



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

**Funcionalitat dels micobacteris ambientals de
creixement ràpid com a agents antitumorals**

Silvia P. Secanella Fandos

2012



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

Funcionalitat dels micobacteris ambientals de creixement ràpid com a agents antitumorals

Memòria de tesi presentada per obtenir el grau de Doctora en Microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona, per Silvia P. Secanella Fandos.

Vist i plau de les Directores de la Tesi,

Dra. Esther Julián Gómez

Dra. Marina Luquin Fernández

Bellaterra, Setembre de 2012

Al Lluís i al Quim

ÍNDIX

ÍNDIX	1
ÍNDIX DE TAULES	7
ÍNDIX DE FIGURES	9
ACRÒNIMS	13
PRESENTACIÓ	17
PRESENTATION	18
A. INTRODUCCIÓ	21
A.1. EL CÀNCER DE BUFETA	21
A.1.1. La bufeta urinària.....	21
A.1.2. Classificació del càncer de bufeta.....	22
A.1.3. Factors de risc del càncer de bufeta	24
A.1.4. Epidemiologia del càncer de bufeta	25
A.1.5. Simptomatologia del càncer de bufeta	26
A.1.6. Diagnòstic del càncer de bufeta.....	26
A.1.7. Tractament del càncer de bufeta superficial	28
A.1.7.1. Agents quimioteràpics.....	31
A.1.7.2. Agents immunoteràpics	33
A.2. ELS MICOBACTERIS.....	36
A.2.1. Característiques del gènere <i>Mycobacterium</i>	36
A.2.1.1. Els micobacteris ambientals	37
A.2.1.2. La paret cel·lular dels micobacteris.....	37
A.2.2. Propietats immunoestimuladores dels micobacteris	42
A.2.2.1. Efecte antitumoral dels micobacteris.....	44
A.2.3. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	45
A.2.3.1. Història del BCG.....	45
A.2.3.1.1. Les soques filles de BCG	46
A.2.3.2. Mecanisme d'acció del BCG com a immunoteràpic en el tractament del càncer de bufeta	48
A.2.3.2.1. Cèl·lules participants en la resposta immunitària induïda pel BCG.....	50
Cèl·lules presentadores d'antígens.....	50
A.2.3.2.2. Citocines i quimiocines involucrades en la resposta antitumoral	53
A.2.3.2.3. Funció dels receptors Toll-like en la resposta immunitària induïda pel BCG.....	55
A.2.3.3. Inducció de la mort cel·lular per part de BCG	57
A.2.3.3.1. El cicle cel·lular.....	57
A.2.3.3.2. La necrosi.....	58

A.2.3.3.3. L'apoptosi	58
B. OBJECTIUS	63
C. MATERIAL I MÈTODES	67
C.1. OBTENCIÓ I CULTIU DELS MICROORGANISMES.....	67
C.1.1. Soques bacterianes.....	67
C.1.2. Medis de cultiu	69
C.1.3. Manteniment de les soques bacterianes	70
C.2. ANÀLISI DELS LÍPIDS I GLICOLÍPIDS DELS MICROBACTERIS.....	71
C.2.1. Extracció i anàlisi de lípids, glicolípids i fosfolípids lliures	71
C.2.2. Extracció i anàlisi de MK i PDIM	72
C.2.3. Extracció i anàlisi d'àcids micòlics.....	73
C.2.3.1. Ressonància magnètica nuclear (RMN)	75
C.3. OBTENCIÓ I CULTIU DE LES CÈL·LULES EUCARIOTES	77
C.3.1. Cèl·lules humanes.....	77
C.3.1.1. Línies cel·lulars de càncer de bufeta.....	77
C.3.1.2. Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC)	78
C.3.2. Cèl·lules de ratolí	79
C.3.2.1. Línia cel·lular de macròfags	79
C.3.2.2. Línia cel·lular de càncer de bufeta.....	80
C.3.2.3. Macròfags derivats de medul·la òssia (BMM)	80
C.3.2.3.1 Línia cel·lular de fibroblasts L929	81
C.3.3. Manteniment de les cèl·lules eucariotes.....	81
C.3.3.1. Congelació cel·lular	81
C.3.3.2. Descongelació cel·lular	82
C.3.3.3. Recol·lecció de les cèl·lules i passes cel·lulars	82
C.4. TÈCNiques DE CULTIU	83
C.4.1. Suspensions bacterianes.....	83
C.4.1.1. Preparació de les suspensions bacterianes.....	83
C.4.1.2. Tractament de les suspensions bacterianes.....	85
C.4.1.2.1. Tractament de calor	85
C.4.1.2.2. Tractament de radiació.....	85
C.4.2. Infecció cel·lular amb les suspensions bacterianes	86
C.4.3. Determinació de la viabilitat cel·lular	87
C.4.3.1. Recompte cel·lular	87
C.4.3.2. Assaig de proliferació cel·lular	88
C.4.4. Recol·lecció del sobrenedant dels cultius cel·lulars.....	88

C.4.5. Detecció de la producció d'òxid nítric en el sobrenedant dels cultius cel·lulars	89
C.4.6. Determinació de citocines i quimiocines en el sobrenedant dels cultius cel·lulars..	89
C.4.7. Assaig de la viabilitat bacteriana als cultius cel·lulars.....	93
C.5. ESTUDI DE L'EFECTE ANTITUMORAL DIRECTE DELS MICOBACTERIS.....	94
C.5.1. Supervivència dels micobacteris dins de les cèl·lules tumorals	94
C.5.2. Activitat antitumoral directa dels micobacteris vius	94
C.5.3. Comparació de l'activitat antitumoral directa dels micobacteris vius i tractats	95
C.5.4. Efecte sinèrgic dels micobacteris amb la MMC	95
C.6. ESTUDI DEL MECANISME DE LA INHIBICIÓ CEL·LULAR	96
C.6.1. Efecte antitumoral directe de les citocines	96
C.6.2. Capacitat dels micobacteris d'induir l'apoptosi en les cèl·lules tumorals.....	96
C.6.2.1. Anàlisi de l'alteració de la membrana cel·lular.....	98
C.6.2.2. Anàlisi del DNA cromosòmic.....	99
C.6.2.3. Detecció de la caspasa 3.....	101
C.6.3. Cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals tractades amb els micobacteris.....	102
C.7. ESTUDI DE L'EFECTE ANTITUMORAL INDIRECTE DELS BACTERIS	104
C.7.1. Cèl·lules de sang perifèrica humanes (PBMC).....	104
C.7.1.1. Activació de les PBMC per part dels micobacteris.....	104
C.7.1.2. Citotoxicitat de les PBMC activades front les cèl·lules tumorals humanes	104
C.7.2. Línia cel·lular de macròfags de ratolí J774.....	106
C.7.2.1. Supervivència dels micobacteris dins dels macròfags	106
C.7.2.2. Activació dels macròfags	106
C.7.2.2.1. Detecció i anàlisi de marcadors de superfície d'activació en macròfag	106
C.7.2.2.2. Detecció de la producció de citocines pels macròfags activats	108
C.7.3. Macròfags derivats de medul·la òssia de ratolí (BMM)	108
C.7.3.1. Efecte directe dels micobacteris en les cèl·lules tumorals de ratolí	108
C.7.3.2. Activació dels BMM per part dels micobacteris.....	109
C.7.3.3. Citotoxicitat dels BMM activats front les cèl·lules tumorals de ratolí.....	110
C.8. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	111
D. RESULTATS.....	115
D.1. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTITUMORAL DE DIFERENTS SOQUES DE <i>M. BOVIS</i> BCG	115
D.1.1. Caracterització fenotípica. Perfil lipídic i glicolipídic.....	115
D.1.2. Capacitat d'inhibir la proliferació de les cèl·lules tumorals	118
D.1.3. Capacitat d'induir la producció de citocines i NO en les cèl·lules tumorals.....	121
D.1.4. Supervivència de les soques de BCG dins les cèl·lules tumorals	122

D.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTITUMORAL DE DIFERENTS MICOBACTERIS AMBIENTALS	124
D.2.1. Caracterització fenotípica. Perfil lipídic i glicolipídic	124
D.2.1.1. Anàlisi del patró d'àcids micòlics de <i>M. confluentis</i>	127
D.2.1.1.1. Anàlisi per CCF i CCF-2D	127
D.2.1.1.2. Anàlisi per RMN	131
D.2.2. Estudi de l'activitat antitumoral directa	132
D.2.2.1. Estudi amb micobacteris ambientals vius	132
D.2.2.1.1. Inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals	132
D.2.2.1.2. Inducció de la producció de citocines i NO en les cèl·lules tumorals	135
D.2.2.2. Supervivència dels micobacteris dins les cèl·lules tumorals	138
D.2.2.3. Comparació de l'activitat antitumoral directa dels micobacteris vius i morts	139
D.2.2.3.1. Viabilitat dels micobacteris sotmesos als diferents tractaments	139
D.2.2.3.2. Capacitat antiproliferativa dels micobacteris, tractats amb calor i radiació, en les cèl·lules tumorals	140
D.2.2.3.3. Inducció de la producció de citocines i NO en les cèl·lules tumorals pels micobacteris morts	142
D.2.2.4. Efecte sinèrgic dels micobacteris amb la mitomicina C	145
D.2.2.4.1. Inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals	145
D.2.2.4.2. Inducció de la producció de citocines en les cèl·lules tumorals	148
D.2.2.5. Mecanisme de la inhibició de la proliferació	151
D.2.2.5.1. Efecte directe de les citocines en la proliferació de les cèl·lules tumorals	151
D.2.2.5.2. Capacitat dels micobacteris d'induir l'apoptosi en les cèl·lules tumorals	152
D.2.2.5.3. Arrest del cicle cel·lular	156
D.2.3. Estudi de l'activitat antitumoral indirecta	159
D.2.3.1. Estudi amb PBMC d'humans	159
D.2.3.1.1. Capacitat d'activació de les PBMC. Inducció de la producció de citocines per part dels micobacteris	159
D.2.3.1.2. Citotoxicitat de les PBMC, activades amb els micobacteris, front les cèl·lules tumorals	162
D.2.3.2. Estudi amb macròfags de ratolí J774	165
D.2.3.2.1. Supervivència dels micobacteris dins del macròfag	165
D.2.3.2.2. Capacitat d'activació del macròfag pels micobacteris	167
D.2.3.3. Estudi amb macròfags derivats de medul·la òssia (BMM) de ratolins. Implicació dels receptors Toll-like en l'activació (model animal)	175
D.2.3.3.1. Capacitat d'activació dels BMM. Inducció de la producció de citocines per part dels micobacteris	175
D.2.3.3.2. Inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals de bufeta de ratolí	176
D.2.3.3.3. Citotoxicitat dels BMM, activats pels micobacteris, front les cèl·lules tumorals de ratolí	178
DISCUSSIÓ	183
CONCLUSIONS	197
CONCLUSIONS	199
PERSPECTIVES DE FUTUR	203

BIBLIOGRAFIA	207
ANNEX	241
AGRAÏMENTS	273

ÍNDEX DE TAULES

Taula C.1. Característiques dels diferents microorganismes utilitzats.....	68
Taula C.2. Nombre de cfu/ml en una suspensió bacteriana corresponent a una terbolesa de McFarland 1.....	84
Taula C.3. Sumari dels tests de citocines i quimiocines utilitzats en aquest treball.....	90
Taula C.4. Sumari dels anticossos utilitzats per a la detecció dels receptors de superfície cel·lular.....	108
Taula D.1. Valors Rf dels diferents àcids micòlics de les CCF analitzades.....	130
Taula D.2. Valors de viabilitat, expressats en cfu/ml, dels diferents bacteris tractats.....	139
Taula D.3. Producció d'IL-6 i IL-8 en les línies tumorals infectades amb els micobacteris (vius i morts) sols o en combinació amb la MMC, a les 48 hores post-infecció.....	149
Taula D.4. Nombre de cèl·lules T24 apoptòtiques primerenques després de ser incubades amb diferents concentracions de STP i CMP durant 15 o 24 hores.....	153
Taula D.5. Producció d'IL-10, IL-12, TNF- α , IL-6, KC, RANTES i IP-10 en BMM de ratolins C57BL/6 WT sense infectar i infectats amb els diferents micobacteris.....	175
Taula D.6. Producció d'IL-10, IL-12 i TNF- α (pg/ml) en BMM de ratolins C57BL/6 WT i deficients pel TLR2, sense estimular (control), i estimulats amb els diferents micobacteris i l'agonista del receptor deficiet.....	176

ÍNDEX DE FIGURES

Figura A.1. Representació esquemàtica de la bufeta i dels diferents estadis del càncer de bufeta.....	21
Figura A.2. Esquema del tractament del càncer de bufeta superficial segons els risc de recurrència i progressió associat.....	30
Figura A.3. Paret cel·lular del gènere <i>Mycobacterium</i>	38
Figura A.4. Estructures químiques dels diferents tipus d'àcids micòlics.....	39
Figura A.5. Esquema genealògic de l'evolució genètica de les diferents soques de BCG.....	48
Figura A.6. Mecanisme d'acció del BCG en la resposta antitumoral front el càncer de bufeta ..	50
Figura A.7. Esquema representatiu de la senyalització a través dels TLR.....	56
Figura C.1. Separació cel·lular d'una mostra de sang amb Ficoll després de ser centrifugada.	79
Figura C.2. Quadrícula de la cambra de Neubauer que es visualitza al microscopi. S'indiquen les dimensions i els quadrants on es realitza el recompte cel·lular (&).....	87
Figura D.1. Genealogia i característiques fenotípiques de les diferents soques de BCG. L'any d'obtenció de cada soca s'ha inclòs com a referència. La dimensió horitzontal no està a la mateixa escala que les diferències genètiques.....	115
Figura D.2. CCF dels àcids micòlics de les soques de BCG	116
Figura D.3. CCF-2D del PDIM de l'extracte cru de les soques de BCG.....	117
Figura D.4. CCF del PGL de l'extracte cru de les soques de BCG.....	117
Figura D.5. CCF del DMT i del MMT (A), dels PIM (B), i dels FL (C) de l'extracte cru de les soques de BCG	118
Figura D.6. Inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals per BCG o <i>E. coli</i> a diferents temps post-infecció (A, B i C) i a diferents MOI (a, b i c).....	120
Figura D.7. Efecte de les diferents soques de BCG i de <i>E. coli</i> (MOI 12,5:1) en el creixement de les cèl·lules tumorals després de 72 hores en les línies T24 i RT4, i de 120 hores en la J82	121
Figura D.8. Producció d'IL-6 i IL-8 per les cèl·lules de càncer de bufeta estimulades amb les diferents soques de BCG i <i>E. coli</i> (MOI 12,5:1) i sense estimular (control), durant 72 hores en les línies T24 i RT4, i 120 hores en la J82	122
Figura D.9. Viabilitat de les soques de BCG dins la línia tumoral T24 a les 3 i 72 hores després de la infecció (MOI 10:1).....	123
Figura D.10. CCF-2D del PDIM de l'extracte dels micobacteris.....	124
Figura D.11. CCF del PGL de l'extracte cru dels micobacteris	125
Figura D.12. CCF dels PIM (A) i dels FL (B) de l'extracte cru dels micobacteris.....	126
Figura D.13. CCF dels àcids micòlics dels micobacteris	127
Figura D.14. CCF dels àcids micòlics dels micobacteris obtinguts per metanòlisi alcalina o àcida	128
Figura D.15. CCF-2D dels àcids micòlics dels micobacteris obtinguts per metanòlisi alcalina o àcida	129
Figura D.16. CCF dels àcids micòlics dels micobacteris obtinguts per metanòlisi alcalina	130

Figura D.17. Espectre ¹ H NMR dels metil ésters purificats.....	132
Figura D.18. Inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals pels diferents micobacteris o <i>E. coli</i> a diferents MOI (A, B i C) i a diferents temps post-infecció (a, b i c)	134
Figura D.19. Efecte dels diferents micobacteris i d' <i>E. coli</i> (MOI 12,5:1) en la proliferació tumoral després de 72 hores en les línies T24 i RT4, i de 120 hores en la J82.....	135
Figura D.20. Producció d'IL-8 per la línia tumoral J82 estimulada amb els diferents micobacteris i <i>E. coli</i> (MOI 12,5:1) i sense estimular (control), durant diferents temps post-infecció (24, 72 i 120 hores).....	136
Figura D.21. Producció d'IL-8 (A) i IL-6 (B) per les cèl·lules de càncer de bufeta estimulades amb els diferents micobacteris i <i>E. coli</i> (MOI 12,5:1) i sense estimular (control), a les 72 hores en les línies T24 i RT4, i a les 120 hores en la J82	137
Figura D.22. Viabilitat dels bacteris dins de les cèl·lules T24 a les 3, 24, 48 i 72 hores d'infecció del cultiu (MOI 12,5:1).....	138
Figura D.23. Efecte dels bacteris vius i tractats en el creixement de les cèl·lules tumorals després de 72 hores en les línies T24 (A) i RT4 (C), i de 120 hores en la J82 (B).....	141
Figura D.24. Efecte dels bacteris vius i tractats en el creixement de la línia tumoral J82 després de 120 hores	142
Figura D.25. Producció d'IL-8 (A, C i E) i IL-6 (B i D) per les cèl·lules tumorals T24 (A i B), J82 (C i D) i RT4 (E), estimulades amb els bacteris vius i tractats (MOI 10:1) i sense estimular (control), durant 72 hores en les línies T24 i RT4, i 120 hores en la J82	144
Figura D.26. Efecte de la MMC a diferents concentracions, sola i en combinació amb BCG, en el creixement de les tres línies tumorals: T24 (A), J82 (B) i RT4 (C), després de 48 hores de cultiu.....	146
Figura D.27. Efecte sinèrgic (en percentatge) dels diferents micobacteris junt amb MMC en el creixement de les tres línies tumorals, T24 (A), J82 (B) i RT4 (C), comparat amb les cèl·lules tractades amb MMC.....	147
Figura D.28. Efecte de les citocines IL-6 i IL-8 en la viabilitat de la línia tumoral T24 després de 48 hores de cultiu	152
Figura D.29. Anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules T24 doblement tenyides amb Anx i IP	154
Figura D.30. Fragmentació del DNA genòmic de les cèl·lules T24.....	155
Figura D.31. Detecció de la caspasa 3 activa en la línia tumoral T24 després de 48 hores de cultiu amb els diferents	156
Figura D.32. Anàlisi del cycle cel·lular de les cèl·lules T24 sense tractar (A) i estimulades amb STP (B), després de 48 hores de cultiu i tenyides amb IP	156
Figura D.33. Anàlisi per citometria de flux del cycle cel·lular de la línia tumoral T24, infectada amb els micobacteris (MOI 10:1), a les 24, 48 i 72 hores de cultiu.....	158
Figura D.34. Anàlisi per citometria de flux del cycle cel·lular de la línia tumoral T24, infectada amb els micobacteris (MOI 10:1), a les 48 hores de cultiu.....	159
Figura D.35. Producció d'IL-10 (A), IL-12 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D), IL-8 (E), i IL-6 (F), per les PBMC estimulades amb els diferents micobacteris i sense estimular (control).....	161
Figura D.36. Activitat citotòxica induïda per les PBMC activades front la línia tumoral T24, a una proporció de 20:1 (PBMC : T24) (A), i pels factors solubles presents al sobrenedant de les PBMC activades front la línia tumoral T24 (B), després de 48 hores de cultiu.....	163

Figura D.37. Producció d'IL-8 (A i B) i IL-6 (C i D) per la línia tumoral T24 (T24), co-cultivada amb les PBMC sense estimular (control) o estimulades amb els diferents micobacteris 165	
Figura D.38. Viabilitat de BCG dins de la línia de macròfags de ratolí J774 a les 3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores d'infecció del cultiu	166
Figura D.39. Viabilitat dels bacteris dins de la línia de macròfags de ratolí J774 a les 3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores d'infecció del cultiu (MOI 10:1)	166
Figura D.40. Activació del marcador de superfície CD86 en els macròfags J774, tractats o no amb el bloquejador FcBlock, i sense estimular o estimulats amb 1 i 10 µg/ml d'LPS durant 24 hores de cultiu	167
Figura D.41. Distribució dels macròfags J774, tenyits amb l'anticòs anti-CD80, a les 24 hores de cultiu.....	169
Figura D.42. Activació del marcador de superfície CD86 en els macròfags estimulats amb LPS (10 µg/ml) (A), infectats amb <i>M. spp.</i> (B) i <i>M. gastris</i> (C).....	170
Figura D.43. Activació dels marcadors de superfície: CD80 (A), CD86 (B) i CD40 (C), dels macròfags J774.....	172
Figura D.44. Producció de NO pels macròfags J774 sense estimular o infectats amb BCG o <i>M. spp.</i> (MOI 10:1), a les 3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores de cultiu	173
Figura D.45. Producció d'IL-6 (A), IL-12 (B) i NO (C), pels macròfags J774	174
Figura D.46. Inhibició del creixement de la línia tumoral MB49 pels micobacteris a diferents temps post-infecció (MOI 10:1)	177
Figura D.47. Producció d'IL6 (A) i KC (B) per la línia tumoral MB49 estimulada amb els diferents micobacteris (MOI 10:1) i sense estimular (control) a diferents temps post-infecció	178
Figura D.48. Activitat citotòxica induïda pels BMM activats front la línia tumoral MB49, a una proporció de 20:1 (BMM : MB49), després de 24 hores de cultiu (A). Activitat citotòxica induïda pels factors solubles presents al sobrenedant dels BMM activats front la línia tumoral MB49, després de 48 hores de cultiu (B).....	180

ACRÒNIMS

AECC	Associació Espanyola Contra el Càncer
AJCC	Comitè sobre el Càncer dels Estats Units (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
ALP	fosfatasa alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
Anx	anexina-V-fluoresceïna
ATCC	col·lecció americana de cultius tipus (<i>American Type Culture Collection</i>)
BAK	cèl·lula assassina activada per BCG (<i>BCG-Activated Killer</i>)
BCG	bacil de Calmette i Guèrin
BD	Becton & Dickinson
BMM	macròfags derivats de medul·la òssia (<i>Bone Marrow derived Macrophages</i>)
BSA	albúmina sèrica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	grup de diferenciació (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CDCl ₃	cloroform deuterat
CECT	col·lecció espanyola de cultius tipus
CIS	carcinoma <i>in situ</i>
CCF	cromatografia en capa fina unidimensional
CCF-2D	cromatografia en capa fina bidimensional
CFU	unitats formadores de colònies (<i>Colony Forming Units</i>)
CMP	camptothecin
¹³ C RMN	ressonància magnètica nuclear de carboni 13
CO ₂	diòxid de carboni
CpG	citosina unida a guanina mitjançant un enllaç fosfat
DAT	diaciltrealosa
DC	cèl·lula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	dimetil sulfòxid
DMT	dimicolat de trealosa
DNA	àcid desoxiribonucleic (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNAsa	desoxiribonucleasa
DSMZ	col·lecció alemanya de microorganismes i cultius cel·lulars (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	enzim immunoassaig (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FBS	sèrum boví fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FL	fosfolípid
GPL	glicopeptidolípid
¹ H RMN	ressonància magnètica nuclear de protó

HRP	peroxidasa de rave (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
HEPES	àcid 4-(2-hidroxiètil)piperazina-1-età sulfònic
Hz	hertz
IL	interleucina
IFN	interferó
IP	iodur de propidi
kGy	kilogray
LM	lipomanà
LAK	cèl·lula assassina activada per limfocines (<i>Lymphokine-Activated Killer</i>)
LAM	lipoarabinomanà
LB	Luria Bertoni
mAG	micoloil-arabinogalactà
M-CSF	factor estimulant de colònies de macròfags (<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
MMT	monomicolat de trealosa
MHC	complex major d'histocompatibilitat (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MK	menaquinones (<i>MenaKinones</i>)
MHC	complex major d'histocompatibilitat (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MHz	megahertz
MPT	proteïna antigènica. MPT prové <i>M. tuberculosis</i> , i el nombre que segueix indica la mobilitat relativa durant l'electroforesi en gel de poliàcrilamida no desnaturalitzant.
MOI	multiplicitat d'infecció (<i>Multiplicity Of Infection</i>)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	factor nuclear (<i>Nuclear Factor-κB</i>)
NK	cèl·lula assassina (<i>Natural Killer</i>)
NO	òxid nítric (<i>Nitric Oxide</i>)
NO ₂	nitrit
OADC	Oleic-Albumina-Dextrosa-Catalasa
OMS	Organització Mundial de la Salut
pb	parell de bases
PBMC	cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	tampó fosfat salí (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDIM	dimicocerosat de tiocèrol (<i>Phthiocerol DIMycocerosates</i>)
PE	ficoeritrina
PGL	glicolípids fenòlics (<i>Phenolic Glyco-Lipids</i>)
PIM	fosfatidil inositol manòsid
PMN	polimorfonuclear
PPD	derivat proteic purificat (<i>Purified Protein Derivative</i>)

ppm	parts per milió
OD	densitat òptica (<i>Optical Density</i>)
RANTES	quimiocina (<i>Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted</i>)
RD	regió de diferència
RPMI 1640	medi de cultiu <i>Royal Park Memorial Institute 1640</i>
RTICC	Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer
SD	desviació estàndard (<i>Standard Deviation</i>)
SDS	dodecilsulfat sòdic (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SL	sulfolípid
STP	staurosporine
T ^a	temperatura
TAE	tampó Tris-Acètic-EDTA
TAT	triaciltrealosa
TLR	receptor toll-like (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF- α	factor de necrosi tumoral-alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>)
Tris	tris (hidroximetil) aminometà
TRAIL	l·ligand inductor d'apoptosi relacionat al TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TSA	agar de triptona de soja (<i>Tryptic Soy Agar</i>)
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UICC	Unió Internacional Contra el Càncer
UV	ultraviolat
vs	<i>versus</i>
WT	soca salvatge (<i>Wild Type</i>)

PRESENTACIÓ

El càncer de bufeta és la patologia maligna més comuna del tracte urinari. Aproximadament, el 75-85% dels pacients amb càncer de bufeta presenten malaltia confinada a la mucosa o submucosa quan es diagnostiquen. Després de la resecció transuretral (RTU) del tumor d'aquests pacients, existeix un 30-80% de casos de recurrències i un 1-45% de casos en que el tumor progressa a estadis més agressius. Els pacients, aleshores, requereixen d'un tractament amb *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette i Guérin (BCG) per prevenir les recurrències i la progressió del tumor, a més d'un seguiment continu al llarg de la seva vida. Aquesta teràpia intravesical amb BCG viu, s'utilitza des de fa 36 anys.

D'una banda, actualment s'estan utilitzant diferents soques de BCG, les quals varien en el seu contingut antigènic. El BCG també s'utilitza com a vacuna front la tuberculosi, i també s'administren diferents soques del bacil. En aquest context de la tuberculosi, les diferències antigèniques s'han relacionat amb respostes immunitàries diferents.

D'una altra banda, tot i els beneficis de la immunoteràpia amb BCG en pacients amb càncer de bufeta superficial, aquest tractament té les seves limitacions i ocasiona alguns problemes que comprometen el seu ús. Un elevat nombre de pacients presenta problemes de toxicitat associats encara que no severos. Aquests problemes poden ser més greus presentant-se, inclús, casos de sèpsia per BCG. Degut a tots aquests inconvenients és necessari trobar nous agents, més eficaços i segurs que BCG viu, en la immunoteràpia antitumoral.

Finalment, el mecanisme d'acció del BCG com a agent antitumoral es desconeix amb exactitud avui en dia. No obstant, es coneix que els micobacteris són una font de molècules moduladores del sistema immune humà, i s'ha descrit que alguns d'aquests antigens són reconeguts per receptors Toll-like (TLR), i que aquests estan directament involucrats en la inducció de la immunitat antitumoral.

En la primera part d'aquest treball s'ha centrat l'interès en comparar l'activitat antitumoral directa de diferents soques de BCG en cèl·lules tumorals de bufeta (objectiu 1), per tal de relacionar els diferents antigens lipídics i glicolipídics presents en la paret cel·lular de cada soca de BCG amb la seva capacitat citotòxica.

En la segona part d'aquest treball l'interès s'ha focalitzat en la possibilitat de trobar un micobacteri ambiental no patògen capaç d'induir una resposta antitumoral directa, similar o millor a la que indueix BCG, front les línies tumorals de bufeta, i també d'activar una resposta immune, clau per l'activitat antitumoral indirecta (objectius 2 i 3). A més, s'ha estudiat el mecanisme mitjançant el qual exerceix l'activitat antitumoral directa, i la implicació dels TLR.

PRESENTATION

Bladder cancer is the most common malignant disease of the urinary tract. Approximately, 75-85% of patients with bladder cancer have disease confined to the mucosa and submucosa when it is diagnosed. After transurethral resection (TUR) of the tumor in these patients, there is between 30 and 80% of cases of recurrence and between 1 and 45% of cases of tumor progression to more aggressive stages. Then, patients require a treatment with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette and Guerin (BCG) to prevent tumor recurrence and progression, as well as a continuous monitoring throughout their lives. This intravesical therapy using live BCG has been used for 36 years.

On the one hand, different BCG substrains are being used around the world. These substrains vary in their antigenic content. In the context of tuberculosis, in which BCG is used as a vaccine, antigenic differences among BCG substrains have been related to different immune responses in vaccinated individuals.

On the other hand, despite the benefits of BCG immunotherapy in patients with superficial bladder cancer, this treatment has limitations and causes some problems that compromise their use. A high number of patients present non-severed associated toxicity problems, although more serious problems could appear, including even cases of BCG sepsis. Because of these drawbacks it is necessary to find new tumor immunotherapy agents, more efficient and safer than live BCG.

Finally, until now, the precise mechanisms by means of BCG acts as anticancer agent are unknown. However, it is widely recognized that mycobacteria are a source of modulating molecules of the human immune system, and some of these antigens are recognized by Toll-like receptors (TLR), which are directly involved in the antitumor immunity.

The first part of this work, the interest has been focused on the comparison of the direct antitumor activity of different BCG substrains in bladder cancer cells (objective 1), in order to correlate the different cell wall lipidic and glycolipidic profile of each BCG substrain with their cytotoxic ability.

In the second part of the work, interest has been focused on the possibility of find a non-pathogenic environmental mycobacteria which posses antitumoral capacity. That is, it can induce a direct cytotoxicity against bladder cancer lines similar or better than the current treatment (BCG), and activate an immune response crucial for an indirect antitumor activity (objectives 2 and 3). In addition, the mechanism by which it exerts direct antitumor activity and the role of TLR have been studied.

A. INTRODUCCIÓ

A. INTRODUCCIÓ

A.1. El càncer de bufeta

A.1.1. La bufeta urinària

La bufeta és un òrgan buit, situat a la pelvis, encarregat d'emmagatzemar l'orina que arriba filtrada dels ronyons a través dels urèters, i expulsar-la per la uretra.

La seva paret està formada per diferents capes (**Fig. A.1**):

- **capa serosa:** situada a la part externa, recobrint l'exterior de la bufeta. Està formada per greix, teixit fibrós i vasos sanguinis.
- **capa muscular:** formada per múscul llis, el múscul detrusor, el qual quan es contrau expulsa l'orina a la uretra. Està formada per tres capes musculars diferents:
 - capa externa o superficial: formada per fibres musculars longitudinals.
 - capa mitja: formada per fibres musculars circulars.
 - capa interna o profunda: formada per fibres longitudinals.
- **capa mucosa:** situada a la part interna i formada per:
 - Làmina pròpia: teixit conjuntiu.
 - Epiteli de transició urinari (uroteli): epiteli estratificat de fins a vuit capes cel·lulars, impermeable, que es troba en contacte amb l'orina, i que té la capacitat d'expandir-se quan la bufeta s'omple d'orina i d'encongir-se quan es buida.

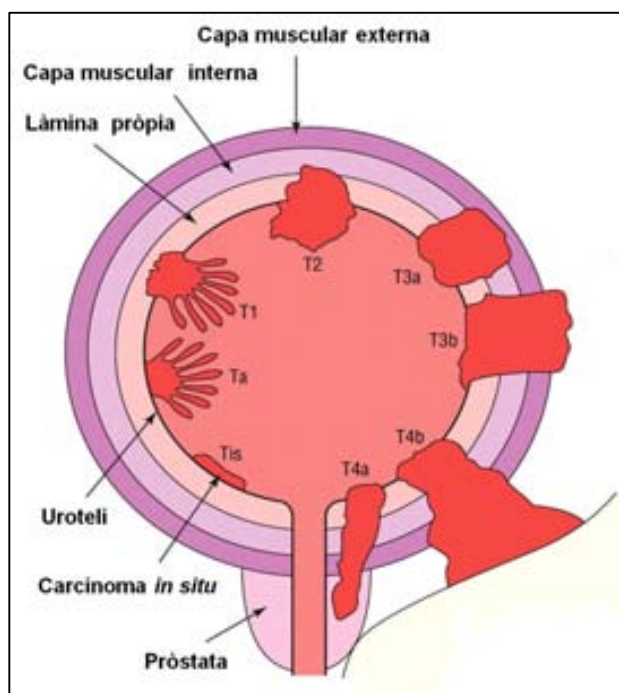


Figura A.1. Representació esquemàtica de la bufeta i dels diferents estadis del càncer de bufeta
Imatge adaptada de Nolan, 2012.

A.1.2. Classificació del càncer de bufeta

Segons el tipus cel·lular afectat, es poden descriure tres tipus de càncer de bufeta (Mostofi, 1988):

- **Carcinoma transicional:** comença a l'epiteli transicional. Suposa aproximadament el 90% dels casos de càncer de bufeta quan es diagnostica.

Una varietat és el **carcinoma papil·lar**, el qual creix cap a l'interior de la bufeta en forma de dit o rovelló, i és de bon pronòstic.

Quan es limita al recobriment de la bufeta, s'anomena **càncer superficial, o no invasiu o no infiltrant**, i representa el 70% dels casos, però amb una elevada tendència a la recurrència. Mentre que el 30% dels casos s'origina a les cèl·lules de transició, i creix a través del recobriment de la bufeta envaint la paret muscular d'aquesta o òrgans propers i ganglis limfàtics, i es coneix com **càncer invasiu o infiltrant**.

- **Carcinoma epidermoide o escamós:** s'origina a les cèl·lules escamoses, les quals són cèl·lules primes i planes que es poden formar a la bufeta després d'una prolongada infecció o irritació. Representa, aproximadament, el 6-8% dels casos de càncer de bufeta en el moment del diagnòstic.
- **Adenocarcinoma:** s'origina a les cèl·lules glandulars que revesteixen determinats òrgans del cos i que després es propaguen a la bufeta. Els llocs primaris més freqüents afectats pels adenocarcinomes inclouen el pulmó, el pàncrees, el pit, la pròstata, l'estómac, el fetge i el colon. Representa entre l'1-2% dels casos de càncer de bufeta quan es diagnostica.

Un cop establert el tipus histològic tumoral, és important conèixer la infiltració i el grau histològic del tumor.

Per tal d'establir el grau d'infiltració del tumor, es fa servir el sistema TNM (**Fig. A.1**). És una escala que defineix els diferents estadis d'un tumor fent referència a tres paràmetres del càncer: l'extensió primària del tumor (mida del tumor) (T), afectació o no dels ganglis limfàtics (N) i la presència o no de metàstasi (l'afectació o no d'altres òrgans allunyats al tumor d'origen) (M)), establerta pel Comitè dels Estats Units sobre el Càncer (AJCC) i la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC) (Sobin, 2009).

- **T** (tumor primari)
 - **T0:** no existeixen proves de tumor primari.
 - **Ta:** carcinoma papil·lar no invasiu, confinat a l'uroteli.
 - **Tis:** carcinoma *in situ* (CIS), tumor superficial pla que no envaeix la làmina pròpia.
 - **T1:** el tumor envaeix el teixit connectiu subepitelial o la làmina pròpia.
 - **T2:** el tumor envaeix la capa muscular vesical.

- **T2a:** el tumor envaeix la capa muscular superficial o la meitat interna.
- **T2b:** el tumor envaeix la capa muscular profunda o la meitat externa.
- **T3:** el tumor envaeix més enllà de la capa muscular o el greix perivesical.
 - **T3a:** la invasió és microscòpica
 - **T3b:** la invasió és macroscòpica (massa extravésical).
- **T4:** el tumor envaeix òrgans i teixits adjacents a la bufeta.
 - **T4a:** invasió de la pròstata, l'úter o la vagina.
 - **T4b:** invasió de la paret pelviana o la paret abdominal.

Segons aquesta classificació del tumor primari, els tumors de bufeta Ta, Tis i T1 són **carcinomes superficials**, mentre que els T2, T3 i T4 són **carcinomes invasius**.

- **N** (afectació dels ganglis limfàtics regionals)
 - **N0:** no hi ha afectació dels ganglis limfàtics.
 - **N1:** afectació en un sol gangli limfàtic de 2 cm o menys en el seu eix major.
 - **N2:** afectació en un sol gangli limfàtic major de 2 cm però menor de 5 cm en el seu eix major, o varis ganglis limfàtics cap d'ells major de 5 cm en el seu eix major.
 - **N3:** afectació en un gangli limfàtic més gran de 5 cm en el seu eix major.
- **M** (metàstasi a distància)
 - **M0:** no hi ha metàstasi a distància.
 - **M1:** hi ha metàstasi a distància.

Per establir el grau histològic del **tumor superficial** de bufeta, ha estat molt utilitzada la classificació proposada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) al 1973, on es diferencien, a banda del papil·loma urotelial, tres graus d'anaplasia cel·lular (G) (Mostofi, 1973). De menor a major grau d'anaplasia, trobem tumors de grau:

- **G1:** ben diferenciat.
- **G2:** moderadament diferenciat.
- **G3:** pobrement diferenciat.

Posteriorment, al 1998, aquesta classificació va ser revisada per l'OMS i la Societat Internacional d'Uropatòlegs (Epstein, 1998). Al 2004 va ser actualitzada i la OMS va publicar una nova classificació en la que els graus establerts en la classificació de 1973 (G1, G2 i G3), s'ampliaren i especificaren segons el creixement potencial dels tumors no invasius (tenint en compte criteris citològics i estructurals específics) (Sauter, 2004):

- **Neoplàsia papil·lar urotelial de baix potencial maligne (NPUBPM).** Correspon a tumors papil·lars urotelials de baix grau, amb una incidència de recurrència important i de progressió baixa. Segons la classificació de 1973, correspondria al carcinoma G1.
- **Carcinoma papil·lar urotelial de baix grau.** Correspon a carcinomes papil·lars urotelials no invasius de baix grau, i majoritàriament d'elevat grau (recurrència i progressió). Segons la classificació de 1973, correspondria a carcinomes G1 i a alguns carcinomes G2.
- **Carcinoma papil·lar urotelial d'elevat grau.** Aquests carcinomes tenen un major pronòstic de recurrència i progressió. Segons la classificació de 1973, correspondria a la majoria de carcinomes G2 i a tots els G3.

De totes maneres, aquestes dues classificacions no són excloents i es complementen, de manera que avui en dia es recomana la utilització de les dues classificacions fins que aquesta última estigui validada amb més estudis clínics (Álvarez, 2007; Montironi, 2009). Inclús s'ha suggerit, recentment, una nova classificació per tal d'unificar els diferents criteris de classificació i poder comparar els resultats entre diferents centres, ja que existeix una elevada variabilitat inter i intraobservadors respecte a l'estadificació i graduació del tumor (Cheng, 2012).

A.1.3. Factors de risc del càncer de bufeta

Actualment no es coneixen les causes exactes del càncer de bufeta, però existeixen determinats factors de risc per desenvolupar aquest tipus de càncer.

Un dels principals factor de risc és el **tabac**, ja que un 70-75% dels casos de càncer de bufeta es poden atribuir al seu consum. S'ha establert una relació degut a la presència de diferents substàncies en el tabac, com el 2-aminonaftalè i el 4-aminobifenil. El risc dels fumadors és aproximadament quatre vegades més elevat que el dels no fumadors (Hung, 2004), i a Europa s'atribueix a la meitat de casos de càncer del tracte urinari als homes i quasi un terç a les dones (Zeegers, 2000).

Un altre factor de risc molt notable està relacionat a les **exposicions ocupacionals** als carcinògens urotelials. Els grups de risc són, per exemple, els treballadors de la indústria del cautxú (per l'exposició a amines aromàtiques), de fabricació de mobles i pintors (per l'exposició a components de la pintura), de la mineria del carbó i fundició de metalls (per l'exposició a hidrocarburs aromàtics policíclics), enginyers navals, mecànics de cotxes i conductors de camions (per l'exposició a gasos del dièsel), etc. (Zeegers, 2001; Kogevinas, 2003).

Un altre factor de risc conegut és la infecció crònica pel paràsit propi del nord d'Àfrica ***Schistosoma haematobium***, l'esquistomatosi (Mostafa, 1999). En general, totes les irritacions cròniques del tracte urinari, causades per infeccions urinàries, càlculs renals o en la bufeta, etc., estan relacionades amb aquest tipus de càncer (Cote, 2009).

També l'ús d'alguns **medicaments** (fenacetina o ciclofosfamida) podria estar implicat en l'origen d'un càncer vesical (Castelao, 2000; Cote, 2009), així com una dieta amb alts continguts de carns fregides i grasses (Moyad, 2002), o la presència d'elevat contingut d'arsènic a l'aigua de beguda (Mink, 2008).

Els **defectes congènits** en la bufeta poden incrementar la possibilitat de desenvolupar un càncer en aquest òrgan. Els antecedents familiars i els factors genètics també són importants. Per a què el càncer es desenvolupi hi ha d'haver diverses mutacions en oncògens i gens supressors de tumors. S'ha demostrat que els gens FGFR3, HRAS, RB1 i TP53 poden trobar-se alterats en cas de patir càncer de bufeta.

Un altre factor de risc és l'**edat** i el **sexe**. Segons l'Associació Espanyola contra el Càncer (AECC, <http://www.aecc.es>) la majoria de casos es diagnostiquen entre els 65 i els 75 anys, amb un màxim als 70 anys, encara que es registren casos des dels 40-45 anys. A més, els homes tenen índexs d'incidència i mortalitat més elevats que les dones (<http://www.cancer.gov>, Institut Nacional de Càncer dels Estats Units).

A.1.4. Epidemiologia del càncer de bufeta

El càncer de bufeta és la patologia maligna més comuna del tracte urinari, sent el quart més comú en homes i l'onzè en dones al món. El 65% dels casos es registren a països desenvolupats, sobretot al sud d'Europa i al nord d'Amèrica, lligats a l'alta proporció de fumadors entre la població masculina. Encara que la incidència local més gran és al nord d'Àfrica, concretament a Egipte, degut al gran nombre d'infeccions causades per *S. haematobium*.

Als Estats Units, en aquest any 2012, s'estima que seran diagnosticats 73510 casos nous i s'estimen 14880 morts (Siegel, 2012). La incidència, als Estats Units, és quatre vegades més elevada en homes que en dones, i quasi dos vegades més alta en homes blancs que en afroamericans (<http://www.cancer.gov>).

A Europa, la incidència més alta apareix a l'occident (23,6 en homes i 5,4 en dones) i al sud (27,1 en homes i 4,1 en dones) (Babjuk, 2011). Segons l'AECC, a Espanya es diagnostiquen uns 12200 casos anuals, representant l'11% dels tumors

del sexe masculí i el 2,4% dels femenins, actualment. La incidència al nostre país és de les més altes del món, sent el quart tumor més freqüent en homes, després dels de pulmó, pròstata i colorrectal. Aproximadament, el 75% d'homes i el 70% de dones que pateixen un càncer de bufeta a Espanya sobreviuen més de 5 anys. Aquesta supervivència és superior a la mitja europea, que es situa al voltant del 69% als 5 anys. Espanya, juntament a Islàndia, Alemanya i Àustria, registra les taxes més altes d'Europa (<http://www.aecc.es>).

Aproximadament, el 75-85% dels pacients amb càncer de bufeta presenten malaltia confinada a la mucosa o submucosa quan es diagnostiquen (van Rhijn, 2009), mentre que l'altre 15-25% presenten invasió del teixit muscular o dels ganglis limfàtics.

A.1.5. Simptomatologia del càncer de bufeta

En la majoria de casos de càncer de bufeta, superficial i invasiu, el senyal més important que es manifesta és l'hematúria (presència de sang a l'orina).

En els casos de càncer superficial Ta i T1 no apareix dolor vesical i poques vegades es manifesta irritació, disúria o tenesme vesical. En cas contrari es podria sospitar d'un Tis o de tumors invasius. En canvi, en casos de tumors invasius avançats poden aparèixer símptomes com: dolor pelvià, símptomes d'obstrucció renal, o inflamació de peus i cames, com a conseqüència de la invasió d'òrgans i estructures veïnes.

A.1.6. Diagnòstic del càncer de bufeta

Després de la sospita d'un possible tumor a la bufeta, deguda a la simptomatologia del pacient, normalment, es comença el diagnòstic amb la història mèdica completa i l'examen físic, el qual inclou el tracte rectal o vaginal i la palpació bimanual (si hi ha hematúria). En l'examen físic es busquen tumors que siguin suficientment grans per a que es puguin palpar, de manera que no es podran detectar els tumors Ta, T1 i Tis.

Existeixen diferents proves que es poden realitzar per tal de diagnosticar el càncer de bufeta. Concretament, pel càncer de bufeta superficial trobem les següents tècniques diagnòstiques (Babjuk, 2011):

- Si el pacient té hematúria es recomana realitzar una **ecografia**. Només en alguns casos concrets es realitzarà, en aquest moment inicial del diagnòstic, una **urografia intravenosa** o una **urografia per tomografia computaritzada**,

ja que en els estadis inicials del càncer, aquestes dues tècniques tenen poca fiabilitat.

- En tots els pacients amb símptomes sospitosos de càncer de bufeta superficial, es recomana la **cistoscòpia**. Aquesta tècnica és una de les més utilitzades actualment, ja que també permet la recollida de mostres del teixit vesical (biòpsia). Les mostres recollides podran ser examinades posteriorment, proporcionant informació de la mida, localització nombre i aparença dels possibles tumors. Quan ja s'ha detectat un tumor amb les tècniques d'imatge anteriors, la cistoscòpia no es realitzarà, ja que posteriorment es procedirà a una resecció transuretral (RTU).

Com a alternativa, la llum blanca que es fa servir en la cistoscòpia, la RTU i la biòpsia, es pot reemplaçar per llum ultraviolada (**cistoscòpia de fluorescència**) i així incrementar la sensibilitat de la tècnica, especialment quan es tracta de tumors Tis.

- Tant la **citologia** urinària com els **tests d'orina moleculars** (detecció de marcadors solubles o cel·lulars) es recomanen per predir els tumors superficials de grau elevat abans de realitzar una RTU. La citologia té una elevada sensibilitat en tumors de grau elevat, però disminueix en els tumors de baix grau. En canvi, molts dels tests d'orina moleculars tenen una millor sensibilitat, però una menor especificitat que la citologia, a més d'un cost adicional. Alguns d'aquests tests que s'utilitzen són el NMP22, l'Urovysion i l'ImmunoCyt.

Un cop detectat el tumor es realitza una **RTU**, amb la qual s'extirparà les lesions visibles i es diagnosticarà correctament el tumor. En casos de detecció d'un uroteli d'aspecte anormal, es recomana la realització de **biòpsies**. Aquesta tècnica també es recomana en casos en que la mucosa tingui un aspecte normal, però la citologia hagi donat positiva.

Per tal de poder administrar un tractament adequat, és molt important establir correctament l'estadi en el que es troba el tumor després del diagnòstic. Per aquest motiu, quan s'ha realitzat una RTU incompleta o s'ha diagnosticat un tumor d'elevat grau o T1, es recomana realitzar una altra RTU després de 2-6 setmanes de la primera.

Altres tècniques existents pel diagnòstic i estadificació del càncer de bufeta, especialment quan són tumors invasius, són: la tomografia axial computaritzada (**TAC**) (permet avaluar els tumors de bufeta invasius i el grau de metàstasi de ganglis limfàtics pelvians i abdominals), les imatges de ressonància magnètica (**IRM**), la tomografia per emissió de positrons (**PET**) (és possible visualitzar un tumor que no ha estat visible amb un TAC o IRM), o la **gammagrafia òssia** (aquesta tècnica es sol

utilitzar en estadis avançats, ja que permet determinar la presència de metàstasi als ossos).

A.1.7. Tractament del càncer de bufeta superficial

Als pacients amb càncer de bufeta confinada a la mucosa o submucosa (estadis Ta, Tis i T1), la **RTU** és el mètode de tractament habitual. A més, aquest mètode presenta l'avantatge, front el tractament amb **làser** o la **teràpia fotodinàmica** (tractaments alternatius a la RTU), de proporcionar teixit per ser analitzat pel patòleg i determinar el grau i l'estadi del tumor.

Però en la majoria de casos aquest procediment no és suficient, ja que existeix un 30-80% de casos de recurrències i entre un 1-45% de casos en que el tumor progressa a estadis més agressius, envaint el teixit muscular dins dels cinc anys següents a la RTU (Brausi, 2002; van Rhijn, 2009). Els pacients, aleshores, requereixen d'un tractament profilàctic efectiu per prevenir recurrències i la progressió del tumor.

Després de l'eliminació del tumor, la **quimioteràpia** o la **immunoteràpia intravesical** s'utilitzen per tal de prevenir les recurrències i la progressió del tumor. Aquests agents terapèutics s'administren, mitjançant un catèter, directament a la bufeta, on es mantindran durant dues hores abans de ser expulsats per l'orina. Els agents intravesicals utilitzats actualment són els quimioteràpics epirubicina, doxorubicina i mitomicina C (MMC), i l'immunoteràpic BCG. Aquests es descriuen més detalladament en els apartats posteriors A.1.7.1 i A.2.3, respectivament.

Els resultats de diferents estudis realitzats han demostrat una disminució de la recurrència del tumor quan s'administra l'agent quimioteràpic en les 24 hores següents a la RTU, mostrant resultats millors que la RTU sola (Sylvester, 2004; Gudjónsson, 2009). Malauradament, en cas de perforació inter o intraperitoneal no es podrà administrar l'agent quimioteràpic immediatament, degut a les complicacions greus que comportaria (Oddens, 2004).

Diversos treballs han demostrat que el BCG és millor que els altres agents quimioteràpics per a disminuir la recurrència dels tumors (Böhle, 2003; Shelley, 2004). A més, la disminució de la progressió del tumor només ha estat demostrada amb BCG, a diferència de la quimioteràpia que és incapaç de prevenir-la (Sylvester, 2002; Böhle, 2004). No obstant, és necessària una teràpia de manteniment posterior, de com a mínim un any, per tal d'aconseguir resultats superiors al quimioteràpic, com per exemple la MMC, disminuint la recurrència del tumor, i a més reduint la seva progressió (Böhle, 2004; Malmström, 2009).

L'administració de BCG es realitza una vegada a la setmana durant sis setmanes. Aquest protocol va ser establert per Morales i col·laboradors al 1976, i

continua sent, 36 anys després, el protocol estàndard. En canvi, actualment, no s'ha arribat a cap consens per establir un protocol de la teràpia de manteniment (Lamm, 2000 (a); Zlotta, 2000 (a)).

Malauradament, donat el major nombre d'efectes secundaris associats al BCG en comparació amb els agents quimioteràpics, i el risc d'absorció sistèmica i infecció per BCG, fa que no sigui possible la seva aplicació immediatament després de la RTU, fins a dues setmanes després d'aquesta. Aquests problemes associats al BCG s'expliquen detalladament més endavant. De la mateixa manera, tampoc és possible la seva administració als pacients que presenten hematúria macroscòpica, estenosi uretral, tuberculosi activa, traumatisme per cateterització, immunosupressió, o infecció del tracte urinari.

Per aquest motiu, la classificació dels pacients amb càncer de bufeta superficial tenint en compte la recurrència, la progressió i la mortalitat, en grups de risc baix, intermedi i elevat (Millán-Rodríguez, 2000), és rellevant a l'hora d'escollir el tractament adjuvant necessari (**Fig. A.2**). D'aquesta manera, després de la RTU i d'una instil·lació immediata amb quimioteràpia, es seguiran diferents estratègies terapèutiques (Babjuck, 2011):

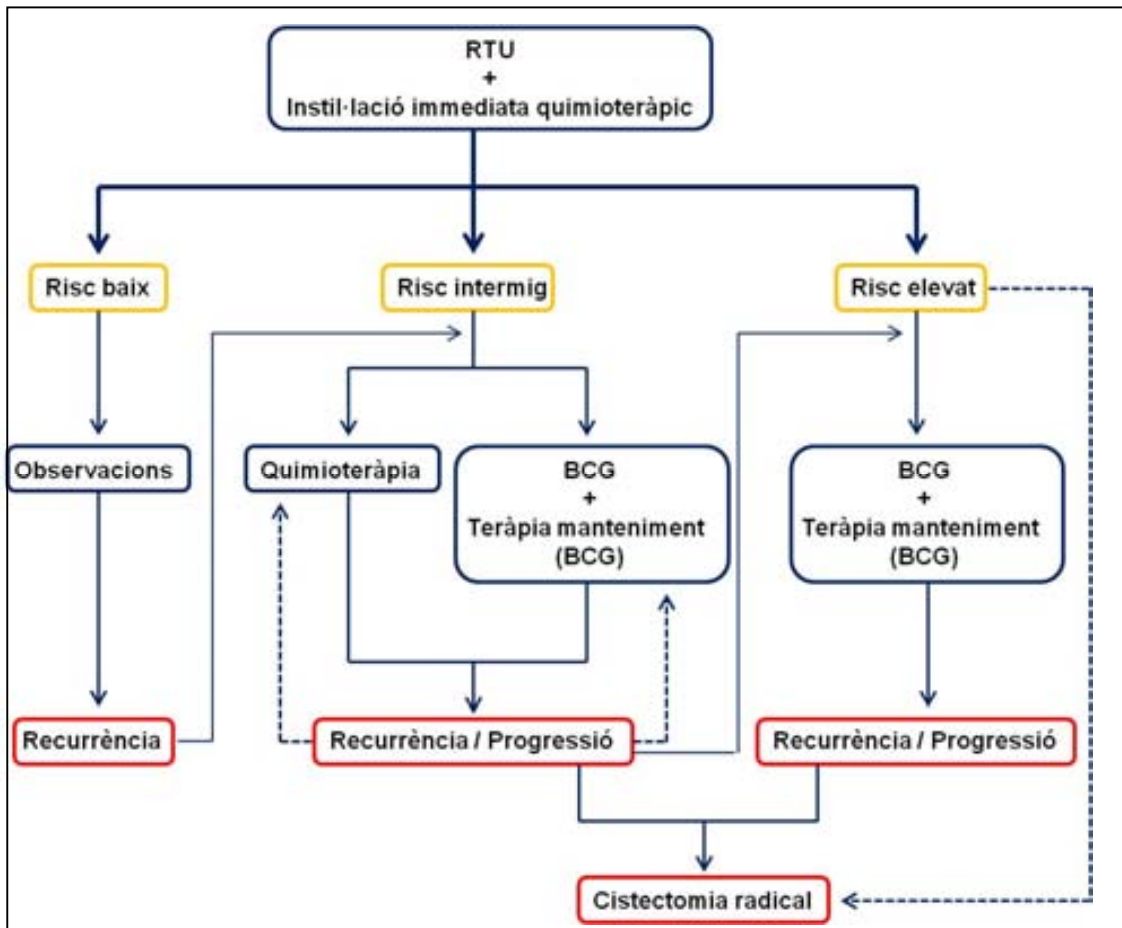
- Als pacients amb tumors de baix risc (G1 Ta, i G1 T1 únic), només es procedirà al seu control posterior. Degut als efectes adversos de la teràpia amb BCG, existeix un consens a l'hora de no tractar a aquests pacients amb el bacil.
- Als pacients amb tumors de risc intermedi (G1 T1 múltiple, G2 Ta, i G2 T1 únic), es recomana un tractament de quimioteràpia local o d'immunoteràpia intravesical amb BCG. Si aquests tractaments estan contraindicats, s'administrarà un altre tipus d'immunoteràpia o quimioteràpia local.
- Els pacients amb tumors d'elevat risc (G2 T1 múltiple, G3 Ta, G3 T1, i Tis), hauran de rebre BCG intravesicalment. Si aquest tractament està contraindicat, s'administrarà un altre tipus d'immunoteràpia o quimioteràpia local.

Els pacients amb Tis que presenten una resposta completa al BCG presenten, aproximadament, un 20% de risc d'evolució de la malaltia a 5 anys; mentre que els pacients amb resposta incompleta al BCG presenten, aproximadament, un 95% de risc d'evolució de la malaltia (Hudson, 1995).

Els pacients que presenten tumors Tis o T1 d'elevat grau que no han respòs positivament al tractament intravesical inicial, se'ls realitza una extirpació quirúrgica de la bufeta (cistectomia) i posterior reconstrucció, ja que hi ha risc de progressió del tumor a invasiu. Com a alternativa es pot repetir la teràpia intravesical, però els resultats no són satisfactoris (Babjuk, 2011) (**Fig. A.2**).

Després de tres mesos post-tractament, i una avaluació de la bufeta lliure de malaltia, moltes vegades, com hem explicat anteriorment, es realitza una **teràpia de manteniment** amb aquests agents per prevenir recaigudes, especialment quan els pacients han estat tractats amb BCG. De totes maneres, un control periòdic amb cistoscòpia és necessari per avaluar l'evolució del pacient. Conseqüentment, el càncer de bufeta no invasiu es considera una malaltia crònica que requereix un seguiment freqüent i tractaments repetits, convertint-se, d'entre tots el càncers, en el de més elevat cost (considerant el cost per pacient des del diagnòstic fins la mort) (Ploeg, 2009).

Figura A.2. Esquema del tractament del càncer de bufeta superficial segons els risc de recurrència i progressió associat
 Imatge adaptada de van Rhijn, 2009.



Fins a un 30-40% dels pacients tractats amb BCG no responen favorablement a la teràpia (Sylvester, 2010), i en un elevat percentatge de pacients es presenten problemes de toxicitat associats encara que no severes. La majoria de pacients experimenten símptomes d'irritabilitat (cistitis) com a resultat de la reacció inflamatòria de la mucosa vesical (Martínez-Piñeiro, 2005). Aproximadament un 40% desenvolupa hematúria que normalment s'autolimita però, a vegades és necessari suspendre la

teràpia fins que desaparegui completament (Martínez-Piñeiro, 2002). Un 30% dels pacients presenten febre, malestar i nàusees o vòmits (Lamm (b), 2000; Gontero, 2010). En un 1% es poden desenvolupar prostatitis granulomatosa, orquiepididimitis granulomatosa, hepatitis granulomatosa i pneumonitis. També s'han descrit quadres al·lèrgics al BCG, o casos d'obstrucció uretral i contractura vesical, fent necessari la suspensió del tractament. La complicació més seria és la sèpsia per BCG (González, 2003; Nadasy, 2008), la qual s'ha estimat que té lloc en un 0,4% dels pacients (Lamm, 2000 (b)). Degut a molts d'aquests efectes secundaris, en un 20% dels pacients és necessari suspendre el tractament (Sylvester, 2010). De totes maneres, els efectes secundaris severes es donen en menys del 5% dels pacients (van der Meijden, 2003), en gran part, gràcies a la millor experiència de la tècnica d'administració.

Amb l'objectiu de reduir els efectes secundaris de la teràpia amb BCG i de millorar la seva eficàcia, s'estan realitzant estudis per disminuir la dosi administrada del bacil. Alguns protocols terapèutics que han assajat pautes de tractament amb dosis baixes de BCG han observat que no disminuïa la seva eficàcia (a nivell de recurrència i progressió del tumor), mentre que sí disminuïen els efectes secundaris (Martínez-Piñeiro, 2005; Ojea, 2007). No obstant, en relació als pacients amb tumors d'elevat risc, existeix controvèrsia entre estudis clínics que demostren que les dosis baixes són igual d'eficaces que l'estàndard (Martínez Piñeiro, 2005; Kamel, 2009) i els que no (Dalbagni, 2000).

Una altra estratègia per millorar l'eficàcia del tractament és la d'incrementar la capacitat de penetració de l'agent terapèutic. En aquest aspecte, s'han realitzat treballs combinant l'agent quimioteràpic amb termoteràpia (42-43°C) intravesical (Colombo, 2003; van der Heijden, 2004). Els resultats obtinguts han estat beneficiosos, però es necessiten més estudis per a validar-los.

Una altra d'aquestes estratègies ha estat la inducció d'un gradient elèctric entre l'agent quimioteràpic i la paret de la bufeta (Colombo, 2001; Di Stasi, 2006). Aquesta tècnica ha permès incrementar l'efectivitat del quimioteràpic, però no ha estat superior al tractament amb BCG sol.

Altres tècniques que s'estan assajant són la teràpia fotodinàmica (Berger, 2003; Asanuma, 2005), i la utilització de transportadors magnètics (Leakakos, 2003).

Durant al llarg d'aquests anys també hi ha hagut un gran interès per trobar nous agents quimioteràpics i immunoteràpics. Aquestes noves estratègies alternatives al tractament tradicional es descriuen a continuació.

A.1.7.1. Agents quimioteràpics

Els agents quimioteràpics utilitzats pel tractament del càncer de bufeta superficial han estat la tiotepa, la MMC i la doxorubicina. Degut a les diferències que

mostren els diferents compostos quimioteràpics a nivell de valors de recurrència dels tumors (Huncharek, 2001), actualment s'estan duent a terme diversos estudis per tal de definir el patró de tractament ideal i optimitzar l'eficàcia de la teràpia tradicional.

A més, s'estan estudiant diferents agents com a possibles opcions per al tractament intravesical. Entre ells trobem la gemcitabina, l'apaziquona i la valrubicina, que es troben en fase experimental III; el docetaxel i paclitaxel, que es troben en fase experimental II; i la suramina i la meglumina amb àcid gamma-linoleic (MeGLA) que es troben en fase experimental I. Seguidament es descriuen detalladament aquests agents quimioteràpics:

- La **tiotepa** és un compost organofosforat alquilant. Va ser el primer quimioteràpic utilitzat intravesicalment per al tractament del càncer de bufeta, i va ser molt utilitzat als anys 70 i principis del 80. Degut a la seva important toxicitat, avui en dia s'utilitza ocasionalment. Diferents assajos clínics han mostrat la seva capacitat per reduir les recurrències del tumor, però amb resultats similars a les antraciclinaes i a altres agents quimioteràpics (Zincke, 1985; Martínez-Piñero, 1990).
- La **MMC** és un compost que prové de l'*Streptomyces caespitosus*, i actua inhibint la síntesi del DNA, ja que és un agent alquilant d'aquest. Com ja hem explicat anteriorment (apartat A.1.7), la seva administració després de la RTU disminueix la recurrència del tumor, però a diferència del BCG, no és capaç de disminuir la progressió d'aquest. La seva administració té lloc, actualment, en pacients amb tumors de risc baix o intermedi. De totes maneres, s'estan duent a terme diferents estudis per tal de millorar l'eficàcia del tractament del càncer de bufeta superficial, alternant o combinant la MMC amb el BCG (Rintala, 1996; Kaasinen, 2000).
- La **doxorubicina**, l'**epirubicina** i la **valrubicina** són antraciclinaes que inhibeixen la topoisomerasa II i la síntesi del DNA actuant com a agents intercalants. S'han realitzat diversos estudis en pacients amb càncer de bufeta superficial, per tal de comparar l'eficàcia d'aquests tres agents per prevenir la recurrència del tumor (Oosterlink, 1993; Patterson, 2000). Els resultats mostren una disminució de la recurrència amb nivells similars entre ells. No obstant, no s'ha mostrat un efecte millor de la doxorubicina i l'epirubicina que el BCG per disminuir la recurrència (Lamm, 1991; van der Meijden, 2001). El seu ús està àmpliament acceptat per al tractament del càncer superficial, i s'ha suggerit la seva eficàcia, especialment la valrubicina, en pacients que han fallat o han estat intolerants a la teràpia amb BCG (Kuznetsov, 2001).
- La **gemcitabina** és una pirimidina anàloga capaç d'inhibir el creixement cel·lular i d'induir apoptosi mitjançant la inhibició de la síntesi del DNA. Aquest agent en combinació amb cisplatí, també ha mostrat un efecte beneficiós en pacients amb càncer de bufeta invasiu (Gunlusoy, 2012; Cognetti, 2012).

Actualment s'estan duent a terme estudis clínics en fase I i II pel tractament del càncer de bufeta d'elevat risc en pacients on el tractament amb BCG ha fallat (Dalbagni, 2006; Mohanty, 2008), i en pacients amb tumors de risc baix i intermedi (Addeo, 2010), amb resultats beneficiosos pel pacient.

- L'indolquinona **apaziquona** és un agent bioeductiu alquilant que s'activa per les reductases expressades en les cèl·lules tumorals i indueix la mort cel·lular. Diversos assajos clínics en fase II han mostrat que és un agent prometedor pel tractament del càncer de bufeta superficial (Hendricksen, 2012; Yutkin, 2012). Actualment, s'estant realitzant assajos clínics en fase III, per tal d'estudiar la seva administració després de la RTU.
- Els taxans, **docetaxel** i **paclitaxel**, són agents que inhibeixen la polimerització dels microtúbuls i consegüentment indueixen l'arrest cel·lular en la fase M. S'ha demostrat la seva activitat antitumoral en tumors metastàtics, en combinació amb el cisplatí, en assajos clínics en fase II (Dimopoulos, 1999). A més, també s'ha demostrat la seva activitat citotòxica en carcinoma transicional *in vitro* (Rangel, 1994). Encara que la seva poca solubilitat en medis aquosos limiten la seva administració intravesicalment, actualment s'està estudiant, en model animal, com millorar la seva adhesió a l'uroteli (Le Visage, 2004; Mugabe, 2009) amb resultats prometedors per al tractament del càncer de bufeta superficial.
- La **suramina** és una naftilurea polisulfonada que actua com un potent antagonista del factor de creixement endotelial vascular (VEGF). S'ha demostrat que és capaç d'inhibir l'activitat de diversos factors angiogènics produïts per les línies tumorals i la proliferació cel·lular *in vitro* (Gansler, 1992). La seva utilització en pacients amb càncer de bufeta superficial s'està estudiant en assajos clínics de fase I (Uchio, 2003; Ord, 2005), demostrant la seva baixa toxicitat.
- La **MeGLA** és un àcid gras essencial amb efecte citotòxic. S'ha suggerit com un potenciador de l'epirubicina en un assaig clínic de fase I (Harris, 2003).

A.1.7.2. Agents immunoteràpics

L'objectiu dels agents immunoteràpics és el de produir un efecte antitumoral estimulants la immunitat adquirida, i molts dels estudis realitzats en càncer de bufeta es basen en estimular aquesta immunitat en el pacient. Com s'ha explicat anteriorment, la teràpia amb **BCG** és el tractament estàndard pel càncer de bufeta superficial, i s'explicarà més detalladament a l'apartat A.2.3.

A continuació es mostren els agents immunoteràpics estudiats en els últims anys com a alternativa a la utilització del BCG o com a adjuvants d'aquest per al tractament del càncer de bufeta superficial.

- Mitjançant l'**enginyeria recombinant** s'ha utilitzat el BCG i altres micobacteris, com *M. smegmatis*, modificats genèticament per tal d'expressar citocines o molècules immunomoduladores per tal de millorar la resposta immune i reduir la recurrència i progressió del tumor (Haley, 1999). Per una altra banda, s'ha realitzat estudis amb **extractes de la paret cel·lular** de diferents micobacteris, com BCG, *M. phlei* o *M. vaccae*, com a possible alternativa a l'ús de BCG. Tots aquests agents s'expliquen detalladament a l'apartat A.2.2.1.
- Les **interleuquines (IL)** s'han descrit com a possibles adjuvants responsables de la millora de l'eficàcia dels agents intravesicals tradicionals, donat que són responsables d'estimular la proliferació i la inducció de la producció de citocines en les cèl·lules T i les cèl·lules Natural Killer (NK). Algunes d'elles han mostrat una activitat antitumoral en models animals, com l'**IL-2** (Riggs, 1992; Xiao, 2011) i l'**IL-12** (Horinaga, 2005; Zaharoff, 2009). Aquests resultats han suggerit la seva utilització en la teràpia del càncer de bufeta superficial en humans i s'han realitzat assajos clínics de fase I-II demostrant la seva seguretat (a nivell de toxicitat) en els pacients (Tubaro, 1991; Weiss, 2003), i el seu efecte antitumoral en aquests (Den Otter, 1998). No obstant, l'efecte antitumoral o immunoestimulador de l'IL-12 no ha estat demostrat en humans en un assaig clínic de fase I (Weiss, 2003).

L'**interferó (IFN)- α** , s'ha utilitzat en diversos assajos clínics de fase I-II com a immunoteràpic en pacients amb càncer de bufeta mostrant resultats prometedors disminuint la recurrència del tumor (Glashan, 1990; Portillo, 1997), encara que no millors que el BCG (Jimenez-Cruz, 1997). La combinació d'aquesta molècula amb BCG ha estat efectiva (disminuint la recurrència) en els casos en que el tractament amb BCG no ha funcionat (Punnen, 2003; Gallagher, 2008). També s'han dut a terme assajos clínics de fase I-II, combinant l'IFN- α amb agents quimioteràpics com la MMC o l'epirubicina, mostrant millors resultats que la monoteràpia amb el quimioteràpic disminuint la recurrència del tumor (Engelmann, 1992; Raitanen, 1995). No obstant, encara es continuen buscant alternatives millors.

- L'**hemocianina** és una glicoproteïna transportadora d'oxígen present en mol·luscs i artròpodes. Diversos treballs han descrit la seva capacitat immunoestimuladora inespecífica en mamífers. L'hemocianina keyhole-limpet (**KLH**) provinent del mol·lusc *Megathura cranulata*, ha estat utilitzada en diversos assajos clínics de fase I i II com a agent intravesical (Jurincic-Winkler, 2000; Lamm (c), 2000). L'hemocianina provinent de *Concholepas concholepas* (**CCH**) s'ha proposat com a prometedor immunoestimulador alternatiu a BCG, ja que s'ha mostrat el seu efecte antitumoral i immunoestimulador en model

animal (Molledo, 2006). No obstant, són necessaris més estudis amb aquesta molècula, especialment en pacients on el tractament amb BCG o diferents quimioteràpics no ha funcionat.

- Espècies de **Lactobacillus** han mostrat tenir una capacitat antitumoral major que BCG en cèl·lules de càncer de bufeta *in vitro* (Seow, 2002). *Lactobacillus casei* mort per calor administrat intravesicalment, ha demostrat la seva capacitat per prevenir la recurrència del tumor en model animal (Takahashi, 2001). També s'ha demostrat que administrat oralment, en combinació amb epirubicina intravesical, és capaç de prevenir la recurrència del tumor en humans (Naito, 2008). Un estudi recent ha mostrat aquesta capacitat antitumoral i immunoestimuladora de l'espècie *Lactobacillus rhamnosus* en model animal (Seow, 2010). Aquests resultats suggereixen que els probiòtics podrien utilitzar-se com a possible alternativa al tractament immunoteràpic del càncer de bufeta superficial.
- Actualment s'estan realitzant estudis amb la **lectina mistletoe**, extreta de la planta *Viscum album* (vesc), la qual s'ha vist que és capaç d'estimular la producció de citocines i l'expressió de marcadors d'activació de limfòcits, amb la conseqüent inhibició de la carcinogènesi urotelial en models animals (Elsässer-Beile, 2001). S'ha demostrat el seu potencial com a adjuvant terapèutic pel càncer de bufeta superficial en un assaig clínic en fase I-II (Elsässer-Beile, 2005).
- La **rubratina** és un extracte de la paret cel·lular de *Nocardia rubra*, i ha estat utilitzat en un estudi comparatiu amb BCG en pacients amb càncer superficial (de Boer, 2000). S'ha observat el seu paper immunoestimulador, ja que s'ha detectat un increment del nivell de citocines, la presència de leucòcits i cèl·lules T activades en l'orina dels pacients tractats. Però aquesta activitat immunoestimuladora va ser menor que la produïda per BCG.
- Gràcies a la tecnologia recombinant, es va generar la fusió de la molècula del factor de creixement- α transformador amb l'endotoxina PE-40 de *Pseudomonas*, obtenint la proteïna **TP-40**. Aquesta proteïna s'uneix a les cèl·lules cancerígenes que expressen el receptor del factor de creixement epidèrmic, s'internalitza i mata la cèl·lula gràcies a l'endotoxina. Es va realitzar un assaig clínic de fase I, però els resultats no van ser satisfactoris ja que la mida dels tumors T_a i T₁ no va disminuir després del tractament, encara que es suggereix com a possible alternativa per als pacients amb tumors T_{is} que han fallat previament al tractament amb altres agents (Goldberg, 1995).
- La **bropirimina** és una pirimidina aril capaç d'incrementar la producció d'IFN endògen. Diferents assajos clínics amb pacients amb càncer de bufeta superficial T_{is}, han mostrat una resposta del pacient amb la seva administració

per via oral (Sarosdy, 1996; Witjes, 1999), però la seva rellevant toxicitat cardíaca va fer que es deixés d'utilitzar en estudis clínics.

A.2. Els micobacteris

A.2.1. Característiques del gènere *Mycobacterium*

Dins de l'ordre *Actinomycetales*, subordre *Corynebacterineae*, es troba la família *Mycobacteriaceae*, a la qual pertany el gènere *Mycobacterium* (Hartmans, 2006; Saviola, 2006).

El gènere *Mycobacterium* està format per bacils de morfologia variada, i de 0,2-0,6 µm d'amplada i 1-10 µm de longitud (Hartmans, 2006). En aquest gènere podem trobar espècies des de morfologia colonial llisa fins a rugosa, inclús alguna espècie pot tenir més d'una morfologia colonial (Barrera, 2007). Els micobacteris es poden tenir mitjançant la tinció Ziehl-Neelsen. Un cop tenyits amb el colorant primari (carbol fucsina), són resistents a la decoloració àcid-alcohòlica (barreja d'etanol i àcid clorhídric), motiu pel qual se'ls coneixen com a bacils "àcid-alcohol resistents", i s'observen de color fucsia al microscopi (Saviola, 2006).

El seu metabolisme és molt variable, la majoria s'adapta fàcilment al creixement en substrats simples amb una font de carboni, de nitrogen i ions metalls essencials (Barrera, 2007). Existeixen espècies de creixement lent o ràpid (segons si triguen més o menys de set dies en créixer, respectivament), o inclús que encara no s'han pogut cultivar en medis sintètics com *Mycobacterium leprae* (Wayne, 1986). El temps de generació, generalment comprèn entre les dues (*Mycobacterium smegmatis*) fins a les 24 hores (*Mycobacterium tuberculosis*) (Chauhan, 2006; Saviola, 2006). Són microorganismes aeròbics. El seu creixement és afavorit amb una atmosfera del 5-10% de CO₂. La seva temperatura òptima de creixement oscil·la entre els 25°C fins a més de 40°C, sent variable segons l'espècie. Els micobacteris destaquen per tenir un elevat contingut de guanina més citocina (G+C) (61-71%) al seu àcid desoxiribonucleic (DNA). Una característica important dels micobacteris és la seva paret cel·lular amb un elevat contingut lipídic, el qual constitueix més de la meitat del pes sec de la cèl·lula.

Aquest gènere inclou més de 150 espècies (www.bacterio.cict.fr) classificades segons la seva importància clínica i epidemiològica en:

- **Complex *M. tuberculosis***: inclou *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canneti*, i *M. tuberculosis*, causants de la tuberculosi en humans. *M. bovis* (inclou la soca BCG), *Mycobacterium microti*, i *Mycobacterium pinnipedi*, causants de la tuberculosi en animals i ocasionalment en humans.
- **Complex *M. leprae***: inclou *M. leprae* i *Mycobacterium lepraemurium*, causants de la lepra humana (malaltia de Hansen) i en rosegadors, respectivament.

- **Micobacteris no tuberculosos, atípics o ambientals:** inclou la resta d'espècies no incloses als dos grups anteriors. Algunes d'elles són patògens oportunistes i responsables de les micobacteriosis atípiques.

A.2.1.1. Els micobacteris ambientals

Els micobacteris es troben distribuïts àmpliament en una gran diversitat d'hàbitats (aigua dolça o salada, sòl, etc) (Hartmans, 2006). Una de les característiques més importants que els diferencien dels altres dos grans grups és la baixa virulència que presenten en hostes immunocompetents i la seva manca de transmissió interhumana.

Segons Runyon i col·laboradors (1959), els micobacteris ambientals es poden classificar segons la seva velocitat de creixement i la producció de pigment en presència o no de llum. D'aquesta manera, els micobacteris ambientals poden ser de **creixement ràpid o lent**, depenent de si les colònies en medi sòlid es fan visibles abans o després de set dies de cultiu. D'acord amb la seva pigmentació, poden ser **fotocromògens** (produeixen pigment si s'exposen a la llum), **escotocromògens** (produeixen pigment en la foscor) i **no cromògens** (no produeixen pigment).

En els últims anys la diferenciació tradicional de les espècies micobacterianes (taxa de creixement, pigmentació, termotolerància i característiques enzimàtiques i bioquímiques) han estat complementades amb tècniques moleculars i d'anàlisi dels àcids micòlics per cromatografia. De totes maneres, els bons resultats que s'obtenen amb la comparació de les seqüències genètiques del gen codificant per l'àcid ribonucleic ribosomal 16S (Tortoli, 2003) han fet que avui en dia sigui l'estàndard per la identificació de noves espècies (Tortoli, 2006).

A.2.1.2. La paret cel·lular dels micobacteris

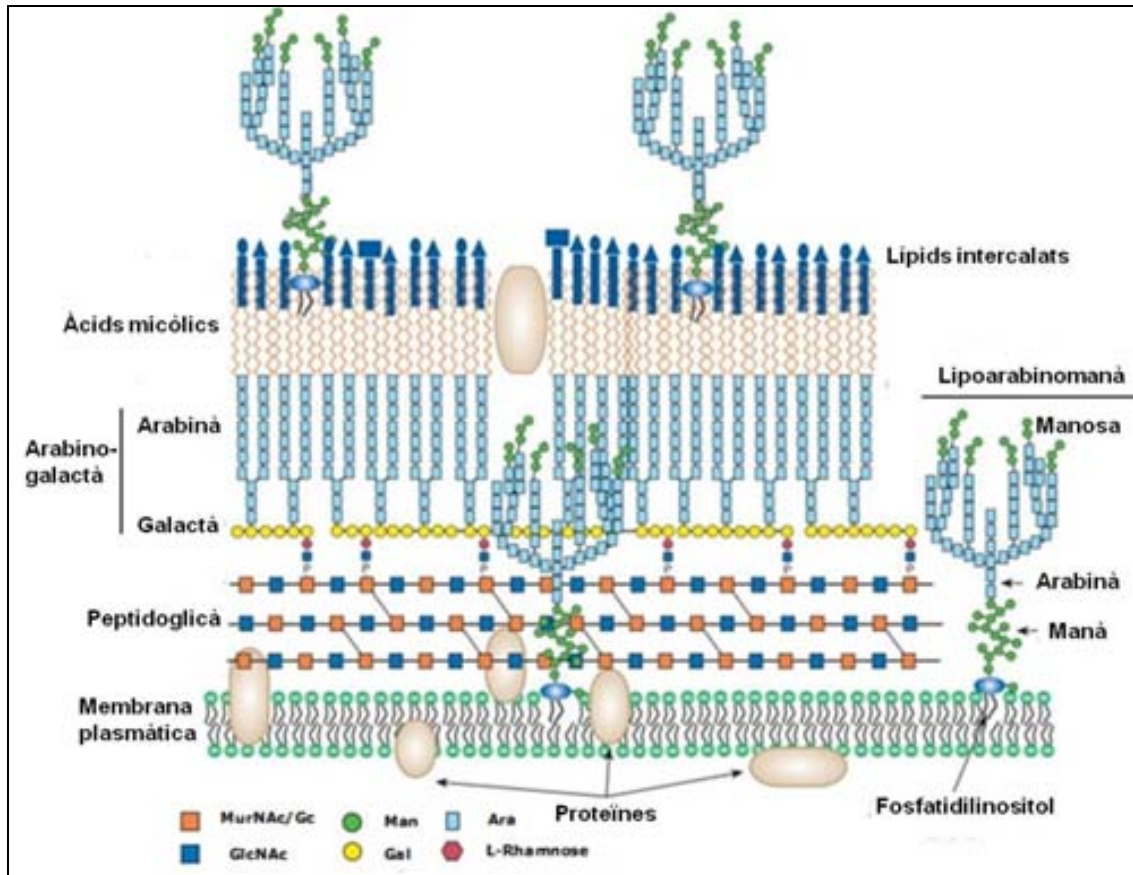
La paret cel·lular micobacteriana envolta la membrana plasmàtica i confereix un conjunt de característiques pròpies i distintives d'aquest gènere: elevada hidrofobicitat, àcid-alcohol resistència, resistència a antibiòtics i lesions, propietats immunològiques, etc.

Consisteix en una bicapa asimètrica formada per diversos tipus de lípids i glicolípids (**Fig. A.3**), els quals representen més del 60% del pes sec del micobacteri (Liu, 1999). El seu esquelet està format per tres macromolècules: el peptidoglicà, l'arabinogalactà i els àcids micòlics, que unides covalentment per unions fosfodièsters, formen el **complex micoloil-arabinogalactà (mAG)** (Draper, 2005) (**Fig. A.3**). Aquest complex mAG, ha estat relacionat amb l'estimulació de la resposta immune. A l'apartat

A.2.2, es descriu més detalladament les propietats immunoestimuladores d'aquestes molècules.

Figura A.3. Paret cel·lular del gènere *Mycobacterium*

Imatge adaptada de Brennan, 2007.



- El **peptidoglicà** és responsable de la forma i rigidesa a la cèl·lula (Brennan, 1995). És un polímer constituït per molècules d'N-acetil glucosamina i àcid muràmic N-glicosilat, connectades per cadenes curtes de quatre aminoàcids diferents (Crick, 2001; Draper, 2005).
- L'**arabinogalactà** és un polisacàrid ramificat que està format per arabinosa i galactosa. La cadena de galactà es troba unida al carboni 6 d'alguns residus de l'àcid muràmic del peptidoglicà a través d'un enllaç fosfodièster (Brennan 1995). Aquest compost també es troba en els gèneres *Corynebacterium*, *Nocardia* i *Rhodococcus*.
- Els **àcids micòlics** són àcids grassos β -hidroxilats i α -alquil ramificats de cadena lineal, d'entre 60 i 90 àtoms de carboni. Es troben covalentment units per enllaços èster a l'arabinosa de l'arabinogalactà (Draper, 2005), o esterificant sucres lliures de la paret.

La seva estructura general correspon a $R_1\text{-CH(OH)-CH(R}_2\text{)-COOH}$. R_1 és una cadena alifàtica llarga amb, generalment, 50-56 àtoms de carboni que s'anomena meromicolat, i que presenta diferents grups funcionals (grups metoxi, ceto o epoxi, anells ciclopropans, ramificacions metil, i dobles enllaços carboni-carboni). R_2 és una cadena curta alifàtica amb, generalment, 22-26 àtoms de carboni (Steck, 1978).

En relació amb els diferents grups funcionals de la cadena meromicolat, s'han descrit set tipus diferents d'àcids micòlics: α -micolat, α' -micolat, metoxi-micolat, ceto-micolat, epoxi-micolat, carboxi-micolat, i ω -1-metoxi-micolat (**Fig. A.4**) (Luquin, 1990; Hartmans, 2006).

Es troben a la paret cel·lular del gènere *Mycobacterium*, i també dels gèneres *Corynebacterium*, *Nocardia* i *Rhodococcus*. Cada espècie micobacteriana presenta un patró característic, però no exclusiu d'espècie (Hinrikson, 1994).

Figura A.4. Estructures químiques dels diferents tipus d'àcids micòlics

Imatge adaptada de Hinrikson, 1994; i Laval, 2001.

Tipus	Micolat	Estructura
I	α -Micolat	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{A} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$
II	α' -Micolat	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_y - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$
III	Metoxi-micolat	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \underset{\text{OCH}_3}{\text{CH}} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$
IV	Ceto-micolat	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \underset{\text{O}}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$
V	Epoxi-micolat	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \underset{\text{O}}{\text{CH}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$
VI	Carboxi-micolat	$\text{OH} - \underset{\text{O}}{\text{C}} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$
VII	ω -1-Metoxi-micolat	$\text{CH}_2 - \underset{\text{OCH}_3}{\text{CH}} - (\text{CH}_2)_x - \text{A} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \underset{\text{OH}}{\text{C}}^{\text{H}} - \underset{\text{COOH}}{\text{C}}^{\text{H}} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$

A	\rightarrow	$\overset{\text{cis}}{\text{CH}=\text{CH}}$	or	$\overset{\text{trans}}{\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}}$	or	$\overset{\text{cis}}{\text{CH}-\text{CH}}$		
		$\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_3}$		$\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_3}$		$\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_3}$		
B	\rightarrow	$\overset{\text{cis}}{\text{CH}=\text{CH}}$	or	$\overset{\text{trans}}{\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}}$	or	$\overset{\text{cis}}{\text{CH}-\text{CH}}$	or	$\overset{\text{trans}}{\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}}$
				$\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_3}$		$\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}_2}$		$\underset{\text{CH}_2}{\text{CH}_2} \quad \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_3}$

A, distal; B, proximal.

Els valors a, b i c van des de 11 a 19. El valor d va des de 19 a 23.

A i B simbolitzen una unió doble o un anell ciclopropà. En A i B poden haver branques metil adjacents.

De manera més minoritària també es troben lípids i glicolípid units de manera no covalent (lliures), i altres units covalentment al complex mAG (Brennan, 1995; Draper, 1998; Ryll, 2001) (**Fig. A.3**). Els lípids i glicolípid lliures es situen a la part més externa de la paret i es poden extreure fàcilment amb solvents orgànics (Daffé, 1998).

- Els **lípid lliures** majoritaris de la paret cel·lular dels micobacteris corresponen a les menaquinones (MK) i els dimicocerosats de tiocerol (PDIM). Les **MK** es troben a totes les espècies micobacterianes, mentre que els **PDIM** es troben en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. leprae*, *M. microti*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *M. haemophilum*, *Mycobacterium gastri* i *Mycobacterium kansasii* (Yu, 2012). Diferents estudis han demostrat que el PDIM està relacionat amb la virulència de *M. tuberculosis* (Camacho, 2001; Pinto, 2004).
- Entre els **glicolípid lliures** trobem les aciltrealoses, els lipooligosacàrids, els glicolípid fenòlics (PGL) i els glicopeptidolípid (GPL).
 - Les aciltrealoses són compostos que comparteixen una mateixa estructura formada per una molècula de trealosa esterificada per àcids micòlics o altres cadenes d'àcids grassos. Entre aquests compostos trobem: el dimicolat de trealosa (DMT), el monomicolat de trealosa (MMT), el sulfolípid (SL), la diaciltrealosa (DAT) i la triaciltrealosa (TAT).
 - El **DMT**, o *cord factor*, està format per una trealosa esterificada amb dos àcids micòlics, i és un dels glicolípid més estudiats ja que s'ha descrit un gran nombre d'activitats biològiques, com el seu efecte tòxic en ratolí (Kato, 1972; Goren, 1979) i la seva activitat antitumoral i angiogènica (Yamagami, 2001). Es troba a totes les espècies del gènere *Mycobacterium* (excepte a *M. leprae*), i també en gèneres com *Corynebacterium*, *Nocardia* o *Rhodococcus*.
 - El **SL** està format per una trealosa sulfatada esterificada per àcid palmític, àcid esteàric i dos àcids grassos polimetil ramificats (Goren, 1976). Entre les seves funcions descrites trobem l'activació de neutròfils humans (Zhang, 1988), la inhibició de la formació d'oxígen reactiu (Brozna, 1991), etc. Són compostos exclusius de soques virulentes de *M. tuberculosis*.
 - Les **DAT** estan formades per una molècula de trealosa esterificada per dos àcids grassos polimetil ramificats (Baer, 1993). Ha estat descrit el seu paper en la inhibició de la proliferació de cèl·lules T de ratolí *in vitro* (Saavedra, 2001). Es troben en les espècies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* i *M. fortuitum*.

- Les **TAT** es diferencien de les DAT per presentar una tercera molècula d'àcid gras esterificant la trealosa (Muñoz, 1997). Es troben només en *M. fortuitum* i *M. tuberculosis*.
 - Els **lipooligosacàrids** presenten una trealosa poliacilada per dos o tres cadenes d'àcids grassos metilats de cadena llarga i glicosilada per una o més unitats d'oligosacàrid. S'ha descrit la seva possible implicació en la morfologia colonial (Belisle, 1989), o en l'adhesió a superfícies (Ren, 2007), i el seu paper com a receptor de micobacteriòfags (Besra, 1994). Aquests glicolípid es troben distribuïts en moltes espècies micobacterianes.
 - Els **PGL** estan constituïts per un grup fenol i un tiocerol, esterificat per dos àcids grassos multimetil ramificats (àcids micoceròsics o tiocerànics). Unida al grup fenol es troba una part glucosídica que pot tenir entre un i quatre sucres. Entre les seves funcions descrites trobem el segrest de radicals d'oxígen (Chan, 1989), l'activació de neutròfils humans (Fäldt, 1999), la seva implicació en la virulència del micobacteri (Yu, 2012), etc. Es troben en patògens obligats i oportunistes (*M. bovis*, *M. canetti*, *M. gastri*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. tuberculosis* i *M. ulcerans*).
 - Els **GPL** tenen un nucli lipopeptidil format per una cadena acilada i un tripèptid dels aminoàcids D-fenilalanina, D-treonina i D-alanina. Ha estat descrit el seu paper en la morfologia colonial i la motilitat (Martínez, 1999; Recht, 2000), l'adhesió a diferents superfícies (Wu, 2009), la inhibició de la fagocitosis per part de macròfags humans (Villeneuve, 2003). Aquests són els glicolípid principals de la capa més externa de *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium butyricum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium habana*, *Mycobacterium simiae*, *M. smegmatis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense* i *Mycobacterium xenopi* (Chatterjee, 2001; Schoney, 2008).
- Els **glicans i lipoglicans** es troben units covalentment a la membrana citoplasmàtica per un fosfatidilinositol i s'estenen al llarg de la paret cel·lular (**Fig. A.3**). Entre ells trobem el lipoarabinomanà (LAM), lipomanà (LM), fosfatidil inositol manòsid (PIM).
 - El **LAM** i **LM** són lipoglicans d'elevat pes molecular formats per successives addicions de manosa a una molècula de fosfatidilinositol. A més, en el LAM també es troba unit el polisacàrid D-arabinomanà (Nigou, 2003). Entre les seves funcions descrites trobem la inhibició de la secreció d'IL-12 per macròfags i cèl·lules dendrítiques (DC) (Nigou, 2001), la supervivència del micobacteri dins del macròfag (Vercellone, 1998), el bloqueig de l'activació transcripcional de l'IFN- γ (Riedel, 1997), etc. Aquests compostos es troben a totes les espècies del gènere *Mycobacterium*.

- Els **PIM** estan formats per un anell d'inositol que pot portar unides entre una i sis molècules de D-manosa (Asselineau, 1998). Entre les seves funcions descrites trobem la inducció de l'òxid nítric (NO) sintasa (Tenu, 1995), l'adhesió a cèl·lules no fagocítiques (Hoppe, 1997), la inhibició de l'activació de macròfags (Court, 2011), etc. Es poden trobar tant lliures com units covalentment a la membrana citoplasmàtica del micobacteri, i estan presents en tots els membres del gènere *Mycobacterium*.

També es troben proteïnes associades (**Fig. A.3**), algunes de les quals tenen funcions enzimàtiques participant en la construcció de la paret cel·lular, i altres com porines permetent el pas de molècules a través de la paret (Brennan 1995; Draper, 2005; Hatzios, 2009).

A.2.2. Propietats immunoestimuladores dels micobacteris

L'activitat immunoestimuladora dels micobacteris es deu, principalment, a la capacitat dels antigens micobacterians per a estimular el sistema immunitari, induint la síntesi de citocines i activant les cèl·lules efectores del sistema immunitari (Hayashi, 1996; Tsuji, 2000). La interacció entre el micobacteri i els receptors de les cèl·lules del sistema immune innat, especialment de les cèl·lules presentadores d'antígen (macròfags o DC) es dona, principalment, gràcies a les molècules de la superfície del bacil, la majoria de les quals corresponen a lípids i glicolípid. Els macròfags i les DC tenen la capacitat de processar els antigens dels bacils i de presentar-los als limfòcits T CD4⁺ i T CD8⁺ a través de les molècules MHC II i I, respectivament, o a través del CD1 en el cas de les DC, amb la conseqüent activació i inducció d'una resposta, preferentment Th1 (amb la producció d'IL-2 i IFN- γ , entre d'altres) (Haanen, 1991). A més, aquestes cèl·lules presentadores d'antígen també seran capaces d'alliberar citocines, com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), IL-1 i IL-6, NO i intermediaris nitrogenats a través de la NO sintasa. Les cèl·lules immunitàries que participen en la llisi de les cèl·lules infectades poden ser limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺, limfòcits T γ/δ , o cèl·lules efectores inespecífiques (NK, macròfags) (Kaufmann, 1995; Fowler, 2012).

Diferents components de la paret cel·lular dels micobacteris han mostrat tenir una activitat immunomoduladora. S'ha demostrat la capacitat de l'esquelet de la paret cel·lular de BCG d'induir la secreció de TNF- α en les DC (Tsuji, 2000) i macròfags *in vitro* (Underhill, 1999). En macròfags de malsats leprosos, s'ha demostrat que aquesta capacitat correspon, especialment, al peptidoglicà (Barnes, 1992). Altres estudis han descrit la capacitat de la part de BCG d'estimular la proliferació de cèl·lules T γ/δ *in vitro* (Vesoski, 2004), i d'activar diferents gens en DC i macròfags humans, demostrant una activitat adjuvant del mAGP de BCG (Begum, 2004; Ishii, 2005). També s'ha demostrat la capacitat del mAGP i del LAM de BCG per induir la secreció del lligand

inductor d'apoptosi relacionat al TNF (TRAIL) pels neutròfils d'humans (Simons, 2007 (a))

A part de BCG, Yuksel i col·laboradors (2011), van comparar *in vitro* la capacitat de l'extracte de la paret cel·lular de 88 micobacteris diferents per induir la producció de TNF- α i IL-12. Aquests resultats fan suggerir als autors que els micobacteris inductors d'aquestes citocines podrien ser possibles candidats com a immunoestimuladors per al tractament del càncer de bufeta.

Altres components de la paret cel·lular que han mostrat tenir una activitat immunomoduladora, són l'àcid muràmic del peptidoglicà (Chedid, 1983), el DMT (Yarkoni, 1979), els PIM (Jones, 2001), el LAM (Briken, 2004), o el LM (Dao, 2004). També s'ha descrit la importància dels àcids micòlics pel creixement, supervivència i patogenicitat de *M. tuberculosis* (Barry, 1998), i la seva implicació en la resposta immune, estimulants la producció d'IFN- γ , IL-12 i TNF- α , i inhibint la producció d'IL-10 per macròfags murins i humans (Korf, 2005; Peyron, 2008). Aquests lípids micobacterians són reconeguts per les cèl·lules T gràcies a les proteïnes presentadores CD1 (Moody, 1997; Porcelli, 1999).

Per una altra banda, es coneixen diversos antígens proteïcs de la superfície dels micobacteris (12, 14, 19, 37, 65 i 71 kDa) i secretats (10, 19, 30 i 38 kDa, la proteïna soluble Tx-114 i el complex 85 kDa) que indueixen una resposta immunitària (Zlotta, 1997; Simons, 2007 (a); Sheikhi, 2008). La lipoproteïna PSt1, la qual es pot trobar tant intra com extracel·lularment, s'ha descrit com a immunogènica i immunoestimuladora del sistema immunitari i s'ha mostrat la seva capacitat antitumoral en model animal de càncer de bufeta (Sänger, 2004). També s'ha descrit la capacitat antineoplàstica d'un polisacàrid de la paret de BCG format per glucans (Wang, 1995; Dinadayala, 2004).

El DNA de BCG també ha mostrat una activitat immunoestimuladora en diferents treballs. Aquesta activitat s'ha relacionat amb la capacitat del DNA per a estimular les cèl·lules NK i induir la secreció d'IFN en els esplenòcits (Tokunaga, 1984; Shimada, 1986). Concretament, s'ha demostrat que són els motius CpG no metilats els responsables d'aquesta activitat (Kataoka, 1992; Yamamoto, 1992). En un estudi amb model animal, s'ha observat que el CpG de BCG és capaç d'induir una resposta immune antitumoral, inclús millor que el propi BCG (Mangsbo, 2008).

Aquestes molècules immunomoduladores dels micobacteris són reconegudes entre d'altres pels TLR de les cèl·lules del sistema immunitari, induint una resposta cel·lular. A l'apartat A.2.3.2.1, es descriu detalladament el paper d'aquests receptors en la resposta immunoestimuladora dels micobacteris.

A.2.2.1. Efecte antitumoral dels micobacteris

La paret cel·lular de molts bacteris ha mostrat tenir activitat anti-cancerígena. Zlotta i col·laboradors (2000 (b)) van demostrar que a banda de BCG viu, la seva paret cel·lular era capaç d'induir una activitat citotòxica de les cèl·lules del sistema immune front les cèl·lules tumorals de bufeta. Amb l'objectiu de buscar estratègies alternatives a la utilització de BCG viu, s'ha fet servir BCG mort per calor (Zhang, 1999; Yamada, 2002) o un sonicat de BCG (Thanhäuser, 1993; Zbar, 1974) que no han mostrat ser tan efectius com BCG viu.

Per una altra banda, extractes de la paret cel·lular d'altres micobacteris diferents a BCG, entre ells: *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. vaccae* o *M. tuberculosis*, s'han utilitzat com a teràpia per diferents tipus de càncer (Gray, 1975; Ribí, 1976; Vosika, 1984; Patel, 2008).

El DNA de *Mycobacterium phlei* ha estat descrit com a participant en la inducció de la síntesi de citocines en cèl·lules tumorals de bufeta, i inclús capaç d'inhibir directament la proliferació de cèl·lules tumorals (Filion, 1999). De fet, la combinació d'un extracte de la paret cel·lular i DNA de *M. phlei* (MCC), ha estat patentada (Bioniche Life Science Inc.) com a possible candidat per al tractament del càncer de bufeta superficial en els casos de pacients que no han respost al BCG (Chin, 1996; Morales, 2001). Amb aquest compost ja s'han iniciat estudis clínics de fase III (Morales, 2008).

Altres autors han utilitzat extractes de *M. smegmatis* en diferents models tumorals (Ribí, 1976; Saito, 1979), demostrant que exerceix un efecte antitumoral comparable a l'obtingut amb BCG i *M. phlei* en model animal de fibrosarcoma i hepatoma (Yarkoni, 1980). Per aquest motiu, aquest micobacteri es va utilitzar mort per calor com a adjuvant immunoteràpic en un estudi clínic amb pacients amb càncer de pulmó (Decroix, 1984), però no va mostrar un efecte immunoestimulador efectiu. Mitjançant l'enginyeria **recombinant** s'han realitzat estudis amb *M. smegmatis*, de la mateixa manera que amb BCG, capaç d'expressar citocines o proteïnes immunomoduladores per poder millorar la resposta immunitària i reduir la recurrència i progressió del tumor. En un estudi amb model animal de càncer de bufeta, es va mostrar la capacitat de *M. smegmatis* recombinant per activar les cèl·lules NK (Young, 2004). Per una altra banda, tant viu com mort per calor, ha mostrat la seva capacitat per activar les cèl·lules T CD8⁺ i DC en model animal de càncer de timus (Rich, 2012). Aquests resultats suggereixen la seva utilització com a immunoestimulador per al tractament del càncer de bufeta, encara que s'han de realitzar estudis clínics per assegurar la seva eficàcia i seguretat.

Mycobacterium vaccae mort per calor (SRL172), ha estat utilitzat en diversos assajos clínics de fase II com a immunoteràpic per a diferents tipus de càncer, com el

melanoma maligne (Nicholson, 2003), el càncer de prostatata (Hrouda, 1998), el càncer renal (Patel, 2008) o de pulmó (O'Brien, 2000). En estudis clínics en fase III amb pacients amb adenocarcinoma de pulmó, s'ha vist que l'administració de *M. vaccae* combinat amb el quimioteràpic, incrementa la supervivència i la qualitat de vida del pacient (O'Brien, 2004). Els efectes beneficiosos obtinguts, han estat atribuïts a components de la paret cel·lular. Concretament, s'ha demostrat la capacitat antineoplàstica dels proteoglicans de la paret de *M. vaccae* en model animal i *in vitro* (Tian, 1999). En el context del càncer de bufeta superficial només existeix un estudi en el que assajen *in vitro* diferents soques de *M. vaccae* vives, però cap d'elles mostren ser més eficaces que BCG com a immunomoduladors (Baran, 2004).

Els resultats beneficiosos obtinguts amb *M. vaccae* mort per calor, ha portat a l'estudi de *Mycobacterium obuense* mort per calor (IMM-101) com a possible candidat immunoestimulador per al tractament del melanoma. De fet, recentment s'han iniciat amb ell estudis clínics de fase I per al tractament del melanoma, on es mostra la no toxicitat en el pacient (Stebbing, 2012).

Mycobacterium indicus pranii ha estat utilitzat en dos estudis clínics amb pacients amb càncer de bufeta i de pulmó (Chaudhuri, 2003; Sur, 2003). S'ha demostrat que és capaç d'induir una resposta Th1 i que té potencial immunoterapèutic front el melanoma en model animal (Rakshit, 2012; Ahmad, 2011).

A.2.3. *Mycobacterium bovis* BCG

A.2.3.1. Història del BCG

Al 1882, Robert **Koch** va descobrir el bacil *M. tuberculosis*, causant de la tuberculosi, i l'aïllà en medi de cultiu constituït per sèrum coagulat i patata. Posteriorment, **Nocard**, al 1902, va aïllar la soca virulenta *M. bovis* d'una mostra d'una vaca amb mastitis.

Al 1908, el metge francès Léon Charles Albert **Calmette** va deduir que *M. bovis* perdia virulència al ser cultivat amb bilis, ja que a l'injectar petites dosis del bacil a les vaques aquest s'acumulava al mesenteri sense causar cap malaltia. Gràcies a aquest fet, i amb l'ajut del veterinari Jean-Marie Camilla **Guérin**, va iniciar els cultius de *M. bovis* en presència de bilis de bou i patata glicerinaada a l'Institut Pasteur de Lille (França).

Després de 230 resembres durant 13 anys, *M. bovis* es va utilitzar per primera vegada com a vacuna contra la tuberculosi a l'Hospital de la Charité a Paris, al 1921. Aquesta vacuna s'anomenà BCG (Bacillus Calmette i Guérin). Al 1924, es va iniciar la vacunació de recent nascuts de França i altres països europeus. Després d'assegurar i demostrar la seva innocuïtat, al 1932 es va declarar vacuna segura i s'iniciaren

campanyes de vacunació massiva al Japó, China, Rússia, França, Anglaterra i Canadà. Finalment, al 1956 es va obtenir la llicència per poder produir-la, distribuir-la i vendre-la als Estats Units, i es va utilitzar arreu del món com a vacuna profilàctica contra la tuberculosi.

Paral·lelament, al 1921, **Coley** va ser el primer en observar que pocs malalts de tuberculosi patien càncer. Però va ser **Pearl**, al 1929, qui va descriure una relació inversa entre la tuberculosi i el càncer, ja que va observar en una sèrie de 7500 necròpsies, realitzades al Johns Hopkins Hospital (Baltimore, Estats Units), que els pacients morts que havien patit tuberculosi tenien una incidència inferior de neoplàsies malignes que el grup control (Pearl, 1929). El primer en publicar l'efecte beneficiós del BCG en el tractament del càncer, va ser el suec **Holmgren** al 1935. A partir d'aquí, es van generar diversos estudis clínics utilitzant el BCG com a adjuvant terapèutic en el tractament de diferents càncers, com el de colon, pulmò, melanoma (Morton, 1970) i la leucèmia (Mathé, 1969). Malauradament, els estudis van perdre importància anys després amb el desenvolupament de la quimioteràpia i radioteràpia.

D'aquesta manera, es va deixar d'utilitzar fins que al 1974, **Zbar i Rapp** establiren les condicions necessàries per aconseguir l'efecte antitumoral del BCG en model animal: càrrega tumoral petita, administració d'un nombre adequat de bacils vius, contacte entre el BCG i les cèl·lules tumorals, i capacitat de desenvolupar una resposta immune front els antigens del bacil (Zbar, 1974). Gràcies a aquests postulats, al 1976, **Morales** i col·laboradors, van establir el protocol per al tractament del càncer de bufeta superficial que avui en dia encara es fa servir (Morales, 1976; Brandau, 2007). Finalment, el tractament amb BCG pel càncer de bufeta superficial va ser àmpliament acceptat gràcies als resultats publicats on es demostrà la disminució de la recurrència i de la progressió en pacients que havien rebut teràpia amb BCG després de cirurgia local (Lamm, 1980).

A.2.3.1.1. Les soques filles de BCG

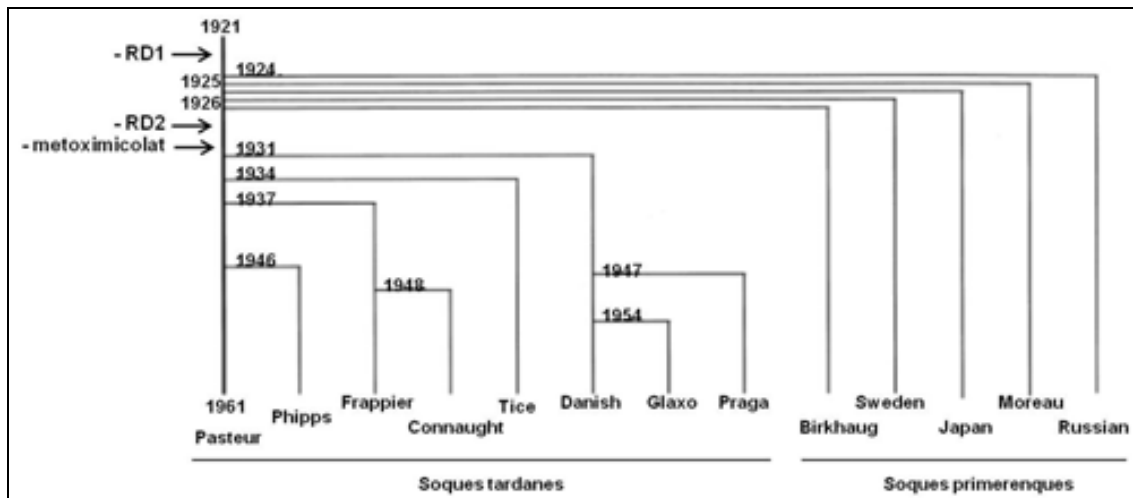
La vacuna BCG original es va distribuir als diferents laboratoris arreu del món. Com que no es van crear lots liofilitzats de la vacuna fins al 1960, des dels anys 20 fins els anys 60 es van continuar fent ressembres addicionals del bacil, per tal de preservar el bacteri viable, sota les diferents condicions de cada laboratori. Com a conseqüència es van acumular insercions i delecions als genomes de les diferents soques de BCG de cada laboratori. Gràcies a les tècniques moleculars actuals, s'ha pogut seqüenciar i comparar els genomes de *M. bovis* i de diferents soques de BCG (Brosch, 2007; Seki, 2009), de manera que ha estat possible identificar les bases moleculars de l'atenuació de BCG i de la variabilitat genètica entre les diferents soques. A més, s'han descrit diferències en les propietats bioquímiques i en els determinants antigènics, incloent el contingut lipídic i glicolipídic de la paret cel·lular, entre les diferents soques de BCG (Behr, 2002; Rodriguez-Alvarez, 2009; Hayashi, 2010).

El nom que han adquirit les diferents soques fa referència al lloc original de manufactura. A partir dels estudis moleculars que hem mencionat anteriorment, les diferents soques es van poder classificar en primerenques o tardanes segons el moment en que van divergir del BCG original, i per tant van perdre la regió de diferència (RD) 2 (Behr, 1999) i la capacitat per sintetitzar el metoximicolat (Behr, 2000) (**Fig. A.5**). Entre les soques més utilitzades, trobem les primerenques: Russian (Moscou, Rússia), Moreau (Brasil), Japan (Tòquio, Japó), Sweden (Göteborg, Suècia) i Birkhaug, i les tardanes: Danish (Copenhagen, Dinamarca), Glaxo (Anglaterra), Tice (Chicago, Estats Units), Frappier (Montreal, Canadà), Connaught (Toronto, Canadà), Phipps (Filadèlfia, Estats Units) i Pasteur (França) (**Fig. A.5**).

En l'àmbit de la tuberculosi, s'han dut a terme nombrosos estudis avaluant l'impacte de les diferències entre les diferents soques de BCG i la seva eficàcia com a vacuna, especialment respecte al nivell de protecció que proporciona (Liu, 2009). Diferents estudis *in vitro* i amb animals i humans indiquen que els diferents determinants antigènics donen lloc a diferències en l'activitat immunològica entre les diferents soques de BCG (Hayashi, 2009; Keyser, 2011). No obstant, els resultats obtinguts han estat controvertos. Algunes investigacions han mostrat que les soques evolutivament primerenques són capaces d'induir una major resposta proinflamatòria Th1, i per tant una millor protecció front la malaltia de la tuberculosi que les soques tardanes (Davids, 2006). En canvi, altres autors no han observat cap relació entre les soques evolutivament diferents i la resposta induïda en el pacient tuberculós (Horwitz, 2009).

Respecte a la teràpia del càncer de bufeta superficial, encara que també s'estan utilitzant diferents soques de BCG, existeixen molt poques dades que avaluïn l'impacte de les diferències antigèniques entre les diferents soques en la seva capacitat antitumoral *in vitro*. De fet, només hi ha un estudi que compara la capacitat d'inhibir la proliferació tumoral entre una soca primerenca i una tardana (Schwarzer, 2010). Un altre estudi també compara la capacitat antitumoral de diferents soques de BCG, però totes elles són tardanes (Rajala, 1992;). Per una altra banda s'han realitzat diversos estudis clínics comparatius entre diferents soques (Champetier, 2000; Sylvester, 2002, Birkhäuser, 2012). Malauradament, no es poden extreure conclusions, ja que la diversitat de resultats obtinguts són deguts, en gran part, a la gran variabilitat existent entre els diferents assajos (dosi del bacil, estat clínic del pacient, tipus de tumor, etc.).

Figura A.5. Esquema genealògic de l'evolució genètica de les diferents soques de BCG
Imatge adaptada de Behr, 1999.



RD, regió de diferència.

A.2.3.2. Mecanisme d'acció del BCG com a immunoteràpic en el tractament del càncer de bufeta

Després de trenta anys de l'inici de l'administració de BCG, es desconeix amb exactitud els mecanismes mitjançant els quals actua com a agent antitumoral. Es coneix que té lloc una activitat directa (inhibició de la proliferació) sobre les cèl·lules tumorals (Zhang, 1997), així com una activitat tumoral indirecta consistent en l'estimulació del sistema immunitari.

La cara luminal de la bufeta està recoberta per glicosamines sulfatades. Aquesta capa hidrofílica protegeix la paret de substàncies tòxiques i dels microorganismes. Inicialment, sembla que el bacil s'acumula a prop de la paret sense adherir-se (Schamhart, 1994), ja que, tant la paret del BCG com de la bufeta estan carregades negativament i les càrregues de les dues superfícies es repel·leixen. Però les cèl·lules tumorals sintetitzen menys quantitat de glicosamines, de manera que incrementa l'accès dels agents terapèutics (Liang, 2001). (**Fig. A.6**).

Posteriorment, sembla ser important la unió del bacteri (BCG) amb les cèl·lules de la bufeta per iniciar el seu mecanisme d'acció. Aquesta unió consisteix en la interacció entre l'adhesina micobacteriana FAP (de l'anglès, *fibronectin attachment protein*) amb la integrina $\alpha_5\beta_1$ (receptor de la fibronectina) de la cèl·lula tumoral a través de la fibronectina cel·lular del micobacteri (Ratliff, 1993 (a); Coon, 2012), amb la consegüent fagocitosis del bacil (Becich, 1991; Kuroda, 1993) (**Fig. A.6**). No obstant, hi ha estudis que proposen altres molècules del bacil implicades en la seva adhesió amb la cèl·lula tumoral, com per exemple l'antigen 85 que s'uneix a la fibronectina cel·lular (Zhao, 2000), o l'adhesina HBHA (de l'anglès, *heparin-binding haemagglutinin*

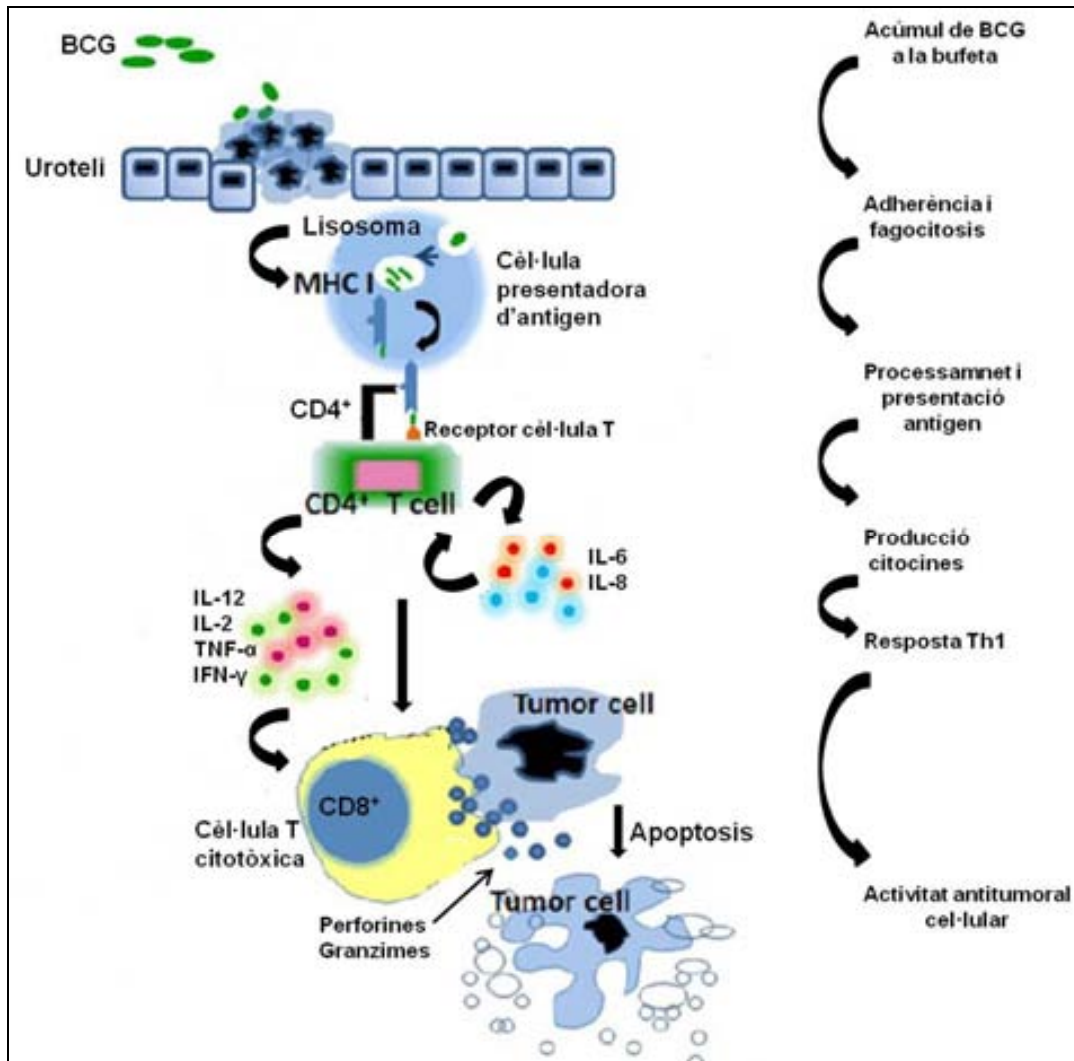
adhesin) que interacciona amb els proteoglicans d'heparan-sulfats que es co-expressen amb la fibronectina (Schneider, 1994).

Un cop el BCG és fagocitat i processat, resulta en una alteració de l'expressió gènica de la cèl·lula tumoral (**Fig. A.6**). Diferents treballs *in vitro* han demostrat la capacitat de BCG per inhibir el creixement de les cèl·lules tumorals directament (Pryor, 1995; Zhang, 1997). Alguns autors senyalen la inducció de l'apoptosi i la disminució de l'activitat de la telomerasa com a responsables de l'efecte citotòxic directe de BCG (Sasaki, 1997; Saitoh, 2002). Encara que el possible mecanisme no es coneix exactament, es creu que l'increment del NO induït pel bacil internalitzat, podria ser el causant del dany del DNA i dels conseqüents efectes citotòxics (Jansson, 1998; Mitropoulos, 2000).

Com a conseqüència de l'alteració fenotípica de les cèl·lules tumorals causada pel BCG, també s'indueix la secreció de diverses citocines, com l'IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , entre d'altres (Bever, 2004; Shintani, 2007; Saban, 2008), i l'increment de l'expressió de molècules d'adhesió (ICAM-1), produint-se una infiltració masiva en la paret de la bufeta (**Fig. A.6**). Aquesta reacció inflammatòria local en la mucosa de la bufeta es caracteritza per la presència, en primer lloc, de cèl·lules polimorfonuclears (PMN) que al ser estimulades pel BCG secreten quimiocines i altres citocines dirigint, inicialment, una resposta local (Suttman, 2006). Posteriorment, nombroses cèl·lules T (CD4⁺ i CD8⁺) i macròfags són atrets (Ratliff, 1993 (b)), el que comporta una secreció de citocines pro-inflamatòries Th1 que sovint suposa una resposta favorable. Ntre aquestes citocines, s'ha demostrat que la secreció d'IL-12 i IFN- α pels monòcits activats per BCG és indispensable per a l'activació de cèl·lules citotòxiques, com per exemple les cèl·lules NK, les cèl·lules T CD8⁺, els macròfags i els limfòcits γ/δ (Suttman, 2004) (**Fig. A.6**).

Figura A.6. Mecanisme d'acció del BCG en la resposta antitumoral front el càncer de bufeta

Imatge adaptada d'Ahirwar, 2011.



A.2.3.2.1. Cèl·lules participants en la resposta immunitària induïda pel BCG

Cèl·lules presentadores d'antígens

L'activació de la resposta immunitària és, principalment, característica de les cèl·lules presentadores d'antigen professionals, com les **DC** i els **macròfags**. Diversos treballs han mostrat que les **cèl·lules tumorals** de bufeta també poden actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen.

Aquestes cèl·lules, de la mateixa manera que la majoria de les cèl·lules, expressen la molècula **MHC I**, encarregada de presentar els antígens endògens, els quals han estat processats al citoplasma i transportats al reticle endoplasmàtic prèviament. Aquests antígens endògens seran reconeguts pels limfòcits T CD8⁺ citotòxics (Buus, 1987; Bjorkman, 1990) (**Fig. A.6**).

En canvi, la molècula **MHC II**, presentadora dels antígens exògens, s'expressa a les cèl·lules presentadores d'antigen (macròfags, limfòcits B, DC i cèl·lules de Langerhans). Aquests antígens exògens han estat processats als lisosomes i units al MHC II abans de migrar a la superfície cel·lular per tal de ser reconeguts pels limfòcits T CD4⁺ (Allen, 1984).

Diferents estudis han demostrat que la teràpia amb BCG pot incrementar l'expressió de les molècules MHC I i II de les cèl·lules urotelials (Saint, 1996; Ikeda, 2002), de manera que les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques i T CD4⁺ podrien reconèixer els antígens presentats. S'ha demostrat que l'expressió de MHC I i II en les cèl·lules tumorals incrementa en els pacients que responen al tractament amb BCG (Sanders, 1991; de Boer, 1991), i que els limfòcits T CD8⁺ i CD4⁺ estan presents a la paret de la bufeta després del tractament.

Per una altra banda, els antígens lipídics i glicolipídics són presentats a les cèl·lules T per les molècules **CD1**. La teràpia amb BCG és capaç d'incrementar l'expressió d'aquestes molècules en les cèl·lules tumorals de bufeta (Ikeda, 2002), de manera que també participen en el mecanisme d'acció del bacil.

Macròfags

A banda de ser cèl·lules presentadores d'antigen, molts estudis han demostrat la seva activitat citotòxica front les línies cel·lulars de càncer de bufeta (Patard, 1998; Yamada, 2002; Luo, 2006). Aquesta activitat citotòxica s'ha demostrat, *in vitro*, que es dona a través del contacte directe amb la cèl·lula tumoral, o a través de la inducció de citocines (resposta Th1) i NO (Atkinson, 2000; Luo, 2006).

Després de les instil·lacions amb BCG, s'ha detectat la presència de macròfags, junt amb altres tipus cel·lulars, a la paret de la bufeta i a la orina dels pacients tractats (de Boer, 1991; Saint, 2001).

Neutròfils

Són les primeres cèl·lules fagocítiques infiltrades a la paret de la bufeta com a resposta a la instil·lació del BCG (Simons, 2008). Es caracteritzen per la secreció de citocines i quimiocines que atrauran altres tipus cel·lulars del sistema immune, i també del lligand TRAIL. Aquesta última molècula és capaç d'induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals.

S'ha demostrat que la presència de TRAIL en la orina de pacients amb càncer de bufeta està relacionada amb la resposta al tractament amb BCG (Ludwig, 2004).

Limfòcits T α/β

Diversos estudis han demostrat la importància de les cèl·lules **T CD4⁺ i CD8⁺** en la resposta tumoral mediada per BCG i la presència d'aquestes en la paret de la bufeta després del tractament, especialment del fenotip CD4 (Böhle, 1990; Leong,

1990; Ratliff, 1993 (b)). En un treball realitzat en model animal deficient del timus, es va observar una restauració de la resposta al tractament amb BCG després d'administrar cèl·lules T (Ratliff, 1987).

Les cèl·lules T CD4⁺ constitueixen les poblacions de limfòcits Th1 i Th2 (de "T helper"). Cada població produeix un perfil de citocines característic, de manera que les cèl·lules Th1 produeixen IL-2, IL-12, TNF-β i IFN-γ, i estan més involucrades en la resposta cel·lular. En canvi, les cèl·lules Th2 produeixen IL-4, IL-5 i IL-10, i juguen un paper important en la resposta humoral, podent inhibir la via Th1 (Kaufmann, 1995). En canvi, les cèl·lules T CD8⁺ són capaces de lliurar les cèl·lules infectades i de produir IL-2 i IFN-γ.

L'activació d'aquests limfòcits requereix de la unió del seu receptor a l'antigen presentat per la molècula MHC, i també la unió a una molècula co-estimuladora expressada en la cèl·lula presentadora d'antigen (ICAM-1, B7-1 i B7-2). En cèl·lules urotelials, s'ha observat un increment de l'expressió d'aquestes molècules després del tractament amb BCG (Jackson, 1995; Saint, 1996).

Després de la teràpia amb BCG s'ha observat un increment de la resposta Th1 respecte a la Th2, i s'ha evidenciat que aquesta resposta és fonamental per l'èxit de la teràpia, tant *in vitro* (Méndez-Samperio, 1999; Luo, 2003), com en model animal (McAveney, 1994; Shin, 1995), o en humans (Saint, 2001). De totes maneres, s'ha demostrat que el BCG també induïx la resposta Th2 (Atkins, 2003). En la orina dels pacients tractats amb BCG s'ha detectat citocines característiques de la resposta Th1, encara que també s'ha detectat IL-10 (Th2) (Jackson, 1995; Lattime, 1992).

També s'ha mostrat un increment de la proliferació de limfòcits de sang perifèrica i d'anticossos, en pacients amb càncer de bufeta superficial, com a resposta front a antígens micobacterians o proteïnes de shock tèrmic (hsp) (Zlotta, 1998). Degut al paper que juga la resposta immune com a biomarcador predictiu de la teràpia front el càncer (Studer, 1985; Zlotta, 1997), diversos treballs estudien la resposta humoral com a marcadors de pronòstic del càncer de bufeta. En aquest aspecte, es troben resultats contradictoris, possiblement degut a diferències entre els pacients seleccionats, defensant la presència d'anticossos front BCG o front antígens específics d'aquest (per exemple l'hsp 65) com a pronòstic positiu (Lamm, 1981; Ardelt, 2010) o negatiu de la teràpia amb BCG (van der Meijden, 1989; Zlotta, 1997).

Limfòcits T γ/δ

Aquests limfòcits són cèl·lules citotòxiques que no reconeixen els antígens a través de les molècules MHC. Reconeixen proteïnes micobacterianes, com les proteïnes hsp, superantígens (Janis, 1989; Havran, 1994), fosfoantígens i antígens lipídics. Es caracteritzen per produir citocines (com l'IL-2, IL-4 i IFN-γ i TNF-α), per destruir altres cèl·lules, com macròfags infectats amb micobacteris, a través de la perforina i granzims; i per destruir microorganismes i cèl·lules tumorals a través de la

granulinsina (Kabelitz, 2004). Es creu que juguen un paper important en la resposta immune innata primerenca front el càncer (Alexandroff, 1997; Naoe, 2007). S'ha demostrat que aquesta població cel·lular incrementa després del tractament amb BCG (Lee, 2004), i a més s'ha observat, *in vitro* i en model animal, que és capaç de lliurar les cèl·lules tumorals de bufeta (Higuchi, 2009; Yuasa, 2009) i d'altres tipus de càncer (Wrobel, 2007; Bouet-Toussaint, 2008).

L'IL-12, IL-1 β i TNF- α són capaces d'activar aquestes cèl·lules. S'ha demostrat que la producció d'aquestes citocines per DC activades amb extractes de BCG, *M. vaccae* i *M. obuense*, dóna lloc a l'activació de la resposta antitumoral dels limfòcits γ/δ *in vitro* (Fowler, 2012).

Limfòcits citotòxics inespecífics

Les cèl·lules **NK** són limfòcits CD3⁻, CD2[±], CD8[±], CD16[±], CD56⁺, i són els majors precursors dels limfòcits assassins activats per limfocines (**LAK**). Aquestes dues poblacions cel·lulars són capaces de lliurar, sense restricció per MHC, les cèl·lules tumorals després de ser estimulades amb BCG *in vitro* (Shemtov, 1995; Brandau, 2001), i de produir citocines com TNF- α i IFN- γ . La destrucció de la cèl·lula tumoral per part d'aquestes cèl·lules es produeix a través del lligant Fas, la perforina, i el TNF- α (Lee, 1996).

Els diversos estudis *in vitro* que s'han dut a terme durant aquests anys, han demostrat que les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica tenen capacitat antitumoral després de ser estimulades amb BCG (Pryor, 1995; Mizutani, 1992), i que els limfòcits T CD4⁺ i els monòcits participen en aquesta citotoxicitat induint la secreció d'IL-12, IL-2 i IFN- γ que són essencials en aquest procés (Thanhäuser, 1995). Aquestes cèl·lules efectores, les cèl·lules assassines activades per BCG (**BAK**), són capaces de destruir les cèl·lules tumorals (Thanhäuser, 1993; Kaasinen, 1993) a través de la perforina secretada (Brandau, 2000; Suttman, 2004).

A.2.3.2.2. Citocines i quimiocines involucrades en la resposta antitumoral

IFN- γ . Aquesta citocina és produïda per les cèl·lules T α/β , cèl·lules T γ/δ i cèl·lules NK. Es coneix com una molècula immunomoduladora, capaç d'incrementar l'expressió de MHC II en cèl·lules urotelials (Jackson, 1993). Aquesta citocina és capaç d'inhibir el creixement de les cèl·lules tumorals de bufeta *in vitro* (Hawkyard, 1992; Patard, 1996). En un estudi amb anticossos anti-IFN- γ s'observà una disminució de la capacitat antiproliferativa de BCG front les cèl·lules tumorals de bufeta (Kurusu, 1994).

Com ja hem vist a l'apartat A.1.7.2, l'**IFN- α** ha estat utilitzat com a immunoteràpic pel tractament del càncer de bufeta.

IL-2. Aquesta citocina és secretada per limfòcits T CD4 i CD8 activats. És un factor de creixement dels limfòcits T, capaç d'induir la producció d'IFN i TNF- α . La seva producció s'ha vist relacionada amb una teràpia amb BCG exitosa (Saint, 2003;

Watanabe, 2003). La seva expressió per cèl·lules mononuclears de sang perifèrica activades per BCG, estimula la generació de cèl·lules LAK, les quals, com hem explicat anteriorment, són citotòxiques front les cèl·lules tumorals de càncer de bufeta. A l'apartat A.1.7.2 ja hem vist que ha estat estudiada com a possible adjuvant en combinació amb BCG pel tractament del càncer de bufeta en un model animal.

IL-6. Aquesta citocina és produïda per monòcits, macròfags, limfòcits, fibroblasts i cèl·lules endotelials (Kishimoto, 1989). En el context del càncer, el seu paper depèn del tipus tumoral, donant lloc a diferents efectes (DeMichele, 2003). S'ha descrit la seva capacitat per promoure el creixement de cèl·lules immunitàries i per incrementar l'activitat de cèl·lules NK, LAK i limfòcits (Nishimoto, 2006). S'ha descrit el seu potencial per inhibir el creixement tumoral (Revel, 1992), com la seva capacitat estimuladora de la proliferació tumoral (Okamoto, 1997). Com ja hem vist, el BCG és capaç d'induir la seva producció en les cèl·lules tumorals de bufeta, i a més, s'ha detectat la seva presència en la orina dels pacients tractats amb BCG (Sanchez-Carbayo, 2001).

IL-8. Aquesta quimiocina és secretada per un ampli ventall de tipus cel·lulars (leucòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials, cèl·lules tumorals, etc.). Té la capacitat d'activar els neutròfils, així com d'atraure eosinòfils i basòfils. La seva detecció en la bufeta s'ha utilitzat com a marcador predictiu de la resposta clínica al BCG (de Boer, 1997; Shintani, 2007). En ratolins, aquesta quimiocina rep el nom de KC (de l'anglès, *Keratinocyte-derived Cytokine*)

IL-10. Aquesta citocina és produïda per diversos tipus cel·lulars activats, com cèl·lules T CD4 Th2, cèl·lules B, macròfags, monòcits i queratenòcits (Goldman, 1995). Regula la resposta immunitària inhibint la producció de citocines Th1 i bloquejant l'expressió de la molècula MHC II i de molècules co-estimuladores (Moore, 2001; Petit-Bertron, 2005).

IL-12. Aquesta citocina és produïda principalment per cèl·lules presentadores d'antigen, monòcits i macròfags. És una citocina pro-inflamatòria involucrada en la resposta Th1, capaç d'estimular la proliferació de cèl·lules T activades i cèl·lules NK (Zaharoff, 2009). A través de l'activació de les cèl·lules NK i limfòcits T, de la inducció de la secreció de citocines, i de la inhibició de l'angiogènesi, mostra la seva acció antitumoral (DeBlaker-Hohe, 1995; Stern, 1996).

IP-10 (de l'anglès *Interferon-inducible Protein 10 kDa*). Aquesta quimiocina, també anomenada CXCL10, està involucrada en l'efecte antitumoral de la teràpia amb BCG, i s'ha detectat en l'orina de pacients tractats (Poppas, 1998). La seva activitat anti-angiogènica ha estat descrita per diferents autors (Strieter, 1995; Rosenkilde, 2004).

RANTES (de l'anglès *Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted*). Aquesta quimiocina, també anomenada CCL5, és una potent molècula quimiotàctica que atrau monòcits i cèl·lules T de memòria. Es troba incrementada en pacients amb càncer de bufeta que han estat tractats amb BCG (Reale, 2002).

TNF- α . Aquesta citocina és produïda pels monòcits i macròfags, cèl·lules T, cèl·lules B, cèl·lules NK, fibroblasts i algunes cèl·lules tumorals.

Juntament amb el **NO**, estan relacionats amb la regulació de la proliferació cel·lular. L'activitat antitumoral dels macròfags és deguda, en part, per la producció d'aquestes molècules (Luo, 2004; Yamada, 2002). El TNF- α i el NO són capaços d'induir la mort cel·lular a través dels mecanismes de l'apoptosi (Laster, 1988; Ware, 1996).

TRAIL. Pertany a la família de les molècules TNF i és expressat pels neutròfils. Com ja hem mencionat anteriorment, s'ha detectat en pacients que han respost a la teràpia amb BCG (Ludwig, 2004), suggerint el paper important dels neutròfils en la resposta induïda pel BCG (Simons, 2007 (b); Rosevear, 2009). A més, s'ha demostrat la seva capacitat antitumoral *in vitro* (Szliszka, 2009).

A.2.3.2.3. Funció dels receptors Toll-like en la resposta immunitària induïda pel BCG

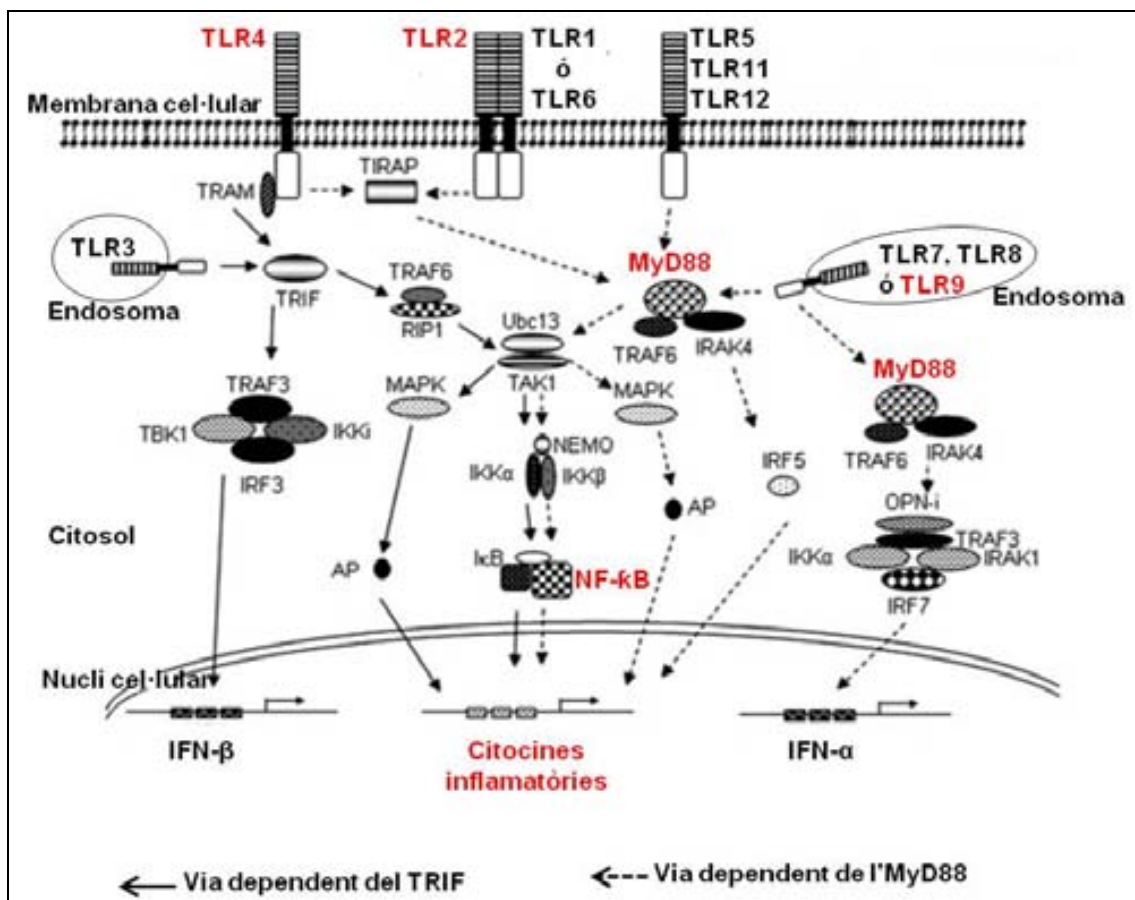
Els TLR són un conjunt de proteïnes, moltes d'elles transmembranals, que formen part de la resposta immunitària innata (Takeda, 2005). Són capaços de reconèixer els patrons moleculars associats a patògens, els quals es troben en molècules de bacteris gram-negatius i -positius, de DNA i RNA viral, de fongs i protozous (Liew, 2005). D'aquesta manera, els TLR-1, -2, -4, i -6 reconeixen molècules que contenen lípids, mentre que els TLR-3, -7, -8, i -9 reconeixen àcids nucleics (Akira, 2006), i el TLR5 la flagelina (Hayashi, 2001). Per una altra banda, aquests receptors també reconeixen diversos lligands expressats en diferents tipus cel·lulars com a resposta front l'estrès.

La seva senyalització pot estar associada a la molècula adaptadora MyD88, la qual, a través d'altres molècules, activarà el factor de transcripció NF- κ B i conseqüentment s'induirà la producció de citocines inflamatòries. Els TLR-7 i -9 també poden activar, a través de l'MyD88, la molècula IRF-7 que estimularà la producció d'IFN (Fig. A.7).

Els TLR-3 i -4, actuen a través de l'adaptador TRIF en lloc de l'MyD88. Aquest adaptador també acabarà activant el NF- κ B, i la molècula IRF-3 que estimularà la transcripció de l'IFN. El TLR-4, és l'únic que pot actuar de manera dependent o independent a l'MyD88 (Fig. A.7).

L'activació d'aquests receptors indueix la resposta immune innata i també participa en l'activació, maduració i regulació de la resposta adaptativa (Iwasaki, 2004). Indueix la producció de citocines pro-inflamatòries (IL-1, IL-6, TNF- α) i quimiocines (IL-8, RANTES) (Ghosh, 2006). Regula el reclutament de monòcits, neutròfils i cèl·lules NK a través de la inducció de l'expressió de molècules d'adhesió i integrines (Laudanna, 2002; Iwasaki, 2004). Incrementa la producció de molècules coestimuladores en les cèl·lules presentadores d'antigen (CD40, CD80, CD86) i el MHC i, conseqüentment, l'activació dels limfòcits T (Hoebe, 2003; Iwasaki, 2004).

Figura A.7. Esquema representatiu de la senyalització a través dels TLR
 Imatge adaptada de Chen, 2007 (a); i Jenkins, 2010.



Com s'ha explicat a l'apartat A.2.2, es coneix que els micobacteris són una font de molècules moduladores del sistema immune humà. L'esquelet de la paret cel·lular, els àcids micòlics (Korf, 2005), el DMT, el LAM, el peptidoglicà, o l'àcid muràmic interactuen directament amb el sistema immune innat. S'ha descrit que alguns d'aquests antígens són reconeguts pels receptors TLR. Aquests receptors, com s'ha explicat anteriorment, estan implicats en l'activació de macròfags i la maduració de DC, determinants per al processament i presentació de pèptids tumorals i per a la producció de citocines, bàsiques en la immunoteràpia antitumoral. Aquests receptors

estan directament involucrats en la inducció de la immunitat antitumoral (Okamoto, 2003).

Tsuji i col·laboradors (2000), van demostrar que la maduració de les DC i la inducció de citocines, utilitzant la paret cel·lular de BCG, és a través del TLR-2 i -4. Concretament, es va descriure el peptidoglicà com la part de la paret cel·lular implicada en aquesta resposta (Uehori, 2003). En canvi, utilitzant el bacil sencer, s'ha observat que aquest activa el TLR-2 preferentment més que el TLR-4 (Fricke, 2006).

El LAM o la lipoproteïna 19 KDa actuen a través del TLR-2 (Brightbill, 1999; Means, 1999). Hemmi i col·laboradors (2000), van descobrir una nova molècula de la família dels TLR, TLR9, que reconeix específicament DNA-CpG no metilat bacterià, tenint efectes immuno-estimuladors, incloent la immunitat antitumoral. La senyalització a través del TLR9 activa nombroses poblacions de cèl·lules immunes i condueix a la resposta immune cap a un fenotip Th1. De manera interessant, els micobacteris tenen el contingut més elevat de CpG d'entre tots els procariotes, de fet, la major part del treball pioner en DNA immuno-estimulador, va ser realitzat en estudis de resistència tumoral mediat per BCG (Atkins, 2003).

A més, recentment s'ha descrit que les cèl·lules epitelials també poden reconèixer antígens de BCG a través dels TLR (Miyazaki, 2006).

A.2.3.3. Inducció de la mort cel·lular per part de BCG

A.2.3.3.1. El cicle cel·lular

Les cèl·lules eucariotes realitzen un conjunt de fases on cada fase nova, requereix que l'anterior s'hagi completat perfectament. El conjunt de fases s'anomena "cicle cel·lular", i la seva funció és que la divisió de la cèl·lula es realitzi preservant l'informació genètica de la cèl·lula mare (Sherr, 1996). Les fases que tenen lloc són les següents:

- Fase G0: la cèl·lula està en repòs (quiescència).
- Fase G1: la cèl·lula es prepara per a sintetitzar DNA.
- Fase S: síntesi de DNA.
- Fase G2: la cèl·lula es prepara per a la divisió cel·lular. La cèl·lula conté el doble de quantitat de DNA que en la fase G1.
- Fase M: la cèl·lula es divideix (mitosi).

Entre les fases G1/S i G2/M es troben els "punts de restricció", encarregats de controlar l'ordre de les passes que s'han de dur a terme i el temps de transició entre ells dins del cicle cel·lular. D'aquesta manera, la cèl·lula s'assegura que els punts crítics (la replicació del DNA i la segregació cromosòmica) es realitzin correctament. Quan es detecta un dany en el DNA, el cicle cel·lular s'atura i s'indueix la transcripció

dels gens de reparació. La pèrdua o mutació d'aquests gens produeix una "inestabilitat genòmica" que induirà la transformació de la cèl·lula normal a cancerosa (Strauss, 1995, Kamb, 1995). Quan el dany és irreparable per la maquinària cel·lular s'indueix la mort cel·lular programada (apoptosi).

Molts dels fàrmacs anticancerígens utilitzats avui en dia, actuen interferint en la divisió de la cèl·lula, aturant el cicle cel·lular. Diferents autors han demostrat que l'acció antitumoral directa de BCG és deguda a la seva capacitat per induir l'arrest cel·lular de les cèl·lules tumorals *in vitro* (Chen, 2005; See, 2010).

A.2.3.3.2. La necrosi

La necrosi correspon a un procés de mort cel·lular front un dany greu en la cèl·lula. És un procés passiu, ja que no requereix la participació activa de la cèl·lula i pot afectar a una zona més o menys àmplia de teixit. Degut a l'alteració de la permeabilitat de la membrana plasmàtica, té lloc l'entrada de Ca^{2+} acompanyada amb l'entrada passiva d'aigua i un flux anormal d'ions, el que provoca una ruptura osmòtica de la cèl·lula i conseqüentment es desencadena una resposta inflamatòria.

Els canvis morfològics que es poden observar durant aquest procés són: la dilatació de la cèl·lula i del mitocondri, la vacuolització i dilatació del reticle endoplasmàtic, l'increment de la permeabilitat i la condensació del nucli (picnosi), la dissolució de la cromatina, i l'alliberació del contingut cel·lular activant una resposta inflamatòria que induirà un fenomen necròtic a les cèl·lules veïnes (Cameron, 2000).

La possibilitat de que BCG actuï inhibint la proliferació tumoral mitjançant la inducció de la necrosi ha estat suggerida per diferents autors, (Seow, 2002; DiPaola, 2007; See, 2009). Com a conseqüència de la necrosi s'alliberen diferents proteïnes cel·lulars, com per exemple l'HMGB1 (de l'anglès, *high-mobility group protein B1*), que podrien jugar un paper important en la resposta immunitària antitumoral posterior (See, 2009).

A.2.3.3.3. L'apoptosi

El terme d'apoptosi és conegut com mort cel·lular programada, donat que la cèl·lula té la capacitat d'activar la maquinària de mort com a resposta a determinats estímuls.

En el procés d'apoptosi la cèl·lula participa activament en benefici de la resta de l'organisme. Existeix una regulació a nivell genètic, i té lloc en el desenvolupament embrionari, en el manteniment de l'homeòstasi dels teixits i de l'envelliment cel·lular, en el mecanisme de defensa per tal d'eliminar de l'organisme les cèl·lules danyades, mutades o infectades, o com a resposta a diferents agents externs (agents

quimioteràpics, radiacions ionitzants). A diferència del procés anterior, la necrosi, no s'origina una resposta inflamatòria, i per tant no hi ha un dany tissular.

Els canvis morfològics característics d'aquest procés de mort cel·lular són: la pèrdua de contacte cèl·lula-cèl·lula i l'adquisició d'una forma arrodonida, la condensació i fragmentació de la cromatina nuclear, la disgregació del nucli i la disminució del volum citoplasmàtic (degut a la pèrdua d'aigua i la condensació de les proteïnes), la ruptura cel·lular en vesícules rodejades de membrana (cossos apoptòtics) les quals seran fagocitades per macròfags o cèl·lules veïnes.

Paral·lelament a aquests canvis, també apareixen processos bioquímics característics. S'activen les caspases (proteases-cisteïna-aspartat) iniciadores (caspasa 2, 8, 9 i 10) front els senyals d'estrès, dany cel·lular o mort, les quals proteolitzaran i activaran les caspases efectores (caspasa 3, 6 i 7) que proteolitzaran diferents substrats que conduiran a la mort cel·lular per apoptosi (Nuñez, 1998; Thornberry, 1998). S'activen les endonucleases dependents de Ca^{2+} i Mg^{+} , que tallen el DNA genòmic pels espais internucleosomals, donant lloc a fragments de 180 parells de bases o múltiples. Es dona una pèrdua del potencial mitocondrial i canvis en la membrana plasmàtica; els residus de fosfatidilserina es trasloquen de la cara interna a la cara externa de la membrana cel·lular, facilitant el reconeixement d'aquestes cèl·lules pels macròfags (Kerr, 1994).

Diferents senyals d'estrès o estímuls fisiològics (alteracions del cicle cel·lular, lesions del DNA, presència o absència de determinades citocines o factors de creixement, determinades infeccions, drogues i toxines, etc.) poden ser els inductors d'apoptosi a través d'una o més vies de senyalització, en funció de la cèl·lula i del tipus de senyal rebuda. Finalment, aquestes vies específiques donaran lloc a un mateix mecanisme final que destruirà la cèl·lula (Krammer, 1994). Durant aquest procés participen nombroses molècules de la superfície cel·lular, del citosol, mitocondrials i nuclears.

Diferents autors han descrit la capacitat *in vitro* de BCG per induir la mort de les cèl·lules tumorals de bufeta per apoptosi, tant indirectament (a través del sistema immunitari) (Shemtov, 1995; Papageorgiou, 2004) com directament (Sandes, 2007; Schwarzer, 2010). També s'ha demostrat la capacitat de MCC per activar l'apoptosi directament (Filion, 1999). Per una altra banda, hi ha treballs que manifesten que BCG inhibeix el mecanisme de l'apoptosi (Chen, 2007 (b)), i que la seva activitat antitumoral directa es deuria a altres mecanismes diferents (Sasaki, 1997; Fontana, 1999).

Com acabem d'explicar en aquesta introducció, un 75-85% dels pacients de càncer de bufeta presenten càncer superficial en el moment que es diagnostiquen. Referent a la teràpia intravesical amb BCG que s'aplica a aquests pacients per tal de prevenir les recurrències i la progressió del tumor, encara existeixen diferents aspectes que cal resoldre o que es poden millorar.

El fet de que actualment s'estiguin utilitzant diferents soques de BCG, suggereix la possibilitat de que cada una d'elles indueixi una resposta antitumoral i immunoestimuladora diferent, de la mateixa manera que s'ha observat en el context de la tuberculosi. A més, tot i els beneficis de la teràpia amb BCG en el tractament del càncer de bufeta, aquest té les seves limitacions i com ja hem mencionat anteriorment, ocasiona alguns problemes que comprometen el seu ús. Degut a tots aquests inconvenients és necessari trobar nous agents, més eficaços i segurs que BCG viu, en la immunoteràpia antitumoral.

D'aquesta manera, els objectius d'aquesta tesi són els que es detallen a continuació:

B. OBJECTIUS

B. OBJECTIUS

Els objectius de la tesi han estat els següents:

- I. Comparar l'activitat antitumoral directa de diferents soques de BCG evolutivament primerenques i tardanes

- II. Avaluar l'activitat antitumoral directa de diferents micobacteris ambientals de creixement ràpid en línies tumorals de bufeta humanes. Estudiar el mecanisme mitjançant el qual té lloc la inhibició de la proliferació cel·lular i la inducció de la producció de citocines.

- III. Avaluar l'activitat antitumoral indirecta de diferents micobacteris ambientals de creixement ràpid. Estudiar la seva capacitat d'activació de cèl·lules del sistema immunitari, i avaluar l'activitat citotòxica en aquestes cèl·lules activades. Estudiar la implicació dels receptors toll-like en aquesta activitat citotòxica.

C. MATERIAL I MÈTODES

C. MATERIAL I MÈTODES

C.1. Obtenció i cultiu dels microorganismes

C.1.1. Soques bacterianes

Per a determinar les diferències en la capacitat antitumoral directa entre diferents soques de *M. bovis* BCG, van ser escollides les següents:

- Connaught (ATCC 35745), obtinguda d'Aventis Pasteur Laboratories (ImmunoCyst), Toronto, Ontario, Canadà.
- Phipps (ATCC 35734), obtinguda de la col·lecció espanyola de cultius tipus (CECT)
- Tice (ATCC 27289) obtinguda de la col·lecció alemanya de microorganismes i cultius cel·lulars (DSMZ)
- Russian (ATCC 35740), cedida cordialment pel Dr. Carlos Martín (Laboratori de Genètica Molecular de Micobacteris, Universitat de Saragossa, Espanya) (2)
- Moreau (35736), (2)
- Danish (35733), (2)
- Glaxo (35741), cedida pel Dr. Jun Liu (Departament de Genètica Mèdica i Microbiologia, Universitat de Toronto, Canada) (3)
- Japan (ATCC 35737), (3)

Per estudiar la capacitat antitumoral de diferents micobacteris ambientals es van seleccionar les següents espècies de creixement ràpid, classificades amb un nivell de bioseguretat 1:

- *M. spp.*, obtinguda de la col·lecció de soques del nostre laboratori (Laboratori de Micobacteriologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Espanya) (4)
- *Mycobacterium confluentis* (ATCC 49920), obtinguda de la DSMZ
- *Mycobacterium hiberniae* (ATCC 49874), obtinguda de la DSMZ
- *Mycobacterium mageritense* (ATCC 700351), obtinguda de la DSMZ

Paral·lelament, es van seleccionar dues espècies micobacterianes de creixement ràpid, classificades amb un nivell de bioseguretat 2, però amb unes característiques rellevants pel seu paper antitumoral descrit prèviament per altres autors:

- *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) (4)
- *Mycobacterium vaccae*, (ATCC 15483) (4), que originàriament té una morfologia colonial llisa (S)
- *Mycobacterium vaccae*, variant de morfologia colonial rugosa (R), obtinguda a partir de l'anterior al nostre laboratori

També es va escollir un micobacteri amb un nivell de bioseguretat 2 i amb la característica de ser l'únic micobacteri no patògen que comparteix amb BCG, i altres micobacteris descrits com a patògens, la presència de dimicocerosats de tiocerol (PDIM) i glicolípid fenòlics (PGL). Tots dos són lípids de la paret cel·lular i relacionats amb la virulència de micobacteris patògens (Ortalo-Magné, 1996).

- *Mycobacterium gastri* (ATCC 15754), (4)

Com a controls negatius es va escollir els següents bacteris, corresponents a un gramnegatiu i grampositiu, respectivament:

- *Escherichia coli* (ATCC 10536), (4)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), (4)

Les condicions de cultiu (medi de cultiu, temperatura i temps de creixement) de cada microorganisme es troben resumides a la **taula C.1**.

Taula C.1. Característiques dels diferents microorganismes utilitzats

Bacteri	ATCC	Nivell bioseguretat	Lloc d'obtenció	Medi de cultiu	Tª (°C)	Temps (dies)
BCG Connaught	35745	2	(1)	7H10, 7H11	37	15
BCG Danish	35733	2	(2)	7H10	37	15
BCG Glaxo	35741	2	(3)	7H10	37	15
BCG Japan	35737	2	(3)	7H10	37	15
BCG Moreau	35736	2	(2)	7H10	37	15
BCG Phipps	35734	2	CECT	7H10	37	15
BCG Tice	27289	2	DSMZ	7H10	37	15
BCG Russian	35740	2	(2)	7H10	37	15
<i>M. spp.</i>		1	(4)	7H10, 7H11	37	7
<i>M. confluentis</i>	49920	1	DSMZ	7H10	37	7
<i>M. hiberniae</i>	49874	1	DSMZ	7H10	37	15
<i>M. mageritense</i>	70035	1	DSMZ	7H10	37	7
<i>M. gastri</i>	15754	2	(4)	7H10, 7H11	37	15
<i>M. phlei</i>	11758	2	(4)	TSA	37	7
<i>M. vaccae</i>	15483	2	(4)	TSA	30	7
<i>E. coli</i>	10536	1	(4)	LB	37	1
<i>E. faecalis</i>	19433	2	(4)	LB	37	2

(1) Aventis Pasteur Laboratories (ImmunoCyst)

(2) Cedida cordialment pel Dr. Carlos Martín (Laboratori de Genètica Molecular de Micobacteris, Universitat de Saragossa, Saragossa, Espanya)

(3) Cedida pel Dr. Jun Liu (Departament de Genètica Mèdica i Microbiologia, Universitat de Toronto, Toronto, Canada)

(4) Laboratori de Micobacteriologia, UAB, Barcelona, Espanya

CECT, col·lecció espanyola de cultius tipus.

DSMZ, col·lecció alemanya de microorganismes i cultius cel·lulars.

7H10 i 7H11, medi sòlid Middlebrook 7H10 i 7H11, respectivament.

TSA, medi sòlid agar de triptona de soja.

LB, medi sòlid Luria Bertani.

T^a, temperatura.

C.1.2. Medis de cultiu

Els medis de cultiu que es van fer servir pel creixement dels diferents microorganismes van ser:

Medi Middlebrook 7H10

Aquest medi consisteix en agar Middlebrook 7H10 suplementat amb 10% d'Oleic-Albumina-Dextrosa-Catalasa (OADC).

1. Per preparar l'OADC es van afegir a 100 ml d'aigua destil·lada:

- Albúmina sèrica bovina (BSA), fracció V (Roche, Basilea, Suïssa) 5 g
- Glucosa (Panreac, Barcelona, Espanya) 2 g
- Clorur de sodi (Panreac) 0,85 g
- Catalasa (Sigma, St. Louis, Missouri, Estats Units) 4 mg
- Àcid oleic (Sigma) 0,05 g

2. Després de dissoldre els components es va esterilitzar la barreja per filtració i s'incubà durant 24 hores a 37°C per tal de comprovar que no hi hagués creixement microbiològic.

3. Un cop comprovat que el OADC no estigués contaminat es va procedir a preparar el medi Middlebrook 7H10. Es van afegir a 900 ml d'aigua destil·lada:

- Agar Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, Michigan, Estats Units) 19 g
- Glicerol (Panreac) 5 ml

4. Després de barrejar els components, es va autoclavar a 121°C durant 10 minuts. Una vegada refredat per sota dels 60°C, es va afegir l'OADC preparat i es dispensà en plaques de Petri.

Medi Middlebrook 7H11

Aquest medi és una modificació de l'anterior, 7H10, ja que se li ha afegit hidrolitzat de caseïna. Es va utilitzar suplementat amb OADC, 64 U / ml de polimixina B i 5 µg / ml d'amfotericina B.

Es van comprar plaques de Petri amb aquest medi de cultiu a l'Hospital Karolinska de Solna, Suècia.

En els experiments d'infecció dels macròfags derivats de medul·la òssia i de la línia tumoral MB49, BCG, *M. spp.* i *M. gastri* es van fer créixer en aquest medi, en lloc de fer-ho en 7H10.

Medi agar de triptona de soja (TSA)

1. A 1000 ml d'aigua destil·lada es va afegir:

- TSA (Scharlau, Barcelona, Espanya) 40 g

2. Després de barrejar, es va autoclavar a 121°C durant 15 minuts. Una vegada refredat es dispensà en plaques de Petri.

Medi agar Luria Bertoni (LB)

1. A 1000 ml d'aigua destil·lada es va afegir:

- Triptona (Scharlau) 10 g
- Extracte de llevat (Panreac) 5 g
- Clorur de sodi (Panreac) 10 g

2. Després de barrejar i ajustar a pH 7, es va afegir 15 g d'agar bacteriològic (Scharlau). Posteriorment, es va autoclavar a 121°C durant 15 minuts. Una vegada refredat es dispensà en plaques de Petri.

C.1.3. Manteniment de les soques bacterianes

Per a la conservació a llarg termini dels microorganismes, les colònies crescudes en la placa de cultiu es van mantenir a -40°C en vials estèrils amb 1 ml de medi de conservació estèril.

El medi de conservació va consistir en llet desnatada en pols al 20% en aigua (p/v), el qual es va autoclavar a 115°C durant 15 minuts i es va deixar refredar abans d'utilitzar.

Per a descongelar els microorganismes, es va sembrar per esgotament en estria 100 µl de la solució bacteriana anterior, parcialment descongelada, en una placa de Petri amb el medi de cultiu adient.

Les plaques de Petri on es van fer créixer els micobacteris en medi sòlid, es van segellar amb Parafilm per a evitar la dessecació. Passat el temps necessari de creixement, a la temperatura corresponent, es va tornar a fer una sembra.

C.2. Anàlisi dels lípids i glicolípidis dels micobacteris

C.2.1. Extracció i anàlisi de lípids, glicolípidis i fosfolípids lliures

Obtenció de l'extracte cru mitjançant extracció amb solvents orgànics

1. Les colònies de micobacteris crescudes en placa es van recollir de la superfície d'agar i es van dipositar en un matrau on es van resuspendre amb una solució de cloroform i metanol (1:2, v/v). Es van mantenir en agitació constant durant 24 hores a T^a ambient, facilitant d'aquesta manera l'extracció dels lípids i glicolípidis lliures que es troben a la paret cel·lular del micobacteri.
2. Es va filtrar la barreja per separar les restes cel·lulars. La fase líquida es va evaporar amb l'ajuda d'un rotavapor (Büchi, model 461, Flawil, Suïssa).
3. Les restes cel·lulars separades es van resuspendre amb una solució de cloroform i metanol (2:1, v/v) i es van mantenir en agitació constant durant 24 hores a T^a ambient.
4. Es va filtrar la barreja. La fase líquida es va ajuntar amb l'anterior, i es va evaporar amb un rotavapor obtenint l'extracte lipídic total.
5. L'extracte lipídic obtingut es va resuspendre amb una solució de cloroform/metanol/aigua destil·lada (8:4:2, v/v/v). L'aigua utilitzada contenia un 0,04% de clorur de sodi per tal de minimitzar la formació d'una interfase entre la fase aquosa (superior) i l'orgànica (inferior).
6. Finalment, es va recuperar la fase orgànica, la qual contenia l'extracte glicolipídic i es va evaporar sota corrent de nitrogen. L'extracte cru es va mantenir a 4°C fins a la seva utilització.

Anàlisi per cromatografia en capa fina (CCF) analítica unidimensional

Els lípids, els glicolípidis i els fosfolípids lliures extrets presents a l'extracte cru, es van analitzar per CCF unidimensional en plaques de gel de sílice 60 (0,25 mm de gruix, 20 cm x 20 cm; Merck, Darmstadt, Alemanya).

1. L'extracte cru es va resuspendre amb 0,5-1 ml de cloroform. Es va dipositar 10 µl a la superfície de la placa amb un capil·lar de vidre calibrat.
2. Un cop les mostres estiguessin seques, es va posar la placa dins d'una cubeta saturada amb els solvents adients: cloroform/metanol (10:90 o 85:15, v/v) o cloroform/metanol/aigua destil·lada (90:10:1 o 30:80:1 o 60:35:8, v/v/v). Es va eluir una vegada fins a 2 cm de la part superior d'aquesta.
3. Finalment, les mostres es van revelar per polvorització. Els reveladors utilitzats van ser:

- Antrona a l'1% (p/v) en àcid sulfúric i escalfament a 120°C durant uns minuts amb una placa calefactora (Camag, Muttenz, Suïssa). Els compostos que contenen carbohidrats, els glicolípid, es visualitzaren de color blau.
- Dittmer (òxid de molibdè a l'1,3% en àcid sulfúric 4,2 M) i repòs a T^a ambient. Els compostos que contenen fòsfor, els fosfolípids, es visualitzaren de color blau.

Els lípids, glicolípid i fosfolípids es van identificar comparant el seu recorregut cromatogràfic amb compostos coneguts i purificats prèviament a partir de *M. tuberculosis* H37Rv.

Solucions, sals i reactius

- Àcid sulfúric (Carlo Erba, Rodano, Milà)
- Antrona (Sigma)
- Cloroform (Carlo Erba)
- Clorur de sodi (Panreac)
- Dittmer (Sigma)
- Metanol (Carlo Erba)

C.2.2. Extracció i anàlisi de MK i PDIM

Extracció amb solvents orgànics

1. Es van dipositar uns 50 mg (pes humit) de colònies micobacterianes crescudes en placa, en tubs de vidre, amb taps amb recobriment intern de tefló, amb 2 ml d'una solució de metanol i clorur de sodi 0,3% (p/v) en aigua (100:10, v/v) i 1 ml d'hexà.
2. Aquesta barreja es va mantenir en agitació durant 15 minuts per aconseguir que tot el material cel·lular estigués en contacte amb el reactiu.
3. Es va deixar reposar fins la visualització de dues fases diferenciades. La fase superior, corresponent a l'hexà, es va recuperar. Aquest pas es va repetir una segona vegada.
4. Finalment, es van ajuntar les dos fases d'hexà i es van evaporar sota corrent de nitrogen a 40°C.

Anàlisi per CCF analítica bidimensional (2D)

L'extracte obtingut es va analitzar mitjançant CCF analítica bidimensional en plaques de gel de sílice 60 (0,25 mm gruix, 20 cm x 20 cm, Merck).

1. Els lípids es van resuspendre amb 0,5-1 ml de cloroform i es va dipositar 10 µl a la superfície d'un quart de placa amb un capil·lar de vidre calibrat.
2. El tros de placa amb la mostra es va posar dins d'una cubeta saturada amb hexà i acetat d'etil (98:2, v/v) i es va fer pujar tres vegades en una mateixa direcció. Posteriorment, es va eluir en una segona direcció amb hexà i acetona (98:2, v/v) una vegada.
3. Les mostres es van revelar per polvorització amb àcid fosfomolibdic al 10% (p/v) en etanol absolut i escalfament a 120°C una placa calefactora. Amb aquest revelador es visualitzaren de color negre els compostos que contenen enllaços de carboni. Les MK i PDIM es van identificar comparant el seu recorregut cromatogràfic amb els mateixos compostos purificats prèviament a partir de *M. tuberculosis* H37Rv.

Solucions, sals i reactius

- Acetat d'etil (Merk)
- Acetona (Merk)
- Àcid fosfomolibdic (Merk)
- Cloroform (Carlo Erba)
- Clorur de sodi (Panreac)
- Etanol absolut (Carlo Erba)
- Metanol (Carlo Erba)
- n-hexà (Carlo Erba)

C.2.3. Extracció i anàlisi d'àcids micòlics

Per realitzar l'extracció dels àcids micòlics es van utilitzar dos protocols diferents: la metanòlisi àcida i la metanòlisi alcalina.

Extracció mitjançant la metanòlisi àcida

1. Es van dipositar uns 50 mg (pes humit) de colònies micobacterianes crescudes en placa en tubs de vidre amb taps amb recobriment intern de tefló. S'afegiren 2 ml d'una solució de metanol/toluè/àcid sulfúric (30:15:1, v/v/v).
2. Es va mesclar amb un vòrtex (Heidolph, model Reax 200, Schwabach, Alemanya), per a facilitar que el material cel·lular entrés en contacte amb la solució, i els tubs es van posar en un bany sec a 80°C durant 16 hores.
3. Es van deixar refredar els tubs a temperatura ambient, i es va afegir 2 ml d'hexà.
4. Es va barrejar amb un vòrtex i es va deixar en repòs fins la formació de dues fases. La fase superior, corresponent a l'hexà es va recuperar. Per obtenir un millor rendiment d'aquest procés, es van repetir els passos 3 i 4 del protocol.
5. Les fases corresponents a l'hexà es van ajuntar en un tub nou i es van evaporar sota corrent de nitrogen a 40°C.

Extracció mitjançant la metanòlisi alcalina

Aquest protocol consisteix en un procés d'alliberació dels àcids micòlics mitjançant la saponificació. Posteriorment, els àcids grassos no esterificats resultants es metilen, obtenint els èsters metílics (Daffé, 1982).

1. Es van dipositar uns 50 mg (pes humit) de colònies micobacterianes crescudes en placa en tubs de vidre amb taps amb recobriment intern de tefló, i es van barrejar amb 2 ml de solució de saponificació.

La solució de saponificació consisteix en metanol i benzè (8:2, v/v) al 5% (p/v) d'hidròxid de potassi. Aquesta solució serveix per a trencar l'enllaç entre l'arabinosa i l'àcid micòlic, i el potassi que conté s'uneix als grups àcid carboxílic dels àcids grassos lliures.

2. Es va mesclar amb un vòrtex i els tubs es van posar en un bany sec a 100°C durant 3 hores.
3. Un cop refredats els tubs a T^a ambient, les mostres es van acidificar afegint àcid sulfúric al 20% (v/v) fins arribar a pH 1.
4. Es va afegir 2 ml d'èter etílic. Després d'agitar la barreja es va deixar reposar fins la formació de dos fases. La fase superior, corresponent a l'èter etílic, es va recuperar. Aquest pas es va repetir una segona vegada i es van ajuntar les dos fases superiors en un tub nou.
5. Es va afegir 2 ml d'aigua destil·lada al tub amb l'èter etílic recuperat anteriorment. Es va barrejar amb un vòrtex i es va deixar en repòs fins la formació de dues fases. La fase inferior, corresponent a l'aigua, es va descartar. Aquest pas també es va repetir una segona vegada.
6. Per acabar de deshidratar la mostra, es va afegir sulfat de sodi anhidre i es va filtrar en un tub nou. El contingut d'aquest nou tub es va evaporar sota corrent de nitrogen a 40°C.
7. Els àcids micòlics es van resuspendre amb 2 ml de diazometà durant 15 minuts i a T^a ambient.
 - a) La solució diazometà serveix per a metilar els àcids micòlics convertint-se en no volàtils i/o no polars, i es prepara de la següent manera:
 - b) Es barreja en un matràs: 9 ml d'hidròxid de potassi al 40% (p/v) en aigua destil·lada amb 45 ml d'èter etílic i amb 3 g de N-nitroso-N-metil urea.
 - c) Aquesta mescla es manté en gel durant 30 minuts fins que es formen dues fases.
 - d) Recuperem la fase superior (de color més groguenc) en un matràs nou recobert amb lleties d'hidròxid de potassi.

- e) Finalment es segella amb Parafilm i es preserva a -20°C en absència de llum (condicions en les que és estable durant curts períodes de temps (dies)). Abans d'utilitzar aquesta solució necessita haver estat com a mínim una hora en aquestes condicions. És una substància altament tòxica i potencialment explosiva.

8. Finalment, es va evaporar la solució sota corrent de nitrogen a 40°C .

Anàlisi dels àcids micòlics per CCF analítica

El patró d'esters metílics dels àcids micòlics es va analitzar mitjançant CCF analítica unidimensional i bidimensional en plaques de gel de sílice 60 (0,25 mm gruix, 20 cm x 20 cm, Merck, Darmstadt, Alemanya).

1. Els àcids micòlics es van resuspendre en 0,5 ml d'hexà i es va aplicar 10 μl a la superfície de la placa amb un capil·lar de vidre calibrat.
2. La placa es va eluir de tres maners diferents:
 - amb una solució d'hexà i èter etílic (85:15, v/v), pujant la placa tres vegades en una única direcció.
 - amb diclormetà (100%), pujant la placa una vegada.
 - amb una solució d'èter de petroli (b.p. $60-80^{\circ}\text{C}$) i acetona (95:5, v/v), pujant la placa una vegada. Seguit d'una elució amb toluè i acetona (97:3, v/v) en una segona direcció.
3. Finalment, es va revelar polvoritzant la placa amb àcid fosfomolíbdic al 10% (p/v) en etanol absolut i escalfament a 120°C amb una placa calefactora. Els àcids micòlics es van identificar comparant el seu recorregut cromatogràfic amb àcids micòlics purificats prèviament a partir d'altres soques escollides.

Solucions, sals i reactius

- | | |
|-----------------------------------|---|
| • Acetat d'etil (Merk) | • Èter petroli ($60-80^{\circ}\text{C}$) (Carlo Erba) |
| • Acetona (Merk) | • Metanol (Carlo Erba) |
| • Àcid sulfúric (Carlo Erba) | • Hidròxid de potassi (Scharlab) |
| • Àcid fosfomolíbdic (Merk) | • NaCl (Panreac) |
| • Benzè (Carlo Erba, Arese, Milà) | • Na_2SO_4 anhidre (Merck) |
| • Diclormetà (Carlo Erba) | • N-nitroso-N-metil urea (Sigma) |
| • Etanol absolut (Carlo Erba) | • n-hexà (Carlo Erba) |
| • Èter etílic (Carlo Erba) | • Toluè (Carlo Erba) |

C.2.3.1. Ressonància magnètica nuclear (RMN)

Per tal de corroborar el patró d'àcids micòlics de la paret de *M. confluentis*, aquests es van purificar i analitzar mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN).

Purificació del compost

1. Els compostos es van purificar mitjançant CCF preparatives unidimensionals en plaques de gel de sílice 60 (0,25 mm gruix, 20 cm x 20 cm, Merck).
2. L'extracte dels àcids micòlics es va resuspendre amb 0,5 ml de n-hexà i es va aplicar a la superfície de la placa amb un capil·lar de vidre calibrat (10 µl) de manera contínua, formant una franja.
3. La placa amb les mostres es va eluir tres vegades amb una solució d'hexà i èter etílic (85:15, v/v). El patró dels àcids micòlics es va revelar utilitzant una cambra de vidre saturada amb vapors de iode. Els vapors de iode es dissolen en els compostos orgànics, de manera que aquests es visualitzaren com taques de color marró-groc.
4. Un cop s'identificaren les taques corresponents als compostos a purificar, es va recollir la sílice corresponent a la zona assenyalada pel iode.
5. Per tal de recuperar el compost de la sílice rascada, aquesta es va dissoldre en èter etílic i es va filtrar. Aquest procés es va repetir tres vegades. Els extractes recuperats es van concentrar per evaporació sota corrent de nitrogen.
6. Abans de l'anàlisi del compost per RMN, es va verificar la seva puresa per CCF, tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior (C.2.3).
7. Posteriorment, els compostos purificats es van dissoldre en 600 µl de cloroform deuterat, CDCl₃ (99,8% D), i es van traspasar a tubs de RMN.

Solucions sals i reactius

- n-hexà (Carlo Erba)
- Èter etílic (Carlo Erba)
- Cloroform deuterat (Cortecnet, Voisins-le-Bretonneux, França)

Anàlisi per RMN

L'anàlisi per RMN es va realitzar en un espectròmetre Bruker, model Avance II 600 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanya), equipat amb una sonda TBI de 5 mm i gradients en l'eix Z. El camp magnètic al qual es van realitzar els experiments va ser de 600,13 megahertz (MHz) per protó (¹H-RMN) i 150,90 MHz per carboni 13 (¹³C-RMN). Tots els experiments es van dur a terme a 298,0 K de T^a.

Els espectres de protó es van adquirir utilitzant una seqüència de polsos estàndard puls-adquisició de 90°, amb temps d'adquisició de 1,71 segons i temps de relaxació de 2 segons. Les senyals de ressonància (FIDs, de l'anglès *Free Induction Decay*) obtingudes van ser convertides a espectre (transformada de Fourier) i a continuació es va corregir la seva fase i línia base. Els experiments de correlació bidimensionals: ¹H-¹H COSY (espectrometria de correlació) i ¹H-¹³C HSQC (correlació

heteronuclear amb gradient), es van realitzar utilitzant seqüències de polsos estàndard (Bruker) i sota condicions de rutina.

Els espectres es van calibrar utilitzant la senyal del dissolvent residual (cloroform, 7,27 i 77,0 parts per (ppm) per ^1H i ^{13}C respectivament). Els valors dels desplaçaments químics es van expressar en ppm, i els valors de les constants d'acoblament en hertzs (Hz).

Per l'adquisició i el processat dels espectres es va utilitzar el software TOPSPIN 2.5 de Bruker.

Les anàlisis per RMN van ser realitzades al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de l'UAB.

C.3. Obtenció i cultiu de les cèl·lules eucariotes

En aquest treball s'han utilitzat tant línies cel·lulars tumorals i no tumorals d'origen humà i de ratolí, com cèl·lules de sang perifèrica humanes i macròfags derivats de medul·la òssia de ratolí. Això implica que els experiments s'han dut a terme amb unes condicions d'esterilitat i bioseguretat necessàries per a la manipulació de les mostres i per a la protecció del manipulador.

Els experiments han estat aprovats per la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana (CEEAH) de la UAB, i pel Comitè d'Ètica en l'Experimentació Animal de la Universitat d'Estocolm.

C.3.1. Cèl·lules humanes

C.3.1.1. Línies cel·lulars de càncer de bufeta

Les línies cel·lulars humanes de càncer de bufeta escollides en aquest estudi van ser la T24, J82 i RT4. Aquests cèl·lules són de carcinoma transicional i tenen graus histopatològics de diferenciació diferents: la T24 i la J82 són de grau 3, i la RT4 és de grau 1.

Les tres línies han estat subministrades pel banc de Línies Cel·lulars de Càncer del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB), com a part del projecte de recerca Red Temàtica d'Investigació Cooperativa en Càncer (RTICC) finançat pel Ministeri de Sanitat, C03/010.

Les monocapes cel·lulars s'han mantingut en medi de cultiu DMEM/F12 complet, compost per: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture Ham's F-12 amb HEPES, L-glutamina i roig fenol (DMEM/F12 HEPES, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, Estats Units) suplementat amb 10% sèrum boví fetal (FBS, Lonza, Basel, Suïssa), 100 U/ml penicil·lina G (Lab ERN, S.A., Barcelona, Espanya) i

100 µg/ml estreptomina (Lab Reig Jofre, S.A., Barcelona, Espanya). Els cultius s'han realitzat a 37°C en una atmosfera humidificada amb 5% de CO₂.

C.3.1.2. Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC)

Les PBMC d'humans van procedir d'individus sans negatius per la prova cutània de la tuberculosi, també anomenat prova del derivat proteic purificat (PPD), els quals van ser informats i van donar el seu consentiment signat. Les extraccions es van realitzar al dispensari de la UAB. Es va recollir la sang en tubs amb un 1% d'heparina i abans d'haver realitzat la prova PPD (per a confirmar la seva negativitat).

Les PBMC es van obtenir mitjançant el gradient de densitat de Ficoll-Hypaque (Böyum, 1968). Aquest mètode permet la separació de les cèl·lules mononuclears de les cèl·lules polimorfonuclears i els eritròcits, mitjançant la centrifugació en un medi isosmòtic amb una densitat de 1,077 g/ml. Com a resultat s'obté la sedimentació de les cèl·lules polimorfonuclears i dels eritròcits i la formació d'un núvol de cèl·lules, corresponent a les PBMC, entre la mostra i la interfase mostra/medi.

Procediment d'obtenció

1. Es va diluir la sang amb RPMI 1640 en una proporció 1:1 (v/v).
2. La sang diluïda es va transferir en un tub Falcon que contenia Ficoll-Hypaque (LymphoprepTM, Comercial RAFTER, Saragossa, Espanya) en una proporció de 2-3 ml de Ficoll per cada 5-7 ml de sang diluïda. La sang es va deixar caure per la paret del tub i es va anar depositant a sobre del Ficoll, formant una capa superior.
3. Es va centrifugar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estats Units) a 400 x g durant 20 minuts i sense fre. Es van formar 4 fases, tal i com es pot observar a la **figura C.1**: una fase superior corresponent al plasma sanguini, una segona capa blanquinosa amb les cèl·lules mononuclears (limfòcits i monòcits) i les plaquetes, una tercera capa transparent (reactiu Ficoll) i una última capa vermella que contenia els eritròcits i les cèl·lules polimorfonuclears.

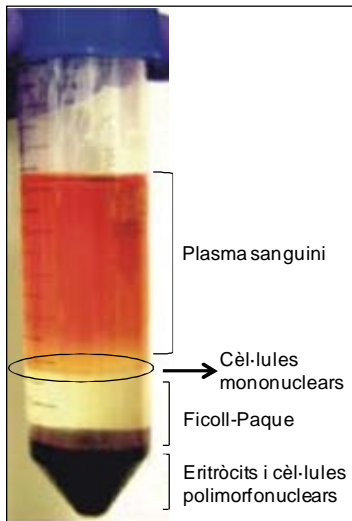


Figura C.1. Separació cel·lular d'una mostra de sang amb Ficoll després de ser centrifugada

4. Mitjançant una pipeta Pasteur de plàstic estèril, es va recuperar el núvol de cèl·lules mononuclears.
5. Es van rentar amb RPMI 1640 centrifugant a 400 x g durant 10 minuts, amb fre.
6. El sobrenedant es va descartar i el pèl·let es va resuspendre i barrejar amb RPMI 1640 per procedir al recompte cel·lular.
7. Finalment, la suspensió cel·lular es va centrifugar a 300 x g durant 15 minuts, amb fre. El pèl·let resuspès es va barrejar amb el volum de medi de congelació necessari per preservar les cèl·lules a -80°C fins a la seva utilització.

El medi de cultiu complet que es va utilitzar, un cop descongelades les cèl·lules, va ser: RPMI 1640 amb HEPES, L-glutamina i roig fenol (Gibco, Invitrogen) suplementat amb 10% de FBS (Lonza), 100 U/ml de penicil·lina G i (Lab ERN, S.A.) i 100 µg/ml estreptomina (Lab Reig Jofre, S.A.). Els cultius es van mantenir a 37°C en una atmosfera humida amb 5% de CO₂.

C.3.2. Cèl·lules de ratolí

C.3.2.1. Línia cel·lular de macròfags

La línia cel·lular de macròfags de ratolí J774 va ser cedida pel Dr. Carlos Martín (Laboratori de Genètica Molecular de Micobacteris, Universitat de Saragossa, Saragossa, Espanya).

El medi de cultiu complet utilitzat va ser DMEM complet, compost per: DMEM amb HEPES, L-glutamina i roig fenol (Gibco, Invitrogen) suplementat amb 10 % de sèrum boví fetal (FBS) (Lonza), 100 U/ml de penicil·lina G (Lab ERN, S.A.) i 100 µg/ml estreptomina (Lab Reig Jofre, S.A.). Les condicions de cultiu emprades van ser a una temperatura d'incubació de 37°C i en una atmosfera humidificada amb 5% de CO₂.

C.3.2.2. Línia cel·lular de càncer de bufeta

La línia tumoral MB49 prové d'un carcinoma epitelial de bufeta induït en una soca de ratolí C57BL/6. Aquesta línia cel·lular ha estat escollida pel seu paral·lelisme amb la línia cel·lular humana T24 (Chen, 2009).

La línia de càncer de bufeta MB49 va ser cedida amablement pel Dr. Thomas Tötterman (Laboratori Rudbeck, Departament d'Immunologia, Genètica i Patologia de la Universitat d'Uppsala, Suècia).

Els cultius es van mantenir en medi de cultiu RPMI 1640 complet, compost per: RPMI 1640 suplementat amb 10% FBS, 20% tampó HEPES, 1% L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicil·lina G i 100 µg/ml estreptomina (tot d'Invitrogen).

C.3.2.3. Macròfags derivats de medul·la òssia (BMM)

Els macròfags de ratolí es van obtenir a partir de la medul·la òssia dels fèmurs i tíbies de ratolins C57BL/6 de 10-12 setmanes de vida.

Es van utilitzar ratolins de la soca salvatge C57BL/6 (WT) i ratolins deficients pels receptors TLR2, TLR4, i MyD88, amb un background C57BL/6. Les parelles reproductores dels ratolins deficients pels receptors es van obtenir de l'Institut Karolinska, Solna, Suècia, amb el permís de S. Akira (Universitat d'Osaka, Japó), i es van mantenir a l'estabulari dels laboratoris Arrhenius de la Universitat d'Estocolm, Suècia.

Els ratolins van estar supervisats diàriament i es van utilitzar animals sentinella per a assegurar les condicions lliures de patògens a les instal·lacions.

Procediment d'obtenció (Racoosin, 1989; Rothfuchs, 2001)

1. Els animals van ser anestesiats amb isoflurà i es van sacrificar mitjançant dislocació cervical.
2. Es van recuperar els fèmurs i tíbies posteriors, descartant la pell i el màxim possible de múscul. Es van dipositar en un tub de poliestiré amb medi RPMI 1640 suplementat amb 20% de HEPES (Invitrogen).
3. Es va acabar de descartar el múscul restant, i els ossos es van dipositar en plaques de Petri estèrils on es van rentar les cavitats de la medul·la òssia amb medi RPMI 1640 complet.
4. Les cèl·lules obtingudes es van centrifugar a 300 x g durant 10 minuts, es van resuspendre en medi RPMI 1640 complet i es va realitzar un recompte cel·lular.
5. Es van tornar a centrifugar a 300 x g durant 10 minuts.

6. Posteriorment, es van resuspendre en medi de cultiu (la composició del qual està descrita al següent paràgraf) i dipositar en una placa de cultiu o es van resuspendre en medi de congelació i congelar a -80°C fins al moment d'iniciar els experiments.

El medi de cultiu emprat va ser RPMI 1640 complet amb un 20% de medi condicionat de cèl·lules L929 (font de factor estimulant de colònies de macròfag (M-CSF)). Els cultius s'incubaren a 37°C i en una atmosfera humidificada amb 5% de CO_2 . El medi es va reemplaçar cada dos dies fins arribar a una confluència aproximadament del 80% (5-7 dies), moment en que es va reemplaçar el medi de cultiu per medi RPMI 1640 complet, durant 24 hores. Passat aquest temps, es van iniciar els experiments amb els macròfags.

C.3.2.3.1 Línia cel·lular de fibroblasts L929

La línia cel·lular L929 (ATCC CCL-1, NCTC clon 929) es va utilitzar com a font del factor M-CSF necessari per la diferenciació i proliferació de macròfags de ratolí. Aquestes cèl·lules produeixen grans quantitats de M-CSF quan proliferen, de manera que el sobrenedant del seu cultiu també s'anomena medi condicionat per als macròfags.

Aquestes cèl·lules corresponen a una línia de fibroblasts provinent de teixit adipós subcutani d'una soca de ratolí C3H/An mascle.

Procediment d'obtenció del medi condicionat de cèl·lules L929

1. Les cèl·lules L929 es van sembrar en flascons de cultiu de 150 cm^2 .
2. Quan van arribar a un 100% de confluència (després de 7 dies, aproximadament), es va recollir el sobrenedant dels flascons i es va filtrar per a eliminar les cèl·lules en suspensió.
3. El sobrenedant filtrat es va conservar en alíquotes a -20°C fins al moment de la seva utilització. Quan es descongela una alíquota, aquesta s'ha de mantenir a 4°C per evitar la degradació del M-CSF deguda als cicles de congelació/descongelació. Els cultius es van mantenir en medi RPMI 1640 complet.

C.3.3. Manteniment de les cèl·lules eucariotes

C.3.3.1. Congelació cel·lular

Protocol

1. Es van recuperar les cèl·lules en un tub de poliestirè i es van centrifugar a $300 \times g$ durant 10 minuts.

2. El sobrenedant es va descartar, es va resuspendre el pèl·let, i es va afegir el volum necessari de medi de congelació fred. Es va repartir 1 ml/criovial (Nunc, Roskilde, Dinamarca).
3. Ràpidament es van posar els criovials en un Mr. Frosty (Nalgene, Nunc) i es va mantenir a -80°C .

El medi de congelació va ser diferent segons el tipus cel·lular:

- Les línies cel·lulars es van congelar amb FBS (Lonza) i 20% de dimetil sulfòxid (DMSO, Merk). La concentració cel·lular va ser de 1×10^6 cèl·lules / ml.
- Les PBMC es van congelar amb FBS (Lonza) amb 10% de DMSO (Merck). La concentració cel·lular va ser de 1×10^6 cèl·lules / ml.
- Els BMM i la línia cel·lular L929 es van congelar en RPMI 1640 amb 50% de FBS (Invitrogen), 5% de DMSO (Merck), 1% de L-glutamina (Invitrogen) i 1% de penicil·lina i estreptomicina (Invitrogen). La concentració cel·lular va ser de 1×10^7 cèl·lules / ml pels BMM, i de 1×10^6 per les cèl·lules L929.

C.3.3.2. Descongelació cel·lular

Protocol

1. Es va descongelar el criovial amb les cèl·lules en un bany humit a 37°C , fins que la suspensió es desenganxà de les parets.
2. Es va decantar el contingut del criovial en un tub de poliestiré amb medi de cultiu (10 ml de medi per 1×10^7 cèl·lules, aproximadament).
3. La suspensió cel·lular es va centrifugar a $300 \times g$ durant 10 minuts. El pèl·let resultant després de decantar el sobrenedant, es va resuspendre i diluir en el medi de cultiu adient pel tipus cel·lular.

C.3.3.3. Recol·lecció de les cèl·lules i passes cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball, tant murines com humanes, són adherents i creixen formant monocapes, de manera que s'han hagut de desenganxar inicialment de la superfície de plàstic on estaven, per tal de recuperar-les i traspasar-les a un nou recipient de cultiu. Per a desenganxar-les vam utilitzar la tripsina, enzim responsable de trencar els enllaços peptídics entre les proteïnes de les cèl·lules amb la superfície de plàstic i amb les cèl·lules veïnes.

Protocol

1. Es va descartar el medi de cultiu del flascó i es van rentar les cèl·lules amb PBS. Amb aquest procediment es facilita l'eliminació de restes de FBS del medi de cultiu, ja que aquest inactiva l'acció de la tripsina que s'utilitzarà a continuació.
2. Després de descartar el PBS, es va afegir tripsina-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Àustria) 1x diluïda en PBS i seguidament es va retirar. La quantitat d'enzim que quedava en contacte amb el cultiu era suficient per actuar. El cultiu es va incubar a 37°C i amb 5% de CO₂, durant 5 o 10 minuts, depenent del tipus cel·lular.

Les línies cel·lulars T24, MB49 i L929 necessitaven estar en contacte amb tripsina 5 minuts, aproximadament, per desenganxar-se; en canvi la J82, RT4 i J774 necessitaven 10 minuts.

3. Posteriorment, es facilità el procés mitjançant cops secs en flascó i es recuperaren amb medi de cultiu amb 10% de FBS, el qual inactivarà l'acció de la tripsina.
4. Aquestes cèl·lules recuperades es van poder traspasar a un altre flascó per mantenir-les en cultiu, o es van poder utilitzar pels diferents experiments que es van dur a terme.

C.4. Tècniques de cultiu

C.4.1. Suspensions bacterianes

En aquest treball s'han utilitzat microorganismes de nivell de biosegurat 1 i 2. Això implica que els experiments s'han dut a terme en les instal·lacions de bioseguretat adequades i aprovades pel Comitè de Bioseguretat de la UAB.

Per a infectar els cultius cel·lulars amb els diferents bacteris, es van preparar suspensions d'aquests. Aquestes suspensions es van utilitzar directament, per estudiar l'efecte del bacteri viu, i es van sotmetre a diferents tractaments per tal de comparar amb l'efecte del bacteri mort.

C.4.1.1. Preparació de les suspensions bacterianes

Protocol

1. Es van recollir els bacteris de la superfície del medi de cultiu sòlid i es van dipositar en un tub de vidre amb boletes de vidre estèrils i es va vortexar.
2. Es va afegir PBS i es va agitar amb un vòrtex la suspensió formada per a desfer els agregats que tendeixen a formar els bacteris.

3. Es va deixar reposar durant 20-30 minuts amb la finalitat de que precipitessin els agregats que poguessin quedar (Schulze-Röbbecke, 1992).
4. Un cop sedimentats, es va transferir el sobrenedant a un tub nou i es va diluir amb PBS fins obtenir una concentració equivalent a una terbolesa corresponent a un McFarland 1.
5. Es van centrifugar a 2000 x g durant 10 minuts. El pèl·let bacterià es va resuspendre i diluir en medi de cultiu complet sense antibiòtics.
6. La suspensió bacteriana es va sotmetre a 3 polsos (45 W) consecutius de 30 segons en un bany d'aigua ultrasònic (Bandelin Electronic, model Sonorex Super RK52H, Berlin, Alemanya) obtenint predominantment una suspensió cel·lular de bacteris individuals (Stokes, 2004).

Un cop obtingudes les suspensions bacterianes, es van realitzar dilucions seriades en PBS i es van sembrar en plaques de Petri amb medi de cultiu sòlid. Després de 1-2 setmanes d'incubació (depenent del bacteri) es van comptar les unitats formadores de colònies (cfu). La suspensió bacteriana corresponent a un McFarland 1, va ser equivalent a un nombre de cfu diferent segons el micobacteri. A la **taula C.2** es mostra l'equivalència del nombre de cfu en 1 ml d'aquesta suspensió, per cada micobacteri estudiat.

Taula C.2. Nombre de cfu / ml en una suspensió bacteriana corresponent a una terbolesa de McFarland 1, per BCG, *M. spp.*, i altres (*M. gastri*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. confluentis*, *M. mageritense*, *M. hiberniae*, *E. coli* i *E. faecalis*)

Bacteri	cfu / ml
BCG	5×10^5
<i>M. spp.</i>	5×10^6
Resta de bacteris	1×10^7

Solucions i tampons

Tampó fosfat salí (PBS)

Per 1 litre:

- Clorur de sodi (Panreac) 8 g
- Fosfat disòdic anhidre (Na₂HPO₄) (Panreac) 1,16 g
- Fosfat monopotàssic (KH₂PO₄) (Panreac) 0,2 g
- Clorur de potassi (KCl) (Panreac) 0,2 g

Es va enrasar fins 1 litre amb aigua ultrapura i després es va mesurar i ajustar el pH a 7,4.

Solució McFarland1

1. Preparar la solució A: clorur de bari (Sigma) 0,048 M (1,175% Cl₂Ba. 2H₂O w/v) (1%, p/v).
2. Preparar la solució B: àcid sulfúric (Carlo Erba) 0,36 N (1%, v/v).
3. Barrejar en un tub de vidre de 10 ml amb tap amb recobriments de tefló:

• Solució A	0,1 ml
• Solució B	9,9 ml

Aquesta solució es va mantenir a temperatura ambient i protegida de la llum, com a màxim durant 6 mesos. Abans d'utilitzar es va barrejar vigorosament amb un vòrtex.

C.4.1.2. Tractament de les suspensions bacterianes

Paral·lelament, suspensions bacterianes en PBS a una terbolesa corresponent a un McFarland 1 (preparades com s'ha indicat a l'apartat anterior (C.4.1.1, passos 1-4), van ser sotmeses a diferents tractaments de calor i radiació. Posteriorment, les suspensions tractades es van processar de la mateixa manera que els passos 5 i 6 de l'apartat C.4.1.1 per tal de procedir a la infecció cel·lular.

C.4.1.2.1. Tractament de calor

Els tractaments de calor van consistir en:

- 121°C durant 15 minuts en autoclau
- 80°C durant 30 minuts en bany humit (Büchi, model 461)
- 60°C durant 30 minuts en bany humit (Büchi, model 461)

C.4.1.2.2. Tractament de radiació

Els tractaments de radiació correspongueren a l'exposició a:

- Llum ultravioleta (UV) durant 20 minuts.

Aquest tractament es va realitzar dins de la cabina de bioseguretat del nostre laboratori després d'haver mesurat la dosi de radiació UV emesa amb un dosímetre (UVX Digital Radiometer, UVP, Upland, California, Estats Units), la qual va ser de 0,071 mJ/cm²/s.

Procediment

1. Les suspensions bacterianes es van dipositar en plaques de Petri estèrils, sense tapar, a dins de la cabina de bioseguretat.
 2. El temps d'exposició a la llum UV es va escollir després de realitzar estudis d'optimització comparant els diferents temps d'exposició: 5, 15 i 20 minuts; corresponents a les dosis de: 21, 64 i 85 mJ/cm²/s, respectivament. Aquestes condicions van ser escollides segons el descrit a la bibliografia (Shin, 2008 (a); Barker, 1997).
 3. Per mesurar la viabilitat bacteriana després de la radiació, es van realitzar dilucions seriades de les suspensions amb PBS i es van sembrar en plaques de Petri amb medi de cultiu sòlid (adient per cada micobacteri). Transcorregut el temps de creixement necessari per cada bacteri testat, es van comptar el nombre de cfu de cada placa.
- Irradiació gamma.

Aquest tractament es va realitzar en la empresa externa: Aragogamma, S.L., Barcelona, Espanya.

Procediment

1. Les suspensions bacterianes es van dipositar en ampolles de vidre estèrils i es van sotmetre a dosis de: 5, 15 i 25 kGy (1 Gy = 100 rad), les quals van ser escollides segons el descrit en la bibliografia (Garcia, 1987; Gulle, 1995). La irradiació es va realitzar per raigs gamma de cobalt-60, i es va certificar la dosi determinada mitjançant el dosímetre Red Perspex 4034 LY $\pm 2\delta$.
2. Per mesurar la viabilitat bacteriana després de la radiació, es van realitzar dilucions seriades de les suspensions amb PBS i es van sembrar en plaques de Petri amb medi de cultiu sòlid (adient per cada micobacteri). Transcorregut el temps de creixement necessari per cada bacteri testat, es van comptar el nombre de cfu de cada placa.

C.4.2. Infecció cel·lular amb les suspensions bacterianes

Protocol

1. Es van dipositar les cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu (Nunc, Nunclon, Roskilde, Dinamarca) en medi de cultiu complet sense antibiòtics. Es van incubar a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂, durant diferents temps segons el tipus cel·lular.

2. Les cèl·lules es van infectar amb les suspensions bacterianes preparades com s'indica a l'apartat C.4.1. Es van incubar durant 3 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
3. Els bacteris extracel·lulars van ser eliminats mitjançant tres rentats amb PBS a 37°C.
4. Es va afegir medi de cultiu complet amb antibiòtics i es van incubar a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂.
5. Els efectes de la infecció per part dels bacteris es va monitoritzar a diferents temps segons l'experiment.

C.4.3. Determinació de la viabilitat cel·lular

C.4.3.1. Recompte cel·lular

El recompte de les cèl·lules es va realitzar mitjançant la tinció amb blau tripà i es va utilitzar la cambra de Neubauer.

Protocol

1. Es va diluir la suspensió cel·lular amb blau tripà al 0,4% en PBS (Gibco/BRL, Grand Island, Nova York, Estats Units).
2. Es va dipositar 10 µl d'aquesta barreja entre la cambra de Neubauer i el cobreobjectes (la suspensió cel·lular entra per capil·laritat) i es va comptar el nombre de cèl·lules viables en els quatre quadrants (cada quadrant està format per 16 quadrats). Aquests quadrants es mostren marcats amb el símbol "&" a la **figura C.2.**

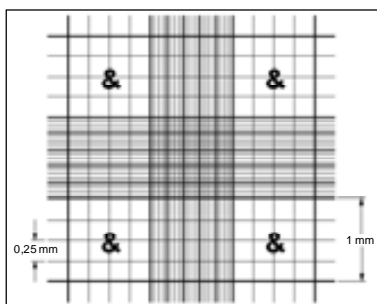


Figura C.2. Quadrícula de la cambra de Neubauer que es visualitza al microscopi. S'indiquen les dimensions i els quadrants on es realitza el recompte cel·lular (&)

3. Finalment, es va aplicar la següent fórmula per calcular en nombre de cèl·lules viables/ml:

$$\text{Cèl·lules/ml} = \text{mitjana nombre cèl·lules dels camps dels 4 quadrants} \times 10^4 \times \text{FD}$$

- 10⁴, és el volum de la cambra de Neubauer (1 mm x 1 mm x 0,1 mm = 0,1 mm³ = 0,1 µl)
- FD, és el factor de dilució que hem aplicat

C.4.3.2. Assaig de proliferació cel·lular

Un dels mètodes utilitzats per mesurar la proliferació cel·lular i la citotoxicitat, va ser la utilització de sal de tetrazol soluble 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), el qual permet la quantificació colorimètrica de la viabilitat cel·lular. Aquest assaig es basa en el trencament de l'anell de tetrazoli del MTT per deshidrogenases mitocondrials actives, formant-se cristalls de formazan. Aquests cristalls són insolubles en medi aquós, però es poden solubilitzar amb dissolvents orgànics. La quantitat de formazan és proporcional al nombre de cèl·lules viables (Mosmann, 1983).

Protocol

1. Es va recollir el sobrenedant de cada pouet de la placa de cultiu.
2. Es va afegir medi de cultiu amb un 10% de MTT (Sigma) i es va incubar durant 3 hores a 37°C i amb 5% de CO₂.
3. Es va afegir l'isopropanol acídic en una relació de 1:1 (v/v) amb el medi de cada pou. És important resuspendre bé amb la pipeta per dissoldre al màxim els cristalls formats.

L'isopropanol acídic va consistir en: 0,04-0,1 N àcid clorhídric (Carlo Erba) en isopropanol absolut (1-propanol, Panreac) (v/v).

4. Finalment, es va mesurar l'absorbància a 550 nm en el lector de plaques (Infinite 200 PRO, Tecan, Männerdorf, Suïssa). El valor final es va expressar en forma de percentatge, donant el valor 100% de viabilitat a l'absorbància de les cèl·lules control (valor que va ser directament proporcional al nombre de cèl·lules metabòlicament actives).

C.4.4. Recol·lecció del sobrenedant dels cultius cel·lulars

Per a determinar la concentració de citocines, quimiocines i NO produïdes pels cultius cel·lulars estimulats amb diferents agents, es va recollir el sobrenedant de cada cultiu i es va dipositar en microtubs.

Aquests microtubs es van centrifugar (Hermle Z233M-2, Wehingen, Alemanya) a 1000 x g durant 10 minuts i el sobrenedant es va traspasar a nous microtubs, els quals es van mantenir a -40°C fins la seva utilització.

C.4.5. Detecció de la producció d'òxid nítric en el sobrenedant dels cultius cel·lulars

L'NO és un important missatger fisiològic i molècula efectora en molts sistemes biològics (immunològic, neuronal i cardiovascular). Un dels dos productes primaris, estables i no volàtils, del trencament de l'NO és el nitrit (NO_2^-). En el nostre treball es va mesurar els nivells de NO_2^- al sobrenedant dels cultius cel·lulars mitjançant un assaig colorimètric amb el reactiu Griess modificat.

Protocol

1. Per la recta patró, es van realitzar dilucions dobles seriades de nitrit de sodi (Panreac) 200 μM en PBS, i es va dipositar 50 μl de cada dilució als pous d'una placa multipou. L'últim punt de la recta, el blanc, va consistir en només PBS.
2. Es va dipositar 50 μl dels sobrenedants a testar a la resta de pous de la placa.
3. A cada pou es va afegir el reactiu Griess (Sigma) en una proporció de 1:1 (v/v) i es va incubar durant 10-15 minuts a T^a ambient i preservat de la llum.
4. Es va mesurar l'absorbància a 550 nm amb el lector de plaques (Infinite 200 PRO, Tecan).

C.4.6. Determinació de citocines i quimiocines en el sobrenedant dels cultius cel·lulars

Per a determinar la producció de citocines i quimiocines es van utilitzar tests d'enzim-immunoassaig comercials i es van seguir les instruccions indicades pel fabricant.

Segons el tipus cel·lular escollit per l'estudi, es va quantificar un determinat tipus de citocines i quimiocines, les quals es mostren a la **taula C.3**.

Taula C.3. Sumari dels tests de citocines i quimiocines utilitzats en aquest treball

Citocina/quimiocina	Mostra	Proveïdor	Tipus cel·lular
IL-6	humà	BD	T24, J82, RT4 i PBMC
IL-8	humà	BD	T24, J82, RT4 i PBMC
TNF-α	humà	Mabtech	T24, J82, RT4 i PBMC
IL-10	humà	Mabtech	PBMC
IL-12 (total)	humà	Mabtech	PBMC
IFN- γ	humà	BD	PBMC
IL-10	ratolí	Mabtech	J774 i BMM
IL-12 (total)	ratolí	Mabtech	J774 i BMM
IL-6	ratolí	BD i R&D	J774, MB49 i BMM
TNF-α	ratolí	BD i R&D	J774, MB49 i BMM
KC	ratolí	R&D	MB49 i BMM
RANTES	ratolí	R&D	BMM
IP-10	ratolí	R&D	BMM

BD, Becton Dickinson; R&D, R&D Systems.

PBMC, cèl·lules mononuclears de sang perifèrica d'humans; BMM, macròfags derivats de medul·la òssia de ratolí.

Els protocols utilitzats han estat molt similars entre ells, però els tampons i les concentracions dels anticossos de cada test van variar en funció de la citocina a avaluar i de la casa comercial proveïdora. A continuació es detalla els protocols que es van seguir de cada casa comercial i la composició de les solucions i tampons utilitzats. Les concentracions dels anticossos amb les que es va treballar van ser les indicades pel fabricant de cada test per cada lot.

En tots els casos es van utilitzar plaques d'ELISA de 96 pouets, d'alta unió i de mig pou (Corning, Costar, Estats Units). De manera que els volums afegits van ser la meitat dels indicats pel fabricant de cada test.

Protocol de l'ELISA de BD (San Diego, Califòrnia, Estats Units)

1. Es va sensibilitzar una placa amb l'anticòs de captura diluït en la solució de sensibilització a la concentració adequada. Es va segellar amb film transparent i es va incubar tota la nit a 4°C.
2. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
3. Es va bloquejar la placa durant una hora a T^a ambient amb la solució de bloqueig.

4. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
5. Es van dipositar les mostres i els estàndards diluïts amb la solució de bloqueig i es van incubar durant dues hores a T^a ambient.
6. Es va rentar la placa 5 vegades amb la solució de rentat.
7. Es va afegir l'anticòs de detecció junt amb la peroxidasa (HRP) diluïts amb la solució de bloqueig a la concentració adequada. Es va incubar la placa durant 1 hora a T^a ambient.
8. Es va rentar la placa 7 vegades amb la solució de rentat.
9. Es va afegir el substrat per l'HRP. Es va incubar com a mínim 20 minuts a T^a ambient i sense llum.
10. Es va mesurar l'absorbància a 630 nm amb lector de plaques.

Protocol de l'ELISA de Mabtech (Nacka Strand, Suècia)

1. Es va sensibilitzar una placa amb l'anticòs de captura diluït en PBS a la concentració adequada. Es va segellar amb film transparent i es va incubar tota la nit a 4°C.
2. Es va rentar la placa 2 vegades amb PBS.
3. Es va bloquejar la placa durant una hora a T^a ambient amb la solució de bloqueig.
4. Es va rentar la placa 5 vegades amb la solució de rentat.
5. Es van dipositar les mostres i els estàndards diluïts amb la solució de bloqueig i es van incubar durant dues hores a T^a ambient.
6. Es va rentar la placa 5 vegades amb la solució de rentat.
7. Es va afegir l'anticòs de detecció diluït amb la solució de bloqueig a la concentració adequada. Es va incubar la placa durant una hora a T^a ambient.
8. Es va rentar la placa 5 vegades amb la solució de rentat.
9. Es va afegir la fosfatasa alcalina (ALP) a la concentració adequada amb la solució de bloqueig. Es va incubar la placa durant una hora a T^a ambient.
10. Es va rentar la placa 5 vegades amb la solució de rentat.
11. Es va afegir el substrat per l'ALP. Es va incubar com a mínim 20 minuts a T^a ambient i sense llum.
12. Es va llegir l'absorbància a 405 nm amb lector de plaques.

Protocol de l'ELISA de R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, Estats Units)

1. Es va sensibilitzar una placa amb l'anticòs de captura diluït en PBS a la concentració adequada. Es va segellar amb film transparent i es va incubar tota la nit a T^a ambient.
2. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
3. Es va bloquejar la placa durant una hora a T^a ambient amb la solució de bloqueig adequada.
4. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
5. Es van dipositar les mostres i els estàndards diluïts amb la solució de bloqueig i es van incubar durant dues hores a T^a ambient.
6. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
7. Es va afegir l'anticòs de detecció diluït amb la solució de bloqueig a la concentració adequada. Es va incubar la placa durant dues hores a T^a ambient.
8. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
9. Es va afegir la fosfatasa alcalina (HRP) a la concentració adequada amb la solució de bloqueig. Es va incubar la placa durant 20 minuts a T^a ambient i sense llum.
10. Es va rentar la placa 3 vegades amb la solució de rentat.
11. Es va afegir el substrat per l'HRP. Es va incubar 20 minuts a T^a ambient i sense llum.
12. Es va aturar la reacció amb àcid sulfúric 2N.
13. Es va llegir l'absorbància a 450 nm amb lector de plaques.

Els resultats d'absorbància es van transformar en concentració per cada una de les citocines després de ser comparades amb la recta patró inclosa a cada placa i subministrada pel fabricant. Les dades es van expressar com el promig dels duplicats realitzats per ELISA de cada un dels pouets triplicats dels cultius.

Solucions i tampons

Solució de sensibilització

- Mabtech i R&D: PBS
- BD: carbonat de sodi 0,1 M; pH 9,5

Solució de rentat

0,05% Tween20 (Sigma) en PBS (v/v)

Solució de bloqueig

- BD: 10% FBS (Lonza) en PBS (v/v)
- Mabtech: 0,05% Tween20 (Sigma) i 0,1% BSA (Roche) en PBS (v/v/p)
- R&D: 1% BSA (Roche) en PBS (v/p)

Tampó per l'ALP

1. A 800 ml d'aigua ultrapura es va afegir:

- | | |
|--|--------|
| • Diethanolamine (Sigma) | 97 ml |
| • Clorur de magnesi (MgCl ₂) (Sigma) | 100 mg |
| • Azida sòdica (Sigma) | 0,2 g |

2. Es van dissoldre tots els compostos, i es va afegir aigua ultrapura fins enrasar a 1 litre.

3. Finalment es va ajustar el pH a $9,8 \pm 0,2$. Aquesta solució es va preservar a 4°C i protegida de la llum.

El substrat per l'ALP és el pNPP (Sigma), el qual es va fer servir a una proporció de 1 mg pNPP / 1 ml tampó per l'ALP.

Tampó per l'HRP

Es va fer servir una barreja de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina i peròxid d'hidrogen (1:1, v/v).

Aquest reactiu es va comprar a BD (TMB Substrate Reagent Set) i a R&D Systems (Substrate Reagent Pack).

C.4.7. Assaig de la viabilitat bacteriana als cultius cel·lulars

Amb la finalitat de determinar la viabilitat intracel·lular dels bacteris després de la infecció, es van realitzar cultius amb les línies cel·lulars T24 i J774. Els cultius van ser sacrificats a diferents temps post-infecció (3, 8, 24, 48 i 72 hores) per tal d'analitzar la supervivència dels diferents bacteris dins les cèl·lules.

Procediment (Dobos, 2000)

1. Es va recollir el medi de cultiu dels pouets, es va afegir 0,1% de Triton X-100 (Sigma) en PBS (v/v) i s'incubà a 37°C durant 15 minuts.
2. Es va recollir la solució anterior de cada pou i es van realitzar dilucions seriades que es sembraren en plaques de cultiu (7H10, TSA o LB, depenent del bacteri) i s'incubaren a la temperatura corresponent durant 1-2 setmanes. Transcorregut el temps, es va comptar el nombre de cfu obtingudes.

C.5. Estudi de l'efecte antitumoral directe dels micobacteris

Per a estudiar l'efecte antitumoral directe dels micobacteris es van infectar les cèl·lules tumorals i posteriorment s'analitzà la viabilitat cel·lular (veure apartat C.4.3.2). També es va mesurar la producció de citocines i NO en el sobrenedant dels cultius (veure apartat C.4.4).

C.5.1. Supervivència dels micobacteris dins de les cèl·lules tumorals

Protocol

1. Es van dipositar 6×10^4 cèl·lules T24 en cada pou d'una placa de cultiu de 48 pous (Nunc) en un volum de 400 μ l de medi DMEM complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, amb una MOI de 10:1.
3. Els cultius es van mantenir a 37°C i en una atmosfera humida amb 5% de CO₂.
4. Finalment, per tal de determinar la viabilitat dels micobacteris dins dels macròfags, es va procedir com a l'apartat C.4.7.

C.5.2. Activitat antitumoral directa dels micobacteris vius

Procediment

1. Es van dipositar 3×10^4 cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu de 96 pous (Nunc), en un volum de 100 μ l de medi DMEM/F12 complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores abans de la infecció (temps necessari per a que les cèl·lules s'adherissin a la superfície del pou).
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2.
La multiplicitat d'infecció (MOI) va ser de 0,5:1; 2,5:1; 12,5:1 i 62,5:1 (bacteri : cèl·lula)
3. Els efectes de la infecció per part dels bacteris es va monitoritzar després de 24, 48 i 72 hores per les línies cel·lulars T24 i RT4, o després de 24, 72 i 120 hores per la línia J82.

En tots els experiments es van realitzar en paral·lel a les infeccions, cultius de cèl·lules tumorals sense infectar com a control. Cada una de les infeccions es va

realitzar per triplicat en cada experiment, i els experiments van ser repetits com a mínim tres vegades.

C.5.3. Comparació de l'activitat antitumoral directa dels micobacteris vius i tractats

Procediment

1. Es van dipositar 3×10^4 cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu de 96 pouets (Nunc), en un volum de 100 μ l de medi DMEM/F12 complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores abans de la infecció.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, amb una MOI de 10:1. En aquest estudi es van utilitzar suspensions bacterianes de: BCG, *M. spp.*, *M. gastri* i *E. coli*, amb els bacteris vius o tractats (amb calor o amb radiació UV o gamma).
3. Els efectes de la infecció per part dels bacteris es van monitoritzar després de 72 hores per les línies cel·lulars T24 i RT4, o després de 120 hores per la línia J82.

En tots els experiments es van realitzar en paral·lel a les infeccions, cultius de cèl·lules tumorals sense infectar com a control. Cada una de les infeccions es va realitzar per triplicat en cada experiment, i els experiments van ser repetits com a mínim tres vegades.

C.5.4. Efecte sinèrgic dels micobacteris amb la MMC

En aquest estudi es va comparar *in vitro* l'efecte dels diferents micobacteris (vius o sotmesos a diferents tractaments) i de la MMC, tant individual com conjuntament, en les línies tumorals humanes.

Procediment

1. Es van dipositar 3×10^4 cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu de 96 pouets (Nunc), en un volum de 100 μ l de medi DMEM/F12 complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores abans de la infecció.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, amb una MOI de 10:1. En aquest estudi es van utilitzar suspensions bacterianes de: BCG, *M. spp.*, *M. gastri*, *M. phlei* i *M. vaccae* (S); amb els bacteris vius o tractats amb calor (121°C durant 15 minuts) o amb radiació gamma (25 kGy).
3. Finalment, es va afegir medi de cultiu complet amb antibiòtics i/o la MMC (Sigma) a una concentració de 10 μ g / ml en la línia T24, i de 1 μ g/ml en les línies J82 i RT4.

4. Després de 48 hores de cultiu es va mesurar la proliferació cel·lular amb MTT, i es va recollir el sobrenedant per mesurar la producció de citocines mitjançant ELISA.

Les condicions de concentració i temps d'acció de la MMC van ser escollides després de realitzar estudis d'optimització comparant diferents dosis (0,01; 0,1; 1 i 10 µg/ml) i diferents temps d'incubació (24, 48 i 72 hores) en les tres línies tumorals.

C.6. Estudi del mecanisme de la inhibició cel·lular

C.6.1. Efecte antitumoral directe de les citocines

Per a estudiar si les citocines induïdes pels micobacteris en les cèl·lules tumorals, tenien una capacitat inhibidora del creixement cel·lular, es van realitzar cultius de la línia cel·lular T24 amb les citocines.

Les citocines escollides per aquest estudi van ser la IL-6 i IL-8 humanes.

Procediment

1. Es van dipositar 3×10^4 cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu de 96 pous (Nunc), en un volum de 200 µl de medi DMEM/F12 complet. Es van incubar durant 3 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. Es va afegir les citocines humanes diluïdes amb medi DMEM/F12 complet. Les citocines van ser afegides individualment a cada pou i també juntes per estudiar el seu possible efecte sinèrgic, a les concentracions següents:
 - IL-6 (BD): 2,5; 5; 10; 20 ng/ml
 - IL-8 (BD): 6; 12; 25; 50 ng/ml
 - IL-6 + IL-8, respectivament: 2,5 + 6; 5 + 12; 10 + 25; 20 + 50 ng/ml
3. Després de 48 hores d'incubació a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂, es va mesurar la proliferació cel·lular (veure apartat C.4.3.2)..

C.6.2. Capacitat dels micobacteris d'induir l'apoptosi en les cèl·lules tumorals

Per a l'estudi de la mort cel·lular es van utilitzar tres tècniques diferents amb l'objectiu d'analitzar el procés d'apoptosi en el cultiu cel·lular.

Com a control positiu de la inducció de l'apoptosi es van utilitzar els següents agents:

- Camptothecin (CMP): quinolona alcaloide citotòxica que inhibeix l'enzim DNA-topoisomerasa I. Prové d'un arbre natiu de Xina anomenat *Camptotheca acuminata*.
- Staurosporine (STP): alcaloide que inhibeix les proteïnes kinases al no deixar que l'ATP s'uneixi a aquestes proteïnes i indueix l'apoptosi activant la caspasa-3. Prové de *Streptomyces staurosporeus*.

Per a dur a terme aquest estudi, la línia tumoral T24 es va cultivar i infectar tal i com es detalla a continuació. Posteriorment, les cèl·lules es van recuperar i manipular segons la tècnica escollida.

Procediment de cultiu i infecció

1. Es van dipositar 2×10^5 cèl·lules T24 en cada pou d'una placa de cultiu de 6 pous (Nunc) en un volum de 3 ml de medi DMEM/F12 complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, a una MOI de 10:1. En aquest estudi es van utilitzar suspensions bacterianes de: BCG, *M. spp.*, *M. gastri*, *M. phlei* i *M. vaccae* (S); amb els bacteris vius o tractats amb calor (121°C durant 15 minuts) o amb radiació gamma (25 kGy).
3. A les 24 hores de cultiu, es va afegir els inductors als pous corresponents (sense infectar). Es va descartar el medi i es va afegir medi nou amb CMP (6 µg/ml) o STP (5 µM). Aquests es van deixar actuar durant 24 hores.
4. A les 48 hores de cultiu, es va recollir el sobrenedant de cada pou infectat amb els bacteris o estimulat amb els inductors i es va guardar, tal i com s'ha descrit prèviament a l'apartat C.4.4.
5. Les cèl·lules adherides als pous es van rentar amb 2 ml de PBS, i es van tripsinitzar amb 500 µl de tripsina i 3 minuts d'incubació.
6. Es van recuperar les cèl·lules amb 2 ml de medi de cultiu complet. Per assegurar-nos de recuperar totes les cèl·lules es va repetir aquest pas amb 2 ml més de medi de cultiu.
7. Es va procedir al recompte cel·lular de cada pou, tal i com està explicat a l'apartat C.4.3.1.

Les condicions de concentració i temps d'acció dels inductors de l'apoptosi van ser escollides després de realitzar estudis d'optimització comparant diferents dosis (CMP a: 6, 15, i 30 µg/ml, i STP a: 5, 10 i 20 µM) i diferents temps d'incubació (8, 15 i 24 hores).

C.6.2.1. Anàlisi de l'alteració de la membrana cel·lular

Per a dur a terme aquest estudi es va utilitzar el kit de tinció d'anexina: Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche).

Als primers estadis de l'apoptosi, un dels canvis que es produeix en la superfície cel·lular correspon a l'alteració de la membrana plasmàtica, on la fosfatidilserina de la part interna es transloca a la part externa, de manera que aquests lípids queden exposats a l'exterior.

L'anexina V, proteïna que s'uneix als fosfolípids en presència de calci (Ca^{2+}), té una gran afinitat per la fosfatidilserina. D'aquesta manera, és capaç de tenyir les cèl·lules apoptòtiques. Les cèl·lules necròtiques no tenen intacta la integritat de la seva membrana i l'anexina també pot interaccionar amb la part citosòlica d'aquesta. Per aquest motiu, també es va utilitzar el iodur de propidi (IP), ja que és un colorant que s'uneix al DNA, i en aquest assaig, només pot accedir al de les cèl·lules que han perdut la integritat de la seva membrana cel·lular, és a dir, les cèl·lules necròtiques.

Gràcies al citòmetre de flux, utilitzant a la vegada l'anexina V conjugada amb fluoresceïna (marcador de color verd) (Anx) i el IP (de color vermell), es va poder quantificar les diferents poblacions formades per cèl·lules vives (Anx^- , IP^-), apoptòtiques primerenques (Anx^+ , IP^-), apoptòtiques tardanes (Anx^+ , IP^+) i necròtiques (Anx^- , IP^+).

Procediment de tinció i anàlisi

1. Les cèl·lules es van centrifugar a 250 x g durant 5 minuts, i després de descartar el sobrenedant i de resuspendre el pèl·let, aquest es va diluir amb la solució de tinció amb una proporció de 100 μl / 10^6 cèl·lules. La incubació es va dur a terme durant 15 minuts en gel i sense llum.

Es van tenir en compte els següents controls de la tinció:

- Cèl·lules tenyides només amb Anx
 - Cèl·lules tenyides només amb IP
 - Cèl·lules sense tenyir (control negatiu)
2. Es van diluir amb 350 μl de tampó (Roche) i aquesta suspensió cel·lular es va traspasar a tubs de citometria.
3. Finalment, es van analitzar amb el citòmetre de flux FACSCalibur i amb el software Cell Quest (BD).

Solucions i tampons

Solució de tinció

- 1ml de tampó d'incubació (Roche)

- 20 µl d'Anx (Roche)
- 20 µl de IP (Roche)

C.6.2.2. Anàlisi del DNA cromosòmic

En el procés de l'apoptosi s'activen endonucleases que trenquen el DNA genòmic internucleosomalment donant lloc a fragments múltiples de 180 parells de bases, aproximadament. Aquesta fragmentació és anterior a la desintegració de la membrana i irreversible.

Es va estudiar aquest fenomen qualitativament mitjançant l'extracció del DNA cel·lular i la posterior observació del patró del DNA fragmentat mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa.

Procediment d'extracció del DNA genòmic

1. Les cèl·lules es van centrifugar a 550 x g durant 5 minuts, i després de descartar el sobrenedant i de resuspendre el pèl·let, aquest es va diluir amb 1 ml de PBS.
2. La suspensió cel·lular resultant es va traspasar a microtubs i es van centrifugar a 500 x g durant 5 minuts. Es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pèl·let.
3. Les cèl·lules es van lliurar amb 200 µl de tampó de llisi, i després de passar-les a través d'una xeringa amb una agulla de 25G, es van incubar durant 15 minuts.
4. Es van centrifugar durant 15 minuts a 14000 x g i a 4°C. El sobrenedant es va traspasar a un microtub nou.
5. Es va afegir proteïnasa K (proteinase K, recombinant PCR grade, Roche) a una concentració de 100 µg / ml. Es va deixar incubar a 37°C durant 3 hores.
6. Es va afegir RNAsa A lliure de DNAsa (Roche) a una concentració de 1mg / ml. Es va incubar a 37°C durant 4 hores.
7. Transcorregut el temps d'incubació, es va afegir 1 volum de fenol/cloroform/alcohol isoamílic (25:24:1, v/v/v) fred i es va barrejar manualment.
8. Després de centrifugar a 14.000 x g durant 5 minuts a 4°C, es van formar dues fases separades per una interfase. La fase aquosa, superior, contenia el DNA; i la fase orgànica, inferior, contenia proteïnes i altres contaminants.
9. La fase superior es va traspasar a un microtub nou. Es van repetir els passos 7-9.
10. Per a precipitar el DNA, es va afegir 2,5 volums d'etanol 100% fred i 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M fred. Es va incubar tota la nit a -20°C.
11. Es va centrifugar a 14000 x g durant 20 minuts a 4°C, i es va descartar el sobrenedant.

12. Es va afegir 1 volum d'etanol al 70% fred al pèl·let resuspès.
13. Es va centrifugar durant 20 minuts a 14000 x g i a 4°C, i es va descartar el sobrenedant.
14. Es va deixar assecat el pèl·let, es va resuspendre i es va afegir 50-100 µl d'aigua ultrapura estèril.

Visualització del DNA en gel d'agarosa al 0,8% (p/v)

1. Es va pesar l'agarosa en pols i es va barrejar amb el volum de tampó d'electroforesi (1x TAE) necessari. Es va escalfar fins que l'agarosa es va fondre, però sense arribar al punt d'ebullició.
2. Un cop es va refredar la solució a 50°C aproximadament, es va dipositar en el suport del gel amb els extrems segellats. Es va col·locar la pinta i es va esperar a que solidifiqués.
3. Es va treure la pinta i es va posar el suport en una cubeta d'electroforesi plena de tampó 1 x TAE.
4. Es van carregar les mostres de DNA i el marcador de pes molecular als pous del gel. Les mostres estaven diluïdes amb solució transportadora 6x en una relació de 1:6 respecte al volum final de DNA. El marcador que es va utilitzar va ser de 1 Kb (Fermentas, Thermo Fischer Scientific).
5. Es va aplicar el voltatge de 100 volts durant 20-30 minuts.
6. Finalment es va observar el gel amb un transil·luminador de llum UV a 302 nm, i es va fotografiar amb un digitalitzador d'imatges.

Solucions i tampons

Tampó de llisi

- 150 mM de tampó hidroximetil amino metà (Tris) (Sigma) pH 8
- 100 mM d'àcid etilen diamino tetra acètic (EDTA) (Sigma) pH 8
- 100 mM clorur de sodi (Panreac)
- 0,5 % de dodecilsulfat sòdic (SDS, Merk) (p/v)

Tampó Tris-Acetata-EDTA (TAE) 1 x

- 40 mM Trizma base (Sigma)
- 20 mM àcid acètic glacial (Panreac)
- 1 mM EDTA (Biorad, Hercules, California, Estats Units)

Es conserva a temperatura ambient.

Tampó de càrrega 5x

- 30% glicerol (Panreac)
- 0,25% blau de bromofenol (Biorad)

- 10% SDS (Merk)

Es prepara amb tampó TAE 1 x, i es conserva aliquidat a -20°C.

C.6.2.3. Detecció de la caspasa 3

Durant els primers estadis de l'apoptosi una de les proteases clau implicada en aquest procés és la caspasa 3. Quan és activa pot trencar proteolíticament i activar altres caspases i molècules rellevants en la cèl·lula.

El test de BD consisteix en un enzim-immunoassaig on s'utilitzen anticossos que reconeixen la forma activa de la caspasa 3 humana en llistats cel·lulars.

Procediment d'extracció de les proteïnes intracel·lulars

1. Les cèl·lules es van centrifugar a 2500 x g durant 5 minuts, i després de descartar el sobrenedant i de resuspendre el pèl·let, aquest es va diluir amb 1 ml de PBS.
2. La suspensió cel·lular resultant es va traspasar a microtubs i es van centrifugar a 500 g durant 5 minuts.
3. Es va descartar el sobrenedant i les cèl·lules resuspeses es van llistar en tampó de llisti (1ml / 4×10^6 cèl·lules). Es van incubar durant 45 minuts.
4. Es van centrifugar a 14000 g durant 20 minuts a 4°C, i el sobrenedant es va traspasar a un microtub nou.

Procediment de detecció de la caspasa 3

1. Es va sensibilitzar una placa d'ELISA d'alta unió i de mig pou (Costar) amb l'anticòs de captura a una dilució de 1:250 amb la solució de sensibilització. Posteriorment, es va segellar amb film transparent i incubar durant tota la nit a 4°C.
2. Es va rentar tres vegades amb la solució de rentat.
3. Es va bloquejar la placa amb la solució de bloqueig durant 1 hora a T^a ambient.
4. Es van fer tres rentats amb la solució de rentat.
5. Es va afegir les mostres i l'estàndard diluït amb la solució de bloqueig. Es va incubar durant 2 hores a T^a ambient.
6. Es va rentar 3 vegades amb la solució de rentat.
7. S'afegí l'anticòs de detecció i del conjugat diluïts 1:250 en la solució de bloqueig i es va incubar durant 1 hora a T^a ambient.
8. Es va rentar 7 vegades amb la solució de rentat.
9. Per a revelar es va afegir la solució de substrat i s'incubà durant 20 minuts a T^a ambient i a la foscor.

10. Finalment es va mesurar la densitat òptica a 630 nm amb el lector de plaques.

Solucions i tampons

Tampó de llisi

- 10 mM de tampó Tris (Sigma) pH 7,5
- 130 mM de clorur de sodi (Panreac)
- 1% Triton X-100 (Sigma) (v/v)
- Còctel inhibidor de proteases (BD) a una dilució 1:50 (v/v)

Les solucions de sensibilització, de rentat i de revelat són les mateixes que les que es van fer servir per determinar les citocines amb els tests comercials de BD (apartat C.4.8).

C.6.3. Cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals tractades amb els micobacteris

Per a estudiar si els micobacteris són capaços d'induir arrest en alguna de les fases del cicle cel·lular, es van infectar les cèl·lules tumorals T24 amb diferents micobacteris i posteriorment es va analitzar l'estat de les cèl·lules mitjançant citometria de flux.

Amb el procediment que es detalla a continuació, es va mesurar la quantitat de DNA i es va estimar la distribució de les cèl·lules d'un cultiu en les diferents fases del cicle cel·lular mitjançant IP. D'aquesta manera, quan les cèl·lules passaven a través del citòmetre, emetien una intensitat de llum proporcional al seu contingut de DNA.

Cultiu i infecció de les cèl·lules

1. Es van dipositar 1×10^5 cèl·lules T24 en cada pou d'una placa de cultiu de 6 pous (Nunc) en un volum de 3 ml de medi de cultiu DMEM/F12 amb antibiòtics i sense FBS (Lonza), durant 60 hores per tal de sincronitzar el cicle cel·lular.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, a una MOI de 10:1.

En aquest estudi es van utilitzar suspensions bacterianes de: BCG, *M. spp.*, *M. gastri* i *M. vaccae* (S); amb els bacteris vius o tractats amb calor (121°C durant 15 minuts) o amb radiació gamma (25 kGy).

3. 24 hores abans de processar les cèl·lules per analitzar l'estat del cicle cel·lular, es va afegir els inductors als pous corresponents (cèl·lules sense infectar). Es va descartar el medi i es va afegir medi nou amb camptothecin (6 µg/ml) o staurosporine (5 µM). Aquests es van deixar actuar durant 24 hores.

Processament i anàlisi de les mostres

1. A les 24, 48 i 72 hores de cultiu, es van rentar les cèl·lules amb 2 ml de PBS i es van tripsinitzar amb 500 µl de tripsina i 3 minuts d'incubació.
2. Es van recuperar les cèl·lules amb 2 ml de medi de cultiu complet. Per assegurar-nos de recuperar totes les cèl·lules es va repetir aquest pas amb 2 ml més de medi de cultiu.
3. Es va procedir al recompte cel·lular de cada pou (apartat C.4.3.1).
4. Es van centrifugar a 200 x g durant 6 minuts i es va descartar el sobrenedant.
5. El pèl·let resuspès es va diluir amb 500 µl de PBS i es va afegir 4,5 ml d'etanol al 70% (v/v) fred.
6. La suspensió cel·lular es va mantenir a -40°C.
7. Es va centrifugar a 200 x g durant 5 minuts. Es va descartar l'etanol i el pèl·let resuspès es va diluir amb 1 ml de PBS. Es va incubar durant 1 minut a T^a ambient.
8. Es va centrifugar a 300 x g durant 5 minuts. Es va descartar es sobrenedant, i el pèl·let resuspès es va diluir amb 250 µl de PBS i 500 µl del tampó d'extracció de DNA. Es va incubar durant 5 minuts a T^a ambient.

El tampó d'extracció contenia citrat i detergent, i va permetre l'extracció dels fragments petits de DNA de les cèl·lules possiblement apoptòtiques. Aquests fragments es poden observar com un pic corresponent a la fase SubG0-G1 en l'anàlisi per citometria de flux (**Fig. D32**).

9. Es va centrifugar a 300 x g durant 5 minuts. Es va descartar es sobrenedant, i el pèl·let resuspès es va diluir amb la solució de IP.
10. La solució es va traspasar a tubs de citometria i es va incubar durant 30 minuts a T^a ambient.
11. La lectura es va realitzar en un citòmetre FACSCalibur (BD) i els resultats es van analitzar amb el software CellQuestPro.

Solucions i tampons

Tampó d'extracció de DNA

- Fosfat de sodi (Panreac) 0,2 M 48 ml
- Àcid cítric (Fluka, Buchs, Suïssa) 0,1 M 2 ml

Es va agitar fins dissoldre els components i es va ajustar el pH a 7,8.

Solució de IP

- 0,1% (v/v) Triton X-100 (Sigma) en PBS 10 ml
- RNAsa lliure de DNAsa (Roche) 2 mg
- IP (1mg/ml) (Sigma) 200 µl

Preparar just en el moment de fer servir.

C.7. Estudi de l'efecte antitumoral indirecte dels bacteris

C.7.1. Cèl·lules de sang perifèrica humanes (PBMC)

C.7.1.1. Activació de les PBMC per part dels micobacteris

Les PBMC es van cultivar i infectar tal i com es detalla a continuació. Posteriorment, es va recol·lectar el sobrenedant de cada cultiu (procediment explicat a l'apartat C.4.4) i es va mesurar la producció de citocines (procediment detallat a l'apartat C.4.6).

Cultiu i infecció de les PBMC

1. Es van dipositar 4×10^6 cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu de 6 pouets (Nunc), en un volum de 3 ml de medi RPMI 1640 complet sense antibiòtics.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2 (passes 1-2). En aquest estudi es van utilitzar suspensions bacterianes de: BCG, *M. spp.*, *M. gastri*, *M. phlei* i *M. vaccae* (S); amb els bacteris vius o tractats amb calor (121°C durant 15 minuts) o amb radiació gamma (25 kGy). La MOI utilitzada va ser de 0,1:1 per BCG i de 1:1 per la resta de bacteris.
3. Les cèl·lules infectades es van incubar durant 7 dies a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂ amb medi de cultiu complet sense antibiòtics.

En tots els experiments es van realitzar en paral·lel a les infeccions, cultius de cèl·lules sense infectar com a control. Cada una de les infeccions es va realitzar per triplicat en cada experiment, i els experiments van ser repetits com a mínim tres vegades.

C.7.1.2. Citotoxicitat de les PBMC activades front les cèl·lules tumorals humanes

Després de cultivar i infectar les PBMC amb els micobacteris durant 7 dies, tal i com s'ha explicat a l'apartat anterior, es va procedir al cultiu de les cèl·lules tumorals amb les PBMC activades o amb sobrenedant d'aquestes, tal i com es detalla a continuació:

Cultiu de les cèl·lules tumorals amb les PBMC activades

1. Tres hores abans d'iniciar el co-cultiu de les cèl·lules tumorals amb les PBMC activades, es van dipositar 1×10^4 cèl·lules T24 en cada pou d'una placa de cultiu de 96 pouets (Nunc), en un volum de 200 µl de medi RPMI 1640 complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.

2. Es va recollir el sobrenedant de cada pou de les PBMC activades amb els bacteris.
3. Es van fer tres rentats amb 3 ml de PBS per recuperar les cèl·lules, les quals es van ajuntar amb el sobrenedant anterior.
4. Les cèl·lules recuperades es van centrifugar a 250 x g durant 10 minuts. Es va descartar el sobrenedant. Es va afegir 1 ml de medi de cultiu complet RPMI 1640 al pèl·let resuspès.
5. Es va realitzar un recompte cel·lular amb la cambra de Neubauer (C.4.3.1).
6. Les PBMC es van diluir en medi de cultiu complet obtenint una concentració de 2×10^5 cèl·lules en 3 ml.
7. El medi de cultiu de les cèl·lules T24 es va reemplaçar per la suspensió de PBMC anterior. D'aquesta manera les cèl·lules estaven en una proporció de 20:1 (PBMC : T24).
8. Els cultius es van incubar durant 48 hores a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂.
9. Finalment, es va recol·lectar el sobrenedant i es va guardar (C.4.4) per mesurar la producció de citocines (C.4.6). Després de rentar el pou amb PBS, es va analitzar la inhibició de les cèl·lules tumorals mitjançant el MTT (C.4.3.2).

Cultiu de les cèl·lules tumorals amb el sobrenedant de les PBMC activades

1. Tres hores abans d'iniciar el co-cultiu de les cèl·lules tumorals amb les PBMC activades, es van dipositar 1×10^4 cèl·lules T24 en cada pou d'una placa de cultiu de 96 pouets (Nunc), en un volum de 200 µl de medi RPMI 1640 complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 3 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. Es va recollir el sobrenedant de cada pou de les PBMC activades amb els bacteris i es va centrifugar a 15000 x g durant 20 minuts. Part d'aquests sobrenedants es va guardar, tal i com s'indica a l'apartat C.4.4.
3. El medi de cultiu de les cèl·lules T24 es va reemplaçar pel sobrenedant centrifugat de les PBMC.
4. Els cultius es van incubar durant 48 hores a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂.
5. Finalment, es va analitzar la inhibició de les cèl·lules tumorals mitjançant el MTT (C.4.3.2).

C.7.2. Línia cel·lular de macròfags de ratolí J774

Els macròfags J774 es van infectar amb els micobacteris. Posteriorment, es va estudiar la supervivència dels bacteris dins de les cèl·lules, i la seva capacitat d'activació de marcadors de superfície i d'induir citocines en els macròfags.

C.7.2.1. Supervivència dels micobacteris dins dels macròfags

Protocol

1. Es van dipositar 6×10^4 cèl·lules J774 en cada pou d'una placa de cultiu de 48 pous (Nunc) en un volum de 400 μ l de medi DMEM complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 24 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, amb MOIs de 100:1; 10:1; 1:1 i 0,1:1.
3. Els cultius es van mantenir a 37°C i en una atmosfera humida amb 5% de CO₂.
4. Finalment, per tal de determinar la viabilitat dels micobacteris dins dels macròfags, es va procedir com a l'apartat C.4.7.

C.7.2.2. Activació dels macròfags

C.7.2.2.1. Detecció i anàlisi de marcadors de superfície d'activació en macròfag

Per a detectar els marcadors de superfície MHC-II, CD80, CD86 i CD40; es van analitzar per citometria de flux les cèl·lules tenyides amb anticossos marcats front aquests receptors (**Taula C.4**).

Cultiu i infecció dels macròfags J774

1. Es van dipositar 5×10^5 cèl·lules J774 en cada pou d'una placa de cultiu de 6 pous (Nunc) en un volum de 3 ml de medi DMEM complet sense antibiòtics. Es van incubar durant 24 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2. En aquest estudi es van utilitzar suspensions bacterianes de: BCG, *M. spp.*, *M. gastri*, *M. phlei* i *M. vaccae* (S); amb els bacteris vius o tractats amb calor (121°C durant 15 minuts) o amb radiació gamma (25 kGy). La MOI utilitzada va ser de 1:1 per BCG i de 10:1 per la resta de bacteris.

Els pous no infectats es van estimular amb lipopolisacàrid (LPS, procedent de la soca *E. coli* 055:B5 (Sigma)), a una concentració de 10 μ g/ml.

Paral·lelament, també es va mantenir pous sense estímul com a control, als que es va reemplaçar el medi de cultiu per medi fresc.

3. Els cultius es van mantenir a 37°C i en una atmosfera humida amb 5% de CO₂, durant 24 hores.

Processament i anàlisi de les mostres

1. Es van rentar les cèl·lules amb 3 ml de PBS.
2. Per a recol·lectar les cèl·lules de cada pou, es van desenganxar de la superfície amb un gratador i es van recollir amb 2 ml de PBS. Aquest pas es va realitzar dos vegades per assegurar el màxim nombre de cèl·lules possibles.
3. Després de transferir les cèl·lules a tubs de poliestirè, es va realitzar el recompte cel·lular (C.4.3.1).
4. Es van centrifugar a 300 x g durant 10 minuts. El sobrenedant es va descartar i es va afegir 1 ml de PBS al pèl·let resuspès.
5. Les cèl·lules sense estimular i les estimulades amb LPS es van repartir en quatre microtubs (250 µl/microtub). Les cèl·lules infectades es van repartir en dos microtubs (500 µl/microtub).
6. Es van centrifugar a 500 x g durant 5 minuts. Es va descartar el sobrenedant i el pèl·let es va resuspendre.
7. Es va afegir 25 µl de l'anticòs FcBlock diluït en PBS a una concentració de 5 µg/ml. Es va incubar en gel durant 15 minuts.
8. Es va afegir 25 µl de l'anticòs anti-marcador de superfície o de l'anticòs control d'isotip, diluït en PBS a una concentració de 5 µg/ml; excepte l'anticòs anti-CD40 i el control d'isotip corresponent, que es van utilitzar a una concentració de 10 µg/ml, i es va incubar en gel durant 30 minuts i protegit de la llum.
9. Les cèl·lules tenyides es van centrifugar a 500 x g durant 5 minuts. Es va descartar el sobrenedant i es va afegir 1 ml de PBS al pèl·let resuspès.
10. Es van tornar a centrifugar i rentar com al pas anterior (10).
11. Després de l'última centrifugació, es va descartar el sobrenedant i el pèl·let es va resuspendre i traspasar a un tub de citometria en 300 µl de PBS.
12. Es van passar les cèl·lules tenyides pel citòmetre FACSCalibur (BD) i es van analitzar els resultats amb el software CellQuestPro.

Taula C.4. Sumari dels anticossos utilitzats per a la detecció dels receptors de superfície cel·lular

Receptor	Anticòs	Control d'isotip	Procedència
MHC-II	anti-IA ^d de ratolí	IgG2b, _κ	ratolí
CD40	anti-CD40 de ratolí	IgG2a, _κ	rata
CD80 (B7-1)	anti-CD80 de ratolí	IgG2, _κ	hamster
CD86 (B7-2)	anti-CD86 de ratolí	IgG2a, _κ	rata
Fcγ III/II	anti-CD16/CD32 de ratolí*	-	rata

* mouse BD Fc BlockTM

Tots els anticossos i els seus controls d'isotip, excepte l'anti-CD16/CD32, estan marcats fluorescentment amb ficoeritrina (PE).

Tots els anticossos i els seus controls d'isotip provenen de BD.

C.7.2.2.2. Detecció de la producció de citocines pels macròfags activats

Els macròfags J774 es van cultivar i infectar de la mateixa manera que s'ha explicat a l'apartat anterior (C.7.2.2.1). Després de les 24 hores de cultiu es va recollir el sobrenedant i es va conservar (C.4.4) per tal de mesurar la producció de citocines (C.4.6) i NO (C.4.5).

C.7.3. Macròfags derivats de medul·la òssia de ratolí (BMM)

C.7.3.1. Efecte directe dels micobacteris en les cèl·lules tumorals de ratolí

Per a estudiar l'efecte antitumoral directe dels micobacteris es van infectar les cèl·lules tumorals i posteriorment s'analitzà la capacitat d'inhibició cel·lular amb MTT. També es va recollir el sobrenedant per a mesurar la producció de citocines mitjançant ELISA.

Procediment

1. Es van dipositar 3×10^4 cèl·lules en cada pou d'una placa de cultiu de 48 pouets (Nunc), en un volum de 400 µl de medi RPMI 1640 complet sense antibiòtics. Es van incubar tota la nit a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂.
2. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, a una MOI de 10:1. Els bacteris utilitzats en aquest estudi van ser: BCG, *M. spp.* i *M. gastri*.
3. Els efectes de la infecció per part dels bacteris es va monitoritzar després de 24, 48 i 72 hores.

En tots els experiments es van realitzar en paral·lel a les infeccions, cultius de cèl·lules tumorals sense infectar com a control. Cada una de les infeccions es va realitzar per triplicat en cada experiment, i els experiments van ser repetits com a mínim tres vegades.

C.7.3.2. Activació dels BMM per part dels micobacteris

Els BMM es van cultivar i infectar tal i com es detalla a continuació. Posteriorment, es va recol·lectar el sobrenedant de cada cultiu (procediment explicat a l'apartat C.4.4) i es va mesurar la producció de citocines (procediment detallat a l'apartat C.4.6).

Cultiu i infecció dels BMM

1. Es van dipositar els BMM en una placa de cultiu de 48 pouets (Nunc), en una concentració de 2×10^5 BMM / pou en un volum de 400 μ l. Les condicions de cultiu han estat explicades anteriorment a l'apartat C.3.2.3.
2. Després dels 5-6 dies de cultiu i d'estar 24 hores sense el medi condicionat de les cèl·lules L929, es comptava amb una concentració cel·lular corresponent a 1×10^5 BMM / pou.
3. El procediment d'infecció va ser com l'indicat a l'apartat C.4.2, a una MOI de 10:1. Els bacteris utilitzats en aquest estudi van ser: BCG, *M. spp.* i *M. gastri*.
4. Es van utilitzar pous control als que es va afegir els següents compostos com a controls positius durant 24 hores:
 - Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ trihydrochloride (Pam₃) (Enzo Life Sciences) a una concentració de 1 μ g/ml, com agonista del TLR2.
 - LPS d'*E. coli* (Sigma) a una concentració de 10 μ g/ml, com agonista del TLR4.
 - IFN- γ (Mabtech) a una concentració de 20 ng/ml, com control de viabilitat cel·lular general, donat que el tipus d'estimulació és independent dels TLR.
5. Les cèl·lules infectades es van incubar durant 24 hores a 37°C en una atmosfera humida del 5% de CO₂ amb medi de cultiu complet sense antibiòtics.

En tots els experiments es van realitzar en paral·lel a les infeccions, cultius de cèl·lules sense infectar com a control. Cada una de les infeccions es va realitzar per triplicat en cada experiment, i els experiments van ser repetits com a mínim tres vegades.

C.7.3.3. Citotoxicitat dels BMM activats front les cèl·lules tumorals de ratolí

Després de cultivar i infectar els BMM amb els micobacteris durant 24 hores, tal i com s'ha explicat a l'apartat anterior (C.7.3.2), es va procedir al cultiu de les cèl·lules tumorals amb les PBMC activades o amb sobrenedant d'aquestes, tal i com es detalla a continuació:

Cultiu de les cèl·lules tumorals amb els BMM activats

1. Es va recollir el sobrenedant dels BMM de cada pou en cultiu.
2. Es van dipositar 5×10^3 cèl·lules MB49 en cada pou de la placa de cultiu dels BMM activats, en un volum de 400 μ l de medi RPMI 1640 complet. D'aquesta manera les cèl·lules estaven en una proporció de 20:1 (BMM : MB49).
3. Els cultius es van incubar a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂ durant 24 hores.
4. Es va recollir el sobrenedant de cada pou. Les cèl·lules adherides de cada pou es van tripsinitzar (apartat C.3.3.3) i recollir en Eppendorfs. Els pous es van rentar amb PBS per assegurar-nos de recuperar totes les cèl·lules.
5. Finalment, es va recol·lectar el sobrenedant i es va guardar (C.4.4) per a mesurar la producció de citocines (C.4.6), i es va realitzar el recompte de les cèl·lules tumorals recuperades amb la cambra de Neubauer (C.4.3.1).

Cultiu de les cèl·lules tumorals amb el sobrenedant dels BMM

1. Un dia abans d'iniciar l'experiment, es van dipositar $1,5 \times 10^4$ cèl·lules MB49 en cada pou d'una placa de 96 pouets (Nunc), en un volum de 200 μ l per pou, diluïdes en medi RPMI 1640 complet.
2. Es va recollir el sobrenedant dels BMM en cultiu i es va centrifugar a 15000 x g durant 20 minuts a 4°C.
3. Es va reemplaçar el medi de les cèl·lules tumorals pel sobrenedant centrifugat dels BMM.
4. Els cultius resultants es van incubar a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂ durant 48 hores.
5. Es va recollir el sobrenedant de cada pou. Les cèl·lules adherides de cada pou es van tripsinitzar (apartat C.3.3.3) i recollir en Eppendorfs. Els pous es van rentar amb PBS per assegurar-nos de recuperar totes les cèl·lules.
6. Finalment, es va analitzar la inhibició de les cèl·lules tumorals recuperades mitjançant el recompte amb la cambra de Neubauer (C.4.3.1).

En tots els experiments es va realitzar, en paral·lel a les infeccions, cultius de cèl·lules tumorals sense infectar com a control. En cada experiment, cada una de les infeccions es va realitzar per triplicat, i els experiments van ser repetits com a mínim tres vegades.

C.8. Anàlisi estadístic

En l'estudi comparatiu de l'activitat antitumoral directa entre les diferents soques de BCG i els diferents micobacteris ambientals, es va utilitzar el test T-student per a comparar els valors d'inhibició de la proliferació cel·lular, així com el nivell de citocines obtingudes en els sobrenedants dels cultius de les línies tumorals de càncer de bufeta infectats amb els micobacteris. Aquest estudi es va realitzar entre els valors de les cèl·lules control (no infectades) i de les cèl·lules infectades amb els micobacteris.

En l'estudi comparatiu de la supervivència de les diferents soques de BCG i dels diferents micobacteris ambientals dins de les cèl·lules tumorals de bufeta i de la línia de macròfags murins J774, es va utilitzar el test T-student per comparar el nombre de cfu/pou en els cultius entre les diferents espècies micobacterianes i també entre els diferents temps post-infecció.

En l'estudi comparatiu de la resposta antitumoral directa entre els diferents micobacteris vius i sotmesos als diversos tractaments, es va utilitzar el test T-student per a comparar els valors d'inhibició de la proliferació cel·lular, així com el nivell de citocines obtingudes en els sobrenedants dels cultius de les línies tumorals de càncer de bufeta infectats amb els micobacteris. Aquest estudi es va realitzar comparant els valors de les cèl·lules control (no infectades) i de les cèl·lules infectades amb els diferents micobacteris, comparant els valors de les cèl·lules infectades amb els micobacteris vius i tractats, i comparant els valors de les cèl·lules infectades amb els diferents micobacteris i amb BCG viu.

En l'estudi comparatiu de l'efecte sinèrgic de la MMC amb els diferents micobacteris en les cèl·lules tumorals de càncer de bufeta, es va utilitzar el test T-student per a comparar els valors d'inhibició de la proliferació cel·lular, així com el nivell de citocines obtingudes en els sobrenedants dels cultius. Aquest estudi es va realitzar comparant els valors de les cèl·lules control (no tractades) i de les cèl·lules infectades amb els micobacteris i tractades o no amb MMC, comparant els valors de les cèl·lules infectades amb els micobacteris i tractades o no amb MMC i de les cèl·lules infectades amb BCG viu, i comparant els valors de les cèl·lules infectades amb els micobacteris amb i sense MMC.

En l'estudi comparatiu de l'efecte directe de les citocines IL-6 i IL-8 en la línia tumoral T24, es va utilitzar el test T-student per a comparar els valors d'inhibició de la

proliferació cel·lular entre les cèl·lules tractades amb les citocines i les cèl·lules control (no tractades).

En l'estudi comparatiu de la inducció de la caspasa 3 en la línia tumoral T24, es va utilitzar el test T-student per a comparar el nivell d'expressió d'aquesta proteïna en els sobrenedants dels cultius de les cèl·lules infectades amb els micobacteris i de les cèl·lules tractades amb els inductors de l'apoptosi (CMP i STP). Tamé es va utilitzar aquest test per a comparar el percentatge de cèl·lules de cada fase obtingut en l'anàlisi del cicle cel·lular de les cèl·lules infectades amb els micobacteris.

En l'estudi comparatiu de l'activitat antitumoral indirecta entre els diferents micobacteris ambientals, es va utilitzar el test T-student per a comparar els valors de citotoxicitat directa i indirecta (mitjançant el sobrenedant), així com el nivell de citocines obtingudes en els sobrenedants dels cultius de les PBMC i dels BMM, activats amb els micobacteris, junt amb les cèl·lules tumorals. Aquest estudi es va realitzar comparant entre els valors de les cèl·lules control (no activades) i de les cèl·lules activades amb els micobacteris, comparant els valors de les cèl·lules activades amb els micobacteris vius i tractats, i comparant els valors de les cèl·lules activades amb els diferents micobacteris i amb BCG viu.

Finalment, en l'estudi comparatiu de la inducció de l'expressió dels marcadors d'activació de superfície dels macròfags murins J774, es va fer servir el test T-student per a comparar els nivells obtinguts en les cèl·lules infectades amb els micobacteris i amb els nivells basals de les cèl·lules control (no infectades).

Les diferències es van considerar significatives quan p era $<0,05$.

D. RESULTATS

D. RESULTATS

D.1. Estudi de l'activitat antitumoral de diferents soques de *M. bovis* BCG

D.1.1. Caracterització fenotípica. Perfil lipídic i glicolipídic

En aquest treball s'han escollit tres soques evolutivament primerenques de BCG: Russian, Moreau i Japan; i cinc soques tardanes: Danish, Glaxo, Tice, Connaught i Phipps. Les diferents soques de BCG presenten a la seva paret cel·lular diversos patrons d'antígens (**Fig. D.1**), de manera que vam analitzar el patró lipídic i glicolipídic de cada una d'elles.

Figura D.1. Genealogia i característiques fenotípiques de les diferents soques de BCG. L'any d'obtenció de cada soca s'ha inclòs com a referència. La dimensió horitzontal no està a la mateixa escala que les diferències genètiques

Mycobacterium bovis		Antígens						
		MPT64 ^{&}	MPT70 ^{&} MPT83 ^{&}	Metoxi- micolat ^{&}	PDIM [*]	PGL [*]	MMT, DMT, PIM, FL [*]	
1908-1921 - RD1	BCG							
1924	BCG Russian	+	+++	+	+	+	+	
1925	BCG Moreau	+	+++	+	-	-	+	
- RD2	BCG Japan	+	+++	+	-	-	+	
1931	BCG Danish	-	+	-	+	+	+	
1954	BCG Glaxo	-	+	-	-	-	+	
1934	BCG Tice	-	+	-	+	-	+	
1948	BCG Connaught	-	+	-	+	+	+	
1938	BCG Phipps	-	+	-	+	+	+	

PDIM, dimicocerosats de tiocerol; PGL, fenol glicolipid; MPT64, MPT70, MPT83, proteïnes antigèniques (MPT per *M. tuberculosis*, i el nombre que segueix indica la mobilitat relativa durant l'electroforesi en gel de poliàcrilamida no desnaturalitzant); MMT, monomicolat de trealosa; DMT, dimicolat de trealosa; PIM, fosfatidilinositolmanòsids; FL, fosfolípids.

[&] (Liu, 2009)

^{*} Fig. D.2-D.5 d'aquest treball.

Tal i com es pot observar a la **figura D.2**, les espècies primerenques van presentar un mateix contingut d'àcids micòlics: α - (α -), metoxi- i ceto-micolat; mentre que les soques tardanes mostraren la pèrdua del metoxi-micolat, presentant un patró format per només l' α - i ceto-micolat.

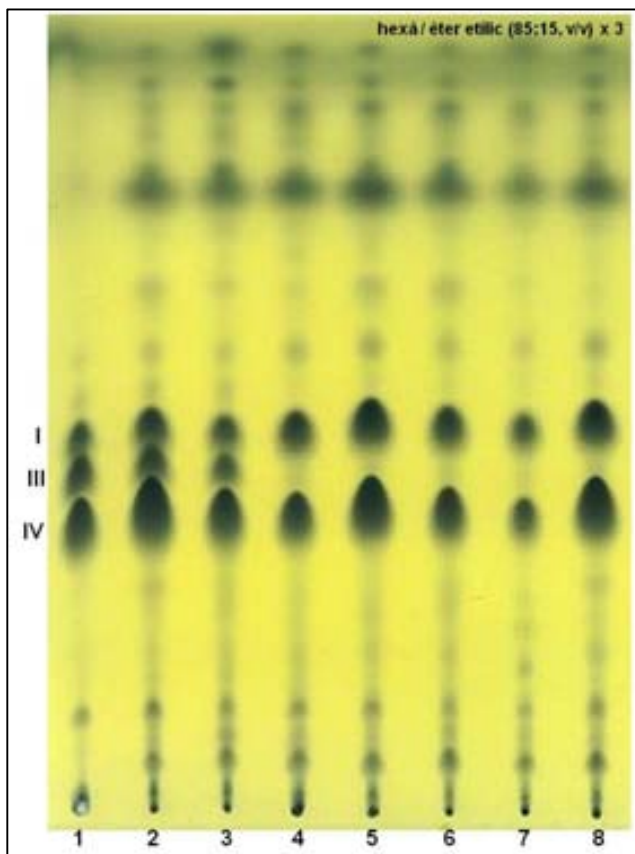


Figura D.2. CCF dels àcids micòlics de les soques de BCG

- (1) Russian,
- (2) Moreau,
- (3) Japan,
- (4) Danish,
- (5) Glaxo,
- (6) Tice,
- (7) Connaught,
- (8) Phipps.

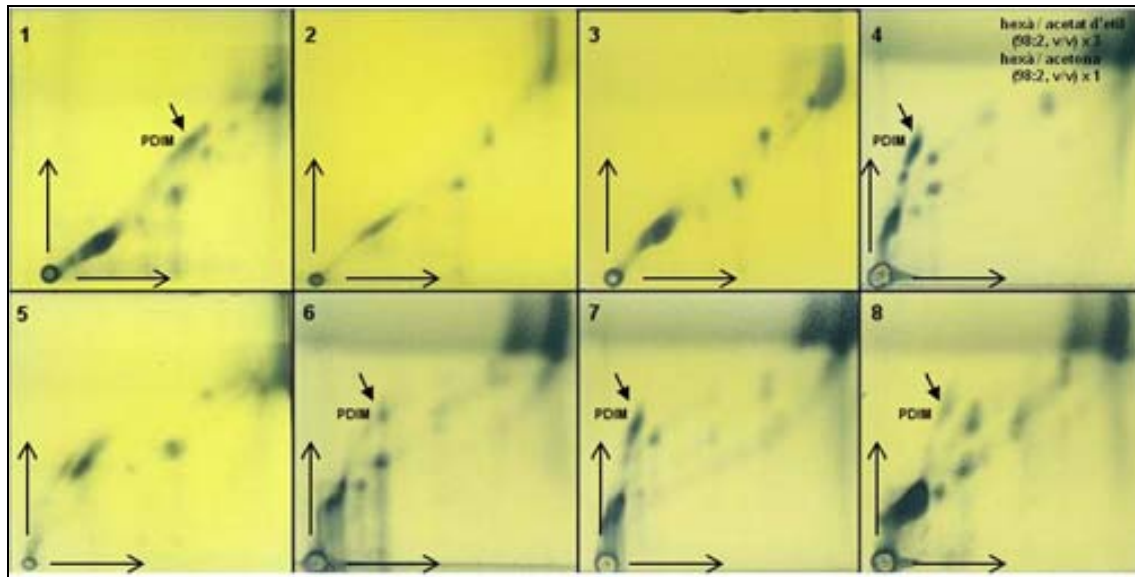
La placa va ser eluïda tres vegades amb hexà/dietil èter (85:15, v/v), i revelada amb àcid fosfomolíbdic al 10% (p/v) en etanol.

I, α -micolat;
 III, metoxi-micolat;
 IV, ceto-micolat.

Respecte al contingut de lípids i glicolípid (Fig. D.3 i D.4), es va detectar la presència de PDIM i PGL als extractes de les soques Russian, Danish, Connaught i Phipps. En canvi, aquests dos compostos no es van detectar a les soques Japan, Moreau i Glaxo. BCG Tice va ser l'única soca analitzada que va mostrar un patró diferent, ja que va presentar PDIM, però no PGL.

Als extractes de totes les soques de BCG analitzades es va detectar la presència de DMT, MMT, PIM i fosfolípids (Fig. D.5), de manera que el contingut d'aquests compostos no mostrava diferències entre les espècies primerenques i tardanes analitzades.

Figura D.3. CCF-2D del PDIM de l'extracte cru de les soques de BCG



Russian (1), Moreau (2), Japan (3), Danish (4), Glaxo (5), Tice (6), Connaught (7) i Phipps (8).

PDIM, dimiocerosat de tiocerol

La placa va ser eluïda tres vegades amb èter de petroli/acetat d'etil (98:2, v/v) i èter de petroli/acetona (98:2, v/v) una vegada en una segona direcció. Va ser revelada amb àcid fosfomolibdic al 10% (p/v) en etanol.

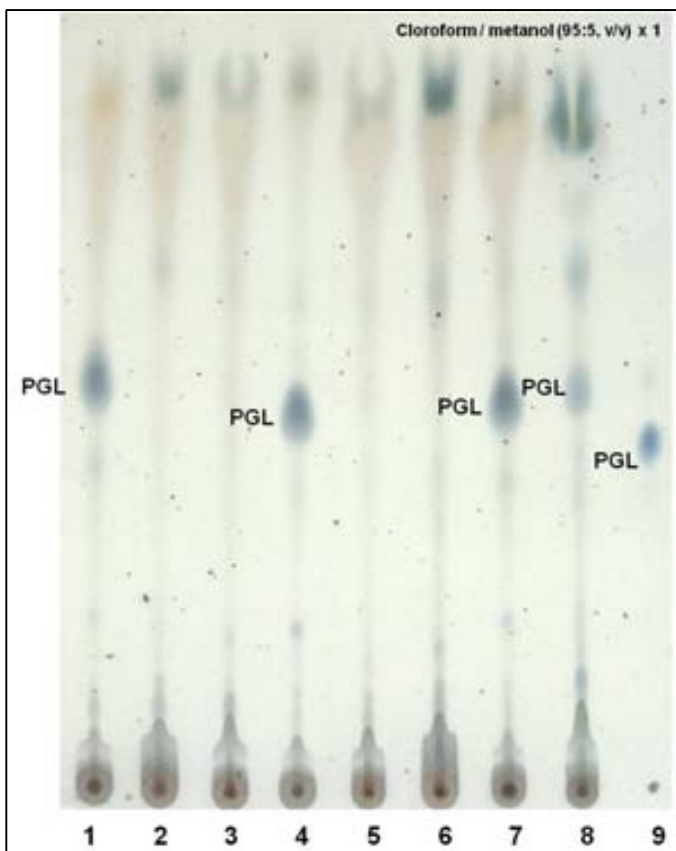


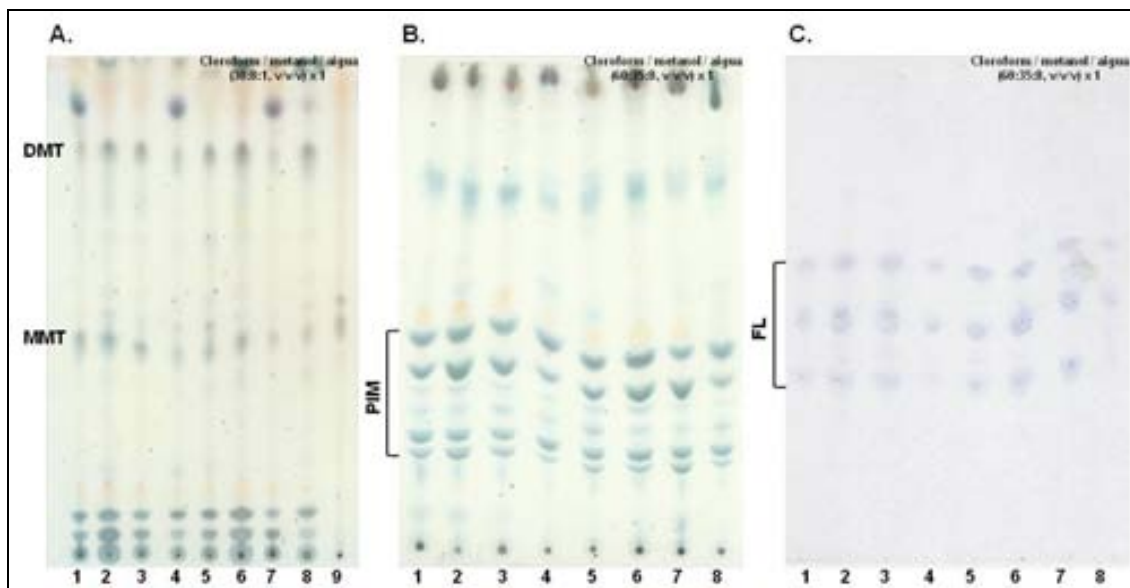
Figura D.4. CCF del PGL de l'extracte cru de les soques de BCG.

- (1) Russian,
- (2) Moreau,
- (3) Japan,
- (4) Danish,
- (5) Glaxo,
- (6) Tice,
- (7) Connaught,
- (8) Phipps,
- (9) PGL purificat de *M. canetti*.

PGL, fnoil glicolípid

La placa va ser eluïda amb cloroform/metanol (95:5, v/v) i es va revelar amb antrona a l'1% (p/v) en àcid sulfúric.

Figura D.5. CCF del DMT i del MMT (A), dels PIM (B), i dels FL (C) de l'extracte cru de les soques de BCG



Russian (1), Moreau (2), Japan (3), Danish (4), Glaxo (5), Tice (6), Connaught (7), Phipps (8) i DMT i MMT purificats de *M. tuberculosis* H37Rv (9).

DMT, dimicolat de trealosa; MMT, monomicolat de trealosa; PIM, fosfatidilinositolmanòsid, FL, fosfolípids.

La placa (A) va ser eluïda amb cloroform/metanol/aigua (30:8:1, v/v) i es va revelar amb antrona a l'1% (p/v) en àcid sulfúric.

La placa (B) va ser eluïda amb cloroform/metanol/aigua (60:35:8, v/v) i es va revelar amb antrona a l'1% (p/v) en àcid sulfúric.

La placa (C) va ser eluïda amb cloroform/metanol/aigua (60:35:8, v/v) i es va revelar amb Dittmer.

D.1.2. Capacitat d'inhibir la proliferació de les cèl·lules tumorals

La inhibició de la proliferació cel·lular es va analitzar a diferents temps i a diferents MOIs. Tal i com mostra la **figura D.6**, l'activitat anti-proliferativa dels BCG va ser temps i MOI dependent. De totes maneres, l'efecte antitumoral de cada soca de BCG es va mostrar diferent segons la línia cel·lular estudiada.

En la línia tumoral T24 (**Fig. D.6 A**), totes les soques de BCG induïren una forta inhibició a partir de les 24 hores després de la infecció; excepte Glaxo, amb la qual aquest efecte s'observà a partir de les 48 hores. El nivell màxim d'inhibició de la proliferació cel·lular en aquestes cèl·lules, es va detectar 72 hores després de la infecció. En canvi, en el cas de la línia J82 (**Fig. D.6 B**), el nivell màxim d'inhibició del creixement cel·lular es va detectar a les 120 hores post-infecció, mentre que en les cèl·lules RT4 (**Fig. D.6 C**) va ser a les 72 hores. En les tres línies tumorals, es va analitzar la inhibició de la proliferació cel·lular a temps superiors als indicats, arribant a les 96 hores amb les línies T24 i RT4 i a les 144 hores amb la J82, però no es van detectar valors d'inhibició superiors (dades no mostrades).

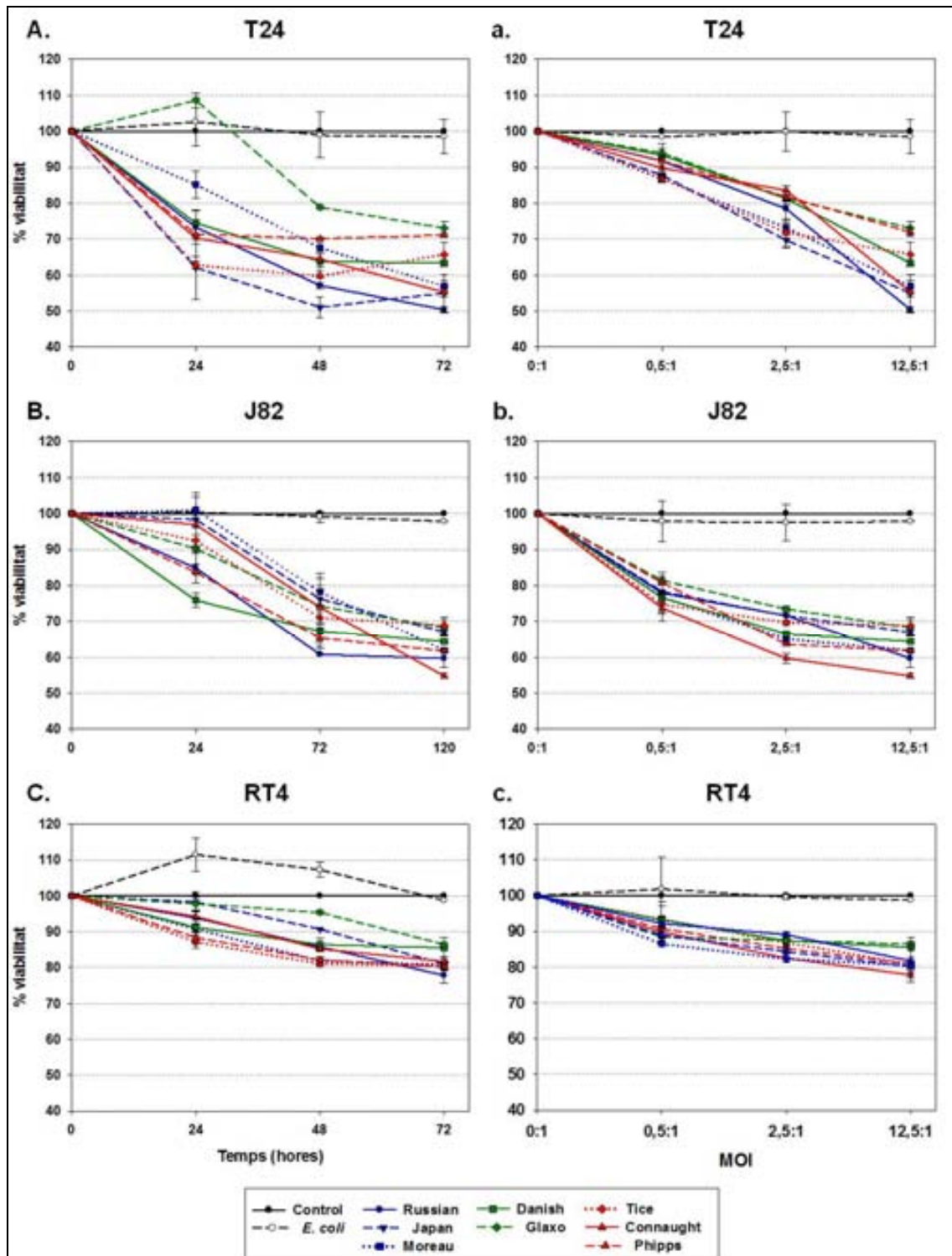
En els tres tipus cel·lulars, els nivells més elevats d'inhibició de la proliferació cel·lular, tal i com es mostra a la **figura D.6 a, b i c**, van estar utilitzant la MOI de 12,5:1. Es van infectar els cultius cel·lulars amb MOIs més elevades, arribant fins a 62,5:1, però en cap de les tres línies tumorals es va detectar un increment de la inhibició cel·lular (dades no mostrades).

Comparant les diferents soques de BCG, les que van mostrar una major capacitat d'inhibir la proliferació de les cèl·lules T24 (**Fig. D.7**) van ser les tres espècies primerenques, Russian, Moreau i Japan, i l'espècie tardana, Connaught; amb valors d'inhibició del 43-50%. En canvi, BCG Glaxo i Phipps van ser les menys eficaces per disminuir la viabilitat d'aquestes cèl·lules, mostrant valors d'inhibició del 27% aproximadament. Aquestes dues últimes soques mostraren una capacitat citotòxica significativament diferent respecte de les altres soques analitzades ($p < 0,05$), excepte respecte de la Tice.

En la línia cel·lular J82 (**Fig. D.7**), les espècies Russian i Connaught són les que van induir un major efecte inhibitori del creixement tumoral, amb valors d'inhibició del 40-45%. Per contra, Glaxo i Tice van ser les menys eficaces, mostrant valors del 31% d'inhibició. En aquest cas, BCG Connaught va ser l'única espècie que mostrà un efecte antitumoral significativament diferent a la resta ($p < 0,05$), excepte respecte de Russian.

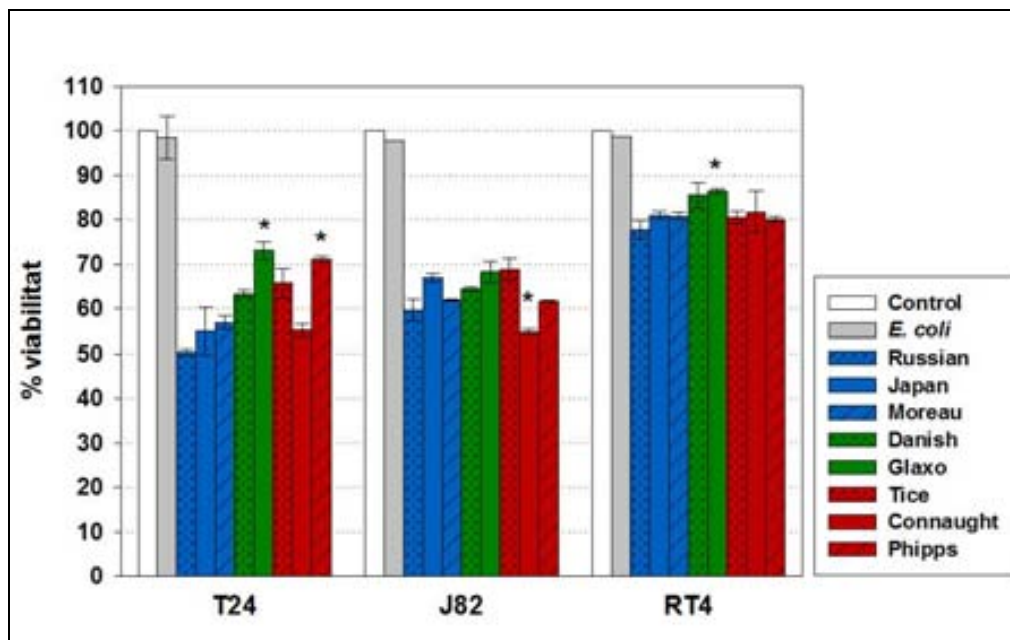
Finalment, en les cèl·lules RT4 (**Fig. D.7**), totes les espècies de BCG van induir nivells similars d'inhibició de la proliferació (18-22%) a les 72 hores post-infecció; excepte Danish i Glaxo, les quals van mostrar nivells d'inhibició inferiors a la resta (13-14%). BCG Glaxo mostrà valors anti-proliferatius estadísticament diferents ($p < 0,05$) respecte de Russian, Moreau, Tice i Phipps.

Figura D.6. Inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals per BCG o *E. coli* a diferents temps post-infecció (A, B i C) i a diferents MOI (a, b i c)



Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte a les cèl·lules control (no infectades). Cada punt representa el promig \pm desviació estàndard (SD) dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

Figura D.7. Efecte de les diferents soques de BCG i de *E. coli* (MOI 12,5:1) en el creixement de les cèl·lules tumorals després de 72 hores en les línies T24 i RT4, i de 120 hores en la J82



Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte al control (cèl·lules no infectades). Cada punt representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs altres soques de BCG

D.1.3. Capacitat d'induir la producció de citocines i NO en les cèl·lules tumorals

En les línies tumorals T24 i J82, totes les soques de BCG analitzades van ser capaces d'induir la producció de IL-8 (**Fig. D.8 A**). Els nivells induïts pels micobacteris van ser significativament superiors als produïts per les cèl·lules constitutivament ($p < 0,05$), excepte en els casos de les soques Glaxo i Tice en la línia J82. Les soques de BCG Russian i Connaught van induir els nivells més elevats de IL-8 en aquests dos tipus cel·lulars.

Igual que en el cas anterior, les cèl·lules RT4 (**Fig. D.8 A**) infectades amb les diferents soques de BCG també van produir nivells de IL-8 superiors als produïts per les cèl·lules no infectades ($p < 0,05$), excepte amb BCG Glaxo.

Apart de l'IL-8, les cèl·lules T24 i J82 produeixen constitutivament IL-6 (**Fig. D.8 B**), però la infecció d'aquestes cèl·lules amb les diferents soques de BCG incrementà significativament els nivells d'aquesta citocina ($p < 0,05$). Les espècies Russian i Connaught van ser les més eficaces en induir la producció d'IL-6 en la línia T24, i aquestes dues, juntament amb la Phipps, en la J82. Per contra, Glaxo i Tice van induir els nivells més baixos d'aquesta citocina en les dues línies tumorals. Cap BCG va ser capaç d'induir la producció de IL-6 en la línia RT4 (**Fig. D.8 B**).

El control negatiu, *E. coli*, induí la producció de IL-8 i IL-6 en les tres línies tumorals analitzades. En el cas de la RT4, *E. coli* va induir la producció de valors de IL-8 superiors als obtinguts amb les diferents soques de BCG ($p < 0,05$).

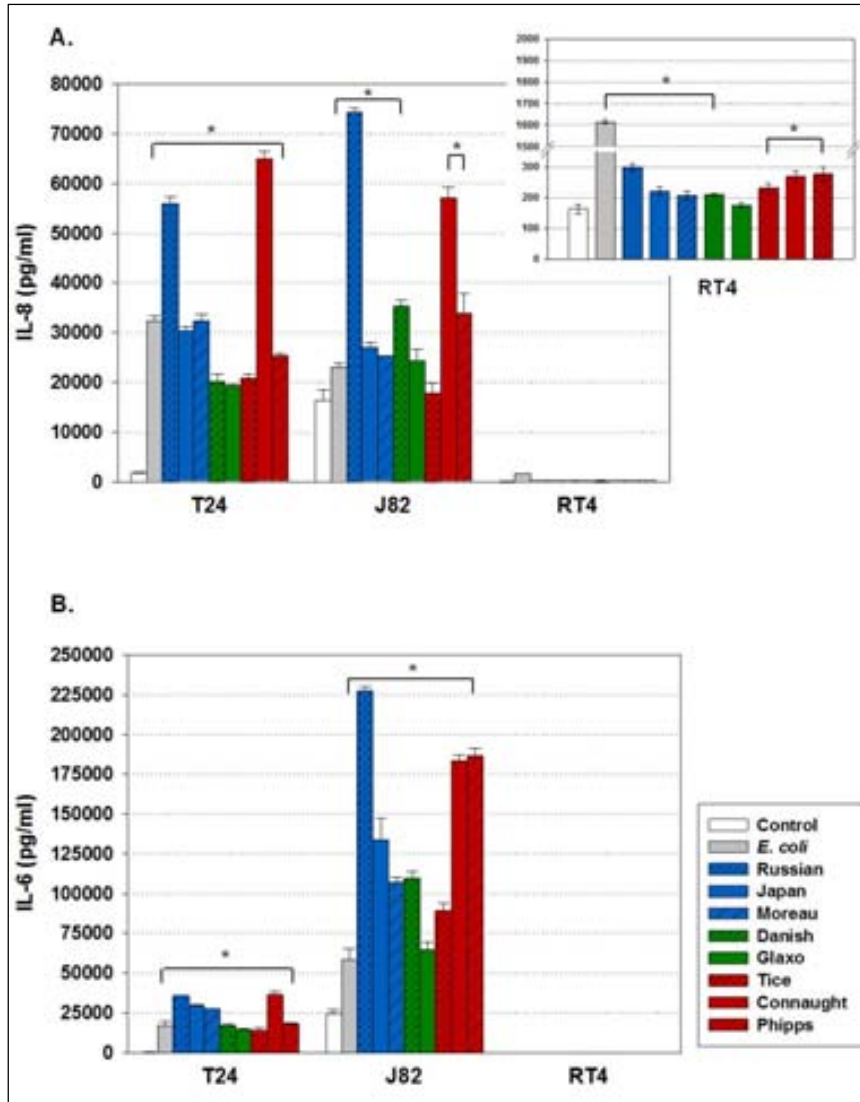


Figura D.8. Producció d'IL-6 i IL-8 per les cèl·lules de càncer de bufeta estimulades amb les diferents soques de BCG i *E. coli* (MOI 12,5:1) i sense estimular (control), durant 72 hores en les línies T24 i RT4, i 120 hores en la J82

Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control

En cap cas es va detectar la producció de TNF- α i de NO en els cultius.

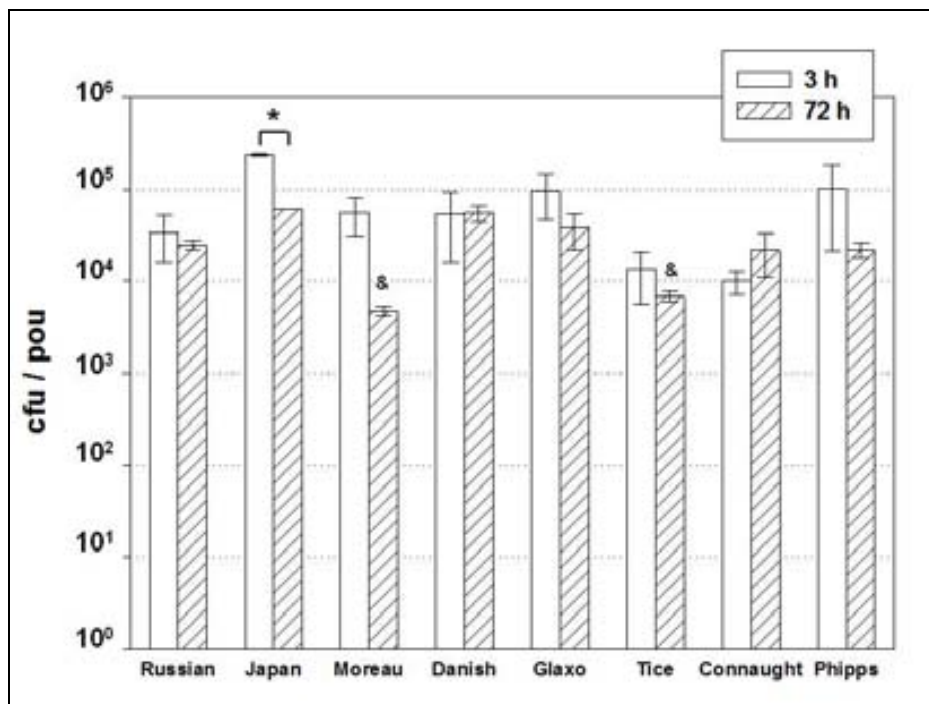
D.1.4. Supervivència de les soques de BCG dins les cèl·lules tumorals

Tal i com s'observa a la **figura D.9**, totes les soques de BCG analitzades van ser capaces d'internalitzar-se dins de les cèl·lules T24 a les tres hores després de la infecció.

El nombre de bacteris que es va detectar a l'interior cel·lular, a les tres hores de cultiu, va ser similar entre les diferents soques de BCG ($p > 0,05$). En canvi, a partir de les 24 hores el nombre de cfu va variar segons les diferents BCGs (dades no mostrades), i a les 72 hores post-infecció, els valors de supervivència intracel·lular de les espècies Tice i Moreau van ser inferiors a la resta ($p < 0,05$; excepte respecte de Glaxo i Connaught).

L'única soca de BCG que va mostrar una disminució intracel·lular en el temps, estadísticament significativa ($p < 0,05$) va ser Japan. Aquest comportament es va observar a partir de les 24 hores i es va mantenir a les 48 i 72 hores de cultiu, encara que a la **figura D.9** només es mostra les dades de les 3 i 72 hores.

Figura D.9. Viabilitat de les soques de BCG dins la línia tumoral T24 a les 3 i 72 hores després de la infecció (MOI 10:1)



Els resultats estan expressats com el promig del nombre de cfu/pou \pm SD de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs altres soques de BCG, excepte de Glaxo i Connaught

& $p < 0,05$ vs 3 i 72 hores de cultiu

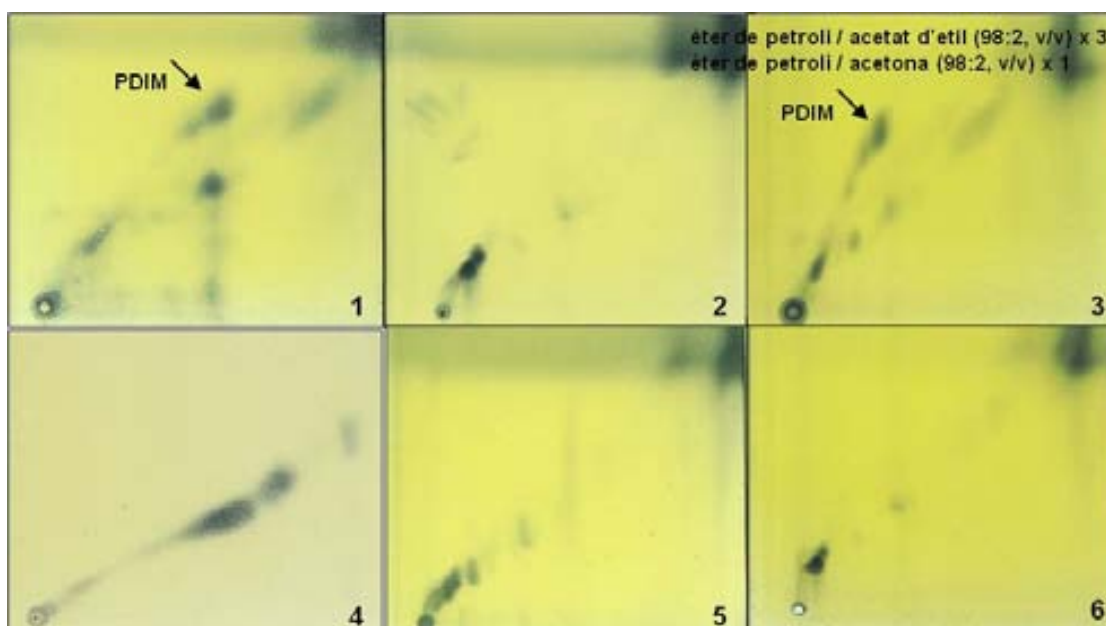
D.2. Estudi de l'activitat antitumoral de diferents micobacteris ambientals

D.2.1. Caracterització fenotípica. Perfil lipídic i glicolipídic

Cada espècie micobacteriana presenta un patró determinat de lípids i glicolípids de la paret cel·lular, els quals resulten essencials tant per estudis taxonòmics, com per la funció que poden desenvolupar a la cèl·lula. Per aquest motiu es va extreure i comparar el patró de lípids i glicolípids dels diferents micobacteris escollits.

Tal i com es pot observar a les **figures D.10 i D.11**, BCG i *M. gastri* van ser els únics micobacteris (com s'havia descrit) dels escollits que van presentar PDIMs i PGLs. Per altra banda, als extractes de tots els micobacteris analitzats es va detectar la presència de PIM i fosfolípids (**Fig. D.12**), DMT i MMT (dades no mostrades).

Figura D.10. CCF-2D del PDIM de l'extracte dels micobacteris



M. gastri (1), *M. spp.* (2), BCG Connaught (3), *M. hiberniae* (4), *M. confluentis* (5) i *M. mageritense* (6).

PDIM, fosfatidilinositolmanòsid

La placa va ser eluïda tres vegades amb èter de petroli/acetat d'etil (98:2, v/v) i èter de petroli/acetona (98:2, v/v) una vegada en una segona direcció. Va ser revelada amb àcid fosfomolibdic al 10% (p/v) en etanol.

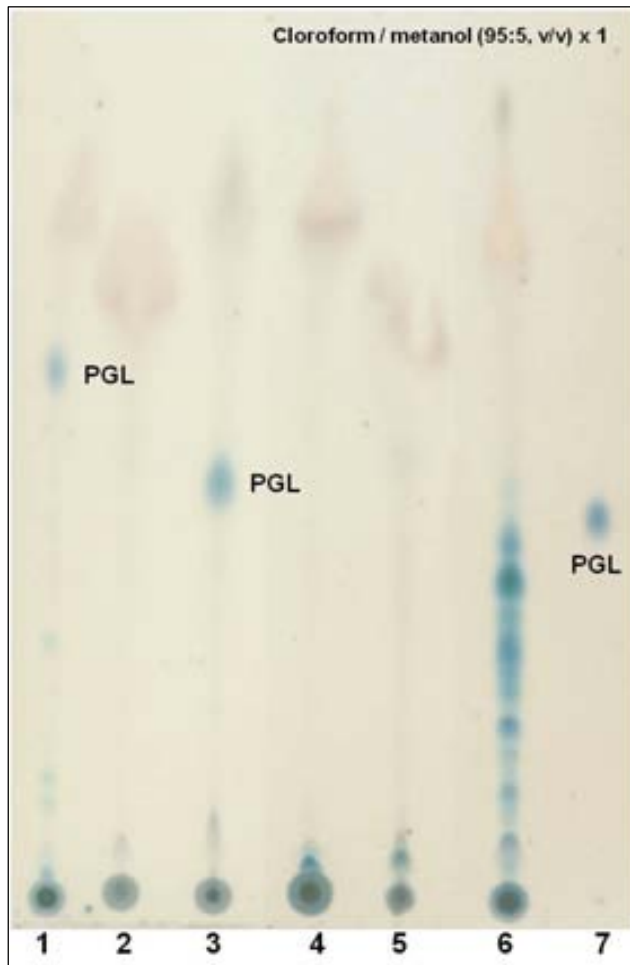


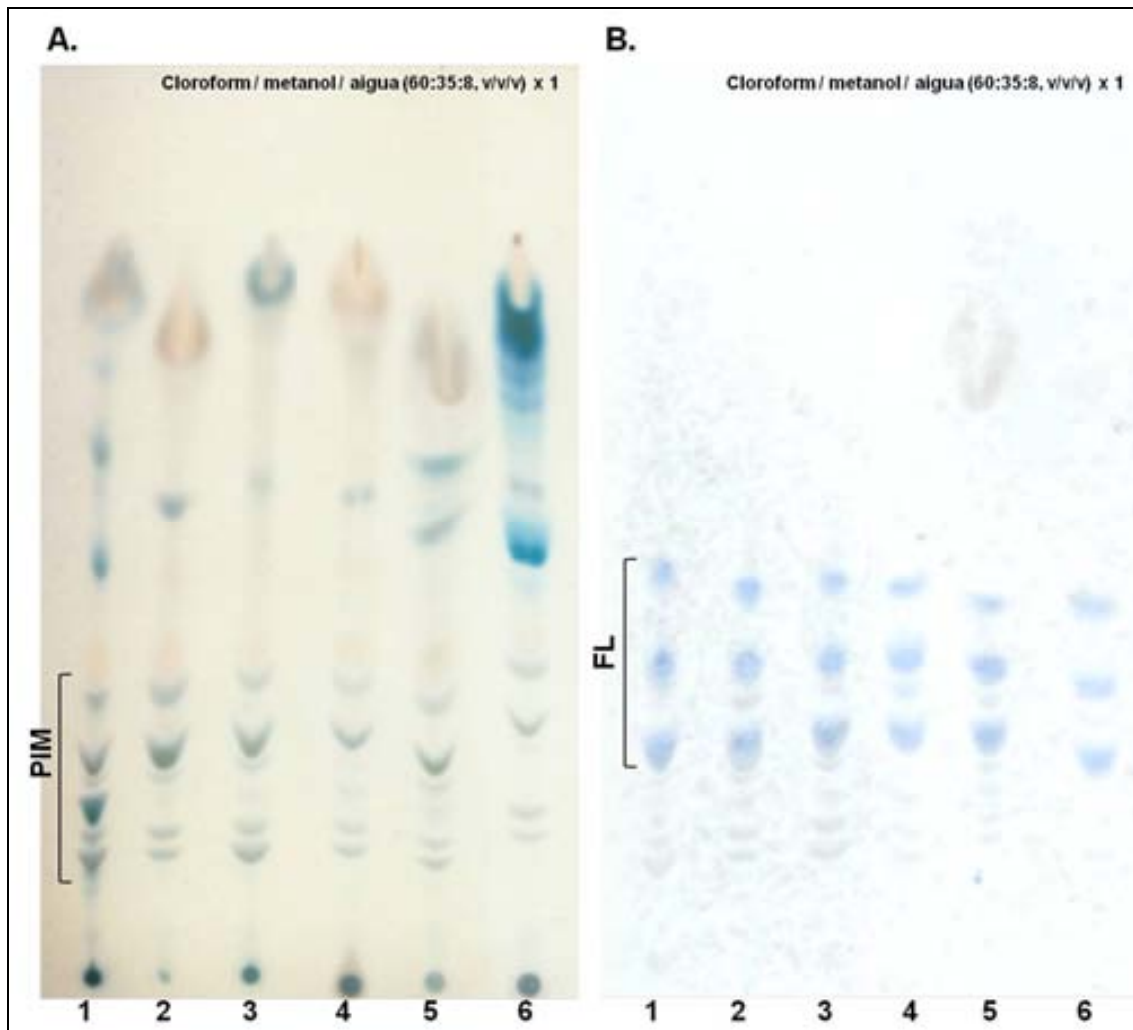
Figura D.11. CCF del PGL de l'extracte cru dels micobacteris

- (1) *M. gastri*,
- (2) *M. spp.*,
- (3) BCG Connaught,
- (6) *M. hiberniae*,
- (7) *M. confluentis*,
- (8) *M. mageritense*,
- (9) PGL purificat de *M. canetti*.

PGL, fenol glicolípíd

La placa va ser eluïda amb cloroform/metanol (95:5, v/v) i es va revelar amb antrona a l'1% (p/v) en àcid sulfúric.

Figura D.12. CCF dels PIM (A) i dels FL (B) de l'extracte cru dels micobacteris



M. gastri (1), *M. spp.* (2), BCG Connaught (3), *M. hiberniae* (4), *M. confluentis* (5) i *M. mageritense* (6).

PIM, fosfatidilinositolmanòsids; FL, fosfolípids.

La placa (A) va ser eluïda amb cloroform/metanol/aigua (60:35:8, v/v) i es va revelar amb antrona a l'1% (p/v) en àcid sulfúric.

La placa (B) va ser eluïda amb cloroform/metanol/aigua (60:35:8, v/v) i es va revelar amb Dittmer.

Respecte a l'anàlisi dels àcids micòtics, després de la seva extracció mitjançant la metanòlisi alcalina, cada micobacteri va presentar un patró diferent, excepte les dos variants de morfologia colonial de *M. vaccae* (Fig. D.13). Tots els patrons obtinguts van correspondre amb els ja descrits per altres autors, amb la excepció de *M. confluentis*.

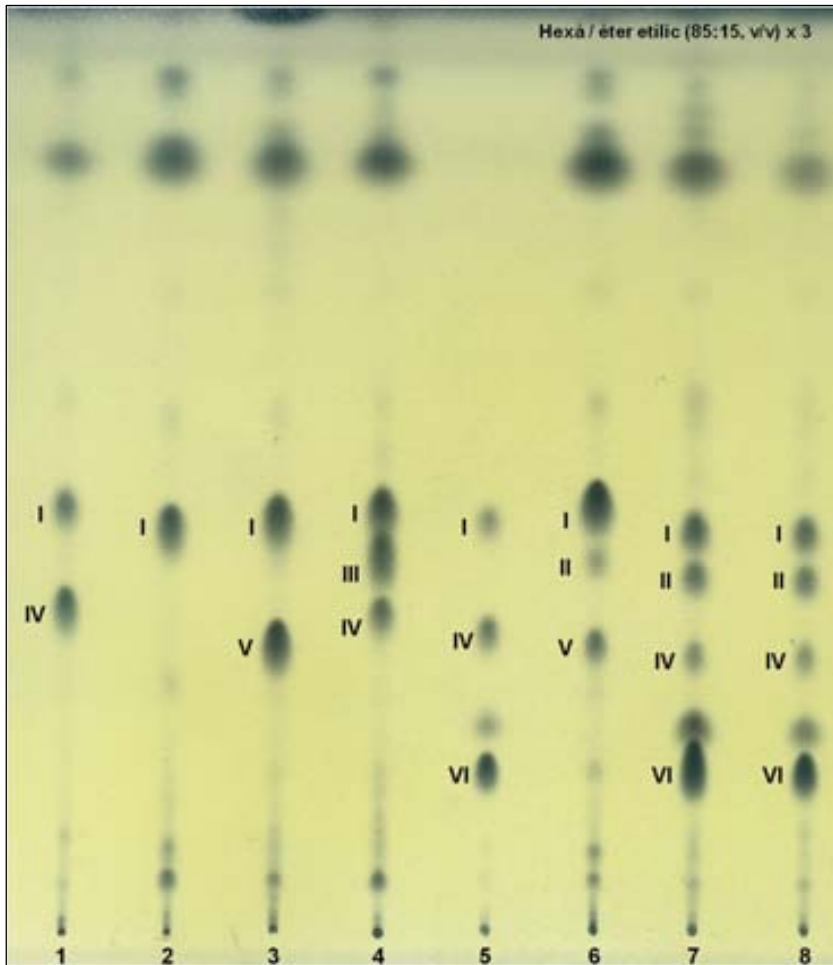


Figura D.13. CCF dels àcids micòlics dels micobacteris

(1) BCG Connaught,
 (2) *M. spp.*,
 (3) *M. confluentis*,
 (4) *M. gastri*,
 (5) *M. hiberniae*,
 (6) *M. mageritense*,
 (7) *M. vaccae* (S),
 (8) *M. vaccae* (R).

La placa va ser eluïda tres vegades amb hexà/dietil èter (85:15, v/v), i revelada amb àcid fosfomolibdic al 10% (p/v) en etanol.

I, α -micolat;
 II, α' -micolat;
 III, metoxi-micolat;
 IV, ceto-micolat;
 V, epoxi-micolat;
 VI, carboxi-micolat.

D.2.1.1. Anàlisi del patró d'àcids micòlics de *M. confluentis*

D.2.1.1.1. Anàlisi per CCF i CCF-2D

Segons els resultats obtinguts, el contingut d'àcids micòlics, extrets per metanòlisi alcalina de *M. confluentis* va ser: α - i epoxi-micolat. Aquest patró no va coincidir amb el ja descrit per altres autors, on apareixia el ceto- en lloc de l'epoxi-micolat. Per aquest motiu, vam realitzar paral·lelament una extracció dels àcids micòlics mitjançant la metanòlisi àcida. Apart de *M. confluentis*, vam escollir *M. smegmatis* i *M. phlei* per presentar l'àcid micòlic tipus V, i BCG Connaught per presentar el tipus IV en el seu patró de micolats. Els extractes d'aquests tres micobacteris es van utilitzar com a controls i es van fer córrer en paral·lel amb el de *M. confluentis* en la placa de CCF.

A la **figura D.14**, a les línies 1-4 corresponents als micolats extrets per metanòlisi alcalina, podem observar com l'àcid micòlic tipus V (epoxi-micolat) va córrer a una distància molt similar a la del tipus IV (ceto-micolat), de manera que es podien

confondre fàcilment. En canvi, amb la metanòlisi àcida (línies 5-8), l'àcid micòlic tipus V, al contrari que el IV, es va trencar i va deixar de ser visible (**Taula D.1**).

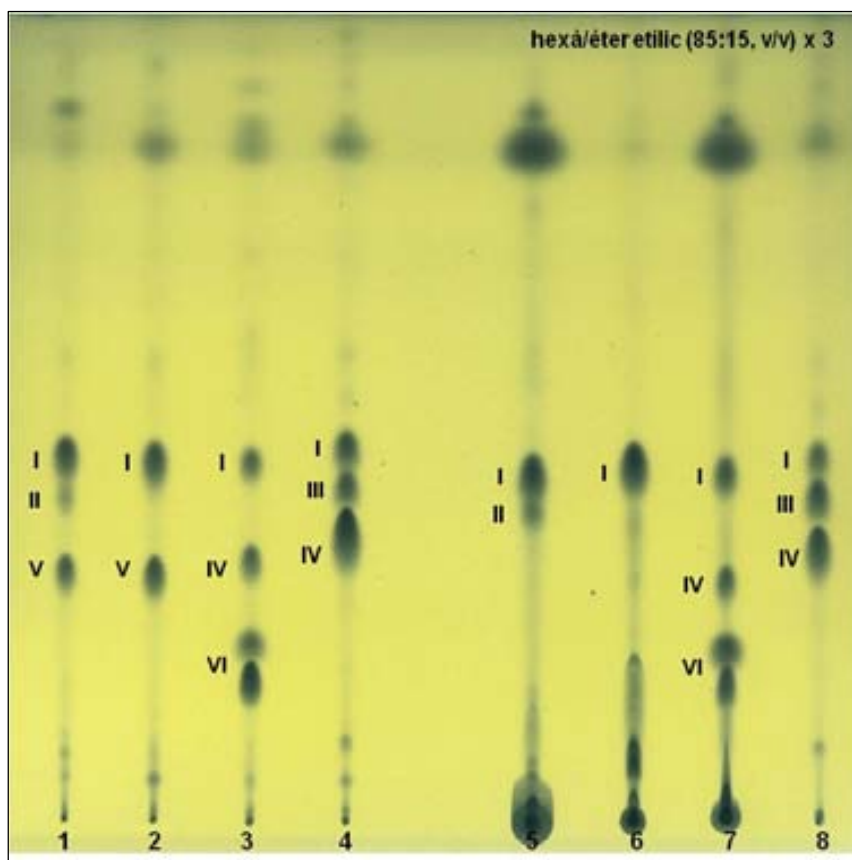


Figura D.14. CCF dels àcids micòlics dels micobacteris otinguts per metanòlisi alcalina o àcida

(1 i 5) *M. smegmatis*, (2 i 6) *M. confluentis*, (3 i 7) *M. phlei*, (4 i 8) BCG Connaught, obtinguts per metanòlisi alcalina (1-4) o per metanòlisi àcida (5-8).

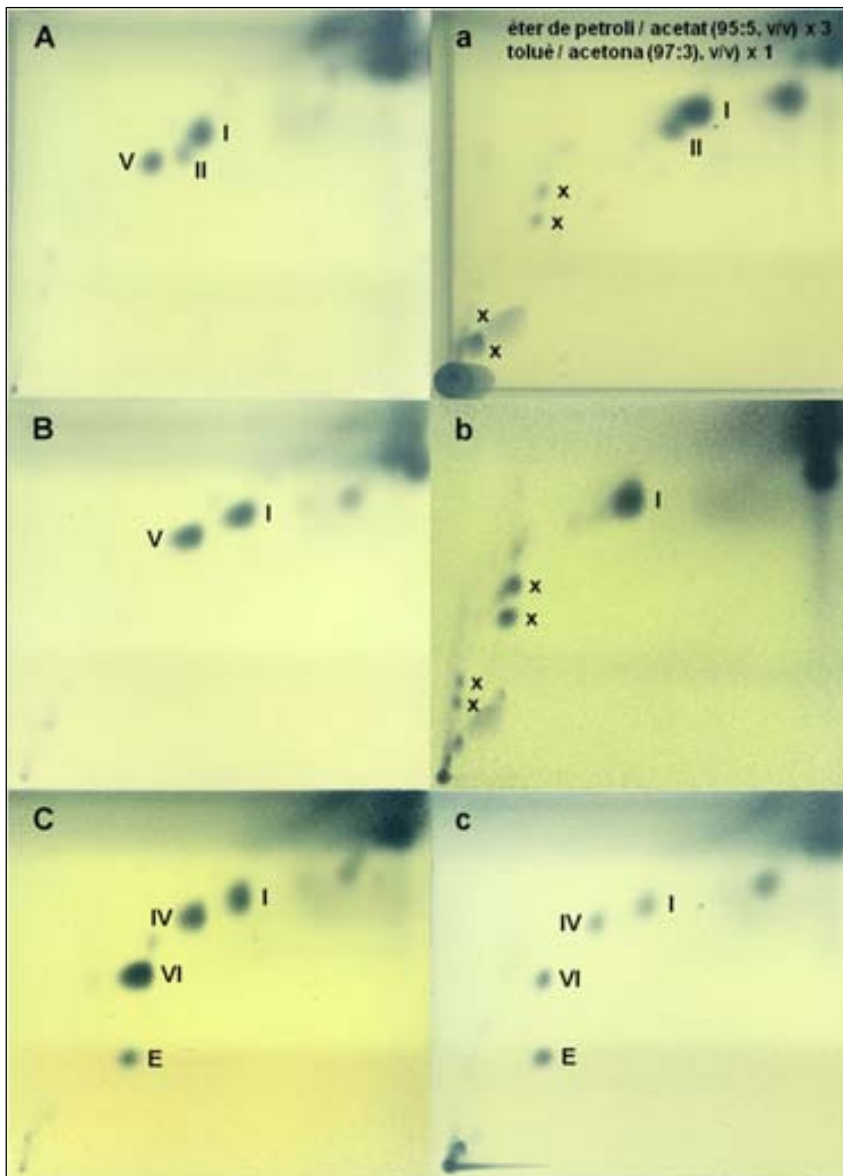
La placa va ser eluida tres vegades amb hexà/dietil èter (85:15, v/v), i revelada amb àcid fosfomolibdic al 10% (p/v) en etanol.

I, α -micolat;
II, α' -micolat;
III, metoxi-micolat;
IV, ceto-micolat;
V, epoxi-micolat;
VI, carboxi-micolat.

Quan aquests extractes es van analitzar per CCF-2D (**Fig. D.15**), el resultat va ser el mateix: la taca corresponent a l'àcid micòlic tipus V era visible quan procedia de l'extracció per metanòlisi alcalina (**Fig. D.15 A i B**), però desapareixia quan procedia de la metanòlisi àcida (**Fig. D.15 a i b**); en canvi la taca corresponent al micolat tipus IV era visible en tots dos casos (**Fig. D.15 C i c**).

Com a resultat de la metanòlisi àcida l'epoxi-micolat es trenca donant lloc a components de cadena llarga més polars (derivats dihidroxí i hidroximetoxi). Aquests compostos es van poder visualitzar clarament a la CCF-2D (**Fig. D.15**).

Figura D.15. CCF-2D dels àcids micòlics dels micobacteris obtinguts per metanòlisi alcalina o àcida



(A i a) *M. smegmatis*,
(B i b) *M. confluentis*,
(C i c) *M. phlei*,
obtinguts per
metanòlisi alcalina
(A, B i C) o per
metanòlisi àcida (a, b
i c).

La placa va ser
eluída tres vegades
amb èter de petroli
(b.p. 60-
80°C)/acetona (95:5,
v/v) en una primera
direcció, seguida per
una única elució amb
toluè/acetona (97:3,
v/v) en una segona
direcció. Es va
revelar amb àcid
fosfomolibdric al 10%
(p/v) en etanol.

I, α-micolat;
II, α'-micolat;
III, metoxi-micolat;
IV, ceto-micolat;
V, epoxi-micolat;
VI, carboxi-micolat;

E, alcohol de cadena
llarga (2-eicosanol i
homòlegs);

x, components
derivats dels
epoximicolats per la
metanòlisi àcida.

Per una altra banda, els extractes obtinguts per metanòlisi alcalina es van analitzar per CCF amb diclorometà com eluent. En aquest cas, les taques corresponents als àcids micòlics tipus IV i V presentaven una mobilitat diferent, de manera que es podien diferenciar entre ells. Però, amb aquest sistema d'elució, l'àcid micòlic tipus IV tenia la mateixa mobilitat que el tipus III, detectant-se com una única taca quan formaven part del mateix patró, com en el cas de BCG Connaught. (**Fig. D.16 i Taula D.1**).

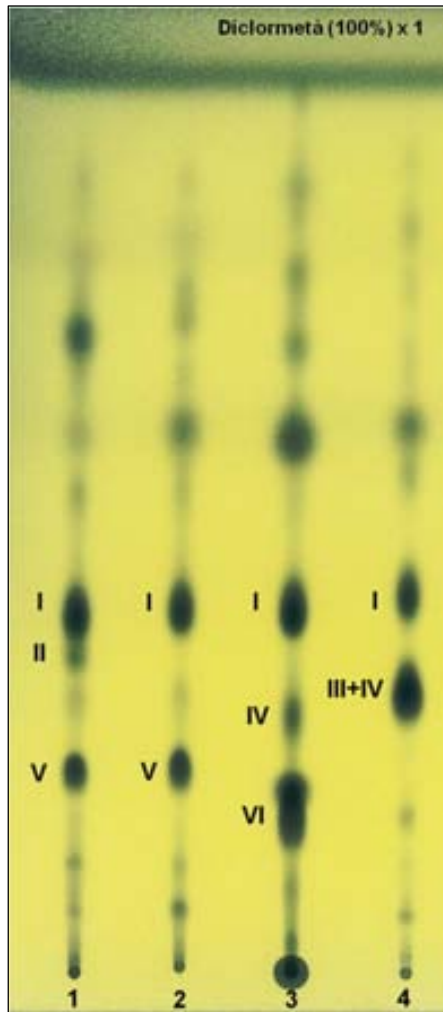


Figura D.16. CCF dels àcids micòlics dels micobacteris obtinguts per metanòlisi alcalina

- (1) *M. smegmatis*,
 (2) *M. confluentis*,
 (3) *M. phlei*,
 (4) BCG

La placa va ser eluïda una vegada amb diclorometà (100%). Es va revelar amb àcid fosfomolibdric al 10% (p/v) en etanol.

- I, α -micolat;
 II, α' -micolat;
 III + IV, metoxi- + ceto-micolat;
 V, epoxi-micolat;
 VI, carboxi-micolat.

Taula D.1. Valors Rf dels diferents àcids micòlics de les CCF analitzades

Àcid micòlic	Valors Rf		
	Metanòlisi àcida ^a	Metanòlisi alcalina ^a	
		Hexà/dietil èter (85:15, v/v) ^b	Hexà/dietil èter (85:15, v/v) ^b
I	0,43-0,44	0,44-0,45	0,37-0,39
II	0,38	0,40	0,33
III	0,39	0,41	0,29
IV	0,31-0,33	0,35	0,27-0,29
V	-	0,31	0,21
VI	0,23	0,23	0,18

I, α -micolat; II, α' -micolat; III, metoxi-micolat; IV, ceto-micolat; V, epoxi-micolat; VI, carboxi-micolat.

Rf, factor de retardament. El Rf de cada taca de la placa de CCF va ser calculat aplicant la següent equació: distància recorreguda per l'àcid micòlic dividida per la distància recorreguda pel front del solvent.

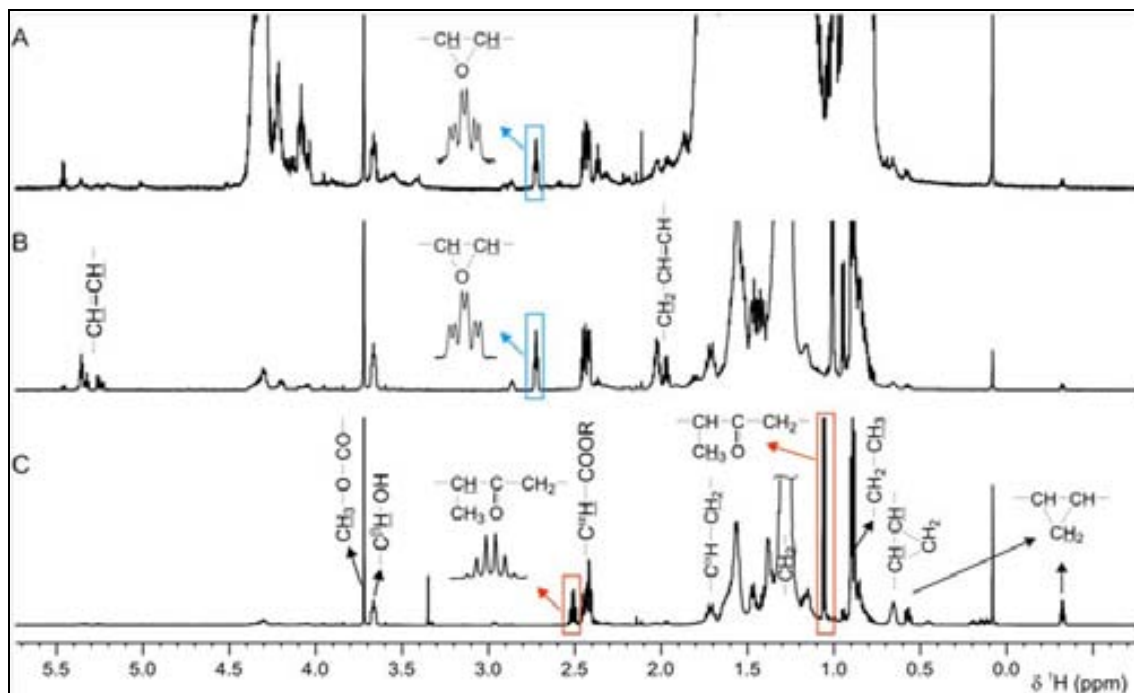
^a, procediment d'extracció dels àcids micòlics; ^b, sistema d'elució de la placa de CCF.

D.2.1.1.2. Anàlisi per RMN

La presència de l'àcid micòlic tipus V a la paret de *M. confluentis* es va confirmar per espectroscòpia de RMN. Aquests anàlisis es van realitzar a partir de les taques corresponents als àcids micòlics tipus V de *M. smegmatis* i *M. confluentis*, i tipus IV de BCG Connaught, de la placa de CCF on es van analitzar (**Fig. D.14**).

A la **figura D.17 A** es pot observar l'espectre de protó (^1H -RMN) de l'àcid micòlic aïllat de la taca corresponent al tipus V de *M. smegmatis* de la placa de CCF (**Fig 14**, línia 1). A l'espectre s'observa un doblet de triplets a 2,72 ppm (constants d'acoblament, J , 5,6 i 2,2 Hz) corresponent als protons del grup epoxi (Dinadayala, 2003). També es va detectar un pic anàleg dels analits aïllats de la taca corresponent a l'àcid micòlic tipus V de *M. confluentis* (**Fig D.17 B**). En el cas de l'espectre de l'àcid micòlic tipus IV de BCG (**Fig D.14**, línia 4), que es mostra en la **figura D.17 C**, no es van observar senyals de protons del grup epoxi. A més, es va detectar un multiplet a 2,51 ppm corresponent a un protó metínic adjacent al grup ceto, i un doblet a 1,06 ppm (J , 6,9 Hz) corresponent a un grup metil unit al grup metínic anterior (Watanabe, 1999). L'assignació d'aquests pics es va corroborar mitjançant experiments de RMN bidimensionals (correlacions ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HSQC).

Addicionalment, a la mostra de *M. confluentis* es van detectar unes senyals corresponents a protons etilènics (5,34 i 5,24 ppm) junt a les del grup metilè adjacents al doble enllaç (2,01 ppm). A la mostra de BCG es van observar senyals característiques d'anells ciclo-propil substituïts en *cis* (0,65, 0,57 i -0,33 ppm). En tots els casos es van identificar les senyals típiques dels àcid micòlics, com el singlet metil éster (3,72 ppm), el protó β -carboxílic (3,66 ppm), el protó α -carboxílic (2,44 ppm), cadenes de metilè (1,27 ppm, ampla), i grups metil terminals (0,89 ppm, triplet); els quals s'indiquen a la **figura D.17 C** com a exemple.

Figura D.17. Espectre ^1H NMR dels metil ésters purificats

Tipus V de *M. smegmatis* (fig. D.17, línia 1) (A), tipus V de *M. confluentis* (fig. D.17, línia 2) (B) i tipus IV de BCG Connaught (fig. D.17, línia 4) (C).

L'espectre es va adquirir a 298,0 K i a un camp magnètic de 600 MHz.

D.2.2. Estudi de l'activitat antitumoral directa

D.2.2.1. Estudi amb micobacteris ambientals vius

D.2.2.1.1. Inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals

La inhibició de la proliferació cel·lular es va analitzar a diferents temps i a diferents MOIs. Com mostra la **figura D.18**, l'activitat citotòxica dels micobacteris va ser temps- i MOI-dependent. De totes maneres, aquest efecte antitumoral va ser diferent segons l'espècie micobacteriana utilitzada i el tipus cel·lular analitzat.

Com podem observar a la **figura D.18 A, B i C**, tots els micobacteris amb capacitat citotòxica van mostrar una inhibició màxima a una MOI de 12,5:1. Es van utilitzar, en les tres línies tumorals, dosis d'infecció més elevades a les indicades, arribant fins a una MOI de 62,5:1, però els resultats obtinguts van ser similars als observats a dosis més baixes (dades no mostrades).

Posteriorment, es va analitzar la proliferació dels cultius, infectats amb els micobacteris, a diferents temps post-infecció. En la línia cel·lular T24 (**Fig. D.18 a**) es va detectar el màxim valor d'inhibició de la proliferació a partir de les 48 hores de la infecció. En canvi, en les línies tumorals J82 i RT4, els valors màxims es van observar a partir de les 120 i 72 hores, respectivament (**Fig. D.18 b i c**). Encara que es va analitzar la proliferació cel·lular a temps superiors (96 hores en les línies tumorals T24

i RT4, i 144 hores en la J82), no es va detectar cap increment de la inhibició (dades no mostrades).

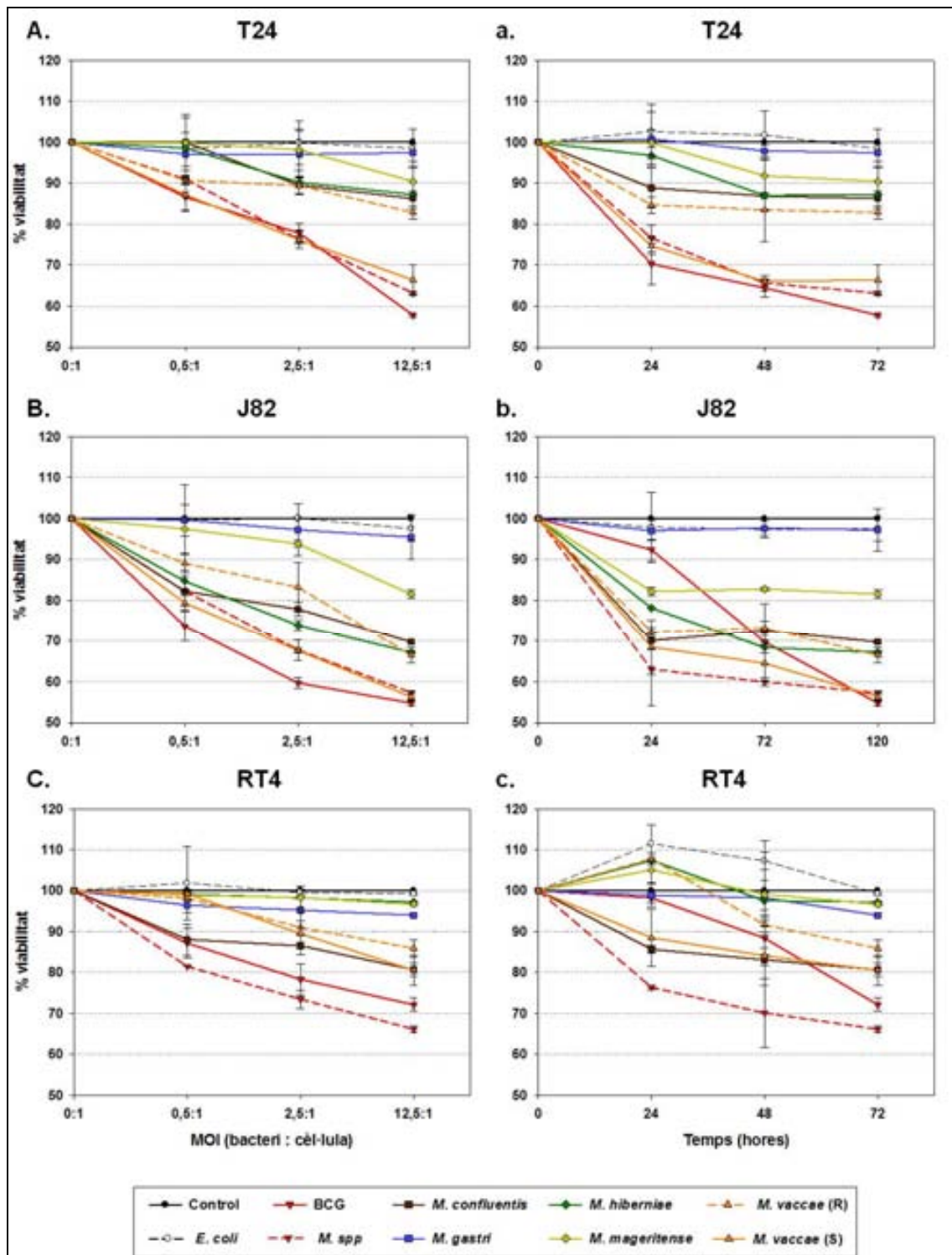
A la **figura D.19** es mostren els resultats obtinguts a una MOI de 12,5:1 i a les 72 hores post-infecció en les línies T24 i RT4, o a les 120 hores en el cas de la J82. Podem destacar que en les línies cel·lulars T24 i J82, d'entre tots els micobacteris estudiats, *M. spp.* juntament amb *M. vaccae* (S) es van comportar de manera similar a BCG arribant a valors d'inhibició del 40%, aproximadament. En canvi, en la línia cel·lular RT4, la capacitat d'inhibició de la proliferació cel·lular de *M. spp.* ($34 \pm 1\%$ d'inhibició) va ser superior a l'observada amb BCG i *M. vaccae* (S) ($28 \pm 2\%$ i $19 \pm 4\%$, respectivament). En aquesta línia cel·lular, BCG, *M. spp.* i *M. vaccae* (S) són els únics en presentar diferències significatives respecte del control ($p < 0,05$).

Els micobacteris *M. confluentis*, *M. gastri*, *M. hiberniae* i *M. mageritense* van mostrar diferències significatives respecte del control positiu, BCG, en les tres línies cel·lulars ($p < 0,05$), amb valors d'inhibició inferiors.

El micobacteri que va mostrar una menor capacitat antiproliferativa en les tres línies cel·lulars va ser *M. gastri* (3-6% d'inhibició). En la línia RT4, *M. mageritense* i *M. hiberniae* van presentar valors d'inhibició igual de baixos que *M. gastri*.

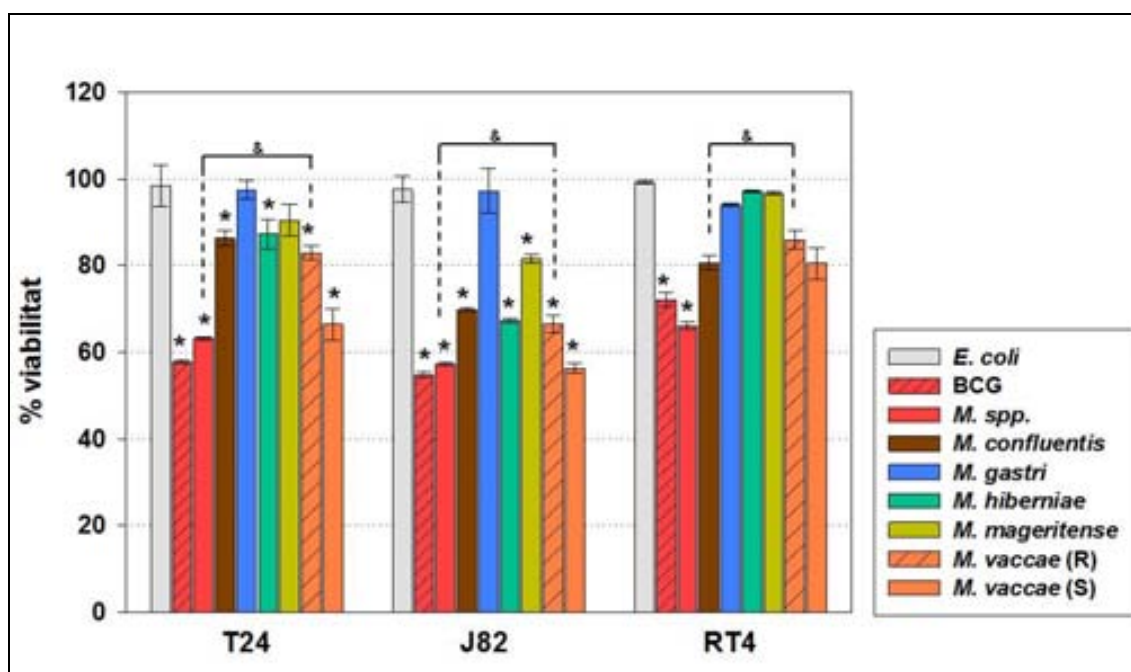
El control negatiu, *E. coli*, no va inhibir el creixement tumoral de cap de les tres línies cel·lulars. A més, aquest bacteri junt a *M. gastri* van ser els únics que no van mostrar diferències significatives respecte al control (cèl·lules sense infectar) en cap de les tres línies tumorals analitzades.

Figura D.18. Inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals pels diferents micobacteris o *E. coli* a diferents MOI (A, B i C) i a diferents temps post-infecció (a, b i c)



Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte de les cèl·lules control (no infectades). Cada punt representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

Figura D.19. Efecte dels diferents micobacteris i d'*E. coli* (MOI 12,5:1) en la proliferació tumoral després de 72 hores en les línies T24 i RT4, i de 120 hores en la J82



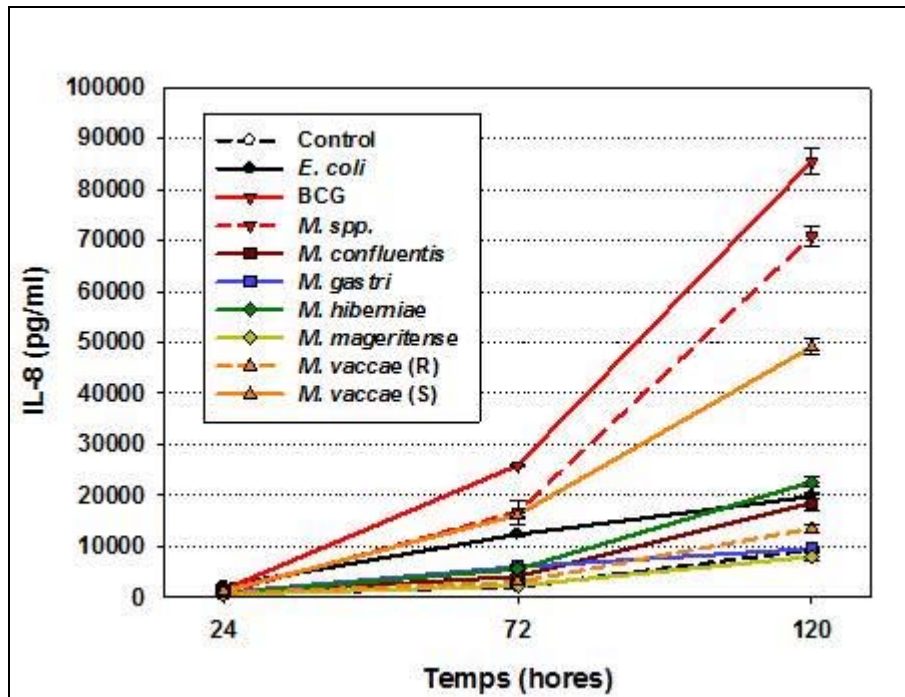
Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte al control (cèl·lules no infectades). Cada columna representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules sense infectar)

& $p < 0,05$ vs BCG

D.2.2.1.2. Inducció de la producció de citocines i NO en les cèl·lules tumorals Vam poder observar una relació directa entre l'augment de la producció de les citocines i el temps d'incubació dels cultius (**Fig. D.20**), i entre la producció de les citocines i les MOI utilitzades per a infectar els cultius (dades no mostrades).

Figura D.20. Producció d'IL-8 per la línia tumoral J82 estimulada amb els diferents micobacteris i *E. coli* (MOI 12,5:1) i sense estimular (control), durant diferents temps post-infecció (24, 72 i 120 hores)



Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

En la **figura D.21** podem observar com la producció de citocines va variar segons els bacteris utilitzats i la línia cel·lular estudiada.

Tots els micobacteris van induir la producció d'IL-8 en les tres línies tumorals ($p < 0,05$ respecte al control (cèl·lules sense infectar), excepte *M. mageritense* i *M. gas tri* en les línies J82 i RT4, i *M. hiberniae* en la línia RT4). Comparant els diferents micobacteris amb BCG, podem observar que *M. spp.* i *M. vaccae* (S) van mostrar un comportament similar a BCG en les línies tumorals T24 i J82, és a dir, van induir la producció IL-8, encara que menys que BCG, però destacant per sobre de la resta de micobacteris avaluats. En canvi, en la línia RT4, BCG va induir una producció d'IL-8 per sobre de la resta de micobacteris, sent *M. spp.* el segon en mostrar aquesta capacitat (**Fig. D.21 A**).

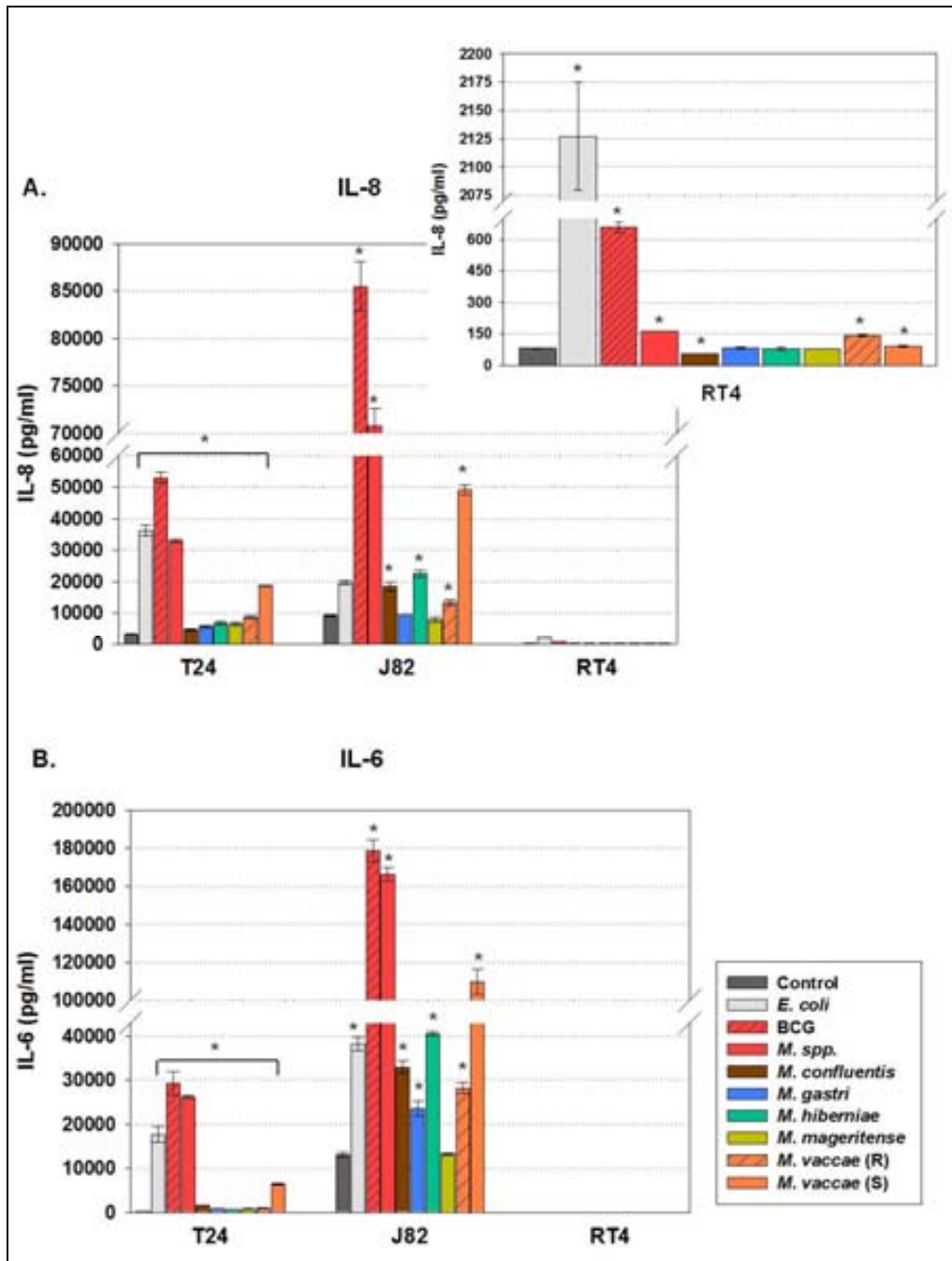
En la línia tumoral RT4 no es va detectar producció de IL-6. En canvi, tots els micobacteris van ser capaços d'induir la producció d'IL-6 (**Fig. D.21 B**) en les línies tumorals T24 i J82 ($p < 0,05$ respecte al control (cèl·lules sense infectar), excepte *M. mageritense* en la línia J82). A l'igual que en el cas anterior, *M. spp.* i *M. vaccae* (S) van induir una producció d'IL-6 menor que BCG, però superior a la resta de micobacteris estudiats, mostrant un comportament similar a BCG.

El control negatiu, *E. coli*, tal i com s'observa a la **figura D.21**, també va ser capaç d'induir la producció de IL-6 i IL-8 en les línies tumorals estudiades. En la línia

RT4, la infecció amb *E. coli* va induir una elevada producció de IL-8, sent superior a la induïda per BCG.

Cap de les tres línies cel·lulars amb o sense estímul (infecció) va produir TNF- α i NO.

Figura D.21. Producció d'IL-8 (A) i IL-6 (B) per les cèl·lules de càncer de bufeta estimulades amb els diferents micobacteris i *E. coli* (MOI 12,5:1) i sense estimular (control), a les 72 hores en les línies T24 i J82, i a les 120 hores en la J82



Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules sense infectar)

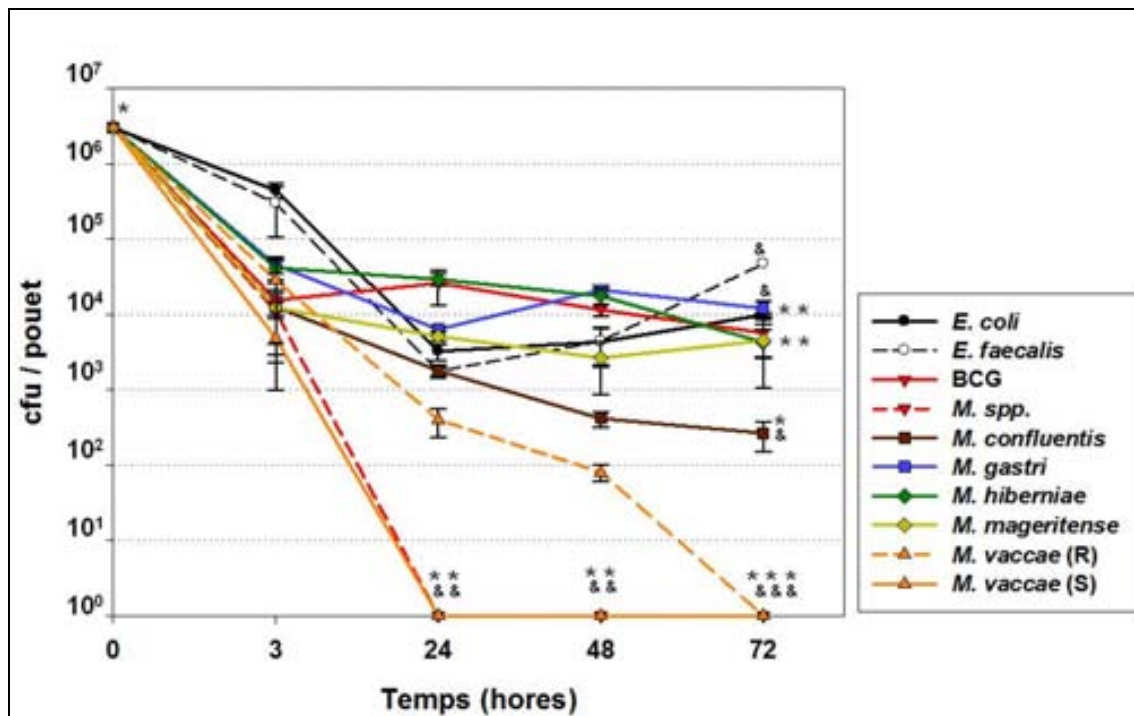
D.2.2.2. Supervivència dels micobacteris dins les cèl·lules tumorals

Tots els micobacteris analitzats i el control negatiu, *E. coli*, van ser capaços d'internalitzar-se dins les cèl·lules tumorals T24 després de tres hores de cultiu, encara que el nombre de cfu va ser inferior a l'inicial ($p < 0,05$).

M. spp. i *M. vaccae* (S), a diferència de la resta dels bacteris estudiats, van deixar de ser viables dins les cèl·lules T24 a les 24 hores post-infecció ($p < 0,05$; respecte a les 3 hores de cultiu). El nombre de cfu de *M. vaccae* (R) va disminuir progressivament a les 24 i 48 hores, fins desaparèixer a les 72 hores ($p > 0,05$). La resta de micobacteris i *E. coli* van mantenir-se viables dins les cèl·lules després de 72 hores, encara que el nombre de cfu va disminuir ($p < 0,05$), excepte en el cas de BCG ($p > 0,05$). Aquests resultats es poden observar a la **figura D.22**.

A les 72 hores del cultiu, no es van observar diferències significatives entre *E. coli*, *M. hiberniae*, *M. mageritense* i BCG.

Figura D.22. Viabilitat dels bacteris dins de les cèl·lules T24 a les 3, 24, 48 i 72 hores d'infecció del cultiu (MOI 12,5:1)



Els resultats estan expressats com el promig del nombre de cfu/pouet \pm SD de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs 3 hores de cultiu

& $p < 0,05$ vs BCG

D.2.2.3. Comparació de l'activitat antitumoral directa dels micobacteris vius i morts

Tal i com s'ha explicat a la introducció, la utilització de BCG viu en pacients comporta una possible infecció per aquest microorganisme. Degut a l'avantatge que podria suposar la teràpia amb bacils no viables, es va estudiar la capacitat antitumoral directa dels micobacteris morts mitjançant diferents tipus de tractament de calor o radiació.

Per a aquest estudi es va escollir *M. spp.*, ja que va presentar un comportament similar a BCG als assajos anteriors, inclús millor en algun dels cultius cel·lulars. BCG es va utilitzar com a control positiu, i *E. coli* i *E. faecalis* com a controls negatius.

D.2.2.3.1. Viabilitat dels micobacteris sotmesos als diferents tractaments

Després de sotmetre les suspensions bacterianes als diferents tractaments de calor i radiació, es va avaluar la viabilitat dels microorganismes, obtenint diferents resultats segons el tractament aplicat (**Taula D.2**).

Amb el tractament a 121°C durant 15 minuts i 80°C durant 30 minuts, no es van obtenir bacteris viables. En canvi, quan es van sotmetre a 60°C durant 30 minuts, els bacteris mantenien la seva viabilitat, encara que amb valors inferiors als no tractats.

Per una altra banda, tots els bacteris que es van sotmetre a les diferents dosis de radiació gamma (5, 15 i 25 kGy) no van ser viables. Per contra, el tractament amb radiació UV va fer disminuir la viabilitat bacteriana de 3 a 6 ordres de magnitud depenent del bacteri.

Taula D.2. Valors de viabilitat, expressats en cfu/ml, dels diferents bacteris tractats

Tractament	<i>M. spp.</i>	BCG	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
Viu	3,05 x 10 ⁶	1,36 x 10 ⁵	2 x 10 ⁷	4,85 x 10 ⁷
121°C, 15 minuts	0	0	0	0
80°C, 30 minuts	0	0	0	0
60°C, 30 minuts	8,25 x 10 ²	2,55 x 10 ²	3 x 10 ¹	1,53 x 10 ⁵
5 kGy	0	0	0	0
15 kGy	0	0	0	0
25 kGy	0	0	0	0
UV, 20 minuts	3,62 x 10 ³	6,52 x 10 ²	5	3 x 10 ¹

D.2.2.3.2. Capacitat antiproliferativa dels micobacteris, tractats amb calor i radiació, en les cèl·lules tumorals

En la **figura D.23** podem observar com BCG i *M. spp.* van ser capaços d'inhibir el creixement de les cèl·lules tumorals ($p < 0,05$; respecte les cèl·lules sense infectar), tant vius com sotmesos als diferents tractaments, amb valors d'inhibició del 30-50%. A més, no es van trobar diferències significatives ($p > 0,05$) entre els bacteris tractats i els seus respectius no tractats en les línies T24 i RT4. Cap dels diferents micobacteris analitzats va mostrar diferències significatives respecte de BCG viu en les línies tumorals T24 i RT4 ($p > 0,05$, excepte *M. spp.* viu en la línia RT4). En canvi, en la línia J82, tal i com es pot observar a la **figura D.23 B**, alguns dels tractaments sotmesos a BCG o *M. spp.* van fer que apareguessin diferències significatives ($p < 0,05$).

En la línia RT4 (**Fig. D.23 C**), es va observar el mateix comportament destacat anteriorment: *M. spp.*, tant viu com mort, va ser capaç d'aconseguir valors d'inhibició cel·lular superiors a BCG, encara que sense diferències significatives ($p > 0,05$).

Els controls negatius, *E. coli* i *E. faecalis*, no van ser capaços d'inhibir el creixement en cap cas ($p > 0,05$; respecte del control; excepte *E. coli* i *E. faecalis* autoclavats a les línies J82 i RT4, respectivament), obtenint valors de viabilitat del 90-100% respecte al control (cèl·lules sense infectar). A més, tots dos bacteris van mostrar diferències significatives respecte de BCG viu, a les tres línies tumorals.

Degut a l'interès de *M. vaccae* i *M. phlei* com a immunoteràpics pel tractament del cancer, es van escollir en aquest treball per tal de comparar la seva capacitat per inhibir el creixement tumoral, tant vius com morts, amb la de BCG i *M. spp.* Els tractaments escollits en aquest cas, van ser els d'irradiació a 25 kGy i calor a 121°C durant 15 minuts.

A la **figura D. 24**, podem observar que *M. phlei*, a diferència de *M. vaccae*, va ser capaç d'inhibir el creixement de la línia tumoral J82, tant viu com mort, de manera similar a BCG i *M. spp.* *M. vaccae* i *M. phlei* mostraren diferències significatives respecte de BCG viu ($p < 0,05$), i també entre aquests dos micobacteris vius i els seus respectius tractats ($p < 0,05$).

Per una altra banda, *M. gastris* es va comportar de manera similar als controls negatius (*E. coli* i *E. faecalis*). Aquest micobacteri, tant viu com mort, no va ser capaç d'inhibir el creixement tumoral ($p > 0,05$ respecte del control).

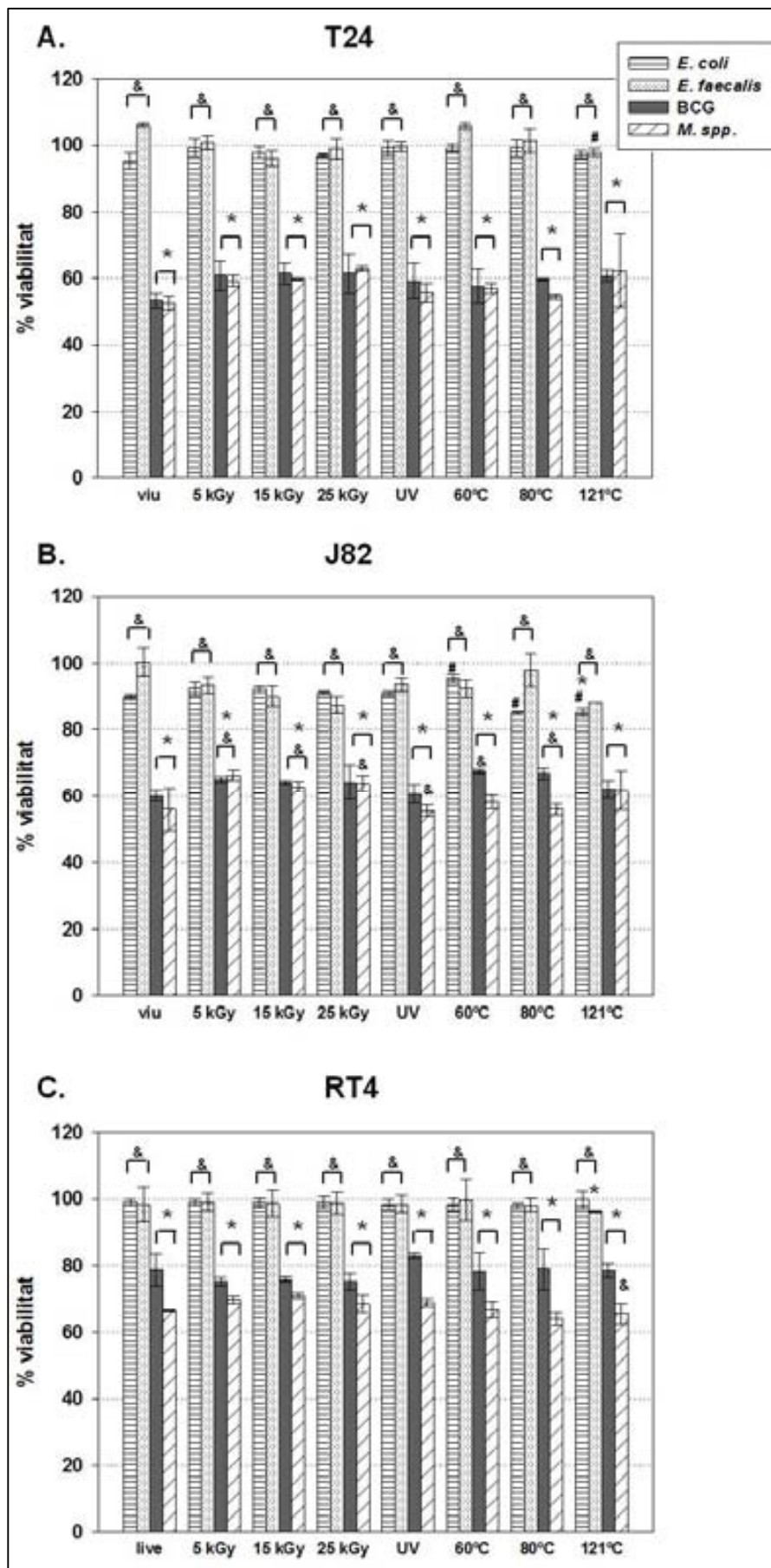


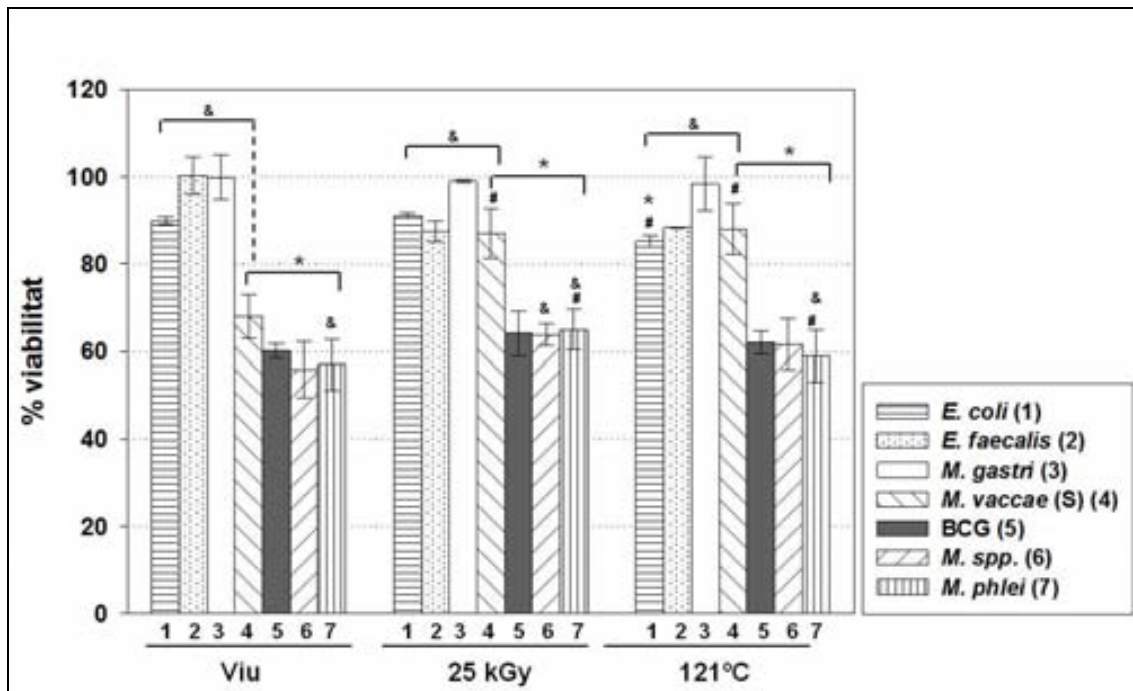
Figura D.23.
Efecte dels bacteris vius i tractats en el creixement de les cèl·lules tumorals després de 72 hores en les línies T24 (A) i RT4 (C), i de 120 hores en la J82 (B)

La infecció es va realitzar amb els bacteris vius, morts per radiació (gamma (5, 15 i 25 kGy), i UV/20 minuts), i per calor (60°C/30 minuts, 80°C/30 minuts, i 121°C/15 minuts); a una MOI de 10:1.

Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte al control (cèl·lules no infectades). Cada columna representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules sense tractar)
& $p < 0,05$ vs BCG viu

Figura D.24. Efecte dels bacteris vius i tractats en el creixement de la línia tumoral J82 després de 120 hores



La infecció es va realitzar amb els bacteris vius, morts per irradiació (25 kGy), i per calor (121°C); a una MOI de 10:1.

Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte al control (cèl·lules no infectades). Cada columna representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules sense tractar)

& $p < 0,05$ vs BCG viu

$p < 0,05$ vs micobacteri no tractat

D.2.2.3.3. Inducció de la producció de citocines i NO en les cèl·lules tumorals pels micobacteris morts

Les tres línies cel·lulars infectades amb BCG i *M. spp.*, tant vius com tractats, van produir nivells de les citocines IL-8 i IL-6 superiors a les cèl·lules constitutivament ($p < 0,05$) (Fig. D.25).

En la línia T24 (Fig. D.25 A i B), BCG i *M. spp.* tractats amb radiació gamma (amb les tres dosis diferents) van induir una producció de les dues citocines amb valors similars entre ells i als seus respectius no tractats. De la mateixa manera, BCG sotmès a radiació UV va induir uns valors de les dues citocines similars; mentre que, *M. spp.* sotmès a UV va induir uns nivells inferiors ($p < 0,05$). Tant BCG com *M. spp.* tractats amb calor, van disminuir considerablement la seva capacitat d'induir la producció d'IL-6 i IL-8, excepte BCG sotmès a 60°C (Fig D.25 A i B).

En la línia J82 (Fig. D.25 C i D), el comportament de BCG i *M. spp.* va variar, ja que la seva capacitat d'induir la producció de les dues citocines va disminuir al ser sotmès a radiació gamma ($p < 0,05$), especialment amb *M. spp.*, però els nivells d'IL-8

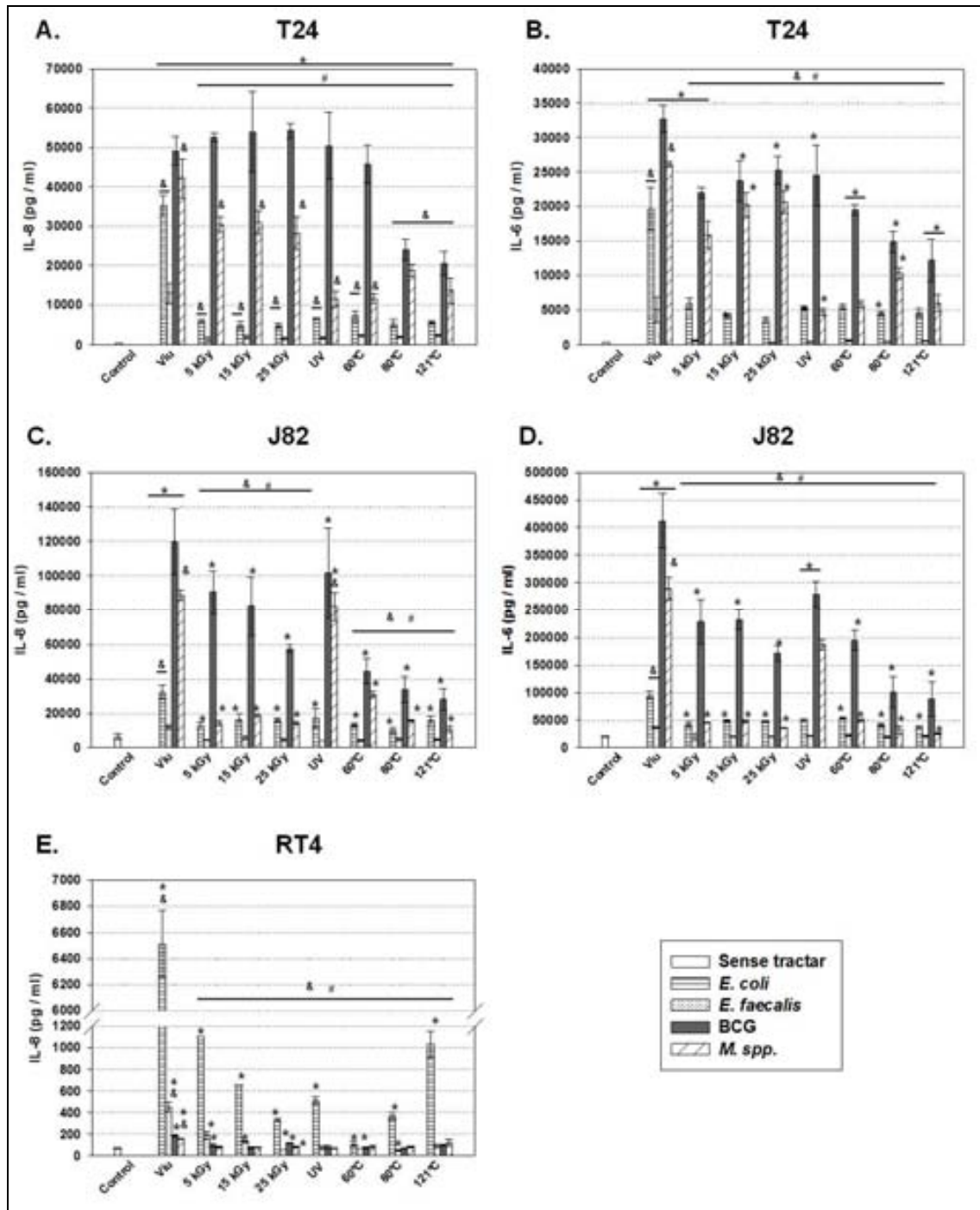
es van mantenir al ser sotmesos a radiació UV ($p > 0,05$). Igual que a la línia T24, al ser tractats amb calor, la capacitat dels dos micobacteris per induir la producció de les dues citocines va disminuir ($p < 0,05$).

Respecte a la línia RT4 (**Fig. D25 E**), els valors d'IL-8 van disminuir considerablement quan els bacteris es van sotmetre a qualsevol dels tractaments escollits ($p < 0,05$).

Per últim, destacar el comportament dels controls negatius, *E. coli* i *E. faecalis*. En les 3 línies tumorals, els valors de les dues citocines induïts per aquests bacteris van disminuir considerablement al ser sotmesos als diferents tractaments, inclús els nivells induïts per *E. faecalis* no van mostrar diferències significatives respecte als nivells produïts per les cèl·lules J82 constitutivament ($p > 0,05$) (**Fig. D25**).

En tots els casos es van observar diferències significatives respecte al BCG viu i entre els micobacteris vius i els seus respectius no tractats ($p < 0,05$), amb algunes excepcions que es mostren a la **figura D 25**.

Figura D.25. Producció d'IL-8 (A, C i E) i IL-6 (B i D) per les cèl·lules tumorals T24 (A i B), J82 (C i D) i RT4 (E), estimulades amb els bacteris vius i tractats (MOI 10:1) i sense estimular (control), durant 72 hores en les línies T24 i RT4, i 120 hores en la J82



Els resultats estan expressats com el promig ± SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* p < 0,05 vs control (cèl·lules sense tractar)

& p < 0,05 vs BCG viu

p < 0,05 vs micobacteri no tractat

D.2.2.4. Efecte sinèrgic dels micobacteris amb la mitomicina C

D.2.2.4.1. Inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals

Tal i com podem observar a la **figura D.26**, la MMC va inhibir la proliferació de les cèl·lules tumorals T24, J82 i RT4 ($p < 0,05$ respecte les cèl·lules sense tractar), i ho va fer de manera concentració- i temps-dependent (a la **figura D.26** només es mostren les dades en funció de la concentració de MMC).

L'efecte de la MMC es va veure incrementat quan va ser administrada junt amb BCG ($p < 0,05$), i en tots els casos, la MMC tant administrada sola com combinada amb BCG, va mostrar diferències significatives ($p < 0,05$) respecte de l'administració de només BCG viu, excepte en el cas de la línia T24 amb 0,1 µg/ml de MMC (**Fig D.26**).

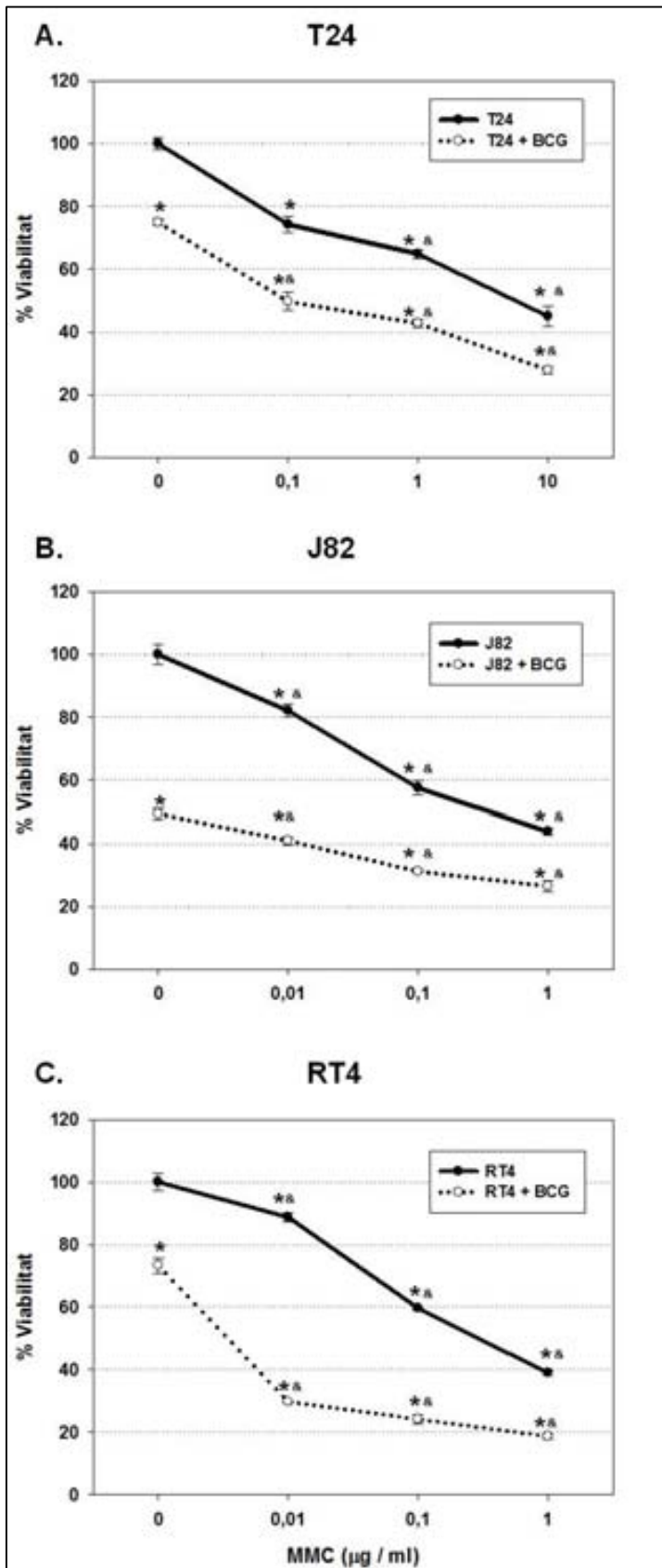
A partir d'aquests resultats (**Fig D.26**), es van escollir les concentracions de 10 µg/ml per la línia tumoral T24, i d'1 µg/ml per les línies J82 i RT4, per ser amb les que es van obtenir valors de viabilitat més baixos. Aquestes concentracions escollides són les que es van fer servir per l'estudi de l'efecte sinèrgic posterior (**Fig D.27**).

L'efecte sinèrgic descrit amb BCG viu, també es va poder observar amb el bacil mort i amb *M. spp.*, *M. phlei*, *M. gastri* i *M. vaccae* (S), tant vius com morts per calor (121°C durant 15 minuts) i irradiació (25 kGy).

En la **figura D.27** es mostra el % de sinergisme per inhibir el creixement cel·lular, dels diferents micobacteris en combinació amb la MMC, el qual es va calcular respecte l'efecte de la MMC. En la línia T24 (**Fig. D.27 A**), BCG, *M. spp.* i *M. phlei*, vius i morts, van presentar uns valors de sinergisme similars (50-60%). Mentre que, en la línia J82 (**Fig. D.27 B**), els valors amb aquests tres micobacteris vius van ser del 40%, i van disminuir al ser sotmesos als diferents tractaments, especialment en el cas de BCG i *M. spp.* En canvi, en la línia RT4 (**Fig. D.27 C**), *M. spp.* i *M. phlei* van presentar valors de sinergisme més elevats que BCG.

En les tres línies tumorals, *M. gastri* i *M. vaccae* (S) van ser els micobacteris en mostrar els valors de sinèrgia més baixos, arribant a ser nuls en la línia RT4.

Figura D.26. Efecte de la MMC a diferents concentracions, sola i en combinació amb BCG, en el creixement de les tres línies tumorals: T24 (A), J82 (B) i RT4 (C), després de 48 hores de cultiu

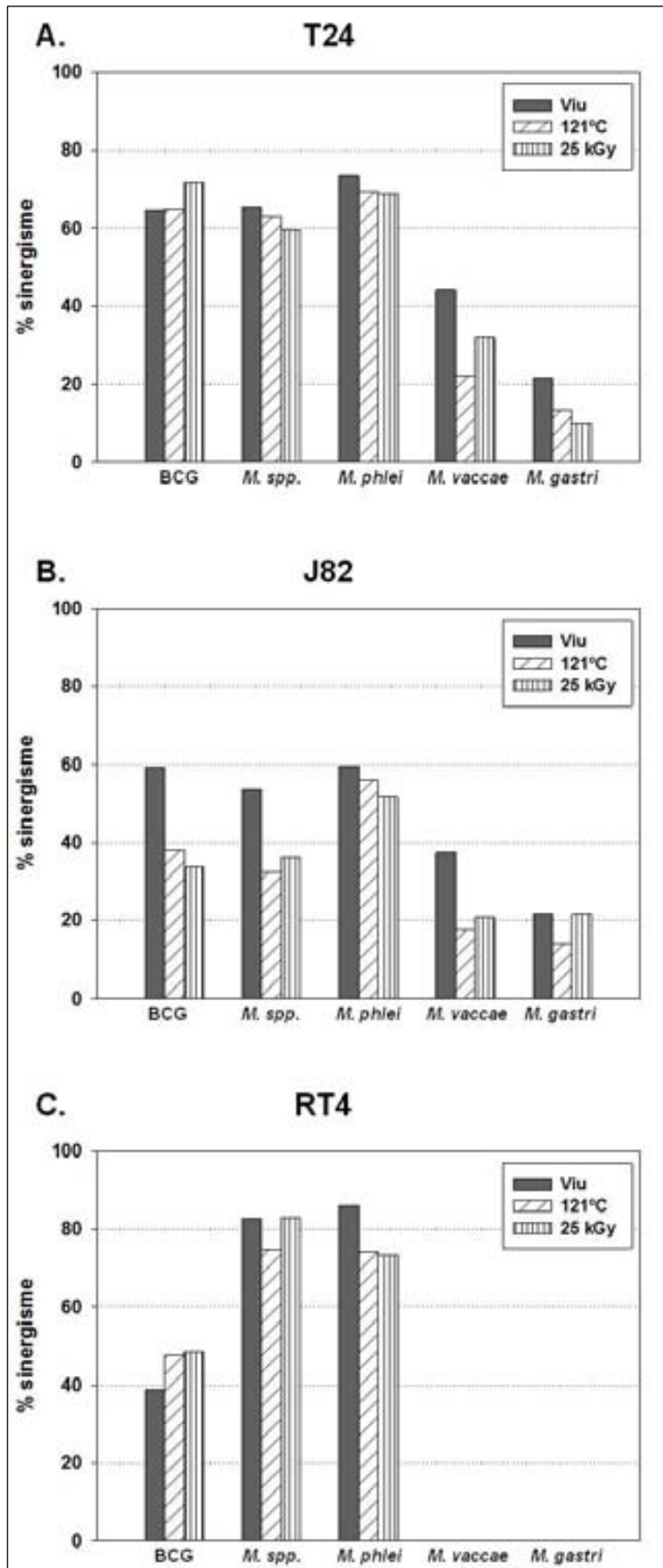


Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte a les cèl·lules control (no tractades). Cada punt representa el promig ± SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* p < 0,05 vs control (cèl·lules sense tractar)

& p < 0,05 vs BCG viu

Figura D.27. Efecte sinèrgic (en percentatge) dels diferents micobacteris junt amb MMC en el creixement de les tres línies tumorals, T24 (A), J82 (B) i RT4 (C), comparat amb les cèl·lules tractades amb MMC



L'equació que es va fer servir per calcular el nivell de sinèrgia per induir la mort cel·lular entre la MMC i els micobacteris, va ser la següent:

$$\left(\left(\frac{\% \text{ cèl·lules no viables després de ser cultivades amb el micobacteri + MMC} - (\% \text{ cèl·lules no viables després de ser cultivades amb MMC})}{(\% \text{ cèl·lules no viables després de ser cultivades amb MMC})} \right) \times 100 \right)$$

Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

D.2.2.4.2. Inducció de la producció de citocines en les cèl·lules tumorals

En la línia tumoral T24 (**Taula D.3 A i B**), els micobacteris, tant vius com morts, sols o en combinació amb MMC van induir la producció d'IL-8 i IL-6 ($p < 0,05$ respecte el control (cèl·lules sense infectar), excepte en alguns casos que es poden observar a la **taula D.3**). En aquesta línia cel·lular, tots els micobacteris sols van induir nivells majors d'IL-8 que els micobacteris en combinació amb la MMC ($p < 0,05$), mentre que en el cas de l'IL-6 només es va observar aquest comportament amb BCG. Els valors més elevats de les dues citocines es van obtenir amb BCG viu sol, mostrant diferències significatives amb la resta ($p < 0,05$; excepte amb BCG irradiat sol).

En el cas de la línia J82 (**Taula D.3 A i B**), igual que en el cas anterior es van obtenir nivells de d'IL-6 i IL-8 superiors al control ($p < 0,05$, excepte algun cas que es pot observar a la taula corresponent). En general, i a diferència de la línia T24, els micobacteris en combinació amb la MMC van induir nivells majors de les dues citocines que els micobacteris sols ($p < 0,05$). Els valors més elevats de les dues citocines es van obtenir amb BCG viu en combinació amb la MMC, i la majoria van presentar diferències significatives respecte BCG viu sol ($p < 0,05$).

En la línia RT4 (**Taula D.3 B**), tal i com es va observar en estudis anteriors, només es va detectar la producció d'IL-8. Igual que amb la línia T24, la majoria dels micobacteris sols van induir nivells majors d'IL-8 que els micobacteris en combinació amb la MMC ($p < 0,05$), excepte en el cas de *M. vaccae* i *M. gastri* on el valors eren similars o inclús més elevats. En aquesta línia tumoral, els valors més elevats es van obtenir amb BCG viu sol, i totes les condicions analitzades van presentar diferències significatives respecte a aquest ($p < 0,05$), excepte *M. spp.* autoclavat.

Taula D.3. Producció d'IL-6 (A) i IL-8 (B) en les línies tumorals infectades amb els micobacteris (vius i morts, MOI 10:1) sols (sense tractar) o en combinació amb la MMC, a les 48 hores post-infecció. Els valors estan expressats en pg/ml \pm SD, i corresponen al promig dels triplicats dels cultius de tres experiments independents

A.

	T24		J82	
	Sense tractar	MMC	Sense tractar	MMC
Control	288 \pm 45	903 \pm 233	13872 \pm 1563 * &	32094 \pm 4841 * &#
BCG				
viu	6920 \pm 1178 *	1704 \pm 323 * &#	54610 \pm 1897 * &	74713 \pm 4575 * &#
121°C	4170 \pm 70 * &	576 \pm 36 * &#	30734 \pm 4827 * &	37443 \pm 8759 * &
25	6887 \pm 484 *	677 \pm 34 * &#	36749 \pm 3035 * &	52955 \pm 5390 * &#
M. spp.				
viu	1059 \pm 365 * &	958 \pm 42 * &	54892 \pm 2080 *	68911 \pm 3633 * &#
121°C	590 \pm 42 * &	491 \pm 12 * &#	17981 \pm 4563 &	39647 \pm 8441 * &#
25	641 \pm 82 * &	634 \pm 13 * &	24715 \pm 1243 * &	51583 \pm 3404 * &
M. phlei				
viu	1019 \pm 156 * &	1111 \pm 100 * &	50555 \pm 693 * &	70640 \pm 1386 * &#
121°C	404 \pm 57 * &	559 \pm 3 * &#	23046 \pm 609 * &	40567 \pm 11051 * &
25	565 \pm 57 * &	711 \pm 40 * &#	29923 \pm 524 * &	52377 \pm 5300 * &
M. vaccae				
viu	585 \pm 38 * &	865 \pm 189 * &#	49803 \pm 564 * &	61765 \pm 864 * &#
121°C	293 \pm 88 &	400 \pm 54 * &#	13278 \pm 1976 &	54502 \pm 278 * &
25	317 \pm 79 &	405 \pm 51 * &	17768 \pm 516 * &	44129 \pm 1768 * &#
M. gastri				
viu	289 \pm 32 &	442 \pm 47 * &#	22600 \pm 1347 * &	37864 \pm 1772 * &#
121°C	191 \pm 34 * &	456 \pm 52 * &#	23435 \pm 1613 * &	42212 \pm 3083 * &#
25	229 \pm 20 * &	459 \pm 17 * &#	24811 \pm 492 * &	40488 \pm 2468 * &#

* p < 0,05 vs control (cèl·lules sense tractar)

& p < 0,05 vs BCG viu

p < 0,05 vs micobacteri sense MMC

B.

	T24		J82		RT4	
	Sense tractar	MMC	Sense tractar	MMC	Sense tractar	MMC
Control	1459 ±261	936 ±223	4242 ±1053	9987 ±2730	81 ±3	1488 ±52 * & #
BCG						
viu	12576 ±796 * &	2971 ±431 * & #	20150 ±1545 * &	24159 ±571 * & #	2112 ±6 * &	1032 ±63 * & #
121°C	8131 ±1019 * &	1017 ±131 * & #	7972 ±437 * &	16761 ±417 * & #	1572 ±14 * &	728 ±22 * & #
25	10630 ±1208 *	1198 ±271 & #	12988 ±1409 * &	16104 ±1242 * & #	1529 ±21 * &	842 ±8 * & #
M. spp.						
viu	3887 ±344 * &	1820 ±277 * & #	12156 ±634 * &	15570 ±523 * & #	1614 ±73 * &	1163 ±16 * & #
121°C	2028 ±504 * &	787 ±133 * & #	7226 ±589 * &	11990 ±2677 * & #	1426 ±261 *	766 ±74 * & #
25	2846 ±140 * &	1214 ±235 & #	11527 ±1553 * &	12691 ±522 * &	1332 ±39 * &	885 ±36 * &
M. phlei						
viu	3488 ±498 * &	1880 ±475 * & #	15908 ±285 * &	17326 ±537 * & #	1577 ±12 * &	959 ±86 * & #
121°C	2115 ±901 &	1083 ±267 * & #	10096 ±103 * &	13848 ±1486 * & #	1357 ±97 * &	963 ±33 * & #
25	3211 ±642 * &	1341 ±139 & #	10821 ±1084 * &	12070 ±1337 * &	1236 ±130 * &	884 ±88 * &
M. vaccae						
viu	2870 ±564 * &	1564 ±331 & #	10789 ±1432 * &	14145 ±2627 * &	1096 ±28 * &	730 ±130 * &
121°C	1442 ±287 &	728 ±82 * & #	5710 ±292 * &	12313 ±1121 * & #	646 ±52 * &	756 ±23 * &
25	2087 ±157 * &	705 ±104 * & #	4531 ±156 * &	9142 ±1221 * & #	616 ±31 * &	658 ±61 * &
M. gastri						
viu	1339 ±107 &	678 ±110 * & #	6836 ±549 * &	10099 ±301 * & #	893 ±7 * &	1488 ±17 * & #
121°C	1137 ±165 * &	603 ±44 * & #	6141 ±342 * &	9595 ±1592 * & #	935 ±6 * &	1162 ±39 * & #
25	1359 ±70 &	833 ±67 * & #	6596 ±942 * &	8711 ±398 * &	875 ±85 * &	1091 ±24 * &

* p < 0,05 vs control (cèl·lules sense tractar)

p < 0,05 vs BCG viu

& p < 0,05 vs micobacteri sense MMC

D.2.2.5. Mecanisme de la inhibició de la proliferació

D.2.2.5.1. Efecte directe de les citocines en la proliferació de les cèl·lules tumorals

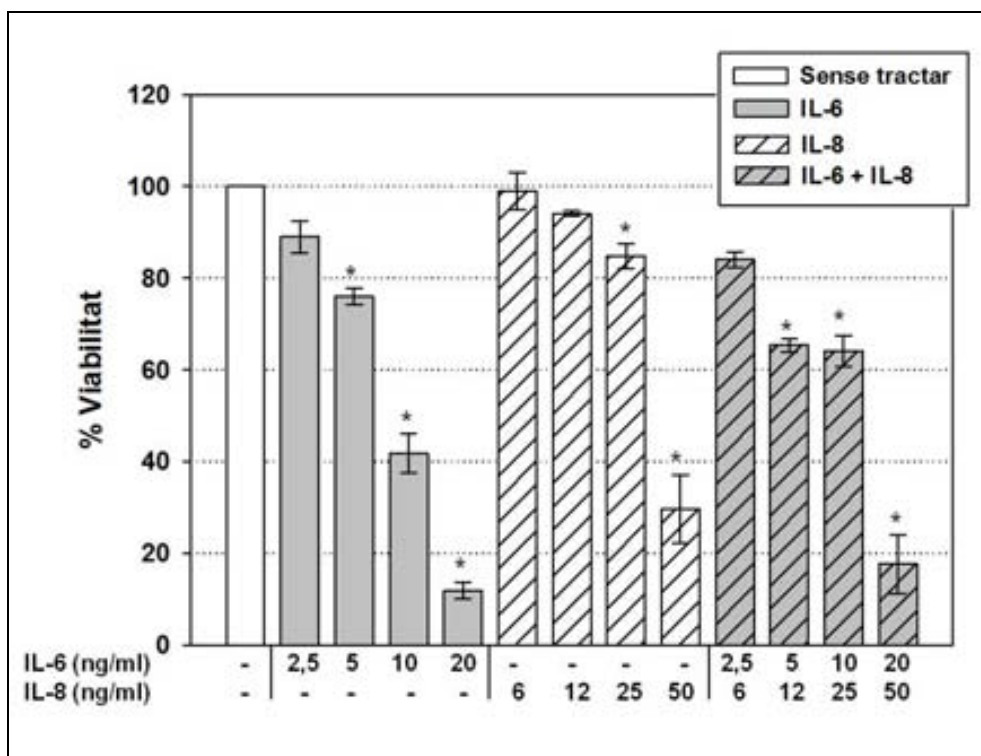
En estudis anteriors hem pogut observar que els micobacteris que produïen una major inhibició, induïen també una major producció de citocines. Per aquest motiu es va estudiar si hi podia haver una correlació directa entre la producció de citocines IL-8 i IL-6 i la disminució de la viabilitat tumoral en les cèl·lules T24.

Tal i com es pot observar a la **figura D.28**, les dues citocines van inhibir la proliferació cel·lular de manera concentració-dependent. En el cas de la IL-6, va ser a partir de 5 µg/ml quan es va detectar una disminució de la viabilitat ($76 \pm 1,8\%$) ($p < 0,05$), i es va arribar al $12 \pm 1,8\%$ de viabilitat amb 20 ng/ml d'aquesta citocina. En canvi en el cas de la IL-8 va ser a partir de 25 ng/ml on es va detectar una disminució de la viabilitat ($85 \pm 2,8\%$) ($p < 0,05$), arribant al $30 \pm 7,5\%$ amb 50 ng/ml.

Quan es van afegir les dues citocines conjuntament al cultiu, es va poder observar un increment en la inhibició de la proliferació cel·lular respecte les citocines soles. Aquesta sinergia es va observar a partir de 5 i 12 ng/ml de IL-6 i IL-8, respectivament, obtenint el $65 \pm 1,4\%$ de viabilitat cel·lular. Quan es van incrementar les dosis s'observà un increment de la inhibició de la proliferació arribant al $18 \pm 6\%$ de viabilitat amb 20 i 50 ng/ml de IL-6 i IL-8, respectivament (**Fig D.28**).

Les concentracions màximes utilitzades d'IL-6 i IL-8 en aquest estudi (20 i 50 ng/ml, respectivament), van ser escollides per ser similars a les obtingudes després de les 72 hores post-infecció de la línia T24 en experiments previs (**Fig. D.21**).

Figura D.28. Efecte de les citocines IL-6 i IL-8 en la viabilitat de la línia tumoral T24 després de 48 hores de cultiu



Els resultats es mostren com a percentatge de viabilitat respecte a les cèl·lules control (no tractades). Cada columna representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules no tractades)

D.2.2.5.2. Capacitat dels micobacteris d'induir l'apoptosi en les cèl·lules tumorals

Amb la finalitat d'estudiar el mecanisme mitjançant el qual té lloc la inhibició de la proliferació cel·lular, es van realitzar diferents assajos relacionats amb l'observació de la inducció de l'apoptosi cel·lular per part dels micobacteris escollits.

Estudi i anàlisi de l'alteració de la membrana cel·lular

Per tal d'optimitzar les condicions en les que els inductors de l'apoptosi actuen en la línia tumoral T24, aquests es van analitzar a diferents concentracions i temps d'incubació. Mitjançant la tinció doble amb anexina-V-fluoresceïna (Anx) i IP, i el posterior anàlisi per citometria de flux, es van obtenir els valors induïts de cèl·lules apoptòtiques primerenques (Anx⁺ / IP⁻), els quals es troben resumits a la **taula D.4**. Tal i com es pot observar, les condicions amb les que es van obtenir nivells d'apoptosi primerenca més elevats van ser: 5 μ M per la STP i 6 μ g/ml per la CMP, durant 24 hores, de manera que es van escollir aquestes condicions dels controls pels experiments posteriors.

Taula D.4. Nombre de cèl·lules T24 apoptòtiques primerenques després de ser incubades amb diferents concentracions de STP i CMP durant 15 o 24 hores

	STP			CMP		
	5 μ M	10 μ M	20 μ M	6 μ g/ml	15 μ g/ml	30 μ g/ml
15 hores	38	32	35	23	10	6
24 hores	47	47	27	45	12	21

Els valors estan expressats com a percentatge respecte del control negatiu (cèl·lules sense tractar), i corresponen als d'un experiment representatiu de tres independents.

A la **figura D.29** podem observar els diagrames representatius corresponents a les cèl·lules T24 infectades amb els diferents micobacteris durant 48 hores, i els diferents controls, on es mostren els següents resultats: la població de cèl·lules vives (Anx^- / IP^- , quadrant inferior-esquerra), apoptòtiques primerenques (Anx^+ / IP^- , inferior-dreta), apoptòtiques tardanes (Anx^+ / IP^+ , superior-dreta) i necròtiques (Anx^- / IP^+ , superior-esquerra).

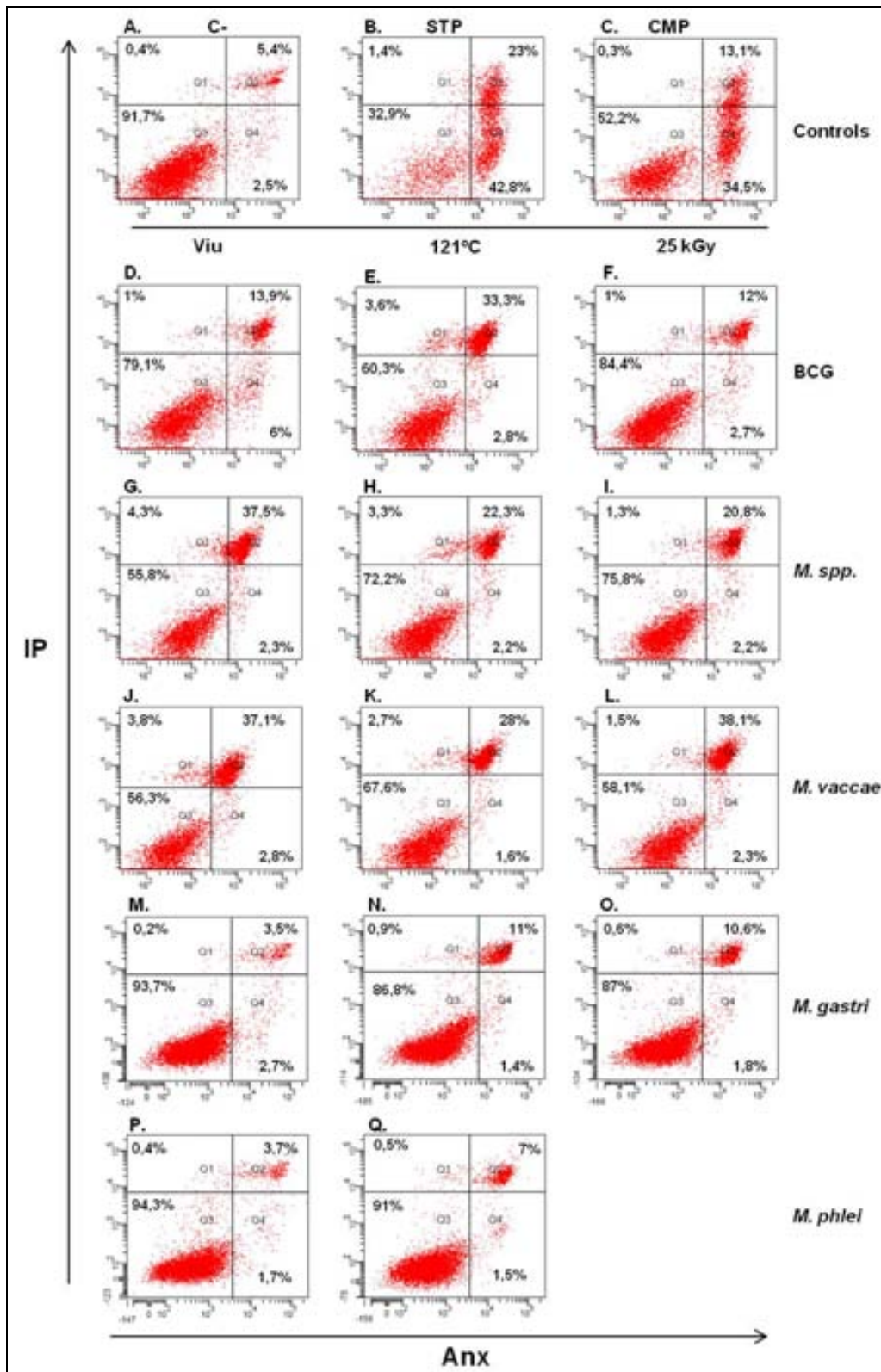
La població de cèl·lules apoptòtiques primerenques induïdes pels inductors control, STP (5 μ M, 24 hores) i CMP (6 μ g/ml, 24 hores), va incrementar respecte del control negatiu ($45 \pm 2\%$, $40 \pm 5\%$ i $3 \pm 0,5\%$, respectivament) (**Fig. D.29 A-C**). En canvi, quan les cèl·lules es van infectar amb els diferents micobacteris durant 48 hores (**Fig. D.29 D-Q**), el nombre de cèl·lules apoptòtiques primerenques no va incrementar.

Per una altra banda, el nombre de cèl·lules apoptòtiques tardanes també va incrementar amb els inductors control (STP: $29 \pm 6\%$, CMP: $21 \pm 7\%$) respecte del control negatiu ($7 \pm 2\%$).

Finalment, el nombre de cèl·lules necròtiques no va incrementar respecte del control negatiu en cap dels casos analitzats.

Aquest estudi es va realitzar a les 24, 48 i 72 hores de cultiu de la línia T24 amb els micobacteris, encara que només es mostren els resultats obtinguts a les 48 hores, ja que aquests van ser amb valors superiors que a les 24 hores i similars als obtinguts a les 72 hores (**Fig. D.29**).

Figura D.29. Anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules T24 doblement tenyides amb Anx i IP



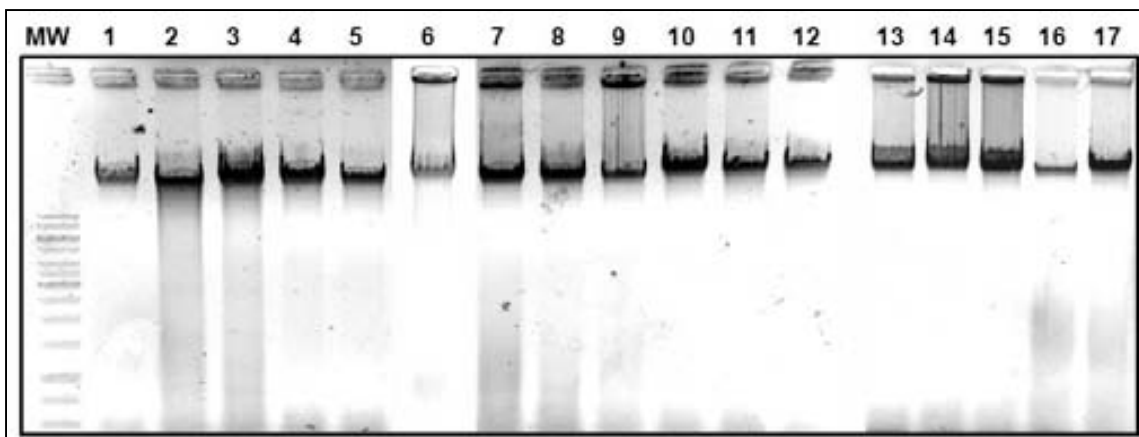
Cèl·lules sense tractar, C- (A), estimulades amb STP (B) i CMP (C), infectades amb BCG (D, E i F), *M. spp.* (G, H i I), *M. vaccae* (J, K i L), *M. gastris* (M, N i O) i *M. phlei* (P i Q). Els micobacteris es van utilitzar vius (D, G, J, M i P), morts per calor (E, H, K, N i Q) i irradiats (F, I, L i O). Els resultats són representatius d'un de tres experiments independents realitzats (els diagrames A-L corresponen a un mateix experiment, i M-Q a un altre experiment diferent).

Estudi i anàlisi de la fragmentació del DNA genòmic

Després d'extreure i analitzar, per electroforesi en gel d'agarosa (**Fig. D.30**), el DNA genòmic de les cèl·lules T24 cultivades amb els controls inductors d'apoptosi (CMP i STP) durant 24 hores, es va visualitzar el DNA degradat al llarg del carril, indicant que el DNA estava fragmentat, i per tant que s'havia induït l'apoptosi.

No obstant, les mostres corresponents al DNA extret de les cèl·lules tractades amb els diferents micobacteris durant 48 hores, no van presentar cap degradació d'aquest al carril del gel, coincidint aquest resultat amb el de les cèl·lules sense tractar (**Fig. D.30**).

Figura D.30. Fragmentació del DNA genòmic de les cèl·lules T24



(1) cèl·lules sense tractar,
(2) CMP,
(3) STP,
(4) BCG viu,
(5) BCG mort per calor,
(6) BCG irradiat,

(7) *M. spp.* viu,
(8) *M. spp.* mort per calor,
(9) *M. spp.* irradiat,
(10) *M. gastri* viu
(11) *M. gastri* mort per calor,
(12) *M. gastri* irradiat,

(13) *M. vaccae* viu,
(14) *M. vaccae* mort per calor
(15) *M. vaccae* irradiat,
(16) *M. phlei* viu,
(17) *M. phlei* mort per calor.

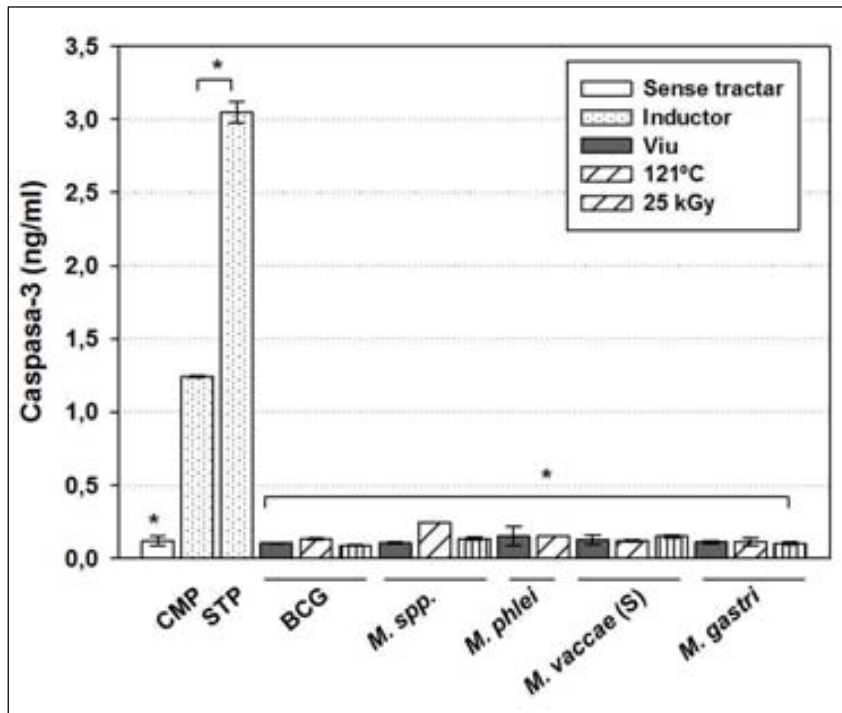
MW, marcador de pes molecular d'1kb.

Aquesta imatge correspon a l'electroforesi de 4 gels d'agarosa (0,8%) diferents.

Detecció de caspasa 3

Cap micobacteri analitzat, tant viu com mort, va ser capaç d'induir un increment en la producció de la caspasa 3 activa en les cèl·lules T24, després de 48 hores de cultiu. En la **figura D.31**, podem observar com els nivells de l'enzim detectats amb els diferents micobacteris van ser similars als produïts per les cèl·lules control (sense cap estímul) ($p > 0,05$). En canvi, els dos inductors utilitzats, la CMP i la STP, van ser capaços d'induir un increment en la producció d'aquesta proteïna fins a nivells de $1,3 \pm 0,01$ i $3 \pm 0,07$ ng/ml, respectivament ($p < 0,05$ respecte la resta de condicions analitzades).

Figura D.31. Detecció de la caspasa 3 activa en la línia tumoral T24 després de 48 hores de cultiu amb els diferents



La infecció es va realitzar amb els micobacteris vius i morts per calor (121°C/15 minuts) o irradiació (25 kGy), amb els inductors de l'apoptosi (CMP, STP), o sense cap estímul.

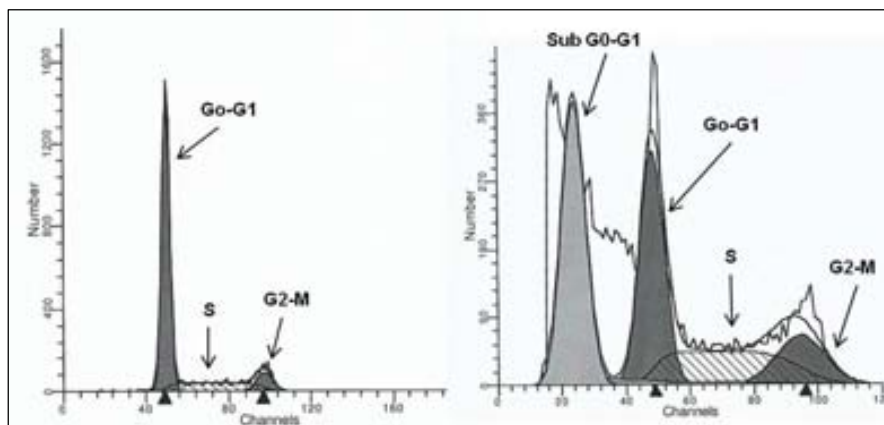
Cada columna representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs inductors (CMP o STP)

D.2.2.5.3. Arrest del cicle cel·lular

A l'anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux es va poder distingir i quantificar la distribució de les cèl·lules al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular (proporció de cèl·lules en G-G1, S, G2-M, subG0-G1, i poliploides). A la **figura D.32** es poden observar els histogrames obtinguts de les cèl·lules T24 sense tractar (**A**) i tractades amb STP (**B**), destacant en aquest últim la presència d'un pic corresponent a la fase subG0-G1 (cèl·lules apoptòtiques) que no va aparèixer a les cèl·lules sense estimular.

Figura D.32. Anàlisi del cicle cel·lular de les cèl·lules T24 sense tractar (A) i estimulades amb STP (B), després de 48 hores de cultiu i tenyides amb IP



El contingut de DNA es va analitzar per citometria de flux. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

L'estudi del cicle cel·lular es va realitzar a les 24, 48 i 72 hores post-infecció amb els diferents micobacteris vius. Tal i com es pot observar a la **figura D.33**, la fase G0-G1 de les cèl·lules control va incrementar, mentre que la fase S va disminuir al llarg del temps. Contràriament, en les cèl·lules cultivades amb la CMP, la fase G0-G1 va disminuir, i la fase S va augmentar. Les cèl·lules infectades amb *M. gastris* i *M.spp.* es van comportar de manera similar al control. En canvi les corresponents a BCG es van comportar de manera similar a la CMP al llarg del temps.

Per tal d'analitzar el comportament de les cèl·lules infectades amb els micobacteris tant vius com morts, es va escollir les 48 hores post-infecció. Els valors corresponents s'han representat gràficament a la **figura D.34**, on es poden observar diferents perfils. Respecte a la fase G0-G1, amb les cèl·lules control es va obtenir un $73 \pm 1,8\%$. Aquest valor va disminuir amb la STP fins a un $43 \pm 4\%$ ($p < 0,05$), mentre que amb la CMP ($74 \pm 1,2\%$) no es va detectar cap diferència estadísticament significativa. En canvi, amb els diferents micobacteris els nivells d'aquesta fase van incrementar lleugerament fins a valors de $78-81 \pm 0,1-0,6\%$ ($p < 0,05$), excepte en el cas de BCG viu i mort per calor on va disminuir ($54 \pm 0,3\%$ i $68 \pm 0,4\%$, respectivament) ($p < 0,05$), i en el cas de BCG irradiat i *M. gastris*, tant viu com mort, on es va mantenir al mateix nivell amb un $75 \pm 0,01-0,1\%$.

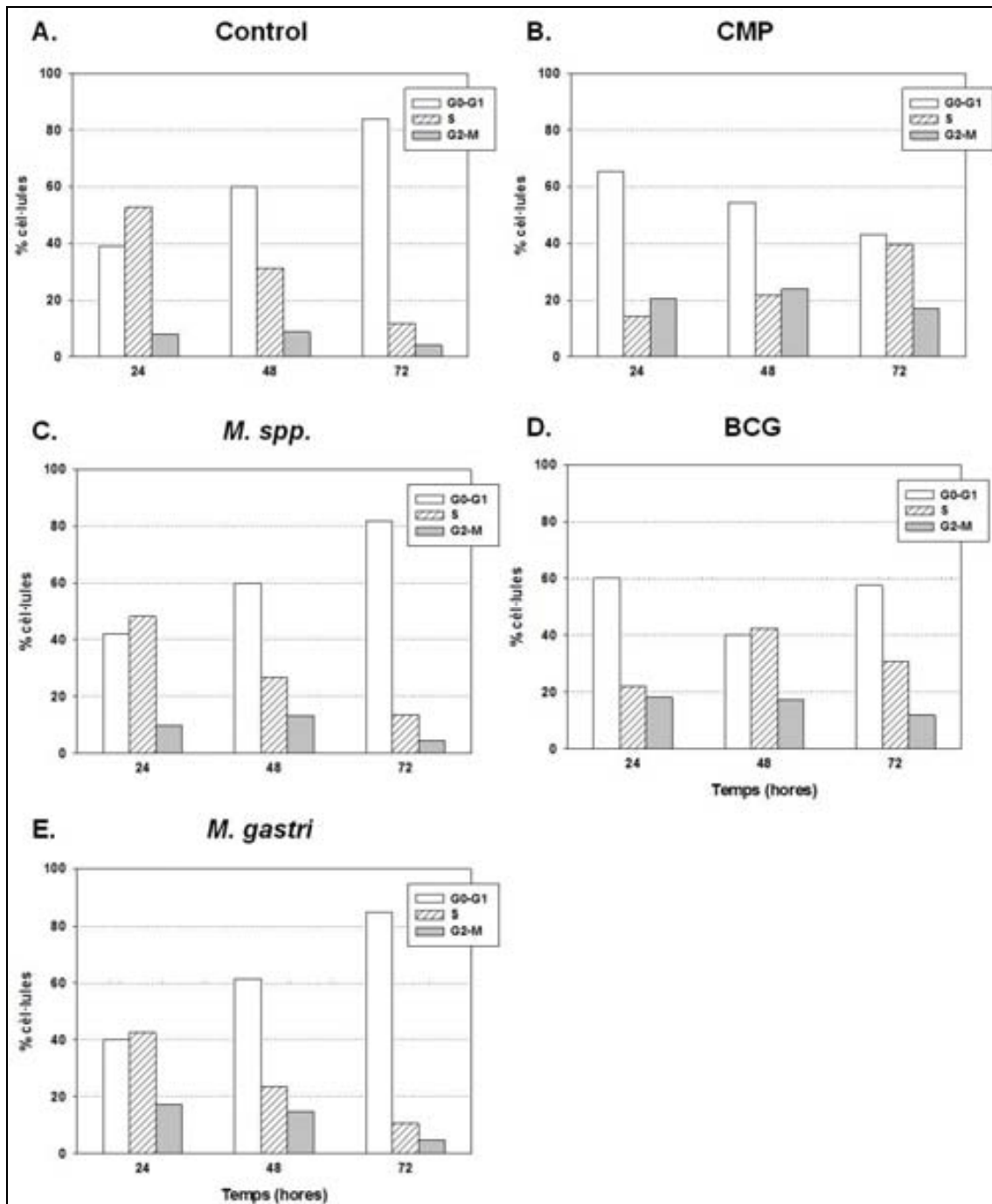
Respecte a la fase S, podem destacar que tant amb la CMP com amb la STP, el % cel·lular d'aquesta fase va incrementar respecte del control ($18 \pm 1,2\%$) fins a valors de $23 \pm 2,6$ i $37 \pm 3,1\%$ ($p < 0,05$). D'altra banda, mentre la fase S amb BCG viu i mort per calor es va veure incrementada fins a valors de $42 \pm 0,6$ i $25 \pm 0,4\%$, respectivament ($p < 0,05$), amb la resta de micobacteris no es va observar cap diferència estadísticament significativa respecte del control.

La fase G2-M es va veure disminuïda amb la CMP ($3 \pm 1,8\%$) ($p < 0,05$), però va incrementar respecte del control ($9 \pm 0,7\%$) amb la STP ($20 \pm 1,7\%$) ($p < 0,05$). Amb els diferents micobacteris, excepte en cas de BCG viu i mort per calor, aquesta fase va disminuir lleugerament fins a valors de $4-5 \pm 0,01-0,7\%$ ($p < 0,05$).

D'aquesta manera podem establir que, a les 48 hores de cultiu, les cèl·lules T24 infectades amb BCG viu i mort per calor tendeixen a acumular-se a la fase S, mentre que la resta tendeix a acumular-se en la fase G0/G1, excepte *M. gastris* i BCG irradiat que es comporten de manera similar a les cèl·lules sense tractar.

Finalment, en aquest assaig, hem pogut detectar la presència de cèl·lules apoptòtiques induïdes pels dos controls, CMP i STP (**Fig. D.34**).

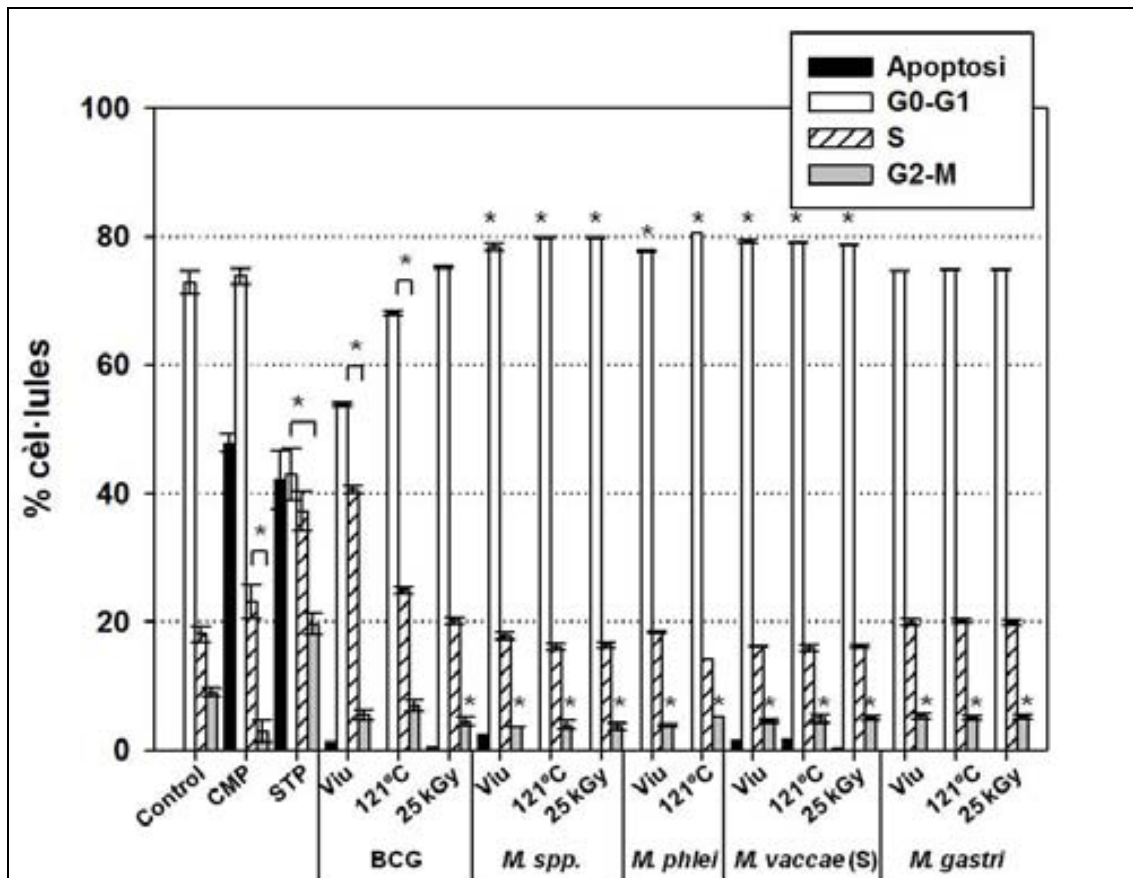
Figura D.33. Anàlisi per citometria de flux del cicle cel·lular de la línia tumoral T24, infectada amb els micobacteris (MOI 10:1), a les 24, 48 i 72 hores de cultiu



Cèl·lules sense tractar (A), estimulada amb CMP (6 µg/ml, 24 hores) (B), infectada amb *M. spp.* (C), BCG (D), i *M. gastris* (E).

Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

Figura D.34. Anàlisi per citometria de flux del cicle cel·lular de la línia tumoral T24, infectada amb els micobacteris (MOI 10:1), a les 48 hores de cultiu



Cèl·lules sense tractar (control), estimulades amb CMP (6 µg/ml, 24 hores) i STP (5 µM, 24 hores), i infectades amb els diferents micobacteris (vius i morts).

Cada columna representa el promig ± SD dels triplicats dels cultius. Les dades són representatives d'un de tres experiments independents.

D.2.3. Estudi de l'activitat antitumoral indirecta

D.2.3.1. Estudi amb PBMC d'humans

D.2.3.1.1. Capacitat d'activació de les PBMC. Inducció de la producció de citocines per part dels micobacteris

Amb l'objectiu d'analitzar l'efecte immunestimulador dels micobacteris escollits, es van infectar les PBMC amb els micobacteris vius i morts, es mesurà la producció de citocines induïes, i posteriorment la seva activitat citotòxica front les cèl·lules tumorals.

Les PBMC en cultiu durant set dies van produir de manera constitutiva les citocines IL-10, IL-12, IFN-γ i IL-8, tot i que els nivells obtinguts van ser molt baixos, inclús en alguns casos propers als del límit de detecció del kit (Fig. D.35 A, B, C i E). Quan es van estimular amb els diferents micobacteris, vius i irradiats, durant set dies, els nivells de les citocines produïdes van incrementar considerablement respecte del

control ($p < 0,05$). Els únics casos amb els que no s'observaren diferències significatives respecte del control foren el d'IL-10 amb *M. gastri* irradiat, i el d'IFN- γ amb *M. phlei* irradiat. A més, els micobacteris utilitzats van ser capaços d'induir la producció de les citocines TNF- α i IL-6 ($p < 0,05$), les quals no es van produir constitutivament (**Fig. D.35 D i F**).

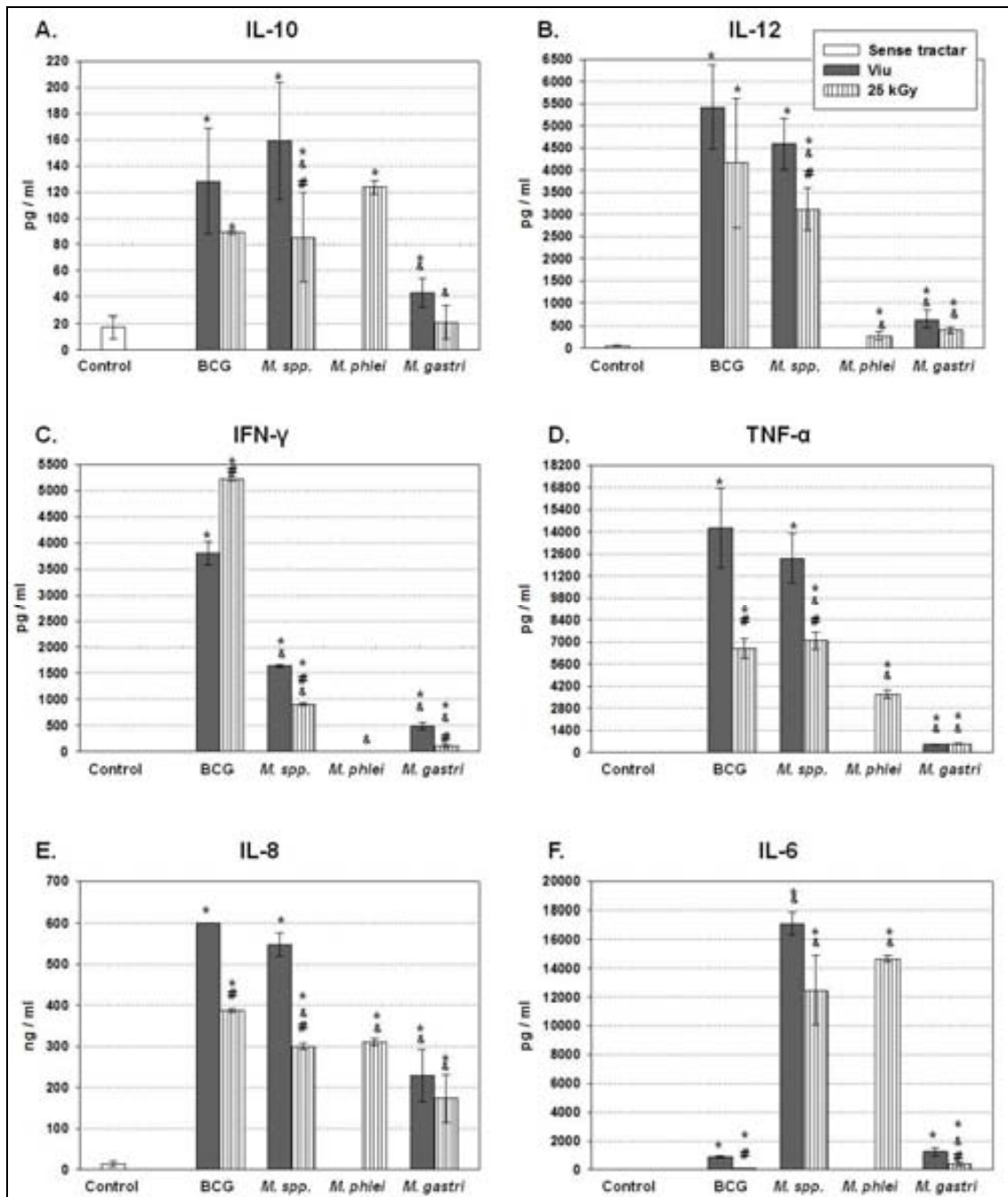
En general els micobacteris irradiats (25 kGy) van induir una menor producció de les citocines que el respectiu micobacteri viu ($p < 0,05$) (**Fig. D.35**). En canvi, respecte a l'IFN- γ induït per BCG, es va observar una producció superior amb el bacteri irradiat ($p < 0,05$).

M. spp. viu va induir uns nivells d'IL-10, IL-12, TNF- α i IL-8 similars a BCG viu ($p > 0,05$). En canvi els nivells d'IL-6 van ser superiors a BCG viu ($p < 0,05$) i a la resta de micobacteris.

Cal destacar que *M. phlei* no es va poder utilitzar viu degut a la formació d'una pel·lícula de biofilm a partir del segon dia de cultiu amb les cèl·lules. Aquest micobacteri irradiat va induir uns nivells d'IL-10 similars a BCG viu ($p > 0,05$). En canvi, els nivells induïts d'IL-12, IFN- γ , TNF- α i IL-8 van ser inferiors a BCG viu ($p < 0,05$). D'altra banda els valors d'IL-6, de la mateixa manera que vam observar amb *M. spp.*, van ser superiors a BCG viu ($p < 0,05$).

Per últim, *M. gastri*, utilitzat en aquest estudi com a control negatiu, va ser el micobacteri que va induir una menor producció de les citocines analitzades (**Fig. D.35**).

Figura D.35. Producció d'IL-10 (A), IL-12 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D), IL-8 (E), i IL-6 (F), per les PBMC estimulades amb els diferents micobacteris i sense estimular (control)



La infecció es va realitzar amb els micobacteris vius i irradiats (25 kGy), a una MOI de 0,1:1 per BCG i de 1:1 per la resta de micobacteris, durant set dies.

Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules sense tractar)

& $p < 0,05$ vs BCG viu

$p < 0,05$ vs micobacteri viu corresponent

D.2.3.1.2. Citotoxicitat de les PBMC, activades amb els micobacteris, front les cèl·lules tumorals

Capacitat d'inhibició de la proliferació cel·lular de la línia tumoral T24

Després d'haver estat activades amb els diferents micobacteris durant set dies, es va analitzar l'activitat citotòxica de les PBMC front la línia tumoral T24. Per una banda, es va realitzar l'estudi mitjançant el contacte cèl·lula-cèl·lula, i per una altra banda es va analitzar dels factors solubles secretats al medi, mitjançant el cultiu de la línia tumoral amb el sobrenedant de les PBMC activades.

Les PBMC, tant estimulades amb els micobacteris (vius i irradiats a 25 kGy) com sense estimular, van presentar activitat citotòxica front la línia tumoral ($p < 0,05$), encara que amb les PBMC estimulades es van obtenir valors de citotoxicitat superiors als de les PBMC no estimulades ($p < 0,05$). Tal i com es pot observar a la **figura D.36 A**, BCG viu va induir una activitat citotòxica major respecte a la resta de micobacteris ($p < 0,05$). Els micobacteris irradiats van disminuir la capacitat citotòxica respecte al seu corresponent no tractat ($p < 0,05$).

Per una altra banda, només BCG i *M. spp.* van induir la secreció de factors solubles al sobrenedant dels cultius de les PBMC estimulades, els quals van presentar activitat citotòxica front les cèl·lules tumorals ($p < 0,05$) (**Fig D.36 B**). A diferència del cas anterior, amb el sobrenedant de les PBMC no estimulades no es va detectar activitat citotòxica. BCG viu va ser el micobacteri que induí una major producció de factors solubles amb activitat citotòxica ($58 \pm 8\%$) respecte dels altres micobacteris ($p < 0,05$). Amb BCG irradiat el valor de citotoxicitat va disminuir respecte a BCG viu ($p < 0,05$), sent similar a *M. spp.* viu i irradiat.

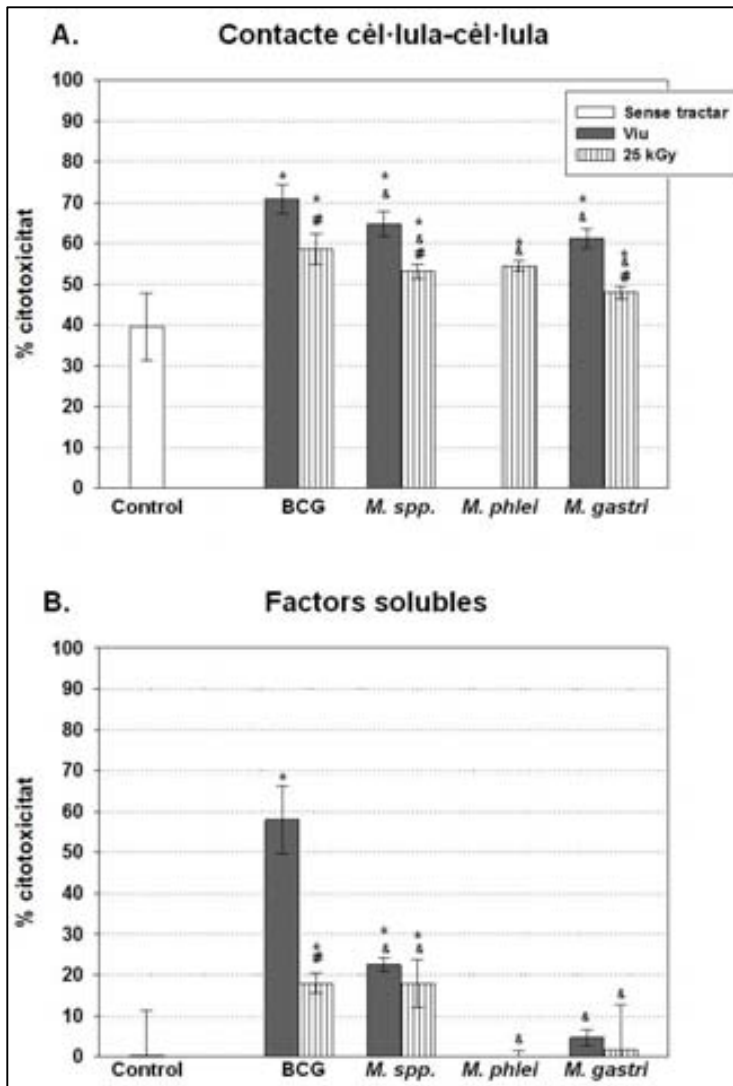


Figura D.36. Activitat citotòxica induïda per les PBMC activades front la línia tumoral T24, a una proporció de 20:1 (PBMC : T24) (A), i pels factors solubles presents al sobrenedant de les PBMC activades front la línia tumoral T24 (B), després de 48 hores de cultiu

Les PBMC van ser infectades amb el micobacteris vius i irradiats (25 kGy), a una MOI de 0,1:1 per BCG i de 1:1 per la resta de micobacteris, durant 7 dies.

Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control (PBMC sense infectar)

& $p < 0,05$ vs BCG viu

$p < 0,05$ vs micobacteri corresponent viu

Capacitat d'inducció de la producció de citocines en la línia tumoral T24

La línia tumoral T24 estimulada amb les PBMC sense activar durant 48 hores, va ser capaç d'induir la producció d'IL-8 ($p < 0,05$) (**Fig. D.37 A**). En canvi, quan es va estimular amb les PBMC activades amb els diferents micobacteris, encara que tots els micobacteris van induir uns nivells superiors als obtinguts amb les cèl·lules T24 soles (13 ± 3 ng/ml) ($p < 0,05$), només *M. phlei* irradiat (tal i com ja hem explicat, no es va poder utilitzar viu) va induir un increment d'IL-8 respecte les PBMC no activades ($p < 0,05$) (309 ± 6 front 151 ± 35 ng/ml). Els valors d'IL-8 obtinguts amb BCG viu van ser similars als del control ($p > 0,05$), en canvi amb la resta de micobacteris (excepte *M. phlei*) els nivells induïts van ser inferiors ($p < 0,05$) (**Fig. D.37 A**).

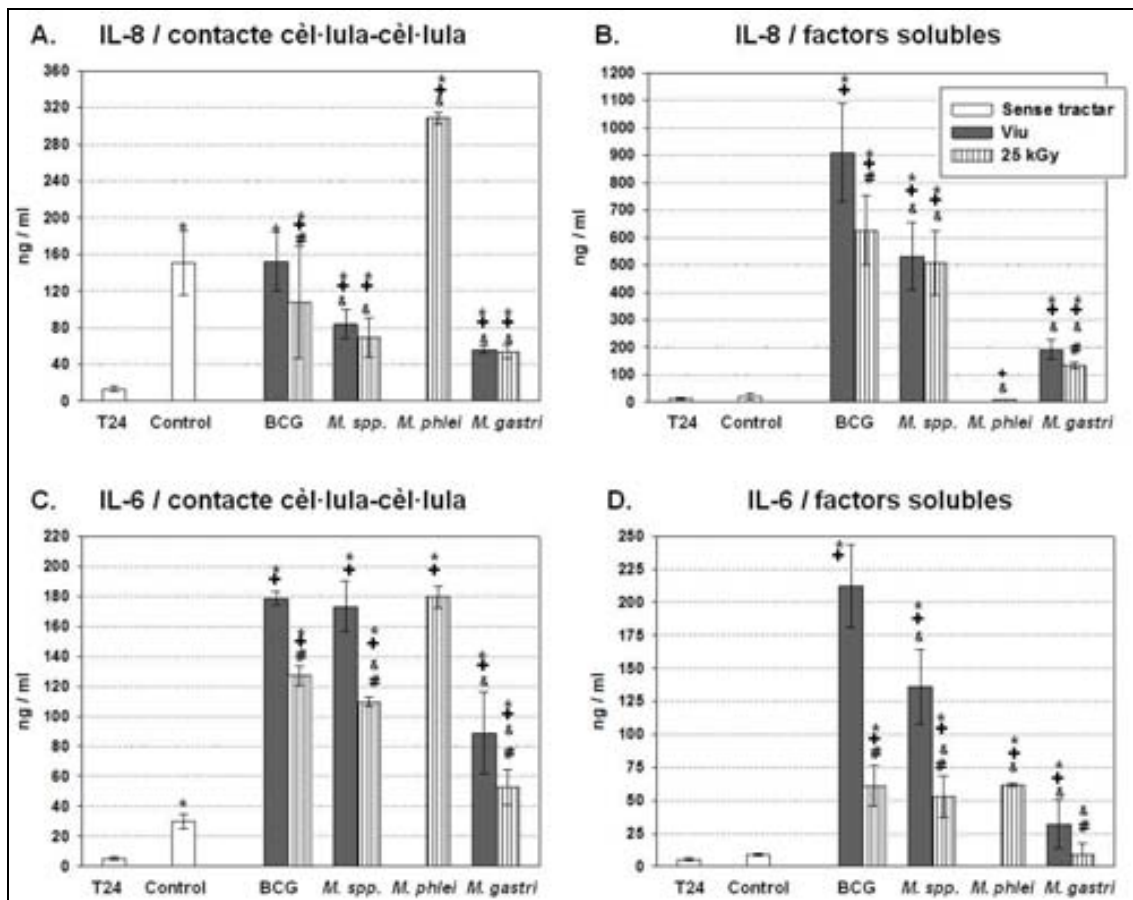
Per una altra banda, el sobrenedant de les PBMC activades amb BCG, *M. spp.* i *M. gastrii* va ser capaç d'incrementar la producció d'IL-8 per part de la línia tumoral ($p < 0,05$) (**Fig. D.37 B**). BCG viu va ser el micobacteri que va induir una major producció d'IL-8 (909 ± 180 ng/ml) ($p < 0,05$). Mentre que BCG i *M. gastrii* irradiats van induir uns

valors d'IL-8 menors que els seus respectius vius ($p < 0,05$), els valors produïts per *M. spp.* viu i irradiat van ser similars (**Fig. D.37 B**).

Igual que amb l'IL-8, les cèl·lules tumorals estimulades amb les PBMC no activades van induir una major producció d'IL-6 que les cèl·lules T24 soles (30 ± 5 front 5 ± 1 ng/ml) ($p < 0,05$) (**Fig. D.37 C**), encara que els valors van ser superiors amb les PBMC activades amb els micobacteris en tots els casos ($p < 0,05$). BCG viu, *M. spp.* viu i *M. phlei* irradiat van induir uns nivells d'IL-6 similars (al voltant de 180 ng/ml), mentre que els valors obtinguts amb *M. gastri* van ser els més baixos. En tots els casos, els micobacteris irradiats van induir una producció menor als seus respectius no tractats ($p < 0,05$) (**Fig. D.37 C**).

Tal i com es pot observar a la **figura D.37 D**, el sobrenedant de les PBMC no activades no va induir la producció d'IL-6 de les cèl·lules tumorals. BCG viu va induir uns valors d'IL-6 superiors a la resta (212 ± 32 ng/ml), sent *M. spp* viu el segon en incrementar la producció d'aquesta citocina (136 ± 28 ng/ml). BCG, *M. spp.* i *M. phlei* irradiats van induir uns nivells d'IL-6 similars entre ells, però inferiors als seus respectius no tractats ($p < 0,05$). De la mateixa manera que en els casos anteriors, els valors d'IL-6 obtinguts amb *M. gastri* van ser el més baixos (**Fig D.37 D**).

Figura D.37. Producció d'IL-8 (A i B) i IL-6 (C i D) per la línia tumoral T24 (T24), co-cultivada amb les PBMC sense estimular (control) o estimulades amb els diferents micobacteris



La infecció es va realitzar amb els micobacteris vius i irradiats (25 kGy), a una MOI de 0,1:1 per BCG i de 1:1 per la resta de micobacteris, durant 48 hores.

Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius de tres experiments independents.

* $p < 0,05$ vs T24

+ $p < 0,05$ vs control (PBMC sense tractar)

& $p < 0,05$ vs BCG viu

$p < 0,05$ vs micobacteri corresponent viu

D.2.3.2. Estudi amb macròfags de ratolí J774

D.2.3.2.1. Supervivència dels micobacteris dins del macròfag

Amb la finalitat d'estudiar la viabilitat dels micobacteris dins dels macròfags J774, aquestes cèl·lules van ser infectades a diferents MOI (0,1; 1, 10 i 100 : 1, bacteri : cèl·lula), i durant diferents temps (3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores).

Per una banda, a la **figura D.38** es mostra el nombre de cfu/pou de BCG dins dels macròfags després de ser infectats a diferents MOI, i es va poder observar com el bacil es mantenia viable dins del macròfag després de 96 hores de cultiu.

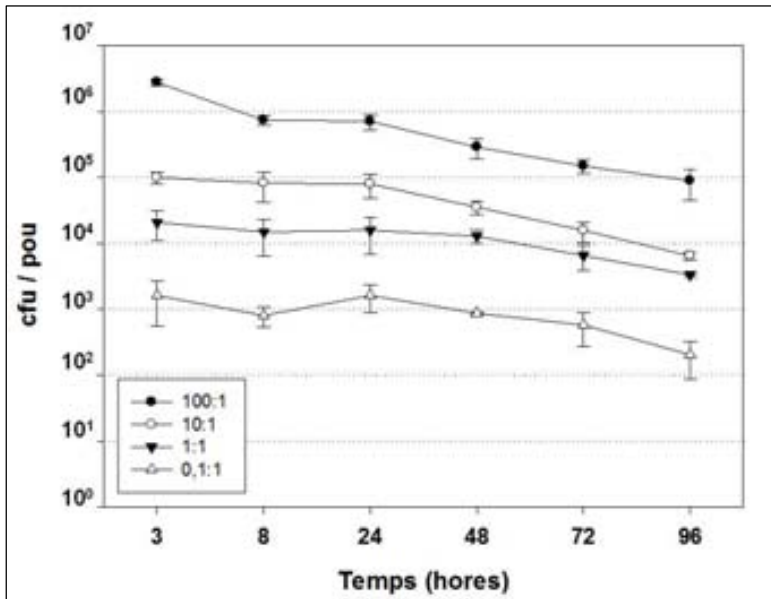


Figura D.38. Viabilitat de BCG dins de la línia de macròfags de ratolí J774 a les 3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores d'infecció del cultiu

La MOI utilitzada va ser de 100; 10; 1 i 0,1:1.

Els resultats estan expressats com el promig del nombre de cfu/pou ± SD dels triplicats dels cultius d'un de tres experiments independents.

* p < 0,05 vs 3 hores de cultiu

& p < 0,05 vs BCG

Per una altra banda, a la **figura D.39**, es mostra el nombre de cfu/pou dels diferents micobacteris dins dels macròfags després de ser infectats a la MOI escollida de 10:1. En aquesta figura vam poder observar com BCG i *M. gastri* es van mantenir viables dins dels macròfags al llarg del temps, mentre que el nombre de cfu de *M. spp.* i *M. vaccae* (S) va disminuir fins desaparèixer a les 96 hores de cultiu (p < 0,05 respecte de les 3 hores de cultiu). Tant *M. vaccae* (S) com *M. spp.* van mostrar diferències significatives (p < 0,05) respecte de BCG, a partir de les 3 i 24 hores, respectivament.

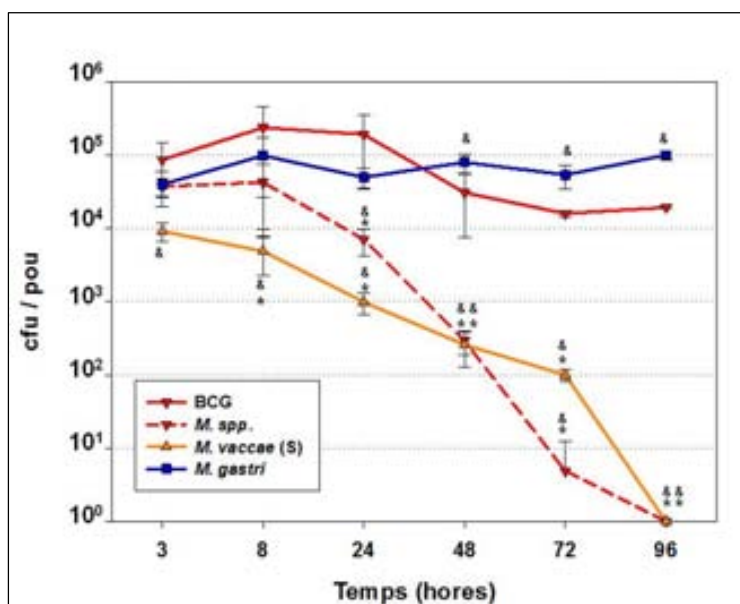


Figura D.39. Viabilitat dels bacteris dins de la línia de macròfags de ratolí J774 a les 3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores d'infecció del cultiu (MOI 10:1)

Els resultats estan expressats com el promig del nombre de cfu/pou ± SD de tres experiments independents.

* p < 0,05 vs 3 hores de cultiu
& p < 0,05 vs BCG

D.2.3.2.2. Capacitat d'activació del macròfag pels micobacteris

Activació de l'expressió de marcadors de superfície

Per tal d'estudiar més detalladament la capacitat d'activació del sistema immunitari, es van realitzar estudis amb la línia cel·lular de macròfags de ratolí J774, ja que per manca de material suficient, no es van poder realitzar aquests experiments amb sang humana. D'aquesta manera, es va analitzar la capacitat d'activar cèl·lules presentadores d'antígens per part dels diferents micobacteris escollits.

En primer lloc es va optimitzar les condicions de l'experiment (les quals van ser les indicades a l'apartat de material i mètodes). Així, es van testar diferents concentracions de l'anticòs bloquejador FcBlock (2,5; 5 i 10 $\mu\text{g/ml}$), sent la corresponent a 5 $\mu\text{g/ml}$ la necessària per minimitzar al màxim el senyal degut a les unions inespecífiques. Es van estudiar diferents concentracions d'LPS (0,1; 0,5; 1 i 10 $\mu\text{g/ml}$) durant 3 i 24 hores, obtenint-se uns valors d'expressió dels marcadors més elevats amb 10 $\mu\text{g/ml}$ durant 24 hores. Els anticossos anti-marcadors de superfície i els seus respectius controls d'isotip es van assajar a diferents concentracions (1, 5 i 10 $\mu\text{g/ml}$), i es van escollir els valors de 5 $\mu\text{g/ml}$ pels anticossos anti-CD80, -CD86 i -MHC-II, i de 10 $\mu\text{g/ml}$ per l'anti-CD40.

A la **figura D.40** es representa un exemple dels resultats obtinguts utilitzant o no el bloquejador FcBlock, i estimulants o no els macròfags amb diferents concentracions d'LPS. Per una banda, podem observar com disminueix la intensitat mitjana de fluorescència del marcador CD86 quan els macròfags es van tractar amb el bloquejador, posant de manifest les unions inespecífiques del marcador amb els receptors Fc de la cèl·lula. Per una altra banda, l'augment de la concentració d'LPS induïa un augment en la intensitat mitjana de fluorescència del marcador.

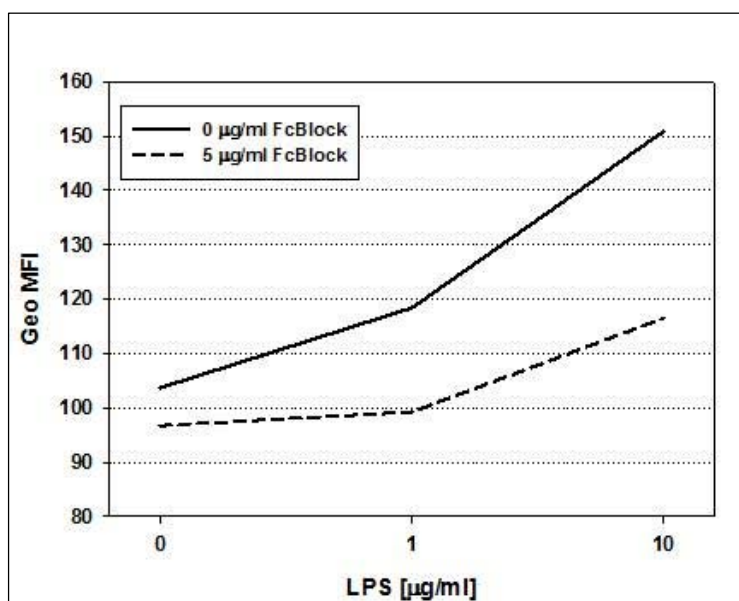
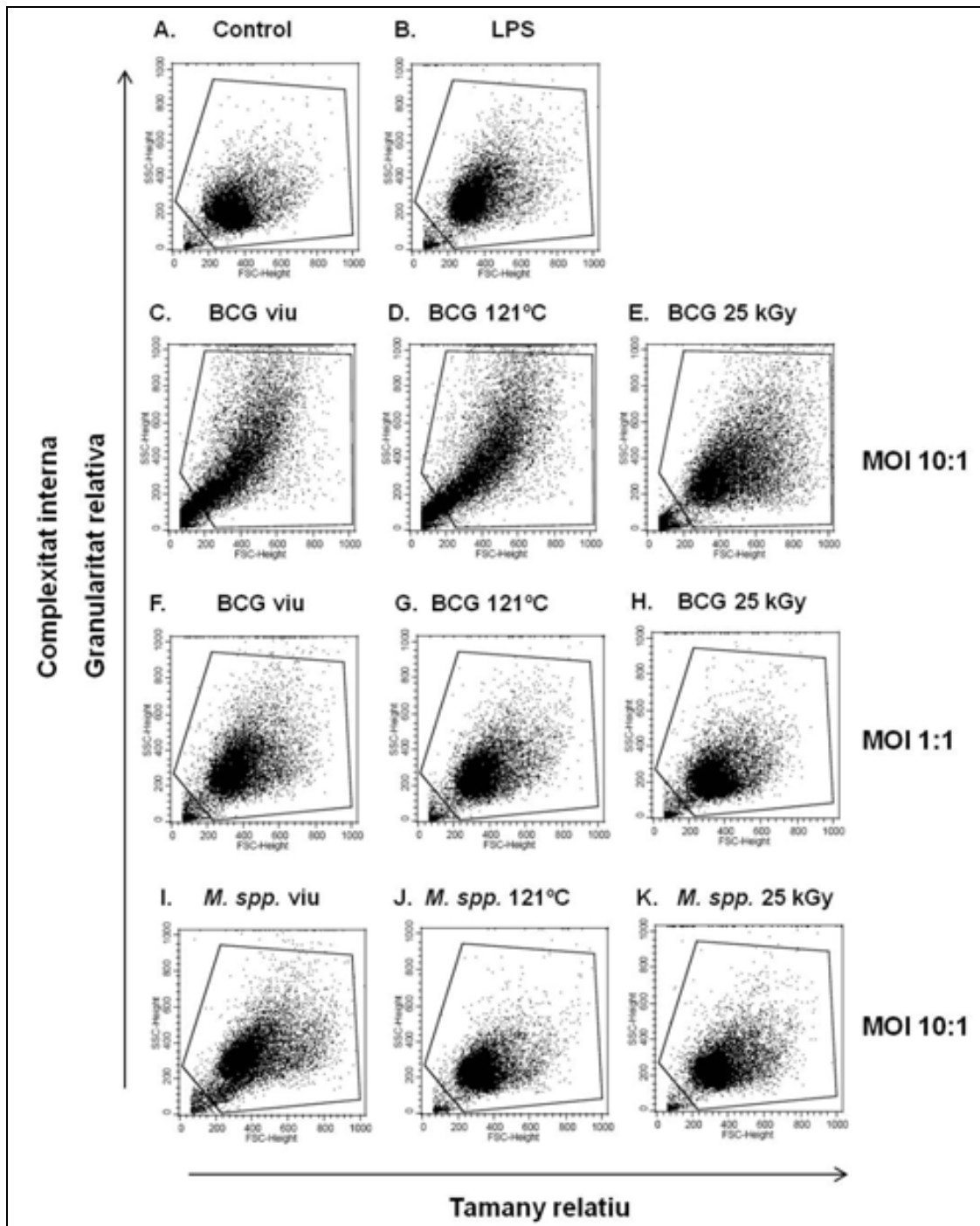


Figura D.40. Activació del marcador de superfície CD86 en els macròfags J774, tractats o no amb el bloquejador FcBlock, i sense estimular o estimulats amb 1 i 10 $\mu\text{g/ml}$ d'LPS durant 24 hores de cultiu

Els resultats estan expressats com la intensitat mitjana de fluorescència (Geo MFI) d'un experiment representatiu de dos realitzats independentment.

A la **figura D.41** es representa, en diagrames de punts, poblacions cel·lulars marcades amb l'anticòs anti-CD80, i es pot observar com amb BCG, viu i mort, a la MOI de 10:1 (**C**, **D** i **E**), la població va augmentar en complexitat interna o granularitat relativa (eix d'ordenades), mentre que la població infectada amb BCG a una MOI de 1:1 (**F**, **G** i **H**) o *M. spp.* a una MOI de 10:1 (**I**, **J** i **K**), es veuen menys distorsionades, molt similars al control negatiu (cèl·lules sense estimular, **A**) i positiu (LPS, **B**). Per aquest motiu, per dur a terme la infecció dels macròfags, es va escollir una MOI de 10:1, excepte en el cas de BCG que va ser de 1:1, ja que, com acabem de veure, a la dosi més elevada la població cel·lular analitzada per citometria canviava molt respecte els controls i la resta de micobacteris.

Figura D.41. Distribució dels macròfags J774, tenyits amb l'anticòs anti-CD80, a les 24 hores de cultiu



Cèl·lules sense estimular (A), estimulades amb LPS (10 µg/ml) (B), infectades amb BCG (C-H), i *M. spp.* (I-K). Els micobacteris es van utilitzar vius (C, F i I), o morts per calor (121°C, 15 minuts) (D, G i J), o irradiació (25 kGy) (E, H i K).

Els histogrames corresponen als d'un experiment representatiu de tres realitzats de manera independent.

Després d'analitzar les cèl·lules tenyides amb els diferents anticossos marcats per tal de detectar l'expressió dels marcadors de superfície d'activació, es van obtenir histogrames com els que es mostren a la **figura D.42**, on es representà el nombre de cèl·lules (eix d'ordenades) i la intensitat de fluorescència (eix d'abcisses). El pic corresponent al control d'isotip indicà la tinció inespecífica i el senyal detectat a partir d'aquest punt es va considerar senyal de fluorescència específica o positiva del marcador en qüestió (regió M1 representada als histogrames). Tal i com es pot observar a la **figura D.42**, les cèl·lules sense estimular van presentar un pic de fluorescència bastant desplaçat cap a la dreta, indicant un elevat nivell basal d'expressió. No obstant, al ser estimulades amb LPS o infectades amb *M. spp.* viu (**Fig. D.42 A i B**), el pic es va desplaçar encara més cap a la dreta, obtenint un major valor d'intensitat de fluorescència, i per tant, una major expressió del marcador. Mentre que amb *M. spp.* mort i *M. gastris* (tant viu com mort), els pics es solaparen indicant que no hi va haver un augment de l'expressió.

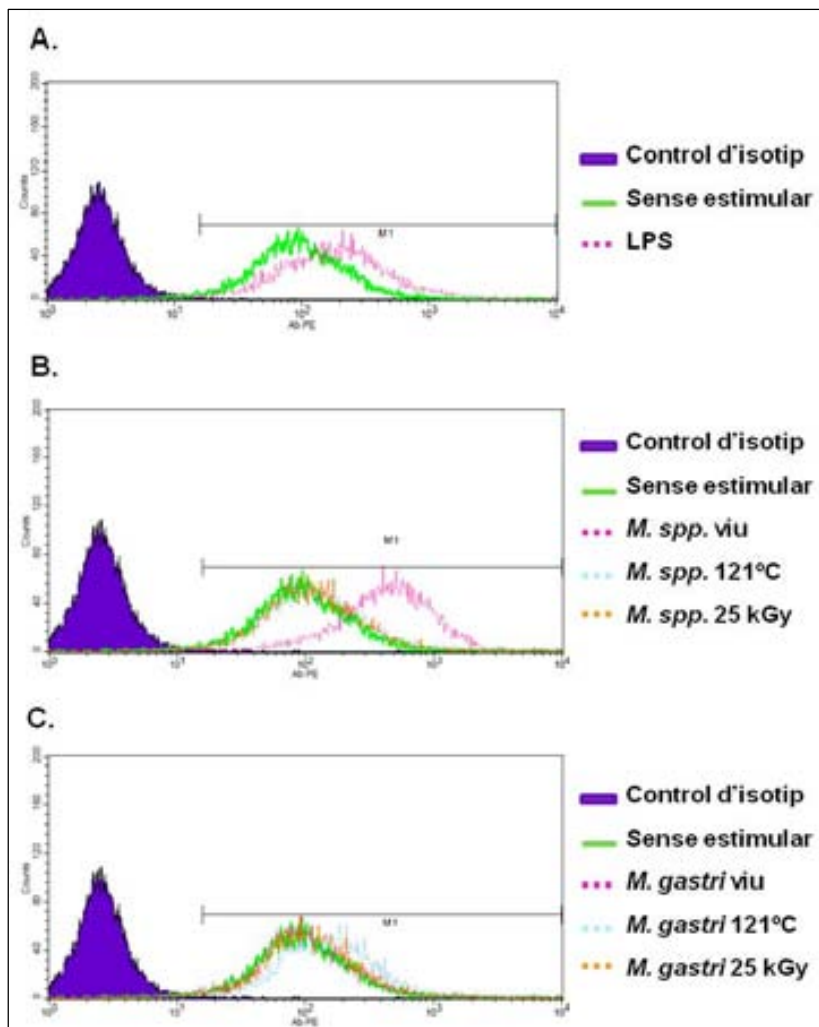


Figura D.42. Activació del marcador de superfície CD86 en els macròfags estimulats amb LPS (10 µg/ml) (A), infectats amb *M. spp.* (B) i *M. gastris* (C)

Els micobacteris es van utilitzar vius, o morts per calor (121°C, 15 minuts), o irradiació (25 kGy), i a una MOI de 10:1, durant 24 hores de cultiu.

Els histogrames corresponen als d'un experiment representatiu de tres realitzats de manera independent.

Per poder avaluar els resultats de manera semi-quantitativa es van escollir els valors numèrics d'intensitat mitjana de fluorescència (la mitjana de la fluorescència de 10000 cèl·lules analitzades) obtinguts amb el citòmetre per a cada histograma. Aquests resultat es van representar en gràfics (**Fig D.43**).

En la **figura D.43** podem observar que els macròfags J774 tenien una expressió basal dels marcadors superficials associats a activació (CD80, CD86 i CD40). Aquesta expressió es va veure incrementada al ser estimulats amb LPS i amb els micobacteris vius (excepte *M. gastrí*) ($p < 0,05$).

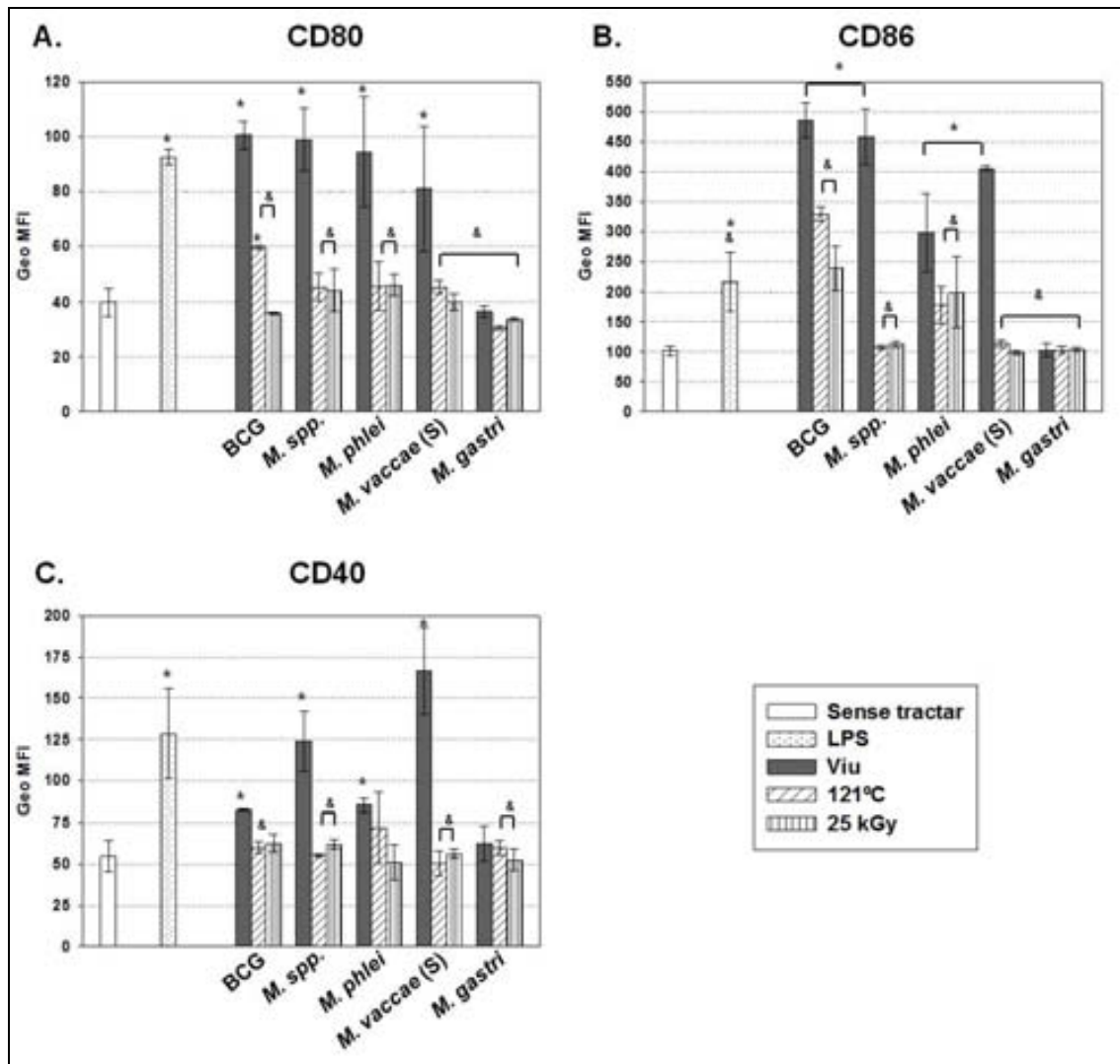
En el cas del marcador CD80 (**Fig D.43 A**), els micobacteris vius utilitzats, excepte *M. gastrí*, van induir uns nivells d'expressió similars a BCG viu ($p > 0,05$) i l'LPS, mentre que la resta van induir valors inferiors i similars al control ($p > 0,05$; excepte BCG mort per calor).

Respecte a l'expressió del marcador CD86 (**Fig D.43 B**), igual que anteriorment, els micobacteris vius, excepte *M. gastrí*, van induir uns nivells similars als obtinguts amb BCG viu ($p < 0,05$) i superiors que a l'LPS. Els nivells obtinguts amb *M. spp.* (mort) i *M. gastrí* (viu i mort) van ser similars als obtinguts amb el control ($p > 0,05$).

Per últim, destacar en la **figura D.43 C**, com els nivells del marcador CD40 induïts per *M. spp.* i *M. vaccae* (S) vius, van ser superiors als induïts per BCG viu. Encara que *M. spp.*, *M. vaccae* (S) i *M. gastrí* morts, i BCG autoclavat van ser els micobacteris que van presentar diferències significatives respecte de BCG viu ($p < 0,05$). Els valors d'expressió obtinguts amb *M. vaccae* (S) van ser inclús superiors als induïts per l'LPS, mentre que els produïts per *M. spp.* van ser similars als de l'LPS. Els micobacteris morts no van ser capaços d'incrementar els nivells d'expressió basal.

En aquest estudi també es va analitzar l'expressió del marcador de superfície MHC-II, però la detecció va ser nul·la en tots els casos.

Figura D.43. Activació dels marcadors de superfície: CD80 (A), CD86 (B) i CD40 (C), dels macròfags J774



Cèl·lules sense estimular (1), estimulades amb LPS (10 µg/ml) (2), infectades amb BCG (3), *M. spp.* (4), *M. phlei* (5), *M. vaccae* (S) (6), i *M. gastri* (7).

Els micobacteris es van utilitzar vius, o morts per calor (121°C, 15 minuts), o irradiació (25 kGy), a una MOI de 1:1 per BCG o de 10:1 per la resta de micobacteris, durant 24 hores de cultiu.

Els resultats estan expressats com el promig de la intensitat mitjana de fluorescència (Geo MFI) ± SD dels cultius de tres experiments independents.

* p < 0,05 vs control (cèl·lules sense estimular)

& p < 0,05 vs BCG viu

Inducció de la producció de citocines i NO

Amb l'objectiu d'estudiar la capacitat dels micobacteris d'induir la producció de citocines i NO en els macròfags J774, aquestes cèl·lules van ser infectades a diferents MOI (0,1; 1, 10 i 100 : 1), i durant diferents temps (3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores), i així determinar les millors condicions per a realitzar aquest estudi. Respecte a les diferents MOI avaluades, entre les dosis més petites no es van veure diferències, i entre les

dues més elevades es van obtenir millors resultats amb la corresponent a 10:1 (dades no mostrades).

A la **figura D.44** es representa la producció de NO per part dels macròfags infectats a una MOI de 10:1 al llarg del temps, i podem observar com *M. spp.* va ser capaç d'induir uns nivells superiors al control i a BCG a partir de les 24 hores de cultiu ($p < 0,05$).

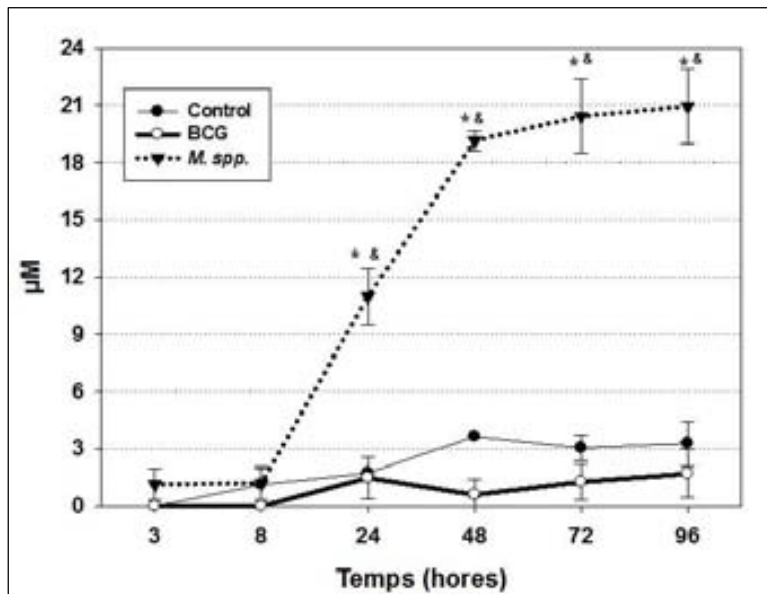


Figura D.44. Producció de NO pels macròfags J774 sense estimular o infectats amb BCG o *M. spp.* (MOI 10:1), a les 3, 8, 24, 48, 72 i 96 hores de cultiu

Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius d'un experiment representatiu de tres realitzats independentment.

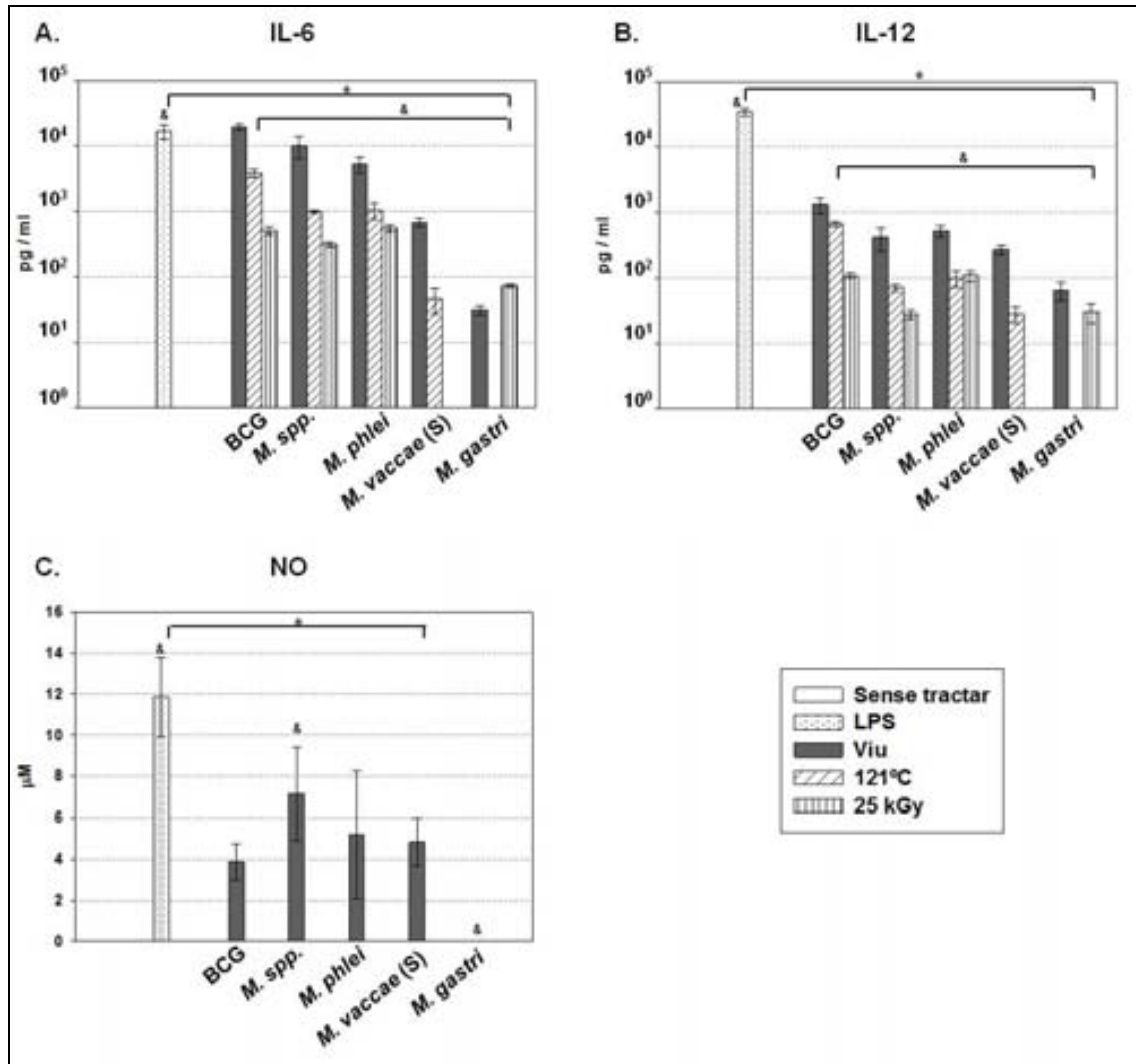
* $p < 0,05$ vs control (cèl·lules sense infectar)
 & $p < 0,05$ vs BCG

En la **figura D.45 A i B**, podem observar com els micobacteris, tant vius com morts, van ser capaços d'induir la producció d'IL-6 i IL-12 ($p < 0,05$ respecte del control), excepte *M. vaccae* (S) irradiat i *M. gastri* autoclavat. Els nivells produïts pels micobacteris de les dues citocines, van ser inferiors als induïts per l'LPS, excepte els valors d'IL-6 produïts per BCG viu, els quals van ser similars (**Fig. D45 A**).

BCG viu va ser el micobacteri que va induir els nivells més elevats de les dues citocines ($p < 0,05$), seguit per *M. spp.* i *M. phlei* vius. En tots els casos (**Fig. D45 A i B**), els valors de les dues citocines van disminuir amb el micobacteris morts (excepte en el cas de *M. gastri* irradiat).

Per una altra banda, la inducció del NO (**Fig. D45 C**), només es va detectar en presència dels micobacteris vius ($p < 0,05$ respecte del control), excepte en el cas de *M. gastri* amb el que no es va detectar cap valor de NO. No obstant, els valors obtinguts amb els micobacteris van ser inferiors als induïts per l'LPS. *M. phlei* i *M. vaccae* (S) van induir un nivells similars a BCG viu ($p > 0,05$).

Figura D.45. Producció d'IL-6 (A), IL-12 (B) i NO (C), pels macròfags J774



Cèl·lules sense estimular (1), estimulades amb LPS (10 µg/ml) (2), infectade amb BCG (3), *M. spp.* (4), *M. phlei* (5), *M. vaccae* (S) (6) i *M. gastri* (7).

Els micobacteris es van utilitzar vius, o morts per calor (121°C, 15 minuts), o irradiació (25 kGy), a una MOI de 1:1 per BCG i de 10:1 per la resta de micobacteris, durant 24 hores.

Els resultats estan expressats com el promig ± SD dels triplicats dels cultius de tres experiments independents.

* p < 0,05 vs control (cèl·lules sense estimular)

& p < 0,05 vs BCG viu

D.2.3.3. Estudi amb macròfags derivats de medul·la òssia (BMM) de ratolins. Implicació dels receptors Toll-like en l'activació (model animal)

D.2.3.3.1. Capacitat d'activació dels BMM. Inducció de la producció de citocines per part dels micobacteris

Per a continuar estudiant la capacitat antitumoral indirecta dels micobacteris escollits, es van utilitzar macròfags, però en aquest cas procedents de la medul·la òssia de ratolins salvatges (WT) i deficients per alguns dels TLR (2 i 4) o MyD88, amb l'objectiu d'estudiar la seva implicació en l'activació d'aquesta resposta.

Tal i com es pot observar a la **taula D.5**, els micobacteris escollits van ser capaços d'induir en els BMM WT la producció de les citocines IL-6, IL-10, IL-12 i TNF- α , i de les quimiocines KC, RANTES i IP-10. Els valors induïts per *M. gastri* van ser molt inferiors comparats amb els induïts pels altres dos micobacteris BCG i *M.spp.*, donant valors similars al control ($p >0,05$) en el cas d'IL-10, IL-12, i IL-6. Però en el cas d'IP-10, els valors produïts per *M. gastri* van ser superiors als de BCG ($p <0,05$). En canvi, *M. spp.* va induir una major producció que BCG de RANTES, i especialment d'IP-10 i IL-12 ($p <0,05$), i una menor producció que BCG d'IL-10 i KC ($p <0,05$).

Taula D.5. Producció d'IL-10, IL-12, TNF- α , IL-6, KC, RANTES i IP-10 (pg/ml) en BMM de ratolins C57BL/6 WT sense infectar (control) i infectats amb els diferents micobacteris

	Control	BCG	<i>M. spp.</i>	<i>M. gastri</i>
IL-10	430 \pm 247	2814 \pm 946*	1848 \pm 22* ^{&}	362 \pm 120 ^{&}
IL-12	594 \pm 19	2043 \pm 681*	12648 \pm 2052* ^{&}	806 \pm 185 ^{&}
TNF-α	93 \pm 14	2633 \pm 390*	1592 \pm 641*	252 \pm 25* ^{&}
IL-6	169 \pm 2	14655 \pm 315*	15991 \pm 1461*	355 \pm 32 ^{&}
KC	372 \pm 18	23432 \pm 1347*	6212 \pm 295* ^{&}	735 \pm 43* ^{&}
RANTES	875 \pm 45	14743 \pm 1588*	57347 \pm 6939* ^{&}	4718 \pm 704* ^{&}
IP-10	233 \pm 21	454 \pm 81*	2491 \pm 163* ^{&}	936 \pm 70* ^{&}

* $p <0,05$ vs control

[&] $p <0,05$ vs BCG

Per a estudiar el paper dels TLR en l'activació del macròfag, es van comparar els valors obtinguts en quant a la producció de citocines, entre els macròfags WT i els macròfags procedents de ratolins deficients per aquests receptors. D'aquesta manera, es va observar (**Taula D.6**) que la producció de les citocines IL-10, IL-12 i TNF- α , induïda per BCG i *M. spp.* va ser dependent del TLR2, ja que els nivells produïts van

disminuir en absència d'aquest receptor. Aquesta inducció també fou depenent, òbviament, de l'adaptador MyD88 (dades no mostrades). En canvi, podem destacar que la dependència de TLR4 per a la inducció d'IL-10 i IL-12 va ser menor; però necessària per a la producció de TNF- α , per part dels tres micobacteris estudiats (dades no mostrades).

Taula D.6. Producció d'IL-10, IL-12 i TNF- α (pg/ml) en BMM de ratolins C57BL/6 WT i deficients pel TLR2, sense estimular (control), i estimulats amb els diferents micobacteris i l'agonista del receptor deficiënt

		WT	TLR2 ^{-/-}
IL-10	Control	430	<10
	BCG	2814	<10
	<i>M. spp.</i>	1848	<10
	<i>M. gastri</i>	362	225
	Pam3	ND	<10
IL-12	Control	594	<10
	BCG	2043	236
	<i>M. spp.</i>	12648	271
	<i>M. gastri</i>	806	12
	Pam3	33901	<10
TNF- α	Control	93	<10
	BCG	2633	688
	<i>M. spp.</i>	1592	<10
	<i>M. gastri</i>	252	<10
	Pam3	4491	<10

<10, valor mínim de detecció del test.

ND, dada no disponible

D.2.3.3.2. Inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals de bufeta de ratolí

Efecte antitumoral directe dels micobacteris en la línia tumoral de càncer de bufeta de ratolí MB49

Amb la finalitat d'analitzar la capacitat citotòxica dels macròfags activats front la línia tumoral MB49, primer vam estudiar la capacitat antitumoral directa dels micobacteris en aquestes cèl·lules tumorals.

En la **figura D.46** podem observar que els tres micobacteris analitzats van ser capaços d'inhibir la proliferació cel·lular de la línia tumoral MB49 de manera temps-dependent. Es va mostrar el nivell màxim a les 72 hores post-infecció, encara que els valors d'inhibició van ser molt diferents, sent d'un $43 \pm 2\%$ i $47 \pm 3\%$ amb BCG i *M.*

spp., respectivament, i d'un $19 \pm 4\%$ amb *M. gastri*. S'ha de destacar que tant *M. spp.* com BCG van ser capaços de produir una inhibició del 30-35% ($p < 0,05$; respecte del control) a partir de las 24 hores de cultiu. Mentre que *M. gastri* no va ser capaç d'inhibir la proliferació cel·lular amb valors estadísticament significatius respecte del control ($p < 0,05$) fins a les 72 hores de cultiu.

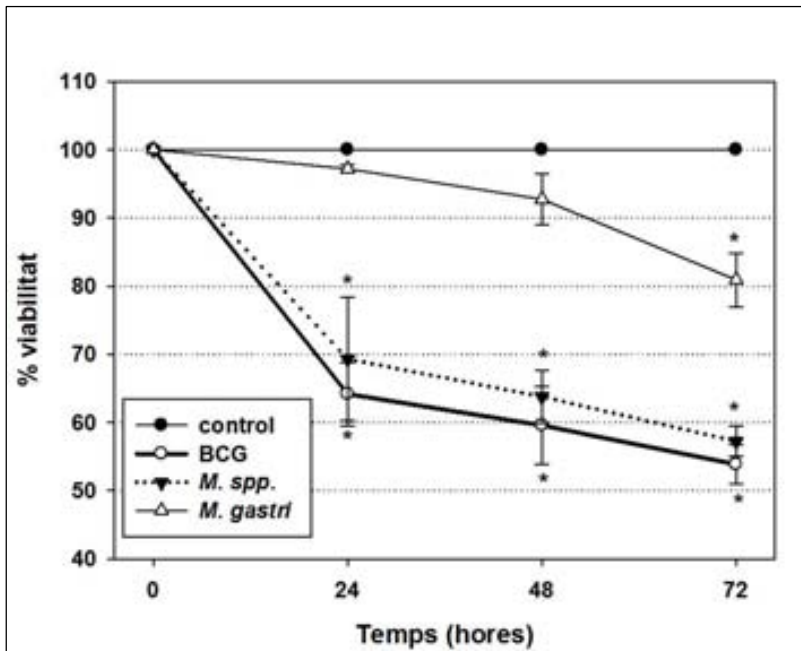


Figura D.46. Inhibició del creixement de la línia tumoral MB49 pels micobacteris a diferents temps post-infecció (MOI 10:1)

Els resultats es mostren com a percentatge de supervivència respecte al control (cèl·lules sense infectar). Cada valor representa el promig \pm SD dels triplicats dels cultius de dos experiments independents.

* $p < 0.05$ vs control

Capacitat d'inducció de la producció de citocines en les cèl·lules tumorals de bufeta de ratolí per part dels micobacteris

A banda d'estudiar la capacitat antitumoral directa per part dels micobacteris, es va analitzar si aquests eren capaços d'induir directament la producció de determinades citocines en la línia tumoral MB49. Tal i com podem observar en la **figura D.47**, tant BCG com *M. spp.*, al contrari de *M. gastri*, van ser capaços d'induir la producció d'IL-6 i KC ($p < 0,05$), encara que BCG induí valors superiors que *M. spp.*, tant d'IL-6 com de KC. La inducció de la producció de les dues citocines per part de *M. spp.* i BCG, va ser temps-dependent.

No es va detectar producció de TNF- α i NO en els cultius analitzats.

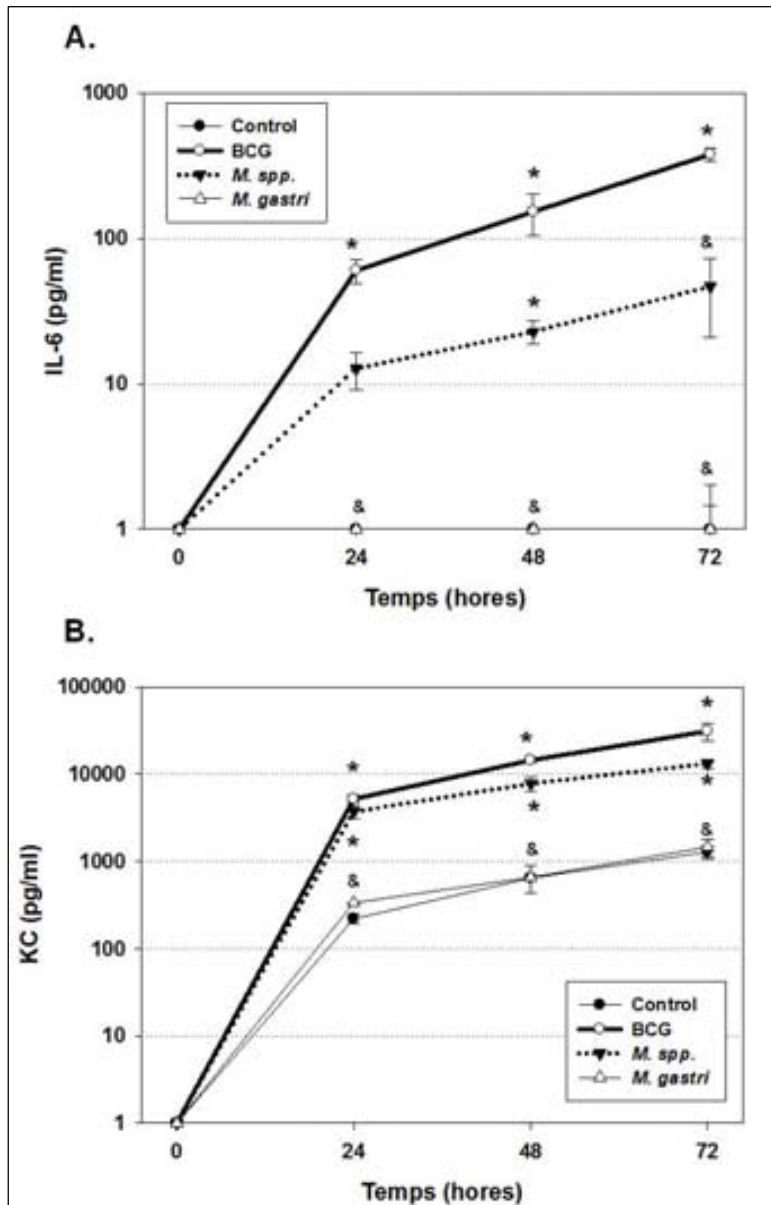


Figura D.47. Producció d'IL6 (A) i KC (B) per la línia tumoral MB49 estimulada amb els diferents micobacteris (MOI 10:1) i sense estimular (control) a diferents temps post-infecció

Els resultats estan expressats com el promig \pm SD dels triplicats dels cultius de dos experiments independents.

* $p < 0,05$ vs control

& $p < 0,05$ vs BCG

D.2.3.3.3. Citotoxicitat dels BMM, activats pels micobacteris, front les cèl·lules tumorals de ratolí

Per a analitzar la capacitat citotòxica dels macròfags derivats de medul·la òssia activats amb els diferents micobacteris, es van cultivar els macròfags juntament amb la línia tumoral MB49.

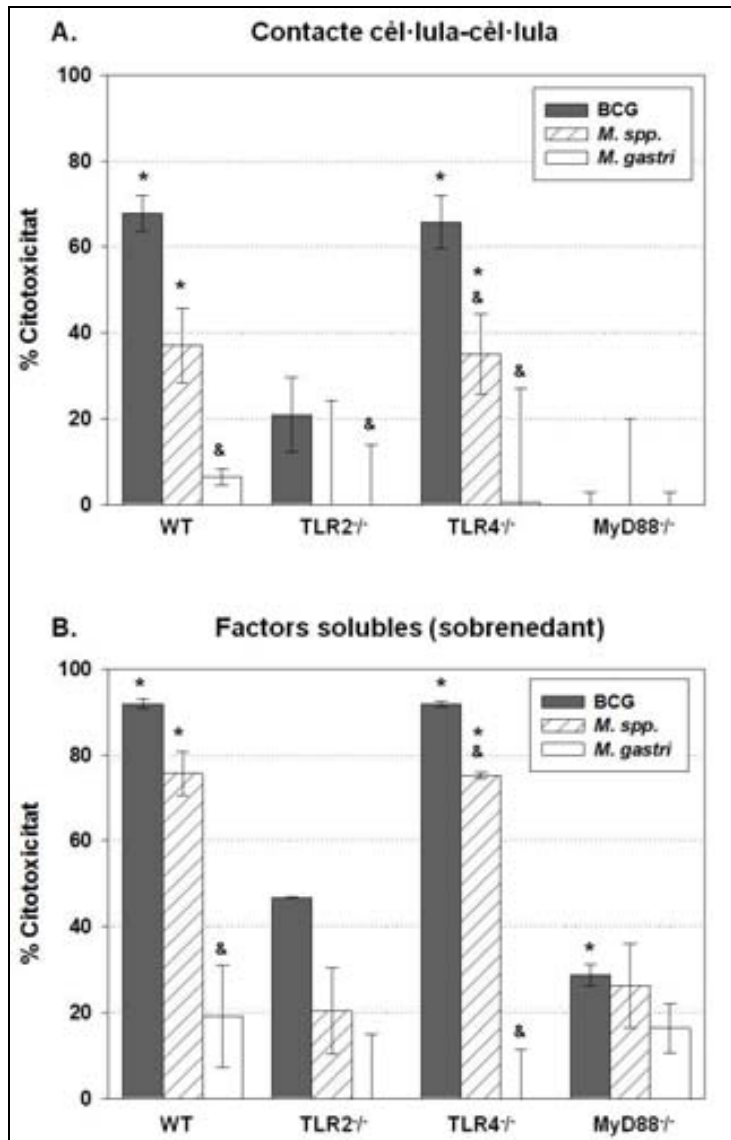
En la **figura D.48 A** podem observar com amb els macròfags WT, tant BCG com *M. spp.*, van ser capaços d'activar la capacitat citotòxica front les cèl·lules tumorals ($p < 0,05$; respecte del control), amb valors d'inhibició corresponents a un $68 \pm 4\%$ amb BCG i a un $37 \pm 9\%$ amb *M. spp.* Pel contrari, els macròfags estimulats amb *M. gastri* no van ser capaços de disminuir la proliferació tumoral.

Per a estudiar la implicació dels TLR en la capacitat citotòxica dels macròfags infectats, vam comparar els valors d'inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals cultivades amb els macròfags WT i amb els macròfags deficients pels receptors TLR2, TLR4 i MyD88. Segons els resultats obtinguts (**Fig D.48 A**), vam poder destacar la necessitat del TLR2 i del MyD88, però no del TLR4, per a estimular la citotoxicitat del macròfag per part de BCG i *M. spp.*

Per una altra banda, es va estudiar la possible activitat antitumoral del sobrenedant dels macròfags activats pels micobacteris. A la **figura D.48 B**, podem observar que els tres micobacteris analitzats van induir, en els macròfags, la secreció de factors solubles amb la capacitat d'inhibir la proliferació de les cèl·lules tumorals. Els valors d'inhibició més elevats ($p < 0,05$; respecte del control) van correspondre als induïts per BCG i *M. spp.* ($92 \pm 1\%$ i $76 \pm 5\%$, respectivament), sent els més baixos els produïts per la inducció amb *M. gastri*.

Aquesta citotoxicitat mediada per factors solubles, igual que la mediada pel contacte cèl·lula-cèl·lula, va ser dependent del TLR2 i MyD88, però no del TLR4, ja que en absència del TLR4 els valors de viabilitat de les cèl·lules MB49 es van mantenir similars als obtinguts amb els macròfags WT.

Figura D.48. Activitat citotòxica induïda pels BMM activats front la línia tumoral MB49, a una proporció de 20:1 (BMM : MB49), després de 24 hores de cultiu (A). Activitat citotòxica induïda pels factors solubles presents al sobrenedant dels BMM activats front la línia tumoral MB49, després de 48 hores de cultiu (B)



Els BMM van ser infectats amb els diferents micobacteris, a una MOI de 10:1, durant 24 hores.

Els resultats estan expressats com el promig ± SD dels triplicats dels cultius de tres experiments independents.

* p <0,05 vs control (BMM sense infectar)

& p <0,05 vs BCG

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Resposta antitumoral directa de les diferents soques de BCG

Actualment, el BCG és l'agent immunoteràpic amb més èxit en el tractament del càncer superficial de bufeta (Gontero, 2010; Babjuk, 2011). Com hem explicat anteriorment a la introducció, avui en dia s'utilitzen diferents soques de BCG, les quals tenen diferents propietats bioquímiques i determinants antigènics (Behr, 2002; Rodriguez-Alvarez, 2009, Hayashi, 2010). En el context de la tuberculosi, hi ha un gran nombre d'estudis que avaluen l'impacte d'aquestes diferències amb l'eficàcia de cada BCG com a vacuna (Liu, 2009).

En el càncer de bufeta també s'estan utilitzant diferents soques de BCG, i possiblement també poden donar lloc a diferents respostes immunològiques en els pacients. No obstant, existeixen molt poques dades que avaluin l'impacte de les diferències entre les soques evolutivament primerenques i tardanes amb la seva capacitat antitumoral *in vitro*. És difícil treure conclusions dels resultats obtinguts en els assajos clínics realitzats fins ara, ja que a banda de que la soca de BCG administrada varia, també ho fa la dosi, el tipus de tumor, la durada del tractament, la quimioteràpia addicional administrada, l'estat clínic del pacient, etc., i aquesta variabilitat podria emascarar diferències en l'eficàcia antitumoral de cada soca de BCG. Per a aquest motiu l'ús de diferents soques de BCG segueix sent un motiu de controvèrsia. Per exemple, en un estudi on es realitzà una meta-anàlisi de la progressió del càncer de bufeta superficial, es va suggerir uns nivells d'eficàcia similars entre les soques Pasteur, Frappier, Connaught i Tice (Sylvester, 2002). Mentre que, en un estudi recent s'ha demostrat que els pacients tractats amb Connaught tenen significativament menys recurrències que els pacients tractats amb Tice (Birkhäuser, 2012).

Per aquests motius, en aquest treball s'ha comparat l'activitat antitumoral directa de vuit soques diferents de BCG (evolutivament primerenques i tardanes), les quals tenen un contingut antigènic (lipídic i glicolipídic) diferent.

Segons els resultats obtinguts en el nostre treball, totes les soques de BCG analitzades van mostrar una activitat antitumoral directa en les tres línies tumorals estudiades. Aquesta activitat anti-proliferativa va ser temps- i MOI-dependent, però cada una de les soques va mostrar un comportament diferent (**Fig. D.6**). Les soques Connaught i Russian van inhibir el creixement de les cèl·lules tumorals T24 i J82 amb valors superiors a la resta, mentre que Glaxo va ser la menys eficaç, inclús en la línia tumoral RT4 (**Fig. D.7**). Com ja hem mencionat a la introducció, actualment, existeixen dos estudis previs que hagin avaluat la capacitat antitumoral directa de diferents soques de BCG. En un d'ells es va comparar una soca primerenca (S4-Jena, provinent de la soca Sweden) amb una tardana (Tice), i es va observar que la primera tenia una capacitat d'inhibir la proliferació de la línia tumoral T24 major que la tardana (Schwarzer, 2010). En l'altre estudi es va avaluar l'activitat citostàtica de cinc soques

diferents de BCG (Pasteur, RIVM (deriva de la Pasteur), Evans (deriva de la Glaxo), Tice i Connaught) totes elles tardanes, en les cèl·lules tumorals T24, i es va observar que Connaught va ser la soca més eficaç (Rajala, 1992). El resultat d'aquest últim estudi concorda amb l'obtingut en el nostre treball. No obstant, nosaltres vam obtenir un nivell d'inhibició de la proliferació cel·lular induït per Connaught inferior al mostrat per Rajala i col·laboradors. Aquesta diferència podria ser deguda a les diferents condicions d'infecció *in vitro*. En els dos estudis previs, després d'infectar el cultiu, el bacil es va deixar en contacte amb les cèl·lules tumorals fins al moment de mesurar la proliferació. En canvi, en el nostre estudi els bacteris extracel·lulars es van descartar, mitjançant rentats del cultiu cel·lular a les tres hores post-infecció, per tal de produir unes condicions el més similars possibles al procediment d'administració *in vivo*, en el qual els bacils romanen a la bufeta del pacient durant 2 hores.

A més, les soques que van inhibir el creixement cel·lular de manera més eficaç van ser les mateixes que van induir una major producció de citocines (IL-6 i IL-8) (**Fig. D.8**). Aquests resultats, els quals concorden amb altres estudis realitzats per altres autors (Zhang, 1997; Miyazaki, 2006), indiquen que les cèl·lules urotelials participen en la producció de citocines induïda pel micobacteri.

Les citocines juguen un paper important en els pacients amb càncer de bufeta superficial tractats amb BCG (Ahirwar, 2011). Concretament, l'IL-6 i IL-8 són crítiques per l'acció de BCG. La producció de la quimiocina IL-8 dona lloc a una infiltració de cèl·lules PMN a la paret de la bufeta limitant l'expansió del bacil i activant la resposta immune del pacient. A més, la presència d'IL-8 en la orina dels pacients que han estat tractats amb BCG s'ha relacionat amb una millor capacitat de resposta immune del pacient i amb un millor pronòstic amb aquest tractament (de Boer, 1997; Shintani, 2007). Per una altra banda, el paper de l'IL-6 en la biologia del càncer depèn del tipus tumoral, donant lloc a diferents efectes, tant positius com negatius per la resposta del pacient (DeMichele, 2003). De totes maneres, particularment en el càncer de bufeta, l'efecte de l'IL-6 com a inductor de la resposta Th2 després de les instil·lacions de BCG, es creu que està limitat per l'elevada producció IFN- γ i l'absència de producció d'IL-4 (Bever, 2004). A més, l'IL-6 és capaç d'incrementar l'expressió del receptor de la fibronectina $\alpha 5\beta 1$, el qual, com ja hem explicat en la introducció, està implicat directament en la unió del BCG a la superfície de l'uroteli (Esvaranathan, 1995; Zhang, 2000).

Els nostres resultats mostren que les cèl·lules de grau 1 de diferenciació RT4, no responen tan bé al tractament amb BCG com les cèl·lules de grau 3 de diferenciació, encara que les condicions d'infecció i cultiu siguin idèntiques. Respecte a aquest fet, s'ha descrit una relació entre l'efecte antitumoral directe de BCG, la producció d'IL-6 i el grau histopatològic del tumor. Les cèl·lules més diferenciades (de grau 1), com la RT4, no internalitzen el BCG i s'ha associat amb la no producció d'IL-6 (Pook, 2007; Bever, 1998). Un altre estudi mostra que la unió del BCG a la cèl·lula tumoral (pas indispensable per la posterior fagocitosis del bacil) és menor en les

cèl·lules més diferenciades que en les menys diferenciades (Schneider, 1994), i aquest fet es va relacionar amb la no presència (o menor) del receptor de la fibronectina $\alpha 5\beta 1$ en les cèl·lules més diferenciades (Kato, 2010). Per una altra banda, estudis que utilitzen anticossos anti-BCG i la citocalasina B, els quals inhibeixen la fagocitosi del bacil, han mostrat que la internalització de BCG és necessària per estimular la síntesi d'IL-6 en les cèl·lules tumorals poc diferenciades, com la T24 (Bevers, 1998). En els nostres experiments, tot i que la inhibició del creixement i la producció d'IL-6 va variar en funció de la soca de BCG analitzada, totes van ser capaces d'internalitzar-se en les cèl·lules T24 i van romandre vives dins de les cèl·lules tumorals amb nivells similars. Per a aquest motiu, a banda de la internalització del bacteri, ha d'haver altres factors involucrats en la inducció de la producció de la IL-6.

La producció de citocines està modulada per antígens bacterians. De fet, diversos components de BCG han estat descrits com a inductors de la citotoxicitat de cèl·lules del sistema immune front les cèl·lules tumorals, sent la paret cel·lular un dels components més actius (Zlotta, 2000 (b); Miyazaki, 2011). Els micobacteris es caracteritzen per tenir un ric contingut en lípids i glicolípidos en la seva paret cel·lular. Entre aquests lípids, els PDIM i PGL s'han relacionat amb la virulència i amb propietats immunomoduladores del bacil. A més, en el context de la tuberculosi, la capacitat de BCG per produir aquests dos lípids s'ha correlacionat amb l'aparició de complicacions en els pacients vacunats (Chen, 2007 (c)). Els antígens lipídics i glicolípidics també estan involucrats en la inducció de NO i citocines en cèl·lules epitelials de pulmó i en macròfags (Hayashi, 2009). Concretament, el DMT és capaç d'incrementar la producció de citocines en macròfags (Dao, 2008; Hayashi, 2009). S'ha mostrat que les soques evolutivament primerenques indueixen una producció de citocines (com l'IL-6 i IL-8) més elevada que les soques tardanes en macròfags (Hayashi, 2009). El DMT, com s'ha descrit a la introducció (apartat A.2.1.2), està format per una molècula de trealosa esterificada amb dos àcids micòlics. El contingut diferent d'àcids micòlics que constitueixen el DMT entre les diferents soques de BCG analitzades, és el que s'ha relacionat amb la diferència en la resposta immune induïda, ja que les soques primerenques produeixen metoxi-micolats, mentre que les tardanes no. De manera similar, el grup fenol de la molècula de PGL pot modificar la producció de citocines en macròfags (Reed, 2004). Per aquests motius, vam suggerir la possibilitat de que aquests antígens podrien estar implicats en la inducció de la producció de citocines en les cèl·lules tumorals de bufeta.

Basant-nos en els nostres resultats, no hem trobat cap associació entre el patró de lípids i glicolípidos de les diferents soques estudiades i la seva activitat antitumoral. Les soques Russian i Connaught tenen un patró d'àcids micòlics diferent i són les dues soques més eficaces com a agents antitumorals en el nostre estudi. A més, les soques Connaught i Phipps, les quals comparteixen el mateix patró de lípids i glicolípidos, mostren una activitat antitumoral molt diferent, ja que la primera és una de les més eficients, mentre que la segona és de les que menys activitat citostàtica ha presentat.

De totes maneres, encara que no s'hagi trobat cap relació entre el perfil dels determinants antigènics analitzats i l'activitat antitumoral observada, aquests lípids i glicolípid podrien estar igualment implicats en la resposta immune induïda pel bacil *in vivo*.

Els nostres resultats *in vitro* suggereixen que la utilització de diferents soques de BCG pot donar lloc a diferents respostes antitumorals, independentment de la seva classificació evolutiva. De totes maneres, són necessaris més estudis per a conèixer l'impacte d'aquestes dades en l'evolució clínica dels pacients tractats amb BCG. La inhibició cel·lular directa i la inducció de la producció de citocines en les cèl·lules tumorals és només un dels mecanismes d'acció del bacil en el càncer de bufeta, ja que tot el sistema immune està implicat en l'efecte de la teràpia amb BCG. Segons els nostres resultats, seria interessant realitzar futurs estudis amb models animals de càncer de bufeta utilitzant les soques de BCG que més eficaçment han funcionat en el nostre treball. És a dir, la soca evolutivament primerenca Russian i la tardana Connaught, ja que han estat les que més han inhibit la proliferació tumoral i induït la producció de citocines, d'entre totes les soques analitzades en aquest treball. Aquests resultats han donat lloc a la publicació d'un article (Secanella-Fandos, 2012, Annex I).

Resposta antitumoral directa dels diferents micobacteris ambientals

En els últims anys, s'ha descrit la capacitat immunoestimuladora i antitumoral de diferents espècies micobacterianes o de diferents extractes derivats seus, però en cap cas s'han obtingut resultats millors als de BCG (apartat A.2.2.1). Aquests estudis ens van suggerir la idea d'escollir i analitzar diferents micobacteris ambientals no patògens, amb la possibilitat de trobar un d'ells capaç d'induir una resposta cel·lular òptima per al tractament del càncer de bufeta superficial. Com hem explicat anteriorment en la discussió, i en la introducció (apartat A.2.2), es coneix la capacitat immunoestimuladora dels lípids i glicolípid presents als micobacteris. No obstant, la composició de cada un d'ells i el seu patró característic en la paret cel·lular depèn de cada espècie micobacteriana. Per una banda, donat que aquest fet pot influir en l'efecte que exerceixen els micobacteris en les cèl·lules eucariotes, es va analitzar el patró de lípids i glicolípid de diferents micobacteris ambientals, per tal d'escollir aquells que presentessin perfils diferents o similars a BCG (**Fig D.13**). D'aquesta manera, es van escollir els micobacteris *M. spp.*, *M. confluentis*, *M. hiberniae* i *M. mageritense*, per què els seu patró lipídic i glicolípidic diferia del que presenta BCG. A més, es va escollir *M. gastri*, ja que és l'únic micobacteri no patògen que presenta PDIMs i PGLs a la seva paret cel·lular de la mateixa manera que BCG (Ortalo-Magné, 1996) (**Fig. D.10-11**). Finalment, també es van escollir les espècies *M. vaccae* i *M. phlei*, ja que han estat utilitzades prèviament per altres autors en estudis de càncer de bufeta (Baran, 2004; Chin, 1996; Morales, 2008).

En l'anàlisi dels àcids micòlics de les espècies escollides per l'estudi, vam observar que corresponien amb els ja descrits per altres autors (Valero-Guillén, 1985; Kazda, 1993; Domenech, 1997), excepte el corresponent al de *M. confluentis*, ja que els nostres resultats indicaren la presència de l'epoxi- en lloc del ceto-micolat descrit per Kirschner i col·laboradors (1992). Per poder confirmar la presència de l'epoxi- o del ceto-micolat hi ha dues possibilitats. Per una banda l'anàlisi per CCF dels extractes saponificats utilitzant el diclormetà com a solvent, ja que els dos micolats presenten mobilitats diferents en aquest sistema (**Fig. D.16**). D'altra banda, l'opció més clara és realitzar paral·lelament una saponificació i una metanòlisi àcida de la paret micobacteriana, i analitzar els extractes en una CCF per tal de comparar els patrons obtinguts (**Fig. D.14-15**). Mitjançant la metanòlisi àcida l'epoxi-micolat es trenca i no es visualitza en una CCF. En canvi el ceto-micolat manté la seva integritat i es pot observar com una única taca a la CCF. Donada la importància del patró d'àcids micòlics per a la descripció de noves espècies i per la seva relació amb el sistema immunitari, és important descriure correctament el seu contingut, i per a això la CCF és una eina molt útil. Els resultats obtinguts en aquest estudi han donat lloc a la publicació d'un article (Secanella-Fandos, 2011, Annex II).

La majoria dels micobacteris escollits van inhibir la proliferació de les cèl·lules tumorals, i ho van fer de manera temps- i MOI-dependent (**Fig. D.18**). Però, aquest efecte va ser diferent segons l'espècie micobacteriana utilitzada i el tipus cel·lular analitzat. *M. spp.* va inhibir les cèl·lules tumorals de grau 3 de diferenciació (T24 i J82) amb nivells similars que BCG o *M. vaccae* (S), però presentà una major activitat antitumoral que BCG i *M. vaccae* (S) en la línia de grau 1 (RT4). En canvi, *M. gastris* va ser el micobacteri que va mostrar una menor capacitat antiproliferativa en les tres línies cel·lulars (**Fig. D.19**).

De la mateixa manera que vam descriure amb les diferents soques de BCG, els micobacteris que van inhibir el creixement cel·lular més eficaçment van ser els mateixos que van induir una major producció de citocines (IL-6 i IL-8) (**Fig. D.21**). Aquests resultats suggereixen una possible correlació directa entre la producció d'IL-6 i IL-8 i la disminució de la viabilitat tumoral. Per tal de demostrar aquest possible efecte, vam afegir IL-6 i IL-8 recombinants humans als cultius de la línia T24. Tal i com hem pogut observar, aquestes dues citocines recombinants són capaces d'inhibir la proliferació cel·lular de la línia T24 de manera concentració-dependent (**Fig. D.28**). A més, aquest efecte es va veure incrementat quan es van afegir conjuntament al cultiu. Estudis anteriors realitzats per altres autors, han mostrat resultats contradictoris sobre l'efecte directe en les cèl·lules tumorals d'aquestes citocines. Per una banda, s'ha descrit un efecte anti-proliferatiu directe de l'IL-6 recombinant en cèl·lules tumorals de bufeta *in vitro* (Revel, 1992), però també s'ha descrit la seva capacitat per incrementar la proliferació tumoral (Okamoto, 1997). D'altra banda, com ja hem explicat anteriorment en la introducció, l'efecte quimioatracient de l'IL-8 està implicat en la resposta immune del pacient front al tractament amb BCG. Però, aquesta citocina

també s'ha descrit com a angiogènica, i s'ha relacionat amb l'increment de la proliferació de cèl·lules tumorals de bufeta *in vitro* i en model animal (Mian, 2003). De totes maneres, els resultats d'aquests autors no descarten la possibilitat de que aquestes dues citocines podrien exercir una activitat antitumoral activant la secreció d'altres proteïnes o activant diferents mecanismes antitumorals que no s'han analitzat.

De totes maneres, l'increment de la producció d'aquests citocines seria només en part responsable de la inhibició cel·lular. En tots els experiments es va utilitzar *E. coli* com a control. *E. coli*, igual que *M. gastri*, no va inhibir la proliferació de cap de les tres línies tumorals, però, a diferència del micobacteri, sí va induir la producció d'IL-6 i IL-8 amb nivells superiors als que les cèl·lules produeixen constitutivament. Els resultats obtinguts amb *E. coli* concorden amb els obtinguts per de Reijke i col·laboradors (1993). Aquests autors van relacionar l'increment de la producció d'IL-6 en la línia T24 amb factors d'*E. coli* secretats al medi, però no amb factors secretats per BCG. A més, *E. coli*, igual que BCG, es pot unir a les cèl·lules tumorals de bufeta, però a diferència de BCG, ho fa de manera no específica (Schneider, 1994). Aquestes dades suggereixen que BCG i *E. coli* s'uneixen a la cèl·lula mitjançant mecanismes diferents i per tant, activant vies cel·lulars diferents, de manera que no es pot descartar la implicació d'altres mecanismes diferents de la producció d'IL-6 en la inhibició de la proliferació antitumoral observada. A més, donada la controvèrsia de les dues citocines analitzades (IL-6 i IL-8), serien necessàries més investigacions per descriure el seu efecte directe beneficiós en les cèl·lules tumorals de bufeta.

Tal i com hem explicat en la introducció (apartat A.1.7), en alguns casos, el tractament dels pacients amb càncer de bufeta superficial comporta una possible infecció per aquest microorganisme. Per a això, la teràpia amb bacils no viables podria suposar un avantatge. A més, es podria disminuir la variabilitat existent entre els tractaments, ja que la dosi de BCG en els vials comercials pot variar d'un a l'altra perquè la concentració del micobacteri no és exacta, si no que correspon a un rang de cfu/ml, i una part dels bacils presents no és viable. Durant aquests anys s'han buscat estratègies diferents a la utilització de BCG viu. D'aquesta manera, s'ha utilitzat BCG mort per calor (Akaza, 1993; Schneider, 1994; Yamada, 2002) o un sonicat de BCG (Thanhäuser, 1993), que no han mostrat ser tant efectius com BCG viu. Altres grups han fet servir extractes de BCG en model animal (Zbar, 1974) o *in vitro* (Kato, 2010), o extractes de *M. phlei* en model animal (Chin, 1996) o en estudis clínics (Morales, 2008), demostrant que l'eficiència dels mateixos depèn de factors com la forma d'administració o d'emulsionar els extractes, fet que determina que siguin o no fagocitats per les cèl·lules incrementant la seva eficàcia (Morales, 2001). No obstant, la utilització dels extractes fins el moment no ha aconseguit igualar l'eficàcia de BCG viu. Per aquest motiu es va suggerir estudiar la capacitat antitumoral directa dels micobacteris ambientals morts mitjançant diferents tipus de tractament per calor o radiació.

Els micobacteris no viables (sotmesos als tractaments de radiació gamma, escalfor a 80°C i 120°C) van ser capaços d'afectar la viabilitat de les línies tumorals (**Fig D. 23**). De la mateixa manera, vam observar que *M. spp.* mort, va ser capaç d'aconseguir valors d'inhibició de la proliferació de la línia tumoral RT4 inclús superiors als obtinguts amb BCG. D'aquesta manera es demostra que *M. spp.* mort es comporta de manera similar que viu. En canvi, els tractaments de radiació amb llum UV i escalfor a 60°C durant 30 minuts, no van reduir completament el nombre de bacteris viables, de manera que aquests dos tractaments no descartarien la possibilitat d'una infecció posterior (**Taula D.2**).

Encara que es va observar una inhibició de la proliferació en tots els casos (excepte amb *M. gastri* i els controls negatius), la inducció de la producció de citocines va variar en funció del tractament sotmès al bacteri i de la línia tumoral analitzada (**Fig D.25**). En la línia T24, BCG i *M. spp.* tractats amb radiació gamma, van induir nivells de citocines similars als seus respectius vius. De fet, dos estudis previs van mostrar que la inactivació de BCG per radiació gamma preservava el seu benefici immunoteràpic en model animal, però no el millorava respecte del bacil viu (Baldwin, 1974; Kreider, 1980). Les dades d'aquests treballs amb BCG concorden amb les nostres. En canvi, amb les condicions d'escalfor més agressives (80°C i 121°C), el nivell de citocines va disminuir significativament en les tres línies cel·lulars. Aquest comportament suggereix que els antígens implicats en la inducció de la producció de citocines per part del micobacteri, poden ser estructurals. A més, el fet de que no sigui necessari que el micobacteri estigui viu podria indicar la no implicació d'antígens secretats activament pel micobacteri, fet concordant amb el resultat mostrat amb BCG en el treball de de Reijke i col·laboradors (1993). Per una altra banda, podríem suggerir que aquests antígens implicats serien termosensibles, de manera que es modificarien al ser sotmesos als tractaments d'escalfor més agressius, i per tant, perdrien la seva funció estimuladora.

Amb l'objectiu de millorar l'eficàcia de la teràpia intravesical del càncer de bufeta, hem assajat la capacitat antitumoral directa dels micobacteris escollits juntament amb el quimioteràpic MMC. La inhibició de la proliferació cel·lular observada amb els micobacteris, tant vius com morts per calor o irradiació, es va veure incrementada en combinació amb la MMC en les tres línies tumorals analitzades (**Fig. D.27**). La sinèrgia obtinguda amb *M. spp.*, tant viu com mort, va ser similar a la de BCG, i inclús superior en la línia RT4. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Rajala i col·laboradors (1992), els quals van descriure que la MMC és capaç de potenciar l'efecte citostàtic de BCG *in vitro*. No obstant, Bailemans i col·laboradors (1994), van mostrar que la MMC no incrementava l'efecte antitumoral de BCG en model animal, però van suggerir que els seus mecanismes d'acció diferents es podrien complementar i així incrementar l'activitat antitumoral. Un altre estudi va demostrar que la MMC podria inhibir el creixement de BCG *in vitro* (Mitsogiannis, 2006), però sense la necessitat de comprometre la seva activitat antitumoral, ja que la inhibició del

creixement del bacil no implica la seva mort. De totes maneres, com hem mencionat anteriorment, la mort del bacil no afectaria a la seva capacitat per inhibir el creixement tumoral. No obstant, respecte a aquesta sinèrgia, només en la línia J82 es va observar un increment de la producció de les citocines superior al induït pel micobacteri sol (**Taula D.3**). En les altres dos línies tumorals, la producció de les citocines va ser superior amb el micobacteri sol. La sinèrgia entre *M. spp.* i la MMC mostrada en aquest estudi podria indicar una estratègia per a incrementar l'eficàcia del tractament immunoteràpic amb el micobacteri. Per aquest motiu, farien falta més estudis, especialment amb *M. spp.*, ja que és capaç de potenciar l'efecte antitumoral de la MMC en les cèl·lules tumorals de bufeta.

Trenta-sis anys després de l'administració de BCG en el tractament del càncer de bufeta superficial, es desconeix amb exactitud els mecanismes amb els que actua com a agent antitumoral. La disminució de la proliferació de les cèl·lules tumorals que hem observat amb els diferents micobacteris, podria ser deguda a la mort cel·lular induïda.

Les nostres dades indiquen que tant BCG com la resta dels micobacteris analitzats exerceixen la seva acció inhibidòria del creixement tumoral mitjançant un mecanisme diferent a l'apoptosi. El nostre resultat obtingut amb BCG coincideix amb el d'altres autors. S'ha descrit que BCG pot inhibir el mecanisme de l'apoptosi (Chen, 2007 (b)), i hi ha treballs que manifesten que la seva activitat antitumoral directa es deu a altres mecanismes diferents a l'apoptosi (Sasaki, 1997; Fontana, 1999), entre els quals s'ha suggerit la necrosi (Seow, 2002; DiPaola, 2007; See, 2009). De totes maneres, en els experiments de citometria de flux del nostre treball, no vam observar que hi hagués inducció de la necrosi (**Fig. D.29**). No obstant, seria interessant realitzar altres tipus d'experiments per tal de confirmar la inducció o no d'aquest mecanisme. De fet, la inducció o no de l'apoptosi és un tema molt discutit en la bibliografia, ja que contràriament als resultats que acabem de mencionar, diferents autors han descrit la capacitat directa de BCG per induir la mort de les cèl·lules tumorals de bufeta mitjançant l'activació de l'apoptosi *in vitro* (Saitoh, 2002; Sandes, 2007; Ping, 2010; Schwarzer, 2010). De la mateixa manera, també s'ha demostrat la capacitat del complex MCC per activar l'apoptosi (Filion, 1999).

Per una altra banda, segons els nostres resultats, BCG viu i autoclavat es comporta de manera diferent a la resta de micobacteris, incloent *M. spp.*, i condicions analitzades. BCG viu i autoclavat indueix un arrest cel·lular en la fase S, mentre que la resta ho fa en la fase G0-G1 (**Fig. D.34**). Diferents autors han demostrat que l'acció antitumoral directa de BCG és deguda a la seva capacitat per induir l'arrest cel·lular de les cèl·lules tumorals *in vitro* en la fase G0-G1 (Chen, 2005; See, 2009). La diferència entre els resultats publicats pels altres autors i els nostres, pot ser deguda a les condicions diferents entre els experiments (dosi, temps, etc.) o a la utilització de soques de BCG diferents. *M. spp.* i BCG, els quals inhibeixen la proliferació de la línia

tumoral T24 amb valors similars, actuen de manera diferent per dur a terme la seva activitat antitumoral.

Resposta antitumoral directa dels diferents micobacteris ambientals

Amb l'objectiu d'analitzar l'efecte immunestimulador dels micobacteris escollits, es va estudiar l'impacte dels diferents micobacteris en tres tipus cel·lulars diferents: la línia de macròfags murins J774, les PBMC i els BMM.

Respecte a la capacitat d'activar les cèl·lules presentadores d'antigen, tant BCG com *M. spp.*, van induir la producció de citocines proinflamatòries (IL-6 i IL-12) en la línia de macròfags murins J774. A més, *M. spp.* va induir uns nivells d'IL-12 superiors a BCG (**Fig. D.45**). Aquesta citocina és clau en la immunoteràpia del càncer de bufeta (O'Donnell, 2004; Zaharoff, 2009). Per una altra banda, només els micobacteris vius van ser capaços d'induir la producció de NO, sent els nivells induïts per *M. spp.* superiors als de BCG (**Fig. D.44**). La producció de NO per macròfags estimulats amb BCG *in vitro* ja ha estat mostrada per altres autors, i s'ha demostrat la seva activitat citotòxica front les cèl·lules tumorals de bufeta (Yamada, 2002; Luo, 2010). També, es va observar que el nivell d'expressió de determinats marcadors superficials associats a activació cel·lular (CD80, CD86 i CD40) va incrementar després de que els macròfags fossin infectats amb els micobacteris, excepte amb *M. gastri* (**Fig. D.43**). Els nivells d'expressió dels marcadors CD80 i CD86 dels macròfags estimulats amb *M. spp.* van ser similars als de BCG. En canvi, el nivell d'expressió del CD40 amb *M. spp.* va ser superior. El CD80 i CD86 són molècules co-estimuladores necessàries per a l'activació de cèl·lules T, i el CD40 és una proteïna co-estimuladora requerida per l'activació del propi macròfag. De manera que *M. spp.* és capaç d'activar els macròfags, els quals activaran posteriorment les cèl·lules T. Degut a que es van obtenir millors resultats amb els micobacteris vius que morts per irradiació o per autoclau, sembla que per donar lloc a una completa activació del macròfag és necessari que el micobacteri estigui viu.

Referent a les PBMC estimulades amb els micobacteris, es va observar un increment en la producció d'IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α i IFN- γ . A més, *M. spp.* va induir uns nivells d'IL-8, IL-12 i TNF- α similars als induïts per BCG, però majors als induïts per *M. phlei* (tant TNF- α i IL-12 como IFN- γ). En el cas de l'IL-6 els nivells induïts per *M. spp.* van ser superiors als de BCG (**Fig. D.35**).

Posteriorment, es va observar que *M. spp.*, igual que BCG, també era capaç d'activar els BMM, ja que va induir la producció de les quimiocines KC, RANTES i IP-10, obtenint valors superiors a BCG en el cas de RANTES i IP-10 (**Taula D.5**). Les quimiocines juguen un paper important en la regulació de la resposta front l'estimulació inflamatòria, ja que són responsables d'atraure i activar monòcits i macròfags, limfòcits, cèl·lules PMN, cèl·lules NK, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T. La capacitat de BCG per induir la producció de quimiocines ha estat descrita per diferents autors

(Suttman, 2006; Luo, 2007), i la presència d'aquestes molècules en la orina de pacients amb càncer de bufeta ha estat relacionada amb una resposta favorable del pacient en el tractament amb BCG (Poppas, 1998; Thalman, 2000; Reale, 2002). A més, l'IP-10 s'ha descrit que té activitat anti-angiogènica (Strieter, 1995; Rosenkilde, 2004). Com hem observat anteriorment, *M. spp.* va induir una expressió del marcador CD40 en els macròfags J774 superior a la de BCG, i en un estudi s'ha relacionat l'estimulació del CD40 amb la producció de RANTES en monòcits (Méndez-Samperio, 2003). Aquest fet coincideix amb els nostres resultats, ja que *M. spp.* va induir uns nivells majors de RANTES que BCG en els BMM. Per una altra banda, *M. spp.* va induir una major producció d'IL-12 i una menor producció d'IL-10 que BCG (**Taula D.5**). D'aquesta manera, podem suggerir que *M. spp.* és capaç d'induir una resposta Th1 més elevada, la qual està associada amb pacients que responen favorablement a la immunoteràpia amb BCG (Saint, 2002; Riemensberger, 2002). El fet que *M. spp.* induïxi nivells més elevats d'IL-12 i IP-10 que BCG, fa suggerir que aquest micobacteri podria ser un potent candidat com agent antitumoral.

Després d'observar la capacitat de *M. spp.* per estimular les cèl·lules del sistema immunitari, vam procedir a avaluar la capacitat citotòxica d'aquestes cèl·lules activades.

Les PBMC no estimulades van presentar activitat citotòxica front les cèl·lules tumorals (**Fig. D.36**). Aquesta activitat basal ha estat atribuïda la seva activitat natural de cèl·lula NK (Liu, 2009). No obstant, les PBMC estimulades amb els micobacteris van presentar un increment en el seu efecte citotòxic front les cèl·lules tumorals. A banda d'aquesta capacitat citotòxica directa, només BCG i *M. spp.* van ser capaços de secretar al medi factors citotòxics. Entre els possibles factors citotòxics secretats, es podrien trobar les citocines induïdes pels micobacteris (Pryor, 1995). En general, els micobacteris morts van mantenir la capacitat d'induir una activitat citotòxica directa i indirecta en les PBMC, però menor que els micobacteris vius.

Per tal d'estudiar l'activitat citotòxica dels BMM activats pels micobacteris, primer es va analitzar si els microorganismes tenien un efecte directe sobre les cèl·lules tumorals de ratolí. *M. spp.* es va comportar de la mateixa manera que en la línia tumoral humana T24, ja que va mostrar una capacitat antitumoral directa de manera similar a BCG (**Fig. D.46**), i a més, va induir la producció d'IL-6 i KC (IL-8 de ratolí) (**Fig. D.47**).

Posteriorment, es va estudiar la capacitat citotòxica dels BMM activats. Els resultats indiquen que els BMM activats per *M. spp.* es converteixen en cèl·lules efectores citotòxiques front les cèl·lules tumorals (**Fig. D.48**). Estudis previs havien demostrat aquesta activitat citotòxica de macròfags activats per BCG (Pryor, 1995; Luo, 2006). A més, hem demostrat que a més de la citotoxicitat mediada pel contacte cèl·lula-cèl·lula, el sobrenedant dels macròfags activats per *M. spp.* també exerceix una inhibició de la proliferació tumoral. Aquesta activitat coincideix amb l'observada

anteriorment amb les PBMC humanes. Per tant, de la mateixa manera que vam suggerir amb les PBMC, les citocines produïdes pels macròfags activats pel micobacteri, podrien formar part dels factors solubles citotòxics secretats al sobrenedant dels cultius (Luo, 2010; Liu, 2011).

Finalment, analitzant els BMM deficients per TLR2, TLR4 i MyD88, hem pogut demostrar que *M. spp.*, igual que BCG, depèn del TLR2 i del MyD88 per dur a terme l'activació del macròfag i la inducció de la producció de citocines. Per contra, hem observat que aquesta activació depèn en menor mesura del TLR4 (**Taula D.6**). En els últims anys s'ha descrit la implicació dels TLR2 i TLR4 en el reconeixement de diferents antígens de la paret cel·lular dels micobacteris (Tsuji, 2000; Uehori, 2003). Aquesta interacció micobacteri-receptor activa, a través de l'adaptador MyD88, cascades de senyals intracel·lulars que impliquen l'activació del factor de transcripció nuclear factor- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) i la conseqüent producció de citocines. En el cas del TLR4, pot activar una cascada de senyals independent a MyD88 (Akira, 2004, Akazawa, 2004). Els nostres resultats concorden amb el treball realitzat per Murata, 2008; on es demostrà que l'activació del macròfag per part d'un extracte de la paret cel·lular de BCG, era dependent del TLR2 i MyD88 i independent del TLR4. En un altre estudi, demostraren també que el TLR2, però no el TLR4, estava implicat en la inducció de la producció de citocines pro-inflamatòries en macròfags per part de *M. abscessus* (Shin, 2008 (b)). De la mateixa manera, la inducció de la citotoxicitat del macròfag activat pels micobacteris, tant *M. spp.* com BCG, front les cèl·lules tumorals ha estat dependent del TLR2 i MyD88, però no del TLR4 (**Fig. D.48**).

Patogenicitat de *M.spp.*

Tal i com s'ha explicat anteriorment, *M. spp.* no és patògen. A diferència de BCG i de la resta de micobacteris (excepte *M. vaccae*), *M. spp.* no va sobreviure ni en les cèl·lules tumorals (**Fig. D.22**) ni en els macròfags (**Fig. D.39**). S'ha de destacar que en els nostres experiments s'han obtingut millors resultats amb *M. spp.* que amb *M. vaccae* i *M. phlei*, tots dos utilitzats per altres autors com a immunoteràpics en estudis previs (descrits anteriorment). A més, cal mencionar que no s'ha descrit en la bibliografia cap infecció en humans o animals causada per *M. spp.*, considerant-se un micobacteri de nivell de bioseguretat 1 en totes les col·leccions internacionals. En canvi, *M. phlei* ha estat descrit com a causant de diferents casos d'infecció en humans (Khatteer, 2008; Paul, 1998; Cage, 1997; Aguilar, 1989). I també s'han descrit casos d'infecció en humans amb *M. vaccae* (Khatteer, 2008; Hachem, 1996). De la mateixa manera, BCG és una soca atenuada considerada de nivell de risc biològic 2.

Per tant, es pot concloure que en aquest treball s'ha identificat un micobacteri ambiental, no patògen, capaç d'inhibir la proliferació de cèl·lules tumorals de càncer de bufeta, millorant inclús l'activitat que presenta BCG en les línies tumorals de grau 1. A

més, aquest micobacteri promou una activitat citotòxica en el sistema immune front les cèl·lules tumorals. Així, *M. spp.*, al tractar-se d'un micobacteri inòcua per a l'home és una alternativa millorada a BCG en la teràpia antineoplàstica.

D'altra banda, també s'ha de destacar que és un micobacteri de creixement ràpid. *In vitro* creix quatre vegades més ràpid que BCG; i a més, ho fa en medis de cultiu més econòmics, de manera que la seva producció a gran escala seria més ràpida i econòmica que la de BCG. A més, el fet que *M. spp.* sigui de nivell de bioseguretat 1 també és interessant a l'hora de considerar-lo com a possible substitut de BCG, ja que la seva manipulació al laboratori no requereix d'un laboratori de nivell de seguretat 2 com en el cas de BCG.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El patró d'àcids micòlics de la paret cel·lular de *Mycobacterium confluentis* està constituït per l' α -micolat (tipus I) i l'epoxi-micolat (tipus V).
2. Les soques de *Mycobacterium bovis* BCG Russian (evolutivament primerenca) i Connaught (evolutivament tardana) són les més eficaces, d'entre les diferents soques analitzades de BCG, en inhibir la proliferació cel·lular i induir la producció de citocines en línies tumorals de càncer de bufeta. No hi ha correlació entre el patró evolutiu de les diferents soques de BCG i la seva activitat antitumoral directa.
3. Només alguns micobacteris ambientals tenen capacitat antitumoral. D'entre tots els micobacteris avaluats, *Mycobacterium spp.* és el que presenta major activitat antitumoral. *M. spp.* és capaç d'inhibir les cèl·lules tumorals de grau 3 de diferenciació, T24 i J82, a nivells similars als de BCG Connaught, i d'inhibir a nivells superiors que BCG la línia RT4 de grau 1 de diferenciació.
4. Els micobacteris que inhibeixen el creixement de les cèl·lules tumorals de càncer de bufeta més eficaçment són els mateixos que indueixen una major producció de citocines IL-6 i IL-8. Aquestes dues citocines estarien parcialment implicades en la inhibició de la proliferació tumoral.
5. Els micobacteris ambientals amb capacitat antitumoral directa la mantenen encara que no siguin viables, tot i que la seva capacitat d'induir la producció de citocines es veu disminuïda. Els micobacteris ambientals amb capacitat antitumoral sotmesos a radiació gamma es comporten de manera més similar als micobacteris vius que els sotmesos a altres tractaments.
6. *M. spp.*, tant viu com mort, junt amb mitomicina C, mostra una activitat antitumoral directa sinèrgica similar a la de BCG amb mitomicina C en les línies T24 i J82, i inclús superior en la línia RT4.
7. Tant BCG com la resta dels micobacteris estudiats, entre ells *M. spp.*, exerceixen la seva acció inhibidòria de la proliferació tumoral mitjançant un mecanisme diferent de l'apoptosi i la necrosi. BCG, tant viu com autoclavat, indueix un arrest cel·lular en la fase S, mentre que la resta de micobacteris en totes les condicions analitzades ho fan en la fase G0-G1.
8. *M. spp.* és capaç d'activar els macròfags J774. Incrementa l'expressió dels marcadors CD80 i CD86 a nivells similars que BCG, i superiors a aquest en quant a l'expressió del marcador CD40. A més, *M. spp.* indueix la producció de citocines proinflamatòries en la línia J774. Els nivells d'IL-12 obtinguts per l'activació amb *M. spp.* són superiors als obtinguts per BCG.

9. *M. spp.*, a l'igual que BCG, és capaç d'activar les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica humanes (PBMC) i els macròfags derivats de medul·la òssia (BMM) de ratolí. *M. spp.* indueix la producció nivells més elevats d'IL-12, RANTES i IP-10 que BCG.
10. *M. spp.*, a l'igual que BCG, és capaç d'induir una capacitat citotòxica directa, i la secreció al medi de cultiu de factors citotòxics, per part de les PBMC i dels BMM activats.
11. Tant per a donar lloc a una completa activació del macròfag, com per a induir una activitat citotòxica directa i indirecta en les PBMC i els BMM, és necessari que el micobacteri estigui viu.
12. *M. spp.*, a l'igual que BCG, depèn del TLR2 i del MyD88, i en menor mesura del TLR4, per dur a terme l'activació del macròfag i la inducció de la producció de citocines. Així mateix, la inducció de la citotoxicitat del macròfag activat per *M. spp.* i BCG, front les cèl·lules tumorals, és dependent del TLR2 i del MyD88, però no del TLR4.
13. *M. spp.*, a diferència de BCG, no és capaç de sobreviure en les cèl·lules tumorals de càncer de bufeta ni en els macròfags J774 al llarg del temps.

CONCLUSIONS

1. The profile of mycolic acids from *Mycobacterium confluentis* contains α -mycolates (type I) and epox-y-mycolates (type V mycolic acids).
2. *Mycobacterium bovis* BCG Russian (evolutionarily early) and Connaught (evolutionarily late) substrains are the most efficacious, among the different substrains analyzed, in inhibiting tumoral growth and inducing cytokines production in bladder cancer cell lines. No correlation between the evolutionarily pattern of the different BCG substrains and their direct antitumor activity was found.
3. Only some micobacteria have antitumoral ability. Among all the micobacteria avaluated, *Mycobacterium* spp. shows the highest antitumoral activity. *M. spp.* is able to inhibit cell proliferation of grade 3 bladder cancer cells, T24 and J82, to a similar extend than BCG; showing even higher levels of cell growth inhibition than BCG in grade 1 cell line RT4.
4. Mycobacteria that induced greater inhibition of proliferation also induced higher production of IL-6 and IL-8 cytokines. These two cytokines are partially involved in the inhibition of tumor proliferation.
5. Non viable mycobacteria retains its ability to inhibit tumor cell proliferation, although their ability to induce cytokine production is partially reduced. Gamma-irradiated mycobacteria behave closer to their respective untreated mycobacteria than mycobacteria subjected to other treatments.
6. *M. spp.*, live or dead, together with mitomicin C, show a synergic direct antitumor activity, similar to that of BCG with mitomicin C in in T24 and J82 cell lines, and even higher than BCG with mitomicin C in RT4 cell line.
7. BCG and the environmental mycobacteria studied, including *M. spp.*, inhibit tumor proliferation by means of a different mechanism from apoptosis or necrosis. BCG, both live and autoclaved, induces S-phase cell cycle arrest, while the other mycobacteria and conditions analyzed induce cell cycle arrest at G0-G1 phase.
8. *M. spp.* is able to activate J774 macrophages. *M. spp.* increases the expression of CD80 and CD86 markers to similar levels than BCG, and over BCG-induced CD40 expression levels. *M. spp.* also triggers proinflammatory cytokines production. *M. spp.*-induced IL-12 levels are superior to those obtained by BCG-induced activation.
9. *M. spp.*, like BCG, is capable of activating human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow derived macrophages (BMM) from mice. *M. spp.*-induced IL-12, RANTES, and IP-10 levels are higher than those triggered by BCG.

10. *M. spp.*, like BCG, is capable of inducing direct cytotoxic capacity and also the release of cytotoxic factors from *M. spp.*-infected PBMC or BMM.
11. Live mycobacteria is necessary for entire macrophage activation and for the induction of a direct and indirect cytotoxic activity in PBMC and BMM.
12. *M. spp.*, like BCG, depends on TLR2 and MyD88, and to a lesser extent on TLR4, to carry out the activation of macrophages and the induction of cytokine production. Furthermore, the cytotoxicity induced by *M. spp.*- or BCG-activated macrophages against tumor cells is dependent on TLR2 and MyD88, but not on TLR4.
13. *M. spp.*, unlike BCG, do not survive inside tumor cells nor J774 macrophages over time.

PERSPECTIVES DE FUTUR

PERSPECTIVES DE FUTUR

Per una banda, tal i com hem explicat, donat que tot el sistema immunitari està implicat en l'efecte de la teràpia amb BCG, seria necessari realitzar més estudis per tal de conèixer l'impacte de les dades obtingudes, en l'estudi de les diferents soques de BCG, en els pacients tractats amb BCG. D'aquesta manera, seria de gran interès avaluar en model animal de càncer de bufeta les dues soques de BCG que han mostrat millors resultats en el nostre estudi, és a dir, la Connaught i la Russian, i comparar-les amb la que ha mostrat pitjors resultats (Glaxo). També seria interessant poder aprofundir en les característiques compartides per aquestes dues soques o en les que les diferencien de la resta, i per tant els hi confereixen una capacitat antitumoral més eficaç que la resta de soques avaluades.

Per una altra banda, la resposta antitumoral directa mostrada per *M. spp.*, així com la seva capacitat d'activar cèl·lules presentadores d'antigen, suggereixen que aquest micobacteri pot ser un candidat per al tractament immunoteràpic del càncer de bufeta superficial. Per a aquest motiu, seria de gran interès realitzar estudis amb model animal de càncer de bufeta comparant l'efecte antitumoral i immunoestimulador de *M. spp.* amb BCG.

A més, les bones dades obtingudes amb *M. spp.* mort, especialment per radiació gamma, fan que sigui interessant continuar el seu estudi comparant-lo amb el micobacteri viu *in vivo*. Aquest fet, també fa que sigui rellevant l'estudi dels antígens de *M. spp.* que podrien estar implicats en l'activitat antitumoral observada. Això podria donar lloc al disseny de nous agents més eficaços per al tractament immunoteràpic, i un coneixement més ampli del mecanisme implicat en la resposta antitumoral induïda.

La capacitat antitumoral i immunoestimuladora de *M. spp.* observada en aquest treball en cèl·lules tumorals de bufeta, podria ser mantinguda en altres tipus de càncer. Així doncs, el seu estudi com a agent antitumoral en diferents tipus neoplàstics seria molt interessant.

Com acabem de veure, els resultats obtinguts en aquesta tesis serveixen de base per a noves vies d'investigació.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Addeo R, Caraglia M, Bellini S, Abbruzzese A, Vincenzi B, Montella L, Miragliuolo A, Guarrasi R, Lanna M, Cennamo G, Faiola V, Del Prete S. (2010) Randomized phase III trial on gemcitabine versus mytomicin in recurrent superficial bladder cancer: evaluation of efficacy and tolerance. *J Clin Oncol.* 28(4): 543-548.

Aguilar JL, Sanchez EE, Carrillo C, Alarcón GS, Silicani A. (1989) Septic arthritis due to *Mycobacterium phlei* presenting as infantile Reiter's syndrome. *J Rheumatol.* 16(10): 1377-8.

Ahirwar DK, Manchanda PK, Mittal RD, Bid HK. (2011) BCG response prediction with cytokine gene variants and bladder cancer: where we are? *J Cancer Res Clin Oncol.* 137(12): 1729-1738.

Ahmad F, Mani J, Kumar P, Haridas S, Upadhyay P, Bhaskar S. (2011) Activation of anti-tumor immune response and reduction of regulatory T cells with *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) therapy in tumor bearing mice. *PLoS One.* 6(9): e25424.

Akaza H, Iwasaki A, Ohtani M, Ikeda N, Nijima K, Toida I, Koiso K. (1993) Expression of antitumor response. Role of attachment and viability of bacillus Calmette-Guérin to bladder cancer cells. *Cancer.* 72(2): 558-563.

Akazawa T, Masuda H, Saeki Y, Matsumoto M, Takeda K, Tsujimura K, Kuzushima K, Takahashi T, Azuma I, Akira S, Toyoshima K, Seya T. (2004) Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64(2): 757-764.

Akira S, Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 4(7): 499-511.

Akira S. (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 311: 1-16.

Alexandroff A, Black J, Bollina P, James K. (1997) Differential production of gamma delta T cells in the urine of bladder cancer patients receiving Bacillus Calmette Guerin immunotherapy. *Int J Oncol.* 10(2): 387-393.

Allen PM, Strydom D, Unanue ER. (1984) Processing of lysozyme by macrophages: identification of the determinant recognized by two T-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81(8): 2489-2493.

Álvarez Kindelán J, Campos Hernández JP, López Beltrán A, Requena Tápia MJ. (2007) Clasificación de la OMS 2004 para los tumores vesicales: resumen y comentarios. *Actas Urol Esp.* 31(9): 978-988.

Ardelt PU, Kneitz B, Adam P, Reiss C, Kocot A, Fensterle J, Chen L, Pasqualini R, Arap W, Gerharz EW, Riedmiller H. (2010) Reactive antibodies against bacillus Calmette-Guérin heat-shock protein-65 potentially predict the outcome of immunotherapy for high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer.* 116(3): 600-609.

Asanuma H, Arai T, Morimoto Y, Kawauchi S, Satoh H, Saguchi K, Kikuchi M, Murai M. (2005) Photodynamic therapy with PAD-S31, a new hydrophilic chlorin photosensitizer, in an orthotopic rat bladder tumor model. *J Urol.* 174(5): 2016-2021.

- Asselineau J, Lanéelle G. (1998) Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front Biosci.* 3: e164-174.
- Atkins H, Davies BR, Kirby JA, Kelly JD. (2003) Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 89(12): 2312-2319.
- Atkinson S, Valadas E, Smith SM, Lukey PT, Dockrell HM. (2000) Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG. *Tuber Lung Dis.* 80(4-5): 197-207.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Rouprêt M. (2011) EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *E Urol.* 59(6): 997-1008.
- Baer HH. (1993) The structure of an antigenic glycolipid (SL-IV) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Carbohydr Res.* 240: 1-22.
- Balemans LT, Vegt PD, Steerenberg PA, De Boer EC, Van Swaaij A, De Vries RE, Van der Meijden AP, Den Otter W. (1994) Effects of sequential intravesical administration of mitomycin C and bacillus Calmette-Guérin on the immune response in the guinea pig bladder. *Urol Res.* 22(4): 239-245.
- Baldwin RW, Cook AJ, Hopper DG, Pimm MV. (1974) Radiation-killed BCG in the treatment of transplanted rat tumours. *Int J Cancer.* 13(6): 743-750.
- Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Zembala M. (2004) Modulation of monocyte-tumour cell interactions by *Mycobacterium vaccae*. *Cancer Immunol Immunother.* 53: 1127-1134.
- Barnes PF, Chatterjee D, Barker LP, George KM, Falkow S, Small PL. (1997) Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun.* 65(4): 1497-1504.
- Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. (1992) Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect Immun.* 60(4): 1441-1446.
- Barrera L. The basics of clinical bacteriology. Chapter 3. Tuberculosis. (2007) From basic science to patient care. Ed. Palomino JC, Cardueso S, Ritacco V. (www.TuberculosisTextbook.com).
- Barry CE 3rd, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y. (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res.* 37(2-3): 143-179.
- Becich MJ, Carroll S, Ratliff TL. (1991) Internalization of bacille Calmette-Guerin by bladder tumor cells. *J Urol.* 145(6): 1316-1324.
- Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi M, Tanabe M, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Fukumori Y, Azuma I, Toyoshima K, Seya Y. (2004) *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect Immun.* 72(2): 937-948.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. (1999) Comparative genomics vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* 284: 1520-1523.

- Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry CE 3rd. (2000) A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoximycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol.* 182(12): 3394-3399.
- Behr MA. (2002) BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis.* 2: 86-92.
- Belisle JT, Brennan PJ. (1989) Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol.* 171: 3465-3470.
- Berger AP, Steiner H, Stenzl A, Akkad T, Bartsch G, Holtl L. (2003) Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study. *Urology.* 61(2): 338-341.
- Besra GS, Khoo KH, Belisle JT, McNeil MR, Morris HR, Dell A, Brennan PJ. (1994) New pyruvylated, glycosylated acyltrehaloses from *Mycobacterium smegmatis* strains, and their implications for phage resistance in mycobacteria. *Carbohydr Res.* 251: 99-114.
- Bevers RF, de Boer EC, Kurth KH, Schamhart DH. (1998) BCG-induced interleukin-6 upregulation and BCG internalization in well and poorly differentiated bladder cancer cell lines. *Eur Cytokine Netw.* 9(2): 181-186.
- Bevers RF, Kurth KH, Schamhart DH. (2004) Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer.* 91(4): 607-612.
- Birkhäuser F, Rentsch CA, Studer UE, Albert ML, Thalman GN. (2012) The BCG strain used is relevant for recurrence-free survival: A randomized phase III study comparing Immucyst® versus Oncotice®. 27th Annual Congress of the European Association of Urology. Abstract 962.
- Bjorkman PJ, Parham P. (1990) Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem.* 59: 253-288.
- Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintièrre C, Daniel P, Genetet N, Meunier B, Dupont-Bierre E, Boudjema K, Catros V. (2008) Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 57(4): 531-539.
- Böhle A, Nowc C, Ulmer AJ, Musehold J, Gerdes J, Hofstetter AG, Flad HD. (1990) Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2 and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Urol.* 144(1): 59-64.
- Böhle A, Jocham D, Bock PR. (2003) Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol.* 169(1): 90-95.
- Böhle A, Bock PR. (2004) Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology.* 63(4): 682-687.
- Böyum A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 97:7.
- Brandau S, Suttman H, Riemensberger J, Seitzer U, Arnold J, Durek C, Jocham D, Flad HD, Böhle A. (2000) *Perforin-mediated lysis of tumor cells by Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. *Clin Cancer Res.* 6(9): 3729-3738.

- Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, Kemp D, Zhao W, Zhao X, Jocham D, Ratliff TL, Böhle A. (2001) NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer*. 92(5): 697-702.
- Brandau S, Suttman H. (2007) Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother Rev*. 61:299-305.
- Brausi M, Collette L, Kurth K, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Newling D, Bouffouix C, Sylvester RJ. (2002) Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol*. 41: 523-531.
- Brennan PJ, Nikaido H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 64: 29-63.
- Brennan PJ, Crick DC. (2007) The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 7(5): 475-488.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 285(5428): 732-736.
- Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. (2004) Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol*. 53(2): 391-403.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. (2007) Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(13): 5596-5601.
- Brozna JP, Horan M, Rademacher JM, Pabst KM. (1991) Monocyte responses to sulphatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhance release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha and altered protein phosphorylation. *Infect Immun*. 59: 2542-2548.
- Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM. (1987) The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science*. 235(4794): 1353-1358.
- Cage GD, Saubolle MA. (1997) Infrequently isolated and unusual mycobacterial species as agents of human disease. *Reviews in Medical Microbiology*. 8 (3): 125-135.
- Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Lanéelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daffé M, Guilhot C. (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 276: 19845-19854.
- Cameron R, Feuer G. (2000) Incidence of apoptosis and its pathological and biochemical manifestations. In: Cameron R, Feuer G, eds. Apoptosis and its modulation by drugs. Berlin: Springer-Verlag. 142: 1-35.
- Castelao JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK. (2000) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *BR J Cancer*. 82: 1364-1369.

- Champetier D, Valignat C, Lopez JG, Ruffion A, Devonec M, Perrin P. (2000) Intravesical BCG-therapy: comparison of side effects of Connaught (Toronto) and Pasteur (Paris) strains. *Prog Urol.* 10(4): 542-547.
- Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR. (1989) Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 2453-2457.
- Chatterjee D, Khoo KH. (2001) The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol Life Sci.* 58: 2018-2042.
- Chaudhuri P, Mukhopadhyay S. (2003) Bladder preserving approach for muscle invasive bladder cancer--role of *Mycobacterium w.* *J Indian Med Assoc.* 101(9): 559-560.
- Chauhan A, Madiraju MV, Fol M, Lofton H, Maloney E, Reynolds R, Rajagopalan M. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol.* 188(5): 1856-1865.
- Chedid L. (1983) Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators. *Microbiol Immunol.* 27(9): 723-732.
- Chen F, Zhang G, Iwamoto Y, See WA. (2005) BCG directly induces cell cycle arrest in human transitional carcinoma cell lines as a consequence of integrin cross-linking. *BMC Urol.* 5:8.
- Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. (2007 (a)) Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol.* 7(10):1271-1285.
- Chen F, Zhang G, Cao Y, Payne R, See WA. (2007 (b)) Bacillus Calmette-Guerin inhibits apoptosis in human urothelial carcinoma cell lines in response to cytotoxic injury. *J Urol.* 178(5): 2166-2170.
- Chen JM, Islam ST, Ren H, Liu J. (2007 (c)) Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine.* 25 (48): 8114-8122.
- Chen F. (2009) MB49 murine urothelial carcinoma: molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to BCG. *J Urol.* 182: 2932-2937.
- Cheng L, Maclennan GT, Lopez-Beltran A. (2012) Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal. *Hum Pathol.* [Epub ahead of print].
- Chin JL, Kadhim SA, Batislam E, Karlik SJ, Garcia BM, Nickel JC, Morales A. (1996) Mycobacterium cell wall: an alternative to intravesical bacillus Calmette Guerin (BCG) therapy in orthotopic murine bladder cancer. *J Urol.* 156(3): 1189-1193.
- Cognetti F, Ruggeri EM, Felici A, Gallucci M, Muto G, Pollera CF, Massidda B, Rubagotti A, Giannarelli D, Boccardo F; Study Group. (2012) Adjuvant chemotherapy with cisplatin and gemcitabine versus chemotherapy at relapse in patients with muscle-invasive bladder cancer submitted to radical cystectomy: an Italian, multicenter, randomized phase III trial. *Ann Oncol.* 23(3): 695-700.
- Colombo R, Brausi M, Da Pozzo L, Salonia A, Montorsi F, Scattoni V, Roscigno M, Rigatti P. (2001) Thermo-chemotherapy and electromotive drug administration of mitomycin C in superficial bladder cancer eradication. A pilot study on marker lesion. *Eur Urol.* 39(1): 95-100.

- Colombo R, Da Pozzo L, Salonia A, Rigatti P, Leib Z, Baniel J, Caldarera E, Pavone-Macaluso M. (2003) Multicentric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 21(23): 4270-4276.
- Coon BG, Crist S, González-Bonet AM, Kim HK, Sowa J, Thompson DH, Ratliff TL, Aguilar RC. (2012) Fibronectin attachment protein from bacillus Calmette-Guerin as targeting agent for bladder tumor cells. *Int J Cancer.* 131(3): 591-600.
- Cote RJ, Mitra AP, Amin MB. (2009) Bladder and urethra. In *Modern Surgical Pathology*, ed. N Weidner, RJ Cote, S Suster, LM Weiss. Philadelphia, PA: Saunders. In Press.
- Court N, Rose S, Bourigault ML, Front S, Martin OR, Dowling JK, Kenny EF, O'Neill L, Erard F, Quesniaux VF. (2011) Mycobacterial PIMs inhibit host inflammatory responses through CD14-dependent and CD14-independent mechanisms. *PLoS One.* 6(9): e24631.
- Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. (2001) Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology.* 11: 107R-118R.
- Daffé M. (1982) Etude structurale des constituants lipidiques of *Mycobacterium leprae*. Comparison avec diverses espèces de mycobactéries. Tesis. Universitat de Tolouse, França.
- Daffé M, Draper P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol.* 39: 131-203.
- Dalbagni G, Herr HW. (2000) Current use and questions concerning intravesical bladder cancer group for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 27(1): 137-141.
- Dalbagni G, Russo P, Bochner B, Ben-Porat L, Sheinfeld J, Sogani P, Donat MS, Herr HW, Bajorin D. (2006) Phase II trial of intravesical gemcitabine in bacille Calmette-Guérin-refractory transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Oncol.* 24(18): 2729-2734.
- Dao DN, Kremer L, Guérardel Y, Molano A, Jacobs WR Jr, Porcelli SA, Briken V. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun.* 72(4): 2067-2074.
- Dao DN, Sweeney K, Hsu T, Gurcha SS, Nascimento IP, Roshevsky D, Besra GS, Chan J, Porcelli SA, Jacobs WR. (2008) Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog.* 4(6): e1000081.
- Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, Gamielidien H, Gelderbloem SJ, Hawkridge A, Hussey GD, Hughes EJ, Soler J, Murray RA, Ress SR, Kaplan G. (2006) The effect of bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis.* 193: 531-536.
- DeBlaker-Hohe DF, Yamauchi A, Yu CR, Horvath-Arcidiacono JA, Bloom ET. (1995) IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. *Cell Immunol.* 165(1): 33-43.
- de Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Van der Meijden AP, Aarden LA, Debruyne FM, Ruitenberg EJ. (1991) Leukocytes and cytokines in the urine of superficial bladder cancer patients after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin. *In Vivo.* 5(6): 671-677.

de Boer EC, Somogyi L, de Ruiter GJ, de Reijke TM, Kurth KH, Schamhart DH. (1997) Role of interleukin-8 in onset of the immune response in intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *Urol Res.* 25(1): 31-34.

de Boer EC, De Reijke TM, Vos PC, Kurth KH, Schamhart DH. (2000) Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell-wall skeletons (Rubratin) and bacillus Calmette-Guérin as therapy for superficial bladder cancer: a comparative study. *Clin Infect Dis.* 31 Suppl 3: S109-S114.

Decroix G, Chastang C, Fichet D, Asselain B, Lebeau B, Morice V, Lepage T, Babo P, Fabre C, Rebischung JL, et al. (1984) Adjuvant immunotherapy with nonviable *Mycobacterium smegmatis* in resected primary lung carcinoma. A randomized clinical trial of 219 patients. *Cancer.* 53(4): 906-912.

DeMichele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Klein-Cabral M, Athanasiadis G, Colligan T, Stadtmauer E, Weber B. (2003) Interleukin-6-174G→C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res.* 63(22): 8051-8056.

Den Otter W, Dobrowolski Z, Bugajski A, Papla B, Van Der Meijden AP, Korten JW, Boon TA, Siedlar M, Zembala M. (1998) Intravesical interleukin-2 in T1 papillary bladder carcinoma: regression of marker lesion in 8 of 10 patients. *J Urol.* 159(4): 1183-1186.

de Reijke TM, Vos PC, de Boer EC, Bevers RF, de Muinck Keizer WH, Kurth KH, Schamhart DH. (1993) Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Urol Res.* 21(5): 349-352.

Dimopoulos MA, Bakoyannis C, Georgoulas V, Papadimitriou C, Mouloupoulos LA, Deliveliotis C, Karayannis A, Varkarakis I, Aravantinos G, Zervas A, Pantazopoulos D, Fountzilias G, Bamias A, Kyriakakis Z, Anagnostopoulos A, Giannopoulos A, Kosmidis P. (1999) Docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in advanced carcinoma of the urothelium: a multicenter phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Ann Oncol.* 10(11): 1385-1388.

Dinadayala P, Laval F, Raynaud C, Lemassu A, Lanéelle M-A, Daffé M. (2003) Tracking the putative biosynthetic precursors of oxygenated mycolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Structural analysis of fatty acids of a mutant strain devoid of methoxy and ketomycolates. *J Biol Chem.* 278 (9): 7310-7319.

Dinadayala P, Lemassu A, Granovski P, Cérantola S, Winter N, Daffé M. (2004) Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin. Structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains. *J Biol Chem.* 279(13):12369-12378.

DiPaola RS, Lattime EC. (2007) Bacillus Calmette-Guérin mechanism of action: the role of immunity, apoptosis, necrosis and autophagy. *J Urol.* 178(5): 1840-1841.

Di Stasi SM, Giannantoni A, Giurioli A, Valenti M, Zampa G, Storti L, Attisani F, De Carolis A, Capelli G, Vespasiani G, Stephen RL. (2006) Sequential BCG and electromotive mitomycin versus BCG alone for high-risk superficial bladder cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 7(1): 43-51.

Dobos KM, Spotts EA, Quinn FD, King CH. (2000) Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun.* 68(11): 6300-6310.

Domenech P, Jimenez MS, Menendez MC, Bull TJ, Samper S, Manrique A, Garcia MJ. (1997) *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47(2): 535-540.

Draper P. (1998) The outer parts of the mycobacteria envelope as permeability barriers. *Front Biosci.* 3: 1253-1261.

Draper P, Daffé M. (2005) The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability barrier. Chapter 17. Tuberculosis and the tubercle bacillus. Cole ST, Eisenack D, McMurray DN. ASM Press.

Elsässer-Beile U, Ruhnau T, Freudenberg N, Wetterauer U, Mengs U. (2001) Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. *Cancer.* 91(5): 998-1004.

Elsässer-Beile U, Leiber C, Wolf P, Lucht M, Mengs U, Wetterauer U. (2005) Adjuvant intravesical treatment of superficial bladder cancer with a standardized mistletoe extract. *J Urol.* 174(1): 76-79.

Engelmann U, Knopf HJ, Graff J. (1992) Interferon-alpha 2b instillation prophylaxis in superficial bladder cancer—a prospective, controlled three-armed trial. Project Group Bochum-Interferon and Superficial Bladder Cancer. *Anticancer Drugs.* Suppl 1: 33-37.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. (1998) The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 22(12): 1435-1448.

Esuvaranathan K, Alexandroff AB, McIntyre M, Jackson AM, Prescott S, Chisholm GD, James K. (1995) Interleukin-6 production by bladder tumors is upregulated by BCG immunotherapy. *J Urol.* 154 (2 Pt 1): 572-575.

Fäldt J, Dahlgren C, Karlsson A, Ahmed AMS, Minnikin DE, Ridell M. (1999) Activation of human neutrophils by mycobacterial phenolic glycolipids. *Clin Exp Immunol.* 118: 253-260.

Filion MC, Lépicié P, Morales A, Phillips NC. (1999) Mycobacterium phlei cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells. *Br J Cancer.* 79(2): 229-235.

Fontana D, Bellina M, Galietti F, Scoffone C, Cagnazzi E, Guercio S, Cappia S, Pozzi E. (1999) Intravesical bacillus calmette-guérin (BCG) as inducer of tumor-suppressing proteins p53 and p21 Waf1-Cip1 during treatment of superficial bladder cancer. *J Urol.* 162(1): 225-230.

Fowler DW, Copier J, Wilson N, Dalgleish AG, Bodman-Smith MD. (2012) Mycobacteria activate $\gamma\delta$ T-cell anti-tumour responses via cytokines from type 1 myeloid dendritic cells: a mechanism of action for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 61(4): 535-547.

Fricke I, Mitchell D, Mittelstädt J, Lehan N, Heine H, Goldmann T, Böhle A, Brandau S. (2006) Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol.* 176(9): 5173-5182.

Gallagher BL, Joudi FN, Maymí JL, O'Donnell MA. (2008) Impact of previous bacille Calmette-Guérin failure pattern on subsequent response to bacille Calmette-Guérin plus interferon intravesical therapy. *Urology.* 71(2): 297-301.

- Gansler T, Vaghmar N, Olson JJ, Graham SD. (1992) Suramin inhibits growth factor binding and proliferation by urothelial carcinoma cell cultures. *J Urol.* 148(3): 910-914.
- Garcia MM, Brooks BW, Stewart RB, Dion W, Trudel JRR, Ouwerkerk T. (1987) Evaluation of gamma radiation levels for reducing pathogenic bacteria and fungi in animal sewage and laboratory effluents. *Can J Vat Res.* 51: 285-289.
- Ghosh TK, Mickelson DJ, Fink J, Solberg JC, Inglefield JR, Hook D, Gupta SK, Gibson S, Alkan SS. (2006) Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. *Cell Immunol.* 243(1): 48-57.
- Glashan RW. (1990) A randomized controlled study of intravesical alpha-2b-interferon in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol.* 144(3): 658-661.
- Goldberg MR, Heimbrook DC, Russo P, Sarosdy MF, Greenberg RE, Giantonio BJ, Linehan WM, Walther M, Fisher HA, Messing E, Crawford ED, Oliff AI, Pastan IH. (1995) Phase I clinical study of the recombinant oncotxin TP40 in superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1(1): 57-61.
- Goldman M, Velu T. (1995) Interleukin-10 and its implications for immunopathology. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 24: 79-90.
- Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell M A, Oderda M, Sylvester R, Witjes F. (2010) The role of Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 57: 410-429.
- Gonzalez OY, Musher DM, Brar I, Furgeson S, Boktour MR, Septimus EJ, Hamill RJ, Graviss EA. (2003) Spectrum of bacille Calmette-Guérin (BCG) infection after intravesical BCG immunotherapy. *Clin Infect Dis.* 36(2): 140-148.
- Goren MB, Brokl O, Roller P, Fales HM, Das BC. (1976) Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. The structure of the principal sulfatide (SL-I). *Biochemistry* 15: 2728-2734.
- Goren MB, Brennan PJ. (1979) Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. In: Youmans GP, ed: *Tuberculosis*. Philadelphia, PA: WB Saunders; p. 63-193 (Chapter 4).
- Gray GR, Ribi E, Granger D, Parker R, Azuma I, Yamamoto K. (1975) Immunotherapy of cancer: tumor suppression and regression by cell walls of *Mycobacterium phlei* attached to oil droplets. *J Natl Cancer Inst.* 55(3): 727-730.
- Gudjónsson S, Adell L, Merdasa F, Olsson R, Larsson B, Davidsson T, Richthoff J, Hagberg G, Grabe M, Bendahl PO, Mansson W, Liedberg F. (2009) Should all patients with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a prospective randomised multicenter study. *Eur Urol.* 55(4): 773-780.
- Gulle H, Fray LM, Gormley EP, Murray A, Moriarty KM. (1995) Responses of bovine T cells to fractionated lysate and culture filtrate proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Vet Immunol Immunopath.* 48: 183-190.
- Gunlusoy B, Arslan M, Vardar E, Degirmenci T, Kara C, Ceylan Y, Kozacıoğlu Z. (2012) The efficacy and toxicity of gemcitabine and cisplatin chemotherapy in advanced/metastatic bladder urothelial carcinoma. *Actas Urol Esp.*

Haanen JB, de Waal Malefijt R, Res PC, Kraakman EM, Ottenhoff TH, de Vries RR, Spits H. (1991) Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. *J Exp Med.* 174(3): 583-92.

Hachem R, Raad I, Rolston KV, Whimbey E, Katz R, Tarrand J, Libshitz H. (1996) Cutaneous and pulmonary infections caused by *Mycobacterium vaccae*. *Clin Infect Dis.* 23 (1): 173-175.

Haley JL, Young DG, Alexandroff A, James K, Jackson AM. (1999) Enhancing the immunotherapeutic potential of mycobacteria by transfection with tumor necrosis- α . *Immunology.* 96(1):114-121.

Harris NM, Anderson WR, Lwaleed BA, Cooper AJ, Birch BR, Solomon LZ. (2003) Epirubicin and meglumine gamma-linolenic acid: a logical choice of combination therapy for patients with superficial bladder carcinoma. *Cancer.* 97(1): 71-78.

Hartmans S, De Bont JAM, Stackebrandt E. (2006) The Genus *Mycobacterium*- Nonmedical. *Prokariotes.* 3: 889-918.

Hatzios SK, Schelle MW, Holsclaw CM, Behrens CR, Botyanszki Z, Lin FL, Carlson BL, Kumar P, Leary JA, Bertozzi CR. (2009) PapA3 is an acyltransferase required for polyacyltrehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 284(19): 12745-51.

Havran WL, Boismenu R. (1994) Activation and function of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol.* 6(3): 442-446.

Hawkyard SJ, Jackson AM, James K, Prescott S, Smyth JF, Chisholm GD. (1992) The inhibitory effects of interferon gamma on the growth of bladder cancer cells. *J Urol.* 147(5): 1399-1403.

Hayashi A, Noda A. (1996) Does the cell wall skeleton from Bacille Calmette-Guérin directly induce interferon-gamma, independent of interleukin-12? *Jpn J Clin Oncol.* 26(3):124-127.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 410(6832): 1099-1103.

Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Kondo M, Yasuda E, Inagaki E, Kanai K, Fujiwara A, Kawarazaki A, Chiba T, Onozaki K. (2009) Comparable studies of immunostimulating activities *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 56(2): 116-128.

Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Mukai M, Yasuda E, Horita Y, Yamamoto R, Fujiwara A, Kanai K, Kondo M, Kawarazaki A, Yano I, Yamamoto R, Onozaki K. (2010) Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol Lett.* 306: 103-109.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 408(6813): 740-745.

Hendricksen K, Cornel EB, de Reijke TM, Arentsen HC, Chawla S, Witjes JA. (2012) Phase 2 study of adjuvant intravesical instillations of apaziquone for high risk nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.* 187(4): 1195-1199.

- Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, Takahashi H. (2009) A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 58(8): 1245-1255.
- Hinrikson HP, Pfyffer GE. (1994) Mycobacterial mycolic acids (mini-review). Part I. *Med Microbiol Lett* 3: 49-57.
- Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, Alexopoulou L, Flavell RA, Han J, Beutler B. (2003) Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol.* 4(12): 1223-1229.
- Hoppe H, de Wed BJ, Cywes C, Daffé M, Ehlers MR. (1997) Identification of phosphatidylinositol mannoside as mycobacterial adhesion mediating both direct and opsonic binding to nonphagocytic mammalian cell. *Infect Immun.* 65: 3896-3905.
- Horinaga M, Harsch KM, Fukuyama R, Heston W, Larchian W. (2005) Intravesical interleukin-12 gene therapy in an orthotopic bladder cancer model. *Urology.* 66(2): 461-466.
- Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. (2009) Commonly administered BCG strains including an evolutionarily early strain and evolutionarily late strain of disparate genealogy induce comparable protective immunity against tuberculosis. *Vaccine.* 27: 441-445.
- Hrouda D, Baban B, Dunsmuir W, Kirby R, Dalgleish AG. (1998) Immunotherapy of advanced prostate cancer: a phase I/II trial using *Mycobacterium vaccae* (SRL 172). *Br J Urol.* 82(4): 568-573.
- Hudson MA, Herr HW. (1995) Carcinoma in situ of the bladder. *J Urol.* 153(3 Pt 1): 564-572.
- Huncharek M, McGarry R, Kupelnick B. (2001) Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res.* 21(1B): 765-769.
- Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Hautefeuille A, Donato F, Gelatti U, Spaliviero M, Placidi D, Carta A, Scotto di Carlo A, Porru S. (2004) GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer.* 110(4): 598-604.
- Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K, Akaza H. (2002) Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guérin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol.* 9(1): 29-35.
- Ishii K, Kurita-Taniguchi M, Aoki M, Kimura T, Kashiwazaki Y, Matsumoto M, Seya T. (2005) Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunol Lett.* 98(2): 280-290.
- Iwasaki A, Medzhitov R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5(10): 987-995.
- Jackson AM, Alexandrov AB, Gribben SC, Esuvarnathan K, James K. (1993) Expression and shedding of ICAM-1 in bladder cancer and its immunotherapy. *Int J Cancer.* 55(6): 921-925.
- Jackson AM, Alexandroff AB, Kelly RW, Skibinska A, Esuvaranathan K, Prescott S, Chisholm GD, James K. (1995) Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-

- 1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol.* 99(3): 369-375.
- Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. (1989) Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 244(4905): 713-716.
- Jansson OT, Morcos E, Brundin L, Lundberg JO, Adolfsson J, Söderhäll M, Wiklund NP. (1998) The role of nitric oxide in bacillus Calmette-Guérin mediated anti-tumour effects in human bladder cancer. *Br J Cancer.* 78(5): 588-592.
- Järvinen R, Kaasinen E, Rintala E, Group TF. (2012) Long-term results of maintenance treatment of mitomycin C or alternating mitomycin C and bacillus Calmette-Guérin instillation therapy of patients with carcinoma in situ of the bladder: A subgroup analysis of the prospective FinnBladder 2 study with a 17-year follow-up. *Scand J Urol Nephrol.* [Epub ahead of print].
- Jenkins KA, Mansell A. (2010) TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Cytokine.* 49: 237-244.
- Jimenez-Cruz JF, Vera-Donoso CD, Leiva O, Pamplona M, Rioja-Sanz LA, Martinez-Lasierra M, Flores N, Unda M. (1997) Intravesical immunoprophylaxis in recurrent superficial bladder cancer (Stage T1): multicenter trial comparing bacille Calmette-Guérin and interferon-alpha. *Urology.* 50(4): 529-535.
- Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ. (2001) Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 69(6): 1036-1044.
- Jurincic-Winkler CD, Metz KA, Beuth J, Klippel KF. (2000) Keyhole limpet hemocyanin for carcinoma in situ of the bladder: a long-term follow-up study. *Eur Urol. Suppl* 3: 45-49.
- Kaasinen ES, Kalliomäki PH, Alftan OS, Timonen TT. (1993) Bacillus Calmette-Guérin sensitises fresh transitional carcinoma cells and T24 cell line to non-MHC-restricted cytotoxicity in vitro. *Br J Urol.* 72(6): 897-906.
- Kaasinen E, Rintala E, Pere AK, Kallio J, Puolakka VM, Liukkonen T, Tuhkanen K. (2000) Weekly mitomycin C followed by monthly bacillus Calmette-Guérin or alternating monthly interferon-alpha2B and bacillus Calmette-Guérin for prophylaxis of recurrent papillary superficial bladder carcinoma. *J Urol.* 164(1): 47-52.
- Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zöller M. (2004) Potential of human gammadelta T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *Int J Cancer.* 112(5): 727-732.
- Kamb A. (1995) Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* 11(4):136-140.
- Kamel AI, El Baz AG, Abdel Salam WT, El Din Ryad ME, Mahena AA. (2009) Low dose BCG regimen in T1 transitional cell carcinoma of the bladder; long term results. *J Egypt Natl Canc Inst.* 21(2):151-5.
- Kataoka T, Yamamoto S, Yamamoto T, Kuramoto E, Kimura Y, Yano O, Tokunaga T. (1992) Antitumor activity of synthetic oligonucleotides with sequences from cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res.* 83(3): 244-247.
- Kato M. (1972) Antibody formation to trehalose 6,6'-dimycolate (cord-formation) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 5: 203-12.

- Kato T, Bilim V, Yuuki K, Naito S, Yamanobe T, Nagaoka A, Yano I, Akaza H, Tomita Y. (2010) Bacillus Calmette-Guerin and BCG cell wall skeleton suppressed viability of bladder cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 30(10): 4089-4096.
- Kaufmann SH, Ladel CH, Flesch IE. (1995) T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. *Ciba Found Symp.* 195: 123-132.
- Kazda J, Cooney R, Monaghan M, Quinn PJ, Stackebrandt E, Dorsch M, Daffé M, Müller K, Cook BR, Tarnok ZS. (1993) *Mycobacterium hiberniae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 43(2): 352-357.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 73: 2013-16.
- Keyser A, Troudt JM, Taylor JL, Izzo AA. (2011) BCG sub-strains induce variable protection against virulent pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection, with the capacity to drive Th2 immunity. *Vaccine.* 29(50): 9308-9315.
- Khatter S, Singh UB, Arora J, Rana T, Seth P. (2008) Mycobacterial infections in human immuno-deficiency virus seropositive patients: role of non-tuberculous mycobacteria. *Indian J Tuberc.* 55(1): 28-33.
- Kirschner P, Teske A, Schröder KH, Kroppenstedt RM, Wolters J, Böttger EC. (1992) *Mycobacterium confluentis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 42(2): 257-262.
- Kishimoto T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood.* 74(1): 1-10.
- Kogevinas M, Mannetje A, Cordier S, Ranft U, González CA, Vineis P, Chang-Claude J, Lynge E, Wahrendorf J, Tzonou A, Jöckel KH, Serra C, Porru S, Hours M, Greiser E, Bofetta P. (2003) Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control.* 14: 907-914.
- Korf J, Stoltz A, Vershoor J, De Baetselier P, Grooten J. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *Eur J Immunol.* 35(3): 890-900.
- Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. (1994) Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 6(2): 279-289.
- Kreider JW, Bartlett GL, Purnell DM. (1980) Immunotherapeutic effectiveness of BCG inactivated by various modalities. *Cancer.* 46(3): 480-487.
- Kurusu H, Matsuyama H, Ohmoto Y, Shimabukuro T, Naito K. (1994) Cytokine-mediated antitumor effect of bacillus Calmette-Guérin on tumor cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother.* 39(4): 249-253.
- Kuroda K, Brown EJ, Telle WB, Russell DG, Ratliff TL. (1993) Characterization of the internalization of bacillus Calmette-Guerin by human bladder tumor cells. *J Clin Invest.* 91(1): 69-76.
- Kuznetsov DD, Alsikafi NF, O'Connor RC, Steinberg GD. (2001) Intravesical valrubicin in the treatment of carcinoma in situ of the bladder. *Expert Opin Pharmacother.* 2(6):1009-1013.

Lamm DL, Thor DE, Harris SC, Reyna JA, Stogdill VD, Radwin HM. (1980) Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Urol.* 124(1): 38-40.

Lamm DL, Thor DE, Winters WD, Stogdill VD, Radwin HM. (1981) BCG immunotherapy of bladder cancer: inhibition of tumor recurrence and associated immune responses. *Cancer.* 48(1): 82-88.

Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, Stanisc TH, Smith JA Jr, Sullivan J, Sarosdy MF, Crissman JD, Coltman CA. (1991) A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med.* 1991 325(17): 1205-1209.

Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman ED, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, Sarosdy MF, Bohl RD, Grossman HB, Beck TM, Leimert JT, Crawford ED. (2000 (a)) Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent Ta, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma on the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol.* 163(4):1124-1129.

Lamm DL. (2000 (b)) Efficacy and safety of Bacille Calmette-Guérin immunotherapy in superficial bladder cancer. *Clin Infect Dis.* 31: S86-S90.

Lamm DL, Dehaven JI, Riggs DR. (2000 (c)) Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of bladder cancer: laboratory and clinical studies. *Eur Urol.* 37 Suppl 3: 41-44.

Laster SM, Wood JG, Gooding LR. (1988) Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol.* 141(8): 2629-2634.

Lattime EC, Gomella LG, McCue PA. (1992) Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4+ T-cells. *Cancer Res.* 52(15): 4286-4290.

Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev.* 186: 37-46.

Laval F, Lanéelle MA, Déon C, Monsarrat B, Daffé M. (2001) accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem.* 73(18):4537-4544.

Leakakos T, Ji C, Lawson G, Peterson C, Goodwin S. (2003) Intravesical administration of doxorubicin to swine bladder using magnetically targeted carriers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 51(6): 445-450.

Lee J, Choi K, Olin MR, Cho SN, Molitor TW. (2004) Gammadelta T cells in immunity induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect Immun.* 72(3): 1504-1511.

Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. (1996) Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol.* 157(5): 1919-1925.

Leong AS, Wannakrairot P, Jose J, Milios J. (1990) Bacillus Calmette-Guérin-treated superficial bladder cancer: correlation of morphology with immunophenotyping. *J Pathol.* 162(1): 35-41.

Le Visage C, Rioux-Leclercq N, Haller M, Breton P, Malavaud B, Leong K. (2004) Efficacy of paclitaxel released from bio-adhesive polymer microspheres on model superficial bladder cancer. *J Urol.* 171(3): 1324-1329.

- Liang FX, Riedel I, Deng FM, Zhou G, Xu C, Wu XR, Kong XP, Moll R, Sun TT. (2001) Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *Biochem J.* 355(Pt 1): 13-18.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 5(6): 446-458.
- Liu J, Barry CE, Nikaido H. (1999) Cell wall: physical structure and permeability. (Chapter 12). A: *Mycobacteria. Molecular Biology and Virulence.* Eds.: Ratledge C, Dale J. Blackwell Science Ltd. UK. pp: 220-239.
- Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. (2009) BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin.* 5(2): 70-78.
- Liu WM, Foeler DW, Gravett AM, Smith P, Dalglish AG. (2011) Supernatants from lymphocytes stimulated with Bacillus Calmette-Guérin can modify the antigenicity of tumours and stimulate allogenic T-cell responses. *B J of Cancer.* 105: 687-93.
- Ludwig AT, Moore JM, Luo Y, Chen X, Saltsgaver NA, O'Donnell MA, Griffith TS. (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guérin-induced antitumor activity. *Cancer Res.* 64(10): 3386-3390.
- Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. (2003) Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine.* 21(1): 17-26.
- Luo Y, Yamada H, Chen X, Ryan AA, Evanoff DP, Triccas JA, O'Donnell MA. (2004) Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) expressing mouse IL-18 augments Th1 immunity and macrophage cytotoxicity. *Clin Exp Immunol.* 137(1): 24-34.
- Luo Y, Yamada H, Evanoff DP, Chen X. (2006) Role of Th1-stimulating cytokines in bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells. *Clin Exp Immunol.* 146(1): 181-188.
- Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. (2007) *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) induces human CC- and CXC-chemokines in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol.* 147(2): 370-378.
- Luo Y, Han R, Evanoff DP, Chen X. (2010) Interleukin-10 inhibits *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol.* 160(3):359-68.
- Luquin M, Roussel J, Lopez-Calahorra F, Lanéelle G, Ausina V, Lanéelle MA. (1990) A novel mycolic acid in a *Mycobacterium* sp. From the environment. *Eur J Biochem.* 192: 753-759.
- McAveney KM, Gomella LG, Lattime EC. (1994) Induction of TH1- and TH2-associated cytokine mRNA in mouse bladder following intravesical growth of the murine bladder tumor MB49 and BCG immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 39(6): 401-406.
- Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, Solsona E, Di Stasi SM, Witjes JA. (2009) An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 56: 247-256.

Mangsbo SM, Ninalga C, Essand M, Loskog A, Tötterman TH. (2008) CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity. *J Immunother.* 31(1): 34-42.

Martínez A, Torello S, Kolter R. (1999) Sliding motility in Mycobacteria. *J Bacteriol.* 181: 7331-7338.

Martínez-Piñeiro JA, Jiménez León J, Martínez-Piñeiro L Jr, Fiter L, Mosteiro JA, Navarro J, García Matres MJ, Cárcamo P. (1990) Bacillus Calmette-Guerin versus doxorubicin versus thiotepa: a randomized prospective study in 202 patients with superficial bladder cancer. *J Urol.* 143(3): 502-506.

Martínez Piñeiro JA, Flores N, Isorna S, Solsona E, Sebastián JL, Pertusa C, Rioja LA, Martínez-Piñeiro L, Vela R, Camacho JE, Nogueira JL, Pereira I, Resel L, Muntañola P, Galvis F, Chesa N, de Torres JA, Carballido J, Bernuy C, Arribas S, Madero R; for CUETO (Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico). (2002) Long-term follow-up of a randomized prospective trial comparing a standard 81 mg dose of intravesical bacille Calmette-Guérin with a reduced dose of 27 mg in superficial bladder cancer. *BJU Int.* 89(7): 671-680.

Martínez-Piñeiro JA, Martínez-Piñeiro L, Solsona E, Rodríguez RH, Gómez JM, Martín MG, Molina JR, Collado AG, Flores N, Isorna S, Pertusa C, Rabadán M, Astobieta A, Camacho JE, Arribas S, Madero R; Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO). (2005) Has a 3-fold decreased dose of bacillus Calmette-Guerin the same efficacy against recurrences and progression on T1G3 and Tis bladder tumours than the standard dose? Results of a prospective randomized trial. *J Urol.* 174(4 Pt 1): 1242-1247.

Mathé G, Pouillart P, Lapeyroue F. (1969) Active immunotherapy of L1210 leukaemia applied after the graft of tumour cells. *Br J Cancer.* 23(4): 814-824.

Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. (1999) Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 163(7):3920-7.

Méndez-Samperio P, Ayala-Verdin HE, Trejo-Echeverria A. (1999) Interleukin-12 regulates the production of Bacille Calmette-Guérin-induced interferon-gamma from human cells in a CD40-dependent manner. *Scand J Immunol.* 50(1): 61-67.

Méndez-Samperio P, Vázquez A, Ayala H. (2003) Infection of human monocytes with *Mycobacterium bovis* **BCG** induces production of CC-chemokines. *J Infect.* 47(2): 139-147.

Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, Gudas JM, McConkey DJ, Bar-Eli M. (2003) Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res.* 9(8): 3167-3175.

Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodríguez J. (2000) Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol.* 164(3 Pt 1):680-684.

Mink PJ, Alexander DD, Barraj LM, Kelsh MA, Tsuji JS. (2008) Low-level arsenic exposure in drinking water and bladder cancer: a review and meta-analysis. *Regul Toxicol Pharmacol.* 52(3): 299-310.

- Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Giannopoulos A, Kyriakou G, Dimopoulos C. (2000) Oxidative stress of red blood cells during *Bacillus Calmette-Guerin* intravesical instillations. *In Vivo*. 14(6): 721-724.
- Mitsogiannis IC, Psaroudaki Z, Perrea D, Paniara O, Melekos MD, Zervas A, Mitropoulos D. (2006) In vitro biocompatibility between mitomycin-C (MMC) and bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Anticancer Res*. 26(6B):4569-73.
- Miyazaki J, Kawai K, Oikawa T, Johraku A, Hattori K, Shimazui T, Akaza H. (2006) Uroepithelial cells can directly respond to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin through Toll-like receptor signalling. *BJU Int*. 97(4): 860-864.
- Miyazaki J, Kawai K, Kojima T, Oikawa T, Joraku A, Shimazu T, Nakaya A, Yano I, Nakamura T, Harashima H, Akaza H. (2011) The liposome-incorporating cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin can directly enhance the susceptibility of cancer cells to lymphokine-activated killer cells through up-regulation of natural-killer group 2, member D ligands. *BJU Int*. 108(9): 1520-1526.
- Mizutani Y, Nio Y, Fukumoto M, Yoshida O. (1992) Effects of bacillus Calmette-Guerin on cytotoxic activities of peripheral blood lymphocytes against human T24 lined and freshly isolated autologous urinary bladder transitional carcinoma cells in patients with urinary bladder cancer. *Cancer*. 69(2): 537-545.
- Mohanty NK, Nayak RL, Vasudeva P, Arora RP. (2008) Management of BCG non-responders with fixed dose intravesical gemcitabine in superficial transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Indian J Urol*. 24(1): 44-47.
- Moltedo B, Faunes F, Haussmann D, De Ioannes P, De Ioannes AE, Puente J, Becker MI. (2006) Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J Urol*. 176(6 Pt 1): 2690-2695.
- Montironi R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Cheng L. (2009) 2004 World Health Organization classification of the noninvasive urothelial neoplasms: inherent problems and clinical reflections. *Eur Urol*. (Suppl 8):453-457.
- Moody DB, Reinhold BB, Guy MR, Beckman EM, Frederique DE, Furlong ST, Ye S, Reinhold VN, Siling PA, Modlin RL, Besra GS, Porcelli SA. (1997) Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science*. 278(5336): 283-286.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19: 683-765.
- Morales A, Eidiner D, Bruce A W. (1976) Intracavitary bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 116: 180.
- Morales A, Chin JL, Ramsey EW. (2001) Mycobacterial cell wall extract for treatment of carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*. 166(5): 1633-1637.
- Morales A. (2008) Evolution of intravesical immunotherapy for bladder cancer: mycobacterial cell wall preparation as a promising agent. *Expert Opin Investig Drugs*. 17(7): 1067-1073.
- Morton D, Eilber FR, Malmgren RA, Wood WC. (1970) Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery*. 68(1): 158-163.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63.

Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. (1999) Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev*. 179: 97-111.

Mostofi FK, Sobin LH. (1973) Histologic typing of urinary bladder tumors. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Mostofi FK, Davis CJ Jr, Sesterhenn IA. (1988) Pathology of tumors of the urinary tract. In: Skinner DG, Lieskovsky G, eds.: *Diagnosis and Management of Genitourinary Cancer*. Philadelphia, Pa: WB Saunders. pp. 83-117.

Moyad MA. (2002) Potential lifestyle and dietary supplement options for the prevention and postdiagnosis of bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 29(1): 31-48, viii.

Mugabe C, Hadaschik BA, Kainthan RK, Brooks DE, So AI, Gleave ME, Burt HM. (2009) Paclitaxel incorporated in hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols for intravesical bladder cancer therapy. *BJU Int*. 103(7): 978-986.

Muñoz M, Lanéelle M, Luquin M, Torrelles J, Julián E, Ausina V, Daffé M. (1997) Occurrence of an antigenic triscyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 157: 251-259.

Murata M. (2008) Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors. *Cancer Sci*. 99(7): 1435-1440.

Nadasy KA, Patel RS, Emmett M, Murillo RA, Tribble MA, Black RD, Sutker WL. (2008) Four cases of disseminated *Mycobacterium bovis* infection following intravesical BCG instillation for treatment of bladder carcinoma. *South Med J*. 101: 91-95.

Naito S, Koga H, Yamaguchi A, Fujimoto N, Hasui Y, Kuramoto H, Iguchi A, Kinukawa N; Kyushu University Urological Oncology Group. (2008) Prevention of recurrence with epirubicin and *Lactobacillus casei* after transurethral resection of bladder cancer. *J Urol*. 179(2): 485-490.

Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K, Morita J, Iwamoto S, Miyazaki A, Yoshida H. (2007) Bacillus Calmette-Guérin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol*. 14(6): 532-538.

Nicholson S, Guile K, John J, Clarke IA, Diffley J, Donnellan P, Michael A, Szlosarek P, Dalglish AG. (2003) A randomized phase II trial of SRL172 (*Mycobacterium vaccae*) +/- low-dose interleukin-2 in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res*. 13(4): 389-393.

Nigou J, Zelle-Rieser C, Guilleron M, Thurnher M, Puzo G. (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol*. 166: 7477-8485.

Nigou J, Guilleron M, Puzo G. (2003) Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie*. 85: 153-166.

Nishimoto N, Kishimoto T. (2006) Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2(11): 619-626.

- Nolan M. (2012) EMEA approved new drugs: Vinflunine. *Eur J Hosp Pharm.* 19: 26-27.
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17(25): 3237-3245.
- O'Brien ME, Saini A, Smith IE, Webb A, Gregory K, Mendes R, Ryan C, Priest K, Bromelow KV, Palmer RD, Tuckwell N, Kennard DA, Souberbielle BE. (2000) A randomized phase II study of SRL172 (*Mycobacterium vaccae*) combined with chemotherapy in patients with advanced inoperable non-small-cell lung cancer and mesothelioma. *Br J Cancer.* 83(7): 853-857.
- O'Brien ME, Anderson H, Kaukel E, O'Byrne K, Pawlicki M, Von Pawel J, Reck M; SR-ON-12 Study Group. (2004) SRL172 (killed *Mycobacterium vaccae*) in addition to standard chemotherapy improves quality of life without affecting survival, in patients with advanced non-small-cell lung cancer: phase III results. *Ann Oncol.* 15(6): 906-914.
- Oddens JR, van der Mijden AP, Sylvester R. (2004) One immediate portoperative instillation of chemotherapy in low risk Ta, T1 bladder cancer patients. Is it always safe? *Eur Urol.* 46(3):336-338.
- O'Donnell MA, Luo Y, Hunter SE, Chen X, Hayes LL, Clinton SK. (2004) Interleukin-12 immunotherapy of murine transitional cell carcinoma of the bladder: dose dependent tumor eradication and generation of protective immunity. *J Urol.* 171(3): 1330-1335.
- Ojea A, Nogueira JL, Solsona E, Flores N, Gómez JM, Molina JR, Chantada V, Camacho JE, Piñeiro LM, Rodríguez RH, Isorna S, Blas M, Martínez-Piñeiro JA, Madero R; CUETO Group (Club Urológico Español De Tratamiento Oncológico). (2007) A multicentre, randomised prospective trial comparing three intravesical adjuvant therapies for intermediate-risk superficial bladder cancer: low-dose bacillus Calmete-Guerin (27 mg) versus very low-dose bacillus Calmette-Guerin (13.5 mg) versus mitomycin C. *Eur Urol.* 52(5):1398-1406.
- Okamoto M, Hattori K, Oyasu R. (1997) Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 72(1): 149-154.
- Okamoto M, Sato M. (2003) Toll-like receptor signaling in anti-cancer immunity. *J Med Invest.* 50(1-2): 9-24.
- Oosterlinck W, Kurth KH, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R. (1993) A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol.* 149(4): 749-752.
- Ord JJ, Streeter E, Jones A, Le Monnier K, Cranston D, Crew J, et al. (2005) Phase I trial of intravesical suramin in recurrent superficial transitional cell bladder carcinoma. *Br J Cancer.* 92(12): 2140-2147.
- Ortalo-Magné A, Lemassu A, Lanéelle M-A, Bardou F, Silve G, Gounon P, Marchal G, Daffé M. (1996) Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J Bacteriol.* 178: 456-461.
- Papageorgiou A, Lashinger L, Millikan R, Grossman HB, Benedict W, Dinney CP, McConkey DJ. (2004) Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in interferon-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Cancer Res.* 64(24): 8973-8979.

- Patel PM, Sim S, O'Donnell DO, Protheroe A, Beirne D, Stanley A, Tourani JM, Khayat D, Hancock B, Vasey P, Dalgleish A, Johnston C, Banks RE, Selby PJ. (2008) An evaluation of a preparation of *Mycobacterium vaccae* (SRL172) as an immunotherapeutic agent in renal cancer. *Eur J Cancer*. 44(2): 216-223.
- Patard JJ, Muscatelli-Groux B, Saint F, Popov Z, Maille P, Abbou C, Chopin D. (1996) Evaluation of local immune response after intravesical bacille Calmette-Guérin treatment for superficial bladder cancer. *Br J Urol*. 78(5): 709-714.
- Patard JJ, Saint F, Velotti F, Abbou CC, Chopin DK. (1998) Immune response following intravesical bacillus Calmette-Guerin instillations in superficial bladder cancer: a review. *Urol Res*. 26: 155-159.
- Patterson AL, Greenberg RE, Weems L, Bahnson R, Wajsman Z, Israel M, Sweatman T, Webber D, Gulfo J. (2000) Pilot study of the tolerability and toxicity of intravesical valrubicin immediately after transurethral resection of superficial bladder cancer. *Urology*. 56(2): 232-235.
- Paul E, Devarajan P. (1998) *Mycobacterium phlei* peritonitis: a rare complication of chronic peritoneal dialysis. *Pediatric nephrology*. 12(1): 67-68.
- Pearl R. (1929) Cancer and tuberculosis. *Am J Hyg*. 9: 97-159.
- Petit-Bertron AF, Pedron T, Gross U, Coppée JY, Sansonetti PJ, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. (2005) Adherence modifies the regulation of gene expression induced by interleukin-10. *Cytokine*. 29(1): 1-12.
- Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, Daffé M, Emile JF, Marchou B, Cardona PJ, de Chastellier C, Altare F. (2008) Foamy macrophages from tuberculosis patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog*. 4(11): e10000204.
- Ping SY, Wu CL, Yu DS. (2010) Sunitinib can enhance BCG mediated cytotoxicity to transitional cell carcinoma through apoptosis pathway. *Urol Oncol*. [Epub ahead of print].
- Pinto R, Saunders BM, Camacho LR, Britton WJ, Gicquel B, Triccas JA. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacille Calmette-Guerin Vaccine. *J Infect Dis*. 33: 1363-1374.
- Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. (2009) The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*. 27(3):289-293.
- Pook SH, Rahmat JN, Esuvaranathan K, Mahendran R. (2007) Internalization of *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin, by bladder cancer cells is cytotoxic. *Oncol Rep*. 18(5): 1315-1320.
- Poppas DP, Pavlovich CP, Folkman J, Voest EE, Chen X, Luster AD, O'Donnell MA. (1998) Intravesical bacille Calmette-Guérin induces the antiangiogenic chemokine interferon-inducible protein 10. *Urology*. 52(2): 268-275.
- Porcelli SA; Modlin RL. (1999) The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol*. 17: 297-329.

- Portillo J, Martin B, Hernandez R, Correas M, Gutierrez J, Del Valle J, Roca A, Vega A, Villanueva A, Gutierrez R. (1997) Results at 43 months' follow-up of a double-blind, randomized, prospective clinical trial using intravesical interferon alpha-2b in the prophylaxis of stage pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 49(2): 187-190.
- Pryor K, Stricker P, Russell P, Golovsky D, Penny R. (1995) Antiproliferative effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha 2b on human bladder cancer cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother*. 41(5): 309-316.
- Punnen SP, Chin JL, Jewett MA. (2003) Management of bacillus Calmette-Guerin (BCG) refractory superficial bladder cancer: results with intravesical BCG and Interferon combination therapy. *Can J Urol*. 10(2): 1790-1795.
- Racoosin EL, Swanson JA. (1989) Macropage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J Exp Med*. 170: 1635-1648.
- Raitanen MP, Lukkarinen O. (1995) A controlled study of intravesical epirubicin with or without alpha 2b-interferon as prophylaxis for recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Finnish Multicentre Study Group. *Br J Urol*. 76(6): 697-701.
- Rajala P, Kaasinen E, Rintala E, Jauhiainen K, Nurmi M, Alfthan O, Lähde M. (1992) Cytostatic effect of different strains of Bacillus Calmette-Guérin on human bladder cancer cells in vitro alone and in combination with mitomycin C and interferon-alpha. *Urol Res*. 20(3): 215-217.
- Rangel C, Niell H, Miller A, Cox C. (1994) Taxol and taxotere in bladder cancer: in vitro activity and urine stability. *Cancer Chemother Pharmacol*. 33(6): 460-464.
- Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. (1987) Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol*. 137(1): 155-158.
- Ratliff TL, McCarthy R, Telle WB, Brown EJ. (1993 (a)) Purification of a mycobacterial adhesin for fibronectin. *Infect Immun*. 61(5): 1889-1894.
- Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. (1993 (b)) T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol*. 150(3): 1018-1023.
- Reale M, Intorno R, Tenaglia R, Feliciani C, Barbacane RC, Santoni A, Conti P. (2002) Production of MCP-1 and RANTES in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 51(2): 91-98.
- Recht J, Martínez A, Torello S, Kolter R. (2000) Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 182: 4348-4351.
- Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*. 431(7004): 84-87.
- Ren H, Dover LG, Islam SL, Alexander DC, Chen JM, Besra GS, Liu J. (2007) Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Mol Microbiol*. 63(5): 1345-1359.
- Revel M. (1992) Growth regulatory functions of IL6 and antitumour effects. *Res Immunol*. 143(7): 769-773.

Ribi E, Milner KC, Granger DL, Kelly MT, Yamamoto K, Brehmer W, Parker R, Smith RF, Strain SM. (1976) Immunotherapy with nonviable microbial components. *Ann N Y Acad Sci.* 277: 228-238.

Rich FJ, Kuhn S, Hyde EJ, Harper JL, Ronchese F, Kirman JR. (2012) Induction of T cell responses and recruitment of an inflammatory dendritic cell subset following tumor immunotherapy with *Mycobacterium smegmatis*. *Cancer Immunol Immunother.* [Epub ahead of print]

Riedel DD, Kaufmann SH. (1997) Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 65: 4620-4623.

Riemensberger J, Böhle A, Brandau S. (2002) IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin. Exp. Immunol.* 127(1): 20-26.

Riggs DR, Tarry WF, DeHaven JI, Sosnowski J, Lamm DL. (1992) Immunotherapy of murine transitional cell carcinoma of the bladder using alpha and gamma interferon in combination with other forms of immunotherapy. *J Urol.* 147(1): 212-214.

Rakshit S, Ponnusamy M, Papanna S, Saha B, Ahmed A, Nandi D. (2012) Immunotherapeutic efficacy of *Mycobacterium indicus pranii* in eliciting anti-tumor T cell responses: critical roles of IFN γ . *Int J Cancer.* 130(4): 865-875.

Rintala E, Jauhiainen K, Kaasinen E, Nurmi M, Alfthan O. (1996) Alternating mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin instillation prophylaxis for recurrent papillary (stages Ta to T1) superficial bladder cancer. Finnbladder Group. *J Urol.* 156(1): 56-59.

Rodriguez-Alvarez M, Mendoza-Hernandez G, Encarnación S, Calva JJ, López-Vidal Y. (2009) Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. *Tuberculosis (Edinb),* 89(2): 126-135.

Rosenkilde MM, Schwartz TW. (2004) The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS.* 112(7-8): 481-495.

Rosevear HM, Lightfoot AJ. (2009) The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev.* 28:345-353.

Rothfuchs AG, Gigliotti D, Palmblad K, Andersson U, Wigzell H, Rottenberg ME. (2001) IFN-alpha beta-dependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. *J Immunol.* 167: 6453-61.

Runyon EH. (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am.* 43: 273-290.

Ryll R, Kumazawa Y, Yano I. (2001) Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids-a review. *Microbiol Immunol.* 45: 801-811.

Saavedra R, Segura E, Leyva R, Esparza LA, López-Marín LM. (2001) Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8: 1081-1088.

- Saban MR, O'Donnell MA, Hurst RE, Wu XR, Simpson C, Dozmorov I, Davis C, Saban R. (2008) Molecular networks discriminating mouse bladder responses to intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG), LPS, and TNF-alpha. *BMC Immunol.* 9:4.
- Saint F, Patard JJ, Groux Muscatelli B, Lefrere Belda MA, Gil Diez de Medina S, Abbou CC, Chopin DK. (1996) Evaluation of cellular tumor rejection mechanisms in peritumoral bladder wall after BCG treatment. *BJU Int.* 88(6): 602-610.
- Saint F, Irani J, Salomon L, Legrand P, Abbou CC, Chopin D. (2001) Urinary leukocytes as a new prognostic marker of therapeutic response and of adverse effects associated with the maintenance treatment with endovesical BCG, for the prophylaxis of superficial bladder tumors. *Prog Urol.* 11(6): 1242-1250.
- Saint F, Patard JJ, Maille P, Soyeux P, Hoznek A, Salomon L, Abbou CC, Chopin DK. (2002) Prognostic value of a T helper 1 urinary cytokine responses after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *J Urol.* 167: 364-7.
- Saint F, Kurth N, Maille P, Vordos D, Hoznek A, Soyeux P, Patard JJ, Abbou CC, Chopin DK. (2003) Urinary IL-2 assay for monitoring intravesical bacillus Calmette-Guérin response of superficial bladder cancer during induction course and maintenance therapy. *Int J Cancer.* 2003 107(3): 434-440.
- Saito H, Watanabe T. (1979) Effect of a bacteriocin produced by *Mycobacterium smegmatis* on growth of cultured tumor and normal cells. *Cancer Res.* 39(12): 5114-5117.
- Saitoh H, Mori K, Kudoh S, Itoh H, Takahashi N, Suzuki T. (2002) BCG effects on telomerase activity in bladder cancer cell lines. *Int J Clin Oncol.* 7(3): 165-170.
- Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Romani R, Herrero M, Gonzalez de Buitrago JM, Navajo JA. (2001) Serial urinary IL-2, IL-6, IL-8, TNFalpha, UBC, CYFRA 21-1 and NMP22 during follow-up of patients with bladder cancer receiving intravesical BCG. *Anticancer Res.* 21(4B): 3041-3047.
- Sanders H, McCue P, Graham SD Jr. (1991) ABO(H) antigens and beta-2 microglobulin in transitional cell carcinoma. Predictors of response to intravesical bacillus Calmette-Guerin. *Cancer.* 67(12): 3024-3028.
- Sandes E, Lodillinsky C, Cwirenbaum R, Argüelles C, Casabé A, Eiján AM. (2007) Cathepsin B is involved in the apoptosis intrinsic pathway induced by Bacillus Calmette-Guérin in transitional cancer cell lines. *Int J Mol Med.* 20(6): 823-828.
- Sänger C, Busche A, Bentien G, Spallek R, Jonas F, Böhle A, Singh M, Brandau S. (2004) Immunodominant PstSI antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a potent biological response modifier for the treatment of bladder cancer. *BMC Cancer.* 26(4): 86.
- Sarosdy MF, Lowe BA, Schellhammer PF, Lamm DL, Graham SD Jr, Grossman HB, See WA, Peabody JO, Moon TD, Flanigan RC, Crawford ED, Morganroth J. (1996) Oral bropirime immunotherapy of carcinoma in situ of the bladder: results of a phase II trial. *Urology.* 48(1): 21-27.
- Sasaki A, Kudoh S, Mori K, Takahashi N, Suzuki T. (1997) Are BCG effects against urinary bladder carcinoma cell line T24 correlated with apoptosis in vitro? *Urol Int.* 59(3): 142-148.
- Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Chevillat J, Gasser T, Grignon DJ, Hofstadter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI. (2004) Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias.

In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARCC Press. pp. 29-34.

Saviola B, Bishai W. (2006) The Genus *Mycobacterium*- Medical. *Prokariotes*. 3: 919-933.

Schamhart DH, De Boer EC, Vleeming R, Kurth KH. (1994) Theoretical and experimental evidence on the use of glycosaminoglycans in BCG-mediated immunotherapy of superficial bladder cancer. *Semin Thromb Hemost*. 20(3):301-9.

Schneider B, Thanhäuser A, Jocham D, Loppnow H, Vollmer E, Galle J, Flad HD, Ulmer AJ, Böhle A. (1994) Specific binding of bacillus Calmette-Guérin to urothelial tumor cells in vitro. *World J Urol*. 12(6): 337-344.

Schoney JS, Sweet L. (2008) The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glicobiology*. 18: 832-841.

Schulze-Röbbecke R, Buchholtz K. (1992) Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 58(6): 1869-1873.

Schwarzer K, Foerster M, Steiner T, Hermann IM, Straube E. (2010) BCG strain S4-Jena: An early BCG strain is capable to reduce the proliferation of bladder cancer cells by induction of apoptosis. *Cancer Cell Int*. 10: 21.

See WA, Zhang G, Chen F, Cao Y, Langenstroer P, Sandlow J. (2009) Bacille-Calmette Guèrin induces caspase-independent cell death in urothelial carcinoma cells together with release of the necrosis-associated chemokine high molecular group box protein 1. *BJU Int*. 103(12): 1714-1720.

See WA, Zhang G, Chen F, Cao Y. (2010) p21 Expression by human urothelial carcinoma cells modulates the phenotypic response to BCG. *Urol Oncol*. 28(5): 526-533.

Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. (2009) Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine*. 27(11): 1710-1716.

Seow SW, Rahmat JN, Mohamed AA, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. (2002) *Lactobacillus* species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than *Mycobacterium bovis* (bacillus Calmette-Guerin). *J Urol*. 168(5): 2236-2239.

Seow SW, Cai S, Rahmat JN, Bay BH, Lee YK, Chan YH, Mahendran R. (2010) *Lactobacillus rhamnosus* GG induces tumor regression in mice bearing orthotopic bladder tumors. *Cancer Sci*. 101(3): 751-758.

Sheikhi A, Nazarian M, Khadem-Al-Melleh A, Nasab NM, Esmaeilzadeh A, Yahaghi N, Sheikhi R. (2008) In-vitro effects of *Mycobacterium bovis* BCG-lysate and its derived heat shock proteins on cytokines secretion by blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients in comparison with healthy controls. *Int Immunopharmacol*. 8(6): 887-892.

Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. (2004) Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a metaanalysis of randomized trials. *BJU Int*. 93(4): 485-490.

- Shemtov MM, Cheng DL, Kong L, Shu WP, Sassaroli M, Droller MJ, Liu BC. (1995) LAK cell mediated apoptosis of human bladder cancer cells involves a pH-dependent endonuclease system in the cancer cell: possible mechanism of BCG therapy. *J Urol.* 154(1): 269-274.
- Sherr CJ. (1996) Cancer cell cycles. *Science.* 274(5293): 1672-1677.
- Shimada S, Yano O, Tokunaga T. (1986) In vivo augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG. *Jpn J Cancer Res.* 77(8): 808-816.
- Shin JS, Park JH, Kim JD, Lee JM, Kim SJ. (1995) Induction of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA in bladders and spleens of mice after intravesical administration of bacillus Calmette-Guérin. *Clin Exp Immunol.* 100(1): 26-31.
- Shin G A, Lee J K, Freeman R, Cangelosi G A. (2008 (a)) Inactivation of *Mycobacterium avium* complex by UV irradiation. *App Environ Microbiol.* 74: 7064-7069.
- Shin DM, Yang CS, Yuk JM, Kim KH, Shin SJ, Takahara K, Lee SJ, Jo EK. (2008 (b)) *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol.* 10(8): 1608-21.
- Shintani Y, Sawada Y, Inagaki T, Hohjimoto Y, Uekado Y, Shinka T. (2007) Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guérin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Int J Urol.* 14(2): 140-146.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer Journal for Clinicians.* 62(1): 10-29.
- Simons MP, Moore JM, Kemp TJ, Griffith TS. (2007 (a)) Identification of the mycobacterial subcomponents involved in the release of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand from human neutrophils. *Infect Immun.* 75(3): 1265-1271.
- Simons MP, Nauseef WM, Griffith TS. (2007 (b)) Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. *Immunol Res.* 39(1-3): 79-93.
- Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. (2008) Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol.* 26(4): 341-345.
- Szliszka E, Mazur B, Zydowicz G, Czuba ZP, Król W. (2009) TRAIL-induced apoptosis and expression of death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in bladder cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 47(4): 579-585.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. (2009) TNM classification of malignant tumors (UICC International Union Against Cancer). Ed 7. New York: Wiley-Blackwell. p. 262-265.
- Stebbing J, Dalglish A, Gifford-Moore A, Martin A, Gleeson C, Wilson G, Brunet LR, Grange J, Mudan S. (2012) An intra-patient placebo-controlled phase I trial to evaluate the safety and tolerability of intradermal IMM-101 in melanoma. *Ann Oncol.* 23(5): 1314-1319.
- Steck PA, Schwartz BA, Rosendahl MS, Gray GR. (1978) Mycolic acids. A reinvestigation. *J Biol Chem.* 253: 5625-5629.
- Stern AS, Magram J, Presky DH. (1996) Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Sci.* 58(8): 639-654.

Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D, Thorson LM. (2004) The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun.* 72(10): 5676-5686.

Strauss M, Lukas J, Bartek J. (1995) Unrestricted cell cycling and cancer. *Nat Med.* 1(12): 1245-1246.

Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Polverini PJ. (1995) Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 210(1): 51-57.

Studer UE, deKernion JB, Lovrekovich H, Lovrekovich L. (1985) Quantitative measurements of humoral immune response in mice to a FANFT induced bladder tumor. *Urol Res.* 13(3): 123-130.

Sur PK, Dastidar AG. (2003) Role of *mycobacterium w* as adjuvant treatment of lung cancer (non-small cell lung cancer). *J Indian Med Assoc.* 101(2): 118-120.

Suttman H, Jacobsen M, Reiss K, Jocham D, Böhle A, Brandau S. (2004) Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol.* 172(4 Pt 1): 1490-1495.

Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, Böhle A, Brandau S. (2006) Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res.* 66(16): 8250-8257.

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. (2002) Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 168(5): 1964-1970.

Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. (2004) A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a metaanalysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 171(6 Pt 1): 2186-2190.

Sylvester RJ. (2009) Bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for the treatment of intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer: the debate continues. *Eur Urol.* 56: 266-268.

Sylvester RJ. (2010) Bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Urol.* 18(2): 113-120.

Takahashi T, Kushiro A, Nomoto K, Uchida K, Morotomi M, Yokokura T, Akaza H. (2001) Antitumor effects of the intravesical instillation of heat killed cells of the *Lactobacillus casei* strain Shirota on the murine orthotopic bladder tumor MBT-2. *J Urol.* 166(6): 2506-2511.

Takeda K, Akira S. (2005) TIR-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 17(1): 1-14.

Tenu JP, Sekkaï D, Yapo A, Petit JF, Lemaire G. (1995) Phosphatidylinositolmannoside-based liposomes induce no synthase in primed mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 208: 295-301.

- Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Möhrle K, Cecchini MG, Studer UE. (2000) Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guérin. *J Urol.* 164(6): 2129-2133.
- Thanhäuser A, Böhle A, Flad HD, Ernst M, Mattern T, Ulmer AJ. (1993) Induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cells against human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Immunol Immunother.* 37(2): 105-111.
- Thanhäuser A, Böhle A, Schneider B, Reiling N, Mattern T, Ernst M, Flad HD, Ulmer AJ. (1995) The induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type-1 cells. *Cancer Immunol Immunother.* 40(2): 103-108.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science.* 281: 1312-6.
- Tian XX, Li A, Zhou W, Farrugia IV, Groves MJ. (1999) Isolation and biological activities of an antineoplastic protein-polysaccharide complex (PS4A) obtained from *Mycobacterium vaccae*. *Anticancer Res.* 19(1A):237-243.
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* 72(4): 955-962.
- Tortoli E. (2003) Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 16: 319-354.
- Tortoli E. (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48: 159-178.
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. (2000) Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun.* 68(12): 6883-6890.
- Tubaro A, Velotti F, Stoppacciaro A, Santoni A, Vicentini C, Bossola PC, Galassi P, Pettinato A, Morrone S, Napolitano T, Frati L, Ruco L, Franks CR, Palmer PA, Pourreau CN, Miano L. (1991) Continuous intra-arterial administration of recombinant interleukin-2 in low-stage bladder cancer. A phase IB study. *Cancer.* 68(1): 56-61.
- Uchio EM, Linehan WM, Figg WD, Walter MM. (2003) A phase I study of intravesical suramin for the treatment of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 169: 357-360.
- Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, Kawata T, Azuma I, Toyoshima K, Seya T. (2003) Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin peptidoglycan. *Infect Immun.* 71(8): 4238-4249.
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. (1999) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(25): 14459-14463.
- Valero-Guillén PL, Pacheco F, Martín-Luengo F. (1985) Fatty acid composition and mycolic acid pattern of some chromogenic mycobacteria. *J Appl Bacteriol.* 59(2): 113-126.

van der Heijden AG, Jansen CF, Verhaegh G, O'Donnell MA, Schalken JA, Witjes JA. (2004) The effect of hyperthermia on mitomycin-C induced in four human bladder cancer cell lines. *Eur Urol.* 46(5): 670-674.

van der Meijden AP, Steerenberg PA, van Hoogstraaten IM, Kerckhaert JA, Schreinemachers LM, Harthoorn-Lasthuizen EJ, Hagens AM, de Jong WH, Debruijne FM, Ruitenberg EJ. (1989) Immune reactions in patients with superficial bladder cancer after intradermal and intravesical treatment with bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunol Immunother.* 28(4): 287-295.

van der Meijden AP, Brausi M, Zamboni V, Kirkels W, de Balincourt C, Sylvester R; Members of the EORTC Genito-Urinary Group. (2001) Intravesical instillation of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid for intermediate and high risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: a European Organization for Research and Treatment of Cancer genito-urinary group randomized phase III trial. *J Urol.* 166(2): 476-481.

van der Meijden AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W, Hoeltl W, Bono AV; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. (2003) Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase II Trial. *Eur Urol.* 44(4): 429-434.

van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, Witjes JA, Zlotta AR. (2009) Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment of bladder cancer. *Eur Urol.* 56(3): 430-442.

Vercellone A, Nigou J, Puzo G. (1998) Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. *Front Biosci.* 3:e149-e163.

Vosika G, Giddings C, Gray GR. (1984) Phase I study of intravenous mycobacterial cell wall skeleton and trehalose dimycolate attached to oil droplets. *J Biol Response Mod.* 3(6): 620-626.

Vesosky B, Turner OC, Turner J, Orme IM. (2004) Gamma interferon production by bovine gamma delta T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. *Infect Immun.* 72(8): 4612-4618.

Villeneuve C, Etienne G, Abadie V, Montrozier H, Bordier C, Laval F, Daffe M, Maridonneau-Parini I, Astarie-Dequeker C. (2003) Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification as a novel family of glycopeptidolipids. *J Biol Chem.* 278(51): 51291-300.

Wang R, Klegerman ME, Marsden I, Sinnott M, Groves MJ. (1995) An anti-neoplastic glycan isolated from *Mycobacterium bovis* (BCG vaccine). *Biochem J.* 311: 867-872.

Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL. (1996) Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem.* 60(1): 47-55.

Watanabe M, Ohta A, Sasaki A-I, Minnikin DE. (1999) Structure of a new glycolipid from the *Mycobacterium avium* – *Mycobacterium intracellulare* complex. *J Bacteriol.* 181(7): 2293-2297.

Watanabe E, Matsuyama H, Matsuda K, Ohmi C, Tei Y, Yoshihiro S, Ohmoto Y, Naito K. (2003) Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Immunol Immunother.* 52(8): 481-486.

Wayne LG, Kubica GP. (1986) The mycobacteria. Int: Holt JG, Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME. (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore MD. pp. 1435-1457.

Weiss GR, O'Donnell MA, Loughlin K, Zonno K, Laliberte RJ, Sherman ML. (2003) Phase 1 study of the intravesical administration of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Immunother.* 26(4): 343-348.

Witjes JA, Caris CT, Mungan NA, Debruyne FM, Witjes WP. (1998) Results of a randomized phase III trial of sequential intravesical therapy with mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C alone in patients with superficial bladder cancer. *J Urol.* 160(5): 1668-1671.

Witjes WP, König M, Boeminghaus FP, Hall RR, Schulman CC, Zurlo M, Fittipaldo A, Riggi M, Debruyne FM. (1999) Results of a European comparative randomized study comparing oral bropirimine versus intravesical BCG treatment in BCG-naive patients with carcinoma in situ of the urinary bladder. European Bropirimine Study Group. *Eur Urol.* 36(6): 576-581.

Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, Kabelitz D, Wesch D. (2007) Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol.* 66(2-3): 320-328.

Wu CW, Schmoller SK, Bannantine JP, Eckstein TM, Inamine JM, Livesey M, Albercht R, Talaat AM. (2009) A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microb Pathog.* 46: 222-230.

www.aecc.es

www.bacterio.cict.fr (List of published names of mycobacteria.2012)

www.cancer.gov

Xiao Z, Hanel E, Mak A, Moore RB. (2011) Antitumor efficacy of intravesical BCG, gemcitabine, interferon- α and interleukin-2 as mono- or combination-therapy for bladder cancer in an orthotopic tumor model. *Clin Med Insights Oncol.* 5: 315-323.

Yamada H, Kuroda E, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. (2002) Prostaglandin E2 down-regulates viable Bacille Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cancer cell MBT-2 in vitro. *Clin Exp Immunol.* 128(1): 52-58.

Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, Arakawa T, Kaneda K, Yano I. (2001) Trehalose 6,6'-dymicolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body-and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun.* 69: 176-182.

Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. (1992) Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol.* 148(12): 4072-4076.

Yarkoni E, Goren MB, Rapp HJ. (1979) Effect of sulfolipid I on trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor) toxicity and antitumor activity. *Infect Immun.* 24(2): 586-588.

- Yarkoni E, Rapp HJ. (1980) Immunotherapy of experimental cancer by intralesional injection of emulsified nonliving mycobacteria: comparison of *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium phlei*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Infect Immun*. 28(3): 887-892.
- Young SL, Murphy M, Zhu XW, Harnden P, O'Donnell MA, James K, Patel PM, Selby PJ, Jackson AM. (2004) Cytokine-modified *Mycobacterium smegmatis* as a novel anticancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 112(4): 653-660.
- Yu J, Tran V, Li M, Huang X, Niu C, Wang D, Zhu J, Wang J, Gao Q, Liu J. (2012) Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun*. 80(4): 1381-1389.
- Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Maekawa T, Kimura S. (2009) Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunother*. 58(4): 493-502.
- Yuksel (2011) Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *J Mol Microbiol*. 20: 24-28.
- Yutkin V, Chin J. (2012) Apaziquon as an intravesical therapeutic agent for urothelial non-muscle-invasive bladder cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 21(2): 251-260.
- Zbar B, Ribi E, Meyer T, Azuma I, Rapp HJ. (1974) Immunotherapy of cancer: regression of established intradermal tumors after intralesional injection of mycobacterial cell walls attached to oil droplets. *J Natl Cancer Inst*. 52(5): 1571-1577.
- Zaharoff DA. (2009) Intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer with chitosan/Interleukin-12. *Cancer Res*. 69: 6192-6199.
- Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van den Brandt PA. (2000) The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*. 89(3): 630-639.
- Zeegers MP, Swaen GM, Kant I, Goldbohm RA, van den Brandt PA. (2001) Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med*. 58(9): 590-596.
- Zhang L, Goren MB, Holzer TJ, Andersen BR. (1988) Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect Immun*. 56: 2876-2883.
- Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K. (1997) Effects of bacillus Calmette-Guèrin and interferon-alpha-2B on human bladder cancer in vitro. *Int J Cancer*. 71(5): 851-857.
- Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K. (1999) Effects of bacillus Calmette-Guèrin and interferon-alpha-2B on cytokine production in human bladder cancer cell lines. *J Urol*. 161(3): 977-983.
- Zhang GJ, Crist SA, McKerrow AK, Xu Y, Ladehoff DC, See WA. (2000) Autocrine IL-6 production by human transitional carcinoma cells upregulates expression of the alpha5beta1 fibronectin receptor. *J Urol*. 163 (5): 1553-1559.
- Zhao W, Schorey JS, Bong-Mastek M, Ritchey J, Brown EJ, Ratliff TL. (2000) Role of a bacillus Calmette-Guèrin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. *Int J Cancer*. 86(1): 83-88.

Zincke H, Benson RC Jr, Hilton JF, Taylor WF. (1985) Intravesical thiotepa and mitomycin C treatment immediately after transurethral resection and later for superficial (stages Ta and Tis) bladder cancer: a prospective, randomized, stratified study with crossover design. *J Urol.* 134(6): 1110-1114.

Zlotta AR, Drowart A, Huygen K, De Bruyn J, Shekarsarai H, Decock M, Pirson M, Jurion F, Palfliet K, Denis O, Mascart F, Simon J, Schulman CC, Van Vooren JP. (1997) Humoral response against heat shock proteins and other mycobacterial antigens after intravesical treatment with bacille Calmette-Guérin (BCG) in patients with superficial bladder cancer. *Clin Exp Immunol.* 109(1): 157-165.

Zlotta AR, Drowart A, Van Vooren JP, Shekarsarai H, De Cock M, Pirson M, Palfliet K, Jurion F, Simon J, Schulman CC, Huygen K. (1998) Superficial bladder tumors and increased reactivity against mycobacterial antigens before bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol.* 159(6): 1885-1891.

Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, Drowart A, Decok M, Pirson M, Jurion F, Palfliet K, Denis O, Simon J, Schulmann CC. (2000 (a)) What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy? Ares six weekly instillations necessary? *Eur Urol.* 37(4): 470-477.

Zlotta AR, Van Vooren JP, Denis O Drowart A, Daffé M, Lefèvre P, Schandene L, De Cock M, De Bruyn J, Vandebussche P, Jurion F, Palfliet K, Simon J, Schulman CC, Content J, Huygen K. (2000 (b)) What are the immunologically active components of bacille Calmette-Guérin in therapy of superficial bladder cancer? *Int J Cancer.* 87: 844-852.

ANNEX

ANNEX

Els articles següents descriuen i discuteixen part dels resultats d'aquesta tesi doctoral:

- I. **Secanella-Fandos S**, Luquin M, Julián E. (2012) Connaught and Russian showed the highest direct antitumoral effects among different BCG substrains. *Journal of Urology*. [in press].

- II. **Secanella-Fandos S**, Luquin M, Pérez-Trujillo M, Julián E. (2011) Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium confluentis* using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B*. 879(26): 2821-2826.

Aquesta tesi a estat la base d'una patent sol·licitada a l'Agència Espanyola de Patents amb data del 26 de juliol de 2012.

Article I

- I. **Secanella-Fandos S**, Luquin M, Julián E. (2012) Connaught and Russian showed the highest direct antitumoral effects among different BCG substrains. *Journal of Urology* [in press].

Connaught and Russian showed the highest direct antitumoral effects among different BCG substrains

Silvia Secanella-Fandos, Marina Luquin, and Esther Julián*

From the Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain.

*Correspondence: Esther Julián, PhD; Departament de Genètica i de Microbiologia; Universitat Autònoma de Barcelona; Facultat de Biociències; 08193 Bellaterra; Barcelona; Spain. E-mail: esther.julian@uab.cat; Tel.: (+34) 93 581 2540; FAX: (+34) 93 581 2387

Running Title: Differential direct antitumor activity among BCG strains

Key Words: bladder cancer, *Mycobacterium bovis* BCG, urothelial cell line.

ABSTRACT

Purpose: Evolutionarily early and late BCG substrains are genetically distinct, displaying different antigenic determinants. While it has been suggested that this fact may influence the immunostimulatory effects of BCG as a vaccine in the context of tuberculosis, the impact of these genetic differences on the antitumor activity of BCG remains unknown. Here, the direct antitumor capacity and the ability to trigger cytokine production of eight evolutionarily early and late BCG substrains on urothelial bladder cancer cell lines were compared.

Material and Methods: The T24, J82 and RT4 bladder tumor cell lines were cultured with different doses of three evolutionarily early BCG substrains (Japan, Moreau and Russian) and five evolutionarily late strains (Connaught, Danish, Glaxo, Phipps, and Tice). Both inhibition of cell proliferation at different time points and the production of interleukin (IL)-6 and IL-8 in cell culture supernatants were measured.

Results: For T24 and J82 cells, Russian and Connaught induced the highest inhibition of cell proliferation and cytokine production, triggering values up to three-fold higher than the other BCG strains. In contrast, Glaxo and Phipps (for T24 cells) and Glaxo and Tice (for J82 cells) were the least efficacious. For RT4, all BCG strains inhibited cell proliferation to a similar extent and induced low levels of only IL-8 except for Danish and Glaxo strains, which were less efficacious.

Conclusions: Russian and Connaught, evolutionarily early and late substrains, respectively, are the most efficacious BCGs for both inhibition of cell proliferation and induction of cytokine production. Glaxo was the least efficacious strain.

INTRODUCTION

Intravesical *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy for superficial bladder cancer remains the most successful currently used immunotherapy. Indeed, BCG therapy is the treatment of choice for high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer for preventing recurrence and progression.¹

Currently, various commercially available BCG substrains are used worldwide, although each substrain possesses specific characteristics based on their history. Starting in 1921, when BCG was initially used as a vaccine, it was distributed from the Pasteur Institute around the world. Lyophilized seed lots of BCG were not made until 1960. Then, multiple passages of BCG were made in each laboratory to preserve viable bacteria. Consequently, insertions and deletions accumulated in the genomes of these strains (fig. 1). Today, molecular biology techniques allow the different substrains and *M. bovis* to be sequenced completely and compared, allowing the identification of the molecular basis of attenuation in BCG and the genetic variability among the daughter strains. In accordance with these genetic characteristics, BCG substrains have been divided into early (Russian, Moreau, Japan, Sweden, Birkhaug) and late strains (Danish, Glaxo, Tice, Connaught, Phipps, Frappier, Prague, Pasteur). Moreover, biochemical properties and differing antigenic determinants have been described among the different BCG substrains, including the lipidic and glycolipidic content of the mycobacterial cell wall.²⁻⁵

In tuberculosis, there has been a wide range of research attempting to assess the impact of these differences on the efficacy of BCG as a vaccine.⁶ There is data from *in vitro*,⁴ *ex vivo*, and *in vivo* animal and human studies to indicate that different antigenic determinants do result in differences in immunological activity between strains. However, the results are controversial. Some authors have reported that evolutionarily early strains induce a higher Th-1 pro-inflammatory response than late strains, suggesting that early strains trigger better protection against tuberculosis disease.⁷ However, other research has found no relationship between evolutionary patterns and protection.⁸

In bladder cancer immunotherapy, different strains are also used, but the impact of the differences between evolutionarily early and late substrains on BCG direct antitumor capacity has been investigated very little. To the best of our knowledge, only one very recently published paper⁹ has compared the ability of one early and one late BCG substrain to inhibit tumor proliferation, finding the best results with the early substrain. In view of this paucity of data, we aimed to compare the inhibition of cell proliferation and induction of cytokine production by eight different evolutionarily early and late BCG substrains in different human cancer cell lines, which represent a spectrum of aggressiveness. Furthermore, we have correlated the different levels of activity to the different cell wall antigens present in each substrain.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

M. bovis BCG Connaught (ATCC 35745), BCG Phipps (ATCC 35744) and BCG Tice (ATCC 27289) strains were purchased from Aventis Pasteur Laboratories (ImmuCyst), from the Spanish Type Culture Collection, and from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, respectively. BCG Russian, Moreau and Danish and BCG Glaxo and Japan strains were kindly given to us by Dr. Carlos Martin (Zaragoza, Spain) and by Dr. Jun Liu (Toronto, Canada), respectively. *Escherichia coli* (ATCC 10536) was used as a negative control.

All BCG strains were grown on Middlebrook 7H10 agar (Difco Laboratories, Surrey, UK) supplemented with 10% oleic-albumin-dextrose-catalase enrichment medium at 37°C for 2 weeks. *E. coli* was grown on Tryptic Soy Agar (TSA; Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) at 37°C for 1 day.

Analysis of cell wall surface lipids and glycolipids

The analysis of lipids and glycolipids was conducted as described previously.¹⁰

Cell culture

The human transitional carcinoma cell lines T24, J82 and RT4, which represent histopathological tumor grades 3, 3 and 1, respectively, were kindly provided by the Cancer Cell Line Repository of the Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (as part of a Cooperative Cancer Research Network [RTICC] project funded by the Spanish Health Ministry, C03/010). Cell monolayers were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12

nutrient mixture (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza, Switzerland), containing 100 U/ml penicillin G (Lab ERN, Barcelona, Spain) and 100 µg/ml streptomycin (Lab Reig Jofre, Barcelona, Spain) (complete medium), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Growth inhibition experiments

For infection experiments, suspensions of bacterial cells were prepared as described previously.¹¹ Three x 10⁴ tumor cells were seeded in triplicate into 96-well tissue culture plates, infected after 3 hours with one of the BCG substrains or *E. coli* at different multiplicities of infection (MOI), and incubated at 37°C for 3 hours. Extracellular bacteria were removed by washing each well three times in warm PBS. Complete medium was then added to each well and incubated at 37°C with an atmosphere of 5% CO₂. The effects of BCGs or *E. coli* infection on tumor cells were monitored at different time points post-infection. Non-infected control cultures were always included, and all experiments were repeated at least three times.

For cytokine-induced cell inhibition experiments, the T24 cell line was cultured as described above with or without increasing concentrations of human recombinant interleukin-6 (IL-6) and/or IL-8 (BD Pharmingen, San Diego, CA).

Cell proliferation assay

Cell viability was assessed using a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (Sigma, St. Louis, MO). Briefly, after removing culture supernatants for cytokine analysis, 10% of MTT in

complete medium was added and incubated for 3 hours at 37°C. After removing the medium, water-insoluble dark blue formazan was dissolved by adding acidic isopropanol. Absorbance was measured at 550 nm (Tecan, Switzerland).

Analysis of cytokines

At different time points after infection, cell culture supernatants were harvested, centrifuged, and stored at -40°C until used. IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels were determined using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (for IL-6 and IL-8 from BD; and for TNF- α from Mabtech, Nacka Strand, Sweden) according to the manufacturer's instructions. All samples were assayed in duplicate.

BCG viability in infected cultures

Colony-forming units (CFU) were measured at different time points post-infection for the T24 cell line as described previously.¹¹

Statistical analysis

The statistical significance of the differences between cytokine levels and growth inhibition among the different BCG strains was assessed using Student's *t*-tests (SigmaStat, SPSS, Chicago, IL). Differences were considered significant when *p* was < 0.05.

RESULTS

Differential production of mycolic acids, lipids and glycolipids between BCG strains

BCG substrains have different patterns of antigenic determinants. Three mycolates (MA)— α -, methoxy- and keto-MA—were observed in the early BCG substrains studied (supplementary fig. 1, lines 1-3),

whereas methoxy-MA was absent in the late BCG substrains (lines 4-8). With respect to the free lipid and glycolipid content, four BCG strains (Russian, Danish, Connaught and Phipps) were found to produce phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and phenoglycolipid (PGL), whereas neither of these compound types were observed with Japan, Moreau and Glaxo substrains (supplementary fig. 2-3). Lastly, the Tice substrain showed a different pattern with PDIMs but no PGLs (supplementary fig. 2, plate 6; and supplementary fig. 3, lane 6).

All BCG strains produced similar levels of trehalose-dimycolate (TDM), trehalose-monomycolate (TMM), phosphatidylinositol mannosides (PIMs), and phospholipids (data not shown). Overall, there were no marked differences in these compounds among the BCG substrains examined (fig. 1).

BCG Russian and Connaught were the most efficacious in inducing tumor growth inhibition

As observed in figure 2, antiproliferative activity was both time- and MOI-dependent in all cases. Increasing MOI doses (up to five-fold) and longer incubation periods were analyzed without detecting higher growth inhibition levels (data not shown).

The antitumor effect of each BCG substrain depends on the cancer cell line studied. As figure 3 shows, the three evolutionarily early strains, Russian, Moreau and Japan, and the evolutionarily late BCG Connaught induced the highest inhibition of T24 cell proliferation with values approximately 43-50%. In contrast, both Glaxo (*p* < 0.01) and Phipps (*p* < 0.05) were statistically less

efficacious in reducing tumor growth, with values of approximately 27% inhibition, except when compared to the Tice strain, for which the differences were not statistically significant.

For the J82 cell line (fig. 3), BCG Russian and Connaught had the strongest inhibitory effect on cell growth (40-45% inhibition values). In contrast, both BCG Glaxo and Tice demonstrated notably lower inhibition activity (31% of inhibition). Nevertheless, BCG Connaught was the only strain that showed a significantly different capacity to inhibit tumor growth compared to the other substrains ($p < 0.01$, except against Russian).

Finally, most BCG strains inhibit RT4 cell proliferation to a similar extent (18-22%) at 72 hours post-infection, with the exception of the Danish and Glaxo strains, which were observed to be less efficacious (values of 13-14%) (fig. 3).

BCG Russia and Connaught triggered the highest cytokine production among the BCG substrains studied

Following the same pattern as growth inhibition, production of cytokines was also dose- and time-dependent (data not shown). Most BCG strains triggered a statistically significant increase in IL-8 production in T24 and J82 cell lines compared to basal levels produced by non-infected cells ($p < 0.01$) (fig. 4A). In both of these cell lines, Russian and Connaught infection induced the highest IL-8 production (fig. 4A), while Glaxo and Tice were the least efficacious. In the case of the RT4 cell line, IL-8 production was higher in BCG-infected cells than in non-infected cells ($p < 0.01$) with the exception of Glaxo-

infected cells. Russian, Phipps and Connaught strains were the most effective at inducing IL-8 release (fig. 4A).

Although there was constitutive production of IL-6, infection with BCGs up-regulated IL-6 production in high grade T24 and J82 cell lines ($p < 0.01$, compared to non-infected cells), (fig. 4B). BCG Russian and Connaught were the most effective at triggering IL-6 release in T24 and J82 cells as well as the Phipps strain for J82 cells. In contrast, Tice and Glaxo were the least effective at inducing IL-6 production in both cell lines (fig. 4B). In no case was IL-6 detected in RT4 cultures.

E. coli also induced IL-6 and IL-8 production in all tumor cell lines studied. In no case was TNF- α detected (data not shown).

IL-6 and IL-8 inhibit tumoral growth

As figure 5 shows, both IL-6 and IL-8 inhibit tumoral growth in a dose-dependent manner. When both interleukins were together at low concentrations, a synergistic effect on growth inhibition was observed, but, at higher concentrations, the inhibition was increased only with respect to IL-8 dose alone.

All BCG substrains survive in the T24 cell line

As figure 6 shows, all BCG strains were internalized in the T24 cell line to a similar extent at 3 hours post-infection ($p > 0.05$). However, at 72 hours post-infection, the rate of survival of Tice and Moreau was significantly lower than most of the other strains ($p < 0.05$) with the exception of Glaxo and Connaught. Japan was the only substrain that showed statistically

significant differences between 3 and 72 hours post-infection (fig. 6).

DISCUSSION

Our first notable finding is that all BCGs had direct antitumor activity, but each substrain displayed different behaviors. Russian and Connaught, evolutionarily early and late substrains, respectively, had the greatest cytostatic activity in the T24 and J82 cell cultures, while the early strain Glaxo was found to be the least efficacious. In the RT4 cell line, Glaxo was again the substrain that induced the weakest inhibition of cell proliferation.

As far we know, only two previous studies have evaluated the direct antitumor ability of different BCGs. Very recently, an early strain (S4-Jena) and a late BCG strain (Tice) were compared. The authors showed that the early strain had greater cytotoxic ability than the late strain using T24 cells.⁹ Previously, the cytostatic activity of five different evolutionarily late BCG substrains was evaluated, also in T24 cells.¹² In agreement with our results, the Connaught substrain was found to be the most efficacious, but a level of growth inhibition greater than that indicated by our results was reported.¹² This difference can be attributed to the *in vitro* infection conditions. In both previous studies, BCG was left in contact with tumor cells until cell proliferation was measured. However, in our study, non-internalized bacteria were washed away 3 hours post-infection, mimicking an *in vivo* setting.

The second finding of note is that BCG strains that induced greater inhibition of proliferation also induced higher production

of cytokines. These results, in agreement with previous studies,^{13,14} indicate that urothelial cells participate in this BCG-induced cytokine production.

Production of cytokines are critical for BCG action.¹⁵ The production of the chemokine IL-8 results in the infiltration of polymorphonuclear cells into the bladder wall, limiting the spread of BCG and activating the host immune response. The presence of IL-8 in urine after instillation has been related to immune responsiveness in patients and a better prognosis with BCG treatment.^{16,17} The favorable role of IL-6 in cancer biology is unclear.¹⁸ However, particularly in bladder cancer, the negative effects of IL-6 (promoting the Th2 response) after bladder BCG instillation are thought to be prevented by high production of IFN- γ and the absence of IL-4 production.¹⁹ Moreover, IL-6 up-regulates the expression of the 5 α 1 integrin-receptor, which is directly implicated in BCG attachment to the urothelial surface.^{20,21}

Our experiments also suggest a possible role for recombinant IL-6 and IL-8 in growth inhibition (fig. 5). Despite this, increased production of cytokines can only be responsible in part for growth inhibition because *E. coli* infection also induced cytokine release at levels similar to some of the BCG strains, but no effects on tumoral growth were observed. *E. coli*-induced cytokine production has been related to the release of soluble factors by *E. coli* cells.²² Moreover, the mechanisms by which *E. coli* interacts with bladder cells are different from those used by BCG.²³ These data suggest that *E. coli* and BCG can

differentially activate cytokine production and/or the release of other factors implicated in cellular growth inhibition. Moreover, the potential for other antitumoral mechanisms cannot be discarded.

Our results also show that RT4 cells are more refractory to BCG treatment than grade 3 tumor cell lines, despite identical infection conditions. Indeed, a correlation between BCG direct antitumor effects, the production of IL-6, and histopathological tumor grade has been reported. For instance, a well-differentiated cell line (RT4) did not internalize BCG, and this was associated with the non-production of IL-6.^{24,25} In contrast, experiments using anti-BCG antibodies and cytochalasin B, a drug inhibiting phagocytosis, have shown that internalization of BCG is necessary in poorly differentiated cell lines (such as T24) for up-regulation of IL-6 synthesis.²⁵ Although growth inhibition and production of IL-6 varied as a function of the BCG substrain used for infection in our experiments, interestingly, we did not observe statistically significant differences in the levels of live bacteria internalized in T24 cells (fig. 6). Thus, apart from internalization of the bacteria, other factors seem to be involved in IL-6 production.

Production of cytokines is modulated by bacterial antigens. Accordingly, we wonder whether Russian and Connaught, although they have different evolutionary histories, have a common antigenic profile. Mycobacteria are characterized by rich lipid and glycolipid content. In fact, the cell wall is one of the most active BCG subcomponents that enhances cytotoxicity against tumor cell lines.²⁶ Lipidic and

glycolipidic antigens have been implicated in triggering the production of nitric oxide and cytokines in lung epithelial cells and macrophages.⁴ Specifically, TDM, which is a trehalose molecule esterified by two mycolic acids, enhances the production of cytokines in macrophages.^{4,27} Evolutionarily early substrains exhibited higher synergistic effects with IFN- γ on the production of inflammatory cytokines (such as IL-6 and IL-8) in macrophages than evolutionarily late substrains. The differences among BCG strains have been related to the mycolic acid composition of TDM. Mycolic acids are important components of the unique cell wall of mycobacteria. TDM from evolutionarily early substrains produces methoxymycolates, whereas evolutionarily late substrains are devoid of methoxymycolates⁶ (fig. 1). Other studies have also shown that mycolates modulate cytokine production in macrophages.²⁷ It has therefore been suggested that methoxymycolate deficiency reflects the differences in immunogenicity among BCG strains. Similarly, the phenol group on PGL alters cytokine production by macrophages.²⁸ Subsequently, we hypothesized that these antigens could also be implicated in cytokine production by bladder epithelial cells.

However, when we attempted to correlate the lipid profile to the antitumor activity of each substrain, we did not find any association. Overall, our study of lipid antigens did not reveal any obvious candidates that would explain the different antitumor activity of these strains, in contrast to findings in lung epithelial cells or macrophages cultures. In fact, we did not

find any other characteristic/antigenic profile shared only by Russian and Connaught substrains,²⁻⁵ Despite the results obtained, a possible role for these antigens in the BCG-induced immune response *in vivo* cannot be discarded.

The use of different strains remains a matter of controversy. Until now, it has been difficult to draw conclusions from results obtained in clinical trials, not only because the strain used varies but also because the BCG dose, tumor type, length of the treatment, additional chemotherapy, and patient clinical status, among other factors, vary as well. Lack of comparability between these other conditions in clinical studies to date may have masked differences in the antitumor efficacy of each BCG strain. For instance, a meta-analysis of progression suggested similar efficacy levels with the Pasteur, Frappier, Connaught and Tice strains²⁹. However, it has recently been demonstrated that patients treated with the Connaught strain had significantly fewer recurrences than patients treated with Tice³⁰, with the five-year recurrence-free survival rate being 75% and 46%, respectively.

Our *in vitro* results suggest that the use of different BCG strains can lead to different antitumor responses. However, the impact of our data on the clinical outcome of BCG-treated patients is not known. A better understanding of the initial urothelial cell response is needed, but BCG treatment also affects the entire immune system. Based on our results, we believe that further studies using bladder cancer animal models with selected BCG substrains are worthwhile.

CONCLUSION

In conclusion, BCG Russian and Connaught, which are evolutionarily early and late strains, respectively, were found to be the most efficacious for growth inhibition and cytokine production among the group of strains studied, whereas Glaxo was shown to be the least efficacious.

REFERENCES

1. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R et al: EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol* 2011; 59: 997.
2. Behr MA: BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 86.
3. Rodriguez-Alvarez M, Mendoza-Hernandez G, Encarnación S et al: Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89: 126.
4. Hayashi D, Takii T, Fujiwara N et al: Comparable studies of immunostimulating activities *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56: 116.
5. Hayashi D, Takii T, Mukai T et al: Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 306: 103.
6. Liu J, Tran V, Leung AS et al: BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and

- protective efficacy. *Hum Vaccin* 2009; 5: 70.
7. Davids V, Hanekom WA, Mansoor N et al: The effect of bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis* 2006; 193: 531.
 8. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ et al: Commonly administered BCG strains including an evolutionarily early strain and evolutionarily late strain of disparate genealogy induce comparable protective immunity against tuberculosis. *Vaccine* 2007; 27: 441.
 9. Schwarzer K, Foerster M, Steiner T et al: BCG strain S4-Jena: An early BCG strain is capable to reduce the proliferation of bladder cancer cells by induction of apoptosis. *Cancer Cell Int* 2010; 10: 21.
 10. Rodríguez-Güell E, Agustí G, Corominas M et al: The production of a new extracellular putative long-chain saturated polyester by smooth variants of *Mycobacterium vaccae* interferes with Th1-cytokine production. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006; 90: 93.
 11. Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A et al: Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J Bacteriol* 2010; 192: 1751.
 12. Rajala P, Kaasinen E, Rintala E et al: Cytostatic effect of different strains of *Bacillus Calmette-Guérin* on human bladder cancer cells in vitro alone and in combination with mitomycin C and interferon-alpha. *Urol Res* 1992; 20: 215.
 13. Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K: Effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon-alpha-2B on human bladder cancer in vitro. *Int J Cancer* 1997; 71: 851.
 14. Miyazaki J, Kawai K, Oikawa T et al: Uroepithelial cells can directly respond to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin through Toll-like receptor signalling. *BJU Int* 2006; 97: 860.
 15. AHIRWAR DK, MANCHANDA PK, MITTAL RD et al: BCG response prediction with cytokine gene variants and bladder cancer: where we are? *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1729.
 16. de Boer EC, Somogyi L, de Ruyter GJ et al: Role of interleukin-8 in onset of the immune response in intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25: 31.
 17. Shintani Y, Sawada Y, Inagaki T et al: Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guérin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Int J Urol* 2007; 14: 140.
 18. DeMichele A, Martin AM, Mick R et al: Interleukin-6-174G→C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 8051.
 19. Bevers RF, Kurth KH, Schamhart DH: Role of urothelial cells in BCG

- immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 607.
20. Esuvaranathan K, Alexandroff AB, McIntyre M et al: Interleukin-6 production by bladder tumors is upregulated by BCG immunotherapy. *J Urol* 1995; 154: 572.
21. Zhang GJ, Crist SA, McKerrow AK et al: Autocrine IL-6 production by human transitional carcinoma cells upregulates expression of the alpha5beta1 fibronectin receptor. *J Urol* 2000; 163: 1553.
22. de Reijke TM, Vos PC, de Boer EC et al: Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Urol Res* 1993; 21: 349.
23. Schneider B, Thanhäuser A, Jocham D et al: Specific binding of bacillus Calmette-Guérin to urothelial tumor cells in vitro. *World J Urol* 1994; 12: 337.
24. Pook SH, Rahmat JN, Esuvaranathan K et al: Internalization of *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette Guerin*, by bladder cancer cells is cytotoxic. *Oncol Rep* 2007; 18: 1315.
25. Bevers RF, de Boer EC, Kurth KH et al: BCG-induced interleukin-6 upregulation and BCG internalization in well and poorly differentiated bladder cancer cell lines. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 181.
26. Zlotta AR, Van Vooren JP, Denis O et al: What are the immunologically active components of bacille Calmette-Guérin in therapy of superficial bladder cancer? *Int J Cancer* 2000; 87: 844.
27. Dao DN, Sweeney K, Hsu T et al: Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000081.
28. Reed MB, Domenech P, Manca C et al: A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004; 431: 84.
29. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; 168: 1964.
30. Birkhäuser F, Rentsch CA, Studer UE et al: The BCG strain used is relevant for recurrence-free survival: A randomized phase III study comparing Immucyst® versus Oncotice®. 27th Annual Congress of the European Association of Urology 2012; Abstract 962.

Figure 1. Genealogy and phenotypic characteristics of the different BCG substrains studied. The year the strain was obtained has been included for reference. The horizontal axis is not proportional to genetic difference.

MPT64, MPT70, MPT83, antigenic proteins (MPT for *M. tuberculosis*, and the number followed indicates the relative mobility during nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis); PDIM, phthiocerol dimycocerosate; PGL, phenolglycolipid; TMM, trehalose-monomycolate; TDM, trehalose-dimycolate; PIM, phosphatidylinositol mannoside; RD, region of difference *figures 2, 3 and 4 of this paper; **corresponding figures from this work not shown
+, present; -, not present

Figure 2. Inhibition of tumor cell growth by BCG or *E. coli* at different time points post-infection (A, B and C) and at different MOIs (a, b and c).

Results are shown as a percentage of cell survival relative to control cells. Each point represents the mean \pm standard deviation from triplicates. Data are representative of one of three independent experiments.

Figure 3. Effect of BCG substrains and *E. coli* (MOI 12.5:1) on tumor cell growth after 72 hours for T24 and RT4, and 120 hours for J82. Results are shown as a percentage of cell survival relative to control cells.

The results are expressed as mean \pm standard deviation obtained from triplicates. Data are representative of one of three independent experiments.

*, $p < 0.05$ against the rest of BCG strains

Figure 4. IL-8 and IL-6 production by human bladder cancer cell lines stimulated with different BCG strains. Cell lines were cultured either in the medium alone (control cells), with BCG strains or *E. coli* (negative control) (MOI 12.5:1) for 72 hours in T24 and RT4 and 120 hours in J82 cell line.

The results are expressed as mean \pm standard deviation obtained from triplicates. Data are representative of one of three independent experiments.

*, $p < 0.05$ against non-infected cells

Figure 5. Synergistic effects of different doses of recombinant human cytokines on inhibition of T24 proliferation. The four columns on the left show the effects of different levels of recombinant IL-6 on T24 proliferation. The three columns on the right show cytokine synergy at the same doses, which are similar to those found in BCG-infected T24 cultures.

T24 cells were cultured either in the medium alone (control cells) or with increasing concentrations of IL-6 and/or IL-8 for 72 hours.

The results are expressed as the mean \pm standard deviation obtained from triplicates. Data represent one of two independent experiments.

*, $p < 0.05$ against T24 cells without stimuli

Figure 6. Bacteria cell counts inside T24 tumor cell line at 3 and 72 hours after BCG infection (MOI 10:1).

The results are expressed as mean \pm standard deviation obtained from triplicates. Data are representative of one of three independent experiments.

*, $p < 0.05$ against the rest of BCG strains

&, $p < 0.05$ between 3 and 72 hours

Figure 1.

<i>Mycobacterium bovis</i>		Antigens					
		BCG substrains	MPT64 [§]	MPT70 [§] MPT83 [§]	Methoxy- mycolate*	PDIM*	PGL*
1908-1921 - RD1	BCG						
1924	BCG Russian	+	+++	+	+	+	+
1925	BCG Moreau	+	+++	+	-	-	+
- RD2	BCG Japan	+	+++	+	-	-	+
1931	BCG Danish	-	+	-	+	+	+
1954	BCG Glaxo	-	+	-	-	-	+
1934	BCG Tice	-	+	-	+	-	+
1948	BCG Connaught	-	+	-	+	+	+
1938	BCG Phipps	-	+	-	+	+	+

Figure 2.

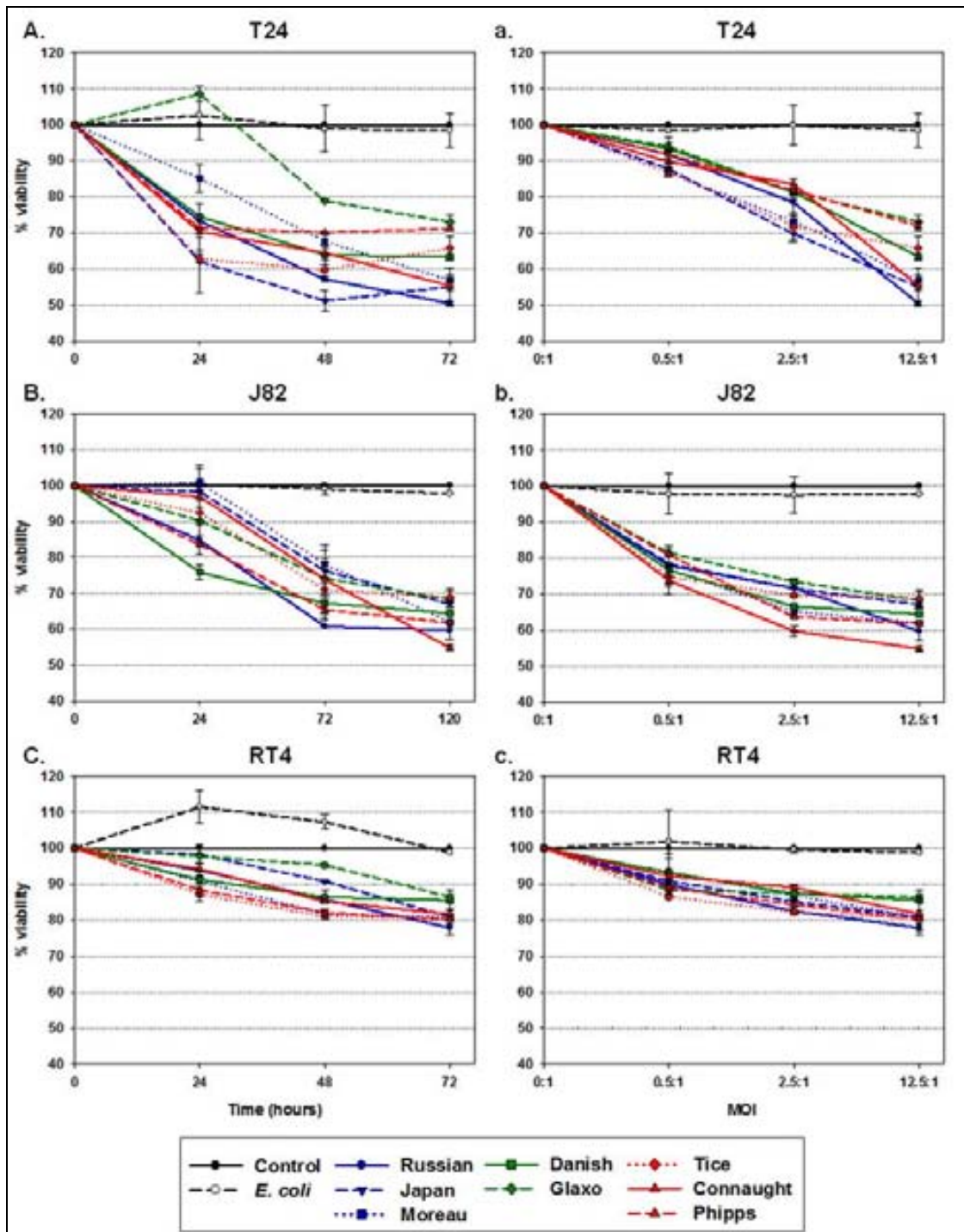


Figure 3.

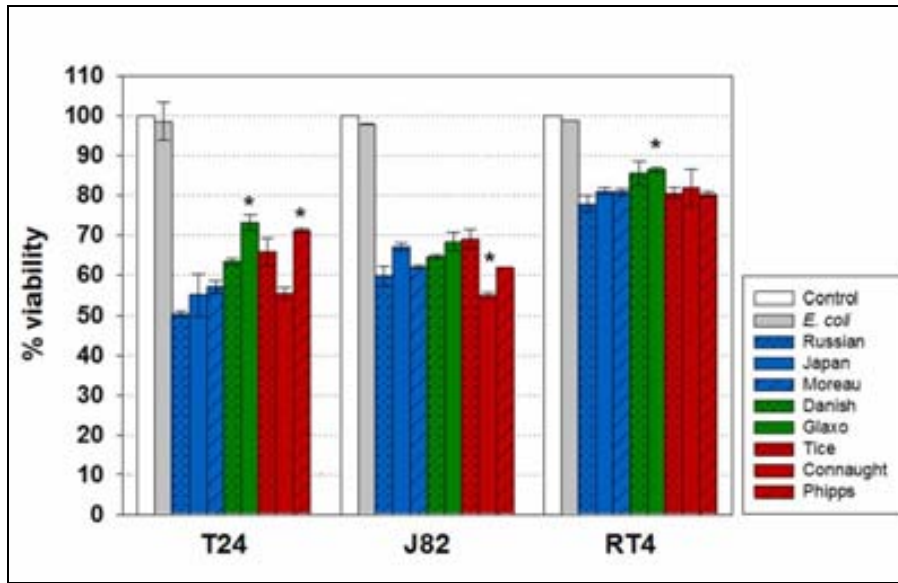


Figure 4.

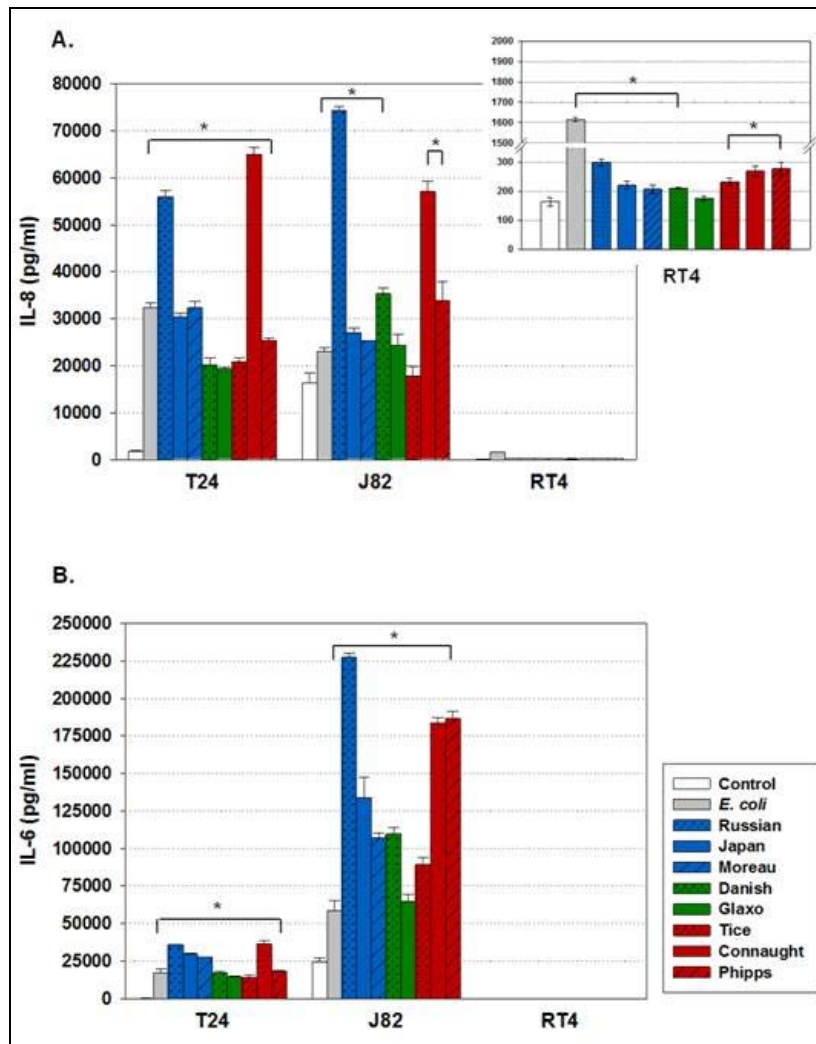


Figure 5.

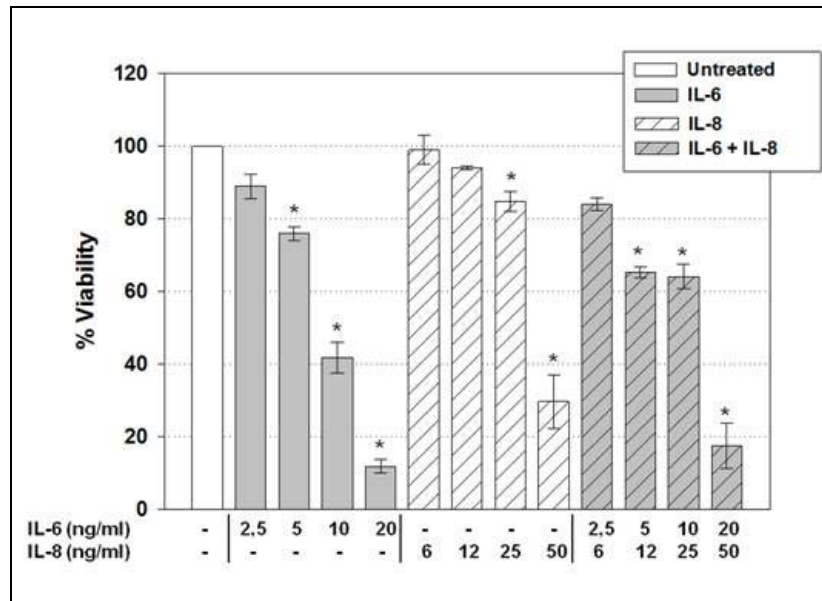
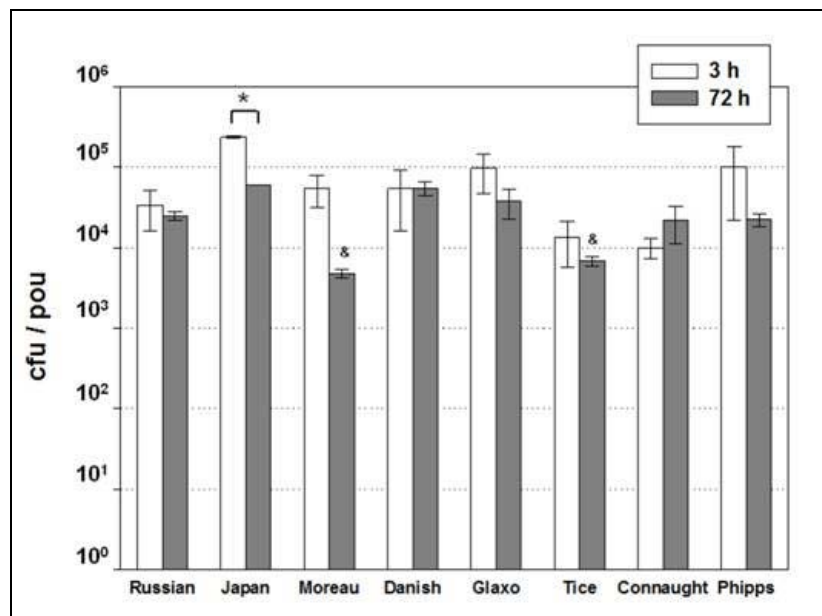


Figure 6.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure 1. Thin layer chromatography (TLC) analysis of mycolic acids (MA): I, α -MA: III, methoxy-MA; and IV, keto-MA; obtained from the different BCG strains. Lanes (1) Russian, (2) Japan, (3) Moreau, (4) Danish, (5) Glaxo, (6) Tice, (7) Connaught, and (8) Phipps strains.

Figure 2. Two-dimensional (2D)-TLC analysis of phthiocerol dimycocerosates (PDIMs) obtained from the different BCG strains. Lanes (1) Russian, (2) Japan, (3) Moreau, (4) Danish, (5) Glaxo, (6) Tice, (7) Connaught, and (8) Phipps strains.

Figure 3. TLC analysis of phenolglycolipids (PGL) extracted from the different BCG strains. Plates were developed with (A) chloroform-methanol (85:15, vol/vol). Lanes (1) Russian, (2) Japan, (3) Moreau, (4) Danish, (5) Glaxo, (6) Tice, (7) Connaught, and (8) Phipps strains.

Figure 1.

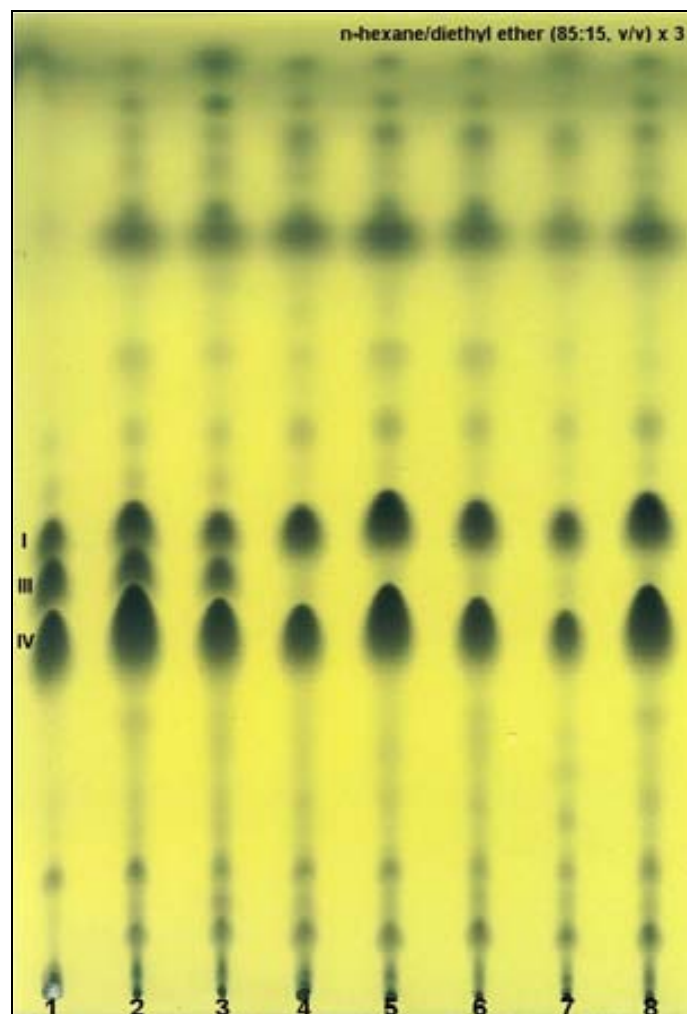


Figure 2.

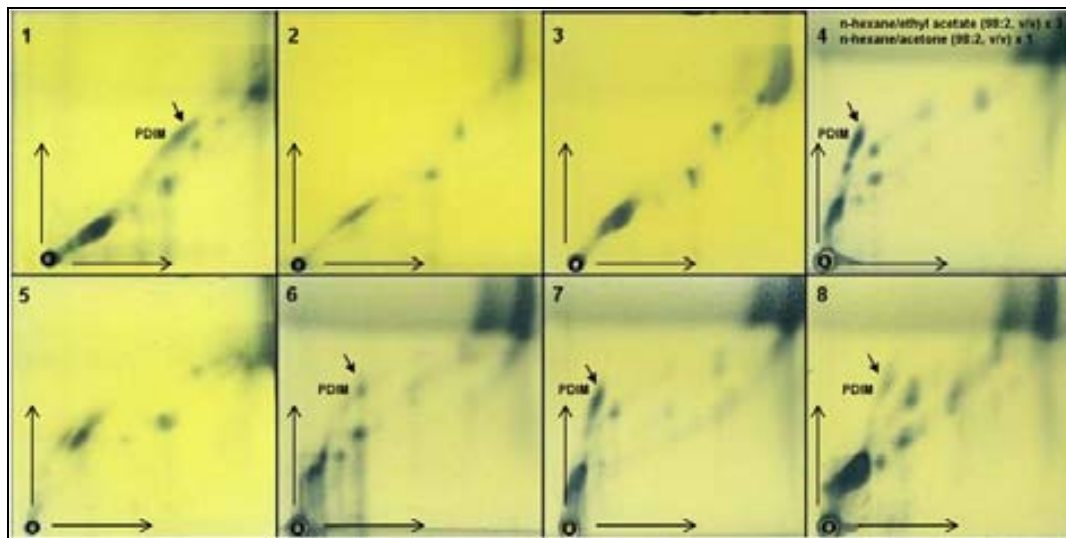
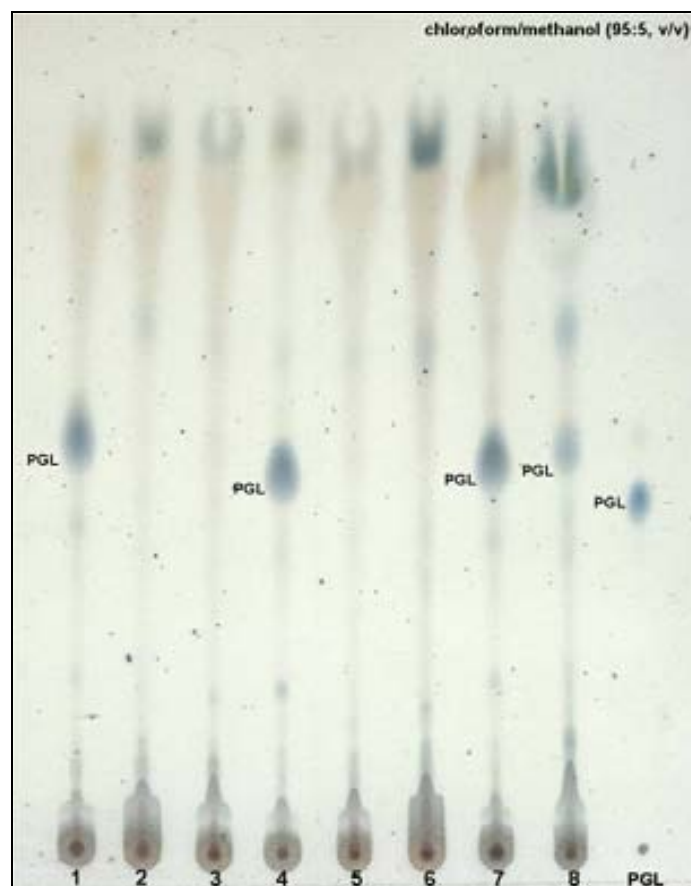


Figure 3.



Article II

- II. **Secanella-Fandos S**, Luquin M, Pérez-Trujillo M, Julián E. (2011) Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium confluentis* using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B*. 879(26): 2821-2826.

Short communication

Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium confluentis* using thin-layer chromatographySilvia Secauella-Bandus^a, Marina Jaquín^a, Míriam Pérez-Tuñillo^b, Esther Julián^{a,*}^aDepartament de Ciències de la Salut, Facultat de Ciències, Universitat de València, Burjassot, Spain; ^bDepartament de Ciències de la Salut, Facultat de Ciències, Universitat de València, Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 February 2013
Accepted 22 July 2013
Available online 23 July 2013Keywords:
Mycobacterium
Mycolic acids
Thin-layer chromatography

ABSTRACT

The profile of mycolic acids from *Mycobacterium confluentis* has not been clearly published. However, the determination of the composition of mycolic acids is crucial element for describing new mycobacterial species. This, an increasingly published problem can lead to confusing relations. The aim of this article is to reuse the protocols clear, by using thin-layer chromatography as a tool, for defining the discrete pattern of mycolic acids of a newly reported mycobacterial species. By using this method, and corroborated using nuclear magnetic resonance analysis, we demonstrated that *M. confluentis* contains α-mycolates, type I and epoxymycolates, type II mycolic acids.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mycobacterium confluentis (DSM 4491)¹ is a saprophytic mycobacteria described in 1892 by Kirschner et al. [1]. Based on a unique sporein isolate. The authors described a non-pigmented rapid grower of no clinical significance. Later it was confirmed that *M. confluentis* is a non-pathogenic mycobacteria in animal models. Being cleared after intravenous infection in BALB/c and even in inferior gamma irradiated mice [2]. From the isolate described by Kirschner et al. [1], no other isolates of *M. confluentis* have been described in the literature.

One of the important features for defining a new *Mycobacterium* species is its pattern of mycolic acids. The description of the profile of mycolic acids is a key point for identifying mycobacterial species [3,4]. These lipids are the main components of the mycobacterial cell wall. There are seven different types (representative figures of the different mycolic acid structures are shown in Fig. 1) and each mycobacterium has a determined pattern that can be shared with other mycobacteria. All of them have a common α-alkyl β-hydroxy core structure of high molecular weight, ranging from 10 to 90 total carbons, with two long chains. Whereas the α-chain, except for length, is fundamentally constant in all types of mycolic acids, the β-chain, called methoxyolate chain, may consist of a wide variety of chemical structures [5]. There are usually two positions that

could be occupied by cyclopropane rings, methyl branched, combinations of cis and trans double bonds or saturated chains, and hydroxy, methoxy, ester or epoxy groups (Fig. 1).

With very few exceptions, each mycobacterium species has a determined composition of mycolic acids, for which reason they are considered to be taxonomically marked. In fact, mycolates are essential elements of the mycobacterial cell wall, not only for taxonomic studies but also because of their functions. Mycolic acids are critical building blocks in the mycobacteria structure conferring properties such as low permeability of the cell wall to hydrophobic compounds and resistance to dehydration, which is crucial for survival inside host cells [6,9]. They are potential targets for anti-mycobacterial drugs. Moreover, these lipids are recognized by the host immune system being implicated in the immunopathology of mycobacterial diseases [10,11].

There are different techniques for defining the pattern of mycolic acids, all of which are based on chromatographic tools. Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is the most employed method in clinical routine laboratories for analyzing the mycolic acid content of mycobacteria isolates. Although different species share the same mycolic acids pattern, the exact proportion of each class of mycolate and the structure vary among different species [6,9]. In HPLC analysis, the mycolic acids are separated on the basis of their polarity and the carbon chain length, with the more polar and shorter eluting first [12]. Using this technique, it is possible to obtain a chromatogram with clusters of peaks. The arrangement and height of major peaks together with their position on the axis of retention times can be compared to commercially available software libraries of reference patterns, allowing the identification of the majority of clinically interesting species

*Corresponding author. Tel.: +34 963 549000 (ext. 5063); fax: +34 963 549000 (ext. 5063).
E-mail address: esther.julian@uv.es (E. Julián).
Tel.: +34 963 549000 (ext. 5063); fax: +34 963 549000 (ext. 5063).
E-mail address: esther.julian@uv.es

Type	Mycolate	Structure
I	<i>α</i> -Mycolate	$\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_x - \text{A} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_w - \text{CH}_3$
II	<i>α</i> '-Mycolate	$\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_x - \text{CH} - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - (\text{CH}_2)_y - \text{CH} - (\text{CH}_2)_z - \text{CH}_3$
III	Methylmycolate	$\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_x - \overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}(\text{H})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_w - \text{CH}_3$
IV	Acetonylmycolate	$\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_x - \overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}(\text{H})}{\text{C}}} - \overset{\text{C}(\text{OOH})}{\parallel} - \text{B} - (\text{CH}_2)_y - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_z - \text{CH}_3$
V	Epoxy mycolate	$\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_x - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{H})}{\text{C}}} - \text{CH} - \text{C}(\text{O}) - \text{CH} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_w - \text{CH}_3$
VI	Carboxymycolate	$\overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_x - \text{B} - (\text{CH}_2)_y - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_z - \text{CH}_3$
VII	<i>γ</i> -Methylmycolate	$\text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{C}(\text{H})}{\text{C}}} - (\text{CH}_2)_x - \text{A} - (\text{CH}_2)_y - \text{B} - (\text{CH}_2)_z - \overset{\text{OH}}{\underset{\text{C}(\text{OOH})}{\text{C}}} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_w - \text{CH}_3$

	<i>cis</i>	or	<i>trans</i>	or	<i>cis</i>		
A	$\text{CH} - \text{CH}$		$\text{CH} - \text{CH} - \text{CH}$		$\text{CH} - \text{CH}$		
			CH_2		CH_2		
	<i>cis</i>	or	<i>trans</i>	or	<i>cis</i>	or	<i>trans</i>
B	$\text{CH} - \text{CH}$		$\text{CH} - \text{CH} - \text{CH}$		$\text{CH} - \text{CH}$		$\text{CH} - \text{CH} - \text{CH}$
			CH_2		CH_2		$\text{CH}_2 - \text{CH}_2$

Fig. 1. Structure of the different types of mycolic acids. Modified from [5]. [A: delta, B: gamma, C: mycolate, D: alpha, mycolates, E: methylmycolate, V: epoxy mycolate, VI: carboxymycolate]. The values of x, y, and z are in the range from 1–175. The value of w is 2000–4000. B and C is divided by two, D and E by 3, and V by 2. All other values are arbitrary.

[12,13]. Using HPLC, it is not possible to identify the different structural types of mycolic acid; however, they can be distinguished by one- or two-dimensional thin layer chromatography (TLC) analysis. TLC allows the differentiation of the seven known mycolic acid types. The methyl ester of mycolic acids were found to migrate on TLC in accordance with the nature of their characteristic functions rather than with other differences in their molecular structures [14]. For instance, the same mycolate type with double bonds instead of cyclopropane rings maintain the same polarity or migrating in TLC analysis [15].

On analyzing the mycolic acid content of different mycobacteria using TLC, we realized that *M. goodii* possesses type V mycolic acid instead of type IV mycolic acid as was described before. We performed an acid methanolysis procedure to extract the lipids from the mycobacterial cell wall. Using this technique, type V mycolic acid molecule is characteristically broken down leading to the presence of more polar long chain components: dihydroxy derivatives and hydroxymethoxy compounds [16,17], and this may be observed by TLC analysis. The purpose of this article is to clarify which mycolic acid content has *M. goodii* and make it clear which protocols are to be followed using TLC chromatography to describe the mycolic acid composition of a mycobacterium.

2. Materials and methods

2.1. Strains and culture conditions

M. goodii (DSMZ 44912)¹ was obtained from the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures, and *Mycobacterium*

strains (ATCC 35769)², *Mycobacterium phlei* (ATCC 17758)³ and *Mycobacterium neoaurum* (CG 4112-3573)⁴ (Japan strain) were obtained from the American Type Culture Collection⁵. All the strains were grown on Middlebrook 7H10 agar (Difco Laboratories, Surrey, United Kingdom) supplemented with 10% sterile human dextrose catalase enrichment media at 37 °C for 7 days, with the exception of BCG which was cultured for 15 days.

2.2. Mycolic acid extraction

Cells were treated following two different protocols. Some of the cells were saponified and then the lipids extracted were methylated with diazomethane as previously described [18]. Briefly, a spatula of bacteria (10 mg wet weight) was scraped from the surface of Middlebrook 7H10 agar plates and treated with 2 ml of a methanol/benzene solution (8:2, v/v) containing 5% (w/v) potassium hydroxide in a test tube. The mixture was heated at 100 °C for 1 h. After cooling at room temperature, the samples were acidified by the addition of 20% (v/v) sulphuric acid, and the lipids were extracted into diethyl ether. The ether extracts were washed with water until neutral, dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and concentrated by evaporation to dryness. Lipids were then methylated with freshly prepared diazomethane. Three grams of *N*-Nitroso *N*-methylurea (Sigma, St. Louis, MO, USA) were dissolved in a pre-cooled solution containing 45 ml of diethyl ether, and 9 ml of 40% (w/v) KOH in distilled water. The mixture was agitated, and the supernatant was the removed and placed in a new tube-cooled in ice containing potassium hydroxide pellets. A 2 ml portion of a solution was poured in each tube containing the dried lipids, and

methylation was achieved within 15 min. Diazomethane was then evaporated, lipid extracts were re-suspended in n-hexane, and then applied to silica gel plates.

From the rest of the cells, lipids were extracted and methylated by acid methanolysis as previously described [19] with slight modifications. Briefly, a spoolful of bacteria was scraped from the surface of agar plates. Lipids were removed with 2 ml of a reagent composed of 30 ml of methanol, 15 ml of toluene, and 1 ml of diazomethane in a screw cap test tube. The mixture was heated at 80 °C overnight. After being cooled at room temperature, the samples were extracted twice with 2 ml of n-hexane. The hexane upper layer was then removed, placed in a clean tube, and evaporated to dryness in a bath at 40 °C under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in n-hexane to be applied to silica gel plates.

2.3. TLC analysis

Methyl mycolates were developed in one dimensional (1D) TLC using hexane-diethyl ether (85:15, v/v) three times, or using dichloromethane (100%) once, and in two dimensional (2D) TLC using a triple development with petroleum ether (bp. 60–80 °C), acetone (85:5, v/v) in the first direction followed by a single development with toluene-acetone (67:3, v/v) in the second direction [20,21]. TLC plates were then sprayed with 10% (w/v) molybdophosphoric acid in absolute ethanol and heated at 120 °C.

For each TLC run, five plate profiles obtained from *M. goodii* strains were compared with those from reference strains chosen to represent the various mycolates [14,20,21].

2.4. NMR spectroscopy analysis

NMR analysis were performed on pure mycolates purified by preparative TLC. The mycolic acid methyl ester scraped from the TLC plates were recovered with diethyl ether. Ethereal extracts were concentrated by evaporation and dissolved in 600 µl of CDCl₃ (99.80% D, 1,1,1-trichloro, Votinox, Le Bourgneux, France) and transferred to NMR tubes.

NMR spectra of the resolved analytes were obtained on a Bruker Avance II 600 spectrometer (Bruker Biospin, Steinmetz, Germany, equipped with a 5 mm 1H probe with Z-gradients, operating at a 1H and 13C NMR frequency of 600.13 and 150.95 MHz respectively and at 298.2K of temperature). 1D 1H NMR spectra were acquired using a standard 90° pulse sequence with an acquisition time of 1.75 s and a relaxation delay of 2 s. The data were collected into 32K computer data points, with a spectral width of 9790 Hz and as the sum of 128 transients. The resulting free induction decays (FID) were Fourier transformed, manually phased, and baseline corrected. 2D NMR experiments such as 2D 1H COSY (Correlation Spectroscopy) and 2D 1H HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) were performed using standard pulse sequences (Bruker) and acquired under routine conditions. All the spectra were calibrated using the residual solvent signal (CHCl₃, 7.27 and 77.0 ppm for 1H and 13C respectively). Chemical shift data are expressed in ppm and coupling constant values in Hz.

3. Results and discussion

As the first four lanes of Fig. 2 show (lanes 1–4), the pattern of mycolic acids of *M. goodii*, *M. confusus*, *M. phlei* and BCG seems to share type I and type V mycolic acids. Only in the other four lanes (lanes 5–8) it is possible to observe that *M. goodii* and *M. confusus* have type V mycolic acid but *M. phlei* and BCG have

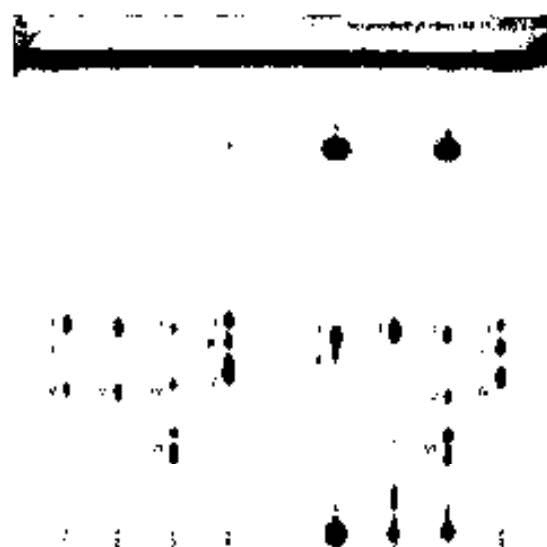


Fig. 2. One dimensional thin-layer chromatography methylated lipids from *M. goodii* (lane 1) and *M. confusus* (lanes 2 and 5), *M. phlei* (lane 3) and BCG (lane 4) and their methylated lipids (lanes 5–8) by acid methylation. Spots I, IV and V correspond to type I, IV and V mycolic acids, respectively. The spots corresponding to the presence of type V mycolic acid in *M. goodii* and *M. confusus* (lanes 1, 2 and 5) were developed three times with hexane-diethyl ether (85:15, v/v) and revealed with molybdophosphoric acid.

type IV mycolic acid. If the samples are run in a 2D TLC the situation is similar than in the 1D TLC analysis. As Fig. 3(A–C) shows mycolic acid IV and V have a similar mobility pattern. Again, only in Fig. 3(A–C) it is possible to differentiate the spots corresponding to mycolic acid V (Fig. 3a and b) and IV (Fig. 3c). The presence of type V mycolates in the reference strain will only be confirmed when the result of acid methylation is shown in both cases. 1D- and 2D-TLC analysis, the absence of the spot corresponding to type V mycolic acid can be appreciated together with the presence of more polar long chain components next to the application point of the TLC, but the results show that *M. confusus* contain α -mycolates (type I) and epoxy-mycolates (type V) (Fig. 2, lane 2, and Fig. 3B).

In order to describe *M. confusus*, Kirschner et al. [1] analyzed the mycolic acid pattern of the isolate by TLC comparing the profile with the known pattern of other mycobacteria run in parallel. They identify the two spots obtained as α -mycolates and keto-mycolates (type I and IV mycolic acids, respectively), when compared with *M. goodii* and *M. phlei* profiles among others. But there were some misinterpretations. On the one hand, *M. goodii* has three mycolic acids (type I, II and V) [12,22], our data are positive type IV mycolate, and the spot corresponding to type V mycolic acid appears in the same position as the type IV mycolic acid of *M. phlei*. Indeed, following the 2D-TLC protocol described by the authors, the spot corresponding to type IV could be confused with that belonging to type V mycolates (epoxy-mycolates, as we (Fig. 3), and others [15,23] have shown). Thus, neither in one dimensional using hexane-diethyl ether (Fig. 2 and Table 1) nor in two dimensional [16,23] and Fig. 3) TLC elution systems it is possible to discern between type IV and V mycolic acids, since both lipids present the same mobility. On the other hand, Kirschner et al. followed an acid methylation procedure but there appears to be an acid stable component both in *M. goodii* and *M. confusus* analysis. As was shown, herein (Figs. 2 and 3) in agreement

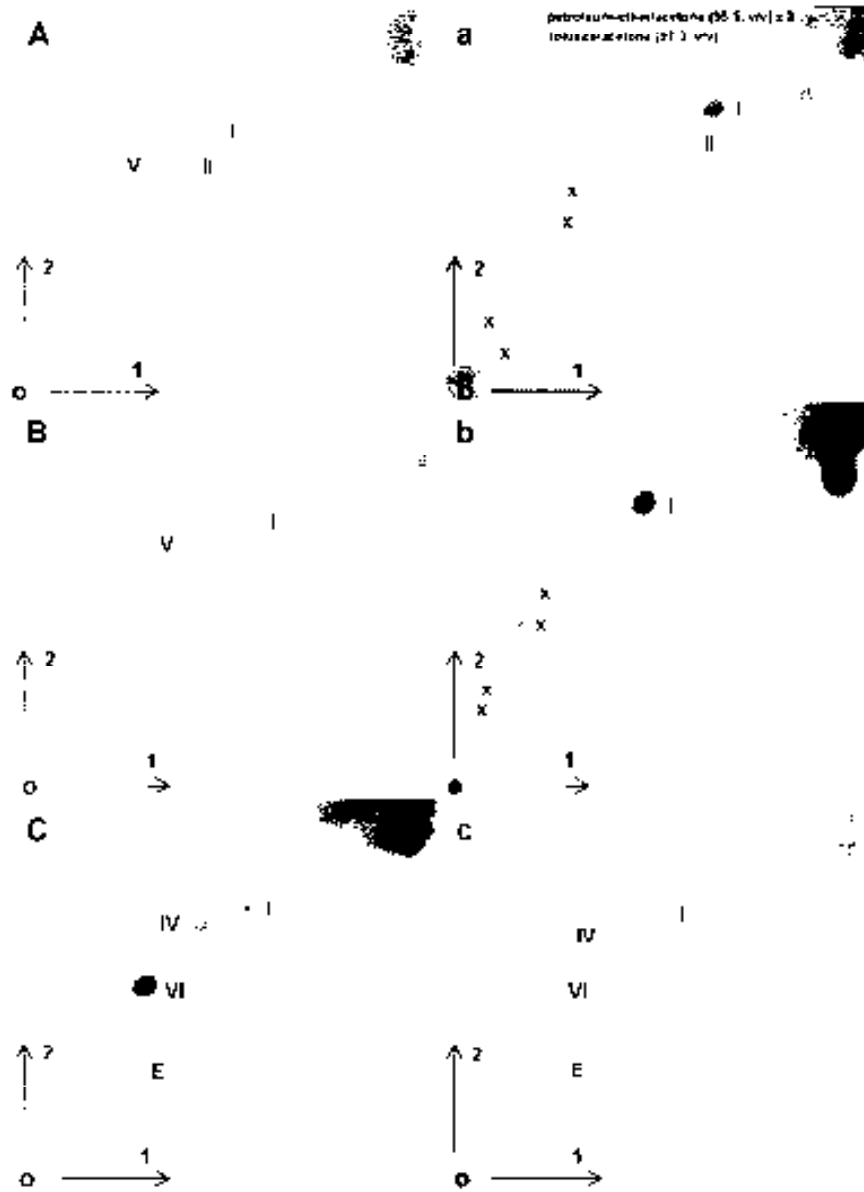


Fig. 3. Two-dimensional thin-layer chromatography of mycolic acids from *M. smegmatis* (A and B), *M. fortuitum* (B and C), and *M. neoaurum* (C and D), obtained by open-pore HPLC using a C₁₈ column (250 × 4.6 mm, LiChrosorb, LiChromat, Allentown, PA), using a 100% CH₂Cl₂ solvent system. The spots were identified by their R_f values and by their chemical composition determined by mass spectrometry and infrared spectroscopy. This was developed using a type developed in a 100% CH₂Cl₂ solvent system. The spots were identified by their R_f values and by their chemical composition determined by mass spectrometry and infrared spectroscopy. The spots were identified by their R_f values and by their chemical composition determined by mass spectrometry and infrared spectroscopy.

with the literature [16, 17], type V mycolates are acid sensitive and they degrade to hydroxymethoxy decarboxylic acids by acid methanolysis. Therefore, although it is possible that Kirschner et al. confused the pattern of mycolic acids due to the TLC method systems used, it is also possible that the spot corresponding to type V mycolic acid appear after acid methanolysis extraction procedure.

There are two options to differentiate both mycolic acids: type IV and V. First, in order to avoid possible misidentifications and to know exactly which types of mycolic acid a mycobacterium has, the best option is to always carry out two different protocols: saponification and methanolysis of the cell wall (non-bar) extracted lipid in parallel using HPLC and compare the patterns

Table 1

Rf values of the different methyl ester and different TLC analysis.

Mycolic acid type	Rf values		Saponification	
	Acetone/dichloromethane	Dichloromethane/ethyl ether (2:1 v/v)	Hexane/ethyl ether (2:1 v/v)	Dichloromethane/ethyl ether
I	0.12 (0.11)	0.11 (0.11)	0.11 (0.15)	0.27 (0.24)
II	0.28	0.28	0.4	0.33
III	0.36	0.36	0.41	0.59
IV	0.11 (0.11)	0.11 (0.11)	0.25	0.25 (0.24)
V			0.31	0.21
VI	0.22		0.21	0.18

I, mycolic acid I; II, mycolic acid II; III, mycolic acid III; IV, mycolic acid IV; V, mycolic acid V; VI, mycolic acid VI. The Rf value of hexane and ethyl ether dichloromethane (up to 100%) and ethyl ether dichloromethane (up to 100%) spotted spot on the TLC plate was calculated using the following equation: distance traveled by the sample and divided by distance traveled by the solvent front.

Fig. 2. TLC separation of mycolic acid methyl esters. A. mycolic acid I section of S.4567. System: 100% CH₂Cl₂.

obtained (Fig. 2 and Table 1). A second attempt to differentiate type IV and V mycolates was to use dichloromethane as an eluent in 5% run on TLC analysis. As Fig. 4 and Table 1 show, when TLC were run using dichloromethane and the saponification procedure was performed, type IV mycolic acid can be differentiated from type V, because type IV has the same Rf value as type III mycolic acid, both type III and IV being combined at a multiple spot (Fig. 4, lanes 1–4; Table 1).

Results described above were unambiguously confirmed by means of NMR spectroscopic analysis of the TLC spots assigned as mycolic acid methyl ester type V for *M. smegmatis* and *M. mageritensis* and type V for *M. goodii* (Fig. 5).

Fig. 5A shows the ¹H NMR spectrum of mycolic acid methyl esters isolated from the TLC spot assigned as type V for *M. smegmatis* (Fig. 2, lane 1). The spectrum shows a doublet of triplets at 2.72 ppm (coupling constants, J = 5.5 and 2.2 Hz), corresponding to the protons of the epoxy group [24]. An analogous peak is observed in the ¹H NMR spectrum of analytes isolated from the TLC spot assigned as type V for *M. mageritensis* (Fig. 2, lane 2) (Fig. 5B). In the case of the BCC, shown in Fig. 5C, mycolic acid methyl esters isolated from the TLC spot assigned as type IV (Fig. 2, lane 4), no signals of protons from an epoxy group were observed. Furthermore, a multiplet at 2.51 ppm corresponding to a methylene proton adjacent to a keto group and a doublet at 1.05 ppm (J = 6.9 Hz), assigned to a methyl group bonded to the former methylene group were observed [25]. These peaks were corroborated by 2D NMR experiments such as 2D-¹H COSY and HETCOR-1D/2D.

In addition, peaks corresponding to ethylene protons were observed in the *M. mageritensis* sample (δ = 3.4 and 3.24 ppm), along with those of the methylene adjacent to double bond (2.01 ppm). Characteristic signals of its substituted cyclopropyl rings (0.6, 0.57 and 0.33 ppm) were observed in the BCC sample. In all cases typical signals of mycolic acid methyl esters were identified, such as the methyl ester singlet (1.72 ppm), α -methylene proton (2.45 ppm), α -carboxylic proton (2.44 ppm), methylene protons adjacent to the α -carboxylic group (1.71 ppm), methylene chains (1.22 ppm, broad), and terminal methyl groups (0.89 ppm, triplet), indicated in Fig. 5C as an example, [24–25].

As far as we know, the only mention of the lipid composition of an *M. mageritensis* cell wall after Kirschner's [17] description was in the later review by Butler and Garbuzio [12] who reported, using HPLC, that *M. mageritensis* shares a lipid emerging complex, single cluster peak pattern of mycolic acids with other mycobacteria. As we mentioned before, using HPLC it is not possible to determine the discrete composition of these lipids. The question remained unclear until now, the profile described initially by Kirschner et al. having been widely accepted [12,26].

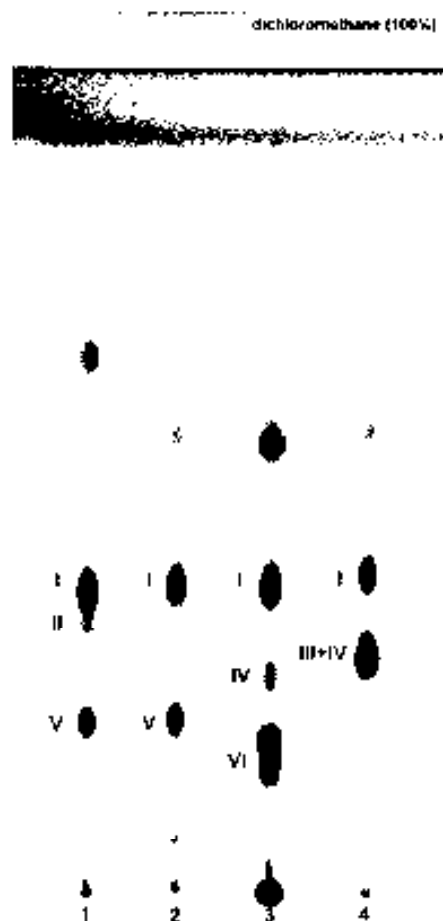


Fig. 4. Gel-encapsulated thin-layer chromatography of mycolic acid methyl esters. Lane 1, *M. smegmatis*; lane 2, *M. mageritensis*; lane 3 and 4, *M. goodii* obtained by saponification. I, mycolic acid I; II, mycolic acid II; III, mycolic acid III; IV, mycolic acid IV; V, mycolic acid V. The spots developed were with dichloromethane (100%) and revealed with an iodine vapor plate.

283

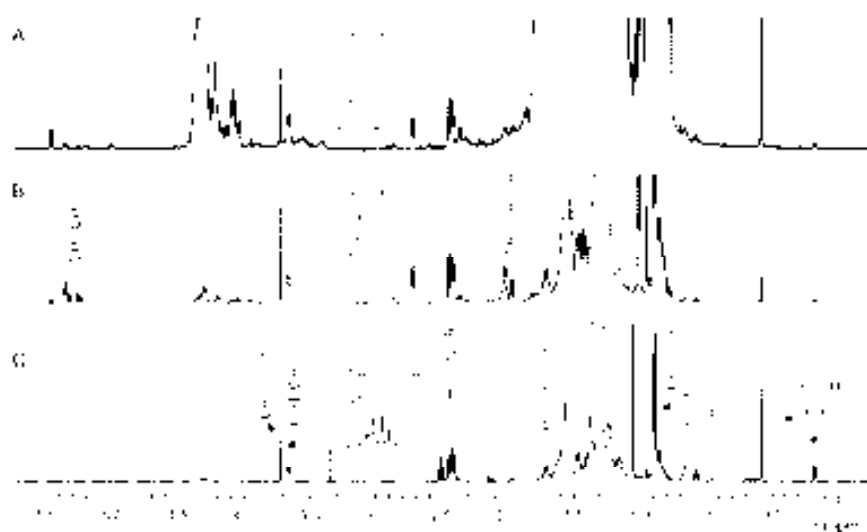
S. Sauerblich *et al.* / *J. Chromatogr. B* 823 (2012) 282–292

Fig. 5. ^1H NMR spectra of methyl mycolic acid derivatives from *M. mageritensis* (A), *M. confusus* (B) and *M. goodii* (C) (type VII), per from *M. mageritensis* (type I), type VIII (D) and from *M. confusus* (type I) and type VIII (E). Spectra were acquired at a ^1H NMR spectrometer, field of 400 MHz.

4. Conclusion

In recent years, newly described mycobacteria species have been emerging necessarily. Due to the importance of the mycolic acid pattern for these new species, it is important to have the content of each species clear, being thin layer chromatography an advantageous tool. Accordingly, *M. confusus* has to be considered to contain α -mycolates (type I) and epoxy-mycolates (type V mycolic acids).

Acknowledgements

Milena Soriano-Landoy is supported by a PhD fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona. This work was supported by funding from the Spanish Science and Education Ministry (SAI2009-05688), from the Spanish Ministry of Science and Innovation (2010-01438) and from the Generalitat of Catalunya (2009SGR 1028).

References

[1] P. Brodin, A. Teste, M. Scharif, R. N. Cripps, S. J. Walker, C. Birtles, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 26.

[2] S. Hien, J. Richter, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 27.

[3] M. V. Gey, E. Gubina, I. P. Gubina, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 115.

[4] S. Himmelfarb, J. M. Gibson, *Chromatogr. Sci. Technol. Anal. Chem.* 1999 (2000) 265.

[5] H. P. G. Gey, S. J. Walker, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 27.

[6] E. Latorre, M. A. Jimenez, E. Latorre, P. S. Alvarez, M. Balles, *Anal. Chem.* 74 (2002) 475.

[7] J. L. Barry III, R. L. Cole, K. M. B. Heifetz, J. M. Hays, J. R. Kloos, E. E. Snider, *Am. Rev. Respir. Dis.* 121 (1980) 1041.

[8] J. D. Cole, J. L. Barry III, J. D. Dawson, R. K. M. Ho, A. W. Woodhill, D. W. Young, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 1547.

[9] J. Latorre, E. Balles, M. V. Gey, P. S. Alvarez, *Res. Chem. Intermed.* 31 (2005) 2743.

[10] J. Latorre, A. Alvarez, J. Wessels, P. de Lencastre, *J. Clin. Microbiol.* 45 (2007) 2540.

[11] A. Balles, E. Gubina, E. Gubina, M. R. Joubert, *J. Mycol. Med. (Lond.)* 19 (2006) 342.

[12] M. R. Joubert, E. Gubina, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14 (2010) 2051.

[13] J. Latorre, M. V. Gey, M. R. Joubert, D. Latorre, *Mycopathol. Mycol.* 163 (2011) 143.

[14] M. V. Gey, E. Gubina, K. P. Seegal, *Zentralblatt Bakteriol.* 278 (2007) 31.

[15] D. Berkani, Z. H. Li, S. Gharbani, M. S. Ghannam, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1091.

[16] M. Lopez, L. Moya, M. J. Gudiño, A. A. Sola, *J. Clin. Microbiol.* 47 (2007) 23.

[17] D. L. Chandler, S. Y. Min, Y. H. Kim, R. H. Johnson, M. Goodfellow, J. M. Hancock, *J. Gen. Microbiol.* 131 (1984) 367.

[18] S. Latorre, M. A. Jimenez, E. Gubina, *J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 115.

[19] D. L. Chandler, S. Y. Min, Y. H. Kim, D. R. Brown, M. Goodfellow, M. M. Hsueh, M. A. Sella, W. Casal, J. C. Mayo, *Bacteriol. Monographs* 13 (1976) 1–27.

[20] D. L. Chandler, S. Y. Min, Y. H. Kim, D. R. Brown, M. Goodfellow, M. M. Hsueh, *Arch. Microbiol.* 129 (1982) 297.

[21] D. L. Chandler, S. Y. Min, R. H. Johnson, A. S. Goldstein, M. Goodfellow, *J. Chromatogr.* 168 (1989) 241.

[22] M. Lopez, M. A. Jimenez, V. A. Garcia, M. Garcia-Guinea, E. Balles, P. S. Alvarez, *J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 27.

[23] D. L. Chandler, S. Y. Min, S. M. Chandler, A. S. Goldstein, M. Goodfellow, *J. Microbiol. Methods* 14 (1984) 295.

[24] F. Dierckx, J. J. Cavalry, B. W. Z. A. Jansen, M. A. Jimenez, E. Balles, *J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 27.

[25] S. Wessels, A. Latorre, S. Alvarez, D. Latorre, *J. Clin. Microbiol.* 45 (2007) 2540.

[26] J. Latorre, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 17 (2013) 27.

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Després de tants anys, és molta la gent amb la que he compartit grans i petites coses, totes elles importants per a la realització d'aquest treball.

En primer lloc vull agrair a les meves directores de tesis, la Dra. Esther Julián i la Dra. Marina Luquin, per haver-me acollit al seu laboratori i haver-me donat l'oportunitat d'arribar fins aquí. Especialment a l'Esther, per la seva implicació i ajut incondicional en tot aquest treball, però sobretot per tot el que he après al seu costat i per tots els moments compartits tant dins com fora del laboratori. Milers de gràcies una vegada més de tantes!

M'agradaria donar les gràcies a tota la gent del laboratori. A la Gemma i l'Eli que em van rebre i em van posar al dia, la Oihane, la Sarai, la Marta i el Fran. A l'Hasier en especial, per totes les hores que vam passar colze a colze dins del "P3", i per tot el seu suport tant al laboratori com fora. A la Ceci pel seu ajut i per les coses especials que hem compartit. A la Estela, a qui també desitjo molts ànims. A la Cris i la Pili per haver-me ajudat en totes les tasques de comandes, preparació dels medis, ...

També vull donar les gràcies als veïns del laboratori per totes les estones divertides que hem passat junts. A la Mireia (així! esa sevillana...), la Zully, l'Álvaro, l'Anama i l'Eduard, el Max, el Jordi, el Dr. Toni i la Dra. Isabel. A la Elia per tot el seu ajut i consells. Al Joan per tot el seu suport i ànims durant aquests anys. Com trobo a faltar els nostres coffee-therapy! I a l'Alex (el chipirón), per la seva alegria en tot moment.

Igualment, gràcies a la gent de la quarta planta. A la Laura, la Naroa, la Marta, la Núria Tomàs, la Núria Vigués, ... Gràcies per tots els bons moments compartits, sobretot a la Laura que des de l'inici m'ha acompanyat en aquesta aventura.

No em podria deixar d'agrair a les secres, la Conchi, la Julia i la Maria Josep, i a la Maite, tot l'ajut amb la paperassa durant aquests anys.

Vull donar les gràcies a totes les persones que m'han ajudat i assessorat en aquesta tesi: la Dra. María José Ramírez pel seu ajut amb els cultius cel·lulars, a la Dra. Julia Lorenzo i a la Manuela Costa per tot el seu ajut i consells amb la citometria de flux. Al Dr. Eduard Torrents i al seu grup per haver-me acollit al seu laboratori i haver-me prestat el seu ajut i consells amb els gels d'electroforesis. A la Míriam Trujillo per la seva implicació amb la RMN. I com no, a tots els que es van oferir a donar sang pels experiments.

Gràcies a la gent de Suècia. Especialment a la Carmen per haver-me acollit al seu laboratori, pel seu optimisme i els seus consells. A la Dag per haver-me cuidat tant bé i ajudar-me a barallar-me amb els ratolins, i a l'Olga. A l'Elena i la Natasha per haver estat la meva família sueca a l'arribar a casa.

Tampoc em puc oblidar de donar les gràcies a la gent del MycoSpain, pels moments divertits i per tot el que he après en les reunions. I a la gent del Clínic, pels ànims i introduir-me en nous camps d'investigació.

També gràcies a tots els meus amics (els de Reus, els de Barcelona, els de Granollers, els de la Facultat, ...) pels seus ànims i tots els moments de desconexió tant necessaris. I a tots els companys que m'he anat trobant pel camí i que han tingut un gest amable i un consell savi.

I finalment, vull donar les gràcies a la meva família. Gràcies pels vostres ànims diaris, el vostre recolzament i entendre totes les hores que he hagut de passar al laboratori. Gràcies als meus pares i sogres (qué poc m'agrada aquesta paraula!) pels vostres grans consells i per fer-me costat per arribar fins aquí. Gràcies als meus germans i cunyats, i a les meves nebodetes, Matina i Berta, per haver fet tant especial aquesta etapa. I gràcies de tot cor al Lluís, per animar-me i recolzar-me cada segon fins al final. Gràcies per la teva paciència i comprensió, per haver compartit amb mí els llargs dies al laboratori, les hores davant de l'ordinador (sempre ens quedarà Baumann), i haver omplert d'alegria cada dia que ha passat. I sobretot gràcies per haver fet realitat el nostre somni.

Gràcies a tots!!