la teràpia amb INH es deu a la disminució de la càrrega bacteriana i a què es va fer l'avaluació estimulants les cèl·lules amb ESAT-6, que és un antigen secretat per bacils en multiplicació activa. Tal com s'ha descrit anteriorment [172], aquesta resposta correlaciona amb la càrrega bacteriana.

En aquest estudi també es va avaluar la bioseguretat de la vacunació amb RUTI®. En cap animal es van trobar efectes tòxics locals o sistèmics importants deguts a la vacunació. No es va observar Fenomen de Koch en animals vacunats, com ja s'havia demostrat anteriorment en models més petits [5] [1] [150], confirmant la bioseguretat de l'administració de RUTI®.



## **Conclusions**

- Aquest estudi demostra la utilitat de les cabres naturalment infectades com a model per a l'avaluació de noves teràpies antituberculoses, malgrat la variabilitat deguda a què era un estudi de camp.
- La vacuna RUTI® va ajudar a controlar la disseminació extrapulmonar.
- La vacuna RUTI® provoca un augment de la resposta cel·lular dirigida contra bacils en multiplicació activa.
- La vacuna RUTI® és una vacuna segura, no provocant efectes tòxics locals o sistèmics en cap animal en què es va administrar, suposant un nou pas cap a l'avaluació com a teràpia de la ITBL en humans, administrada després d'un tractament de curta durada amb INH.



*III. Desenvolupar un model experimental d'ITBL en minipigs spf que permeti estudiar la immunopatologia de la infecció tuberculosa humana i demostrar la Hipòtesi Dinàmica de la latència. Aquest model hauria de servir d'eina per a avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de futurs candidats a vacuna o tractament contra la ITBL, a més de servir per avaluar la bioseguretat i l'eficàcia de la RUTI®.*



Actualment, se sap ben poc sobre l'evolució de la ITBL en humans a nivell histopatològic, encara que existeixen alguns estudis que ens ajuden a entendre l'evolució de les lesions [173] [174]. A grans trets, es desenvolupa una resposta inflamatòria important (amb presència de cèl·lules gegants, producte de la fusió de macròfags activats), generant-se necrosi intragranulomatosa i també una forta resposta fibròtica, encapsulant la lesió. És realment molt difícil trobar bacils a l'interior d'aquestes lesions.

Les radiografies pulmonars revelen la presència de lesions pulmonars calcificades que fan pensar que, després de la infecció per MTB, hi ha una disseminació inicial de les lesions que evolucionen calcificant-se [175].

Fa molts anys es va demostrar que els bacils tuberculosos podien persistir en un estat latent i que un percentatge molt baix d'aquests acabaven desenvolupant lesions [176]. Aquest treball va ser l'origen de la teoria clàssica de la ITBL, on un bacil latent podia ressuscitar degut a una immunodepressió de l'hostatger i generar TB activa [174].

Aquesta teoria va ser contrariada per altres més noves que explicaven la persistència de la infecció tuberculosa latent des d'altres punts de vista com ara:

- La causa més probable de TB en adults era la reinfecció externa [173], visió de la infecció tuberculosa latent com una conseqüència d'autoinoculacions constants, amb un continu escapament dels bacils a l'exterior de les lesions en el procés de neteja i drenatge d'aquestes, provocant episodis febrils [177] [178].
- La hipòtesi més recent que veu la infecció tuberculosa latent com un procés degut a reinfeccions constants [11] [2].

En aquest estudi es va poder seguir l'evolució de les lesions tuberculosos durant 20 setmanes després de la infecció experimental, podent veure en aquest model *in vivo* l'evolució de les lesions i ajudant a explicar la ITBL com un procés de constants reinfeccions endògenes.

El model experimental que es va desenvolupar en aquest estudi va controlar la infecció igual que la majoria d'humans immunocompetents quan s'infecten amb MTB a les vies respiratòries baixes. Tot això en un context caracteritzat per una resposta immune tipus Th1, control de la càrrega bacteriana, inducció constant de lesions noves a pulmó i resolució d'aquestes convertint-se en lesions velles, com a resultat d'una resposta fibròtica important a nivell local, en la que sembla que el septe pulmonar interlobular juga un paper molt important en l'encapsulament dels granulomes.

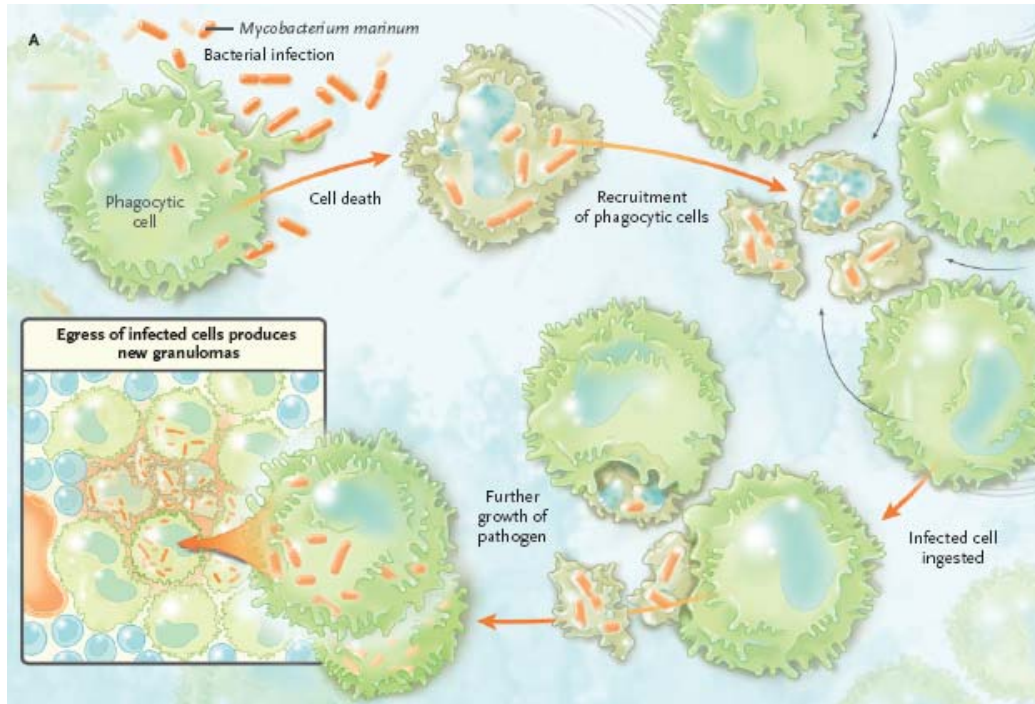
Aquest procés de tancament de la lesió és crucial limitant la disseminació bacil·lar a través dels espais alveolars i, per tant, explicant la disminució de la generació de noves lesions 9 setmanes després de la infecció. De totes maneres, la generació de lesions tuberculosos tot i que va disminuir, no va desaparèixer donant suport a la Hipòtesi Dinàmica de la ITBL que postula que aquesta es manté per un procés constant de reinfeccions endògenes generant-se lesions noves contínuament [11] [2].

La teoria tradicional considera un escenari estàtic on el bacil latent roman a dins de lesions estàtiques durant anys, fins que pot reactivar aprofitant un episodi d'immunosupressió. El que defensa la Hipòtesi Dinàmica és la possibilitat dels bacils latents per a escapar de les lesions en el procés de drenatge cap a l'espai alveolar per a ser finalment evacuats cap al tracte gastrointestinal, formant part del fluid alveolar. Durant la inhalació es poden formar aerosols a partir del fluid alveolar, fent possible que bacils que eren transportats en aquest fluid passin a formar part d'aquests aerosols, podent reinfectar el parènquima pulmonar i perpetuant la infecció. Com que la resposta a MTB es bàsicament cel·lular i contra bacils en multiplicació activa, hi ha una oportunitat pels bacils a multiplicar-se abans que el sistema immune no se n'adoni de què s'ha generat un nou focus infecció al pulmó.

La Hipòtesi Dinàmica de la infecció permet la focalització en una diana terapèutica clara. Aquesta diana són els bacils latents que s'escapen i reinfecten el parènquima pulmonar perpetuant la infecció.

Observant l'evolució de les lesions en aquest model animal que va desenvolupar una ITBL tan semblant als humans en els animals del grup control no tractat, es pot explicar la causa del nostre èxit en el control de la infecció i la baixa incidència de reactivació a TB activa en humans, gràcies al procés d'encapsulament.

Els macròfags infectats que són drenats a fora del granuloma, juguen un paper molt important en la generació de noves lesions, tal i com es va demostrar en un estudi anterior amb *Zebrafish* infectats per *M. marinum* en què els macròfags infectats que escapaven de les lesions primàries podien generar noves lesions, però en aquest cas en la fase innata de la infecció [17].



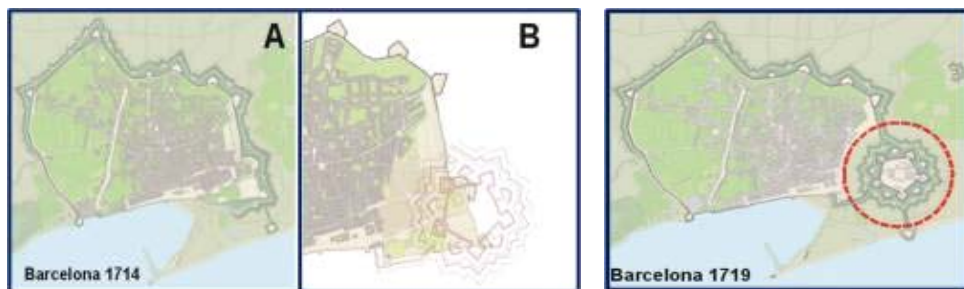
**Figura 44.** de Davis et al., 2009 [17]

Les lesions joves que es van trobar en aquest model, eren molt semblants a les descrites en ratolí anteriorment [102]. Lesions desestructurades amb infiltrat compost per neutròfils, macròfags i limfòcits sense necrosi intragranulomatosa i sense encapsular. A diferència dels ratolins, en el model d'ITBL en *minipigs*, no es va trobar abundància de bacteris a l'interior de les lesions. Aquest fet torna a reforçar la gran similitud entre el model experimental que es va desenvolupar i la ITBL humana, sent els *minipigs*, igual que nosaltres, un model poc tolerant a la presència de bacils i en el que una càrrega bacteriana baixa és suficient per a desenvolupar una forta resposta inflamatòria. Igual que passa al model murí, les lesions joves que es van trobar en el model experimental de *minipig*, estaven en contacte directe amb els espais alveolars, permetent fàcilment el drenatge dels macròfags alveolars infectats cap a l'exterior [102] [3].

A diferència del model murí en el que es pot veure un gran número de macròfags escumosos acumulats a la perifèria de la lesió, en els talls histològics estudiats en els *minipigs* no es va trobar tanta acumulació de cèl·lules d'aquest tipus degut al major tamany dels espais alveolars, permetent un drenatge més efectiu. Aquest procés d'escapament dels macròfags alveolars i disseminació està bastant limitat temporalment, comprovant-se per la baixa presència de macròfags alveolars al rentat broncoalveolar. Segurament, aquest fet està relacionat amb el progrés de l'encapsulament de les lesions, atrapant als macròfags alveolars a dins i col·laborant, per tant, en l'increment de necrosi intragranulomatosa a lesions més velles ja encapsulades [106] [179].

Els resultats obtinguts de l'estudi macroscòpic i microscòpic de les lesions va permetre classificar-les en diferents etapes de formació i valorar la importància de la proliferació dels fibroblasts que s'acaben transformant en miofibroblasts que sintetitzen la matriu de reticulina que contrau la lesió i li dona una forma esfèrica que és una forma que ajuda a suportar les forces externes.

La formació del granuloma amb forma esfèrica permet una estructura molt eficient que permet un estalvi energètic [180] [181]. L'estructura del granuloma permet controlar la disseminació dels bacils no replicatius però permet a l'hora la supervivència d'aquests al seu interior, protegint-los de l'atac de noves cèl·lules del sistema immune (*Citadel paradox*, [8]). A més, el granuloma no és tan sols una estructura defensiva, sinó que permet que s'arribi a una concentració de citocines suficient per a atraure noves cèl·lules del sistema immune, fet que seria impossible en el cas de què no es formessin granulomes i els macròfags infectats es trobessin aïllats [182].



**Figura 45.** de Cardona, 2010 [8]



Després de la formació del granuloma, comença el procés de curació propi del pulmó. Un cop els bacils arriben al parènquima pulmonar i són fagocitats pels macròfags residents, comencen a créixer intracel·lularment provocant la necrosi d'aquests, tot mantenint la resposta inflamatòria (arribada de nous macròfags que són reclutats per fagocitar els *debris* cel·lulars i material necròtic que es genera, junt amb els bacils alliberats novament a l'espai extracel·lular).

En aquest ambient, hi ha secreció de TNF- $\alpha$ , que és un inductor de la síntesi i deposició de fibrina al parènquima danyat [183]. Aquesta fibrina serveix de matriu pel reclutament de noves cèl·lules a la lesió. Degut a la fagocitosis de macròfags i neutròfils que s'apoptosen *in situ* s'indueix la secreció de TGF- $\beta$  i prostaglandina E<sub>2</sub>, que tenen un efecte anti-inflamatori i inductor de la fibrosi de la lesió [184] [185] [186]. La presència de TGF- $\beta$  fa que es reclutin fibroblasts que es comencen a acumular a la lesió i que, juntament amb l'estrès mecànic, fa que aquests es transformin en miofibroblasts contràctils que ajuden a la contracció i estructuració de la lesió [180] [187]. En treballs anteriors s'ha demostrat la seva relació amb els granulomes deguts a infeccions micobacterianes [188].

En el model experimental que es va desenvolupar en aquest estudi, es van observar tots aquest processos escleròtics que també estan descrits en l'evolució dels granulomes humans [173]. És a dir, reclutament i proliferació de fibroblasts que posteriorment es transformen en miofibroblasts que col·laboren en la determinació de l'estructura de la lesió, juntament amb la formació de la càpsula fibròtica externa la qual sorgeix del contacte amb el septe interlobular.

És possible que aquesta similitud amb els granulomes humans sigui deguda a l'existència del septe interlobular en *minipigs* igual que en humans. Les lesions granulomatoses són molt sensibles a l'estrès mecànic i reaccionen amb la proliferació dels fibroblasts i conseqüent engruiximent degut a la síntesi de la càpsula de col·lagen [189].

En el nostre model de TB latent en *minipigs*, es va poder relacionar el procés d'encapsulament de les lesions amb la disminució de la disseminació local i, per tant, amb la reducció de l'escapament bacil·lar. En models experimentals com ratolí i cobai,

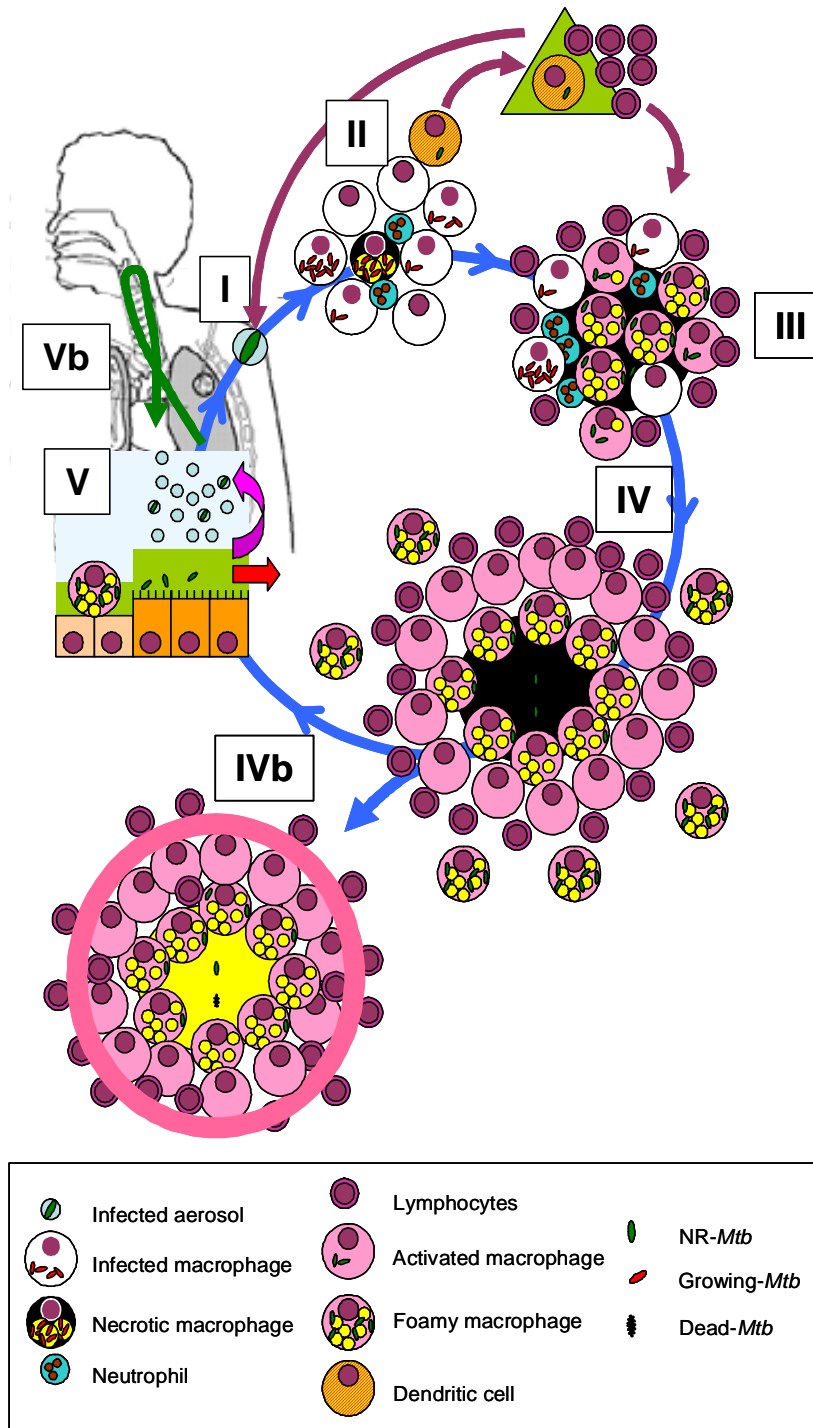
en què no es desenvolupa aquesta càpsula de col·lagen externa, hi ha un constant escapament de bacils de les lesions podent-se trobar macròfags escumosos infectats al BAL [102] [3].

Aquest mecanisme de control de l'escapament bacil·lar va ser la base de la teràpia antituberculosa en l'era pre-quimioteràpica, coneguda amb el nom de la col·lapsoteràpia. Aquesta, reduïa la formació de noves lesions i la líquefacció, a la vegada que ajudava a la curació i fibrosi local [173] [178].

En aquest estudi es va poder demostrar que un cop les lesions s'encapsulaven, començava el procés de curació i retracció de la capa perifèrica de col·lagen, tot començant la mineralització del material necròtic. Ja s'havia vist abans, que la fibrosi i la resposta antiinflamatòria que es genera per fagocitosi de cèl·lules apoptòtiques limitava l'arribada de nous macròfags capaços de fagocitar cossos apoptòtics, afavorint l'acumulació d'aquests i, per tant, el procés de mineralització [190].

La calcificació de les lesions podria ser induïda per la destrucció dels macròfags escumosos, acumulant-se material necròtic [106] [179] a més de fosfatidilserina que és una mol·lècula que té la propietat de promoure l'acumulació de calci i ions fosfat i que junt amb l'increment local de pH [191] [192], podria fer que es produeixi aquest fenomen.

L'observació de lesions mineralitzades i encapsulades en el model experimental desenvolupat en aquest estudi, va permetre revisar la figura del cicle de la ITBL, descrita anteriorment a la introducció d'aquest treball, afegint una nova fase al cicle que seria la IVb. Aquesta, representa com un cop el centre necròtic comença a mineralitzar-se i el granuloma s'encapsula, els bacils no replicatius ja no poden continuar sent drenats.



**Figura 46.** de Cardona et al., 2011 [9]

Els bacils entren als alvèols pulmonars, via aerosols. (I) Aquí són fagocitats pels macròfags alveolars. Un cop fagocitats, els bacils es divideixen a dins d'aquestes cèl·lules provocant la seva necrosi. Els monòcits infectats esdevenen cèl·lules dendrítiques que migren als limfonodes (triangle verd) per a presentar els antígens tuberculosos. (II). Comencen a ser reclutats al granuloma neutròfils, cèl·lules NK,

limfòcits i més macròfags. (III) Els macròfags infectats que es transformen en macròfags escumosos drenen els bacils no replicatius que han estat alliberats a l'espai extracel·lular i han estat fagocitats per ells. (IV) Un cop el centre necròtic comença a mineralitzar-se i el granuloma s'encapsula, els bacils no replicatius ja no poden continuar sent drenats. (IVb) Els bacils no replicatius que han escapat del granuloma a dins dels macròfags escumosos, són novament drenats a l'espai alveolar a on passen a formar part del fluid alveolar que ascendeix cap a l'espai bronquial superior, passant a l'esòfag i sent deglutits o tornant a formar part dels aerosols que seran inhalats i tornaran al parènquima pulmonar reinfectant-lo (V). El drenatge dels bacils als ganglis limfàtics infectats, a través dels conductes toràcics cap a l'aurícula dreta, per a ser bombejats de nou als pulmons a través de l'artèria pulmonar, també contribueix al procés de reinfecció (Vb).

La mineralització del material junt amb el pH alcalí són factors d'*starvation* inductors d'estrès hipòxic i osmòtic, atrapant als bacils latents extracel·lulars al material necròtic [192].

La fibrosi i la calcificació de les lesions són dos factors que contribueixen al control de la càrrega bacteriana, com s'ha demostrat anteriorment en el model de cobai [193] i de la disseminació local de la infecció, com s'ha demostrat en aquest estudi.

Es va poder demostrar que en l'evolució de les lesions granulomatoses, des de la seva formació fins a la cicatrització d'aquestes, existeixen dos patrons de fibrosi que ja havien estat descrits anteriorment [173]. Un primer patró en el que els fibroblasts es transformen en miofibroblasts que organitzen les fibres del col·lagen, fent que les lesions adquireixen la forma esfèrica característica dels granulomes. L'altre patró de fibrosi és induït per la presència del septe interlobular, permetent l'encapsulament de les lesions. Els fibroblasts del septe que produeixen col·lagen tipus I són estimulats amb TGF- $\beta$  i comencen a proliferar rodejant la lesió per acabar encapsulant-la.

En aquest treball es va veure que la quimioteràpia amb INH ajudava al control de la disseminació tot disminuint la generació de noves lesions, com era d'esperar degut a la seva capacitat bactericida. Va ser sorprenent la troballa de què l'administració d'INH també reduïa el número de lesions velles. Això va fer pensar que aquesta teràpia fa

disminuir la fibrosi, segurament degut a la disminució del procés inflamatori [169]. La reducció de la fibrosi induïda per la disminució de la inflamació gràcies a la quimioteràpia, suggereix una relació positiva directe entre el procés inflamatori i la fibrosi.

Pel que fa a l'administració de la RUTI®, es va observar l'efecte contrari. És a dir, va provocar un augment del número de lesions, particularment de les velles, reflectint l'efecte pro-inflamatori provocat per la vacunació que provoca que es generi una resposta immune més potent, capaç de detectar les lesions ràpidament i provocant ràpidament la fibrosi d'aquestes. En estudis anteriors ja s'ha demostrat l'habilitat de la vacuna per a generar una resposta Th1, Th2 i Th3 [5], un augment de la immunitat cel·lular tot augmentant el número de cèl·lules Th1 capaces de reconèixer bacils replicatius i no replicatius [150] i una resposta humoral protectora [151]. Sigui com sigui, l'augment del número de lesions es deu a un efecte protector degut a la vacunació, ja que es va observar una disminució de la càrrega bacteriana en el lòbul pulmonar inoculat.

Els resultats que es presenten en aquest estudi demostren un escenari molt similar al de la ITBL en humans, la qual es podria explicar mitjançant reinfeccions endògenes constants, que mantindrien la infecció al llarg del temps [11].

És ben sabut que la probabilitat a desenvolupar una TB activa disminueix amb el temps [97]. Els nostres resultats demostren com cau la inducció de noves lesions després d'una primera etapa de disseminació. Posteriorment, es manté en un nivell residual constant, tot disminuint la probabilitat de progressió a enfermetat [175].

Els nostres resultats encaixen amb el fet de què en humans es trobin cèl·lules efectores secretores d'IFN- $\gamma$  específiques de MTB en individus latentment infectats [194]. Ja que l'ESAT-6 és un antigen secretat pels bacils en multiplicació activa [195], la presència de cèl·lules efectores específiques d'aquest antigen es relaciona amb la teoria del manteniment de la ITBL per reinfeccions endògenes [11] que faria que apareguessin lesions de nova generació constantment, com s'ha pogut veure en el model experimental desenvolupat en aquest estudi.

Aquestes lesions de nova generació que s'han trobat en el nostre model, són petites (0,5-1mm) i no són visibles amb radiografia de tòrax, encaixant amb el diagnòstic de la ITBL que es caracteritza, entre altres trets, per l'absència de lesions en el diagnòstic per raigs X.

El control de la infecció tuberculosa s'aconsegueix evitant la disseminació dels bacils no replicatius, encapsulant les lesions i controlant el procés inflamatori. La vacuna RUTI® augmenta el procés inflamatori i, per tant, no controla la disseminació, fet que també s'observa en el grup d'animals només tractats amb INH. L'èxit de la RUTI® es deu a que ajuda a disminuir la càrrega de bacils extracel·lulars no replicatius, disminuint la probabilitat de què aquests siguin fagocitats i puguin replicar intracel·lularment. La multiplicació de bacils tuberculosos extracel·lularment només s'ha detectat en el material líquidificat de lesions caseoses [196], que no són presents en el cas d'ITBL en humans, ni tampoc en el model experimental que s'ha desenvolupat.

En aquest model s'ha pogut demostrar que una vegada actuen els factors anti-inflamatoris i s'encapsulen les lesions, aquestes comencen a mineralitzar-se, podent ser un altre factor d'estrès cap als bacils extracel·lulars no replicatius que puguin romandre.

## Conclusions

- El contacte de les lesions granulomatoses amb el septe interlobular és molt important en l'encapsulament de les lesions i, per tant, en el control de la infecció.
- La ITBL és un procés dinàmic en què hi ha reinfeccions endògenes constants.
- El model d'ITBL en *minipigs* infectats per inoculació T.T. d'una baixa dosi de MTB presenta molts paral·lelismes amb la ITBL en humans, convertint-lo en un model molt útil per a l'estudi i enteniment de l'evolució d'aquesta.
- El model d'ITBL en *minipigs* infectats per inoculació T.T. d'una baixa dosi de MTB ofereix l'oportunitat de tenir un model fiable per a testar futures teràpies preventives i terapèutiques.
- La vacuna RUTI® és una vacuna terapèutica que ajuda al control de la ITBL, tot disminuint la càrrega bacteriana gràcies al *boosting* de la immunitat.
- La vacunació amb RUTI® no provoca cap efecte tòxic local o sistèmic en el model d'ITBL en *minipigs* infectats per inoculació T.T. d'una baixa dosi de MTB.
- La vacuna RUTI® pot ser una vacuna eficaç contra la ITBL en humans, donat els resultats positius trobats en aquest model tant similar amb la realitat en humans.

- La vacuna RUTI® pot ser una vacuna segura per a ser administrada a humans, donada l'absència de toxicitat en el nostre model animal fisiològicament tan semblant als humans.



## ***CONCLUSIONS GENERALS***



## Conclusions generals

- La vacuna RUTI® és una vacuna terapèutica eficaç contra la ITBL, fent un boosting de la immunitat cel·lular contra antígens secretats pels bacils en multiplicació activa i contra els antígens estructurals dels bacils no replicatius.
- L'administració de RUTI® augmenta la resposta humoral contra antígens tuberculosos.
- La vacuna RUTI® és una vacuna segura, que no provoca efectes tòxics locals ni sistèmics en el model de cabra naturalment infectada per *M. caprae* i en el model experimental d'ITBL desenvolupat en *minipigs spf*.
- El model de cabra naturalment infectades per *M. caprae* és un model útil per a l'avaluació de noves teràpies antituberculosos
- El model experimental d'ITBL desenvolupat en *minipigs spf* és una eina útil per a l'avaluació de nous candidats preventius i terapèutiques a contra la ITBL humana
- El model experimental d'ITBL desenvolupat en *minipigs spf* és un model útil per a l'estudi i enteniment de l'evolució de la ITBL en humans.
- La ITBL és un procés dinàmic en què hi ha constants reinfeccions endògenes del parènquima pulmonar.
- El contacte de les lesions granulomatoses amb el septe interlobular és molt important en l'encapsulament de les lesions i, per tant, en el control de la infecció.



## ***REFERÈNCIES***



1. Cardona, P.J., *RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection*. Tuberculosis (Edinb), 2006. **86**(3-4): p. 273-89.
2. Cardona, P.J., *Revisiting the natural history of tuberculosis. The inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(1): p. 7-14.
3. Caceres, N., et al., *Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(2): p. 175-82.
4. Vilaplana, C., et al., *Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI*. Vaccine, 2010. **28**(4): p. 1106-16.
5. Cardona, P.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**(11): p. 1393-8.
6. Green, G.M., *Alveolobronchiolar transport mechanisms*. Arch Intern Med, 1973. **131**(1): p. 109-14.
7. Cardona, P.J., et al., *Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol, 2000. **52**(2): p. 156-63.
8. Cardona, P., *The granuloma in tuberculosis: friend or foe? (towards the resolution of the Citadel paradox)*. 11th International Symposium of KU Leuven. Leuven, Belgium, 2010.
9. Cardona, P.J. and J. Ivanyi, *The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle bacilli*. Enferm Infec Microbiol Clin, 2011. **29 Suppl 1**: p. 14-9.
10. Fenton, M.J. and M.W. Vermeulen, *Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 683-90.
11. Cardona, P.J., *A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection*. Infection, 2009. **37**(2): p. 80-6.
12. Korb, D.S., B.E. Schneider, and U.E. Schaible, *Innate immunity in tuberculosis: myths and truth*. Microbes Infect, 2008. **10**(9): p. 995-1004.
13. Parida, S.K. and S.H. Kaufmann, *Novel tuberculosis vaccines on the horizon*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(3): p. 374-84.
14. Vilaplana, C. and P.J. Cardona, *Tuberculin immunotherapy: its history and lessons to be learned*. Microbes Infect, 2010. **12**(2): p. 99-105.
15. Lonnroth, K. and M. Raviglione, *Global epidemiology of tuberculosis: prospects for control*. Semin Respir Crit Care Med, 2008. **29**(5): p. 481-91.
16. Vordermeier, H.M., et al., *Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following Mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis*. Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 3026-32.
17. Davis, J.M. and L. Ramakrishnan, *The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection*. Cell, 2009. **136**(1): p. 37-49.
18. Cardona, P.J., *Robert Koch was right. Towards a new interpretation of tuberculin therapy*. Enferm Infec Microbiol Clin, 2006. **24**(6): p. 385-91.
19. Cervellera, M.J.B., *La tuberculosis i la seva Història*. Col·lecció Històrica de Ciències de la Salut. Fundació Uriach 1838, 1992.
20. Sakula, A., *Carlo Forlanini, inventor of artificial pneumothorax for treatment of pulmonary tuberculosis*. Thorax, 1983. **38**(5): p. 326-32.

21. Burke, D.S., *Vaccine therapy for HIV: a historical review of the treatment of infectious diseases by active specific immunization with microbe-derived antigens*. *Vaccine*, 1993. **11**(9): p. 883-91.
22. Riviere, C., *A Lecture on the action of tuberculin and its application to the treatment of different forms of tuberculosis*. *Br Med J*, 1912. **1**(2675): p. 765-767.
23. Riviere, C., *Discussion on the Uses of Tuberculin in Pulmonary Tuberculosis*. *Proc R Soc Med*, 1912. **5**(Ther Pharmacol Sect): p. 119-21.
24. Trudeau, E.L., E.R. Baldwin, and H.M. Kinghorn, *Studies on the Tuberculin Reaction*. *J Med Res*, 1904. **12**(2): p. 169-89.
25. Wright, A.E., *On the Treatment of Acne, Furunculosis, and Sycosis by Therapeutic Inoculations of Staphylococcus Vaccine*. *Br Med J*, 1904. **1**(2262): p. 1075-1077.
26. Wright, A.E., *A Lecture on therapeutic inoculations of bacterial vaccines and their practical exploitation in the treatment of disease: Delivered at the Medical Graduates' College and Polyclinic*. *Br Med J*, 1903. **1**(2210): p. 1069-1074.
27. von Pirquet, C., *Demonstration zur Tuberculindiagnose durch Hautimpfung*. *Berl Klin Wochenschr*, 1909: p. 481:699.
28. Rivière, C., *Tuberculin treatment*. *Lancet*, 1912: p. 1:147.
29. van der Wel, N., et al., *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1287-98.
30. Davila, S., et al., *Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(10): p. e1000218.
31. Velez, D.R., et al., *NOS2A, TLR4, and IFNGR1 interactions influence pulmonary tuberculosis susceptibility in African-Americans*. *Hum Genet*, 2009. **126**(5): p. 643-53.
32. Velez, D.R., et al., *Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans*. *Hum Genet*, 2010. **127**(1): p. 65-73.
33. North, R.J. and Y.J. Jung, *Immunity to tuberculosis*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 599-623.
34. Lazarevic, V., D. Nolt, and J.L. Flynn, *Long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection is mediated by dynamic immune responses*. *J Immunol*, 2005. **175**(2): p. 1107-17.
35. Lin, P.L., et al., *Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model*. *Infect Immun*, 2009. **77**(10): p. 4631-42.
36. Sharpe, S.A., et al., *Determination of lesion volume by MRI and stereology in a macaque model of tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009. **89**(6): p. 405-16.
37. Langermans, J.A., et al., *Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on Mycobacterium tuberculosis infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 11497-502.
38. Lin, P.L., et al., *Early events in Mycobacterium tuberculosis infection in cynomolgus macaques*. *Infect Immun*, 2006. **74**(7): p. 3790-803.
39. Doherty, T.M., et al., *Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients*. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(2): p. 704-6.
40. Flynn, J.L. and J. Chan, *Immunology of tuberculosis*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 93-129.



41. Lawn, S.D., et al., *Short-term and long-term risk of tuberculosis associated with CD4 cell recovery during antiretroviral therapy in South Africa*. AIDS, 2009. **23**(13): p. 1717-25.
42. Diedrich, C.R., et al., *Reactivation of latent tuberculosis in cynomolgus macaques infected with SIV is associated with early peripheral T cell depletion and not virus load*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9611.
43. van Pinxteren, L.A., et al., *Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3689-98.
44. Serbina, N.V. and J.L. Flynn, *Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3980-8.
45. Stenger, S., et al., *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. Science, 1998. **282**(5386): p. 121-5.
46. Grotzke, J.E. and D.M. Lewinsohn, *Role of CD8+ T lymphocytes in control of Mycobacterium tuberculosis infection*. Microbes Infect, 2005. **7**(4): p. 776-88.
47. Chan, J., et al., *Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 736-40.
48. MacMicking, J.D., et al., *Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5243-8.
49. Flynn, J.L., et al., *Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1796-803.
50. Latorre, I., et al., *Quantitative evaluation of T-cell response after specific antigen stimulation in active and latent tuberculosis infection in adults and children*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009. **65**(3): p. 236-46.
51. Chee, C.B., et al., *Quantitative T-cell interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens in active and latent tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(6): p. 667-70.
52. Janssens, J.P., et al., *Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis*. Eur Respir J, 2007. **30**(4): p. 722-8.
53. Arend, S.M., et al., *Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(6): p. 618-27.
54. Goletti, D., et al., *Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(11): p. 1311-6.
55. Davidow, A.L., *Interferon-gamma release assay test characteristics depend upon the prevalence of active tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(11): p. 1411-5.
56. del Corral, H., et al., *IFN-gamma response to Mycobacterium tuberculosis, risk of infection and disease in household contacts of tuberculosis patients in Colombia*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8257.
57. Abebe, M., et al., *Expression of apoptosis-related genes in an Ethiopian cohort study correlates with tuberculosis clinical status*. Eur J Immunol, 2010. **40**(1): p. 291-301.

58. Tsao, T.C., et al., *Imbalances between tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptor forms, and interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in BAL fluid of cavitary pulmonary tuberculosis*. Chest, 2000. **117**(1): p. 103-9.
59. Doherty, T.M., R.S. Wallis, and A. Zumla, *Biomarkers of disease activity, cure, and relapse in tuberculosis*. Clin Chest Med, 2009. **30**(4): p. 783-96, x.
60. Jurado, J.O., et al., *Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 116-25.
61. Einarsdottir, T., E. Lockhart, and J.L. Flynn, *Cytotoxicity and secretion of gamma interferon are carried out by distinct CD8 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4621-30.
62. Darrah, P.A., et al., *Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 843-50.
63. Sutherland, J.S., et al., *Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease*. Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 723-9.
64. Winau, F., et al., *Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 105-17.
65. Winau, F., et al., *No life without death--apoptosis as prerequisite for T cell activation*. Apoptosis, 2005. **10**(4): p. 707-15.
66. Cooper, A.M., *Cell-mediated immune responses in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 393-422.
67. Khader, S.A., et al., *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 369-77.
68. Chen, X., et al., *Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T Cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **181**(7): p. 734-42.
69. Dlugovitzky, D., et al., *In vitro synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement*. Scand J Immunol, 1999. **49**(2): p. 210-7.
70. Harris, J., et al., *T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 505-17.
71. Belkaid, Y. and K. Tarbell, *Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 551-89.
72. Guyot-Revoll, V., et al., *Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(7): p. 803-10.
73. Toossi, Z. and J.J. Ellner, *Host response to Mycobacterium tuberculosis*. Front Biosci, 1998. **3**: p. e133-40.
74. Stenger, S., et al., *Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1684-7.
75. Foulds, K.E., C.Y. Wu, and R.A. Seder, *Th1 memory: implications for vaccine development*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 58-66.
76. Betts, J.C., et al., *Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 717-31.

77. Voskuil, M.I., et al., *Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 705-13.
78. Wayne, L.G. and C.D. Sohaskey, *Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 139-63.
79. Girardi, E., et al., *Impact of the HIV epidemic on the spread of other diseases: the case of tuberculosis*. AIDS, 2000. **14 Suppl 3**: p. S47-56.
80. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Tuberculosis associated with blocking agents against tumor necrosis factor-alpha. California, 2002-2003*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2004. **53**(30): p. 683-6.
81. Chan, J. and J. Flynn, *The immunological aspects of latency in tuberculosis*. Clin Immunol, 2004. **110**(1): p. 2-12.
82. Scanga, C.A., et al., *Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4531-8.
83. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
84. Chambers, C.A., et al., *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 565-94.
85. Shitrit, D., et al., *Role of soluble interleukin-2 receptor levels in patients with latent tuberculosis*. Lung, 2006. **184**(1): p. 21-4.
86. Rubin, L.A., et al., *Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro*. J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3172-7.
87. Kursar, M., et al., *Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2661-5.
88. Lillebaek, T., et al., *Molecular evidence of endogenous reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 years of latent infection*. J Infect Dis, 2002. **185**(3): p. 401-4.
89. Lillebaek, T., et al., *Stability of DNA patterns and evidence of Mycobacterium tuberculosis reactivation occurring decades after the initial infection*. J Infect Dis, 2003. **188**(7): p. 1032-9.
90. Jick, S.S., et al., *Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis*. Arthritis Rheum, 2006. **55**(1): p. 19-26.
91. Keane, J., *Tumor necrosis factor blockers and reactivation of latent tuberculosis*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 300-2.
92. Wallis, R.S., *Infectious complications of tumor necrosis factor blockade*. Curr Opin Infect Dis, 2009. **22**(4): p. 403-9.
93. Lin, P.L., et al., *Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent Mycobacterium tuberculosis infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 340-50.
94. Lawn, S.D., L.G. Bekker, and R. Wood, *How effectively does HAART restore immune responses to Mycobacterium tuberculosis? Implications for tuberculosis control*. AIDS, 2005. **19**(11): p. 1113-24.
95. Badri, M., D. Wilson, and R. Wood, *Effect of highly active antiretroviral therapy on incidence of tuberculosis in South Africa: a cohort study*. Lancet, 2002. **359**(9323): p. 2059-64.

96. Fox, W., G.A. Ellard, and D.A. Mitchison, *Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications*. Int J Tuberc Lung Dis, 1999. **3**(10 Suppl 2): p. S231-79.
97. Ferebee, S.H., *Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review*. Bibl Tuberc, 1970. **26**: p. 28-106.
98. Mitchison, D.A., *The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy*. Tubercle, 1985. **66**(3): p. 219-25.
99. Mitchison, D.A., *Basic mechanisms of chemotherapy*. Chest, 1979. **76**(6 Suppl): p. 771-81.
100. Grosset, J., *Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis*. Clin Chest Med, 1980. **1**(2): p. 231-41.
101. Wallace, J.G., *The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice*. Am Rev Respir Dis, 1961. **83**: p. 866-71.
102. Cardona, P.J., 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**(10): p. 5845-54.
103. Bui, T.D., D. Dabdub, and S.C. George, *Modeling bronchial circulation with application to soluble gas exchange: description and sensitivity analysis*. J Appl Physiol, 1998. **84**(6): p. 2070-88.
104. Cardona, P.J. and J. Ruiz-Manzano, *On the nature of Mycobacterium tuberculosis-latent bacilli*. Eur Respir J, 2004. **24**(6): p. 1044-51.
105. Millington, K.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis-specific cellular immune profiles suggest bacillary persistence decades after spontaneous cure in untreated tuberculosis*. J Infect Dis, 2010. **202**(11): p. 1685-9.
106. Peyron, P., et al., *Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000204.
107. Rook, G.A. and R. al Attiyah, *Cytokines and the Koch phenomenon*. Tubercle, 1991. **72**(1): p. 13-20.
108. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection*. MMWR Recomm Rep, 2000. **49**: p. 1-54.
109. Tuberculosis, G.d.T.s., *Consenso Nacional para el Control de la Tuberculosis en España*. Med Clin (Barc) 1992. **98**: p. 24-31.
110. Louis, G., *What are the prospects for a new golden era in vaccines?* . Eurohealth, 2008. **14**: p. 12-14.
111. Kaufmann, S.H., G. Hussey, and P.H. Lambert, *New vaccines for tuberculosis*. Lancet, 2010. **375**(9731): p. 2110-9.
112. Black, G.F., et al., *BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies*. Lancet, 2002. **359**(9315): p. 1393-401.
113. Azzopardi, P., et al., *Bacille Calmette-Guerin vaccine-related disease in HIV-infected children: a systematic review*. Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(11): p. 1331-44.
114. Santos, A., et al., *Severe axillary lymphadenitis after BCG vaccination: alert for primary immunodeficiencies*. J Microbiol Immunol Infect. **43**(6): p. 530-7.
115. Food and Drug Administration (FDA), C.f.B.E.a.R., *Guidance for Industry for the Evaluation of Combination Vaccines for Preventable Diseases: Production, Testing and Clinical Studies*. 1997. **97N-0029**: p. 1-19.

116. Caccamo, N., et al., *Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2211-20.
117. Hoft, D.F., et al., *A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers*. J Infect Dis, 2008. **198**(10): p. 1491-501.
118. Kampmann, B., et al., *Evaluation of human antimycobacterial immunity using recombinant reporter mycobacteria*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 895-901.
119. Cheon, S.H., et al., *Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(4): p. 901-7.
120. Cheng, S.H., et al., *Demonstration of increased anti-mycobacterial activity in peripheral blood monocytes after BCG vaccination in British school children*. Clin Exp Immunol, 1988. **74**(1): p. 20-5.
121. Andersen, P., *Effective vaccination of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins*. Infect Immun, 1994. **62**(6): p. 2536-44.
122. Andersen, P., *The T cell response to secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis*. Immunobiology, 1994. **191**(4-5): p. 537-47.
123. Doherty, T.M., et al., *Comparative analysis of different vaccine constructs expressing defined antigens from Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 2004. **190**(12): p. 2146-53.
124. Doherty, T.M., J. Dietrich, and R. Billeskov, *Tuberculosis subunit vaccines: from basic science to clinical testing*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(10): p. 1539-49.
125. Ly, L.H. and D.N. McMurray, *Tuberculosis: vaccines in the pipeline*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(5): p. 635-50.
126. Williams, A., et al., *Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2005. **85**(1-2): p. 29-38.
127. Abou-Zeid, C., et al., *The secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis and their relationship to those recognized by the available antibodies*. J Gen Microbiol, 1988. **134**(2): p. 531-8.
128. Andersen, P., et al., *Identification of immunodominant antigens during infection with Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol, 1992. **36**(6): p. 823-31.
129. Bacon, J. and P.D. Marsh, *Transcriptional responses of Mycobacterium tuberculosis exposed to adverse conditions in vitro*. Curr Mol Med, 2007. **7**(3): p. 277-86.
130. Hampshire, T., et al., *Stationary phase gene expression of Mycobacterium tuberculosis following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?* Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(3-4): p. 228-38.
131. Sherman, D.R., et al., *Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha -crystallin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7534-9.
132. Green, S.J., et al., *Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens*. Immunol Lett, 1994. **43**(1-2): p. 87-94.
133. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.
134. Ottenhoff, T.H., et al., *Control of human host immunity to mycobacteria*. Tuberculosis (Edinb), 2005. **85**(1-2): p. 53-64.

135. Demissie, A., et al., *Healthy individuals that control a latent infection with Mycobacterium tuberculosis express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6938-43.
136. Sahiratmadja, E., et al., *Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 820-9.
137. Jacobs, M., et al., *Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection*. Microbes Infect, 2007. **9**(5): p. 623-8.
138. Flynn, J.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 561-72.
139. Starck, J., et al., *Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis grown under aerobic and anaerobic conditions*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 11): p. 3821-9.
140. Wayne, L.G. and L.G. Hayes, *An in vitro model for sequential study of shift-down of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2062-9.
141. Woolhiser, L., et al., *In vivo adaptation of the Wayne model of latent tuberculosis*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2621-5.
142. Rustad, T.R., et al., *The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1502.
143. Waddell, S.J. and P.D. Butcher, *Microarray analysis of whole genome expression of intracellular Mycobacterium tuberculosis*. Curr Mol Med, 2007. **7**(3): p. 287-96.
144. Voskuil, M.I., K.C. Visconti, and G.K. Schoolnik, *Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy*. Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(3-4): p. 218-27.
145. McKinney, J.D., et al., *Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 735-8.
146. Park, J.S., et al., *Virulent clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(1): p. 80-6.
147. Saunders, B.M. and W.J. Britton, *Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(2): p. 103-11.
148. Hemsworth, G.R. and I. Kochan, *Secretion of antimycobacterial fatty acids by normal and activated macrophages*. Infect Immun, 1978. **19**(1): p. 170-7.
149. Larson, C.L., et al., *Symposium on Relationship of Structure of Microorganisms to Their Immunological Properties. Ii. Host-Reactive Properties of Cell Walls and Protoplasm from Mycobacteria*. Bacteriol Rev, 1963. **27**: p. 341-51.
150. Guirado, E., et al., *Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(8): p. 1229-37.
151. Guirado, E., 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**(5): p. 1252-9.

152. McMurray, D.N., *Guinea pig model of tuberculosis*. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. American Society for Microbiology, 1994. **135-147**.
153. Dannenberg, A.M., *Pathogenesis of human pulmonary tuberculosis. Insights from the rabbit model*. ASM Press, 2006.
154. Une, Y. and T. Mori, *Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2007. **30**(5-6): p. 415-25.
155. Buddle, B.M., D.N. Wedlock, and M. Denis, *Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife*. *Vet Microbiol*, 2006. **112**(2-4): p. 191-200.
156. Buddle, B.M., et al., *Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis*. *Vaccine*, 2002. **20**(7-8): p. 1126-33.
157. Stinear, T.P., et al., *Insights from the complete genome sequence of Mycobacterium marinum on the evolution of Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*, 2008. **18**(5): p. 729-41.
158. Tobin, D.M. and L. Ramakrishnan, *Comparative pathogenesis of Mycobacterium marinum and Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(5): p. 1027-39.
159. Phyu, S., et al., *A mouse model for latent tuberculosis*. *Scand J Infect Dis*, 1998. **30**(1): p. 59-68.
160. Gil, O., et al., *Enhanced gamma interferon responses of mouse spleen cells following immunotherapy for tuberculosis relapse*. *Clin Vaccine Immunol*, 2008. **15**(11): p. 1742-4.
161. (CDC), A.T.S.A.a.t.C.f.D.C.a.P., *Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(4 Pt 2): p. S221-47.
162. Orme, I.M., P. Andersen, and W.H. Boom, *T cell response to Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 1993. **167**(6): p. 1481-97.
163. Trajkovic, V., et al., *Effect of Mycobacterium tuberculosis-specific 10-kilodalton antigen on macrophage release of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide*. *Infect Immun*, 2002. **70**(12): p. 6558-66.
164. Grange, J.M., *Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis*. In P. D. O. Davies (ed.), *Clinical tuberculosis*, 1998. **8**.
165. Bermudez, L.E., et al., *Exposure to ethanol up-regulates the expression of Mycobacterium avium complex proteins associated with bacterial virulence*. *J Infect Dis*, 1993. **168**(4): p. 961-8.
166. Alavi, M.R. and L.F. Affronti, *Induction of mycobacterial proteins during phagocytosis and heat shock: a time interval analysis*. *J Leukoc Biol*, 1994. **55**(5): p. 633-41.
167. Cardona, P.J., *New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007. **6**(1): p. 27-39.
168. Buddle, B.M., et al., *Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2005. **85**(1-2): p. 19-24.
169. Cardona, P.J., et al., *Production of antibodies against glycolipids from the Mycobacterium tuberculosis cell wall in aerosol murine models of tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 2002. **55**(6): p. 639-45.

170. Strickland, D., U.R. Kees, and P.G. Holt, *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**(2): p. 250-8.
171. Wilkinson, K.A., et al., *Effect of treatment of latent tuberculosis infection on the T cell response to Mycobacterium tuberculosis antigens*. J Infect Dis, 2006. **193**(3): p. 354-9.
172. Andersen, P., et al., *The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted?* Trends Mol Med, 2007. **13**(5): p. 175-82.
173. Canetti, G., *The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. Histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis*. New York: Springer Publishing Company, Inc, 1955.
174. Ulrichs, T. and S.H. Kaufmann, *New insights into the function of granulomas in human tuberculosis*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 261-9.
175. Bezuidenhout J, S.J., *Pathology and pathogenesis of tuberculosis*. In: Schaaf S, Zumla A, eds. Tuberculosis: a comprehensive clinical reference. Philadelphia, PA: Saunders, 2009: p. 117-128.
176. Opie EL, A.J., *Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions and in lung tissue without tuberculous lesions*. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 4: 1, 1927.
177. Wright AE, R.S., *On the possibility of determining the presence or absence of tubercular infection by the examination of a patient's blood and tissue fluids*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character: Royal Society, 1906: p. 194-211.
178. Pottenger, F., *Tuberculosis in the child and the adult*. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1934: p. 611p.
179. Russell, D.G., et al., *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma*. Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 943-8.
180. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.
181. Lenzi, H.L., et al., *Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with Schistosoma mansoni: dependence on fiber radiation centers*. Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(5): p. 639-43.
182. Bru, A. and P.J. Cardona, *Mathematical modeling of tuberculosis bacillary counts and cellular populations in the organs of infected mice*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12985.
183. Mullarky, I.K., et al., *Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not hemorrhage or pathogen burden, dictate levels of protective fibrin deposition during infection*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1181-8.
184. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.
185. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 41-50.
186. D'Avila, H., et al., *Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages*. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2589-604.



187. Wipff, P.J., et al., *Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1311-23.
188. Fujita, J., et al., *Immunohistochemical distribution of epithelioid cell, myofibroblast, and transforming growth factor-beta1 in the granuloma caused by Mycobacterium avium intracellulare complex pulmonary infection*. Microbiol Immunol, 2002. **46**(2): p. 67-74.
189. Fraser, R., *Histology and gross anatomy of the respiratory tract*. In: Hamid Q, Shannon J, Martin J, eds. Physiologic basis of respiratory disease. Hamilton: B.C. Decker inc., 2005.
190. Torday, J.S. and V.K. Rehan, *The evolutionary continuum from lung development to homeostasis and repair*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(3): p. L608-11.
191. Huitema, L.F. and A.B. Vaandrager, *What triggers cell-mediated mineralization?* Front Biosci, 2007. **12**: p. 2631-45.
192. Hsu, H.H. and B.G. Abbo, *Role of bicarbonate/CO2 buffer in the initiation of vesicle-mediated calcification: mechanisms of aortic calcification related to atherosclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1690**(2): p. 118-23.
193. Lenaerts, A.J., et al., *Location of persisting mycobacteria in a Guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3338-45.
194. Pai, M., L.W. Riley, and J.M. Colford, Jr., *Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 2004. **4**(12): p. 761-76.
195. Andersen, P., *Host responses and antigens involved in protective immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol, 1997. **45**(2): p. 115-31.
196. Grosset, J., *Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 833-6.



***ARTICLES ANNEXATS***



## Enhanced Gamma Interferon Responses of Mouse Spleen Cells following Immunotherapy for Tuberculosis Relapse<sup>∇</sup>

Olga Gil,<sup>1,2</sup> Cristina Vilaplana,<sup>1,2</sup> Evelyn Guirado,<sup>1,2</sup> Jorge Díaz,<sup>1,2</sup> Neus Cáceres,<sup>1</sup> Mahavir Singh,<sup>3</sup> and Pere-Joan Cardona<sup>1,2\*</sup>

Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Crta de can Ruti s/n, 08916, Badalona, Catalonia, Spain<sup>1</sup>; CIBER Enfermedades Respiratorias, Palma de Mallorca, Spain<sup>2</sup>; and Lionex Diagnostics and Therapeutics GMBH, Braunschweig, Germany<sup>3</sup>

Received 15 July 2008/Returned for modification 4 September 2008/Accepted 19 September 2008

**Gamma interferon responses of spleen cells in mice were examined during postchemotherapy relapse of intraperitoneally induced latent tuberculous infection. The mycobacterial extract RUTI, which prevented the relapse, significantly enhanced the immune responses to secreted and structural recombinant mycobacterial antigens, suggesting that RUTI-mediated protection was mediated by activated T cells.**

The aim of this study was to assess the mechanisms of the vaccine RUTI as an adjunct to chemotherapy, in a latent tuberculosis experimental model based on the intraperitoneal (IP) infection of mice (6).

RUTI has already demonstrated a protective effect in a low-dose aerosol model, inducing a large and fast immune response against antigens secreted by actively growing *Mycobacterium tuberculosis* bacilli (2, 4). Given the long period required to test this therapeutic approach using the aerosol model, the IP model could be a reliable one to test new immunotherapeutic candidates.

Specific-pathogen-free, 7-week-old C57BL/6 female mice were treated by using procedures approved and supervised by the Animal Care Committee of the Germans Trias i Pujol University Hospital. *M. tuberculosis* strain H37Rv Pasteur was grown in Proskauer Beck medium containing 0.01% Tween 80 (9) to mid-log phase and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  in 2-ml aliquots. Mice were vaccinated subcutaneously twice, at weeks 9 and 11, with RUTI, which consists of liposome-based detoxified fragments of *M. tuberculosis* cells, cultured under stress conditions and under good manufacturing procedure quality control by Archivel Farma (Badalona, Catalonia, Spain) (2).

Mice were infected with  $1 \times 10^5$  CFU *M. tuberculosis* by IP injection and divided into three groups: the control group, infected but not treated; the chemotherapy-treated group (receiving 25 mg/kg of body weight isoniazid plus 10 mg/kg rifampin once a week from week 3 to week 9 postinfection); and the vaccinated group, which received two RUTI inoculations after the chemotherapy, at weeks 9 and 11 after infection.

The animals were euthanized with an overdose of isoflurane at week 13 postinfection, and the spleens were harvested. Viable bacteria (CFU) were counted four weeks after the spleen homog-

enates were plated on 7H11 Middlebrook agar (Biomedics s.l., Madrid, Spain) and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . Data were recorded as the  $\log_{10}$  of the mean number of bacteria recovered per organ. The antigen-stimulated numbers of gamma interferon (IFN- $\gamma$ )-secreting cells (in spot forming units [SFU] per  $1 \cdot 10^6$  splenocytes; enzyme-linked immunospot assay [ELISPOT]) and levels of IFN- $\gamma$  production (in pg/ml; enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]) were determined after the splenocytes were stimulated for 18 and 96 h with 15 different recombinant antigens, purified protein derivative (10g/ml), or *Mycobacterium bovis* BCG ( $10^6$  CFU), both purchased at SSI, Denmark. The *M. tuberculosis* antigens, comprising ESAT-6 (Rv3875), CFP-10 (Rv3874), MPT64 (Rv1980c), Ag 85B (Rv1886c), Ag 16kDa (Rv2031c), Ag 19kDa (Rv3763), Ag 38kDa (Rv0934), Ag 40kDa (Rv2780), and Hsp65 (Rv0440) (Lionex Therapeutics & Diagnostics Ltd., Braunschweig, Germany), were present in the spleen cell cultures at a concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$ . The ELISPOT assay was performed after the culture was incubated for 16 h by using a BD murine IFN- $\gamma$  ELISPOT kit (BD Bioscience, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations, and the SFUs counted using an ELISPOT reader. For the ELISA assay, the supernatants of the 72-h cell cultures were harvested and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  to be tested for IFN- $\gamma$  with a murine double-sandwich ELISA kit (Dialone, Besançon, France) according to the manufacturer's recommendations. Both techniques' results were corrected for background values. All results were evaluated for statistical significance (the Student *t* test and one-way analysis of variance), and the differences were considered significant when the *P* value was  $<0.05$ .

The chemotherapy treatment reduced the bacillary load in the spleens to  $2.84 \pm 0.49$  (mean  $\pm$  standard deviation)  $\log_{10}$  CFU/ml at week 9 postinfection, while the untreated control group had a bacillary load of  $4.88 \pm 0.62$   $\log_{10}$  CFU/ml. After four weeks, at week 13 postinfection at the end of the experiment, the group treated with chemotherapy alone had relapsed to  $3.92 \pm 0.25$   $\log_{10}$  CFU/ml, while the chemotherapy-and-RUTI-treated group showed a significantly lower bacterial load ( $3.2 \pm 0.24$   $\log_{10}$  CFU/ml). The infected but untreated control group had  $5.16 \pm 0.32$   $\log_{10}$  CFU/ml (Fig. 1).

Antigen-stimulated IFN- $\gamma$  secretion by the spleen cell cul-

\* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Crta de can Ruti, Camí de les Escoles s/n, 08916 Badalona, Catalonia, Spain. Phone: 34 93 497 86 86. Fax: 34 93 497 86 54. E-mail: pjcardona.igt@germantrias@gencat.cat.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 30 September 2008.

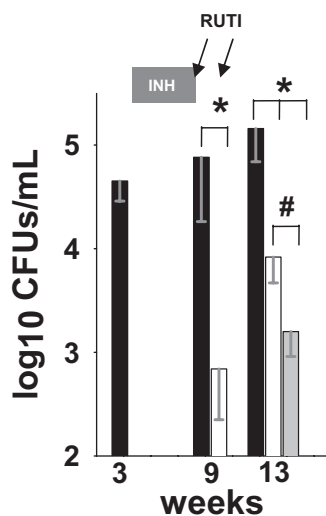


FIG. 1. Bacillary loads in the spleens of IP-infected mice. Chemotherapy treatment was administered once a week from weeks 3 to 9, and the RUTI vaccine was subcutaneously injected at weeks 9 and 11 (arrows). Black, white, and gray bars refer to control, chemotherapy-treated, and chemotherapy-plus-RUTI-treated groups, respectively. Error bars show standard deviations. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are marked as follows: \*, control group; #, chemotherapy-treated group. INH, isoniazid.

tures of RUTI-vaccinated animals was found to be higher than the levels in the spleen cell cultures of the other groups by both ELISPOT and ELISA (Fig. 2). This immune response was polyantigenic, i.e., in respect to a number of both secreted and structural antigens. This finding is plausible, considering that RUTI, which is produced from *M. tuberculosis* cultures grown under stress conditions, contains a wide range of *M. tuberculosis* antigens that are able to trigger or boost immune responses.

Previously reported data (1, 2) show the immunotherapeutic effect of RUTI in aerosol-infected mice. In the present study, IP-infected mice were used. The results from experiments using the aerosol-infected mouse model couldn't demonstrate a high level of response to structural *M. tuberculosis* antigens as clearly as do the results from this IP experiment (4).

One of the limitations of working with the *M. tuberculosis*-infected mouse model is the good tolerance of these animals to the infection, as well as the absence of intragranulomatous necrosis. Therefore, even though it is the most used to study the immunopathology of the tuberculous infection, the mouse model doesn't mimic what really happens in humans (5, 7), making the extrapolation of the results obtained difficult.

In the present study, we tested the vaccine RUTI as an adjunct to chemotherapy in a latent tuberculosis model based on the IP infection of mice, as an experimental mouse model that seems to better resemble the latent infection in humans (6, 8). The vials to be used to infect the animals, regardless of the route, were previously frozen, and there was a reduction of 1 log<sub>10</sub> in the viable counts because of this process. This is why in using the IP route to infect the animals, a large amount of dead bacilli was injected, reaching the spleen much more easily than in the aerosol model. We consider this to be the cause of the mice developing immunity against structural antigens.

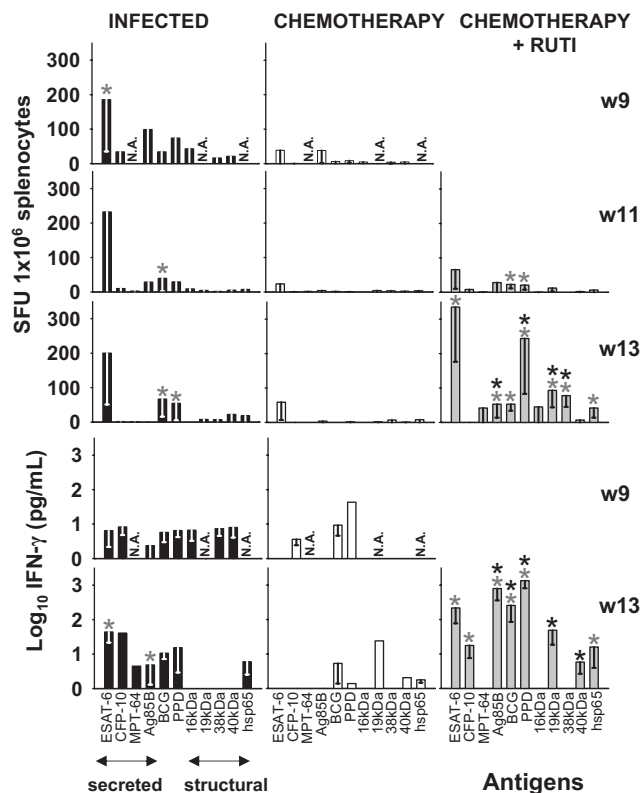


FIG. 2. Enhanced IFN- $\gamma$  response of C57BL/6 mouse splenocytes against *M. tuberculosis* antigens following RUTI vaccination. Mean values and standard deviations of results of ELISPOT (A) and ELISA of culture supernatants (B) following the stimulation of spleen cells with different stimuli are shown. The week at which each assay was performed is shown at the right; the antigens used are listed below the graphs. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are marked with asterisks. Black and gray asterisks refer to control and chemotherapy-treated groups, respectively. N.A., not assayed.

Regarding the labels below the graphs in Fig. 2, it must be clarified that although the 19- and 38-kDa lipoproteins are classified as structural, they can be also found in their nonacylated form in the culture supernatant; i.e., they are akin to secreted antigens in many ways (1).

The findings of the present study show that the proposed therapeutic regimen enhanced the recognition of a wide range of mycobacterial antigens, as well as reducing the relapse of latent tuberculosis infection in IP-infected mice. It boosts the immune response, including structural antigens, a fact that was not demonstrated by previous studies using an aerosol as the route of infection. This fact could be important in helping to diminish that relapse.

On the other hand, the scenario found in the IP model used in the present study resembles human tuberculosis, where intragranulomatous necrosis is quickly induced both in lungs and lymph nodes (3), and thus, a high concentration of extracellular dead bacilli is generated. For that reason we consider that the results shown here will also help to show IP treatment to be a good option as a mouse model mimicking human tuberculosis.

This work was supported by Archivel Farma, s.L.; the Spanish Ministry of Health (grant no. FIS 03/0757; National Plan I+D+I FIS

CM06/00123); the Spanish Society for Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC); and the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR).

P.-J.C. is a coinventor holding the patent on RUTI as a therapeutic vaccine. Regulatory approval and development is being undertaken by a spin-out biopharma company (Archivel Farma, s.l.) in collaboration with the Institut Germans Trias i Pujol. P.-J.C. is the scientific director for this development.

#### REFERENCES

1. Andersen, P. 1997. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* **45**:115–131.
2. Cardona, P. J., I. Amat, S. Gordillo, V. Arcos, E. Guirado, J. Díaz, C. Vilaplana, G. Tapia, and V. Ausina. 2005. Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* **23**:1393–1398.
3. Grange, J. M. 1998. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis, p. 113–127. In P. D. O. Davies (ed.), *Clinical tuberculosis*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
4. Guirado, E., O. Gil, N. Cáceres, M. Singh, C. Vilaplana, and P.-J. Cardona. 2008. Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**:1229–1237.
5. Muñoz-Elias, E. J., J. Timm, T. Botha, W. T. Chan, J. E. Gomez, and J. D. McKinney. 2005. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infect. Immun.* **73**:546–551.
6. Mustafa, T., S. Phyu, R. Nilsen, R. Jonsson, and G. Bjune. 1999. A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* **50**:127–136.
7. Wallace, J. G. 1961. The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* **83**:866–871.
8. Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. 2008. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.* **205**:105–115.
9. Youmans, G. 1979. *Tuberculosis*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.





# Effectiveness and Safety of a Treatment Regimen Based on Isoniazid Plus Vaccination with *Mycobacterium tuberculosis* cells' Fragments: Field-Study with Naturally *Mycobacterium caprae*-Infected Goats

M. Domingo\*, O. Gil†,‡, E. Serrano\*, E. Guirado†,‡, M. Nofrarias\*, M. Grassa\*, N. Cáceres†, B. Pérez\*, C. Vilaplana†,‡ & P.-J. Cardona†,‡

\*Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Bellaterra, Catalonia, Spain; †Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Catalonia, Spain; and ‡CIBER Enfermedades Respiratorias, Palma de Mallorca, Spain

Received 19 January 2009; Accepted in revised form 9 March 2009

Correspondence to: P.-J. Cardona, MD, PhD, Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Crta. del can Ruti, camí de les escoles s/n, 08916 Badalona, Catalonia, Spain. E-mail: pjcardona.igtp.germantrias@gencat.cat

## Abstract

The identification of a herd of goats with tuberculosis let us test a new treatment regimen against latent tuberculosis infection (LTBI). Using large animal experimental models allows a better approach to understanding human tuberculosis according to immunopathological parameters. Based on an initial study showing a correlation between the ESAT-6-specific interferon (IFN)- $\gamma$  secretion and the severity of pulmonary lesions, this parameter was used in combination with an X-ray examination to screen the animals to be included in the efficacy and safety studies. All the animals proved to be infected with *Mycobacterium caprae*. The efficacy study was run in animals distributed in three experimental groups according to treatment: untreated (CT), treated with isoniazid (INH), and treated with INH + RUTI (a vaccine based on *M. tuberculosis* cell fragments) inoculated twice. RUTI temporarily increased the IFN- $\gamma$  production after stimulating the peripheral blood with ESAT-6, purified protein derivative and RUTI *in vitro*. The INH chemotherapy reduced both pulmonary and extra pulmonary affectation, but not disease in pulmonary lymph nodes. The addition of RUTI may have decreased extrapulmonary disease further but had no benefit to lung or lung lymph-nodes itself. Safety studies showed that inoculation of RUTI caused a temporary increase of rectal temperature (1–2 °C) and local swelling, both adverse effects being well tolerated. Neither systemic toxicity nor mortality was induced by the vaccination. The control of goats' infection by the therapeutic regimen consisting in INH chemotherapy + RUTI as well as its safety, represented a further step towards testing its effects in human LTBI in a future.

## Introduction

It is estimated that around 30% of individuals exposed to the infective aerosol of patients with active tuberculosis (TB) develop a latent tuberculosis infection (LTBI) [1]. Once *Mycobacterium tuberculosis* enters into an alveolar macrophage and starts to proliferate, it attracts other macrophages to the dying infected macrophage in a process that causes further spread of the bacteria. When several macrophages have died and a specific immune response begins to be generated in the regional lymph

nodes, specific lymphocytes that are able to recognize antigens produced by growing bacilli migrate to the site of infection to activate the infected macrophages by secreting interferon (IFN)- $\gamma$  [2, 3]. This process eventually stops upon control of infection, although bacilli may persist inside the host for years. Reactivation of these persistent bacilli is thought to cause TB in a considerable percentage of population (5–25%) [1]. How these bacilli can persist for such a long time, in what is referred to as a LTBI, is not entirely known. It is traditionally considered that the bacillus becomes dormant and remains

inside an old lesion until it reactivates its growth, in a context where resuscitation factors are crucial [4]. Alternatively, the dynamic hypothesis holds that bacilli are constantly drained from the lesion towards the alveolar spaces, where growth is reactivated, thus allowing a constant host reinfection [5].

Regardless of the mechanism of latent infection, one-third of human kind is estimated to have LTBI. The fact that this infection gives no symptoms helps persistence of the condition. The vast majority of LTBI cases are not objectively detected, as its diagnosis requires a specific test, the tuberculin skin test, followed by a chest X-ray examination to discard the presence of any lung lesion, and thus the possibility of suffering active TB [6]. Once diagnosed, the standard current therapeutic approach is based on a 9-month administration of isoniazid (INH) [7], although different attempts to reduce the treatment's length have been tried, to increase compliance: use of rifampicin for 4 months, or even for 3 months when combined with INH [8].

Some years ago, a new treatment regimen was proposed: the combination of chemotherapy and RUTI, a therapeutic vaccine based on cell fragments of *M. tuberculosis* [9]. The rationale of this regime is based, first, on the ability of short-term chemotherapy to eliminate the growing bacilli, the inflammatory response and the local immunosuppressive environment generated inside the chronic lesions; and second, on a polyantigenic response following RUTI inoculation, which allows the detection of non-replicating bacilli (i.e. latent bacilli) by the immune system [10]. This regimen has already demonstrated its efficacy in different TB experimental models using small and middle size animals, including mice and guinea pigs [9–11] defying previous data indicating that the therapeutic administration of a vaccine would generate the toxic effect known as Koch's phenomenon [12–14]. A further concern with this combined regime was the size of the host used as a model of disease. Traditionally it has been stated that the murine model is the paradigm of resistance against *M. tuberculosis* infection, while susceptibility is reflected by the guinea pig model. These views are mainly based on the ability of mice or guinea pigs to survive or succumb to the infection, respectively [15]. However, when looking at the pathology, it is interesting to note the weak inflammatory response in mice, in contrast to the more 'human-like' immune response in guinea-pigs [15]. This difference between both animal models led to the concept that mice were in fact 'tolerant' to the presence of a high bacillary load and to systemic dissemination while guinea-pigs do try to induce this strong inflammatory response even if it finally kills them [10]. The concept that a strong immune response is a characteristic of larger animals (including humans) raised the need to test this therapeutic approach in appropriate animal

models of human TB, to confirm both the therapeutic value and safety of treatment.

The detection of a TB case in a slaughter house led us to the identification of a herd of naturally infected goats. *Mycobacterium caprae*, member of *M. tuberculosis* complex, is the most frequent causative agent of tuberculosis outbreaks in Spanish goats, sometimes related to transmission to humans. Because of the major economical problem that an infected herd represents to the agriculture, several methods of genotyping are used in order to help the epidemiological analysis of these outbreaks [16, 17]. In both natural and experimental infections with *M. caprae*, goats usually generate lesions in the lungs and associated lymph nodes, even if tubercles may also be found in liver and spleen. Histologically, these lesions are similar to those observed in humans. Well-defined granulomas are observed, characterized by the presence of epithelioid cells and numerous giant cells. Acid fast bacilli are usually present, but in very low number [18, 19]. Previous experience with cows showed a relationship between the pathology scoring and the production of ESAT-6-specific secretion in peripheral blood [18]. We seized the opportunity to assay the combined therapy (chemotherapy + RUTI) in large animals, because previous data encouraged us to investigate animals presenting infection better resembling LTBI in humans, i.e. the ones with the lower pathology scoring. Data presented here confirm both RUTI's ability to increase the control of the infection when combined with INH, as well as the safety of this combined therapeutic regime.

## Materials and methods

**Animals.** A herd of 500 Murciano-Granadina female goats was localized in Viladordis (Manresa, Barcelona) after detecting a TB case in the slaughterhouse. Consequently, the rest of the animals were tested for bovine TB infection, by stimulating the whole blood with bovine and avian purified protein derivative of tuberculin (PPD-B and PPD-A, respectively), obtained from Ingenasa (Madrid, Spain) and used in culture at 10 µg/ml. The specific IFN- $\gamma$  production was determined using the BOVIGAM ELISA Kit (CSL, Melbourne, Australia) according to the manufacturer's recommendations. The results confirmed the presence of 150 positive infected animals.

Every infected goat was tested for signs of disease or injury before being selected for investigation and, as this was a field study, goats were kept in the farm where they were found. Goats were fed with commercial fodder and were observed daily by farm-workers and weekly by a veterinary to ensure their welfare.

All experimental proceedings were approved and supervised by the Animal Welfare Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona in agreement with

the European Union Laws for protection of experimental animals.

**Study design.** All the infected animals were tested for specific-IFN- $\gamma$  after whole blood (0.5 ml) stimulation with ESAT-6 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark; used at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), using the BOVIGAM ELISA Kit. Results were recorded as optical density (OD) read at 450 nm.

After the ESAT-6 *ex vivo* assay, the infected animals were distributed in the following three studies, planned with different objectives: (1) a preliminary Correlation Study, to demonstrate the correlation between the ESAT-6-specific IFN- $\gamma$  secretion and the Pathology Scoring (20 animals); subsequently (2) an Efficacy Study (42 animals); and (3) a Safety Study, to assess the safety of the RUTI vaccine (10 animals) (Fig. 1).

**Correlation study.** A total of 20 goats with different values of ESAT-6-specific secreted IFN- $\gamma$  (according to the ESAT-6 *ex vivo* assay) were selected. The animals were euthanized and carefully examined *post-mortem*, in order to record precisely the pathology-score by counting and describing all the tuberculous lesions in lung lobes. Briefly, liver, spleen and extrapulmonary (mesenteric, hepatic and retropharyngeal) lymph nodes were removed for histopathological analysis; as well as seven lung lobes and three pulmonary (tracheobronchial, and cranial and caudal mediastinic) lymph nodes. After being removed, first all samples were carefully examined to detect peripheral lesions and sliced in order to evaluate any internal granulomatous lesion. The number and size of the lesions of each sample were recorded. Then, pathology scoring was made according to published standards [20] (Table 1).

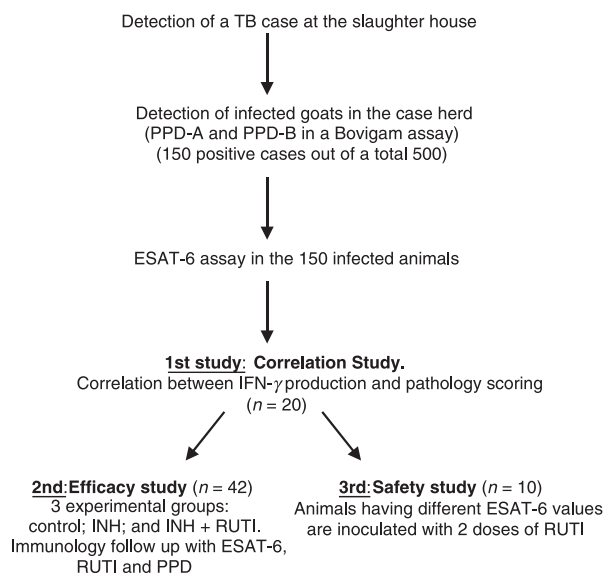
**Table 1** Semiquantitative pathology – scoring system (based on Ref [18]).

Score	Type of lesion
0	No visible lesions
1	Lesions <10 mm of diameter, only visible if slicing
2	$\leq 5$ lesions of <10 mm of diameter
3	>5 lesions of <10 mm of diameter or 1 lesion $\geq 10$ mm of diameter
4	>1 lesion of $\geq 10$ mm of diameter
5	Big coalescent lesions

The pathology score was compared with the ESAT-6-specific secreted IFN- $\gamma$  (in means of OD values) using Spearman's test, in order to evaluate any correlation.

**Efficacy study.** After founding a correlation between the ESAT-6-specific response and the pathology scores, the animals of the herd were tested for a chest X-ray examination, using a portable X-ray unit PXP-20 HF PLUS (Poskom, Goyang, Korea) and the digital system Direct Digitizer Regius Model 110 (Konica Minolta, Tokyo, Japan), to be able to detect at least any lesion >5 mm. The 42 animals with the lowest results in the ESAT-6 *ex vivo* assay (IFN- $\gamma$  OD <2.00) and a complete normal X-ray examination were selected for studying the therapeutic efficacy of RUTI in infected goats. After distributing the cohort randomly in three experimental groups, animals were followed-up and monitored for the specific cellular immunological response, by means of an assay of IFN- $\gamma$  secretion *ex vivo*. Once killed, the bacterial load and the pathological scoring were evaluated. The three experimental groups (14 animals each) were: control non-treated; treated with INH (Cemidon, Alcala Farma, Madrid, Spain); and treated with INH + RUTI. INH was administered i.m. in the cervical region, as 300 mg twice a week for 4 weeks (from weeks 0 to 4). The vaccinated group also received two subcutaneous shots of RUTI (batch B04; 271  $\mu\text{g}$  of FCMtb/0.4 ml), in the cervical region, at weeks 4 and 7. RUTI is the name of a therapeutic vaccine made from detoxified and liposomed *M. tuberculosis* cell fragments grown in stressful conditions. The vaccine was kindly provided by Archivel Farma SL (Badalona, Spain) where it is manufactured under strict good manufacturing practice standards, as published elsewhere [9].

For monitoring infection *ex vivo*, whole blood samples were collected at weeks 0, 4, 8 and 11, in order to determine the specific cellular immune response (by measuring secreted IFN- $\gamma$ ) at each time-point. A total of 0.5 ml of heparinized blood was cultured with each stimulus for 18 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The stimuli used were: RUTI (at 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Archivel Farma), PPD and ESAT-6 (at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively, both from SSI, Copenhagen, Denmark). The harvested supernatants were tested for IFN- $\gamma$  using the



**Figure 1** Schedule of all the procedures and study design.

ELISA BOVIGAM Kit (CSL) according to the manufacturer's recommendations, and the results recorded as OD read at 450 nm.

Animals were euthanized at week 11, by an i.v. sodium pentobarbital overdose, in order to evaluate the pathology scoring, as previously described in point 2.3. The removed lungs were submitted to an X-ray examination using the digital system Direct Digitizer Regius Mode 110 (Konica Minolta), with X-ray collimator Ralco, R302 (Beam Limiting Device, Lissone, Italy) located at the Veterinary Hospital in the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Catalonia, Spain), as well as to histopathological analysis by examining the samples after staining them with Haematoxylin and Eosin and Ziehl-Neelsen. The personnel performing the post-mortems were unaware of the vaccination status of the animals examined.

Homogenates from mediastinic lymph nodes (previously decontaminated according to the Krasnow method [21]) were plated on Middlebrook 7H11 agar (Biomedics, Madrid, Spain) and Lowenstein-Jensen (Biomedics) mediums, at 37 °C for 28 days, in order to evaluate the bacillary load. Colony Forming Units (CFUs) were counted. *Mycobacterium tuberculosis* complex was identified by polymerase chain reaction amplification of the fragments coding for rRNA 16S and MPB70 protein [22]. *Mycobacterium* species characterization was done using a Direct Variable Repeat spacer Oligonucleotide Typing (DVR-spoligotyping) [23]. Both techniques were carried out in the Health Surveillance Laboratory (VISAVET) in the Animal Health Department in the Veterinary School of the Universidad Complutense (Madrid, Spain).

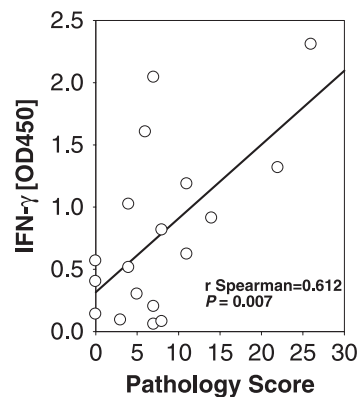
Results of each treatment group were compared for statistically significant differences using a non-parametric test (Kruskal–Wallis) and a posterior Dunn's Multiple Comparison test.

**RUTI Safety study.** A total of 10 animals with different response to ESAT-6 in the *ex vivo* assay were chosen for inclusion in this study. Animals were all subcutaneously vaccinated twice (3 weeks apart) with RUTI (batch B04; 271 µg of FCMtb/0.4 ml) in the cervical region. Animals were followed for 30 days after the first inoculation. The safety evaluation was done by physical examinations and recording of rectal temperature (at 0, 4, 12 and 24 h and 2, 3 and 4 days after each inoculation), and by inspection of the injection site every 24 h during 4 days after each inoculation. Every abnormality was recorded.

## Results

**Correlation study: ESAT-6-specific cellular immune response (IFN-γ production) correlates positively with the pathology score**

Figure 2 shows how values of IFN-γ production after challenging whole blood with ESAT-6 increase proportionally

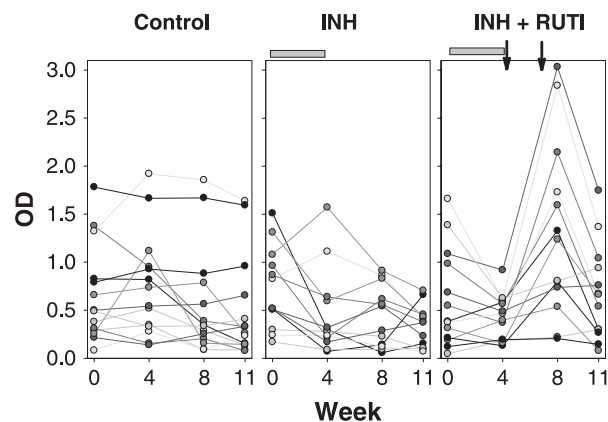


**Figure 2** Correlation between the ESAT-6-specific interferon (IFN)-γ secretion and the pathology scores in the Correlation Study.

to the severity of the pathology score in lungs (Spearman  $r = 0.612$  and  $P = 0.007$ ). Only one animal presented a low IFN-γ production despite having one of the highest pathology scores (29), with a large lung cavity, a phenomenon attributable to an anergic process. The results from this one animal were discarded from the study. The correlation between cellular immune response and pathology allowed us to select animals for the efficacy study: we chose animals with the lowest pathology, avoiding inclusion of anergic animals by scanning all animals by chest X-ray for absence of lung cavities.

## Efficacy study

The assay *ex vivo* with various stimuli shows a different profile of specific IFN-γ secretion in animals treated with RUTI compared to the other groups. Figure 3 shows the ESAT-6-specific IFN-γ production through the whole follow-up. While from control group did not show any characteristic pattern, INH treatment tended to slightly



**Figure 3** ESAT-6 specific IFN-γ production in the Efficacy Study: evolution through time. Each line reflects the evolution of the values for each animal.

reduce the IFN- $\gamma$  production, and the RUTI-vaccinated goats experienced a clear increase after each inoculation. The same tendency was observed after stimulating whole blood with PPD or RUTI in the assay *ex vivo* (data not shown).

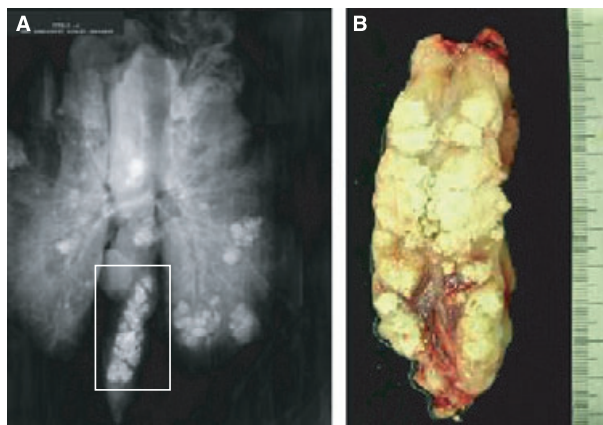
Treatment with INH changes the pathology scores both in lungs and extrapulmonary tissues. Including RUTI in the therapy seems to help to reduce extrapulmonary dissemination.

Cultures of samples from mediastinic lymph nodes showed an average of two log<sub>10</sub> CFUs regardless of the experimental group. This confirmed that all animals were actually infected. The DVR-spoligotyping of all cultures showed a unique spoligotype (*spc-2*), belonging to *M. caprae*.

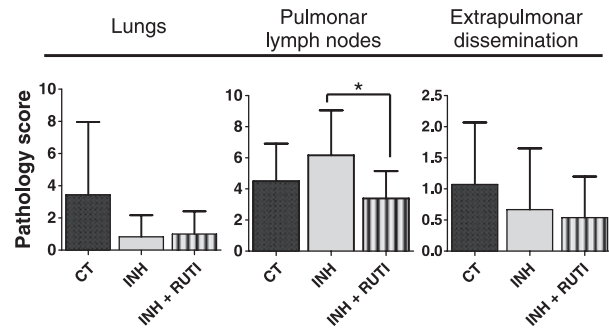
Mediastinic lymph nodes were usually affected in all animals, presenting a high degree of calcification (Fig. 4). Microscopic analysis of pulmonary lesions showed the presence of human-like granulomas, highly organized, with central necrosis surrounded by macrophages, some giant cells and a well-organized ring of fibroblasts (data not shown).

None of the treatments showed statistically significant differences compared with the untreated (CT) group, but a decreasing tendency for both of them could be observed. The administration of a short-term chemotherapy with INH induced a decrease of the pathology scores in the lungs and extrapulmonary organs. This was not observed in pulmonary lymph nodes. Adding RUTI to the INH did not improve the results in lungs, but seemed to help to prevent the dissemination, as the animals had less pathology scores at the extrapulmonary organs (Fig. 5).

No mortality related to RUTI vaccination was found. Even if one animal from the RUTI group had to be



**Figure 4** Pathology findings in the efficacy study. (A) A chest X-ray of an infected goat with a high pathology score (22) which correlated very well with the IFN- $\gamma$  production after challenging peripheral blood with ESAT-6 (OD = 1.316). Note the profusion of calcified lesions, especially in the mediastinic lymph nodes (B).



**Figure 5** Results of the Efficacy Study, showing the average and standard deviation of the pathology scores in lungs, pulmonary lymph nodes and extrapulmonary organs for each different treatment group. \*Statistically significant differences between groups.

killed in order to ensure the compliance of the Ethical Committee requirements, the necropsy confirmed a hepatic steatosis because of pregnancy. No other deaths were recorded during the study.

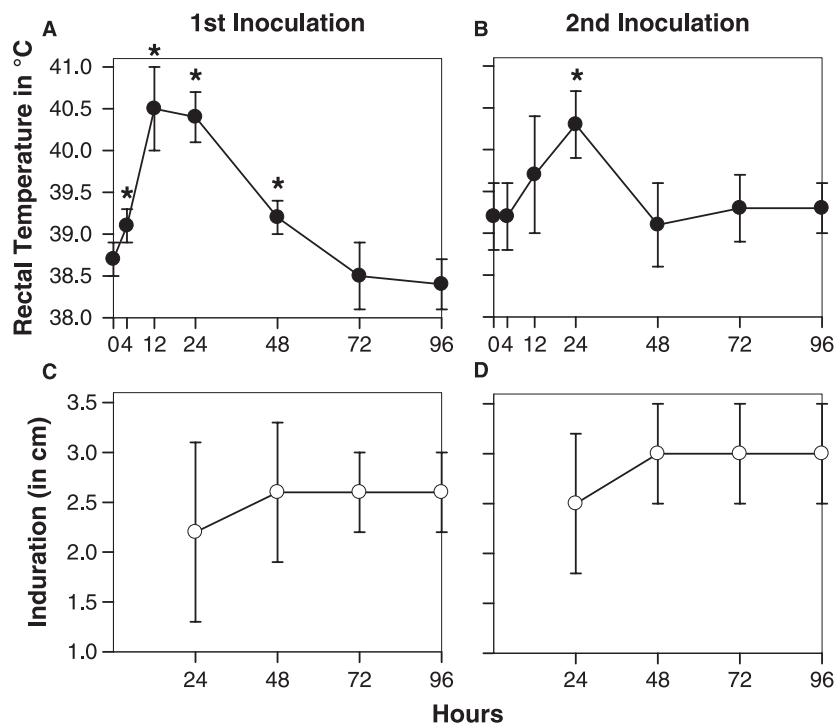
#### Safety study

Neither mortality nor toxicity related to RUTI vaccination were observed when RUTI was administered to infected animals with various ESAT-6-specific responses (thus different pathology scores) without a previous INH treatment. A transient increase in the rectal temperature (1–2 °C) was observed after each inoculation. RUTI also induced an evident induration at the injection site that became stable 48 h after the inoculation (Fig. 6). Histopathology revealed the presence of a TB-like granuloma, very well organized with giant cells, with no acid-fast bacilli being detected (Fig. 7). No correlation between the severity of adverse effects and the initial pathology scores was found (data not shown). In general, RUTI was well tolerated and showed no toxicity in this safety study.

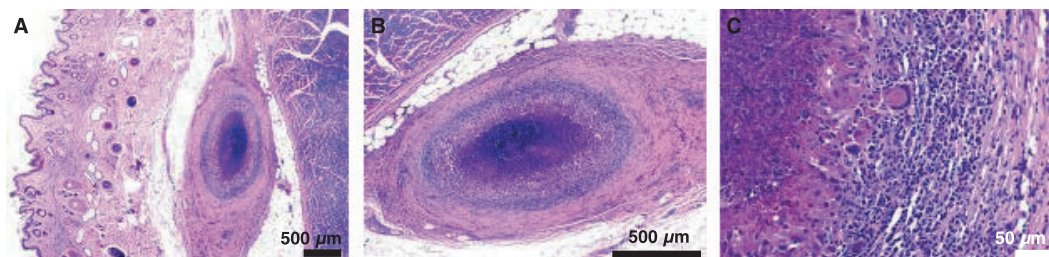
#### Discussion

Eradication of TB in goats is still a pending issue in Europe. The Catalan Government (Generalitat de Catalunya), through its Department of Agriculture, Livestock and Fishing works together with the CRESA in order to localize infected herds, thus limiting the spread of the disease. The identification of individual infected animals by using the BOVIGAM assay is an initiative to avoid the killing of healthy animals belonging to herds containing infected individuals. This scenario provided a good opportunity for designing an experimental model to evaluate the efficacy and safety of RUTI as a therapeutic vaccine.

Others have used a similar context to test new vaccines prior to testing in humans, especially using cattle



**Figure 6** Safety Study. Evolution of rectal temperature (A and B) and local induration (C and D) after the 1st and 2nd inoculation of RUTI in goats not previously treated with chemotherapy.



**Figure 7** Microscopic aspect of the site of RUTI inoculation. Haematoxylin and eosin stain. Note the TB-like granuloma very well structured and with the presence of intragranulomatous necrosis and giant cells.

[24]. RUTI had previously been tested in murine and guinea pig experimental models, but even if the latter can provide a useful initial approach, and even if no problems of safety were found, a lot of potential uncertainties remained [9–11]. Using goats to test RUTI seemed to us as a good approach, because goats TB and human TB are very similar in the route of infection and the pathological characteristics [18, 19]. The size of the animals was another advantage of this model, being more similar to human's body but still permitting the easy manipulation for extracting samples, giving the treatments and doing the X-ray examinations. Goats also can induce strong inflammatory and immunological responses (as humans), thus giving a better idea about the potential safety profile prior to test any treatment in humans [10].

The major problems of the present study were related to the fact that the animals studied were naturally infected (i.e. the heterogeneity of the study population)

and the difficulty of having to discern between LTBI and active TB. Using the previous knowledge provided from experience in cattle, where a high degree of correlation was found between ESAT-6-specific IFN- $\gamma$  production and the severity of the pathology [20], we attempted to homogenize the study population. As the limit between infection and disease is not clearly defined in animal models, we chose the 42 animals with the lowest responses to ESAT-6 and a chest X-ray without visible lesions. Even if some of the ESAT-6 responses were substantial, thus a greater pathology expected, the X-ray helped to discard those infected animals with detectable active disease. That is the reason for using the both parameters (the ESAT-6 response and the X-ray examination) together in screening the animals, intending to be as much accurate as possible in the selection. With this measure, we also intended to mimic what is currently done in LTBI diagnosis, in order to obtain an animal

model that could resemble as much as possible the human LTBI.

Chemotherapeutic treatment was also a challenge, as no experience existed in treating goats with INH, so in the Efficacy Study we decided to administer INH i.m. twice a week, taking into account its prolonged post-antibiotic effect [25]. Interestingly, the effect of chemotherapy on the pathology was higher than we expected. INH treatment of goats seemed to decrease the protective effect of therapeutic vaccination with RUTI compared with previous studies. This decrease is surprising even when considering the influence of antigenic differences between *M. caprae* and *M. tuberculosis*, which is the basis of the vaccine. Unfortunately, logistic circumstances did not allow us to prolong further the length of the efficacy study, and thus it is not clear for how long the protective effect of the administration of INH alone would be maintained, and what would be the role of RUTI in this regard. The results of the efficacy study did not show statistically significant differences between the treatment regimens and the control group, but a tendency in decreasing the pathology score in lungs and extrapulmonary organs was observed for the INH. Adding RUTI to the INH treatment also seemed to tend to reduce the pathology score at the extrapulmonary organs, suggesting that it may help to prevent dissemination.

Regarding the ESAT-6-specific IFN- $\gamma$  secretion, it was slightly decreased by the short-term chemotherapy with INH, in marked contrast to previous findings in humans [26] although in this case, the reduced cellular response observed in goats upon INH treatment can be a consequence of the reduction of the bacillary load [27]. Adding RUTI, there is a transient increase in the specific IFN- $\gamma$  production against ESAT-6, RUTI and PPD, reflecting the boosting effect of RUTI on the immunological response.

Adverse effects related to RUTI administration were not serious and were, in fact, well tolerated even when no prior chemotherapy was administered, which might help decrease the chance of a Koch reaction effect. This finding can help to diminish the existing fear of using mycobacterial antigens for therapy (a fear arising from previous experiences using other formulations) [12–14]. In fact, no previous toxic effects had been related to RUTI in murine or guinea pigs models [9–11], so data presented here confirm its safety profile.

In conclusion, this study showed (in spite of the inconveniences of this being an in-field study) the utility of the goat model for vaccine strategies against tuberculosis. The results showed no increase of the INH effect on the pathology score in lungs when adding the vaccine, but seemed to reduce the extrapulmonary dissemination. RUTI also showed to increase the specific IFN- $\gamma$  production and additional evidence of the vaccine's safety, the present study representing a further step towards testing its effects in human LTBI in a future.

## Acknowledgment

This work was possible thanks to the Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya; the owner of the farm, Mr Josep M<sup>a</sup> Pons and the farm worker Abdeslam Akhazzan; the zone veterinary Mr Esteve Priego; Lucía de Juan and Pr. A. Mateos, from the Laboratorio de Vigilancia Sanitaria (VISAVET) of the Universidad Complutense of Madrid; Archivel Farma S.L.; and the Spanish Ministry of Health (National Plan I+D+I FIS CM06/00123). PJC is coinventor of the patent of RUTI as therapeutic vaccine. Regulatory approval and development is being undertaken by a spin-out biopharma company (Archivel Farma, s.l.) in collaboration with the Institut Germans Trias i Pujol. PJC is the scientific director of this development.

## References

- 1 Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998;6:107–12.
- 2 Andersen P, Askgaard D, Gottschau A, Bennedsen J, Nagai S, Heron I. Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1992;36:823–31.
- 3 Wolf AJ, Desvignes L, Linas B *et al.* Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* 2008;205:105–15.
- 4 Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006;208:261–9.
- 5 Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* 2009, DOI 10.1007/s15010-008-8087-y.
- 6 American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S221–47.
- 7 Comstock GW. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:847–50.
- 8 Woldehanna S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;000:CD000171.
- 9 Cardona PJ, Amat I, Gordillo S *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.
- 10 Cardona PJ. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2006;86:273–89.
- 11 Guirado E, Gil O, Caceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona PJ. Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1229–37.
- 12 Turner J, Rhoades ER, Keen M, Belisle JT, Frank AA, Orme IM. Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect Immun* 2000;68:1706–9.
- 13 Moreira AL, Tsenova L, Haile Aman M *et al.* Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 2002;70:2100–7.
- 14 Taylor JL, Turner OC, Basaraba RJ, Belisle JT, Huygen K, Orme IM. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:2192–8.

- 15 North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004;22:599–623.
- 16 Prodingler WM, Brandstatter A, Naumann L *et al.* Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *JCM* 2005;43:4984–92.
- 17 Javed MT, Aranaz A, De Juan L *et al.* Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. *Tuberculosis* 2007;87:437–45.
- 18 Thoen CE. Tuberculosis in wild and domestic mammals. In: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*, Vol. 11. Bloom BR, ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994: 157–62.
- 19 Thoen CO, Steele JH. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Ames, IA: Iowa State University Press, 1995.
- 20 Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2002;70:3026–32.
- 21 Krasnow I, Wayne LG. Sputum digestion. I. The mortality rate of tubercle bacilli various digestion systems. *Amer J Clin Pathol* 1996;45:352–5.
- 22 Wilton S, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl* 1992;1:269–73.
- 23 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk K *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907–14.
- 24 Buddle BM, Skinner MA, Wedlock DN, de Lisle GW, Vordermeier HM, Glyn Hewinson R. Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85: 19–24.
- 25 Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:S231–79.
- 26 Wilkinson KA, Kon OM, Newton SM *et al.* Effect of treatment of latent tuberculosis infection on the T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *J Infect Dis* 2006;193: 354–9.
- 27 Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med* 2007;13:175–82.



# Granuloma Encapsulation Is a Key Factor for Containing Tuberculosis Infection in Minipigs

Olga Gil<sup>1,2\*</sup>, Ivan Díaz<sup>3\*</sup>, Cristina Vilaplana<sup>1,2</sup>, Gustavo Tapia<sup>4</sup>, Jorge Díaz<sup>1,2</sup>, María Fort<sup>3</sup>, Neus Cáceres<sup>1,2</sup>, Sergio Pinto<sup>1,2</sup>, Joan Caylà<sup>5</sup>, Leigh Corner<sup>6</sup>, Mariano Domingo<sup>3</sup>, Pere-Joan Cardona<sup>1,2\*</sup>

**1** Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE), Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Catalonia, Spain, **2** CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto Carlos III, Palma de Mallorca, Spain, **3** Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) (UAB-IRTA), Bellaterra, Catalonia, Spain, **4** Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain, **5** Tuberculosis Investigation Unit of Barcelona, Servei d'Epidemiologia, Agència de Salut Pública, Barcelona, Catalonia, Spain, **6** School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, University College Dublin, Dublin, Ireland

## Abstract

A transthoracic infection involving a low dose of *Mycobacterium tuberculosis* has been used to establish a new model of infection in minipigs. The 20-week monitoring period showed a marked Th1 response and poor humoral response for the whole infection. A detailed histopathological analysis was performed after slicing the formalin-fixed whole lungs of each animal. All lesions were recorded and classified according to their microscopic aspect, their relationship with the intralobular connective network and their degree of maturity in order to obtain a dissemination ratio (DR) between recent and old lesions. CFU counts and evolution of the DR with time showed that the proposed model correlated with a contained infection, decreasing from week 9 onwards. These findings suggest that the infection induces an initial Th1 response, which is followed by local fibrosis and encapsulation of the granulomas, thereby decreasing the onset of new lesions. Two therapeutic strategies were applied in order to understand how they could influence the model. Thus, chemotherapy with isoniazid alone helped to decrease the total number of lesions, despite the increase in DR after week 9, with similar kinetics to those of the control group, whereas addition of a therapeutic *M. tuberculosis* fragment-based vaccine after chemotherapy increased the Th1 and humoral responses, as well as the number of lesions, but decreased the DR. By providing a local pulmonary structure similar to that in humans, the mini-pig model highlights new aspects that could be key to a better understanding tuberculosis infection control in humans.

**Citation:** Gil O, Díaz I, Vilaplana C, Tapia G, Díaz J, et al. (2010) Granuloma Encapsulation Is a Key Factor for Containing Tuberculosis Infection in Minipigs. PLoS ONE 5(4): e10030. doi:10.1371/journal.pone.0010030

**Editor:** T. Mark Doherty, Statens Serum Institute, Denmark

**Received:** January 21, 2010; **Accepted:** March 15, 2010; **Published:** April 6, 2010

**Copyright:** © 2010 Gil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Archivel Farma S.L. supported the study by providing the vaccine RUTI<sup>®</sup>. The Spanish Ministry of Health (FIS PI080785; National Plan I+D+I FIS CM06/00123); the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2005-07949-C02-02; CIBER Enfermedades Respiratorias, programa CRP-TB); the Bill and Melinda Gates Foundation (Grand Challenges GC12) and the European Community's 7th Framework Programme (FP7/2007-2013: STOPLATENT-TB project under grant agreement 200999) collaborated in funding the study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** PJC is co-inventor of the patent claiming RUTI<sup>®</sup> as a therapeutic vaccine. Regulatory approval and further clinical development is currently being undertaken by a spin-off, the biopharmaceutical company Archivel Farma S.L., in collaboration with the Institut Germans Trias i Pujol. PJC is the Scientific Director of this spin-off. The authors confirm that this does not alter their adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: pcardona.igtp.germanstrias@gencat.cat

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

*Mycobacterium tuberculosis* causes up to 100 million new cases of latent tuberculosis infection (LTBI) every year. The fact that this infection can persist in the host for years explains why LTBI is so prevalent. Indeed, it is estimated that a third of humankind (more than 2.5 billion people) [1] already has LTBI. Progression towards active tuberculosis (TB) (from 5 to 25% of infected people) is relatively low, although even this low percentage represents the induction of 9 million new TB cases every year [2]. Standard treatment for LTBI requires the administration of a potentially hepatotoxic drug, namely isoniazid (INH), for between 6 and 9 months, which results in important compliance problems. Low compliance is the main reason why health systems are reluctant to provide LTBI treatment except in those countries that want to maintain their current low incidence of TB [3] or in the case of

HIV co-infection [4]. A shorter non-toxic treatment is therefore crucial to generalize LTBI control and to promote a global decrease in TB incidence, although this necessarily implies a better knowledge of the evolution of LTBI in order to generate new prophylactic and therapeutic approaches.

The diagnosis of LTBI in humans is based on a normal chest X-ray, together with a positive reaction to the tuberculin skin test (TST) and a lack of clinical signs and symptoms suggestive of active tuberculosis [5]. Recently, new tests based on the detection of effector T-cells reacting against antigens secreted by active growing bacilli (ESAT-6/CFP-10) in peripheral blood, the so-called T-cell interferon gamma assay (TIGRAS), have been introduced [6]. Despite this, human LTBI is still mainly diagnosed by indirect methods [5], and little is known about its histopathological evolution.

Different experimental models have been used to better understand LTBI evolution, the most common being those

generated in mice. This host is able to control the bacillary load once a strong Th1 immune response has been triggered and a chronic phase generated [7] [8,9], even with a demonstrated presence of non-replicating bacilli [10,11]. However, and despite surviving the infection for a long time, progressive infiltration of the lung occurs [12,13] and all mice finally die from tuberculosis. Murine lesions are characterized by the lack of intragranulomatous necrosis, a discrete fibrotic reaction, lack of encapsulation and a strong lymphocytic presence. The predominance of a strong Th1 response led this response (with very low toxicity for the parenchyma) to be considered an “ideal” response to be reproduced and promoted to avoid evolution towards active TB in humans, as a Th1/Th2 response is seen in humans and human lesions are characterized by a strong tissue toxicity (i.e. necrosis and fibrosis) [14]. The lesions in guinea pig infection (with a relatively low survival time once infected [8]), on the other hand, better resemble human ones as they generate a strong inflammatory response with strong fibrosis (although with no external encapsulation) and strong intragranulomatous necrosis followed by mineralization, mostly in primary lesions, where non-replicating bacilli can be detected [15]. Guinea pigs are also characterized by a strong inflammatory response in the hilar lymph-nodes [16], which appears to be an attempt to avoid the systemic dissemination that would otherwise lead to rapid death, as in the case of humans with detectable bacilli in the spleen [17].

Other animal hosts have been used to better understand human LTBI. Zebra fish infected with *M. marinum*, for example, have provided insights into how mycobacteria exploit the granuloma during the innate immune phase for local expansion and systemic dissemination [18]. Cattle have also been used as a model due to their “human-like” control of the infection and similar immune response in peripheral blood. Indeed, the cattle model is nowadays used as a model to test new prophylactic vaccines against human TB [19]. However, the first evidence for progression from LTBI to active disease, including cavity formation, came from an experimental model using the *Cynomolgus* macaque [20], which shows a wide spectrum of human-like lesions.

A histopathological description of LTBI in humans was obtained from the studies performed by Canetti in the middle of the last century [21]. This author described the presence of a “benign evolution” of the infection in those necropsy subjects without active TB, with small granulomas encapsulated by a fibrotic ring and mineralized necrosis in the center. This is probably the best histopathological description of LTBI as it shows an efficacious control of the infection that defines this process.

There is still, however, a need to ascertain the role of the parenchyma structure in the evolution of LTBI. The parenchyma in humans and other large animals is subdivided by connective tissue septa into portions of around one to two cubic centimeters, which may play a role in controlling the dissemination of pulmonary lesions [22]. Lungs are lined by a connective tissue band with a mesothelial surface facing the pleural space. As is the case for the lungs of many larger species, such as pigs, cows, and horses, the human lung has extensive interlobular and intralobular connective tissue, which joins the major vessels and the bronchi to the pleural surface. Such structures are not, however, present in smaller species, such as mice, guinea pigs, rabbits or macaques [23].

In light of the factors discussed above, we therefore considered that an experimental model in a large animal was urgently required to gain a better understanding of LTBI. As mentioned above, there is some previous experience using cattle as a model to test new prophylactic vaccines against human TB [19]. We discarded this option, however, as cattle are ruminants and therefore have a different physiology. We therefore decided to

develop a swine model, as pigs generate lesions that closely resemble those in human TB patients [24,25] and there is a precedent regarding the development of an experimental swine model using *M. bovis* [26].

This study presents for the first time the evolution of *M. tuberculosis* infection in minipigs and shows how different treatment regimes can influence it. The results presented herein demonstrate that this model might resemble LTBI in humans as it shows a strong ability to control infection by generating a strong Th1 response together with a strong local response based on the induction of a fibrotic process, which encapsulates the lesions and limits the constant induction of new lesions, and causes intragranulomatous necrosis and calcification of the lesions that entraps and stresses the remaining non-replicating bacilli inside the lesions.

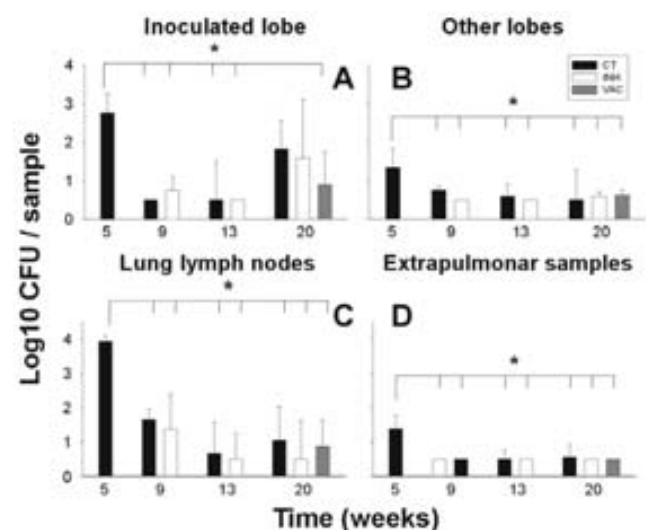
The fact that the local pulmonary structure in this animal model is almost identical to that in humans is of great significance as it may lead to a better understanding of the mechanisms of LTBI induction and allow new prophylactic and therapeutic approaches designed to enhance the strong control of LTBI to be tested.

## Results

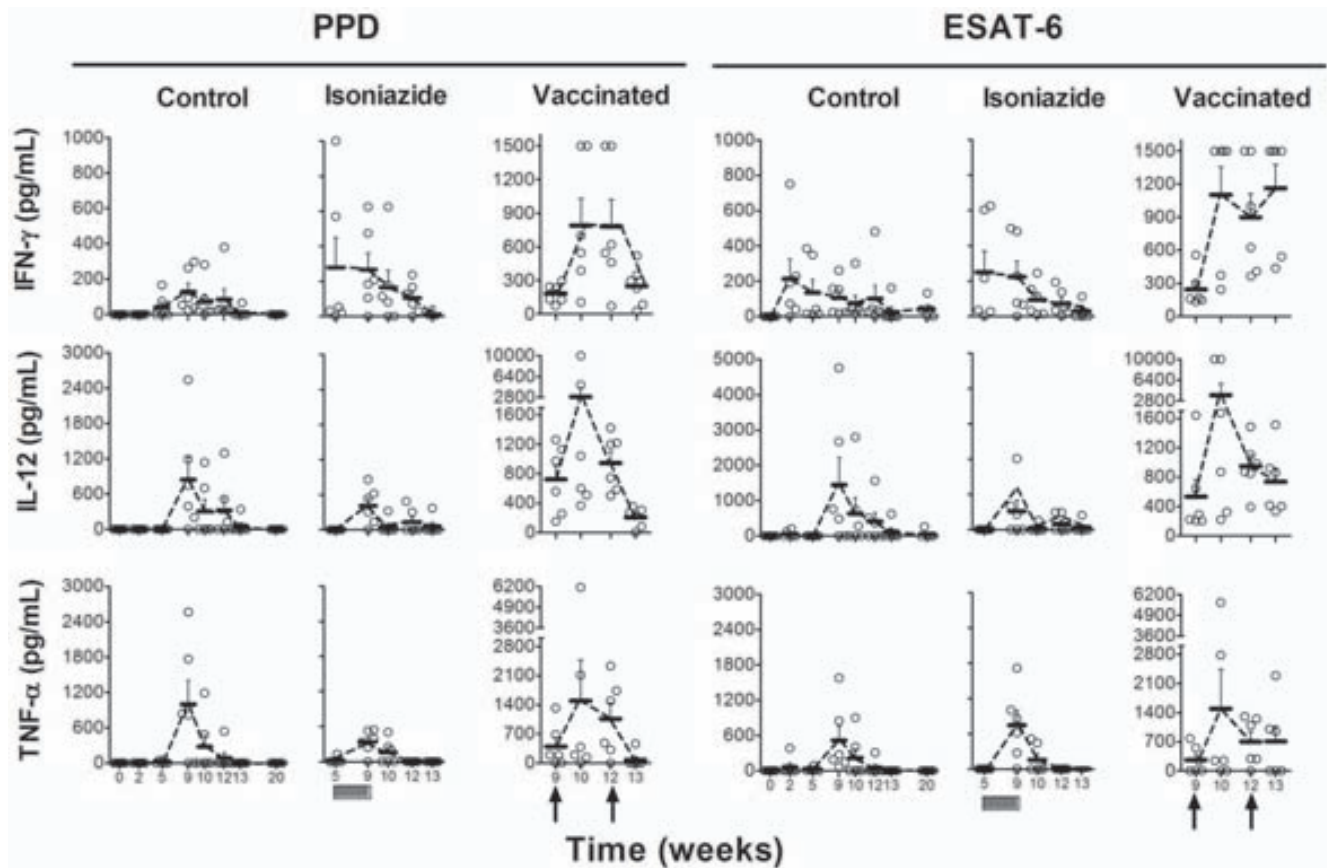
### 1. The natural course of the infection in the minipig model: mimicking human LTBI

At the first time point selected to evaluate the minipig model, namely week 5 post-infection, the bacillary load was found to be high at all sites examined: lung, lymph nodes and extrapulmonary samples (spleen, liver, kidneys, extrapulmonary lymph nodes and others). Furthermore, control of the bacillary count tended to stabilize from week 9 to the end of the experiment (Figure 1). Indeed, bacilli could only be detected in the BAL culture for one animal at week 5 and in the blood cultures of another animal at week 9. BAL samples clearly show the presence of foamy macrophages through time.

The kinetics of the cellular immune response are shown in Figures 2 and 3. A peak in the evolution was detected 9 weeks after



**Figure 1. CFU values in the lungs.** Data (mean and standard deviation) are presented by comparing an inoculated lobe with others (pictures A and B), lung lymph nodes (C), and extrapulmonary samples (D). Every sample collected weighted 2 g. approximately. \* signifies a statistically significant difference in the one-way ANOVA test ( $p < 0.005$ ). CT = control group; INH = chemotherapy with isoniazid; VAC = group treated with vaccine therapy. doi:10.1371/journal.pone.0010030.g001



**Figure 2. Evaluation of the cellular immune response by ELISA assay.** ESAT-6 and PPD-specific IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$  production after stimulation of PBMCs, as determined by ELISA assay. Means and standard error of the means (SEM) are drawn in gray and connected by dotted lines. The black boxes show the period of INH treatment and the black arrows the time of therapeutic vaccination. doi:10.1371/journal.pone.0010030.g002

the challenge in non-treated animals, irrespective of the cytokine evaluated or the techniques or antigens used to stimulate the samples. Levels tended to decrease from week 9 onwards to a residual level, which persisted. Statistically significant differences were only encountered in the ELISPOT assay for this time point when the 16 kDa and Ag85B stimulations were used (one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ). IL-4 and IL-10 levels remained undetectable in all animals. As for the humoral response, only one animal in the control group was found to have serological PPD-specific antibodies from week 13 to the end of the experiment (Figure 4).

Despite the presence of an active infection with a proven continuous residual CFU and cellular immune response, the animals appeared to be in good health, as shown by the welfare checklist conducted as part of the daily clinical monitoring, and continued to gain weight until the end of the experiment. All these data highlight the similarity of our model with the course of human LTBI in terms of the immunological response in peripheral blood, the asymptomatic evolution and the hypothetical control of the CFU concentration in tissue.

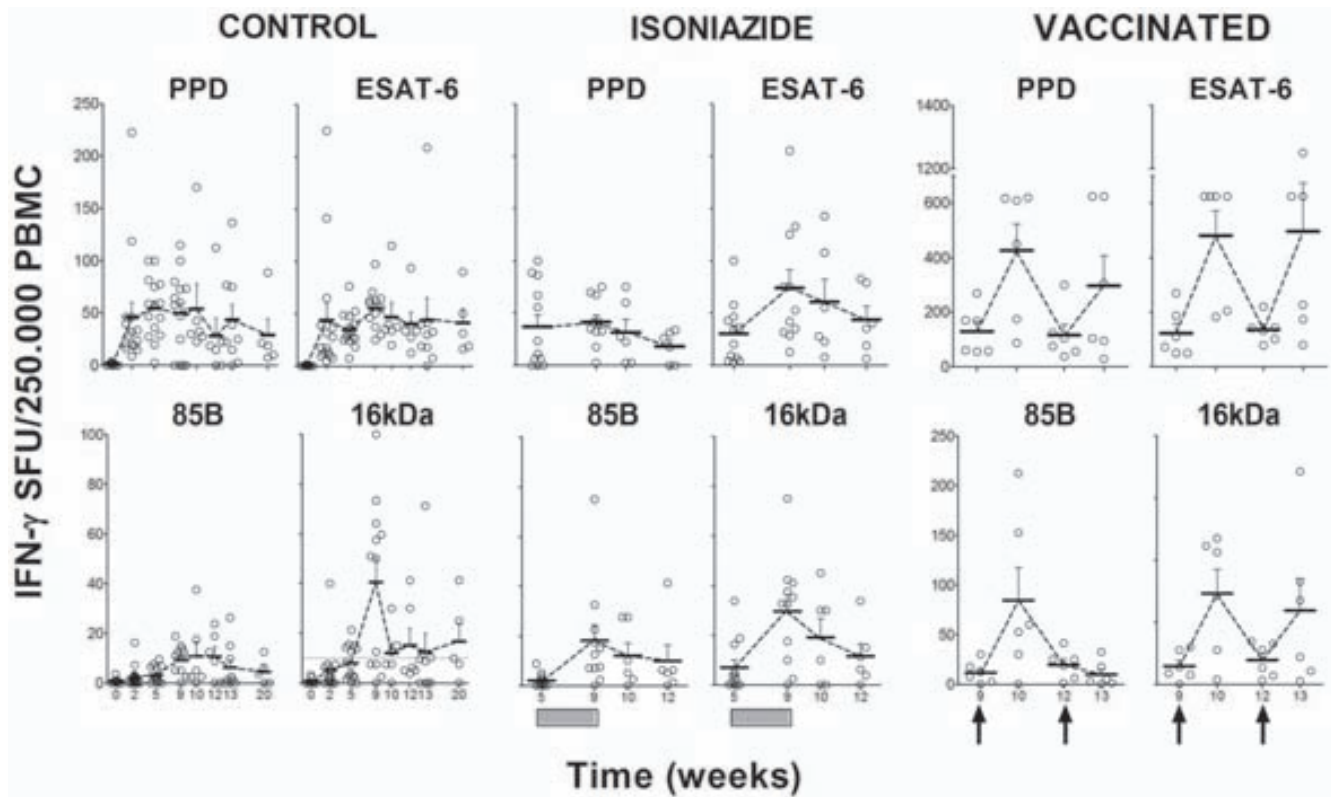
## 2. The pathology permitted a classification of granulomas according to their characteristics and showed the role of the intralobular septa network in the encapsulation process

Figure 5 shows the aspect of the lungs once fixed with formalin. Only confluent lesions related to the site of bacillary inoculation (the caudal left lung) could be detected before slicing. Small lesions

(0.5–2 mm in diameter) could be seen in the other lobes after careful examination of every slice. Figure 5 also shows the reactivity of the intralobular septa in the vicinity of a lesion. Enlargement of the septa was observed when they were touching a granuloma, even in the presence of a small lesion.

A careful examination of 235 lesions permitted us to observe different types of granulomas. Early-phase granulomas seemed barely organized and resembled a mouse-type granuloma, with a non-organized mixture of macrophages, neutrophils and lymphocytes (Figure 6A and B), whereas later-phase lesions (Figures 6C to F) were more organized and offered a more symmetrical sphere-like aspect. A 44.1% of Phase II and a 92.5% of Phase III lesions were encapsulated. These lesions showed a fully organized structure as they mainly contained myofibroblasts along with a very low proportion of lymphocytes and macrophages surrounding a macrophage-based layer containing foamy macrophages and apoptotic cells (mainly neutrophils) around the central necrotic area. In Phase III lesions, the lymphocytes appeared to be mainly accumulated as a thin layer outside the capsule and mineralization was present in all cases, as demonstrated by addition of von Kossa stain (Figure 7). Evolution towards the later phase was mainly based on the increase of the mineralization area and reduction of the surrounding cellularity, together with a reduction in size (Figure 8).

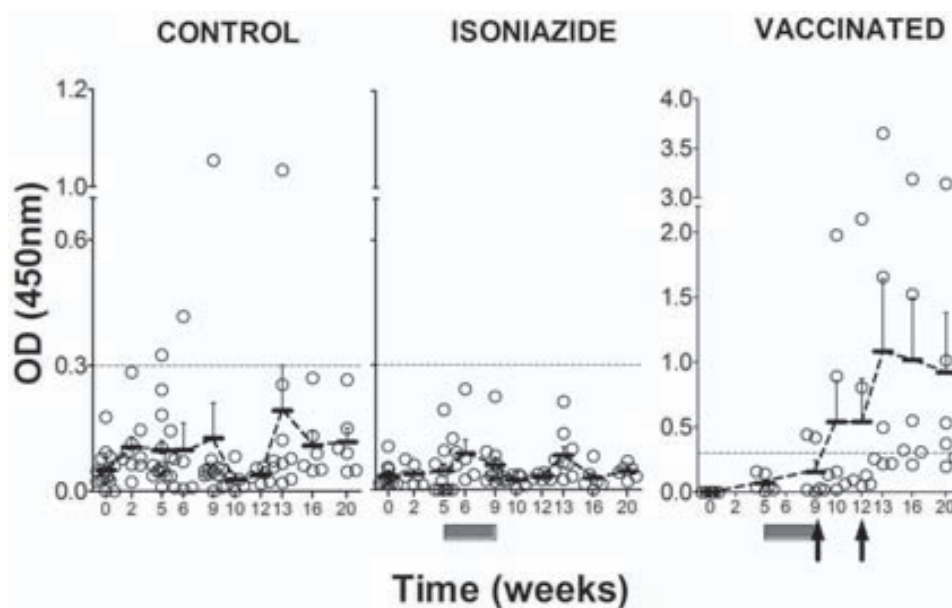
According to these data, and after careful comparison of the microscopic preparations and observation with a stereoscopic microscope, we were able to classify the granulomas according to their major recognizable characteristics (Figure 9 and Table 1) as follows: Phase I granulomas were characterized by the presence of



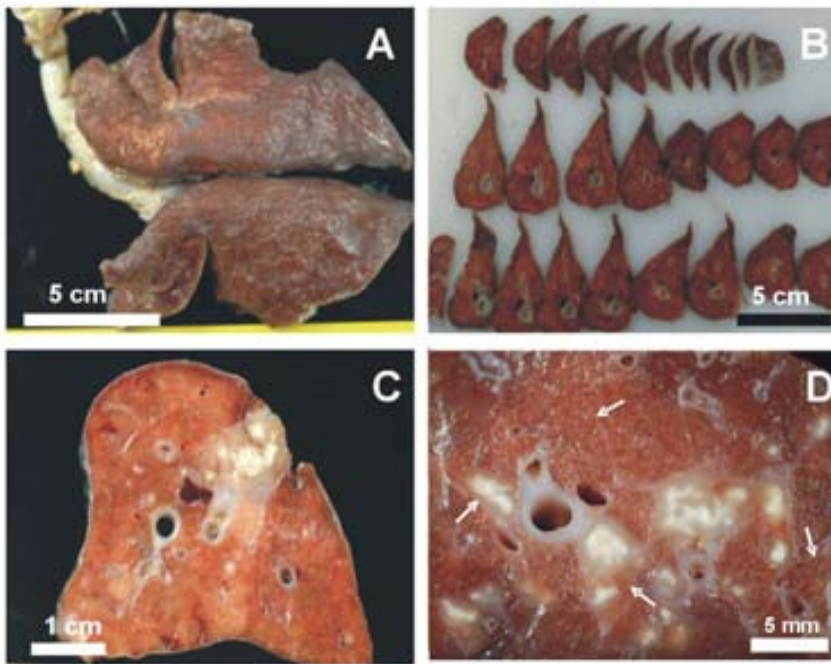
**Figure 3. Evaluation of the cellular immune response by ELISPOT assay.** Evaluation of ESAT-6, Ag85B, 16 kDa and PPD-specific IFN- $\gamma$  production after stimulation of PBMCs, as determined by ELISPOT assay. Means and SEM are drawn in black and connected by dotted lines. The black boxes show the period of INH treatment and the black arrows the time of therapeutic vaccination.  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g003

an irregular infiltration with no intragranulomatous necrosis. Phase II was considered when structured and the first signs of intragranulomatous necrosis appeared, as revealed by the presence

of an opaque area inside the infiltration. Phase III occurred when mineralization dominated the lesion, giving it the appearance of a shiny opaque area, and it became compact and has a cartilaginous



**Figure 4. Evaluation of the humoral response.** Humoral response against PPD is presented. The dotted line indicates the background threshold. Means and SEM are drawn in black and connected by dotted lines. The dark-grey boxes show the period of INH treatment and the black arrows the time of therapeutic vaccination.  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g004



**Figure 5. Macroscopic pathology of the whole lung showing the intralobular septa network.** Macroscopic pathology of the whole lung (A), sliced lobes (B) and the inoculation site (C). White arrows indicate normal septa and the increased thickness of those surrounding lesions (D). doi:10.1371/journal.pone.0010030.g005

consistency when pressed with forceps. We considered this a sign that the lesion had become highly fibrotic, which is not seen in earlier lesions. Finally, phase IV lesions are characterized by the predominance of mineralization with a thin surrounding infiltration. When two or more lesions were found together, they are classified as coalescent.

After evaluating a total of 4981 lesions (Table 2) we attempted to determine the kinetics of the recent (phase I and II) and older (phase III and IV) lesions (Figure 10). Recent lesions were initially predominant but decreased by week 9, when the number of old ones increased, thus showing their maturation. Both types of lesions tended to decrease from this point onwards, with the older ones predominating. Remarkably, one animal showed no lesions at week 13.

In light of the physiological value of the classification between recent and old lesions (recent ones can disseminate bacilli as they are still not well encapsulated), we determined the dissemination ratio (DR) by dividing the number of recent lesions by the older ones in each animal at each time point. Figure 11 shows that evolution of the DR fits a negative exponential regression ( $p < 0.0001$ ), thus demonstrating that, after an initial dissemination period, the generation of new lesions decreased at week 9 to become almost constant (DR of between 0.8 and 0.34) at week 20. This evolution was well supported by the CFU data, which also show a strong control after week 9 (Figure 1).

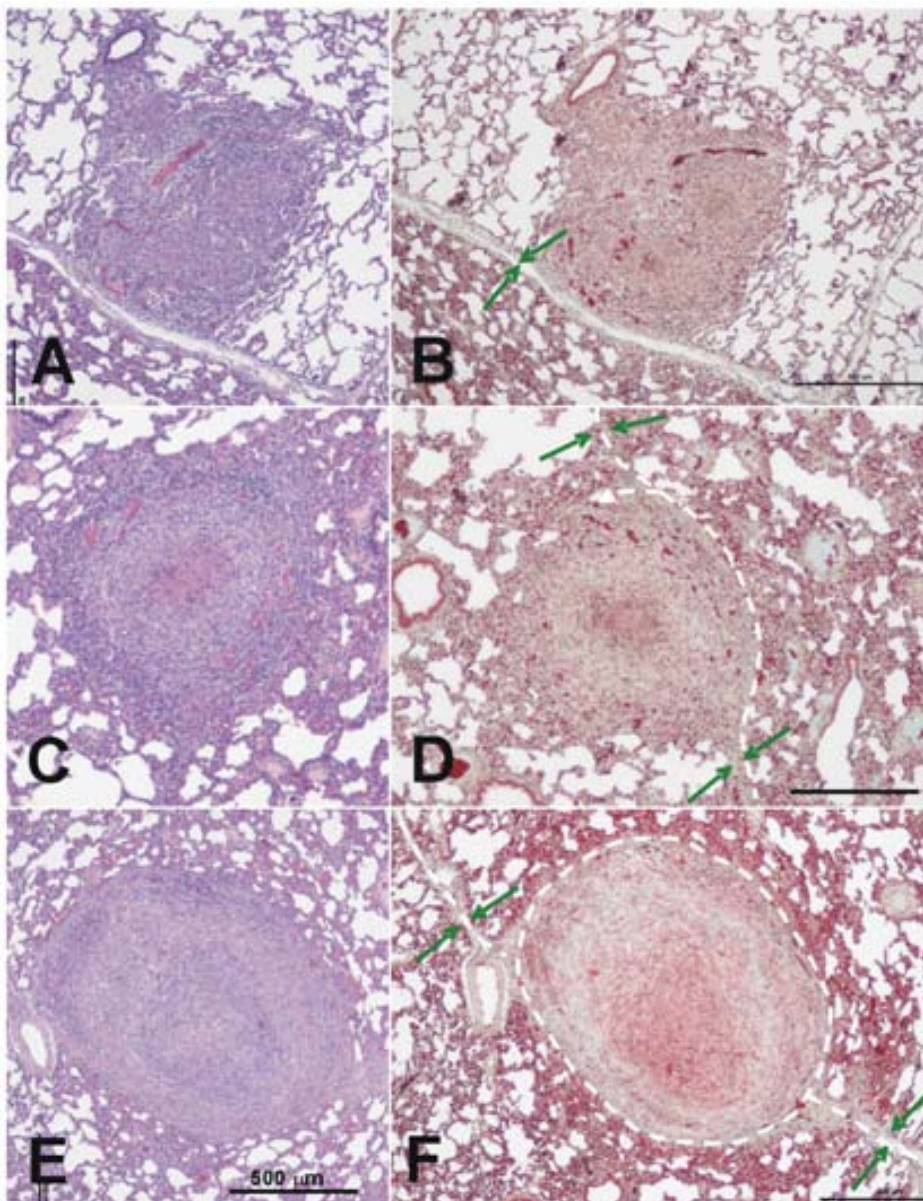
The presence of acid-fast bacilli inside the granulomas was hardly detected during the whole experiment. The maximum observed was two bacilli per lesion, inside the necrotic tissue in all cases, using the auramine technique (data not shown).

Two fibrotic processes, the patterns of which are shown in Figure 12, were present during granuloma evolution. The central pattern was initially characterized by the presence of proliferation, active fibroblasts expressing CD10 and a disorganized net of reticulin based on type III collagen. Once phase II appeared, myofibroblasts (recognized by the presence of antibodies against

the actin in smooth muscle cells) organized the reticulin network and the cellular proliferation and CD10 expression appeared to be located around the capsule, at the periphery, where both reticulin and Masson's trichrome stains showed thick, wavy collagen fibers. As in the intralobular septa, these were easily recognized by antibodies against collagen type I.

As the encapsulation process was detected in a high number of lesions, an analysis of factors possibly associated with it was performed in order to ascertain its origin; the results are presented in Table 3. At the univariate level, encapsulation was found to be related to the granuloma's evolutive phase, its size, and contact with the intralobular connective network (in particular with the medium-large blood vessels or bronchi, and the intralobular septa; the pleura had no influence). Multivariate analysis confirmed the influence of the evolutive phase and contact between the granuloma and the intralobular septa that join the major vessels and bronchi to the pleura. Although this was observed using a 2D method, the percentage of contact (56.5%) was high enough to predict a much larger percentage if different cuts of the granulomas were assayed using a 3D approach. The area of the granulomas appeared to be less important, although it should be noted that encapsulated lesions appeared to be significantly larger ( $0.76$  vs  $0.23$  mm<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ) than non-encapsulated ones (Figure 8). Interestingly, a number of Phase I lesions were also found to be encapsulated, a fact that was linked to the presence of neighboring larger granulomas stimulating the same intralobular septa.

Previous studies have already differentiated between old (initial or primary) granulomatous lesions and new (secondary) ones, both in rabbits [27] or in guinea-pigs, mainly accordingly to the size of the lesions (larger in the former) and also by the lack of intragranulomatous necrosis in the case of guinea-pigs [28]. However, our study provides, for the first time, a clear histopathological evolution of the lesions in the context of what could be considered as a "human-like" experimental LTBI model. The process described was marked by two kind of fibrotic



**Figure 6. Microscopic evolution of recent lesions, showing the relationship between the granulomas and the intralobular septa. A–D: Phase I lesions; E and F: Phase II lesions.** Images **A** and **B** show the initial evolution phase where the granuloma touches an intralobular septa but there is still no fibroblast proliferation. This can be seen in images **C** and **D**, where the septa increase in thickness and start to surround the granuloma, as shown by the white dotted lines. Images **E** and **F** show how the granuloma is finally surrounded by a thick collagenic mantle. Pictures **A**, **C** and **D** were stained with haematoxylin and eosin (H&E), while **B**, **D** and **F** were stained with Masson's trichromic. The original magnification of the large images is  $\times 40$  whereas all insets, except **F** ( $\times 100$ ), are magnified  $\times 400$ . The green arrows show the septa and the dotted white lines the trajectory of the capsule.

doi:10.1371/journal.pone.0010030.g006

structures: an internal one based on the production of collagen III organized by myofibroblasts, and an external one directed by the contact with intralobular septa, based on type I collagen. The evolution of new and old lesions provides a dissemination ratio that could be useful for understanding the persistence of LTBI.

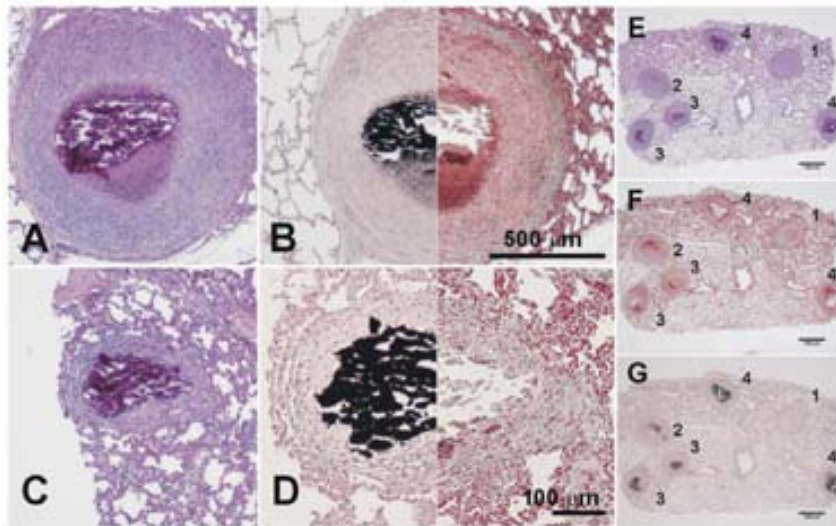
### 3. Modification of the natural course of the infection in the minipig model by adding two different therapeutic treatments

Animals were observed daily to ensure their good health according to a pre-established welfare-status schedule. No local effect was

detected at the inoculation site at any time (data not shown). Systemic adverse effects were monitored by visual inspection and by monitoring the weight and body temperature. There were no apparent differences among the three experimental groups, although weight tended to increase in all groups and temperature to decrease, whilst remaining in the physiological range. These changes were considered related to the age of the animals.

Neither of the treatments applied resulted in a statistically significant difference in the bacillary counts at any site with respect to the control group.

As shown in Figures 2 and 3, INH treatment did not affect the evolution of the cellular immune response with time, although a



**Figure 7. Microscopic evolution of the old lesions.** Once the granuloma is structured, the necrotic process starts and calcification appears. Images **A** and **B** (phase III) show a well-structured and encapsulated granuloma with necrotic calcification. Images **C** and **D** show lesions of an advanced evolution (phase IV), with granulomas containing a large amount of calcification and fibrosis. Samples **A** and **C** were stained with H&E, whereas samples **B** and **D** were half stained with Masson's trichrome and von Kossa stain, which shows calcification in black. Pictures **E** to **G** were stained with H&E, Masson's trichrome and von Kossa stain, respectively. Lesions 1 and 2 are phase II lesions and differ only in the initial mineralization seen in lesion 2. The other lesions are all phase III lesions that have progressed differently. Original magnification is  $\times 10$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g007

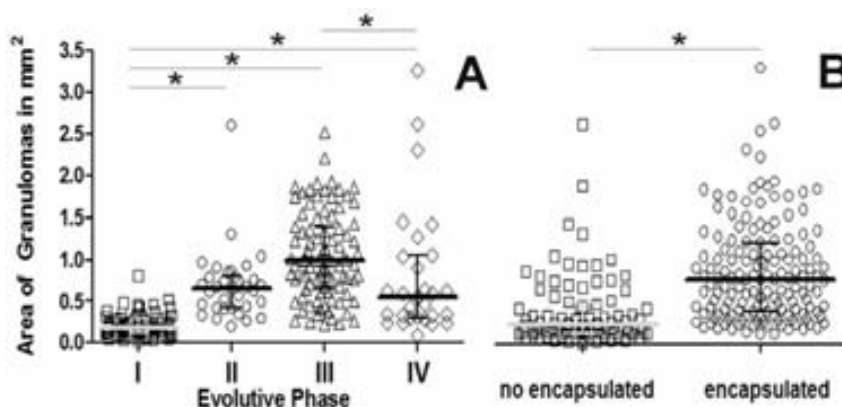
slight decrease could be seen from week 13 onwards. In contrast, the ELISPOT assay showed a transient increase in IFN- $\gamma$  SFU after both the first and second vaccine inoculations (using antigen 85B, PPD, ESAT-6 or 16 kDa as stimuli). This increase was statistically significant when compared to the other two experimental groups. Vaccine therapy also induced a transient increase in IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$  one week after the first vaccine inoculation in some animals, as detected using the ELISA technique (Figure 2). This increase was confirmed statistically upon comparison with the other groups. IL-4 and IL-10 levels remained undetectable in all animals.

An increase of serological PPD-specific antibodies was observed after the second vaccine inoculation in all vaccinated animals. Two animals from the vaccinated group already showed positive PPD-specific antibodies in their sera at week 9, before the first inoculation, and these two animals also had the highest amount of

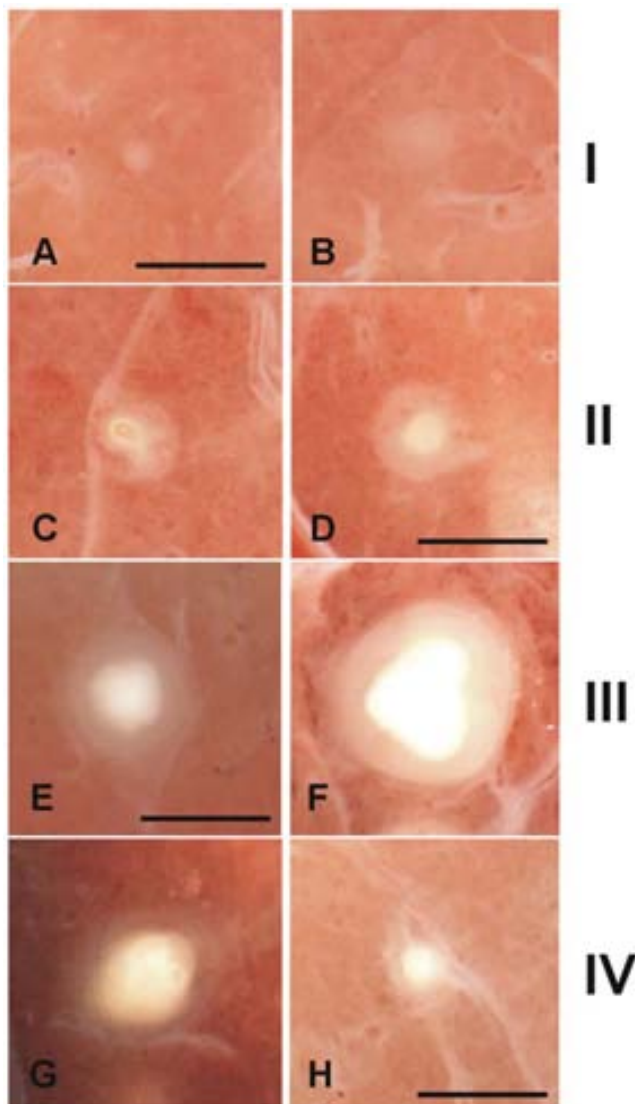
antibodies at the end of the study, thus suggesting a boosting phenomenon.

As regards the kinetics of recent and old lesions, INH treatment during weeks 5 to 9 resulted in a reduction of all lesions, thereby reflecting a decrease in the maturation process. Remarkably, only two lesions could be detected in one animal belonging to the INH group at week 13 (Figure 12). Interestingly, vaccine therapy increased both types of lesions, with the number of old lesions showing a higher increase. This treatment also decreased the CFU numbers of the inoculated lobe (Figure 1).

Although we have already shown that DR decreased sharply from week 9 to a residual constant value until the end of the experiment for the non-treated animals, INH treatment stopped this decrease, apparently by stopping the progression of lesions to phases III and IV but without changing the overall evolution defined by the control group. Interestingly, vaccine therapy modified this evolution by



**Figure 8. Evolution of the area of granulomas according to their evolutive phase.** Individual data are presented in relation to the evolutive state of the lesion (**A**) or its encapsulation status (**B**). Mean and quartiles are presented in each case. Inter-group differences were determined by Dunn's One Anova on ranks test and are marked with \* if statistically significant ( $p < 0.05$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g008



**Figure 9. Macroscopic evolution of the lesions.** Classification of the fixed pulmonary lesions as they appear under the stereoscopic microscope. Considering the histological evolution of the lesions, and taking into account the sequential appearance of encapsulation and calcification, we have divided the lesions into four phases. Phase I is characterized by the presence of cellular infiltration (**A** and **B**). The intragranulomatous necrosis, which is characterized by the presence of an opaque zone inside the granuloma (**C** and **D**), appears during Phase II and structuration of the lesion starts. Phase III (**E** and **F**) involves the onset of calcification, which gives a shiny aspect to the central opacity, which grows in size. These lesions are characterized by the cartilaginous texture of the lesion when touched with the forceps. Phase IV lesions (**G** and **H**) are characterized by predominance of the calcification and a thin surrounding infiltration. Original magnification is  $\times 10$ . Scale bar: 1 mm. doi:10.1371/journal.pone.0010030.g009

reducing the DR to 0.195 at week 20, a fact strongly related to the increased number of old lesions (Figure 10).

In conclusion, treatment of the infection with short-term chemotherapy reduced the number of lesions but appears to also reduce their maturation towards old lesions. In contrast, the addition of a therapeutic vaccination increased the number of lesions, mainly the old ones, tends to reduce the CFU counts, and could be linked to an increase in the (cellular and humoral) immunological responses induced.

## Discussion

Little is known about the histopathological evolution of human LTBI, although some findings have helped to determine the evolution of the lesions [21,29].

In general, a strong inflammatory response is induced, with the presence of giant multinuclear cells, a strong fibrotic response encapsulating the lesion, and a large intragranulomatous necrosis, which finally calcifies over time. The presence of bacilli in these lesions is seldom observed. As a chest X-ray is able to detect old calcified lesions, it is traditionally considered that, upon infection with *M. tuberculosis*, an initial dissemination of lesions, which might evolve towards calcification, takes place before the immune response is triggered [17]. It was demonstrated a long time ago that bacilli can persist in a latent stage in a small percentage (around 1%) of these evolved lesions [30]. This is the origin of the traditional theory, which postulates that these bacilli can resuscitate after some type of local immunodepression and produce active TB [29]. This theory has, however, been superseded to some extent by other less disseminated and/or less accepted theories developed to explain LTBI: external reinfection as the most probable cause of TB in adults [21]; *M. tuberculosis* infection undergoing a constant process of autoinoculation, with bacilli constantly being drained out of the lesions and inducing febrile episodes [31,32]; and the more recent hypothesis that considers LTBI to be a consequence of a constant endogenous reinfection process [33].

As the “perfect” animal model that mimics LTBI has still not been found, we present a new animal model using minipigs. In this study we describe for the first time a comprehensive evolution of the lesions caused by *M. tuberculosis* in a large animal that might fit the traditional view of control of this infection in humans, which leads to an LTBI. This is seen in a context characterized by a maintained Th1 response, control of the bacillary load, the constant induction of recent lesions, and their resolution (towards old lesions) as a result of a strong local fibrotic response in which the local intralobular septa seem to play a crucial role in granuloma encapsulation. This response seems to play a major role in the evolution of granulomas by curtailing the dissemination of bacilli towards the alveolar space, thereby explaining the sudden drop in the induction of new lesions 9 weeks after the challenge. As this dissemination still exists, albeit at a low level, these findings also support the Dynamic Hypothesis, which postulates that maintenance of an LTBI requires a constant endogenous reinfection [33], and might explain the success of humans in controlling TB infections and the low progression towards active TB.

Interestingly, the initial granulomatous dissemination observed also fits with the work developed in the zebrafish model infected with *M. marinum*, where infected macrophages from primary granulomas could disseminate to initiate new secondary granulomas during the innate immune phase of the infection [18].

The initial lesions in this model are similar to the initial murine lesions, in other words a mixture of neutrophils, macrophages and lymphocytes without much organization, with the periphery open to the alveolar spaces. However, very few acid-fast bacilli are seen in minipigs, whereas they are highly abundant in mice, thus reflecting a similar degree of “human-like” low tolerance to the bacilli as such a low concentration is enough to trigger a strong granulomatous reaction. As in mice, a close relation to the alveolar spaces still exists in this phase, thus allowing the constant drainage of infected foamy macrophages towards this space [13,34]. As in guinea pigs or larger mammals, this drainage is very effective as the alveolar spaces are large enough not to retain them locally, as



**Table 1.** Characteristics of the evolution Phase of the lesions.

Phase	Irregular margin	Necrosis	Calcification	Cartilaginous consistency	Halus size in relation to necrosis
I*	+	-	-	-	N.E.**
II	-	+	+/-	-	+++
III	-	++	++	+	++
IV	-	++	+++	+	+

\*Phase I lesions are subdivided in **a** or **b** regarding its contact with interlobular septae (in the **b** case).

\*\*N.E. means "not evaluable".

doi:10.1371/journal.pone.0010030.t001

is the case in mice. This phase is, however, rather limited in time, as also demonstrated by the scarcity of foamy macrophages detected in the BAL. This phenomenon could be a consequence of the entrapment of foamy macrophages in the granuloma during encapsulation and might therefore play a role in the generation of intragranulomatous necrosis [35,36].

Our data permit the lesions to be classified and show that the evolution of the granulomas is marked by fibroblast proliferation and transformation into myofibroblasts, which contract the lesions by structuring the reticulin fibers, thereby allowing the original structure to be maintained against external mechanical forces. The granuloma itself develops with a spherical form due to an energy-minimization process [37,38]. This follows the usual healing process in the lung once a lesion has been induced. Upon onset of infection, intracellular bacillary growth mainly causes necrosis of the infected macrophages, thus maintaining the inflammatory response. In this scenario, secretion of TNF by macrophages is crucial for both fibrin and collagen deposition, which results in a provisional extracellular matrix [39]. This inflammatory response also generates apoptotic neutrophils and macrophages which, once phagocytosed, stimulate the production of TGF- $\beta$  and thus stop the inflammatory response and provoke an anti-inflammatory process, thereby promoting fibrosis [40,41,42]. TGF- $\beta$  also promotes fibroblast accumulation and, together with mechanical stress, induces the transformation into myofibroblasts [37] [43], whose presence has already been linked to mycobacterial granulomas [44].

The animal model studied herein also shows two sclerotic processes that have classically been described in the human "benign" evolution of the infection [21], namely an increase in fibroblast proliferation, which leads to the internal accumulation of myofibroblasts, and the formation of a capsule around the granuloma, as a continuum of the interlobular septum, once the granuloma has reached it. The similarities with human granulomas might then be a consequence of the presence of intralobular septa in minipigs. These structures are highly sensitive to mechanical stress and react to it with fibroblast proliferation and thickening after collagen production [22]. This capsule appears to be vital to prevent the constant drainage of latent bacilli towards the alveolar spaces, as animals that are not able to structure it, such as mice and guinea pigs, constantly have infected foamy macrophages in the BAL [13,34,45]. This process of healing and avoiding constant bacillary dissemination has been known for some time and was the rationale behind the most successful pre-chemotherapy TB therapy, namely collapse therapy, which effectively reduced the appearance of new lesions, avoided liquefaction and also increased local fibrosis and healing by increasing the stasis of the blood circulation [21,32].

It has been speculated that both fibrosis and the anti-inflammatory response restrict the arrival of new macrophages that are able to

phagocytose the apoptotic bodies [46], thus allowing them to accumulate and favoring the mineralization process. Calcification could also be promoted by the destruction of foamy macrophages, which could be both a source of intragranulomatous necrosis [35,36] and of phosphatidylserine, a molecule that is able to promote the local accumulation of calcium and phosphate ions along with an increase in the local pH [47,48] [49,50]. Both these factors could induce a multi-stress scenario against the bacilli, thereby contributing to control of the bacillary load, as has already been demonstrated in the guinea-pig model [15].

As regards the influence of different treatment regimes on the course of the infection, the effect of INH treatment on the evolution of the lesions is worthy of comment. Thus, although this treatment prevents the induction of new lesions and reduces their concentration, it also diminishes the concentration of old lesions, thus indicating a reduction in the fibrosis process that is probably related to a reduction in the inflammatory process, as discussed previously [51]. This could mean that some type of inflammatory process is needed to induce the fibrotic process, possibly by causing enough apoptotic bodies to enhance TGF- $\beta$  production, although this would need to be demonstrated experimentally. Interestingly, the addition of a therapeutic vaccine has the opposite effect: it increases the number of lesions, particularly old ones. This could reflect a proinflammatory process that might involve the quicker detection and control of new lesions, due to the increased cellular and humoral response, and which would finally increase the fibrotic effect. Previous studies with this particular vaccine have already revealed its ability to elicit a combined Th1-Th2-Th3 response [52], a cellular immunity characterized by an increase in the level of Th1 cells that are able to recognize replicating and non-replicating bacilli [45] and a protective humoral response [53]. This increase in the number of lesions might result from a protective role, as supported by the reduction in both the number of CFUs in the inoculated lobe and the dissemination rate.

Overall, the data presented herein suggest a scenario very similar to human LTBI, and could support the idea of a constant reinfection process maintaining the LTBI [33]. It is well known that the chance of developing active TB after infection decreases exponentially with time [54]. Concurrently, our data also show how the induction of new lesions decreases suddenly after an initial dissemination process and remains at a constant residual level, thus reducing the chance of progression towards active TB [17]. Finally, these results are also in agreement with the constant presence of ESAT-6-specific IFN- $\gamma$  spot-forming units in the peripheral blood of LTBI human subjects, thereby revealing the presence of short-lived specific effector T-cells [6]. As ESAT-6 is produced by growing bacilli [55], the explanation for the constant presence of these cells might be related to the constant development of new lesions, as demonstrated in the experimental model proposed here. These new lesions would be so small

**Table 2.** Characteristics of the lesions.

<b>Week 5</b>							
<b>CONTROL</b>							
<b>Phase</b>	<b>Total lesions</b>			<b>Grouped lesions</b>		<b>DR</b>	
	<b>n</b>	<b>median</b>	<b>25–75 per.</b>	<b>median</b>	<b>25–75 per.</b>	<b>median</b>	<b>25–75 per.</b>
<b>I</b>	702	247	(136.8–328)	387	(174–411)	22.77	(10.76–44.32)
<b>II</b>	207	64	(18.25–121)				
<b>III</b>	81	17	(5.75–50.75)	17	(5.75–50.75)		
<b>Coalescent</b>	0	0	0				
<b>IV</b>	0	0	0				
<b>Total</b>	<b>990</b>	<b>Median lesions per animal and percentiles (25–75) = 404 (180–462)</b>					
<b>Week 9</b>							
<b>CONTROL</b>							
<b>I</b>	62	16	(10–32.5)	45	(18–63.75)	0.86	(0.78–0.97)
<b>II</b>	62	29	(8–31.25)				
<b>III</b>	138	48	(18.75–72.75)	60	(21.75–75.75)		
<b>Coalescent</b>	12	0	(0–9)				
<b>IV</b>	0	0	(0–0)				
<b>Total</b>	<b>274</b>	<b>Median lesions per animal and percentiles (25–75) = 105 (39.8–140)</b>					
<b>INH</b>							
<b>I</b>	26	13	(4–22)	17	(7–27)	4.85	(2.7–7)
<b>II</b>	8	4	(3–5)				
<b>III</b>	10	5	(1–9)	5.5	(1–10)		
<b>Coalescent</b>	0	0	(0–0)				
<b>IV</b>	1	0.5	(0–1)				
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>Median lesions per animal and percentiles (25–75) = 22.5 (8–37)</b>					
<b>Week 13</b>							
<b>CONTROL</b>							
<b>I</b>	84	5	(1.25–60.5)	13	(4–153.3)	0.464	(0.43–0.87)
<b>II</b>	130	8	(2.75–92.75)				
<b>III</b>	487	20	(5.75–354.5)	28	(7.75–361.8)		
<b>Coalescent</b>	4	1	(0.25–2.5)				
<b>IV</b>	11	4	(1–6.25)				
<b>Total</b>	<b>716</b>	<b>Median lesions per animal and percentiles (25–75) = 41 (11.8–515)</b>					
<b>INH</b>							
<b>I</b>	110	2	(2–81.5)	6	(1.5–93.75)	0.35	(0.09–1.9)
<b>II</b>	19	4	(1–12.25)				
<b>III</b>	61	14	(3.5–38.75)	17	(4.25–42.5)		
<b>Coalescent</b>	7	3	(0.75–3.75)				
<b>IV</b>	0	0	(0–0)				
<b>Total</b>	<b>197</b>	<b>Median lesions per animal and percentiles (25–75) = 23 (5.75–136)</b>					
<b>Week 20</b>							
<b>CONTROL</b>							
<b>I</b>	233	9	(8–12)	15.5	(10–60)	0.39	(0.22–0.53)
<b>II</b>	472	6.5	(3–48)				
<b>III</b>	700	48.5	(22–178)	60.5	(24–270)		
<b>Coalescent</b>	45	3.5	(1–16)				
<b>IV</b>	109	3	(1–31)				

**Table 2.** Cont.

Week 20							
CONTROL							
<i>Total</i>	1559	<i>Median lesions per animal</i> and percentiles (25–75) = 76 (34–330)					
INH							
I	156	5.5	(1–24)	8.5	(4–55)	0.412	(0.32–0.83)
II	48	4	(2–6)				
III	121	11	(3–26)	26	(6–37)		
Coalescent	47	3	(1–9)				
IV	45	8.5	(3–11)				
<i>Total</i>	417	<i>Median lesions per animal</i> and percentiles (25–75) = 38 (11–155)					
VACCINATED							
I	92	20	(3–21)	35	(7–41)	0.195	(0.18–0.32)
II	78	12.5	(4–18)				
III	389	54	(15–128)	99.5	(36–176)		
Coalescent	26	4.5	(1–7)				
IV	198	27	(7–47)				
<i>Total</i>	783	<i>Median lesions per animal</i> and percentiles (25–75) = 142.5 (44–214)					

doi:10.1371/journal.pone.0010030.t002

(around 0.5–1 mm) that they would not be observable in the chest X-ray, therefore their presence would be absolutely compatible with a diagnosis of LTBI [33].

The “secret” to controlling *M. tuberculosis* infection might therefore lie in both avoiding the drainage of non-replicating bacilli (by encapsulating the lesion) and stopping the inflammatory response. This would prevent any phagocytosis of the remaining bacilli, thus stopping their growth. This is a crucial point as extracellular multiplication of *M. tuberculosis in vivo* has only been seen in liquefacted lesions [56], which are not present in this scenario. In addition, this anti-inflammatory effect could favour mineralization of the necrotic tissue, which might be deleterious for the healing process but would further stress any remaining non-replicating bacilli.

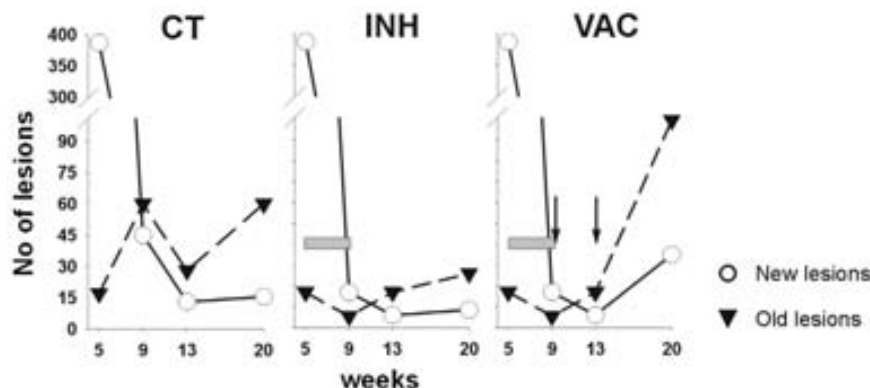
The high number of parallels found between this infection model and the process thought to occur in humans makes it

especially useful for further studies devoted to understanding the evolution of LTBI. Achieving a course of the infection that might be similar to the human one, including the monitoring of the immune responses, also provides an opportunity to not only help new preventive and therapeutic approaches against it to be designed, but to be tested with some reliability, thereby offering a completely new field for future studies.

## Materials and Methods

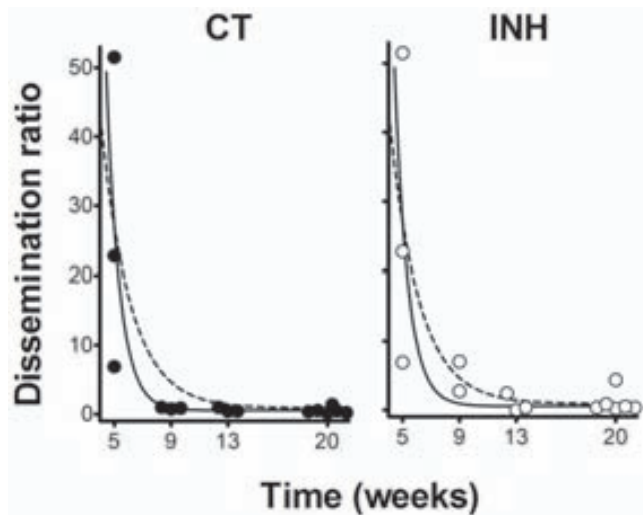
### 1. Experimental Design

**Animals.** A total of 36 1.5-month-old female specific pathogen-free (*spf*) Göttingen minipig® were obtained from Ellegaard (Dalmose, Denmark) and fed with maintenance diet 127 (SAFE, Augy, France). All animals were provided with a highly detailed certificate and were routinely checked for infection



**Figure 10. Evolution of recent and old lesions.** The results show the median of the values represented in Table 2. The gray bar shows the INH treatment period and vaccine inoculation is represented by the black arrows. CT = control group; INH = chemotherapy with isoniazid; VAC = group treated with vaccine therapy.

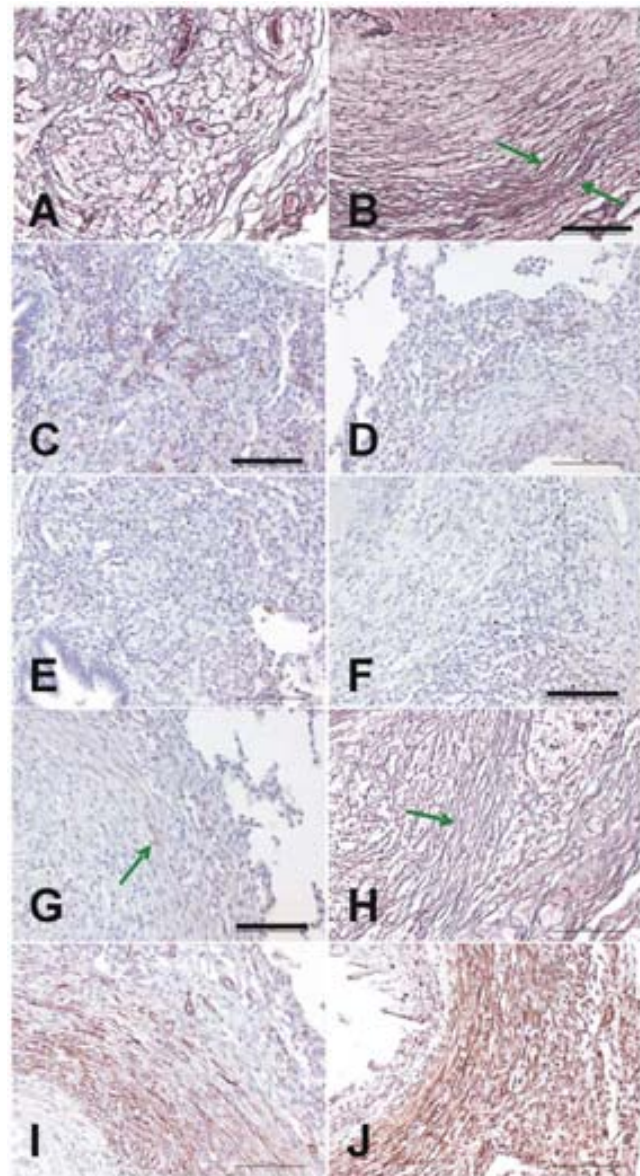
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g010



**Figure 11. Evolution of the dissemination rate (DR).** Individual data points are represented by full or open circles in control (CT) and isoniazid-treated (INH) groups respectively, and are adjusted to an exponential regression. The continuous and dotted lines represent the adjustment for the CT ( $y = 5620.45 \cdot e^{-1.071 \cdot x} + 0.5460$ ) and INH ( $y = 295.62 \cdot e^{-0.4848 \cdot x} + 0.8793$ ) groups. Both adjustments were statistically significant ( $p < 0.0001$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g011

with more than 40 infectious agents, including 24 bacteria, 12 viruses, 4 parasites and 3 fungi.

**Infection and experimental groups.** The animals were anesthetized by intramuscular injection of 10 mg/kg of ketamine, 2 mg/kg of xylazine and 2 mg/kg of azaperone before infection with  $2 \times 10^3$  CFUs of *M. tuberculosis* diluted in 2 mL of saline. The *Mycobacterium tuberculosis* strain used was the H37Rv Pasteur strain, grown in Proskauer Beck medium containing 0.01% Tween 80 to mid-log phase and stored at  $-70^\circ\text{C}$  in 2 mL aliquots until being used to infect the animals. The transthoracic method was preferred to an aerosol as it is safer for the professionals responsible for infecting the animals. The transthoracic infection was performed with an 18-gauge Tuohy epidural needle (length: 90 mm) (Viggon S.A, Paterna, Spain) between the 8th and 9th rib of the left lung. Three experimental groups were established according to the treatment received: infected non-treated (control;  $n = 15$ ); treated with INH alone (INH;  $n = 12$ ); and treated with INH plus two doses of *M. tuberculosis* fragment-based vaccine (vaccinated;  $n = 6$ ). INH (300 mg; Cemidon, Alcala Farma, Madrid, Spain) was administered intramuscularly into the cervical region twice a week for four weeks (weeks 5–9), with three days between injections. This schedule was chosen to determine the effects of INH during its most efficacious period, on the basis of previous bactericidal activity studies [57], assuming that the CFU control would start at week 5 after challenge, as previously demonstrated in guinea pigs [58]. Moreover, this schedule had already been found to be effective in large animals [59]. The therapeutic vaccine used was RUTI<sup>®</sup>, a vaccine manufactured by Archivel Farma, s.l. (Badalona, Catalonia, Spain), under GMP standards. RUTI<sup>®</sup> vaccine is based on *M. tuberculosis* fragments, detoxified and liposomed as published elsewhere [52]. The vaccine is still in clinical development and not commercially available, thus was kindly provided by the manufacturer. RUTI<sup>®</sup> was administered twice, at weeks 9 and 12, 21 days apart, according to previous protocols [59].



**Figure 12. Characterization of the dual fibrotic responses in granuloma evolution.** Figures A, B and H show reticulin stain of initial Phase I (A) and Phase III granulomas (the peripheral capsule is marked with a green arrow in B and H). C and D present immunostaining with anti-CD10 and show an increase in the center (C) or the periphery (D) of Phase I and III granulomas, respectively. E and F also show the differences between these evolutive phases with the same proliferation pattern stained with Ki 67. G shows recognition of the capsule by anti-collagen type 1 antibodies, whereas I and J show the identification of myofibroblasts using anti-smooth muscle and anti-HHF35 antibodies respectively. Original magnification is  $\times 200$ . Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.g012

**Ethics.** All experimental procedures were approved and supervised by the Animal Care Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona in accordance with current EU legislation regarding the protection of experimental animals. All experiments were performed in a BL3 facility inside the CReSA building at the Universitat Autònoma de Barcelona. Animals were observed daily according to a welfare schedule and check list (approved by the CReSA Animal Welfare Committee) to monitor the clinical aspects after the infection and to ensure the safety of the

**Table 3.** Predictive factors in granuloma encapsulation.

VARIABLE	UNIVARIATE LEVEL			MUTIVARIATE LEVEL	
	Encapsulation	p-value	OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR (95% CI)
	Total (% encapsulated)				
<b>Evolutive Phase:</b>					
I	79 (24,1)	<0,001	1	<0,001	1
II	34 (44,1)		2,5 (1,0–6,4)		2,5 (1,0–5,9)
III	93 (92,5)		38,8 (14,2–110,5)		41,6 (16,2–107,3)
IV	29 (93,1)		42,6 (8,6–268,8)		39,2 (8,5–181,7)
<b>Contact with Pleura:</b>					
No	217 (62,7)	1	1	-	
Yes	18 (61,1)		0,94 (0,3–2,8)		
<b>Contact with vessel/bronchi</b>					
No	79 (45,6)	<0,001	1	-	
Yes	156 (71,2)		3,00 (1,62–5,4)		
<b>Contact with Septae:</b>					
No	117 (55,6)	0,03	1	0,045	1
Yes	118 (69,5)		1,8 (1,0–3,2)		2,1 (1,0–4,3)
<b>Contact with the connective net</b>					
No	29 (34,5)	0,02	1	-	
Yes	206 (66,5)		3,8 (1,6–9,3)		
<b>Area size in mm<sup>2</sup>:</b>					
0–0.23	60 (23,3)	<0,01	1	-	
0.24–0.49	58 (63,8)		5,8 (2,4–14,1)		
0.50–0.97	59 (74,6)		9,6 (3,9–24,5)		
0.98–3.27	58 (89,7)		28,5 (9,2–93,2)		

OR: Odds ratio. CI: Confidence Interval.  
doi:10.1371/journal.pone.0010030.t003

treatments tested. They were also weighed every week in order to monitor their health status.

## 2. Post-mortem analysis

**Post-mortem examination.** The animals were euthanised with an intravenous overdose of pentobarbital sodium at week 20 post-innoculation (Vetoquinol, Madrid, Spain). The minipigs were subjected to a detailed post-mortem examination [60]. All obvious lymph nodes present at each site were collected, including the axilar (right and left), inguinal (right and left), mesenteric, hepatic, middle retropharyngeal (right and left), tonsil (right and left), tracheobronchial and caudal mediastinal lymph nodes. A small portion of each lymph node was removed for histology and the remainder retained for bacteriology. Bacteriology tissue samples were collected using an aseptic technique. Gross lesions from the lungs were detected by observation or palpation, recorded and collected for histopathology and culture. If no lung lesions were identified, a sample (approx. 2 g) was collected from the dorsal margin of each lobe for culture. The remainder of the lungs was fixed in formalin in all cases for subsequent slicing at 2-mm intervals. The cut surfaces were further examined for gross lesions and collected for histopathology. Each slice was also carefully examined for microscopic lesions under a binocular stereoscopic microscope SMZ800 (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan).

**Bronchoalveolar lavage (BAL).** After sacrifice and aseptic removal of the lungs, a total of 200 mL of physiological serum was

introduced through the trachea and recovered by aspiration with a 100 mL syringe. The volume recovered was then divided into two tubes: one to determine the CFU and the other for cytology. The latter tube was centrifuged at 300 g for 15 minutes and the sample stained with Oil Red and examined by electron microscopy to identify foamy macrophages.

**Bacterial load.** Samples of lung lobes and pulmonary and extrapulmonary lymph nodes from each animal were extracted to determine the bacterial burden. Lung tissue and BAL samples were homogenized and decontaminated according to a previously reported procedure [61], whereas lymph node samples were not. The number of viable bacteria was determined by plating serial dilutions of whole organ homogenates and BAL on nutrient Middlebrook 7H11 agar (BD Diagnostics, Spark, USA) and Lowenstein-Jensen medium (Biomedics, Madrid, Spain). Bacterial colonies were counted after incubation for 28 days at 37°C. Blood cultures were performed until week 13 by inoculating 5 mL of whole blood to BacT/ALERT MB flasks (Biomérieux, Marcy L'Étoile, France). These samples were incubated for 30 days at 37°C before being considered negative, as recommended by the manufacturer.

**Histopathology and histometry.** Histopathology samples were fixed in 10% buffered formalin, sectioned at 4 µm and stained with haematoxylin-eosin and Masson trichromic, and for acid-fast bacteria following the Ziehl-Neelsen and auramine methods. Von Kossa stain was also used to evaluate the

presence of calcified material in the necrotic tissue [62]. A reticulin silver stain was run to determine the organisation of collagen in the granuloma. Reticulin mainly stains the thin fibrils of type III collagen, although type I collagen can also be stained when organized into thick fibrils assembled in parallel bundles [62]. The small and large axis of each granuloma were recorded from a random sample of Masson trichromic cuts using a DS-Fi1 camera attached to an Eclipse 50i microscope using the NIS-Elements D version 3.0x software package (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). The area of 235 granulomas was obtained using the formula of the area of an oval;  $\pi \cdot a \cdot b$ , where  $a$  = half length of major axis (horizontal) and  $b$  = half length of minor axis (vertical).

**Immunohistochemistry.** For immunohistochemical analysis, 4- $\mu$ m consecutive sections were deparaffinized in xylene and rehydrated with graded alcohol. Heat-induced antigen retrieval was carried out in an autoclave with citrate buffer at pH 6.0. Endogenous peroxidase was blocked with 5% hydrogen peroxide and detection was performed using an UltraVIEW DAB Detection universal Kit in a Benchmark XT device (Roche Diagnostics, Germany). Commercially available anti-human antibodies against CD10 (clone 56C6, 1/20, Novocastra-UK), Ki67 (Clone MIB-1, 1/800, Dako-Denmark), Collagen I (ab6308, 1/500, Abcam-UK), Actin (Clone HHF35, 1/300, Dako-USA), and Alpha Smooth Muscle Actin (Clone  $\alpha$ sm, 1/200, Novocastra-UK) were obtained from the indicated suppliers.

**Semi-thin slices from lung granuloma and BAL.** Lung granulomas were placed in Eppendorf tubes containing the fixation solution 1x (2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M) and kept at 4–8°C for at least 24 h. BAL tubes were centrifuged at 300 g for 10 minutes, then resuspended in 0.5 mL of PBS and 0.5 mL of the fixation solution 2x and kept at 4–8°C for between 2 and 24 h. The BAL samples were again centrifuged at 300 g for 10 minutes, then the supernatant was removed carefully, the fixation solution 1x added slowly and the samples kept at 4–8°C. Granuloma and BAL samples were then post-fixed in osmium tetroxide, dehydrated and embedded in epoxy resin. Semi-thin sections were stained with toluidine blue as described elsewhere [34].

### 3. Evaluation of the immune response

The evolution of the cellular immunological response was monitored by stimulation of PBMCs using different specific stimuli, as well as detection of several cytokines in plasma. The humoral response was also evaluated.

**Immunological responses after stimulation of PBMCs.** Blood was collected using heparinized blood tubes at the time points described above. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from whole blood by density-gradient centrifugation with a Histopaque 1077 (Sigma) and washed. Trypan blue was added to assess their viability.

The abundance of antigen-specific IFN- $\gamma$  secreting cells in the PBMCs was analyzed by an ELISPOT assay using commercial mAbs (Porcine IFN- $\gamma$  P2G10 and biotin P2C11, BD Biosciences Pharmingen) according to a previously reported method [63]. Briefly, Costar 3590 ELISA plates (Corning, New York, USA) were coated overnight with 5  $\mu$ g/ml P2G10 capture antibody diluted in carbonate/bicarbonate buffer. The plates were then washed and blocked for 1 h at 37°C with 150  $\mu$ l PBS containing 1% BSA. After removal of the blocking solution, 5  $\times$  10<sup>5</sup> viable PBMCs were dispensed per well and stimulated with PPD, ESAT-6, Ag 85B, Ag 16 kDa (all at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml) or BCG (5  $\times$  10<sup>5</sup> CFUs/ml).

PPD RT-49 and BCG were obtained from the Statens Serum Institute (SSI, Copenhagen, Denmark). The recombinant *M.*

*tuberculosis* antigens ESAT-6 (Rv3875), Ag 85B (Rv1886c) and Ag 16 kDa (Rv2031c) were purchased from Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH (Braunschweig, Germany).

Unstimulated cells and phytohaemagglutinin (PHA)-stimulated controls (10  $\mu$ g/ml) were also included in both experiments. After 20 h incubation at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, the cells were removed and the biotinylated P2C11 detection antibody was added at 0.5  $\mu$ g/ml and incubated for 1 h at 37°C. The reaction was revealed by sequential incubation of plates with streptavidin-peroxidase and insoluble 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Calbiochem, Nottingham, UK). To calculate the antigen-specific frequencies of IFN- $\gamma$  secreting cells, also known as spot-forming units (SFUs), the number of spots in unstimulated wells was subtracted from those in antigen-stimulated wells. The abundance of antigen-specific IFN- $\gamma$  secreting cells was expressed as number of responding cells from a total of 10<sup>6</sup> PBMC.

To analyze cell-culture supernatants after stimulation of minipig PBMCs with different specific antigens, cells were plated (5  $\times$  10<sup>6</sup> per well) in 48-well plates and mock-stimulated or stimulated with PPD, ESAT-6 (10  $\mu$ l/ml) or PHA. After incubation for 20 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, cell culture supernatants were collected and frozen at –80°C until needed. Capture ELISAs for IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 and IL-12 were performed as mentioned above.

**Serum cytokines.** Cytokine concentration in sera was determined at weeks 0, 2, 5, 9, 10, 12, 13 and 20 using commercial pairs of antibodies (Porcine IFN- $\gamma$ , BD Biosciences Pharmingen; TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 and IL-12; R&D Systems) according to previously reported procedures [63] and the manufacturer's instructions. The cut-off point for each ELISA was calculated as the mean+3SD OD of negative controls. The production of each cytokine was calculated using the linear-regression formula based on the ODs of the cytokine standards provided by the manufacturer and expressed as pg/ml.

**Humoral response.** Costar 3590 ELISA plates (Corning, New York, USA) were coated overnight with 4  $\mu$ g/ml of PPD RT-49 diluted in carbonate/bicarbonate buffer. They were then washed five times with PBS plus 1% Tween 20 and blocked for 45 minutes at 37°C with 150  $\mu$ l PBS plus 0.5% casein. After washing, 1/200 diluted sera in PBS plus 0.5% casein was added and incubated for 1 h at 37°C. The plates were further washed and the conjugate (diluted in PBS with 1% Tween 20) added. The conjugate was prepared with 1/10000 protein A-HRP (Sigma, Madrid, Spain) and 1/5000 protein G-HRP (Bio-Rad Laboratories, El Prat del Llobregat, Spain). The reaction was revealed with soluble TMB (Calbiochem, Nottingham, UK) and stopped 20 minutes later with 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The plates were read at 450 nm using a conventional spectrophotometer. The unspecific response between serum and conjugate was determined for each sample using a control to which PPD RT-49 had not been added. Results were obtained by analyzing the sera in duplicate and subtracting the unspecific response. The cut-off point was calculated as the mean+3SD OD of unspecific responses.

### 4. Statistical analysis

A descriptive study of the qualitative and quantitative variables collected was carried out in order to characterise the study population. Frequency distributions and medians for quantitative variables were calculated. Proportions were compared between groups using the chi-squared and, when pertinent, the two-sided Fisher test. Measures of association were calculated using *odds ratios* (OR) along with their 95% confidence intervals (CI). The factors associated with encapsulation were analysed using logistic

regression (stepwise method) including the variables associated with a p-value of less than 0.15 at the univariate level in the model. A p-value of less than 0.05 was considered significant. The test of Hosmer and Lemeshow was used to check the goodness-of-fit of the models. Analyses were conducted using the SPSS statistical package, version 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## Acknowledgments

Dr. Evelyn Guirado contributed in obtaining the samples. The technicians of the Pathology Department stained the cuts and performed the immunohistochemistry.

## References

- WHO (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009. Geneva, Switzerland.
- Parrish N, Dick J, Bishai W (1998) Mechanisms of latency in Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol* 6: 107–112.
- Sterling TR, Bethel J, Goldberg S, Weinfurter P, Yun L, et al. (2006) The scope and impact of treatment of latent tuberculosis infection in the United States and Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 927–931.
- Bucher HC, Griffith LE, Guyart GH, Sudre P, Naef M, et al. (1999) Isoniazid prophylaxis for tuberculosis in HIV infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Aids* 13: 501–507.
- (2000) Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med* 161: S221–247.
- Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. (2004) Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4: 761–776.
- North RJ, Jung YJ (2004) Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22: 599–623.
- Orme IM (2005) Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 13–17.
- Basaraba RJ (2008) Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis (Edinb)* 88 Suppl 1: S35–47.
- Wallace JG (1961) The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice. *Am Rev Respir Dis* 83: 866–871.
- Munoz-Elias EJ, Timm J, Botha T, Chan WT, Gomez JE, et al. (2005) Replication dynamics of Mycobacterium tuberculosis in chronically infected mice. *Infect Immun* 73: 546–551.
- Cardona PJ, Llatjos R, Gordillo S, Diaz J, Ojanguren I, et al. (2000) Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol* 52: 156–163.
- Cardona PJ, Gordillo S, Diaz J, Tapia G, Amat I, et al. (2003) Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 71: 5845–5854.
- Dhedra K, Booth H, Huggert JF, Johnson MA, Zumla A, et al. (2005) Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 192: 1201–1209.
- Lenaerts AJ, Hoff D, Aly S, Ehlers S, Andries K, et al. (2007) Location of persisting mycobacteria in a guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3338–3345.
- Basaraba R, Smith E, Shanley C, Orme I (2006) Pulmonary lymphatics are primary sites of Mycobacterium tuberculosis infection in guinea pigs infected by aerosol. *Infect Immun* 74: 5397–5401.
- Bezuidenhout J, Schneider J (2009) Pathology and pathogenesis of tuberculosis. In: Zumla SH, ed. *Tuberculosis A comprehensive clinical reference*. Europe: Saunders Elsevier. pp 117–128.
- Davis J, Ramakrishnan L (2009) The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection. *Cell* 136: 37–49.
- Buddle BM, Skinner MA, Wedlock DN, de Lisle GW, Vordermeier HM, et al. (2005) Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 19–24.
- Capuano SV, 3rd, Croix DA, Pawar S, Zinovic A, Myers A, et al. (2003) Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection. *Infect Immun* 71: 5831–5844.
- Canetti G (1955) The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. *Histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis*. New York: Springer Publishing Company, Inc.
- Fraser RS (2005) Histology and gross anatomy of the respiratory tract. In: Hamid Q, Shannon J, Martin J, eds. *Physiologic basis of respiratory disease*. Hamilton: B.C. Decker inc.
- Plopper CG, Harkema JR (2005) The respiratory system and its use in research. *The laboratory primate* 30: 503–526.
- Thoen CO (1994) Tuberculosis in wild and domestic mammals. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington D.C.: American Society for Microbiology. pp 157–162.
- Thoen CO, Steele JH (1995) Mycobacterium bovis infection in animals and humans. Ames: Iowa State University Press.
- Bolin CA, Whipple DL, Khanna KV, Risdahl JM, Peterson PK, et al. (1997) Infection of swine with Mycobacterium bovis as a model of human tuberculosis. *J Infect Dis* 176: 1559–1566.
- Lurie M, Abramson S, Heppleston A (1952) On the response of genetically resistant and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human type tubercle bacilli and the nature of resistance to tuberculosis. *J Exp Med* 95: 119–134.
- McMurray DN (2003) Hematogenous reseeding of the lung in low-dose, aerosol-infected guinea pigs: unique features of the host-pathogen interface in secondary tubercles. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 131–134.
- Ulrichs T, Kaufmann S (2006) New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 208: 261–269.
- Opie EL, Aronson JD (1927) Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions and in lung tissue without tuberculous lesions. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 4: 1.
- Wright AE, Reid S (1906) On the possibility of determining the presence or absence of tubercular infection by the examination of a patient's blood and tissue fluids. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character: Royal Society*. pp 194–211.
- Pottenger FM (1934) *Tuberculosis in the child and the adult*. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 611 p.
- Cardona P (2009) A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* 37: 80–86.
- Cáceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, et al. (2009) Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 175–182.
- Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, et al. (2008) Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. *PLoS Pathog* 4: e1000204.
- Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F (2009) Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 10: 943–948.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, et al. (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170: 1807–1816.
- Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Vale BS, et al. (1999) Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with Schistosoma mansoni: dependence on fiber radiation centers. *Braz J Med Biol Res* 32: 639–643.
- Mullarky IK, Szaba FM, Berggren KN, Kummer LW, Wilhelm LB, et al. (2006) Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not hemorrhage or pathogen burden, dictate levels of protective fibrin deposition during infection. *Infect Immun* 74: 1181–1188.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, et al. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890–898.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109: 41–50.
- D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, et al. (2008) Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol* 10: 2589–2604.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OG ID CV LC MD PJC. Performed the experiments: OG ID CV GT JD MF NC SP LC MD PJC. Analyzed the data: OG ID CV GT NC JC LC MD PJC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ID GT JD MF SP JC MD PJC. Wrote the paper: OG ID CV NC PJC. All authors listed contributed to conception and design, or acquisition of data or analysis and interpretation of data; to drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and gave the final approval of the version to be published.

43. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B (2007) Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 179: 1311–1323.
44. Fujita J, Ohtsuki Y, Suemitsu I, Yamadori I, Shigeto E, et al. (2002) Immunohistochemical distribution of epithelioid cell, myofibroblast, and transforming growth factor-beta1 in the granuloma caused by *Mycobacterium avium* intracellular complex pulmonary infection. *Microbiol Immunol* 46: 67–74.
45. Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, et al. (2008) Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1229–1237.
46. Torday JS, Rehan VK (2007) The evolutionary continuum from lung development to homeostasis and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L608–611.
47. Nishikawa K, Arai H, Inoue K (1990) Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 265: 5226–5231.
48. Nishikawa K, Sato Y, Arai H, Inoue K (1993) Mobilization of acyl chains from endogenous cellular phospholipids into cholesteryl esters during foam-cell formation in mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1169: 257–263.
49. Huitema LF, Vaandrager AB (2007) What triggers cell-mediated mineralization? *Front Biosci* 12: 2631–2645.
50. Hsu HH, Abbo BG (2004) Role of bicarbonate/CO<sub>2</sub> buffer in the initiation of vesicle-mediated calcification: mechanisms of aortic calcification related to atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1690: 118–123.
51. Cardona P, Julián E, Vallès X, Gordillo S, Muñoz M, et al. (2002) Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. *Scand J Immunol* 55: 639–645.
52. Cardona P, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, et al. (2005) Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* 23: 1393–1398.
53. Guirado E, Amat I, Gil O, Díaz J, Arcos V, et al. (2006) Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. *Microbes Infect* 8: 1252–1259.
54. Ferebee SH (1970) Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. *Bibl Tuberc* 26: 28–106.
55. Andersen P (1997) Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 45: 115–131.
56. Grosset J (2003) *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 833–836.
57. Jindani A, Doré C, Mitchison D (2003) Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1348–1354.
58. Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, et al. (2008) Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1229–1237.
59. Domingo M, Gil O, Serrano E, Guirado E, Nofrarias M, et al. (2009) Effectiveness and safety of a treatment regimen based on isoniazid plus vaccination with *Mycobacterium tuberculosis* cells' fragments: field-study with naturally *Mycobacterium caprae*-infected goats. *Scand J Immunol* 69: 500–507.
60. Corner LA, Costello E, Lesellier S, O'Meara D, Sleeman DP, et al. (2007) Experimental tuberculosis in the European badger (*Meles meles*) after endobronchial inoculation of *Mycobacterium bovis*: I. Pathology and bacteriology. *Res Vet Sci* 83: 53–62.
61. Krasnow I, Wayne LG (1966) Sputum digestion. I. The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Tech Bull Regist Med Technol* 36: 34–37.
62. Kiernan JA (2008) *Histological and histochemical methods: theory and practice*. Bloxham: Scion. xvi, 606 p.
63. Diaz I, Mateu E (2005) Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-gamma, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 106: 107–112.