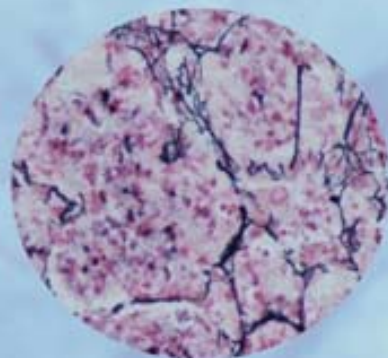


Tuberculosi pulmonar:

com evitar el pas de granuloma

a cavitat



*Estudi de la inflamació en la patogènesi de la
malaltia tuberculosa i
desenvolupament de noves estratègies
terapèutiques*



Departament de Genètica i de Microbiologia
Universitat Autònoma de Barcelona

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

*Estudi de la inflamació en la patogènesi de la malaltia tuberculosa i
desenvolupament de noves estratègies terapèutiques*

Elena Marzo

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

Director: Dr. Pere-Joan Cardona

Memòria de la tesi doctoral presentada per obtenir el grau de Doctor del Programa
de doctorat en microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, Setembre de 2014

Agraïments

Agraeixo molt la contribució a aquesta tesi de tot l'equip de la Unitat de Tuberculosi Experimental. Aquest ha estat realment un treball en equip, de manera que agraeixo a en Jorge i la Vane tota la feina que han fet a l'estabulari, a en Gustavo les lliçons d'histopatologia, a la Neus tot el que em va ensenyar quan vaig començar, a la Cris tots els consells i la feina que hem compartit, i a en Pere-Joan la direcció i l'entusiasme que sempre mostra, i la oportunitat de treballar a la UTE. També vull donar les gràcies per la feina feta a les noves incorporacions, la Paula i l'Isma, i a tots els estudiants que han passat per la UTE: la gent de l'institut de Vic (sobretot la Meritxell i en Pau), els estudiants de grau (la Sònia i l'Antoni), i l'Andreu. A tota la UTE moltes gràcies per la feina i per tot el que he après amb vosaltres, però sobretot us haig d'agrair que heu fet que estimi aquesta feina i que m'ho passi molt bé. Tant, que tinc la sensació que no he estat treballant sinó jugant i fent el boig. Moltíssimes gràcies!

Vull agrair als físics del grup de MOSIMBIO no només la gresca i xerimola que aporten a les reunions, sinó també que m'han fet mirar el món des d'una altra perspectiva, i he après que res no és trivial.

A la Concepció Soler, en Joan i la Diana de Bellvitge, perquè van ser el primer grup que em va acollir per fer recerca, per fer les pràctiques del màster.

D'altra banda vull donar les gràcies a tots els investigadors de l'institut, i investigadores, que de fet som més dones, i a la gent de micro de l'hospital, perquè tothom ha estat molt amable i col·laborador alhora de compartir protocols i material o aconsellar pel que faci falta, i penso que això és un gran valor. En aquest sentit moltes gràcies a l'Írma i a les noies d'Innata, i a la resta de treballadors, sobretot en Marco i en Gerard, per tota la feina a citometria i la infinita paciència! Però sobretot moltes gràcies a les companyes de menjador (Lucía, Núria, Neus, Cris, Mar, Txell, Maria Rosa, Carol, Bego, Patri, Jamal, Borràs...), per la desconexió i bona conversa a l'hora de dinar, i per tot lo que m'han fet riure!!

Voldria dedicar unes paraules a la meva gent de Girona. A les nenes i als pessigolles en un sentit ampli, merci per ser-hi i per aguantar el rollo (el meu i el de tots els doctorands de la colla). A tota la meva família (inclosos els de Barcelona), gràcies pel suport i perquè s'han il·lusionat amb el meu projecte. I sobretot haig d'agrair moltíssim als iaïos i avis d'en Guerau tot els cangurs que m'han permès escriure la tesi aquest estiu i anar a treballar, i això no té preu!

Per últim, un agraïment especial pels meus "companys de pis": a l'Edu, pel suport moral i material, pels savis consells i per les eines informàtiques! I per totes les feines de casa extra que has carregat durant els últims mesos. I a en Guerau, que amb la

seva arribada m'ha forçat a ser més eficient durant les hores que m'he pogut dedicar a la tesi, i també m'ha ajudat a relativitzar, de manera que tot plegat no ha resultat ser tant estressant com m'havia imaginat!!!

Moltes gràcies a tots plegats!!!

Resum

La tuberculosi (TB) és una epidèmia global causada per *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) amb 8,6 milions de malalts i 1,3 milions de morts cada any. El tractament actual amb antibiòtics és molt llarg, car, i presenta efectes adversos.

Quan una persona s'infecta amb *Mtb* pot controlar la infecció en el 90% dels casos (infecció latent), desenvolupant només lesions microscòpiques al pulmó: granulomes de 0,5mm de diàmetre, invisibles en una radiografia. En el 10% restant la infecció no es controla i es desenvolupen lesions més grans, típicament cavitats d'uns 20mm en adults immunocompetents. La clau per comprendre la patogènesi de la TB activa és la formació de grans cavitats a partir de granulomes de 0,5mm.

En aquesta tesi s'ha desenvolupat un model murí, mitjançant la infecció endovenosa de ratolins C3HeB/FeJ amb la soca virulenta de *Mtb* H37Rv, que desenvolupa lesions amb necrosi granulomatosa central i líquüefacció molt similars a les lesions prèvies a la cavitació en humans. Les lesions creixen de forma exponencial en part degut a la infiltració neutrofílica massiva, i en part degut a la coalescència de les lesions properes. Els estudis comparatius amb la soca resistent C3H/HeN i l'ús d'antiinflamatoris no esteroideus (AINEs) en el model han confirmat que la inflamació és un factor clau en el desenvolupament de la TB activa, i també que els AINEs podrien utilitzar-se com a tractament coadjuvant en la TB pulmonar en adults immunocompetents, ja que en frenar la inflamació ajuden a controlar la malaltia.

D'altra banda s'ha desenvolupat un mètode profilàctic que mitjançant l'administració oral de dosis baixes de micobacteris inactivats indueix tolerància al *Mtb*, i en conseqüència una resposta immunitària més equilibrada, amb contenció de la resposta Th17, resultant en una millora de la supervivència, la càrrega bacil·lar i la histopatologia dels ratolins.

Conclusions: S'ha desenvolupat un model murí de TB activa, s'ha caracteritzat el paper que té la inflamació en el desenvolupament de cavitats, concretament la infiltració massiva de neutròfils, s'ha proposat l'ús d'AINEs com a tractament coadjuvant de la tuberculosi activa en adults immunocompetents, i s'ha desenvolupat un nou mètode profilàctic que podria evitar la malaltia mitjançant la inducció de tolerància oral al *Mtb* que s'aconsegueix amb l'administració oral de dosis baixes de micobactèries inactivades.

Abstract

Tuberculosis (TB) is a global epidemic caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). In 2012 an estimated 8,6 million of people developed TB and 1,3 million died from the disease. The current treatment with antibiotics is expensive, long-lasting and presents adverse effects.

When people are infected with *Mtb* the infection is controlled in the 90% of the cases, developing microscopic lesions in the lungs, 0,5mm of size granulomas, invisibles to the X-rays. In the other 10% the infection is not controlled and bigger lesions are developed: in immunocompetent adults the most characteristic lesion is a cavity sized about 20mm of diameter. The clue to understand active TB pathogenesis must be the development of 20mm cavities from 0,5mm granulomas.

In this work a murine model has been developed through the endovenous infection of C3HeB/FeJ mice with H37Rv virulent strain of *Mtb*, which develops lesions presenting central granulomatous necrosis and further liquefaction, very similarly to the lesions previous to cavity formation in human patients. The lesions grow exponentially due to massive neutrophilic infiltration and coalescence of neighbour lesions. The comparative studies with the resistant mice strain C3H/HeN and the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the model confirmed that inflammation is clue in the active TB development, and also that NSAIDs could be use as adjunctive therapy in the treatment of pulmonary TB in immunocompetent adults, through control of excessive inflammation.

On the other hand, a prophylactic method has been developed consisting on induction of tolerance to *Mtb* through oral administration of low doses of heat-killed mycobacteria, driving to a more balanced immune response, limiting Th17 development and resulting in a better outcome of mice in terms of survival, histopathology and bacillary load in lungs.

Conclusions: A murine active TB model has been developed, and the role of inflammation in cavity formation characterized, namely the role of massive neutrophilic infiltration. The use of NSAIDs has been proposed as an adjuvant treatment of active TB in immunocompetent adults, and a new prophylactic method has been developed that could avoid the disease by induction of oral tolerance to *Mtb* through the administration of heat killed micobacteria at low doses.

Resumen

La tuberculosis (TB) es una epidemia global causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) con 8,6 millones de enfermos y 1,3 millones de muertes cada año. El tratamiento actual con antibióticos es muy largo, caro i presenta efectos adversos.

Cuando una persona se infecta con *Mtb* puede controlar la infección en el 90% de los casos (infección latente), desarrollando solamente lesiones microscópicas en el pulmón: granulomas de 0,5mm de diámetro invisibles en una radiografía. En el 10% restante la infección no se controla y se desarrollan lesiones mayores, típicamente cavidades de unos 20mm en adultos inmunocompetentes. La clave para comprender la patogénesis de la TB activa es el paso de granulomas de 0,5mm a cavidades de gran tamaño.

En esta tesis se ha desarrollado un modelo murino mediante la infección endovenosa de ratones C3HeB/FeJ con la cepa virulenta H37Rv de *Mtb*, que desarrolla lesiones con necrosis granulomatosa central y licuefacción, muy similares a las lesiones previas a la cavitación en humanos. Las lesiones crecen de forma exponencial debido en parte a la infiltración neutrofílica masiva, y en parte a la coalescencia de las lesiones vecinas. Los estudios comparativos con la cepa resistente C3H/HeN y el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en el modelo han confirmado que la inflamación es un factor clave en el desarrollo de la TB activa, y también que los AINE podrían utilizarse como tratamiento coadyuvante en la TB pulmonar en adultos inmunocompetentes, dado que en frenar la inflamación ayudan a controlar la enfermedad.

Por otro lado se ha desarrollado un método profiláctico que mediante la administración oral de dosis bajas de micobacterias inactivadas induce tolerancia al *Mtb*, y en consecuencia una respuesta inmunitaria más equilibrada, conteniendo la respuesta Th17, resultando en una mejora de la supervivencia, la carga bacilar y la histopatología de los ratones.

Conclusiones: Se ha desarrollado un modelo murino de TB activa, se ha caracterizado el papel de la inflamación en el desarrollo de cavidades, concretamente de la infiltración masiva de neutrófilos, se ha propuesto el uso de AINEs como tratamiento coadyuvante para la tuberculosis activa en adultos inmunocompetentes, y se ha desarrollado un nuevo método profiláctico que podría evitar la enfermedad mediante la inducción de tolerancia oral al *Mtb* que se consigue con la administración oral de bajas dosis de micobacterias inactivadas.

Sumari

Agraïments	I
Resum	III
Abstract.....	IV
Resumen	V
Sumari	VII
Llistat d'abreviacions.....	1
1 Introducció.....	5
1.1 10 conceptes bàsics sobre la tuberculosi	5
1.2 La tuberculosi com a problema global	6
1.3 Història natural de la tuberculosi	8
1.3.1 Hipòtesi dinàmica i ITBL.....	9
1.3.2 Refutació de la hipòtesi dinàmica i rellevància de l'encapsulació de les lesions gràcies al model de minipigs.....	10
1.3.3 "Damage theory" i tuberculosi activa	12
1.4 Aspectes patològics de la tuberculosi.....	13
1.4.1 Necrosi caseosa i liqüefacció, segons el Dr. Jacques Grosset.....	13
1.4.2 Liqüefacció versus abscessificació.....	15
1.4.3 Espectre de lesions pulmonars tuberculosos en humans	15
1.4.4 Classificació dels pacients segons la patologia pulmonar	17
1.5 Models animals de Tuberculosi	18
1.5.1 Ratolins.....	19
1.5.2 Conill porquí.....	21
1.5.3 Conill.....	22
1.5.4 Primats no humans	22
1.5.5 Grans animals. Importància de la mida del pulmó.....	24
1.5.6 Peix zebra.....	25
1.6 La resposta immunitària en la tuberculosi	26

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

1.6.1	Resposta Innata	26
1.6.2	Resposta adquirida	34
1.7	Teràpies Host-directed o dirigides a l'hostatger	43
1.7.1	Teràpies dirigides a la funció del macròfag	44
1.7.2	Teràpies dirigides a la regulació dels eicosanoids.....	45
1.7.3	Teràpies dirigides a la modulació de citocines	46
1.7.4	Teràpies que mantenen l'homeòstasi de l'hostatger.....	47
1.8	Tolerància Oral.....	48
2	Hipòtesi i objectius.....	50
3	Metodologia	52
3.1	Disseny experimental	52
3.2	Tractaments d'inducció de tolerància oral	55
3.3	Ètica i animals	55
3.4	Histopatologia i histometria	56
3.5	Càrrega bacil·lar.....	56
3.6	Avaluació de la resposta cel·lular específica als estudis 1 i 2.....	57
3.7	Ambient immunològic al teixit infectat.....	58
3.8	Determinació d'eicosanoids.....	58
3.9	Avaluació de la resposta reguladora dels limfòcits T	58
3.10	Citometria	59
3.11	Gràfics i anàlisi estadístic	62
3.12	Publicació dels resultats.	62
4	Estudi 1: Desenvolupament i caracterització d'un model murí de tuberculosi activa	64
4.1	Evolució de la supervivència	64
4.2	Evolució de la càrrega bacil·lar	64
4.3	Origen i evolució de les lesions	65
4.4	Necrosi caseosa i líquuefacció	66
4.5	Caracterització de la resposta immunològica local i sistèmica.....	68

5	Estudi 2: El paper de la inflamació en la tuberculosi activa	72
5.1	Estudi comparatiu entre les soques C3HeB/FeJ i C3H/HeN.....	72
5.1.1	Supervivència i càrrega bacil·lar	72
5.1.2	Estudi histopatològic i histomètric	72
5.2	Efecte dels fàrmacs antiinflamatoris en el desenvolupament de tuberculosi activa en el model murí	75
5.2.1	Efecte sobre la supervivència i la càrrega bacil·lar.....	75
5.2.2	Histopatologia i histometria	77
5.3	Estudi comparatiu dels paràmetres immunològics: soca resistent C3H/HeN i efecte del tractament amb ibuprofè	79
6	Estudi 3: Desenvolupament d'una estratègia terapèutica per tractar la tuberculosi mitjançant l'administració de dosis baixes de micobacteris inactivats	82
6.1	Efecte sobre la supervivència de tractaments elaborats amb diferents soques micobacterianes.....	82
6.2	Efecte sobre la càrrega bacil·lar i la histopatologia.....	87
6.3	Rol protector de les cèl·lules T reguladores en la tuberculosi.....	88
6.3.1	Estudi comparatiu C3HeB/FeJ i C3H/HeN	88
6.3.2	Estudi de depleció de Tregs in vivo en el ratolí resistent C3H/HeN....	89
6.4	Estudi de la modulació immunològica exercida pel tractament amb <i>M.manresensis</i> (Nyaditum resae®)	91
7	Discussió	97
7.1	Sobre el sistema experimental desenvolupat per a l'estudi de la tuberculosi activa	97
7.2	Sobre l'estudi de la progressió a tuberculosi activa en el model desenvolupat.....	99
7.3	Desenvolupament de noves estratègies terapèutiques	105
7.3.1	Discussió sobre la utilitat dels tractaments desenvolupats	105
7.3.2	Desenvolupament del tractament amb micobacteris inactivats.....	107
7.3.3	Discussió sobre el mecanisme d'acció de Naditum resae®.....	109
7.4	Valoració global i fites assolides.....	113
7.4.1	Fites assolides en cada estudi	113

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

8	Conclusions finals.....	116
9	Bibliografia.....	118
10	Annexos	139
10.1	Annex 1: Article “Ibuprofen Therapy Resulted in Significantly Decreased Tissue Bacillary Loads and Increased Survival in a New Murine Experimental Model of Active Tuberculosis”	141
10.2	Annex 2: Article “Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis”	143
10.3	Annex 3: Patent internacional amb número de publicació WO2013186409 A1	145
10.4	Annex 4: Esborrany d’article “New Host-directed therapy against active tuberculosis has been developed and characterized in Cardona’s mice model”	185

Llistat d'abreviacions

AAS: àcid acetilsalicílic

AINEs: Antiinflamatoris no esteroideus

AMPc: Adenosina monofosfat cíclica

ATP: Adenosina trifosfat

BAL: de l'anglès, Bronchoscopic Alveolar Lavage

BCA: àcid Bicinconinic

BCG: Bacil de Calmette-Guérin, soca atenuada del *M.bovis*

CCL20: de l'anglès, Chemokin (C-C motif) ligand 20.

CCR6: de l'anglès, Chemokin (C-C motif) receptor 6.

CD: clúster de diferenciació

CFU: de l'anglès, Colony forming unit

COX: Ciclooxygenasa

CXCL1 o CXCL2: de l'anglès, Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 o 2

DCs: de l'anglès, dendritic cells

DTH: de l'anglès, Delayed-type hipersensitivity

ELISA: de l'anglès, Enzym-linked immunosorbent assay

EV: endovenosa

Foxp3: Gen que codifica la proteïna Forkhead box P3, escrit en minúscules indistintament per referir-se al gen murí o humà.

FSC: de l'anglès, Forward scatter

H/E: Hematoxil·lina/Eosina

hi: de l'anglès, high, alta expressió del marcador

HNPs: de l'anglès, Human neutrophilic peptides

IFN: Interferó

IL: interleucina

iNOS: de l'anglès, inducible Nitric oxide synthase

IRIS: de l'anglès, Immune reconstitution inflammatory syndrome

ITBL: Infecció tuberculosa latent

KC: Sinònim de la quimiocina CXCL1

LIX: Sinònim de la quimiocina CXCL5

lo: de l'anglès, low, baixa expressió del marcador

LOG: Logaritme decimal o logaritme en base 10

LOX: Lipooxygenasa

Lta4: gen que codifica LTA4H, escrit en minúscules indistintament per referir-se al gen murí o humà.

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

LTA4H: de l'anglès, Leukotiene A4 hydrolase

LTB₄: Leucotriè B₄

LXA₄: Lipoxina A₄

LXR α : de l'anglès, Oxysterol receptor alfa

LXR β : de l'anglès, Oxysterol receptor beta

M.: *Mycobacterium*

MDR: de l'anglès, Muldti-drug-resistant (soca multiresistent a antibiòtics)

MFs: Macròfags

MIP-2: de l'anglès, Macrophage inflammatory protein 2, sinònim de CXCL2

MMPs: Metaloproteinases de la matriu

MOI: de l'anglès, Multiplicity of infection

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MTC : Tricròmic de Masson

MVA85A: de l'anglès, Modified vaccinia Ankara 85A

NETs: de l'anglès, Neutrophilic extracellular traps

NK: de l'anglès, Natural killers

OMS: Organització mundial de la salut

OVA: Ovoalbúmina

PBMCs: de l'anglès, Peripheral blood mononuclear cells

PBS : de l'anglès, Phosphate buffered saline

PGE₂: Prostaglandina E₂

PPAR γ : de l'anglès, Peroxisome proliferator activated receptor γ

PPD: de l'anglès, tuberculin purified protein derivative

PRRs: de l'anglès, Patern recognition receptors

RNI: de l'anglès, Reactive Nitrogen Intermediate

ROI: de l'anglès, Reactive Oxygen Intermediate

ROS: de l'anglès, Reactive Oxygen Species

RXR: de l'anglès, Retinoid X receptor

SD: Desviació estàndard

SIDA: Síndrome de la immunodeficiència adquirida.

SSC: de l'anglès, Side scatter

STAT3: de l'anglès, Signal transducer and activator of transcription 3.

TB: Tuberculosi

Teff: T potencialment efectores CD4+CD25+CD39-

TGF- β : de l'anglès, Transforming growth factor beta

Th (dit dels limfòcits): de l'anglès, T helper

TIGRA: de l'anglès, T-cell Interferon-gamma release assay

T_{meff}: T efectores de memòria CD4⁺CD25⁻CD39⁺

TNF- α : de l'angès, Tumor necrosis factor alfa

TST: de l'angès, Tuberculin skin test (prova de la tuberculina)

UTE: Unitat de tuberculosi experimental

VIH: Virus de la immunodeficiència humana

XDR: de l'angès, Extremely-drug-resistant (soca extremadament resistent a antibiòtics)

ZN : Ziehl-Neelsen

1 Introducció

1.1 10 conceptes bàsics sobre la tuberculosi

1. La tuberculosi és una malaltia infecciosa causada per un bacil molt resistent anomenat *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*).

2. La presentació més freqüent en individus sans és la pulmonar, on el bacil produeix lesions al pulmó, però també pèrdua de pes, febre, suors nocturnes i malestar general. Pot acabar amb la mort si no es tracta. Amb menor freqüència també pot presentar-se de forma extrapulmonar.

3. La tuberculosi es transmet per via aèria, quan una persona malalta expulsa bacils continguts en aerosols que es generen quan parla o tus, i que poden anar a parar a les vies respiratòries d'un nou hostatger, i infectar-lo.

4. Quan una persona s'infecta pot controlar la infecció passant a tenir una infecció tuberculosa latent (ITBL), o bé pot emmalaltir en desenvolupar una tuberculosi activa. No obstant això, encara que una persona controli la infecció, la ITBL pot reactivar-se més tard, amb major probabilitat durant els 2 primers anys següents al moment de la infecció.

5. La infecció tuberculosa es pot diagnosticar amb la prova de la tuberculina, que mesura la resposta cel·lular del pacient a antigens tuberculosos. Aquesta prova però, no permet distingir entre infecció i malaltia, pel que el diagnòstic s'ha de basar en la simptomatologia, i finalment en la demostració del bacil en mostres del pacient (clàssicament per cultiu de la mostra o observació directa al microscopi, i més recentment per tècniques de genètica molecular).

6. El tractament estàndard de la tuberculosi consisteix en l'administració de 4 fàrmacs antibiòtics (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida i Etambutol) durant una primera fase (2 mesos), i continuació amb 2 d'aquests fàrmacs (Isoniazida i rifampicina) durant 4 mesos més. Comporta un risc notable d'efectes no desitjats, una baixa adherència al tractament i un cost econòmic important. El tractament es complica quan la tuberculosi és produïda per una soca resistent a algun (o diversos) dels antibiòtics utilitzats normalment. Són les soques que coneixem com a Multi-Drug-resistant (MDR) o Extremely-Drug-resistant (XDR).

7. La tuberculosi està estretament lligada al virus de la immunodeficiència humana (VIH). Les persones amb tuberculosi tenen més risc de desenvolupar la Síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA), i les persones infectades amb VIH tenen major risc de desenvolupar tuberculosi.

8. Tot i així hi ha altres importants factors de risc: immunodeficiències, diabetis mellitus, condicions d'aglomeració de persones, de malnutrició i de pobresa en general.

9. L'aparició de soques de *M.tuberculosis* resistents als antibiòtics és un dels problemes greus de la tuberculosi avui dia, degut a la complicació que suposen per al tractament. En el cas de patir una tuberculosi per una soca multiresistent el cost del tractament es multiplica ja que el temps de tractament s'allarga fins a un mínim de 2 anys. Els riscos per efectes secundaris incrementen molt doncs s'han d'utilitzar fàrmacs de segona línia, i la probabilitat d'èxit també disminueix fins a un 40-50% (envers un 90% del tractament estàndard en soques susceptibles).

10. Els nens són més susceptibles de desenvolupar la tuberculosi, i per aquest motiu la prevalença de la malaltia pediàtrica és un indicador de la prevalença de la infecció en una població. A més, el seu diagnòstic és més difícil degut a que és més freqüent la presentació de formes atípiques de tuberculosi.

1.2 La tuberculosi com a problema global

Tot i que existeixen eines per diagnosticar, prevenir i tractar la tuberculosi, l'any 2012 van emmalaltir-ne 8,6 milions de persones, i 1,3 milions en van morir, segons recull l'últim informe de la Organització Mundial de la Salut (WHO 2013). De fet, la tuberculosi és, després de la SIDA, la malaltia infecciosa causada per un sol agent que més morts produeix a escala global. A més, entre la població afectada pel VIH, la tuberculosi és la primera causa de mort, i és una de les 3 principals causes de mort entre dones joves (de 15 a 44 anys).

Tot i que hi ha casos de tuberculosi arreu del planeta, el 80% d'aquests es concentren en 22 països. Un 60% dels nous casos es presenten a Àsia, però la major proporció de nous casos per habitant es dona a l'Àfrica subsahariana. Pel que fa a les morts, les desigualtats són encara més grans: el 95% de les morts per tuberculosi es produeixen a països amb ingressos baixos o mitjans. De manera que tot i ser un problema global, allà on incideix de forma més crua és a països amb pocs recursos econòmics (WHO 2013).

A nivell global, la mortalitat ha disminuït aproximadament un 50% des de l'any 1990, complint així una de les fites de la OMS pel que fa a aquesta malaltia, que consistia en reduir aquestes taxes a aquests nivells pel 2015. En canvi la prevalença només ha disminuït un 37%, pel que no es preveu que pugui complir aquest objectiu (Figura 1). A més, a 11 dels 22 països amb més tuberculosi ni la incidència, ni la

prevalença ni la mortalitat estan disminuint al ritme que seria necessari per assolir aquests objectius de la OMS.

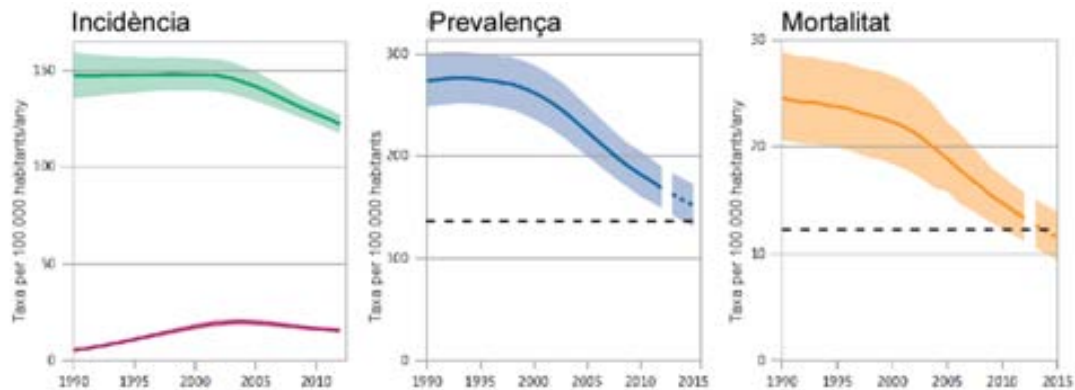


Figura 1: Tendència global de les taxes estimades d'Incidència, Prevalença i Mortalitat de la Tuberculosi. Adaptat de (WHO 2013). Esquerre: tendència a nivell global de la incidència de tuberculosi (en verd) incloent els casos de tuberculosi en pacients infectats amb VIH (línia vermella). Al mig i a l'esquerra, prevalença i mortalitat de la tuberculosi de 1990 a 2012, i previsió de la prevalença fins al 2015. La línia horitzontal discontinua representa l'objectiu de la OMS pel 2015, una reducció de la meitat de la taxa en comparació als nivells de la taxa el 1990. En la mortalitat no s'ha inclòs les morts causades per la tuberculosi en pacients infectats amb VIH.

Un problema addicional és el sorgiment de soques resistents als antibiòtics. L'any 2012 es van informar 450.000 casos de tuberculosi multiresistent, dels quals 170.000 van morir. A més cal tenir en compte que molts dels casos no es detecten, pel que tot plegat, sumat a la dificultat del tractament d'aquest tipus de tuberculosi, constitueix una crisi de salut pública.

Per tal de combatre aquesta epidèmia global és necessari desenvolupar noves eines de diagnòstic i tractament. La vacuna existent, la vacuna del bacil de Calmette-Guérin (BCG), tot i que protegeix els nens de tuberculosi severes com la meningitis o la tuberculosi disseminada, i sols en països amb una alta prevalença, tampoc no és efectiva en adults (Trunz et al. 2006). Pel que fa a la diagnosi, segueix essent un repte diferenciar la infecció latent de la malaltia, o bé detectar la tuberculosi en casos més complicats com ara en nens o en persones amb coinfecció amb VIH. Quant al tractament, el règim que s'utilitza actualment es va desenvolupar fa més de 40 anys, i presenta diversos inconvenients: la llarga durada (mínim de 6 mesos); la necessitat d'una estreta supervisió; la toxicitat (tot i que el tractament és segur, fins i tot en embarassades, la presentació d'efectes adversos no és rara, especialment en certs grups de risc com malalts renals, hepàtics, embarassades o pacients coinfectats amb VIH (WHO 2010)); la dificultat d'utilitzar-lo en persones coinfectades amb VIH donada la interacció dels fàrmacs anti-retrovirals amb alguns antibiòtics; o la impossibilitat d'utilitzar-lo en casos d'infecció amb soques MDR, que presenten resistència a algun dels fàrmacs de primera línia. A més, el preu del tractament també és important,

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

sobretot si tenim en compte que els països amb més afectació són justament aquells on hi ha més escassetat de recursos econòmics.

1.3 Història natural de la tuberculosi

La tuberculosi és una malaltia causada pel *Mycobacterium tuberculosis*, i afecta normalment els pulmons. La infecció comença quan el bacil entra a l'organisme per les vies respiratòries, i quan arriba als alvèols pulmonars és fagocitat pels macròfags. Algunes persones eliminen la infecció en aquest moment, abans que s'arribi a desenvolupar resposta immunitària adquirida, ja que s'estima que en el 70% dels casos d'exposició al bacil la infecció no progressa (Parrish et al. 1998). En cas contrari, el bacil comença a replicar-se dins els macròfags, fins que la resposta adquirida es desenvolupa i frena aquest creixement (Kaufmann et al. 2005). En algunes persones, malgrat estar infectades - tal i com indica una resposta al "Tuberculin skin test" (TST) positiva - la infecció no arriba a provocar lesions visibles en una radiografia ni a provocar símptomes clínics. Seria el cas de persones amb ITBL. D'altres persones, en canvi, desenvolupen la malaltia, ja sigui just després d'infectar-se (tuberculosi primària) o bé al cap d'un temps (tuberculosi postprimària), presentant una simptomatologia clínica variable, que pot incloure un o diversos símptomes (febre nocturna, tos, hemoptisi, pèrdua de pes i malestar general), i un creixement bacil·lar important als pulmons (en molts casos detectable perquè l'esperut és positiu al cultiu o bé perquè la seva observació al microscopi revela bacils àcid-alcohol resistents). Els pacients de tuberculosi activa poden desenvolupar un ampli espectre de lesions, visibles en una radiografia, que al cap i a la fi són la causa del deteriorament de la salut en el pacient.

Davant aquestes observacions clíniques, és lògic fer-se les següents preguntes:

- **Perquè les persones que han patit la malaltia, un cop curades gràcies al tractament amb antibiòtics, segueixen donant positiu a la prova de la tuberculina?**
- **Què passa durant la ITBL?**
- **Perquè un 10% de persones sanes infectades sí que desenvolupen tuberculosi activa?**
- **Com es passa de ITBL a tuberculosi activa i perquè?**

Tradicionalment la ITBL s'ha explicat mitjançant el fenomen de la latència del bacil. El bacil de la tuberculosi, quan es troba en condicions desfavorables per al creixement entra en un estat no replicatiu (Wallace 1961; Munoz-Elias et al. 2005; Cardona 2007; Gill et al. 2009). Alguns autors han defensat que aquests bacils no replicatius poden romandre dins una lesió antiga, i que en determinades circumstàncies (per exemple d'immunosupressió local), el bacil pot despertar o ressuscitar, començant de nou a replicar-se i causant per tant la reactivació de la tuberculosi (Dannenberg 2006). Aquesta teoria, però, no explicaria perquè el tractament de referència per a la ITBL (que disminueix el risc de patir una tuberculosi postprimària en un 90%) consisteix a tractar durant un període limitat de temps (9 mesos) amb un sol fàrmac, l'isoniazida, un antimicrobià que actua contra els micobacteris només si es troben en estat replicatiu, (Comstock 1999; Fox et al. 1999). Per respondre aquestes qüestions sobre la infecció latent el grup de la Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE) ha contribuït amb diversos estudis sobre el paper dels macròfags escumosos en la disseminació pulmonar dels bacils (Cardona et al. 2000; Cardona et al. 2003; Caceres et al. 2009), que van portar al Dr. Cardona a proposar una explicació alternativa, la hipòtesi dinàmica (Cardona 2009). Aquesta visió sobre la història natural de la malaltia s'ha anat completant amb els treballs posteriors del grup en models matemàtics (Bru et al. 2010), o sobre l'encapsulació de les lesions (Gil et al. 2010), i també ha donat un nou punt de vista sobre el pas de ITBL a tuberculosi activa (Cardona 2010).

1.3.1 Hipòtesi dinàmica i ITBL

Aquesta hipòtesi sosté que durant la ITBL els bacils no queden en estat latent, sinó que escapen de les lesions i reinfecten novament el teixit. Així doncs, pel que fa a la ITBL, segons la hipòtesi dinàmica el cicle de reinfecció del *M.tuberculosis* als pulmons seria el següent:

Tal i com es mostra a la

Figura 2 l'hostatger inhala bacils aerosolitzats que un pacient de tuberculosi ha expulsat (I). Un cop arriba a l'espai alveolar (II) és fagocitat per un macròfag alveolar resident, que l'incorpora al fagosoma. Com que el *M.tuberculosis* inhibeix la unió del fagosoma al lisosoma, evita ser destruït i es multiplica intracel·lularment, fins que causa la lisi del macròfag uns dies més tard. Els bacils alliberats són fagocitats pels macròfags veïns, sense causar massa inflamació. Tot i que són drenats al limfonode regional activant la resposta immunitària adquirida, els limfòcits específics generats no poden ser atrets pel focus d'infecció al pulmó, doncs no hi ha prou inflamació que secreti les citocines necessàries (Bru et al. 2010; Cardona et al. 2014; Vilaplana et al. 2014b). Durant aquest període, els bacils van creant nous focus d'inflamació al voltant

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

del punt inicial, infectant més macròfags veïns i replicant-se. (III) Quan hi ha una massa crítica de macròfags veïns infectats, la inflamació generada és capaç d'atraure els limfòcits, que activen els macròfags i els capaciten per destruir els bacils. Els macròfags activats són capaços de destruir un 90% dels bacils tuberculosos. Però els bacils supervivents romanen a dins de macròfags o bé al teixit necròtic en estat no replicatiu. Quan el creixement bacil·lar ja s'ha controlat, els macròfags comencen a reparar el teixit destruït, començant per la fagocitosis del teixit necròtic. D'aquesta manera poden acumular encara més bacils, i a més a més, a mesura que van fagocitant detritus cel·lulars, els lípids fagocitats s'acumulen en vacuoles lipídiques al seu citoplasma, i els macròfags esdevenen escumosos. (IV) Els macròfags escumosos, que perden la capacitat de fagocitar i la capacitat migratòria, són drenats progressivament cap la perifèria de la lesió, arrossegats pel fluid alveolar cap als bronquis. (V) Al llarg d'aquest camí cap al sistema digestiu on són destruïts, poden lisar, i si contenen algun bacil, encara que sigui en estat no replicatiu, (Vb) aquest queda lliure a un altre punt del pulmó on pot començar de nou tot el procés. Aquest fenomen rep el nom de reinfecció endògena.

1.3.2 Refutació de la hipòtesi dinàmica i rellevància de l'encapsulació de les lesions gràcies al model de minipigs

En un estudi realitzat en un model de tuberculosi on s'infectaven porcs amb *M.tuberculosis* (Gil et al. 2010), es va comprovar que després d'unes setmanes d'infecció coexistien lesions en diverses fases d'evolució, des de molt inicials fins a ja calcificades, suggerint doncs que hi havia reinfecció endògena contínua. A més, es va veure que aquelles lesions que contactaven amb un septe intralobular, quedaven encapsulades per un anell de fibrosi exterior, i que 9 setmanes després de la infecció disminuïa molt el nombre de noves lesions. Adaptant la hipòtesi dinàmica a aquesta troballa, doncs, diríem que l'encapsulació de les lesions permet trencar el cicle de reinfecció endògena dels bacils, ja que impedeix el drenatge de bacils cap a l'exterior de les lesions, i per tant evita la disseminació pulmonar, resultant clau en el control de la infecció tuberculosa (

Figura 2, IVb).

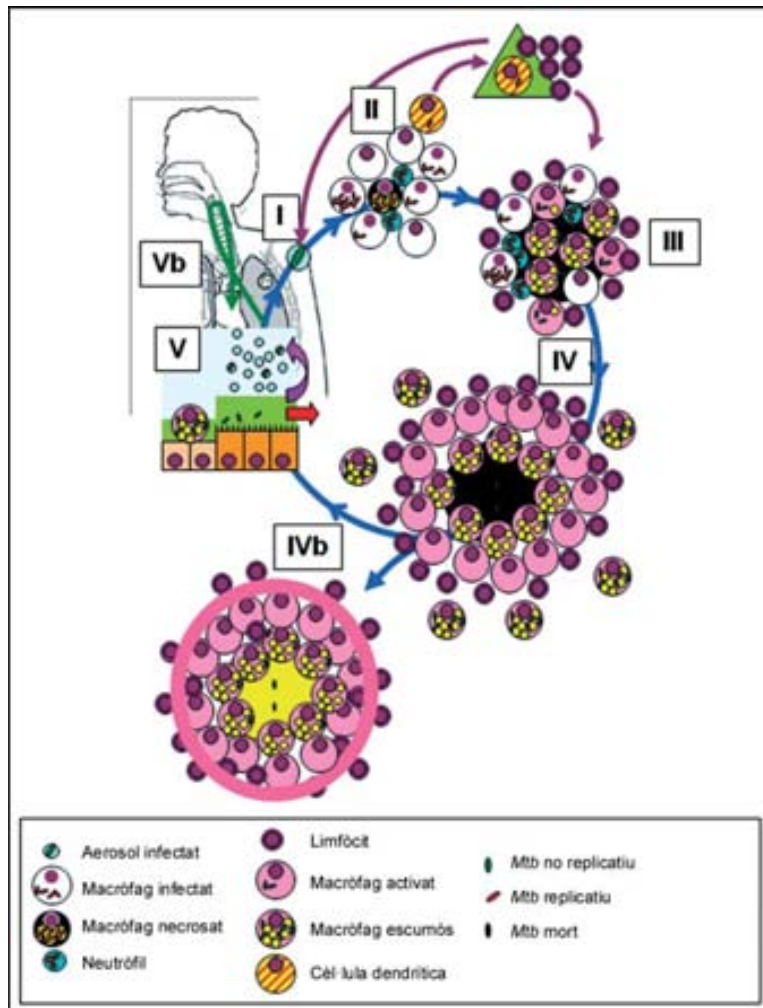


Figura 2: Cicle endogen de *M.tuberculosis* a l'hostatger en la ITBL, adaptat de la figura publicada a (Cardona et al. 2011). I: El bacil de *M.tuberculosis* aerosolitzat entra als alvèols. II: El bacil és fagocitat per un macròfag alveolar, on es replica fins a causar la seva necrosi. Els macròfags necrosats causen una petita reacció inflamatòria, i alliberen els bacils que són fagocitats per macròfags veïns, sense causar lesió. Malgrat els bacils són drenats per les cèl·lules dendrítiques al limfonode regional (triangle verd), on té lloc la presentació d'antigen i s'inicia la resposta immunològica adquirida, en aquesta fase unicel·lular (I) els bacils poden causar nous focus d'infecció lliurement perquè la manca de reacció inflamatòria evita que els limfòcits específics detectin els focus originals d'infecció. III: Quan l'acumulació de macròfags infectats és prou gran la inflamació ja és suficient per atraure els limfòcits específics, que activen els macròfags infectats i destrossen la major part dels bacils (90%). Els bacils supervivents queden en estat no replicatiu a l'interior de macròfags activats o entre el material necròtic. IV: Comença la fase de neteja i regeneració de la lesió, caracteritzada per la fagocitosis de les restes cel·lulars necròtiques que realitzen els macròfags activats. Aquest procés provoca que els macròfags acumulin lípids fins a esdevenir escumosos, i que puguin fagocitar bacils supervivents que han quedat entre els detritus cel·lulars. Quan esdevenen escumosos són drenats cap a la perifèria de la lesió, i posteriorment cap al tracte gastrointestinal on han de ser fagocitats, transportant amb ells els bacils fagocitats. V: Els macròfags escumosos, en el seu camí cap al tracte gastrointestinal poden lisar, alliberant bacils que poden ser aerosolitzats i viatjar o bé cap al tracte gastrointestinal o bé reinfectar el teixit pulmonar (Vb). IVb: si la lesió s'encapsula, s'atura el drenatge de bacils provinents de l'interior de la lesió, aturant el cicle de reinfecció endògena.

1.3.3 “Damage theory” i tuberculosi activa

Segons Casadevall et al (Casadevall et al. 2003), la patogènesi d'una infecció depèn tant del microorganisme com de l'hostatger. Des del punt de vista de l'hostatger hi hauria tres possibles situacions: I) si la resposta immunitària és feble, el microorganisme colonitza l'hostatger, essent perjudicial, II) si la resposta immunitària és moderada, no hi hauria perjudici ni per a l'hostatger ni per al microorganisme, estarien en un equilibri que els permetria sobreviure a tots dos, i III) si la resposta immunitària és massa intensa, seria perjudicial tant pel microorganisme com per l'hostatger, doncs el sistema immunitari provocaria un dany tissular excessiu.

Pel que fa a la tuberculosi, s'ha postulat que la “Damage theory” - o teoria de Dany-benefici en català - es pot aplicar també a la tuberculosi (Cardona 2010), tal i com s'explica a la Figura 3.

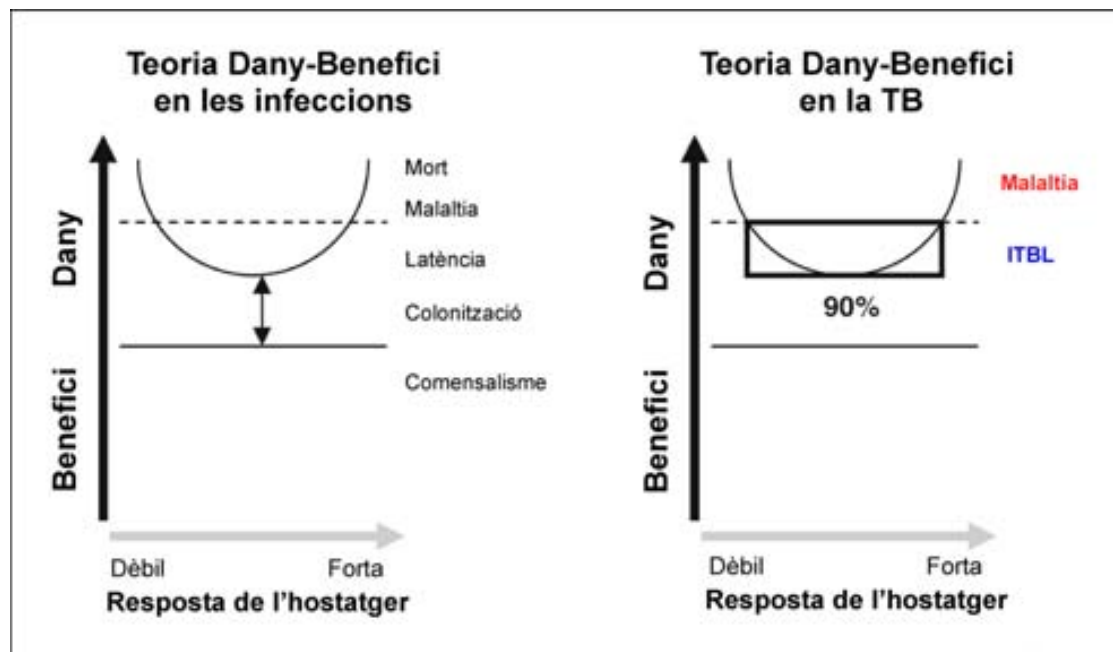


Figura 3: Damage theory o teoria de dany-benefici (Casadevall et al. 2003), adaptat a la TB (Cardona 2010). Teoria dany-benefici en les infeccions: L'eix Y mostra la progressió del dany en el teixit de l'hostatger, i l'eix X la intensitat de la resposta immunitària. La fletxa indica que la posició de la corba és variable i depèn de cada cas particular d'interacció hostatger-patògen. Una resposta dèbil és inapropiada, insuficient per beneficiar l'hostatger, mentre que una resposta forta és també inapropiada, doncs també provoca un dany en l'hostatger. Teoria dany-benefici en la tuberculosi: De la mateixa manera, una resposta insuficient o excessiva portaria a la malaltia, però una resposta equilibrada permetria una convivència del bacil i de l'hostatger, i seria el cas de la ITBL, el cas del 90% dels humans infectats.

En el primer cas, un hostatger que pateixi una immunosupressió no evitarà el creixement del bacil i per tant patirà una malaltia disseminada, podent implicar la mort de l'hostatger. En el segon cas, una resposta immunològica moderada, portaria a un

equilibri entre el *M.tuberculosis* i l'hostatger. El *M.tuberculosis* sobreviuria i l'hostatger no emmalaltiria, només romandria infectat. Seria el cas de la ITBL, i seria la situació del 90% de la població infectada. Finalment, en el tercer cas la resposta immunitària davant la infecció seria molt intensa, produint un dany tissular important, i per tant simptomatologia. Seria el cas de tuberculosi pulmonar típica en adults immunocompetents, amb afectació a l'apex pulmonar, liqüefacció i sovint cavitació de la lesió (Figura 3). Més enllà de ser una teoria sobre el desenvolupament de la malaltia, aquesta "Damage theory" té implicacions pràctiques a l'hora d'afrontar la lluita contra la tuberculosi, doncs en aquest camp de recerca s'ha assumit de forma majoritària que per evitar la malaltia és necessari aconseguir una resposta més intensa. En canvi, amb la "Damage theory" es proposa que la resposta excessiva podria ser la causa de la malaltia tuberculosa, pel que una estratègia alternativa seria modular aquest excés de resposta.

1.4 Aspectes patològics de la tuberculosi

La patologia de la infecció és la característica més important de la malaltia, ja que són les lesions les que provoquen tota la simptomatologia. És a dir, sense lesions, no hi ha malaltia.

1.4.1 Necrosi caseosa i liqüefacció, segons el Dr. Jacques Grosset

La necrosi caseosa és el procés bàsic de la malaltia tuberculosa en humans. És la necrosi de la lesió inicial, que conté macròfags i neutròfils, i del teixit pulmonar que envolta la lesió, i presenta una consistència sòlida, o fins i tot gomosa. Això és degut a que malgrat l'alvèol queda destruït, les fibres elàstiques de les parets alveolars i els seus vasos sanguinis es mantenen, i són responsables de la duresa i solidesa de la lesió. La necrosi caseosa és crucial per a l'evolució de la malaltia, perquè comporta la mort de la immensa majoria dels bacils de la lesió. Per això a les lesions caseoses recents la càrrega bacil·lar és molt alta, però passat un temps, a les lesions caseoses antigues, hi ha molts pocs bacils viables.

El començament de la necrosi caseosa coincideix amb el desenvolupament de la resposta adquirida, la resposta cel·lular en el cas de la tuberculosi, o "Delayed-type hypersensitivity" (DTH). Els factors que augmenten la DTH, com ara la inoculació de l'adjuvant de Freund (mescla d'aigua i olis amb micobacteris), augmenten la formació del caseum. I de la mateixa manera, els models animals amb una DTH molt forta també desenvolupen major caseificació. Un altre indicatiu de que la DTH és responsable del caseum, és que alguns malalts de tuberculosi que pateixen SIDA, amb recomptes baixos de limfòcits T CD4+, pateixen una exacerbació de la tuberculosi quan

Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

recuperen els recomptes de CD4+, el síndrome inflamatori de reconstitució immunològica (IRIS). Ara bé, el Dr. Wilkinson, que ha estudiat l'IRIS amb profunditat, matitza aquesta hipòtesi. L'IRIS no estaria associat a un excés de resposta Th1 directament, sinó que hi hauria un desequilibri de la inflamació, una "tormenta de citocines", especialment quant a "tumor necrosis factor alfa" (TNF- α), interferó gamma (IFN- γ) i interleucina 6 (IL-6) (Walker et al. 2013). De totes maneres, sigui quina sigui la causa del desenvolupament de la DTH, segons el Dr. Grosset la necrosi caseosa és causada per la DTH: els limfòcits T citolítics maten els macròfags infectats portant a la destrucció del teixit que els envolta. L'hostatger destrueix una part del seu teixit per tal de controlar la multiplicació del bacil i evitar la disseminació massiva.

La necrosi caseosa pot evolucionar de diferents maneres segons l'individu:

- 1) Organització de la necrosi caseosa: en la majoria de casos (90% dels infectats) els macròfags activats envolten el centre de la lesió. Els limfòcits T reaccionen als antigens tuberculosos, s'expandeixen i produeixen IFN- γ entre altres citocines, activant els macròfags locals. Els macròfags fagociten i destrueixen els bacils que puguin haver escapat del centre necròtic, i la lesió és encapsulada. Amb el temps, la lesió es fibrosa, es calcifica o fins i tot s'ossifica. Amb aquesta evolució, no queden bacils viables dins la lesió.
- 2) No organització: Algunes lesions caseoses poden persistir en el temps sense encapsular-se o modificar-se de cap altra forma. Serien un pas intermediari entre les prèvies, que resolen la infecció, i les següents, que comporten la progressió de la malaltia.
- 3) "Softening" (estoament) del caseum o líquüefacció: En una minoria de casos (com a molt 10% dels individus infectats) el caseum s'estova. Aquest és un dels esdeveniments més importants de la tuberculosi, doncs dóna lloc a la progressió de la infecció amb *M.tuberculosis* a la malaltia tuberculosa. No en tots els casos, però sí en la majoria, la lesió afecta algun bronqui i llavors es produeix un buidatge del contingut líquüefet a l'arbre bronquial, pel que es forma una cavitat al pulmó, i degut a l'oxigenació de l'ambient es dóna un gran creixement bacil·lar extracel·lular. Amb la tos, el caseum líquüefet amb una alta càrrega bacil·lar és expulsat cap a altres zones del pulmó, i també cap a l'exterior del pacient (esput), de manera que la líquüefacció i cavitació del caseum són responsables de la transmissió de la malaltia.

La lesió cavitada pot resoldre espontàniament, o bé pot portar a la formació de nous focus d'infecció, caseïficació i cavitació, fins a la mort de l'individu si no es tracta. A l'era preantibiòtica (l'estreptomicina va ser el primer antibiòtic actiu contra el *M.tuberculosis* que es va descobrir, el 1943), un 50% dels pacients amb cavitats

morien després de 2 anys de malaltia, un 25% esdevenien malalts crònics i un 25% aconseguien superar la malaltia (Grosset 2003).

1.4.2 Liqüefacció versus abscessificació

Els abscessos són lesions inflamatòries que contenen material purulent (neutròfils) i es formen en resposta dels teixits d'un hostatger a agressions de diversa naturalesa (biològics, químics o físics). La formació dels abscessos s'ha estudiat detalladament en el model murí d'infecció per *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (Cheng et al. 2011). En aquest model, l'abscessificació es produeix en 4 passos: I) després de la inoculació de *S.aureus* als ratolins, es disseminen pel torrent sanguini en 3h cap als òrgans perifèrics. Els bacils de *S.aureus* sobreviuen a la sang, i curiosament s'aglutinen en contacte amb el fibrinògen o la fibrina de la sang. II) el següent pas és l'infiltració massiva de neutròfils i altres cèl·lules inflamatòries als llocs d'infecció, atrets per algun factor proinflamatori que generen els bacils, III) l'abscess madura, de manera que al centre es situa un nucli de bacils encerclat per una pseudocàpsula de fibrina (*S.aureus* secreta coagulasa, que en conjunt amb la protrombina promou la formació de la fibrina) envoltat de neutròfils tant vius com necròtics, tot plegat també envoltat d'una capa de fibrina i dipòsits de matriu extracel·lular. IV) finalment l'abscess pot trencar-se i buidar el contingut.

Així doncs, la formació d'un abscess és un procés molt semblant a la formació de la necrosi caseosa dels tuberculomes. En tots dos casos hi ha un component inflamatori i una infiltració neutrofilica, malgrat que en el cas de l'abscess el procés és molt més ràpid (4 dies en l'abscess, versus diverses setmanes en el cas de la tuberculosi). A més, la formació de la lesió tuberculosa també es diferencia de l'abscessificació per les parets alveolars, que donen la consistència dura que caracteritza la necrosi caseosa, fins que es degraden ocasionant la liqüefacció o estovament del caseum.

1.4.3 Espectre de lesions pulmonars tuberculosos en humans

És possible trobar un ventall molt ampli de lesions en les persones infectades amb *M.tuberculosis* (Canetti 1955). Això és fruit de la reinfecció endògena, que permet la coexistència de lesions en diferents fases d'evolució en un mateix pacient (Gil et al. 2010) però també de les diferents formes de tuberculosi cap on pot evolucionar cada persona infectada. A la Taula 1 podem veure una classificació detallada de les lesions que s'han descrit en humans, en funció de la mida i les característiques histopatològiques. Segons l'estat del pacient, trobem unes lesions o unes altres:

Quan el TST encara és negatiu, hi ha cèl·lules infectades però encara no considerem que hi hagi cap lesió (0). És la fase cel·lular de la infecció.

Taula 1: : Espectre de lesions en la història natural de la infecció de *M.tuberculosis* en humans

Clínica	Fase	Mida (mm)	Dies després de la infecció	Necrosi	Càpsula	Caseum	Calcificació	Afectació Pleural	Cavitat
TST-	0	0	<11	-	-	-	-	-	-
LTBI	I	0,5	11-21	-	-	-	-	+/-	-
	IIa	1-3	28-35	+	-	-	-	+/-	-
	IIb	1-3	28-35	+	+	-	-	+/-	-
	III	5-40	>35	+	+	+	+/-	-	+/-
Tuberculosi activa	IVa	≥12,5	>35	+	+	+	-	-	+
	IVb	V	>21	+/-	+/-	+/-	-	+	-
	IVc	V	>35	+	-	+	+/-	-	-
	IVd	0,5-2	?	+/-	-	-	-	-	-

V=variable. Taula adaptada de (Cardona 2014)

- A partir que el TST és positiu ja podem trobar (I) agrupacions de macròfags i neutròfils, no estructurats, sense limfòcits, de mig mil·límetre, que encara no són visibles a la radiografia. (IIa) La lesió tipus I comença la necrosi, però encara fa 1-3mm. (IIb) La lesió tipus I s'encapsula, també fa 1-3mm. (III) Si la lesió IIa continua progressant, podem trobar un tuberculoma. Presenta necrosi caseosa, ja fa una mida considerable, visible a la radiografia (5-40mm), i pot encapsular-se i calcificar-se, o bé progressar.
- En la tuberculosi activa s'han descrit els següents tipus de lesions, a més de les anteriors, ordenades de major a menor freqüència amb la que es troben: (IVc) Infiltració cel·lular del teixit pulmonar, amb necrosi, i d'una extensió variable, que es pot presentar tant al lòbul superior com al mig o inferior. (IVa) Cavitat, amb una mida d'almenys 12,5 cm, que és una possible evolució del tuberculoma. Sempre es presenta al lòbul superior. (IVb) Lesions a la pleura, que poden presentar més o menys necrosi, caseïficació i encapsulació, de mida variable. (IVd) Tuberculosi miliar, formada per moltes lesions petites, de 0,5 a 2mm, en el mateix estat evolutiu. Poden presentar necrosi. Solen ocupar una gran extensió tant al pulmó com a altres òrgans, i són conseqüència de la disseminació hematògena produïda quan s'allibera una gran quantitat de bacils viables a la circulació, des d'un focus infecció (Cardona 2014).

1.4.4 Classificació dels pacients segons la patologia pulmonar

Clàssicament s'havia associat el tipus de lesions que presentaven els pacients al moment en que la malaltia es presentava en relació al moment de la infecció. La presentació típica, més freqüent en adults immunocompetents, amb infiltració (IVc) i/o cavitació (IVa) a l'apex pulmonar, s'associava a la tuberculosi postprimària, mentre que la presentació atípica, amb limfadenopatia hilar i afectació dels lòbuls mitjos o inferiors, més freqüent en nens, s'havia associat a la tuberculosi primària. Però les dades obtingudes per Jones et al. (Jones et al. 1997) desmenteixen aquesta associació, ja que els pacients estudiats presentaven indiferentment la presentació típica o atípica tant si provenien d'un brot de tuberculosi, i per tant patien tuberculosi primària, com d'un cas aïllat, i per tant tuberculosi postprimària. Jones et al., atribuien la presentació atípica amb limfadenopatia i afectació dels lòbuls inferiors i mitjos a una resposta immunitària ineficaç i no pas a una infecció recent.

Així doncs, el tipus de lesions que desenvolupen els pacients de tuberculosi dependrà del grau de resposta immunitària que desenvolupen davant del

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

M.tuberculosis, més que no pas del moment en que desenvolupen la malaltia (Jones et al. 1997). Segons aquest criteri podem trobar les següents situacions:

- a) Pacients amb TST negatiu: o bé no estan infectats, o bé estan en la fase cel·lular de la infecció, on encara no considerem que hi hagi lesió (0).
- b) A partir de la positivització del TST:
 - Pacients amb immunosupressió: poden presentar tuberculosi miliar (IVd), i fins i tot disseminació a altres òrgans.
 - Pacients amb una resposta immunitària intermitja, però insuficient: presentació atípica o infantil, amb limfadenopatia i infiltració als lòbuls.
 - Pacients amb una resposta immunitària incontrolada: presència de lesions cavitades (IVa).

Pel que fa a la tuberculosi activa, aquestes serien les possibles situacions. Però si tenim en compte la ITBL cal afegir la situació d'aquells pacients amb TST positiu, que estan infectats però que no emmalalteixen. Aquests pacients amb ITBL serien aquells amb la resposta immunitària més adequada, ja que desenvolupen una resposta equilibrada, que protegeix de la malaltia: tot i que controla la infecció, no causa un gran dany tissular, i així evita la cavitació.

1.5 Models animals de Tuberculosi

Els models animals són eines molt emprades en la recerca de moltes malalties humanes. Tot i que no hi ha reservoris naturals de *M.tuberculosis* en altres animals, a banda dels humans, moltes espècies sí que són susceptibles a la infecció accidental o bé s'infecten naturalment amb altres micobacteris. Per aquest motiu s'han utilitzat abundantment en l'estudi de la tuberculosi.

La gran dificultat a l'hora de modelar la tuberculosi humana és la gran varietat de presentacions clíniques, que a més pot ser influenciada per múltiples factors tant ambientals com de l'hostatger (nutrició, edat, tabaquisme, infeccions cròniques...), ja que a l'hora d'interpretar els resultats dels experiments desenvolupats en models animals s'ha de tenir en compte les diferències entre la tuberculosi humana i els seus models quant a la susceptibilitat, la forma de presentació o el curs temporal de la malaltia (Dharmadhikari et al. 2008). La Taula 2 mostra una comparació entre la tuberculosi humana i els diferents models animals més utilitzats quant a la presentació de lesions, que és l'aspecte més important a tenir en compte.

Taula 2: Comparació de l'espectre de lesions dels diferents models animals de Tuberculosi

Fase	Ratolí	CP	Conill	PNH	Caprins	Bovins	Porc	Peix Z*	Humans
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ila	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ilb	-	-	-	-	+	+	+	-	+
III	-	-	-	-	+	+	+	-	+
IVa	-	-	+/-	+/-	+	+	+	-	+
IVb	+	+	+	+	+	+	+	-	+
IVc	+	+	+	+	+	+	+	-	+
IVd	+	+	+	+	+	+	+	-	+

CP: Conill Porquí. PNH: Primats no humans. Peix Z: Peix zebra *lesions no pulmonars

Taula adaptada de (Cardona 2014)

Com s'aprofundirà més endavant, entre les espècies més utilitzades hi ha el ratolí, el conill i el conill porquí. El ratolí és extremadament resistent a la infecció, en el sentit que pot conviure amb la infecció durant molt de temps. El conill porquí és extremadament susceptible, i el conill té una susceptibilitat intermitja entre els altres dos, però és l'únic que desenvolupa lesions cavitades. Menys habitualment s'han utilitzat altres animals com a model de tuberculosi. Els remugants, tant la vaca com la cabra, els primats no humans, el porc, i fins i tot peixos (peix zebra).

Un altre aspecte del model que cal tenir en compte és la via d'infecció, i sobretot quin micobacteri s'utilitza exactament, doncs entre espècies com és evident, però també entre soques, hi ha diferències quant a virulència, immunogenicitat i infectivitat (Gagneux et al. 2007).

Tot i que cap model és perfecte i tots tenen les seves limitacions, cadascun pot modelar algun aspecte (o aspectes) de la malaltia, i es tracta d'escollir bé el model que més s'adeqüi a l'estudi que es vol desenvolupar.

A continuació s'exposa un breu resum de les característiques de les diferents espècies utilitzades, i com s'han emprat en l'estudi de la tuberculosi.

1.5.1 Ratolins

Els ratolins són l'espècie més utilitzada com a model de tuberculosi. En general són resistents a la infecció tuberculosa, en comparació als humans, ja que toleren una gran càrrega bacil·lar als pulmons i altres òrgans sense mostrar signes de malaltia. Quan s'infecten, el *M.tuberculosis* s'hi replica i la càrrega bacil·lar augmenta

Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

progressivament fins que desenvolupa la resposta Th1. Llavors l'hostatger controla el creixement bacil·lar, i comença la fase crònica de la infecció (Rhoades et al. 1997; Orme 2005; Dharmadhikari et al. 2008), fins i tot amb presència de bacils no replicatius segons alguns autors (Wallace 1961; Munoz-Elias et al. 2005). Tot i que sobrevisqui molt temps a la infecció, la infiltració progressiva del pulmó acaba amb la vida de l'animal. Les lesions que desenvolupen són granulomes desorganitzats, amb poca presència de limfòcits i sense necrosi caseosa ni encapsulació. Tot i així, donat que presenten una forta resposta Th1 però sense destrucció cel·lular, s'ha utilitzat molt en l'estudi de la immunologia de la tuberculosi (Gil et al. 2010). Un dels models clàssics amb el ratolí va ser el model de Cornell, utilitzat com a model de latència, on s'infectaven els animals i després es tractaven amb agents antimicrobians, de manera que reduïen molt la càrrega bacil·lar, tot i que la infecció es reactivava al cap d'un temps d'haver finalitzat el tractament (McCune et al. 1966). Aquest model i d'altres millorats s'han utilitzat molt en el desenvolupament de la quimioteràpia actual de la tuberculosi (Mitchison et al. 2009).

La disponibilitat de moltes soques singèniques i la possibilitat de desenvolupar models transgènics han ajudat en el descobriment del paper de diferents citocines, cèl·lules o marcadors de superfície en la malaltia, com ara el rol dels limfòcits TCD4+ (Caruso et al. 1999). Tot i que la majoria de soques de ratolí són resistents (Balb/C, C57Bl/6), hi ha determinades soques que són susceptibles a la infecció: DBA/2, C3H, CBA, i 129/SvJ. Els ratolins SCID (que no desenvolupen limfòcits B ni T) i els Nude (que no desenvolupen el timus, i per tant tampoc cèl·lules T) s'han utilitzat en models d'immunodeficiència. Recentment s'ha desenvolupat un model de tuberculosi amb un ratolí humanitzat (Calderon et al. 2013) on els ratolins NOD-SCID/ $\gamma_c^{(null)}$ s'han reconstituït amb limfòcits humans. Aquest model és susceptible a la infecció, i presenta lesions granulomatoses organitzades, amb necrosi caseosa. Un altre model més senzill de necrosi caseosa és el ratolí de la soca de C3HeB/FeJ. Aquests ratolins són molt susceptibles a la infecció i desenvolupen necrosi caseosa i líquefacció. S'ha utilitzat en diversos estudis genètics degut a la seva susceptibilitat (Chackerian et al. 2001; Kamath et al. 2003; Pan et al. 2005; Yan et al. 2006; Sissons et al. 2009), i també com a model d'hipòxia per avaluació d'antimicrobians (Driver et al. 2012; Harper et al. 2012; Skerry et al. 2012) o de tècniques de bioimatge (Davis et al. 2009).

En definitiva, els diversos models de ratolí existents s'han utilitzat molt en l'estudi de la tuberculosi, tot i les diferències amb el model humà quant a susceptibilitat i patologia. Malgrat aquestes desavantatges és un model molt més barat tant pel cost de l'animal com per la mantenició i les instal·lacions necessàries per un animal tan petit. També en són grans avantatges la disponibilitat de reactius i de soques, la

possibilitat de manipular-los genèticament, i el coneixement exhaustiu d'aquest animal, donat que és l'animal de laboratori més utilitzat en tots els camps.

1.5.2 Conill porquí

El conill porquí o conillet d'Índies és una espècie molt susceptible a la infecció per *M.tuberculosis*, ja que amb un baix nombre de bacteris que inhali és suficient per desenvolupar la malaltia. Potser per això Robert Koch (Koch 1882) va triar-lo per dur a terme els experiments que van demostrar l'agent causant de la Tuberculosi, el bacil *Mycobacterium tuberculosis*. En aquella època (finals segle XIX) el conill porquí era el model experimental més utilitzat, i des de llavors ha estat molt rellevant per a l'estudi de la tuberculosi. Va ser l'espècie d'elecció per al desenvolupament de les tuberculines que s'utilitzen en el TST, donat que presenta una resposta DTH molt robusta. Calmette et al (Calmette et al. 1924) el van utilitzar en el desenvolupament de la BCG. Riley et al. (Riley 1957) el van utilitzar per demostrar la transmissió aerògena de la tuberculosi, donada la seva susceptibilitat. S'han utilitzat també en l'avaluació de vacunes i de tractaments antituberculosos, per estudiar les relacions hostatger-patògen, i fins i tot en estudis sobre l'efecte de la deprivació de la vitamina C en la susceptibilitat a la tuberculosi, és a dir, sobre com afecta la malnutrició a el desenvolupament de la malaltia, ja que el conill porquí, igual que els humans, necessita aportació exògena de vitamina C. (Gupta et al. 2005; Dharmadhikari et al. 2008)

Després de la infecció per via aerosol del conill porquí, la càrrega bacil·lar al pulmó augmenta de forma logarítmica durant 2-4 setmanes, i després entra en una fase estacionària, tal i com passa en el ratolí, degut a la resposta cel·lular, també responsable de la resposta DTH (Smith et al. 1970; Wiegshauss et al. 1970; Dannenberg 2006). Les lesions que reproduïx són granulomes ben formats, i fins i tot presenta necrosi caseosa (McMurray 1994). Però en ser un animal de mida petita, tot i que sí que presenta una reacció fibròtica no és capaç d'encapsular externament la lesió com els humans (Gil et al. 2010). Potser per això es produeix igualment una disseminació hematògena, i la infecció i la destrucció del teixit acaba progressant, provocant la mort de l'animal (Smith et al. 1970; Wiegshauss et al. 1970; Dannenberg 2006).

Existeixen dues soques "inbred" de conill porquí, pel que es pot utilitzar en experiments que requereixin hostatgers singènics. Ara bé, en general hi ha una disponibilitat molt baixa de reactius per estudiar aquest model, i en relació als ratolins, el seu cost és més elevat (Gupta et al. 2005).

1.5.3 Conill

Lurie i Dannenberg van descriure la patogènesi de la tuberculosi en soques de conills "inbred" susceptibles a la infecció per *M.tuberculosis*. Lurie havia creat soques susceptibles i resistents a la infecció. Malauradament, la soca susceptible de Lurie es va perdre, pel que les soques de laboratori disponibles actualment són més aviat resistents al *M.tuberculosis*. Quan s'infecten amb *M.tuberculosis* formen cavitats, però acaben guarint-les. En canvi són molt més susceptibles a *M.bovis*, i desenvolupen la malaltia de forma molt més semblant a humans que no pas els conillets d'Índies, o per descomptat, que els ratolins (Lurie et al. 1952; Dannenberg 2006).

Els experiments realitzats amb conills proposen que la DTH és responsable de la formació de cavitats en els conills (Maeda et al. 1977; Yamamura et al. 1986). Degut a aquesta habilitat per desenvolupar cavitats, són un bon model per estudiar la progressió de la malaltia, però també una model molt adequat per estudiar la transmissibilitat de la tuberculosi. D'una banda, perquè les cavitats contenen una gran càrrega bacil·lar (10^8 Colony Forming Units (CFUs)) que comunica amb l'arbre bronquial, i de l'altra, la capacitat de contagi d'un malalt es correlaciona positivament amb la positivitat del cultiu de l'esput (Dharmadhikari et al. 2008). En aquest model també es va confirmar que les cavitats es desenvolupen preferentment en els lòbuls apicals, mitjançant experiments en que es mantenien els conills en posició vertical amb arnesos, i s'observava com les cavitats es formaven els lòbuls superiors enlloc de la localització habitual a la part posterior dels pulmons en contacte amb l'esquena (Medlar et al. 1936).

Els conills també són un model de ITBL, donada la seva resistència a *M.tuberculosis*, ja que els conills normalment aconsegueixen controlar el creixement bacil·lar amb el seu sistema immunitari. A diferència dels humans, però, no poden reactivar la tuberculosi de forma espontània, excepte en condicions experimentals d'immunosupressió, i tampoc poden encapsular externament les lesions (Dharmadhikari et al. 2008).

L'inconvenient principal d'aquest animal com a model de tuberculosi és el seu cost, tant de manutenció com d'instal·lacions, i la manca de reactius específics per a aquesta espècie.

1.5.4 Primats no humans

Les espècies de primat més utilitzades per modelitzar la tuberculosi humana són el macacs *Cynomolgus* (*Macacca fascicularis*) i Rhesus (*Macacca mulatta*). S'han utilitzat

tant la via d'inhalació d'aerosols com la infecció intratraqueal en aquests models, i diferents soques de *M.tuberculosis*, a més de la infecció amb BCG, sobretot en el macac Rhesus.

El macac *Cynomolgus* replica amb èxit la infecció humana, en el sentit que després de la infecció amb aerosols a baixa dosi (25 CFU) presenta infecció latent i reactivació com els humans. Segons revisen Kaushal et al. (Kaushal et al. 2012), en aquest model s'han reproduït tots els tipus de lesions: la lesió granulomatosa sòlida, la lesió amb necrosi caseosa, en tots els casos, i fins i tot en casos aïllats la mineralització, la cavitació o la fibrosi de les lesions. Ara bé, en ser una espècie de mida petita, tampoc pot presentar l'encapsulació externa com els humans. És remarcable també, que tots els animals s'infecten però més d'un 30% no desenvolupen cap signe de malaltia. Si bé aquest fet es pot considerar positiu, doncs igual que en els humans una part de la població desenvolupa infecció latent i l'altra acaba desenvolupant la malaltia, la contrapartida és la reproductibilitat. Es pot considerar que no és un model previsible, en comparació a altres models més simples, ja que dins un mateix grup experimental, de n petita, s'obtidran uns resultats poc homogenis. Aquest model s'ha utilitzat en avaluació de candidats de vacunes (Langermans et al. 2005), per a l'estudi del paper del TNF- α (Green et al. 2010; Lin et al. 2010) o de les cèl·lules T reguladores (Treg) (Green et al. 2010) en el control de la ITBL, i també s'ha utilitzat com a model de coinfecció VIH/tuberculosi.

Els macacs Rhesus presenten un desenvolupament de la infecció similar als dels macacs *Cynomolgus*. No obstant això, segons alguns autors el macac Rhesus és molt més susceptible a la infecció que el *Cynomolgus*, i així ho demostra el fet la BCG no confereix protecció a aquesta espècie, mentre que sí que protegeix el macac *Cynomolgus* (Langermans et al. 2001). En canvi en un estudi posterior Verreck et al. van obtenir resultats oposats, ja que la BCG sí que va protegir el macac Rhesus (Verreck et al. 2009). La divergència de resultats podria ser deguda a que Verreck et al. van utilitzar BCGs modificades que expressaven antígen 85, mentre que Langermans et al. van utilitzar la soca danesa de BCG (no modificada). Sigui com sigui, en aquest model s'han estudiat el paper dels limfòcits TCD8+ (Chen et al. 2009) o les Th17 (Yao et al. 2010) en el control de la infecció tuberculosa, s'ha utilitzat en fases preclíniques finals d'avaluació de vacunes, i per estudiar lesions hipòxiques (Via et al. 2008).

Molt recentment s'ha desenvolupat un nou model amb Marmosets (*Callithrix jacchus*). Aquest petit primat també desenvolupa un ampli espectre de lesions, incloent lesions granulomatoses sòlides, necrosi caseosa i cavitació. Tot i que com el macac,

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

presenta fibrosi dins la lesió, en ser un animal de mida petita, tampoc no presenta encapsulació externa (Via et al. 2013)

Així, els avantatges més destacables d'aquests models amb primats són l'ample espectre de lesions que potencialment poden presentar tot i que no de manera reproducible, la gran similitud genètica amb els humans, i en el cas dels macacs, també la possibilitat de realitzar estudis de coinfecció amb VIH, (Diedrich et al. 2010), i una gran disponibilitat de reactius, ja que a banda dels que són específics de l'espècie, també cal afegir aquells que presenten reacció creuada entre humans i macacs. La principal desavantatge d'aquests models és el cost de l'animal, així com de l'establiment en el cas dels macacs. I jo també afegiria com a apreciació personal, que és un model amb menor acceptació social respecte altres espècies menys properes a la nostra espècie, que per irracional que sigui no em sembla menyspreable.

1.5.5 Grans animals. Importància de la mida del pulmó

La infecció de *M.bovis* en el bestiar boví és un model natural de tuberculosi donat que la tuberculosi bovina reproduïx un patró de lesions molt similar a la tuberculosi humana. A més el control de la infecció i la resposta immunològica també és molt similar (Buddle et al. 2005; Waters et al. 2014), presentant una resposta DTH molt intensa. L'estudi de la tuberculosi bovina ha aportat molta informació sobre la tuberculosi humana. Tal com revisen Ray Waters et al (Waters et al. 2014), des de l'inici de la història de la recerca, quan es va aprofitar la reactivitat creuada entre la verola bovina i humana per desenvolupar la primera vacuna, s'ha seguit el principi de "benefici doble", és a dir, poder aprofitar des de la medicina humana el coneixement generat amb l'estudi de malalties infeccioses dels bovins, i a la inversa. En el camp de la tuberculosi també s'ha seguit aquest principi de benefici doble. Des de la vacuna BCG, una soca atenuada de *M.bovis*, que s'utilitza tan en humans com en bestiar, fins a noves eines de diagnòstic més recents, com els mètodes de diagnòstic basats en determinació de l'IFN- γ produït per les cèl·lules de la sang, els anomenats "T-cell interferon-gamma release assays" (TIGRAs), que es van desenvolupar inicialment per al diagnòstic de la tuberculosi bovina (Vordermeier et al. 1999).

A més de l'estudi de la infecció natural, també s'han desenvolupat models experimentals mitjançant la infecció de bestiar boví amb *M.bovis* que han contribuït de forma extensa al coneixement de la resposta immunitària a la tuberculosi (revisat a (Waters et al. 2014)), i s'han utilitzat per a l'avaluació de vacunes (Skinner et al. 2003; Wedlock et al. 2003; Skinner et al. 2005; Vordermeier et al. 2009).

Altres mamífers domèstics com ara els petits remugants o el porc, també s'infecten de forma natural amb micobacteris, especialment amb *M.bovis* que té una alta

infectivitat en mamífers domèstics i salvatges (Broughan et al. 2013). J.Sanchez et al. van utilitzar la infecció natural de les cabres amb *M.bovis* i *M.caprae* per estudiar la formació de les lesions cavitades (Sanchez et al. 2011). A més de l'estudi de la infecció natural, també s'han desenvolupat models experimentals amb aquestes espècies. En un model de cabra desenvolupat recentment (de Val Perez et al. 2011) tots els animals infectats intratraquealment amb *M.caprae* van presentar lesions severes de tuberculosi als pulmons, associades als limfonodes. Les lesions presentaven necrosi intragranulomatosa, i més de la meitat dels animals també van presentar lesions cavitades. Més recent encara, un altre model amb cabres, infectades amb *M.bovis* via aerosols, també va reproduir lesions necrosades, amb presència de macròfags escumosos, i intensa fibrosi de les lesions (Gonzalez-Juarrero et al. 2013). Així doncs, les cabres, com les vaques, presenten una patologia molt similar a la de la tuberculosi humana.

Els porcs també s'han utilitzat en l'estudi de la tuberculosi. Bolin et al. van desenvolupar un model de tuberculosi infectant porcs convencionals amb BCG. Van reproduir un ampli espectre de lesions, en funció de la dosi i la via utilitzada, incloent grans lesions líquüefetes (Bolin et al. 1997). El nostre grup va desenvolupar un model amb minipigs, juntament amb un grup del CRESA, on es van infectar els animals intratraquealment, i es va fer un seguiment de les lesions (Gil et al. 2010). Cap animal va desenvolupar malaltia, però en canvi va resultar ser un model excel·lent de ITBL. L'estudi histomètric i histopatològic de les lesions va evidenciar la rellevància de l'encapsulació externa de les lesions per al control de la infecció. Els pulmons dels animals de mida gran, inclosos els humans, contenen una conjunt de septes intralobulars i interlobulars, de teixit connectiu, que structuren el teixit pulmonar i eviten que col·lapsi. Els animals petits com els ratolins, conills, conills porquins i macacs, degut a la mida molt més petita dels pulmons, no necessiten aquests septes. L'estudi amb minipigs va mostrar com les lesions que entraven en contacte amb un septe intralobular s'encapsulaven externament, doncs els fibroblasts del septe responien a la pressió que fa el granuloma en créixer. De manera que el motiu pel qual els models de petita mida no presenten encapsulació externa de les lesions, seria aquesta manca de septes (Gil et al. 2010).

1.5.6 Peix zebra

Molt recentment s'ha desenvolupat aquest model utilitzant el peix zebra (*Danio rerio*), infectat amb *M.marinum*, per a l'estudi de la formació dels granulomes, i per identificar factors genètics de susceptibilitat. Pel que fa a l'estudi de la formació de granulomes, si bé els peixos ni tan sols tenen pulmons, aquest model ofereix

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

l'avantatge que les larves són transparents i permeten un seguiment *in vivo* dels granulomes, amb observació directa. Pel que fa als estudis genètics han tingut molt èxit doncs les troballes en el peix zebra han correlacionat amb la clínica de pacients humans (Tobin et al. 2010; Tobin et al. 2012).

1.6 La resposta immunitària en la tuberculosi

1.6.1 Resposta Innata

No totes les persones que s'exposen a *M.tuberculosis* s'infecten. De fet, fins i tot s'estima que només un 30% de les exposicions al bacil comporten la infecció i la conversió del TST (Parrish et al. 1998). Això és degut a que la resposta innata aconsegueix evitar la infecció en aquests casos, a través de diversos mecanismes.

Quan el bacil de *M.tuberculosis* entra a l'alvèol pulmonar, rep el primer atac defensiu de l'hostatger: el surfactant pulmonar. Els enzims que conté aquest fluid destrueixen la paret bacil·lar fins a un 80%, atacant així una de les barreres naturals de protecció del bacil (Arcos et al. 2011; Cardona 2012)). A banda d'aquesta barrera físico-química, el *M.tuberculosis* també s'ha d'enfrontar amb pèptids antimicrobians secretats pels macròfags i neutròfils de l'hostatger, com ara les defensines i catelicidines. De fet, la Vitamina D té un paper en la producció d'aquestes substàncies (Liu et al. 2007), i la manca de vitamina D està relacionada amb una major incidència no només de tuberculosi, sinó també d'altres malalties del tracte respiratori. Això explica que a l'era preantibiòtica recomanessin als malalts de tuberculosi que paressin el sol, doncs l'exposició als seus rajos assegurava uns nivells òptims de vitamina D, enfortint la resposta innata (Martineau 2012).

El macròfag alveolar fagocita el bacil, i aquest es multiplica dins el fagosoma. A l'inici de la infecció el macròfag alveolar no és capaç de destruir el bacil, doncs una sèrie de mecanismes del bacil impedeixen que el fagosoma maduri correctament (Xu et al. 2007a), impeding la unió del fagosoma al lisosoma (Gordon et al. 1980) i l'acidificació del fagosoma (Sturgill-Koszycki et al. 1994). De manera que fins que el macròfag no és activat per la resposta adquirida, no és eficaç a l'hora d'eliminar el bacil, i ben al contrari, permet la replicació d'aquest. Però un cop s'activen en resposta al TNF- α i a l'IFN- γ els macròfags són més capaços de matar els bacils fagocitats mitjançant la producció de reactius d'oxigen i de nitrogen (ROIs i RNIs).

1.6.1.1 Neutròfils i tuberculosi

Dins l'estudi de la resposta immunitària de l'hostatger en la infecció tuberculosa, els neutròfils són un tipus cel·lular poc estudiat, en comparació a altres tipus cel·lulars

com el macròfag o els limfòcits. A més els resultats en aquests estudis són contradictoris, doncs alguns els atorguen un rol protector, i d'altres un rol perjudicial en la infecció. Les seves característiques intrínseques (temps de vida molt curt i fàcil activació) podrien justificar aquesta variabilitat en els estudis in vitro, segons Lowe (Lowe et al. 2012). A la Figura 4 es mostra un esquema del rol del neutròfil en la tuberculosi segons la revisió bibliogràfica exposada a continuació.

Neutròfils: protectors o perjudicials?

Els neutròfils són el tipus cel·lular infectat predominant en pacients amb tuberculosi activa, segons un estudi on es van analitzar macròfags, neutròfils i limfòcits de fluid del rentat broncoalveolar (BAL), esput i contingut de cavitats tuberculoses, i el seu paper seria perjudicial per a l'hostatger, facilitant una localització al bacil per replicar-se ràpidament (Eum et al. 2010). Els articles publicats coincideixen en que els neutròfils són reclutats al lloc d'infecció en 24 hores i un cop allà són capaços de fagocitar bacils, directament o mitjançant la opsonització, i secretar citocines, tal i com revisa Lowe (Lowe et al. 2012). Martineu et al. (Martineau et al. 2007a) van demostrar que els neutròfils protegien de la infecció mitjançant la secreció de pèptids antimicrobians, concretament Lipocalina 2, en un estudi on comparaven contactes infectats (amb TIGRAs positiu) amb contactes no infectats. Blomgran et al (Blomgran et al. 2011) van trobar que la fagocitosi de neutròfils apoptosats per part de les DCs indueix la seva migració als limfonodes i el desenvolupament de la resposta adquirida, i que al contrari, en deplecionar-los, la resposta s'endarrereix. De manera que almenys a l'inici de la infecció sí que tenen un paper protector. Contràriament, altres estudis posen de manifest un paper perjudicial dels neutròfils. En diversos estudis comparatius de soques susceptibles i resistents de ratolí es va veure que la sobreexpressió de LIX (CXCL5) (Keller et al. 2006) i un reclutament accelerat i massiu de neutròfils es donava en les soques susceptibles (Eruslanov et al. 2005; Keller et al. 2006). En un estudi del perfil transcripcional en sang de pacients amb tuberculosi activa o latent, es va descobrir una signatura transcripcional de tuberculosi activa, essent validada tant en una ciutat com Londres, de baixa prevalença, com a Sud-àfrica, país amb alta prevalença de tuberculosi. Berry et al. van veure que en la tuberculosi activa s'indueïen una sèrie de gens implicats en la via de senyalització dels interferons tant tipus I com tipus II, i que s'expressaven principalment en neutròfils, i no pas en limfòcits T com s'esperava, pel que interpretaven que una sobreactivació dels neutròfils pels interferons pot contribuir a la patogènesi de la tuberculosi activa (Berry et al. 2010). Barnes et al (Barnes et al. 1988), i més recentment, Lowe et al (Lowe et al. 2013) han trobat que la neutrofilia és un indicador de mal pronòstic.

Destrucció dels bacils

La capacitat dels neutròfils per matar els bacils és controvertida. Dels estudis amb *M.tuberculosis* virulent, tant n'hi ha que aconsegueixen veure efecte bactericida o bacteriostàtic in vitro en rata (Sugawara et al. 2004) o en humans (Jones et al. 1990; Kisich et al. 2002), com que no (Denis 1991; Aston et al. 1998; Eruslanov et al. 2005; Reyes-Ruvalcaba et al. 2008). Sobre el mecanisme utilitzat, els neutròfils podrien destruir els bacils intracel·lularment, o bé extracel·lularment, en ambdós casos mitjançant la secreció substàncies antimicrobianes com les catelicidines, la lipocalina-2 (Martineau et al. 2007a) o els HNP (pèptids neutrofílics humans), un altre tipus de defensines (Fu 2003).

Neutròfils i macròfags

A més dels efectes directes sobre els bacils, els neutròfils podrien incrementar l'eliminació d'aquests a través de la cooperació amb els macròfags. Els neutròfils reclutats, que ingereixen bacils, tenen poc temps de vida, i quan moren atrauen monòcits de la sang i macròfags, que els fagociten. En aquest procés podrien ingerir els grànuls amb defensines, que podrien contribuir a matar el bacil (Sharma et al. 2000; Tan et al. 2006). Les citocines secretades tant per neutròfils com macròfags poden dur a una major acumulació i activació d'aquestes cèl·lules (Appelberg 1992; Sawant et al. 2007), o bé pot dur a un ambient antiinflamatori. De fet s'han descrit els neutròfils supressors, que produeixen IL-10 i podrien limitar la inflamació tot i que en excés impediria una resposta adequada dels macròfags (Zhang et al. 2009; Dorhoi et al. 2010).

Mort cel·lular

El tipus de mort cel·lular del neutròfil també pot influenciar en el desenvolupament de la malaltia. L'apoptosi s'ha considerat un procés antiinflamatori, que indueix TGF- β i PGE₂, i inhibeix la producció de IL-6, IL-8, IL-12 i TNF- α en el macròfag que fagocita la cèl·lula apoptòtica (Krysko et al. 2006). La necrosi dels neutròfils, en canvi, s'ha considerat un mecanisme que porta la inflamació. Models in vitro suggereixen que l'apoptosi dels macròfags està relacionada amb el control de la infecció, mentre que la necrosi no (Molloy et al. 1994), i a més la necrosi pot impedir la presentació d'antígens micobacterians (Aleman et al. 2007). Lowe proposa que si el bacil fagocitat és viable la necrosi i una resposta proinflamatòria poden ser beneficioses, mentre que si el bacil ja estan morts, una resposta antiinflamatòria pot ser més convenient (Lowe et al. 2012).

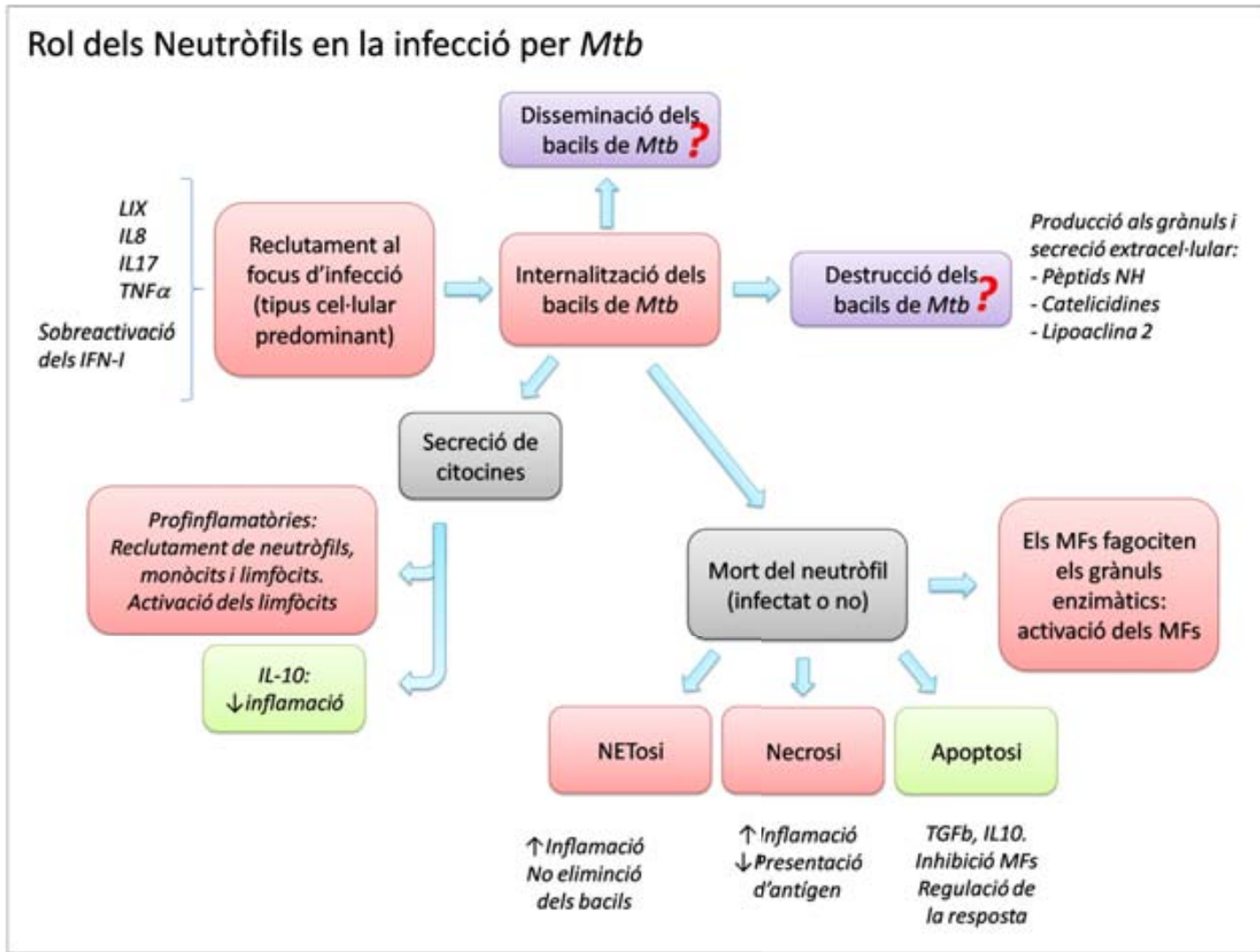


Figura 4: Rol dels neutròfils en la infecció per *M.tuberculosis*. MFs: macròfags. *Mtb*: *M.tuberculosis*

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

Una altre fenomen que s'ha estudiat referent a la mort dels neutròfils és la formació de neutrophilic extracellular traps (NETs). Les NETs són estructures extracel·lulars formades per cromatina, que contenen adherides proteïnes provinents dels grànuls dels neutròfils i són capaces de matar microorganismes extracel·lularment. Es formarien quan els neutròfils s'activen per l'estímul de citocines o bacteris, i comencen el programa de mort cel·lular que els duu a la formació d'aquestes estructures. Quan s'activa el programa, (I) els neutròfils comencen formant reactius d'oxigen, (II) la membrana nuclear es desintegra i també es desintegren els grànuls, (III) el nucli es desempaqueta i el material nuclear omple tota la cèl·lula, barrejant-se amb les proteïnes dels grànuls, (IV) s'acaba de perdre la integritat dels grànuls i la membrana nuclear, i finalment la cèl·lula allibera tot el contingut, les NETs (Brinkmann et al. 2007). Les NETs s'han associat a dany tissular al pulmó en altres malalties (Ermert et al. 2009; Narasaraju et al. 2011; Caudrillier et al. 2012). En tuberculosi s'han observat aquestes estructures, però s'ha vist que tot i que són capaces d'atrapar *M.tuberculosis*, no són capaces de matar-lo (Ramos-Kichik et al. 2009).

Neutròfils i resposta immunitària adquirida

Els neutròfils també influencien en el desenvolupament de la resposta immunitària adquirida, ja sigui mitjançant l'atracció de limfòcits T a través de la secreció de citocines i quimiocines que afectin el comportament dels limfòcits (Petrofsky et al. 1999; Seiler et al. 2003; Mantovani et al. 2011), o modulant la resposta de les cèl·lules dendrítiques (Morel et al. 2008). De fet la depleció dels neutròfils en un model de ratolí va reduir la migració de cèl·lules dendrítiques als limfonodes i va retardar la resposta de les cèl·lules T (Blomgran et al. 2011). D'altra banda la resposta adquirida també influeix en la resposta dels neutròfils: segons un estudi realitzat *in vivo* en un model murí, l'IFN- γ inhibeix la producció d'IL-17 i l'acumulació de neutròfils als pulmons, i és necessari per suprimir la inflamació excessiva (Nandi et al. 2011). Per això podria ser que la neutrofilia exagerada fos conseqüència d'una resposta Th1 inadequada.

En definitiva, els neutròfils a l'inici de la infecció podrien tenir un rol protector, tot i que també podria ser que contribuïssin a la disseminació dels bacils. Però el que sembla bastant clar és que en una fase més avançada els neutròfils s'associen amb severitat de la malaltia, i podrien tenir un paper en el desenvolupament de la resposta immunitària adquirida, que determinaria el control o bé la progressió de la malaltia (Lowe et al. 2012).

1.6.1.2 *Mediadors moleculars de la resposta immunitària*

Les cèl·lules de la immunitat innata reconeixen lligands del *M.tuberculosis* mitjançant un conjunt de "Pattern Recognition Receptors" (PRRs) de diversos tipus, induint així l'expressió dels gens implicats en la primera resposta immunitària, principalment citocines com ara IL-1b, TNF- α i IL-6. Aquestes **citocines** promouen l'activació dels macròfags (Kishimoto 2005). La IL-1b també és quimiotàctica pel limfòcits T i estimula la seva proliferació, i la producció d'IFN- γ controla l'inici de la formació del granuloma, i també estimula la creació i reclutament de neutròfils. (Hunninghake et al. 1987; Sugawara et al. 2001; Oliveira et al. 2008; Ueda et al. 2009). La importància del TNF- α en la resposta a *M.tuberculosis* queda demostrada en humans també, doncs els pacients amb ITBL que reben anti-TNF pel tractament de l'artritis reumatoide o la malaltia de Crohn incrementen la possibilitat de reactivació de la tuberculosi (Keane et al. 2001; Harris et al. 2010). El TNF- α , a més d'activar els macròfags, és imprescindible per la organització del granuloma segons alguns estudis (Kindler et al. 1989; Flynn et al. 1995; Bean et al. 1999; Roach et al. 2002). Ara bé, estudis més recents demostren que no seria així, doncs tant en pacients tractats amb anti-TNF (Iliopoulos et al. 2006), com en el model de macac (Lin et al. 2010) com en el de peix zebra (Clay et al. 2008) malgrat la susceptibilitat a *M.tuberculosis* és molt major, l'estructura del granuloma es preserva. Així doncs, segons aquests estudis el paper del TNF- α consistiria en estimular l'eliminació intracel·lular del *M.tuberculosis*, i no pas la formació del granuloma, si bé el TNF- α sí que seria important per al manteniment del granuloma (Clay et al. 2008). La IL-6 modula la resposta de les cèl·lules T, i estimula la mielopoesi (Liu et al. 1997; Kishimoto 2005; Walker et al. 2008; Lyadova 2012).

Les **quimiocines** són secretades pels macròfags, neutròfils, limfòcits T, cèl·lules endotelials i altres cèl·lules locals. La CXCL10 i la CXCL9 es produeixen en resposta a l'IFN- γ i atrauen els limfòcits T i els monòcits. En canvi les CXCL8 (IL-8), CXCL2 (MIP-2) i CXCL1 (KC) atrauen més aviat granulòcits, i són responsables de l'acumulació de neutròfils en la fase avançada de la tuberculosi (Rhoades et al. 1995; Sasindran et al. 2011). CXCR2 és el receptor quimiotàctic present en els neutròfils, que reconeix tant CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) com CXCL5 (LIX). Tant CXCL5 com CXCR2 contribueixen també a la infiltració neutrofilica, ja que es troben sobrerregulats just després de la infecció amb *M.tuberculosis* (Keller et al. 2006; Kang et al. 2011; Slight et al. 2013), i en un model d'infecció amb aerosol de *M.tuberculosis* es va veure que els dos eren necessaris pel reclutament de neutròfils (Nouailles et al. 2014). Tot i que s'havia pensat que les diferents quimiocines que reconeixen CXCR2 eren redundants,

Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

en estudiar la seva cinètica s'ha descobert que no és així: estan subjectes a una regulació temporal i espacial, de manera que cadascuna té el seu paper específic. En la tuberculosi, la CXCL5 és secretada per les epitelials del pulmó (Nouailles et al. 2014), la CXCL1 i la CXCL2 atrauen els neutròfils i són secretades pels macròfags i neutròfils. La CXCL1 també és secretada pels pneumòcits, i la CXCL15 és secretada només per cèl·lules epitelials dels bronquis (Cai et al. 2010; Bhatia et al. 2012; Lyadova 2012; Dorhoi et al. 2014).

Els **eicosanoids** són molècules bioactives produïdes per cèl·lules presentadores d'antigen i tenen un paper important en la polarització de la resposta immunitària (Harizi et al. 2003; Divangahi et al. 2010). El seu precursor és l'àcid araquidònic, que per l'acció de diversos enzims es metabolitza en els diferents eicosanoids. L'acció de les ciclooxigenases (COX) 1 i 2 el metabolitza en prostaglandines i tromboxà, l'acció de les lipoxigenases (LOX) el catalitza en leucotriens (LT) i lipoxines (LX), tal i com es mostra a la Figura 5. Kaul et al van demostrar un paper protector de la PGE₂, doncs ratolins deficients per al seu receptor EP₂, tenien major susceptibilitat al *M.tuberculosis*, una resposta T reduïda i un increment de Tregs (Kaul et al. 2012). Altres estudis també indiquen un rol protector per a la PGE₂, i un rol oposat per a la LXA₄. Mentre la primera promou la resolució de la inflamació protegint els macròfags de la necrosi, la LXA₄ induiria la necrosi d'aquests mitjançant l'inhibició de la síntesi de PGE₂ (Chen et al. 2008; Divangahi et al. 2009). A més, no sols inhibiria l'apoptosi sinó que també interferiria en la presentació d'antígens per part de les cèl·lules dendrítiques, retardant la resposta de les cèl·lules T, doncs l'apoptosi, en condicions inflamatòries, millora la presentació d'antigen (Divangahi et al. 2010). Curiosament, aquests eicosanoids relacionats amb l'apoptosi s'han estudiat en humans com a biomarcadors del pronòstic de la malaltia, i contrasten amb aquests estudis mencionats. En contactes de pacients de tuberculosi, nivells alts de PGE₂ i baixos de lipoxines s'han associat a major probabilitat de desenvolupar tuberculosi activa (Shu et al. 2013). De fet, les lipoxines, com la LXA₄ són eicosanoids amb activitat antiinflamatòria en alguns desordres inflamatoris. Segons un altre estudi la LXA₄ estimula la fagocitosi dels neutròfils, a través d'un pèptid agonista dels receptors de LXA₄ i en associació a un increment de TGF- β , tant *in vitro* com *in vivo*, en un model d'inflamació aguda (Mitchell et al. 2002). La LXA₄ també regula el reclutament dels neutròfils mitjançant l'inhibició de TNF- α , IL-1b i CXCL2 (MIP-2) (Hachicha et al. 1999). Aquests estudis indicarien un rol proresolutiu de la inflamació, i per tant protector d'aquesta lipoxina, en contraposició als anteriors. Els estudis d'un altre grup també destaquen el paper antiinflamatori de la LXA₄ en el desenvolupament de la tuberculosi. Tobin et al van trobar que la modulació del gen *Ita4h*, que codifica per una hidrolasa

que controla el balanç entre eicosanoids proinflamatoris (LTB₄) i antiinflamatoris (LXA₄), podia determinar dues vies de susceptibilitat a *M.tuberculosis* associades a una desregulació dels nivells de TNF- α : I) si la balança es decanta cap al LTB₄ es sobrerregula el TNF- α , disparant la inflamació, i II) si l'excés és de LXA₄, el TNF- α és insuficient i la resposta immunitària també és inadequada. Els estudis es van realitzar en el model del peix zebra, però en humans es va trobar un polimorfisme en el promotor d'aquest gen, que està associat a susceptibilitat a *M.tuberculosis* (Tobin et al. 2010; Tobin et al. 2012).

Un altre grup de molècules serien aquelles responsables de l'activitat bactericida. Els macròfags activats per IFN- γ i els neutròfils poden destruir bacils mitjançant els intermediaris d'oxigen o nitrogen reactiu (ROI o RNI respectivament), defensines, catelicidina i proteases, que poden utilitzar intracel·lularment, als fagosomes, o bé secretar extracel·lularment, contribuint a la inflamació del focus infeccios (Flynn et al. 2001; van Crevel et al. 2002; Rivas-Santiago et al. 2008; Lyadova 2012).

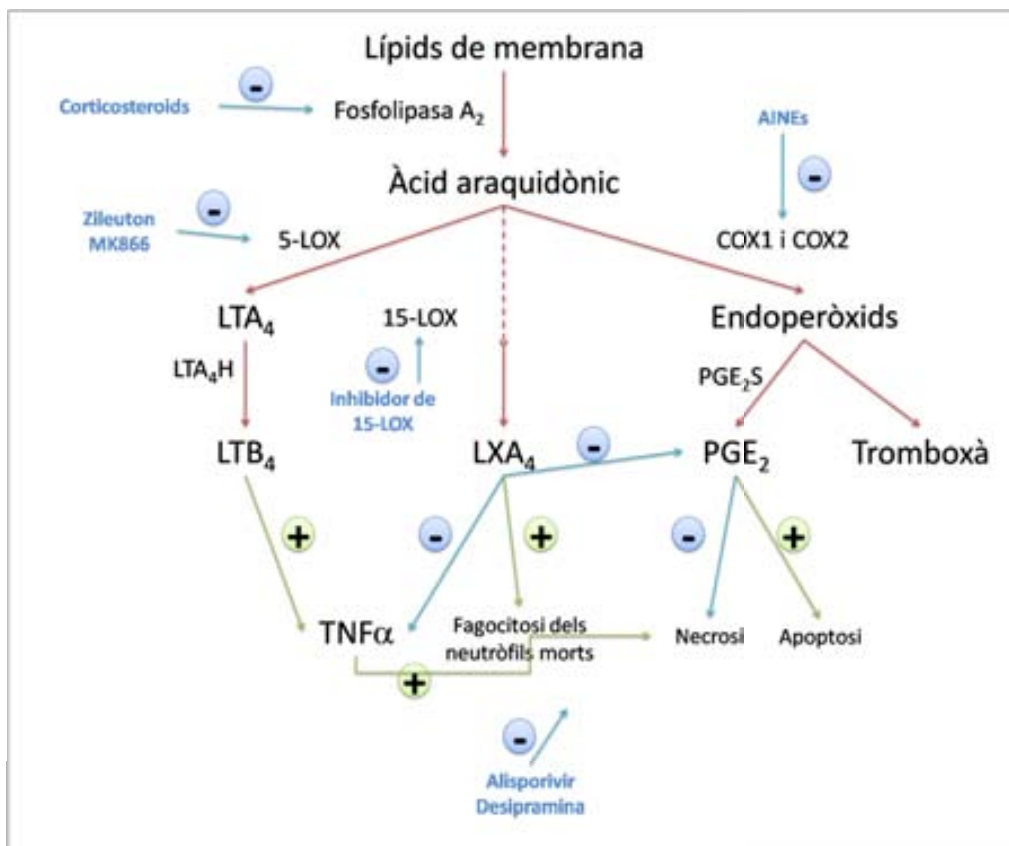


Figura 5: Síntesi i acció dels eicosanoids rellevants en la resposta a *M.tuberculosis*. Esquema adaptat de (Trevor et al. 2010). En l'esquema es mostra la síntesi dels eicosanoids rellevants per a aquest treball, així com alguns dels seus efectes, i nous fàrmacs en desenvolupament per al tractament de la tuberculosi que en modulen la seva activitat.

1.6.2 Resposta adquirida

Tal com resumeix Lyadova (Lyadova 2012) quan les cèl·lules dendrítiques presenten els antigens de *M.tuberculosis* als limfonodes, els limfòcits T CD4+ s'activen i s'inicia una resposta de tipus Th1. Quan els limfòcits són atrets al lloc d'infecció incrementen la producció de quimiocines i citocines efectores: augmenten l'atracció de cèl·lules inflamatòries i promouen la formació del granuloma.

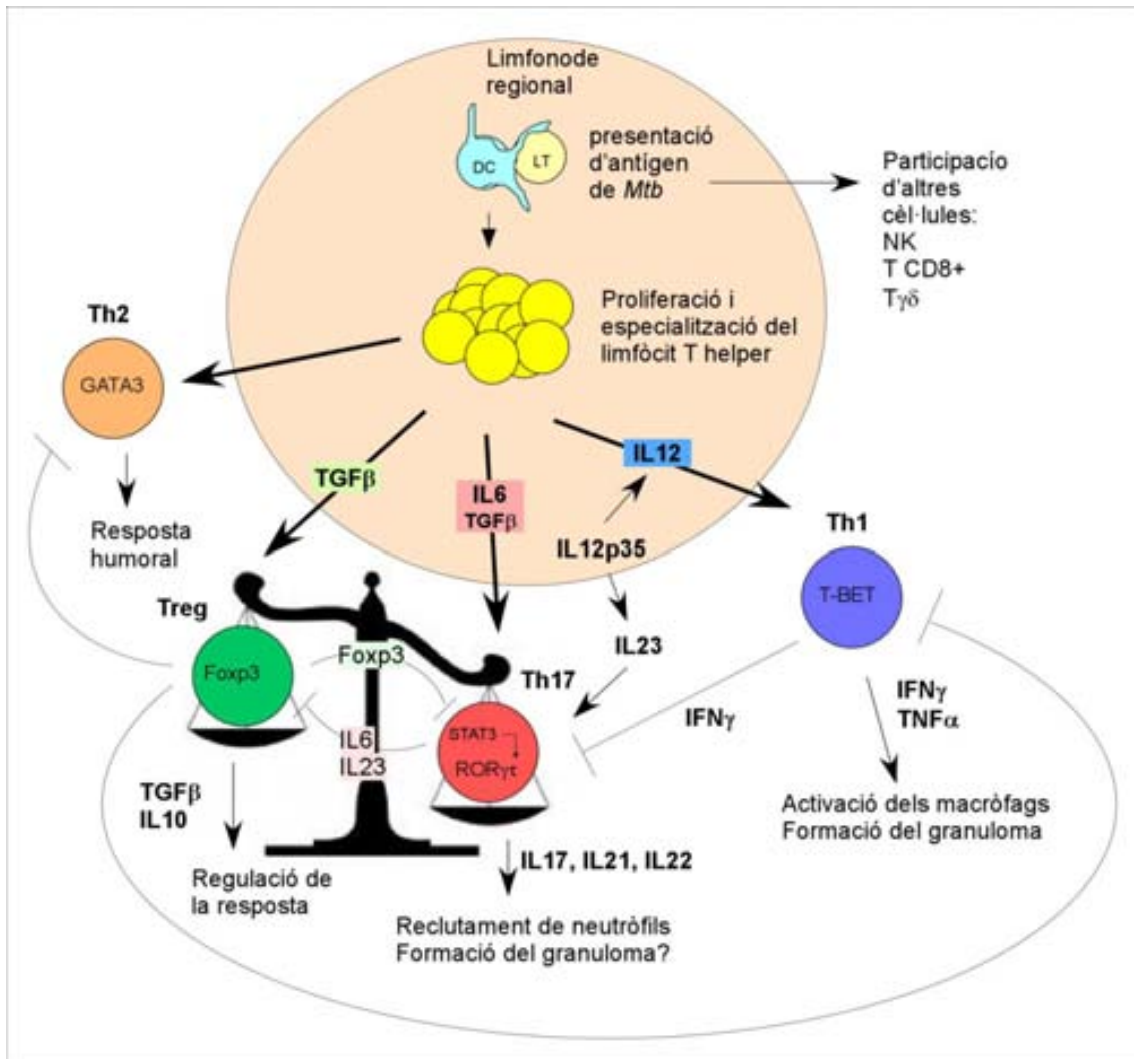


Figura 6: Esquema de la resposta immunitària adquirida enfront *M.tuberculosis*. Quan els bacils són drenats al limfonode regional les cèl·lules dendrítiques (DC) presenten l'antigen als limfòcits T (LT), i s'activa la resposta immunitària adquirida. Els limfòcits proliferen i es poden especialitzar en diferents subtipus segons l'ambient citocínic.

La producció d'IFN-γ i TNF-α activa els macròfags, incrementant la seva capacitat de destruir els bacils fagocitats. D'altres subtipus cel·lulars també contribueixen a la resposta immunitària cap a *M.tuberculosis*: les cèl·lules T CD8+, que produeixen IFN-γ i mostren un efecte citotòxic cap a les cèl·lules infectades (Lalvani et al. 1998), les cèl·lules Th17 que promouen la resposta Th1 i el reclutament de neutròfils (Khader et

al. 2008), els neutròfils que fagociten bacils i podrien tenir un efecte bactericida directa o indirectament, els limfòcits B que podrien regular la resposta immunitària (Ulrichs et al. 2004), i d'altres com les Natural killer (NK), els limfòcits T no convencionals i les cèl·lules T reguladores, també s'han estudiat en la resposta immunitària de la tuberculosi. A la Figura 6 es presenta un resum de la resposta adquirida en la tuberculosi, segons la revisió bibliogràfica exposada a continuació, pel que fa als aspectes més rellevants per a l'estudi realitzat en aquesta tesi.

1.6.2.1 Th17 i TB

L'especialització de les cèl·lules dels sistema immunitari en diferents subtipus és un mecanisme de regulació de la resposta immunitària. Aquest fenomen és molt clar en el cas dels limfòcits T CD4+, que poden secretar diferents citocines per portar a terme diferents funcions. Així, els Th1 secreten IFN- γ per activar els macròfags, els Th2 secreten IL-4, IL-5 i IL-13 i promouen la resposta humoral, i un altre subtipus descrit més recentment és el Th17, que secreta IL-17a, IL-17f, IL-21 i IL-22 (Harrington et al. 2005; Langrish et al. 2005; Park et al. 2005; Liang et al. 2006; Korn et al. 2007). Les cèl·lules que responen a la IL-17 són diverses: limfòcits, macròfags, neutròfils, epitelials, queratinòcits i fibroblasts (Yao et al. 1995; Lin et al. 2009). La resposta de les cèl·lules a IL-17 consisteix en la inducció de la secreció de citocines i quimiocines inflamatòries, així com de substàncies antimicrobianes com les defensines, i també la inducció de la granulopoesis i el reclutament de neutròfils (Ouyang et al. 2008). Tot i que les cèl·lules Th17 en un inici es van relacionar amb una resposta protectora en les infeccions més tard també s'ha relacionat amb el dany tissular provocat tant en les malalties autoimmunitàries com infeccioses (Ye et al. 2001a; Ye et al. 2001b; Happel et al. 2005).

En el camp de la tuberculosi també hi ha hagut estudis dedicats a conèixer el rol de la resposta Th17 en la malaltia, tal i com revisen Torrado i Cooper (Torrado et al. 2010).

Les cèl·lules Th17 es generen als limfonodes on es drena *M.tuberculosis*, de la mateixa manera que els limfòcits Th1, i és després que migren al pulmó a fer la seva funció efectora (Cooper 2009). Les citocines que indueixen la seva formació són la combinació de IL-6 o IL-21 amb nivells baixos de TGF- β . El TNF- α i la IL-1b poden actuar també com a cofactors. Aquestes citocines indueixen l'expressió de ROR- γ t via STAT-3 en els limfòcits activats, i això acaba en l'expressió del receptor de la IL-23 a la membrana, que és el que estableix la funció de la cèl·lula Th17, donat que la IL-23 és la citocina responsable de mantenir la resposta Th17. La IL12p70 (IL12), és imprescindible per a la resposta Th1, i la subunitat IL12p40 és compartida entre la

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

IL12p70 i la IL-23. Així doncs, els nivells d'aquestes citocines tant al limfonode com al pulmó són claus pel balanç entre Th1 i Th17. La secreció de la subunitat IL12p40 s'estimula quan els antígens de *M.tuberculosis* s'uneixen als PRR de les cèl·lules dendrítiques, que són les iniciadores de la resposta, però el balanç entre Th1 i Th17 depèn de les altres dues subunitats: IL-23p19 per formar IL-23, o IL12p35 per formar IL12p70 (IL12), i en la tuberculosi no es coneix de què depèn aquest balanç, però Torrado i Cooper proposen que es deuria a les citocines TGF- β , IL-6 o IL-21 i IL-1b, tal i com s'ha esmentat abans (Torrado et al. 2010).

Quant a un possible rol protector de la Th17, els estudis mostren resultats contradictoris. Mentre que en el model d'infecció de ratolins amb aerosol la IL-23 i la IL-17 van resultar prescindibles pel control de la infecció (Khader J immunol 2005), en un model de ratolins transgènics *il17*^{-/-} infectats amb una dosi alta intratraqueal el resultat va ser el contrari (Okamoto Yoshida et al. 2010), i la IL-17 va demostrar tenir un rol en la formació del granuloma, tal i com també indica un altre estudi, on l'acumulació de neutròfils millora la formació del granuloma (Seiler et al. 2003). En altres malalties infeccioses s'ha vist que la resposta Th17 estimula encara més la resposta Th1 (Lin et al. 2009) però això encara no s'ha demostrat en la tuberculosi. Segons Torrado i Cooper probablement aquest mecanisme no seria important en tuberculosi, doncs ja hi ha una forta resposta Th1 normalment (Torrado et al. 2010).

Pel que fa al rol en la immunopatologia és bastant clar que un excés de IL-17 és perjudicial degut a l'atracció excessiva de neutròfils. A més, l'exposició dels neutròfils a IL-17 i IL-23 els pot allargar la supervivència i canviar el seu fenotip, tot plegat resultant en més inflamació i immunopatologia (Zelante et al. 2007). Així ho indica també un estudi on es va reforçar la resposta Th17 mitjançant la immunització repetida amb BCG, resultant en major secreció de citocines i quimiocines inflamatòries com CXCL2 (MIP-2), TNF- α i IL-6, major atracció de neutròfils cap als pulmons, i per tant, molt més dany tissular i patologia. També en aquest estudi es va veure que la producció de cèl·lules Th17 no es devia només a la diferenciació al limfonode, sinó que també hi havia diferenciació de Th17 localment, segurament degut a la producció de IL-23 (Cruz et al. 2010).

Regulació de la resposta Th17

La regulació de la resposta Th17 és essencial i pot determinar el desenvolupament de la malaltia, doncs un excés de Th17 pot causar un dany tissular molt important. Per regular aquesta resposta excessiva de Th17, l'IFN- γ hi pot tenir un paper important. Els ratolins deficients per IFN- γ mostren una major acumulació de cèl·lules T efectores activades i neutròfils a les lesions granulomatoses davant la infecció amb BCG, però

també un major nombre de cèl·lules T productores d'IL-17. No obstant això, aquestes cèl·lules no controlen el creixement bacil·lar i el teixit pulmonar es veu danyat per aquesta resposta. De manera que l'IFN- γ limita la producció de cèl·lules productores d'IL-17 (Cruz et al. 2006). En un estudi amb *M.tuberculosis*, també l'IFN- γ va inhibir la producció d'IL-17 per part de les cèl·lules T CD4+, resultant en una menor acumulació de neutròfils, menor inflamació al pulmó i millora de la malaltia (Nandi et al. 2011).

Curiosament, en un model de ratolí s'han descrit neutròfils que secreten IL-10 per estimulació de les cèl·lules dendrítiques infectades, que controlarien la resposta excessiva de Th17, sense alterar la resposta Th1. Tot i que el model estudiat és molt artificial, amb limfòcits T transgènics amb el receptor de TCR restringit a ovoalbúmina (OVA), l'experiment és molt interessant i demostra com pot ser de complicada la regulació de la resposta immunitària, i com és difícil simplificar, doncs poden haver-hi múltiples vies de regulació (Doz et al. 2013).

Les Treg també tenen un paper molt rellevant en la regulació de la resposta d'aquest tipus cel·lular, tal i com s'exposarà més endavant.

1.6.2.2 Cèl·lules Treg i TB

Durant les infeccions, el control de la inflamació és necessari per evitar el dany produït per la mateixa resposta immunitària. Tot i que les cèl·lules T CD4+ són imprescindibles per al control de la tuberculosi, una producció incontrolada de TNF- α i IFN- γ seria perjudicial per a l'hostatger (O'Garra et al. 2013), i sobretot un excés de resposta Th17, pel que hi ha diversos mecanismes, incloent aquells mediats per cèl·lules Treg i per la IL-10, per regular la resposta immunitària a *M.tuberculosis*. Tot i així, també s'ha proposat que les Tregs generades durant una infecció no només són beneficioses per l'hostatger, sinó també per a l'agent infeccios, que troba en les Treg una forma d'eludir el sistema immunitari (Mills 2004).

Funció de les Treg

Les cèl·lules Treg naturals (nTreg) són indispensables pel manteniment de la tolerància als autoantígens i l'homeòstasi del sistema immunitari, i es desenvolupen al timus des del naixement (Sakaguchi 2004). Tot i que no es coneix ben bé la seva funció, sí que s'ha vist que tenen diferents mecanismes de supressió: contacte directe cèl·lula-cèl·lula, producció de mediadors solubles (Dieckmann et al. 2002; Longhi et al. 2006; Collison et al. 2007), i activitat a través de cèl·lules intermediàries (Lu et al. 2006; Ly et al. 2006). *In vitro* s'ha demostrat que inhibeixen la proliferació i producció de citocines dels limfòcits T CD4+ (Thornton et al. 1998; Baecher-Allan et al. 2001; Dieckmann et al. 2001; Jonuleit et al. 2001) i la resposta dels limfòcits T CD8+, els

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

monòcits o les cèl·lules NK (Dieckmann et al. 2001; Wing et al. 2003; Taams et al. 2005), i *in vivo* es creu que poden estar implicades no només en el manteniment de la tolerància als autoantígens (Baecher-Allan et al. 2006) sinó també en el control de malalties al·lèrgiques, la tolerància gastrointestinal (Izcue et al. 2006) o la tolerància de la mare als antígens fetals (Aluvihare et al. 2004; Afzali et al. 2010).

Fenotip clàssic de les Treg

Les Treg es van identificar inicialment com a cèl·lules T CD4⁺CD25⁺, però més tard es va trobar que l'expressió del factor de transcripció *Foxp3* les definia millor, doncs es va associar a una funció reguladora (Fontenot et al. 2003) i a més les diferenciava de les cèl·lules T activades, que també expressen la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25). A més, les mutacions del gen *Foxp3* causen un desordre autoimmune fatal tant en ratolins com en humans (Fontenot et al. 2003; Khattri et al. 2003). Les cèl·lules T CD4⁺ convencionals, també poden expressar *Foxp3* i adquirir funcions reguladores, sota els estímuls de IL-2 i TGF- β perifèricament o *in vitro*. Serien les Treg induïdes (iTreg). Malgrat tot, també s'ha descrit que les cèl·lules T activades poden expressar de forma transitòria *Foxp3*, sense adquirir funcions reguladores (Gavin et al. 2006; Allan et al. 2007; Wang et al. 2007), si bé això s'ha demostrat només en humans, no en ratolins. Per això en humans s'utilitzen marcadors addicionals per identificar-les. El fenotip més utilitzat per identificar Treg en humans és el CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺CD127^{lo}. D'altra banda, l'expressió de *Foxp3* en les cèl·lules Treg és inestable, doncs s'ha descrit en múltiples estudis com les Treg deixen d'expressar *Foxp3* i expressen marcadors d'altres subtipus de cèl·lules Th, pel que s'anomenen exTreg o exFoxp3. En alguns estudis atribueixen aquest fet a la pèrdua de l'activitat supressora i reprogramació de la cèl·lula en un altres subtipus diferent, mentre que altres estudis indiquen que malgrat la pèrdua d'expressió de *Foxp3* i expressió d'altres marcadors les exTreg continuen regulant la resposta immunitària (Gao et al. 2012).

Treg CD39+

El CD39 i el CD73 són ectonucleotidases. El CD39 hidrolitzen l'adenosina trifosfat (ATP) a adenosina difosfat (ADP) i aquest a adenosina monofosfat (AMP). El CD73 hidrolitza el AMP a Adenosina. L'ATP i l'ADP són alliberats quan hi ha necrosi i dany tissular, i hi ha evidències que la senyalització cel·lular purinèrgica (és a dir, a través d'aquestes molècules) participa en la resposta inflammatòria que es dona en el rebuig d'òrgans trasplantats. De fet en aquest camp s'estudien ja diferents estratègies per millorar el trasplantament d'òrgans interferint en aquesta senyalització, per exemple

augmentant l'expressió de CD39 (Roberts et al. 2014). El CD39 s'expressa en les cèl·lules Treg CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo}, independentment del CD73, i de fet, sembla que Foxp3 estimula l'expressió del CD39. Dwyer et al van trobar que la classificació de les cèl·lules T CD4⁺ segons l'expressió de CD25 i CD39 és una eina molt interessant, doncs defineix 4 subpoblacions diferents. Les CD25⁺CD39⁺ expressen *Foxp3* (la majoria), i són cèl·lules Treg de memòria, i es mantenen com a Treg també sota un estímul proinflamatori, doncs no secreten IL-17 sota aquestes condicions. En canvi les CD25⁺CD39⁻ serien una població heterogènia, amb potencial Th1, Th2 o Th17 en cultiu, i sota estímuls proinflammatoris sí que es diferenciarien a Th17, secretant IL-17, fins i tot les que expressen també *Foxp3*. De manera que les potencials exFoxp3 no es trobarien entre les Treg CD39⁺, sinó en les CD25⁺CD39⁻. El CD39⁺ també és un marcador de memòria. Les Treg CD39⁺ són de memòria en un 80%, i les CD25⁻CD39⁺ són quasi totes de memòria, pel que es defineixen com cèl·lules T de memòria efectores, i també produeixen IFN- γ i IL-17 sota condicions d'estimulació proinflammatòria. Les CD25⁻CD39⁻, correspondrien a cèl·lules T CD4⁺ naïve. Aquesta classificació, a més, té rellevància clínica, doncs l'índex de cèl·lules T de memòria efectores (CD25⁻CD39⁺) i cèl·lules Treg (CD25⁺CD39⁺) correlacionava positivament amb la severitat del rebuig de l'òrgan en pacients de trasplantament, indicant un paper patogènic de les T de memòria efectores, i un paper protector de les Treg en aquest cas (Dwyer et al. 2010).

Chiachio et al. van validar CD39 com a marcador de cèl·lules Treg en pacients amb tuberculosi, per comparació amb el fenotip CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺CD127⁻, i perquè les cèl·lules CD4⁺CD25⁺CD39⁺ van produir menys IFN- γ i més TGF- β comparat amb altres tipus cel·lulars (Chiacchio et al. 2009).

Resposta Th17 i Treg

El TGF- β , que com ja s'ha dit intervé en l'especialització dels limfòcits Th17, també estimula la diferenciació de cèl·lules Treg Foxp3⁺. De fet, Bettelli et al. van descobrir que l'especialització de Th17 i la de Treg Foxp3⁺ són mútuament excloents, doncs un mateix limfòcit precursor, es pot especialitzar com a Th17 en presència de TGF- β i IL-6, o bé com a Treg Foxp3⁺ si només hi ha TGF- β , de manera que la regulació de Th17 i Treg està estretament lligada (Bettelli et al. 2006). Zhou et al. van profunditzar en l'estudi d'aquest mecanisme, i van trobar que a concentracions baixes, el TGF- β sinergitza amb la IL-6 i la IL-21 per promoure el desenvolupament de cèl·lules Th17, mentre que a altes concentracions, el TGF- β indueix l'expressió de *Foxp3*, i aquest interacciona amb ROR γ t, inhibint la seva funció, de manera que les cèl·lules es diferencien en Treg (Zhou et al. 2008). Curiosament, si bé STAT3 és una proteïna en

la via senyalització de ROR- γ t que porta cap a una resposta Th17, Chaundry et al. van descobrir en estudis amb ratolins que les Treg inhibeixen la resposta patogènica Th17 per la via de senyalització de STAT3 precisament, interpretant que els mateixos factors de transcripció integren senyals de l'ambient que els porten a conduir la resposta immunitària cap a un tipus o un altre mitjançant l'acció supressora de les Treg (Chaudhry et al. 2009). També en aquest sentit, Mucida et al. van trobar que l'àcid retinoic era capaç d'inhibir la inducció de Th17 mediada per IL-6, promovent la inducció de Tregs (Mucida et al. 2007).

Si bé l'expansió de cèl·lules Th17 durant la infecció per *M.tuberculosis* és deguda a les citocines IL-6 i IL-23, l'expansió de Tregs que també es dona durant la infecció per *M.tuberculosis* no es sap ben bé a què és deguda, però segons Shafiani et al. es donaria a partir d'una població específica preexistent. Segons aquest estudi, a més, les Treg específiques per *M.tuberculosis* tindrien una gran capacitat de proliferació (Shafiani et al. 2010).

Un altre fenomen que s'ha descrit relatiu a les Treg i les Th17, és la conversió de les Treg a Th17, en condicions d'inflamació, per exemple durant les infeccions. Afzali et al. revisen aquest fenomen, descrit tant en humans com en ratolins (Afzali et al. 2010). Xu et al. van trobar que en ratolins, les cèl·lules T CD4+CD25+Foxp3+ eren capaces de diferenciar-se en Th17 en resposta a l'estímul de IL-6, en absència de TGF- β (Xu et al. 2007b). Segons Zheng et al., (Zheng et al. 2008) aquest comportament inestable només el tindrien les cèl·lules Treg naturals, mentre que les iTreg induïdes *in vitro* amb IL-2 i TGF- β , serien resistents a aquesta inducció (Zheng et al. 2008; Kong et al. 2012). Komatsu et al. van trobar que només una part de les Treg naturals (nTreg), les CD4+CD25^{low}Foxp3+ es diferenciaven a Th17, i estaven implicades en l'artritis reumatoide, segons els estudis en un model murí (Komatsu et al. 2009; Komatsu et al. 2014). En canvi segons Miyao et al. les exFxp3+ no serien cèl·lules reprogramades, sinó una població molt menor de cèl·lules Foxp3+ poc estables, induïdes perifèricament, i que no provindrien de les nTreg. A més, aquestes exFxp3, quan de forma transitòria expressen Foxp3, no expressen CD25, o bé l'expressen amb baixa intensitat, pel que les cèl·lules CD25+Fxp3+ sí que són majoritàriament Tregs, ja siguin iTregs o nTregs (Miyao et al. 2012). Una troballa interessant per part de Zhou et al. va ser que l'àcid retinoic (metabòlit de la vitamina A) estabilitza el fenotip i la funció de les Treg, fins i tot en ambients proinflamatoris (Zhou et al. 2010).

En humans, les nTregs es diferencien a Th17 sota la influència de IL-1, mentre que la IL-6 i el TGF- β no tindrien cap efecte en aquesta conversió (Koenen et al. 2008; Deknuydt et al. 2009). Les exFxp3 o potencials Th17 perden l'expressió de Foxp3 i

perden les funcions supressores, i alhora adquireixen propietats característiques de les Th17, com la secreció de TNF- α (Deknuydt et al. 2009), o l'expressió de CCR6, el receptor de la CCL20, una quimiocina inflamatòria secretada per les Th17 que atrauria aquestes cèl·lules al focus d'inflamació (Singh et al. 2008). Així doncs, segons la bibliografia consultada no és gens clar quines cèl·lules exactament esdevindrien exF_{oxp3}⁺, però és clar que algun tipus de Treg F_{oxp3}⁺ pot esdevenir Th17 segons l'ambient citocínic.

Un fenomen paral·lel s'ha descrit també per les Treg CD39⁺. En pacients d'hepatitis autoimmune s'ha trobat que les Treg CD39⁺ (CD4⁺CD25^{hi}CD39⁺) estaven disminuïdes en nombre i en funcionalitat. A més, en els pacients, les Treg CD39⁺ estimulades *in vitro* secretaven IFN- γ i IL-17 amb major freqüència que en els controls sans. Segons els autors, això s'explicaria per una conversió de les Treg CD39⁺ a altres subtipus cel·lulars, com ara Th17 (Grant et al. 2014). Aquest estudi doncs, presenta resultats oposats als de Dwyer et al (Dwyer et al. 2010) comentat abans, segons el qual les Treg CD39⁺ no secretarien IL-17 sota estímuls proinflamatoris.

En definitiva, el que és clar és que les cèl·lules Treg i Th17 tenen papers contraposats, i un equilibri entre aquests dos subtipus és important per mantenir una resposta immunitària adequada, ja sigui davant d'una infecció com davant d'un procés d'autoimmunitat. En funció d'altres factors les Treg poden suprimir les Th17, o bé les Th17 poden suprimir la resposta Treg.

Tregs durant la TB

En la majoria d'estudis que sobre les Tregs en la tuberculosi, es destaca el rol que pot tenir la immunosupressió causada per les Tregs en la susceptibilitat a la infecció i desenvolupament de tuberculosi activa. Ribeiro-Rodrigues han trobat un augment de Tregs en sang (CD4⁺CD25^{hi}) i una disminució de la capacitat de producció d'IFN- γ en les PBMCs dels pacients, respecte els controls infectats amb ITBL (Ribeiro-Rodrigues et al. 2006). Chiacchio et al. també van trobar una expansió *in vitro* de Tregs (CD39⁺) major en pacients que en controls sans, però no en les PBMCs directament sense cultivar (Chiacchio et al. 2009). Un altre estudi obtenia resultats similars: alts nivells de Treg en pacients de tuberculosi activa en comparació als infectats amb ITBL, i curiosament les Treg suprimien la producció d'IFN- γ però no la de IL-17 (Marin et al. 2010). Roberts et al. (Roberts et al. 2007) van trobar en pacients de tuberculosi activa una menor expansió *in vitro* després de l'estímul amb BCG de Treg (CD25^{hi}), però en canvi van trobar major expressió de F_{oxp3} i més immunosupressió (menor producció d'IFN- γ i major producció de TGF- β i IL-4). De la mateixa manera, Ho et al. atribueixen el fracàs de la vacuna BCG per protegir de la tuberculosi a la immunosupressió

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

causada per la inducció de cèl·lules Treg (Ho et al. 2010), tot i que aquest estudi s'ha fet en ratolins no infectats, només immunitzats amb BCG, pel que no aporten proves de que el motiu sigui aquest. Boer et al. destaquen el paper de cèl·lules CD8+CD39+ en la immunosupressió que causaria el desenvolupament de tuberculosi activa (Boer et al. 2013), tot i que tampoc demostren que la causa del desenvolupament de la tuberculosi sigui aquesta immunosupressió. DeCassan et al. van estudiar la resposta Th17 i Treg CD39+ en voluntaris sans d'una vacuna per la tuberculosi, MVA85A, i van trobar que la vacuna produïa un augment de la resposta Th17 en detriment de la resposta Treg. A més, van trobar que l'exposició prèvia a antígens micobacterians disminuïa la resposta Th17 de la vacuna (de Cassan et al. 2010), tot i no aportar proves de si aquest tipus de resposta és protector o no. Shaffiani et al., en un model de ratolí, sí que van provar que la injecció de Tregs específiques d'antigen al principi de la infecció produïa un augment de la càrrega bacil·lar, que atribuïen a un retard en el desenvolupament de la resposta Th1 causat per les Treg (Shafiani et al. 2010), i en un altre estudi es va demostrar que la depleció de Tregs en ratolins vacunats amb BCG tenia un efecte significatiu però moderat sobre la càrrega bacil·lar (Jaron et al. 2008). Pel contrari, Quinn et al. van estudiar l'efecte de la depleció de les Treg abans de la infecció en un model de ratolí infectat amb *M.tuberculosis*, i van trobar que afectava molt lleument la producció d'IFN- γ , però no afectava la càrrega bacil·lar (Quinn et al. 2006). A més, Shaffiani et al. en un estudi posterior (Shafiani et al. 2013) han vist que la inducció de Tregs que es produeix a l'inici de la infecció, es limita més tard mitjançant la IL-12.

Des d'un punt de vista totalment diferent, Leepiyassakulchai et al. van comparar els ratolins de la soca resistent C57BL/6 amb els de la soca susceptible DBA/2 i van trobar que els primers incrementaven dràsticament el percentatge de Tregs i cèl·lules dendrítiques reguladores durant la infecció, mentre que els segons no, pel que demostraven un paper protector de les Treg en aquest model (Leepiyasakulchai et al. 2012).

El balanç entre les respostes Th17 i Treg s'ha proposat com a causant de la tuberculosi associada al IRIS de la immunitat en els pacients coinfectats amb VIH i tuberculosi després de rebre el tractament. En aquest estudi es va veure que després del tractament amb antiretrovirals, en tots els pacients el percentatge de Treg disminuïa i el de Th17 augmentava, però aquest canvi era més pronunciat en els pacients coinfectats amb VIH i tuberculosi en relació als pacients infectats només amb VIH (Liu et al. 2011). Tadokera et al. en un estudi on comparaven pacients coinfectats amb tuberculosi i VIH van trobar que la IL-10 i la IL-22 es sobreexpressaven en els pacients amb IRIS en comparació als pacients que no presentaven IRIS, i van

interpretar que l'increment de IL-10 era compensatori, en resposta a l'excés d'inflamació, mentre que l'increment de IL-22, citocina secretada per les cèl·lules Th17, tenia un paper actiu en la immunopatogènesi de l'IRIS (Tadokera et al. 2013). Per contra, també s'ha proposat que el desequilibri entre Th17 i Treg seria responsable de l'efusió pleural en tuberculosi, tot i que en aquest cas, la causa del desequilibri s'atribueix a que les Treg inhibeixen la resposta Th17, produint una immunosupressió local que provocaria l'efusió pleural. En tot cas, en aquest estudi també es va trobar que els nivells de Th17 i Treg correlacionaven negativament en el líquid d'efusió, però no en sang (Ye et al. 2011).

Així doncs, no és gens clar quin seria el paper de les Treg en la tuberculosi, si seria beneficiós o perjudicial per a l'hostatger. Chevalier et al., des del camp del VIH, proposaven una solució de consens: les Treg podrien tenir un paper perjudicial o beneficiós en funció de la fase de la malaltia, segons un estudi realitzat sobre pacients amb SIDA (Chevalier et al. 2013).

1.7 Teràpies Host-directed o dirigides a l'hostatger

La teràpia actual per la tuberculosi és una combinació d'antibiòtics que actuen sobre el bacil *M.tuberculosis*, i presenta grans inconvenients: un temps de tractament extremadament llarg (mínim 6 mesos), poca adherència al tractament, amb la conseqüent aparició de resistències, i certa toxicitat. Per tant, hi ha necessitat d'un tractament més efectiu. Tradicionalment la recerca orientada a curar la tuberculosi s'ha focalitzat en el bacil, en trobar dianes noves o substàncies més eficients que el destrueixin, però s'ha parat poca atenció a l'hostatger. Encara que també hi ha hagut molta recerca encarada al desenvolupament de vacunes, que sí que actuen sobre l'hostatger, aquesta s'ha centrat sobretot en com millorar el reconeixement del bacil, i de moment cap vacuna ha aconseguit arribar al mercat demostrant major efectivitat que la BCG (Vilaplana et al. 2014a). Si bé en aquests dos camps s'avança lentament, l'estudi de la interacció entre *M.tuberculosis* i el seu l'hostatger ha començat a donar els seus fruits: hi ha actualment en desenvolupament diferents estratègies que tenen com a diana l'hostatger, que podrien administrar-se almenys com a coadjuvants a la teràpia vigent, i com a mínim escurçar el tractament o millorar-ne l'efectivitat (Hawn et al. 2013). Es tracta d'estratègies noves, que no es centren ni en les vies metabòliques del bacil per impedir el seu creixement, ni en el bacil com a antígen, sinó en reforçar la resposta immunològica del propi hostatger. Hawn ha realitzat una revisió de tots els tractaments en investigació amb aquestes característiques (Hawn et al. 2013). Se n'exposen alguns exemples a continuació, segons on actuen.

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

1.7.1 Teràpies dirigides a la funció del macròfag

L'**imatinib** és un inhibidor d'una tirosin-kinasa (BRC-ABL) que està implicada en la **captació del *M.tuberculosis*** pels macròfags. Es va investigar inicialment pel tractament de leucèmia. *In vitro*, impedeix parcialment la captació dels bacils per part dels macròfags (Napier et al. 2011). A més, BRC-ABL també està implicada en l'acidificació del fagosoma. Els pacients de leucèmia que reben l'imatinib presenten més fagosomes acidificats que els controls sans (Bruns et al. 2012), i en ratolins infectats amb *M.marinum* aquest fàrmac va reduir les lesions granulomatoses (Napier et al. 2011).

L'**autofàgia** és un procés en el qual les cèl·lules reciclen el seu propi contingut citoplasmàtic mitjançant els lisosomes. Tot i que és un procés que ocorre en condicions fisiològiques, també s'activa per estimulació de l'IFN- γ (i altres condicions) i pot contribuir a degradar patògens intracel·lulars, com ara *M.tuberculosis*. Les molècules **H-89** i **ETB067**, són inhibidors de la kinasa **AKT-1**, implicada en moltes vies de senyalització, incloent la regulació de l'autofàgia. Doncs bé, en cultiu primari de macròfags humans, aquestes molècules van reduir el creixement de soques MDR de *M.tuberculosis* (Kuijl et al. 2007). També s'ha vist que antibiòtics com la **isoniazida**, **pirazinamida** o la **nitazoxanida** podrien tenir un doble efecte: sobre el bacil, i també sobre l'hostatger promovent l'autofàgia (Kim et al. 2012; Lam et al. 2012). A la inversa, també s'ha trobat que fàrmacs amb efecte sobre l'hostatger, concretament antiinflamatoris, també tenen efecte bactericida sobre el *M.tuberculosis in vitro* (Gold et al. 2012; Pinault et al. 2013).

La **vitamina D** és dels primers tractaments de la tuberculosi, utilitzada a l'era preantibiòtica en forma d'exposició solar (la vitamina D pot derivar de l'exposició solar). Està implicada en la síntesi de la catelicidina, un pèptid antimicrobià sintetitzat pel macròfag. Les deficiències en aquesta vitamina s'havien associat a un augment de susceptibilitat a la tuberculosi, i s'han realitzat 5 assajos clínics que avaluen el seu efecte en humans com a tractament complementari, amb resultats diversos (Nursyam et al. 2006; Martineau et al. 2007b; Wejse et al. 2009; Kota et al. 2011; Martineau et al. 2011). Podria jugar-hi un paper la genètica de l'hostatger, de manera que només seria efectiva en alguns pacients.

El **bromur de mepenzolat** va millorar l'efecte bactericida de cèl·lules THP1 humanes, una línia cel·lular de monòcits, mitjançant la inhibició d'una molècula que activa el **metabolisme antilipolític**, de manera que el macròfag no acumula lípids, no forma cossos lipídics i no esdevé escumós, essent aquest efecte perjudicial per al bacil (Singh et al. 2012).

Els **Receptors nuclears sensibles a lípids** PPAR γ , LXR α , LXR β regulen el **metabolisme lipídic dels macròfags**. Aquests receptors nuclears s'activen per àcids grassos o els seus metabòlits, s'uneixen a receptors RXR i regulen l'expressió de determinats gens, incloent gens que regulen la inflamació que causa la malaltia cardiovascular (placa d'ateroma), pel que amb aquest propòsit s'han desenvolupat tractaments que actuen sobre aquests receptors nuclears. Però potencialment aquestes molècules també es podrien utilitzar en la tuberculosi: **l'inhibidor de PPAR γ , GW9662** va reduir el creixement de *M.tuberculosis* en macròfags de ratolí o humana *in vitro* (Rajaram et al. 2010; Mahajan et al. 2012), els **agonistes de LXR** en ratolins també en millorar el control de la càrrega bacil·lar (Korf et al. 2009).

Diferents molècules **activadores de la fosfolipasa D**, que hidrolitza la fosfatidilcolina en àcid fosfatídic i colina, han resultat en un increment de l'efecte bactericida dels macròfags *in vitro*, ja que l'àcid fosfatídic, per mecanismes que es desconeixen, incrementa la maduració del fagosoma, la formació del fagolisosoma, la producció de ROIs i la destrucció dels bacils. També s'han estudiat **activadors de la fosfolipasa A2**, implicada en la formació d'àcid araquidònic que dóna lloc a diverses molècules mediadores de la inflamació, però amb resultats variables.

1.7.2 Teràpies dirigides a la regulació dels eicosanoids

Hi ha molts fàrmacs ja al mercat que inhibeixen enzims de la via de síntesi dels **eicosanoids**. L'aspirina o altres fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus, que inhibeixen la COX-1 i la COX-2, per tant alterant la síntesi de les prostaglandines, o el zileuton, que inhibeix la 5-LOX, i per tant afecta la síntesi de la LXA $_4$.

La **PGE $_2$** protegeix els macròfags de la necrosi, **afavorint l'apoptosi**, mentre que alts nivells de LXA $_4$ inhibirien la PGE $_2$ i induirien la necrosi, afavorint el creixement del bacil. Pel que intervencions a aquest nivell podrien ser beneficioses pel tractament de la tuberculosi, tot i que no se n'han concretat. (Chen et al. 2008; Divangahi et al. 2009) (Divangahi et al. 2010).

Un altre via modulable dels eicosanoids és **la intervenció en la producció del LTB $_4$** , una molècula proinflamatòria que estimula la producció de TNF- α . En aquest cas, els tractaments s'han avaluat en peixos zebra, mutants per al locus *Ita4h* que modula la producció del LTB $_4$. Un dels mutants té alts nivells de LXA $_4$, i baixos nivells de LTB $_4$ i TNF- α , pel que **l'inhibidor de la 15-LOX**, implicada en la síntesi de LXA $_4$, redueix la càrrega bacil·lar. L'altre mutant representa l'extrem contrari: té un excés de LTB $_4$, i per tant funcionen **l'àcid acetilsalicílic (AAS)**, la **dexametasona** i **l'antagonista del LTB $_4$** . Hipotèticament, doncs, aquestes teràpies serien individualitzades, en funció de la genètica de l'hostatger. De fet, estudis en humans

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

també recolzarien aquesta hipòtesi, doncs diferents genotips d'aquest mateix gen afecten també la producció de LTB₄. A més la dexametasona, que és d'ús comú en el tractament de la meningitis tuberculosa, és molt més eficaç en individus que tenen el genotip proinflamatori (associat a alts nivells de LTB₄), i ho és molt poc o gens en els altres genotips (Tobin et al. 2010; Tobin et al. 2012).

Pel que fa a la regulació de la LXA₄, hi ha estudis contradictoris. Els ratolins deficients en 5-LOX, que tenen baixos nivells de LXA₄, tenen menor càrrega bacil·lar i major expressió de IL-12, IFN- γ i iNOS (Aliberti et al. 2002; Bafica et al. 2005). En canvi la inhibició de la 5-LOX mitjançant **MK866** va donar resultats oposats: major càrrega bacil·lar i menor temps de supervivència (Peres et al. 2007). El **zileuton**, un altre inhibidor de la 5-LOX ja aprovat per les autoritats sanitàries, que s'utilitza en el tractament de l'asma, podria donar més informació sobre aquesta via, però de moment no hi ha estudis que l'utilitzen en el tractament de la tuberculosi.

Finalment s'han fet diversos estudis clínics amb inhibidors de les COX1 i COX2. Dos estudis clínics amb **l'AAS** per avaluar la seva eficàcia com a tractament coadjuvant en **pacients de meningitis per tuberculosi** van donar resultats contradictoris (Misra et al. 2010; Schoeman et al. 2011). D'altra banda en ratolins s'han avaluat l'AAS i l'ibuprofè conjuntament amb la pirazinamida, amb resultats positius, tot i que els autors interpretaven que l'efecte positiu dels antiinflamatoris no esteroideus (AINEs) no venia donat per l'efecte antiinflamatori, sinó per una sinèrgia amb la pirazinamida, incrementant l'efecte d'aquest antibiòtic sobre el bacil (Byrne et al. 2007). Curiosament, precisament l'AAS promou el creixement de *Mtb in vitro*, i de fet aquesta activitat va donar lloc al desenvolupament d'un dels primers antibiòtics antituberculosos, l'àcid para-aminosalicílic (Bernheim 1940). De forma similar, també s'ha avaluat l'ús del Diclofenac en ratolins, amb resultats positius, però amb la intenció d'incidir sobre el bacil, ja que el diclofenac té activitat bactericida també *in vitro* (Dutta et al. 2007). A la Figura 5 s'il·lustren algunes d'aquestes estratègies terapèutiques.

1.7.3 Teràpies dirigides a la modulació de citocines

La modulació de citocines inclou múltiples punts d'intervenció. **L'IFN- γ** s'ha administrat en assajos clínics humans com a tractament coadjuvant, i s'ha avaluat també la seva toxicitat, amb resultats positius (Condos et al. 2003; Milanes-Virelles et al. 2008). Però degut al cost elevat i dificultat logística que suposaria la seva administració no es desenvoluparà com a tractament massiu. La **modulació del TNF- α** s'ha provat per diferents vies. Una de les vies ha estat la **modulació de l'adenosina monofosfat cíclica (AMPC)**. L'AMPC és un segon missatger cel·lular que s'elimina degradat per les fosfodiesterases, i un dels efectes que té és la inhibició de la

producció de TNF- α en monòcits i macròfags. Els **inhibidors de les fosfodiesterases (PDEi)**, mitjançant l'acumulació d'AMPc inhibeixen la producció de TNF- α . Diversos iPDE s'han provat en models animals, en combinació amb el tractament estàndard, amb resultats molt positius, amb una restricció de la càrrega bacil·lar i disminució de la inflamació que van comportar una millora en la patologia dels ratolins i dels conills (Koo et al. 2011; Subbian et al. 2011a; Subbian et al. 2011b; Maiga et al. 2012). També s'han utilitzat antiinflamatoris esteroideus amb beneficis en pacients amb meningitis i pericarditis tuberculoses (Strang et al. 1987; Thwaites et al. 2004). Però una immunomodulació més selectiva seria desitjable, donat que els **corticosteroides** comporten molts efectes indesitjats. En aquest sentit, la talidomida s'ha provat com a teràpia adjuvant en pacients amb meningitis tuberculosa, però degut als efectes secundaris severos no és viable el seu ús (Schoeman et al. 2004). Una altra via de regulació del TNF- α ha estat l'administració **d'alisporivir i desipramina**, de moment experimentat en el model del peix zebra (Roca et al. 2013). El TNF- α indueix la producció de ROS, que per una banda té un efecte bactericida, però per l'altre indueix la necrosi del macròfag, amb efectes perjudicials degut a una inflamació excessiva. Aquests fàrmacs **inhibeixen la inducció de la necrosi**, sense afectar l'efecte bactericida. A la Figura 5 s'il·lustren algunes d'aquestes estratègies terapèutiques.

1.7.4 Teràpies que mantenen l'homeòstasi de l'hostatger

Les **metaloproteases de la matriu** s'han associat a la formació de cavitats, pel que s'ha provat la seva inhibició per al tractament de la tuberculosi. La **inhibició de la MMP9** mitjançant **Morpholinos** va resultar en una disminució de la càrrega bacil·lar i del nombre de granulomes, en un model de peix zebra (Volkman et al. 2010). També la **inhibició de MMP1** amb un fàrmac anomenat **Trocade** s'ha suggerit per al tractament. En experiments amb ratolins, es va infectar ratolins que expressaven MMP1 (no s'expressa normalment en ratolins, per això no es podia provar el Trocade directament) i es va trobar una major destrucció alveolar, malgrat no hi va haver diferències en la càrrega bacil·lar (Elkington et al. 2011). També s'ha provat la inhibició de diverses MMPs de forma no selectiva, amb resultats dispars.

La **modulació de l'activitat dels neutròfils** també s'ha suggerit pel tractament de la tuberculosi. Però els fàrmacs amb aquest efecte són poc selectius, amb alta toxicitat i risc, pel que no s'han explorat aquestes vies.

Malgrat la **fibrosi** és necessària per encapsular les lesions i controlar la infecció, s'ha suggerit que els **antifibròtics** també es podrien utilitzar per evitar un excés de fibrosi durant la malaltia activa, però l'efecte d'aquests fàrmacs sobre el desenvolupament de la tuberculosi encara no s'ha avaluat.

1.8 Tolerància Oral

La tolerància oral és la inducció fisiològica de tolerància als antígens de l'alimentació i als bacteris comensals del tracte digestiu que té lloc al teixit limfàtic associat a l'intestí, l'òrgan limfàtic més gran del cos. La majoria d'antígens que interaccionen amb el cos d'un animal (humà o altres) es presenten a l'intestí, ja siguin provinents de l'alimentació o bé provinents de la flora intestinal. Afortunadament la tolerància és la via immunològica que es desenvolupa a l'intestí per defecte, i el tipus de tolerància induïda depèn de la dosi de l'antigen. Així, l'anèrgia es produeix en resposta a una dosi alta, i la inducció de Tregs en resposta a una dosi baixa (Faria et al. 2005; Weiner et al. 2011).

La inducció de Tregs és un dels principals mecanismes de tolerància oral, i té lloc gràcies a les cèl·lules dendrítiques (DCs) de l'intestí, que tenen propietats especials. Les DCs de les mucoses tendeixen a produir citocines antiinflamatòries (Iwasaki et al. 1999), i a més, les DCs intestinals CD103+ adquireixen propietats tolerogèniques condicionades per l'epiteli intestinal de manera que indueixen la diferenciació de cèl·lules T a cèl·lules Treg Foxp3+ davant l'estímul de TGF- β . Paral·lelament, l'àcid retinoic és introduït a l'intestí amb la dieta a través del seu precursor, la vitamina A, ja que les mateixes DCs CD103+ tenen capacitat per metabolitzar-lo, i també té un paper important en la inducció de Tregs a l'intestí (Coombes et al. 2007; Mucida et al. 2007). La vitamina D també contribueix en la tolerància oral, ja que la seva presència a l'intestí (o la dels seus metabòlits) indueix la formació de cèl·lules dendrítiques tolerogèniques (Ruemmele et al. 2013).

La tolerància oral s'ha estudiat per poder utilitzar-la en el tractament de malalties autoimmunes, inflamatòries o fins i tot infeccioses. Harats et al. van aconseguir reduir les lesions arterioscleròtiques en ratolins mitjançant la inducció de tolerància oral (Harats et al. 2002). Ochi et al. van millorar la simptomatologia de la encefalitis autoimmune experimental (EAE), un model murí d'esclerosi múltiple, mitjançant la inducció de Treg a l'intestí amb l'administració d'anti-CD3 (Ochi et al. 2006), i en altres malalties autoimmunes i inflamatòries (Weiner et al. 2011), així com malalties infeccioses (Levy et al. 2007) s'ha utilitzat l'administració oral d'antígens rellevants per la malaltia, per induir tolerància oral, amb l'objectiu de millorar la simptomatologia de la malaltia.

Així doncs, tenint en compte que la TB activa podria ser causada per un excés de resposta immunitària mediada per la resposta cel·lular, la inducció de tolerància oral mitjançant administració de dosis baixes d'antígens de *M.tuberculosis* podria millorar la patologia de la TB activa.

2 Hipòtesi i objectius

Hipòtesi inicial fallida:

La inducció de la cavitat tuberculosa és deguda a un desequilibri en la capacitat de fibrosi del caseum, que porta a la seva liqüefacció

Reformulació de la hipòtesi:

1. La inducció de la cavitat és deguda a una reacció inflamatòria exagerada
2. La inducció de tolerància mitjançant l'administració oral de micobacteris inactivats pot protegir contra la cavitació

Objectius

1. Desenvolupar un model de tuberculosi activa
2. Estudiar el paper de la inflamació en la tuberculosi activa
3. Modular la resposta inflamatòria a la tuberculosi mitjançant la inducció de tolerància administrant micobacteris inactivats per via oral per evitar la formació de cavitats

3 Metodologia

3.1 Disseny experimental

El disseny experimental està esquematitzat a la Figura 7 (Estudi 1 i 2) i a la Figura 8 (Estudi 3).

Estudi 1: Per a l'establiment i caracterització del model experimental es van infectar els animals per via endovenosa (EV), a través de la vena caudal, amb una dosi de 2×10^4 CFU de *M.tuberculosis* de la nostra soca H37Rv Pasteur de referència, i es va repetir 5 vegades per fer-ne el seguiment de la supervivència, utilitzant 12 animals cada vegada. Tot seguit es va repetir l'experiment 5 vegades més i els animals es van sacrificar a diferents temps postinfecció per analitzar-ne diferents paràmetres: patologia pulmonar, càrrega bacil·lar a pulmons, melsa i limfonodes, resposta immunològica específica i nivells sèrics de mediadors de la inflamació. Sempre es van incloure sis animals per sacrifici, excepte per a l'experiment de determinació de la histometria, on es van utilitzar 18 animals en total.

Estudi 2: Per caracteritzar els mecanismes responsables de l'evolució de lesions es va comparar el model desenvolupat amb la soca de ratolins resistents C3H/HeN, i es va avaluar l'efecte de fàrmacs antiinflamatoris en el desenvolupament del model.

D'entrada es va avaluar la supervivència del model, la del grup de la soca C3H/HeN, i la dels animals tractats amb Doxiciclina, Heparina, AAS i ibuprofè, incloent 12 animals per grup. Seguidament es van repetir els experiments per avaluar altres paràmetres (patologia pulmonar, càrrega bacil·lar als pulmons, ambient citocínic al pulmó i nivells sèrics de mediadors de la inflamació) al model desenvolupat, a la soca resistent C3H/HeN i als animals tractats amb ibuprofè, sacrificant 6 animals per grup i temps postinfecció.

Tractaments: L'AAS (Aspirina 3 mg/kg; Bayer Health Care LLC, Leverkusen, Alemanya) es va administrar per via oral diàriament des del dia 0 postinfecció. L'heparina (Clexane 20 UI/kg; Sanofi-aventis, Paris, França), la doxiciclina (Vibracina, 20mg/kg; Pfizer Inc., NY, USA) i l'ibuprofè (Dalsy 80mg/kg, Abbott Laboratories, Abbott Prak, IL, USA) es van administrar per via oral diàriament des de la setmana 3 postinfecció.

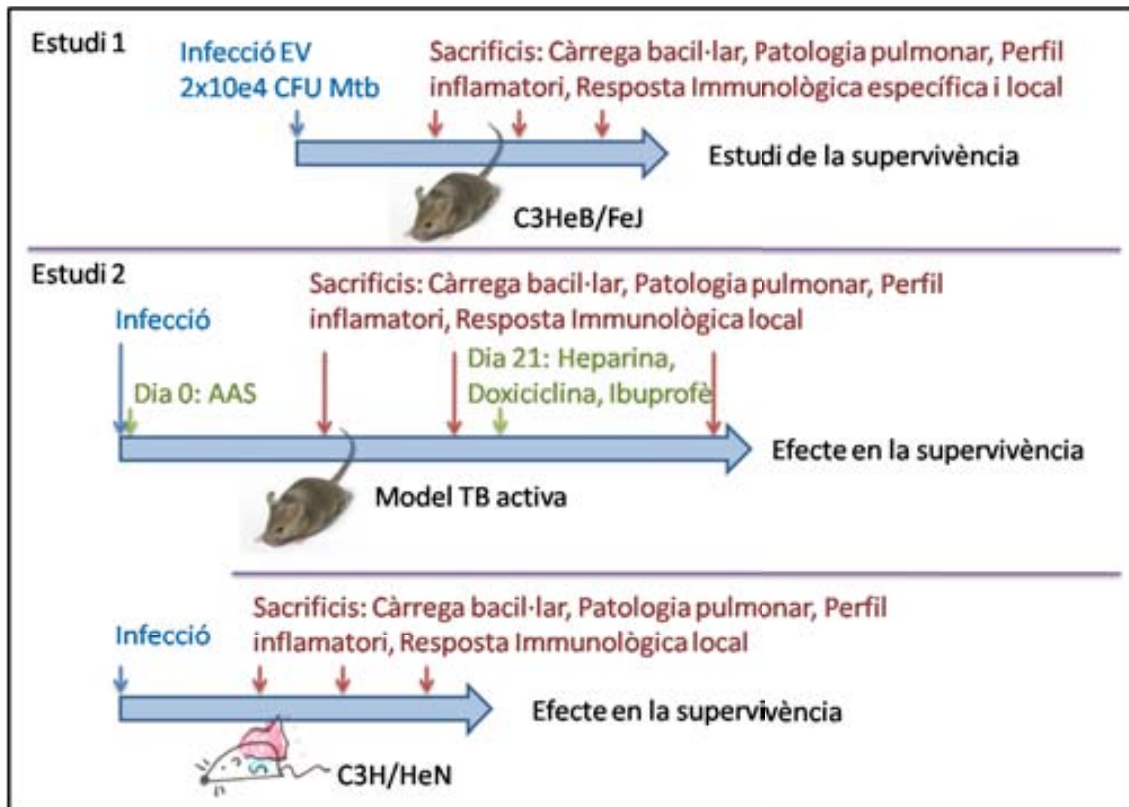


Figura 7: Disseny experimental dels estudis 1 i 2.

Estudi 3:

1) Es van preparar tractaments de bacils desactivats per calor per administració oral amb 5 espècies diferents de micobacteris: *M.tuberculosis*, *M.bovis* BCG, *M.kansasii*, *M.avium* i *M.manresensis* (nova espècie, taxonomia en preparació). Es van avaluar els diferents tractaments en el model murí desenvolupat i caracteritzat prèviament a l'estudi 1, mitjançant l'avaluació de la supervivència dels ratolins. Les diferents dosis i pautes d'administració, així com el nombre d'animals i l'inòcul d'infecció exacte estan indicats a la Taula 4, Taula 5 i Taula 6 (veure resultats, apartat 6.1, a la pàgina 83, 84 i 85 respectivament).

2) Un cop avaluats els tractaments se'n van seleccionar tres (*M.tuberculosis*, *M.bovis* BCG i *M.manresensis*) per a caracteritzar el seu efecte en la càrrega bacil·lar i la patologia pulmonar, als 21 i 28 dies postinfecció. El tractament amb *M.tuberculosis* es va administrar en 5 dosis a dies alterns des de 10 dies preinfecció (10^3 CFU inactivades/animal) o postinfecció (10^5 CFU inactivades/animal). El tractament de *M.bovis* BCG es va administrar diàriament des del dia 7 preinfecció (10^6 CFU inactivades/animal) i el tractament amb *M.manresensis* es va administrar 14 dies des del dia de la infecció (dia 0) a una dosi de $1,3 \times 10^5$ CFU inactivades/animal). Es van utilitzar en total 78 ratolins: 6 animals per grup i temps d'infecció estudiat.

Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

3) Per l'estudi del rol de les Tregs en la tuberculosi es van fer 3 experiments amb la soca C3HeB/FeJ i la soca C3H/HeN. En el primer experiment 6 animals de cada soca es van infectar via EV tal com s'ha descrit pel model, i es van sacrificar 3 setmanes després per avaluar la població de Tregs a melsa. En el segon experiment, 6 animals de cada soca es van infectar EV tal com s'ha descrit pel model, es van sacrificar 2 setmanes després i es va avaluar la població de Treg en el cultiu d'esplenòcits estimulat amb PPD. Finalment, en el tercer experiment es van infectar via EV 12 animals C3H/HeN i un grup (6 animals) es va tractar amb la injecció intraperitoneal de 400µg de anti-CD25 (Anti-mouse CD25 Functional Grade Purified, Clone PC61.5, eBioscience inc., San Diego, CA, USA) 1 dia abans de la infecció. El grup control es va tractar amb el control d'isotip (Rat IgG1 κ Isocontrol, Functional Grade Purified, Clone eBRG1, eBioscience inc., San Diego, CA, USA). Es va extreure sang a diferents temps (dia 1 preinfecció, dia 0, i dies 12, 26 i 46 postinfecció) per avaluar la depleció de Tregs. El dia 46 postinfecció els animals es van sacrificar per tal d'avaluar la histopatologia del pulmó.

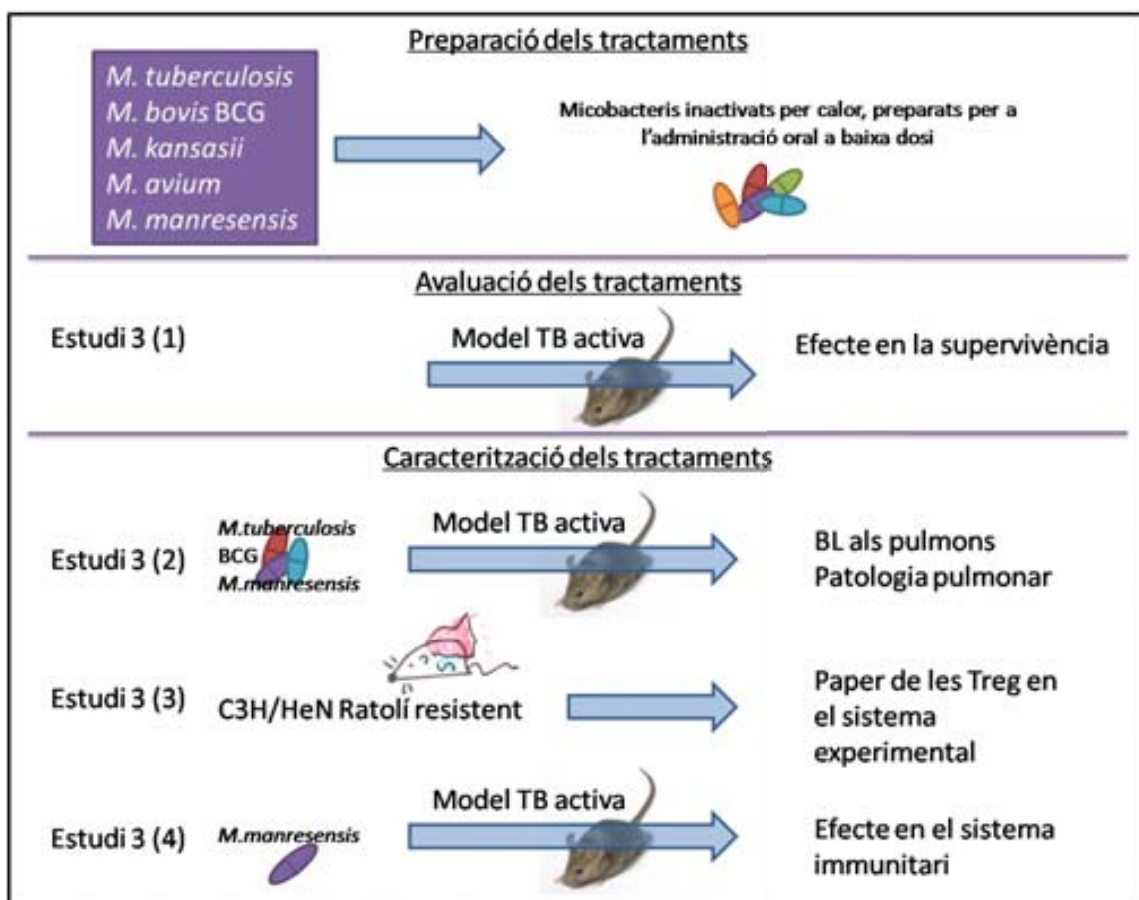


Figura 8: Disseny experimental de l'estudi 3.

4) Finalment es va caracteritzar l'efecte del tractament escollit (el·laborat amb *M.manresensis*) en el sistema immunològic per tal d'estudiar-ne el mecanisme d'acció. Es va utilitzar el mateix model descrit a l'estudi 1. L'experiment es va realitzar 3 vegades, i es van mesurar les Tregs a diferents òrgans. El tractament es va administrar diàriament durant 14 dies des del dia de la infecció (dia 0) a diferents dosis: 6×10^4 , $1,3 \times 10^5$ o 6×10^5 CFU inactivades/animal. En tots els casos es van utilitzar 6 animals per grup i temps d'infecció estudiat, implicant un total de 48 ratolins.

3.2 Tractaments d'inducció de tolerància oral

Per a la preparació dels tractaments es van utilitzar diferents micobacteris de la col·lecció de soques de la Unitat de Tuberculosi Experimental: *M.tuberculosis* H37Rv Pasteur, *M.kansasii*, *M.avium* i *M.manresensis* (Taxonomia en preparació). També es va utilitzar *M.bovis* BCG Danish (Pfizer Inc., NY, USA). Els bacteris es van cultivar en plaques de 7H11 (BCG, *M.kansasii* i *M.manresensis*) a 37°C, o en medi Proskauer-Beck (*M.tuberculosis* i *M.avium*) en condicions d'aeració i agitació a 37°C, segons es va veure convenient per al creixement òptim dels cultius. Després es van subcultivar en medi Proskauer-Beck (a excepció del *M.manresensis*, que es va subcultivar en plaques 7H11). La concentració bacil·lar de cada cultiu es va determinar per dilucions seriades i recompte de colònies en plaques de 7H11, i també es va controlar la contaminació sembrant una placa d'Agar sang. Llavors els cultius es van pasteuritzar i l'esterilització es va confirmar per cultiu negatiu en plaques de 7H11 (10 plaques), agar Sang, agar McConkey i agar Sabouread. Els cultius inactivats es van diluir 1:1 en sucrosa estèril (10% de sucrosa en aigua destil·lada), i es van al·licuar en vials d'1ml per emmagatzemar-los a -80°C fins al seu ús, excepte per *M.tuberculosis*, *M.bovis* BCG i *M.kansasii*, que es van liofilitzar abans de l'emmagatzematge a -80°C. Les plaques de cultiu es van comprar a BD diagnostics, Spark, USA (7H11) o Biomérieux Inc., NC, USA (Agar sang, Agar McConkey i Agar Sabouread).

3.3 Ètica i animals

Per als diversos estudis es van utilitzar ratolins femella de les soques C3HeB/FeJ i de la soca C3H/HeNHsd, d'ara endavant C3H/HeN, lliures de patògens específics (spf), d'una edat aproximada de 6 a 8 setmanes. Els ratolins es van obtenir de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) i de Harlan Labs (Castellar del Vallès, Catalunya) respectivament. Tots els procediments es van dur a terme en instal·lacions de nivell de seguretat biològica 3.

Tots els procediments es van fer d'acord amb el protocol DMAH6119, revisat pel Comitè Ètic d'experimentació animal de l'Hospital Universitari Germans Trias I Pujol

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

(registrarat com a B9900005) I aprovat pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural del govern de la Generalitat, d'acord amb la legislació nacional, així com amb la legislació Europea vigent relativa a la protecció dels animals d'experimentació (Llei de 1997 de la Generalitat de Catalunya; Real Decreto 1201/2005; i 86/609/CEE; 91/628/CEE; 92/65/CEE y 90/425/CEE).

Els animals es van supervisar diàriament (pes i aspecte general) i seguint un protocol molt estricte, en cas de ser necessitat per deteriorament de la salut de l'animal o per requeriment de l'experiment, es va efectuar l'eutanàsia amb isofluorà (per excés inhalatori), per tal d'evitar patiment innecessari.

3.4 Histopatologia i histometria

Els pulmons es van fixar en formalina al 10%, es van incloure en parafina, i els blocs de parafina es van tallar obtenint-ne seccions de 5µm de gruix. Les seccions es van tenyir amb les tincions d'Hematoxil·lina/Eosina (H/E), Tricròmic de Masson (MTC), Ziehl-Neelsen (ZN) i Reticulina de plata, amb la tècnica habitual (Prophet et al. 1992) per a la seva observació al microscopi i per l'anàlisi histomètric utilitzant el programari NIS-Elements D versió 3.0x software package (Nikon Instruments Inc., Tòquio, Japó).

Per obtenir una mesura concreta de l'abast de les lesions al pulmó es van analitzar 4 talls consecutius de cada mostra, amb la tinció H/E, i s'en van mesurar l'àrea lesionada i l'àrea total del pulmó, per així calcular el percentatge d'àrea lesionada respecte l'àrea total del pulmó.

Per estudiar les característiques de les lesions es va desenvolupar un altre estudi histomètric més detallat, utilitzant una lamineta per mostra. Es va comptar el nombre de lesions per animal, el nombre de sublesions, l'àrea total de cada lesió i l'àrea necròtica de cada lesió. Per a aquesta última determinació es va utilitzar la tinció MTC, ja que les àrees necròtiques quedaven tenyides amb un verd pàl·lid fàcil d'identificar, tal i com es pot veure a la Figura 9.

3.5 Càrrega bacil·lar

Les mostres de pulmó, limfonode o melsa es van extreure durant la necròpsia dels animals, es van homogeneïtzar i es van sembrar en plaques d'agar Middlebrook 7H11 (BD diagnostics, Spark, USA). El nombre de CFUs es va comptar després de 28 dies d'incubació a 37°C. Els resultats es van expressar en CFU/ml, i es van graficar com a LOG de CFU/ml.

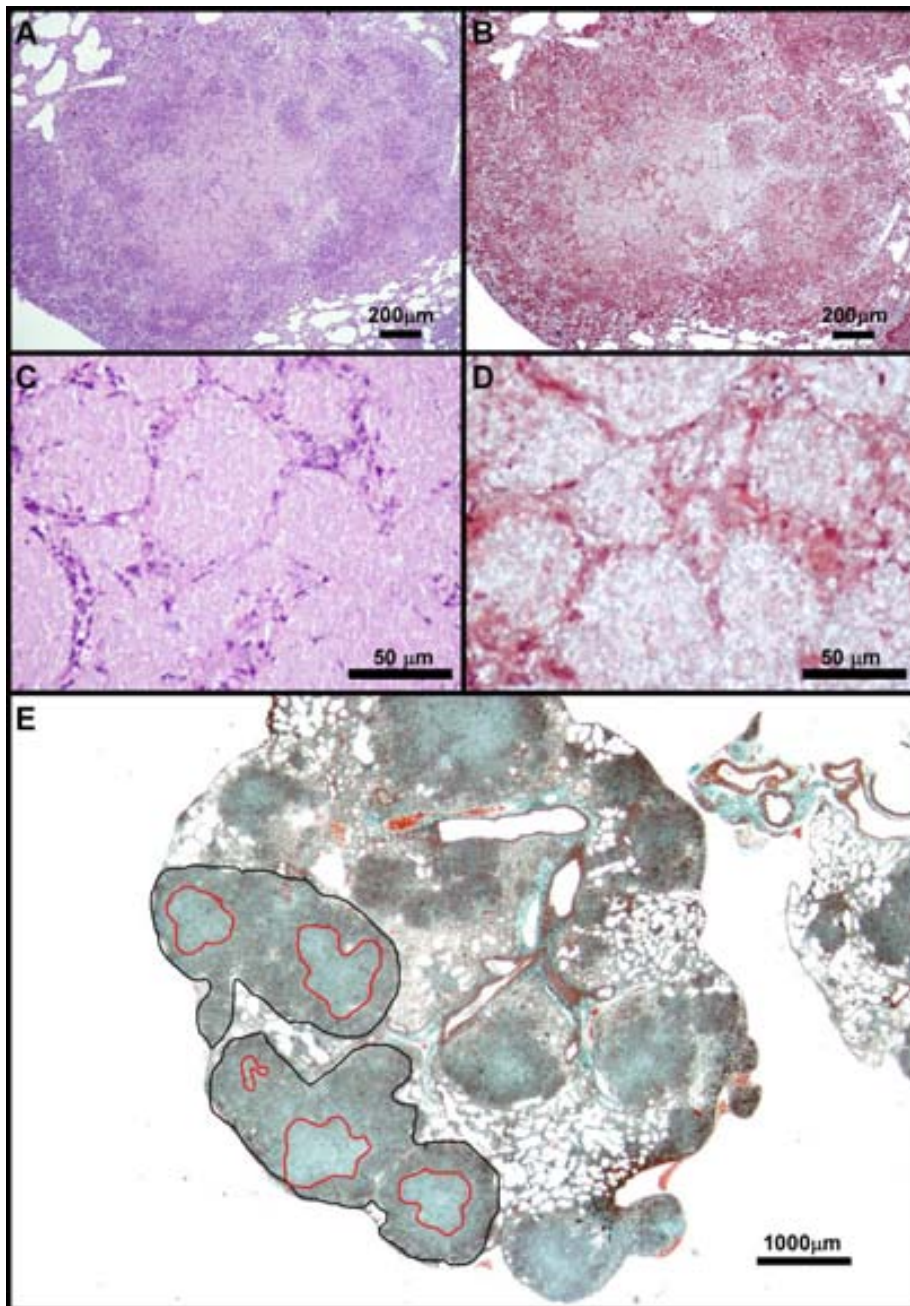


Figura 9: Tècnica histomètrica. Figura publicada a (Marzo et al. 2014). A i C: Tinció H/E. B, D i E: Tinció MTC. Les àrees verdes centrals de les lesions (A i B), corresponen a necrosi caseosa, tal i com es pot veure al detall (C i D). A la imatge E es pot veure com es van seleccionar les àrees de les lesions (línia negra) i les àrees necròtiques dins les lesions (línia vermella).

3.6 Avaluació de la resposta cel·lular específica als estudis 1 i 2

Per analitzar la resposta cel·lular específica es van cultivar 10^6 esplenòcits en plaques de 24 pouets, amb estímul ($10 \mu\text{g/mL}$ de PPD; Statens Serum Institute, Copenhaguen, Dinamarca), o sense, durant 24h, i després es van recollir els sobrenedants per determinar-ne la concentració de 13 citocines i quimiocines (TGF- β ,

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

IL-10, IL-13, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α , CXCL5, CXCL1 and CXCL2) mitjançant Luminex.

Els resultats es van expressar en pg per ml de sobrenedant, i es va considerar la concentració del pouet no estimulat com a "background", pel que es va restar a la concentració del pouet estimulat amb PPD corresponent. L'assaig de Luminex es va fer seguint les instruccions del fabricant (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Es va utilitzar medi complet de cultiu cel·lular (MCC): medi RPMI1640 amb L-glutamina (300mg/L; PAA laboratories GmbH) suplementat amb Serum boví fetal (10%; PAA laboratories GmbH), Penicil·lina (100U/ml), Estreptomicina (100 μ g/ml), piruvat sòdic (1mM; Gibco life-technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) i beta-mercaptoetanol (0,025mM, Gibco life-technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.7 Ambient immunològic al teixit infectat

Els pulmons es van extreure durant la necròpsia i es van congelar immediatament mitjançant nitrogen líquid. Es van emmagatzemar a -80°C fins al seu processament. Es van homogeneïtzar en tampó de lisis (Azida sòdica 0,05%, Triton X-100 0,5%, Cocktail inhibidor de proteases - Sigma-Aldrich Co. SLL, MO, USA - diluït 1:500, tot en tampó PBS).

La concentració de citocines i quimiocines es va determinar mitjançant Luminex, tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior. Per a les dades presentades a l'estudi 2 es va utilitzar tot el paquet pulmonar de cada ratolí. Per les dades corresponents a l'estudi 1, només es va utilitzar el lòbul superior del pulmó dret, i per aquest motiu els resultats es van normalitzar pel contingut total de proteïna. El contingut de proteïna es va quantificar mitjançant un kit d'assaig àcid Bicinconínic (BCA), seguint les instruccions del fabricant (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA).

3.8 Determinació d'eicosanoids

La concentració en sèrum de LTB₄, LXA₄ i PGE₂ es van mesurar mitjançant un kit comercial d'ELISA (LTB₄ i LXA₄: Cusabio Biotech Co. Ltd., Wuhan, Hubei, China; PGE₂: Enzo Life Sciences Int'l, Inc. Plymouth Meeting, PA, USA).

3.9 Avaluació de la resposta reguladora dels limfòcits T

L'avaluació del grau de regulació de la resposta dels limfòcits T es va fer mitjançant l'estudi per citometria de flux del fenotip dels limfòcits T en sang, melsa, limfonodes, pulmons i finalment també en el cultiu d'esplenòcits estimulats amb PPD.

Per la determinació directa en sang, es van extreure 200 μ l de sang en microtubs amb heparina sòdica, per punció de la vena maxil·lar. Es van lisar els eritròcits 10

minuts amb tampó de lisi (2,0594 g/L de Tris; 7,47g/L de clorur d'amoni; en aigua bidestil·lada), i es va fer la tinció amb els anticossos corresponents.

Per la determinació directa a la melsa, limfonodes o pulmons, els òrgans es van disgregar mecànicament amb l'èmbol d'una xeringa i es van filtrar a través d'un separador cel·lular de 40 µm (BD Bioscience, CA, USA) i després es van lisar els eritròcits 8 minuts amb el tampó de lisi que ja s'ha mencionat. El recompte de cèl·lules viables es va fer mitjançant la cambra de Neubauer, i la tinció vital de blau de tripà. Es va fer la tinció d'un milió de cèl·lules per mostra.

Pel que fa als cultius d'esplenòcits, es van plaquejar 10^6 esplenòcits amb PPD (Statens Serum Institute, Kobenhavn, Denmark, 10 µg/mL) o sense, en medi de cultiu MCC en plaques de 24 pouets. Després de 7 dies d'incubació a 37°C i 5% CO₂ es va recuperar tot el contingut de cada pouet per la tinció amb els anticossos corresponents.

3.10 Citometria

Per a l'estudi del fenotip dels limfòcits T es van utilitzar diferents marcadors en cada experiment. Els anticossos utilitzats van ser anti-mouse CD4 FITC, anti-mouse CD25 PE i anti-mouse Foxp3 APC (eBioscience Inc., SD, USA), anti-mouse CD3e BVTM421, anti-mouse CD25-PerCP-CyTM5.5 – (BD biosciences, CA, USA), i anti-mouse CD39 PE (BioLegend Inc., CA, USA).

Per la tinció intracel·lular (Foxp3) es va utilitzar un kit de tinció intracel·lular de Treg (eBioscience Inc., SD, USA) seguint les instruccions del fabricant. Per les tincions de membrana les cèl·lules es van incubar 30 minuts a 4°C amb els anticossos, i seguidament es van fixar amb paraformaldehid al 4% en PBS durant 10 minuts a temperatura ambient. Tot seguit les mostres es van llegir al citòmetre de flux (BD LSRFortessaTM, BD biosciences, CA, USA).

Les dades generades pel citòmetre es van analitzar amb el programa FACSdivaTM software (BD biosciences, CA, USA), tal i com es mostra a la Figura 10 per l'anàlisi de Treg Foxp3+, i a la Figura 11 per l'anàlisi de Treg CD39+. En les mostres de pulmons i cultius d'esplenòcits el marcador de CD3 es fa afegir per identificar les cèl·lules T, ja que les mostres no eren tan nítides com les de sang o esplenòcits frescs, casos en que les limfòcits es van seleccionar fàcilment segons el seu perfil FSC i SSC. Es van analitzar de cada mostra de 1000 a 10000 limfòcits T CD4+.

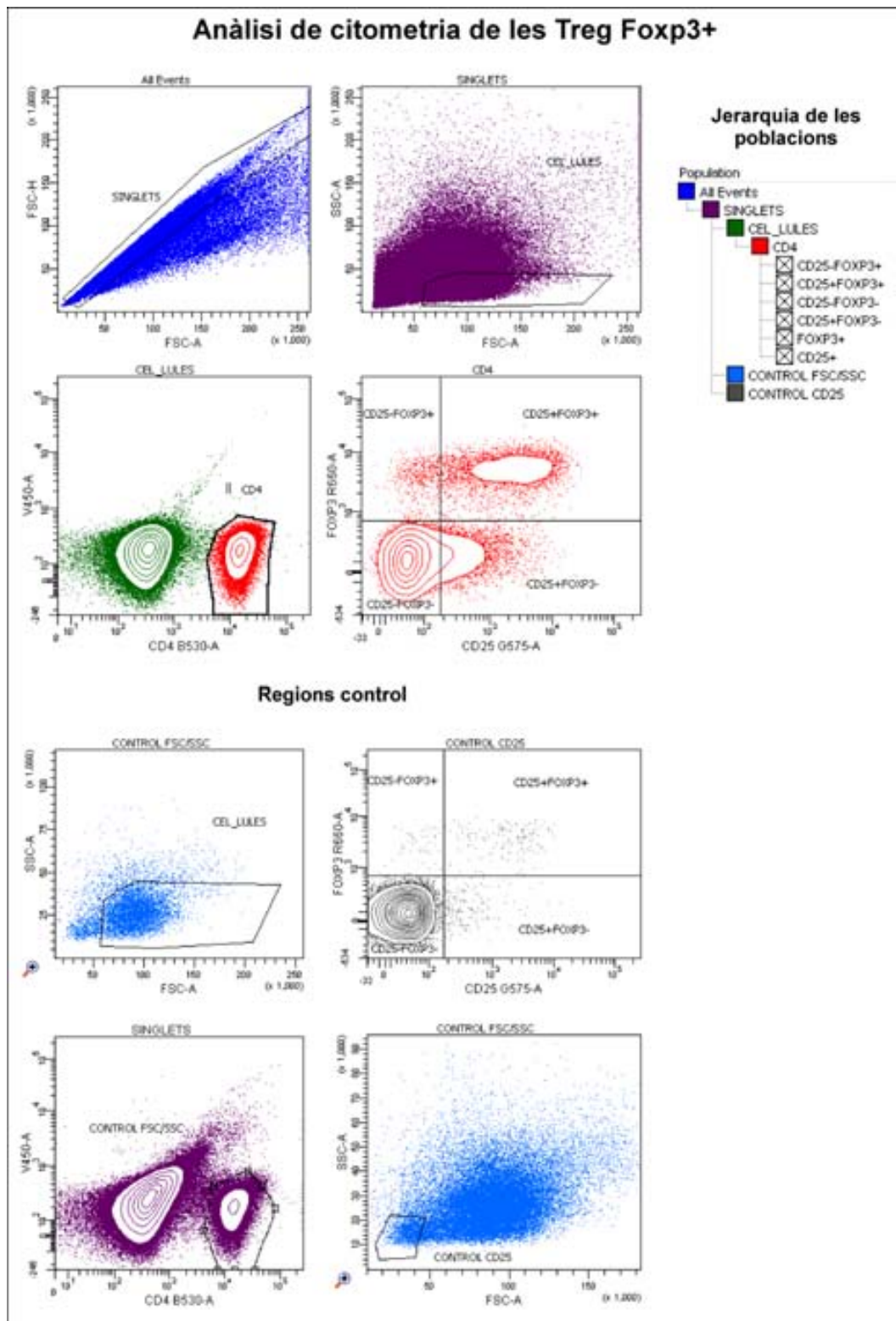


Figura 10: Anàlisi de les Treg Foxp3+ amb el software FACSDiva d'una mostra representativa de melsa. Regions creades per seleccionar les cèl·lules CD4+CD25+Foxp3+, i esquema genealògic de totes les poblacions seleccionades. A la part inferior, regions creades per controlar els resultats. Es va seleccionar una regió de CD4+ entre els singlets, per diferenciar millor les cèl·lules. Es va crear una altra regió de control seleccionant una població coneguda CD25-, per fixar el límit de positivitat del CD25+.

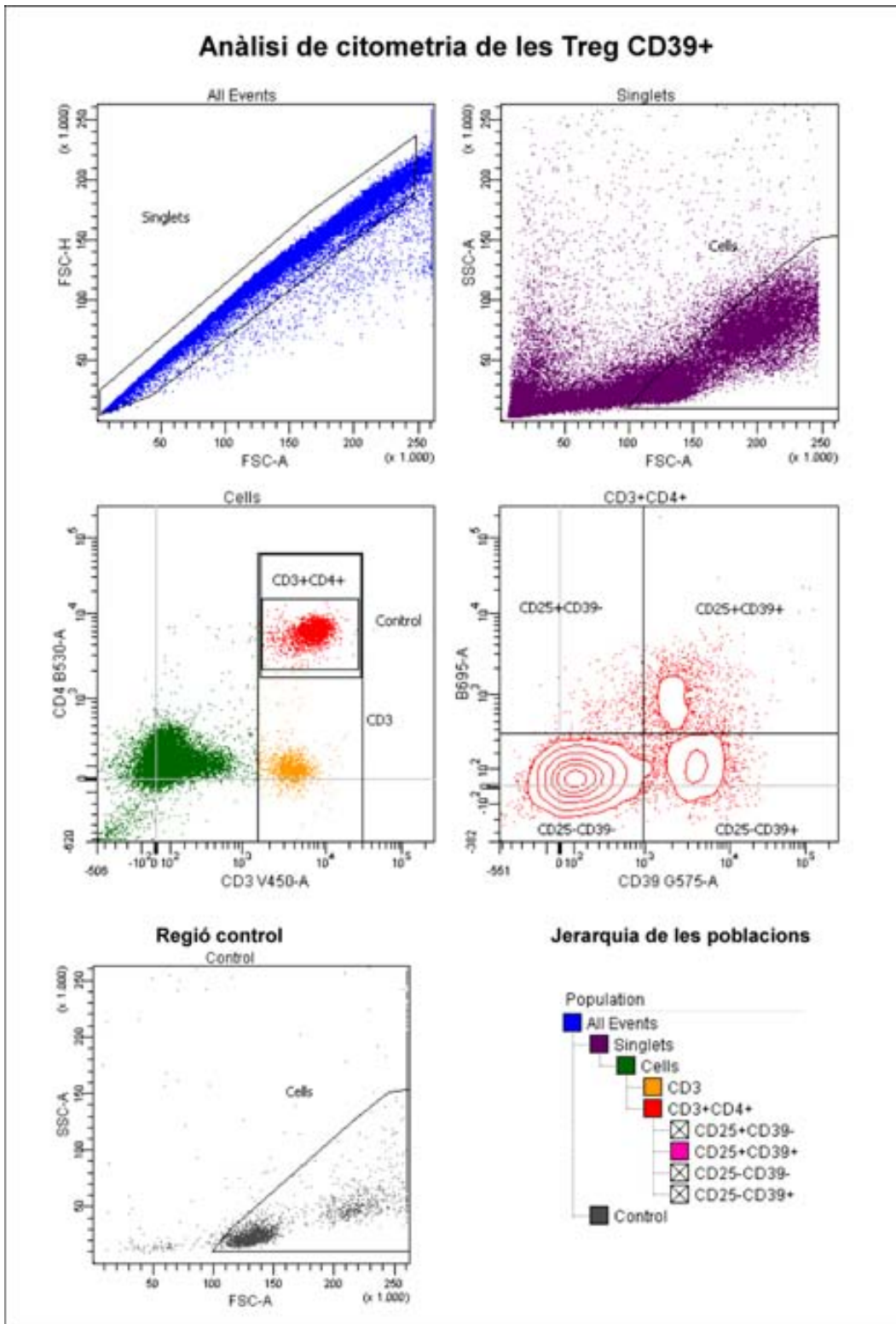


Figura 11: Anàlisi de les Treg CD39+ amb el software FACSDiva en una mostra representativa de melsa. S'han seleccionat les poblacions segons l'esquema genealògic que es mostra. Un cop seleccionades les cèl·lules CD3+CD4+ s'han dividit en 4 poblacions ben distingides, segons la positivitat per CD25 i CD39. Per diferenciar millor les cèl·lules es va seleccionar una regió control de CD3+CD4+ entre els singlets.

3.11 Gràfics i anàlisi estadístic

Els gràfics i l'anàlisi estadístic es van fer utilitzant el programa *GraphPad Prism version 5.00 for Windows*, (GraphPad Software, San Diego Califòrnia USA).

Les diferències es van considerar significatives quan $p < 0,05$ en el test estadístic corresponent.

3.12 Publicació dels resultats.

Els estudis 1 i 2 s'han publicat en dos articles diferents. Aquests resultats s'han publicat per separat perquè davant la rellevància clínica dels resultats sobre l'efecte de l'ibuprofè en la supervivència, la càrrega bacil·lar i la patologia pulmonar, es va creure convenient publicar-los tant aviat com fos possible i en una revista de major impacte, que finalment va ser la revista *Journal of Infectious Diseases*, i s'adjunta a l'annex 1. De manera que la resta de resultats es van publicar posteriorment a la revista *Tuberculosis*, amb la caracterització completa del model i la caracterització immunològica de l'efecte de l'ibuprofè, i s'adjunta a l'annex 2. L'estudi 3 ha donat lloc a la publicació d'una patent internacional (número de sol·licitud: PCT/ES2013/000145, número de publicació: WO2013186409 A1), que s'adjunta a l'annex 3. A més aquest estudi s'espera publicar properament, així que també s'adjunta l'esborrany de l'article a l'annex 4.

4 Estudi 1: Desenvolupament i caracterització d'un model murí de tuberculosi activa

4.1 Evolució de la supervivència

La salut dels animals infectats es va deteriorar greument a partir de la setmana 4. Una setmana més tard la meitat dels ratolins eren morts, i a les 6 setmanes ja només quedaven un 20% dels animals vius. Tot i que es va observar una mínima variació quant al dia exacte en el qual els ratolins començaven a deteriorar-se, probablement a causa de variacions en el pes al moment de la infecció, l'evolució dels animals va ser molt semblant en els 5 experiments diferents, resultant ser un model molt reproducible (Figura 12).

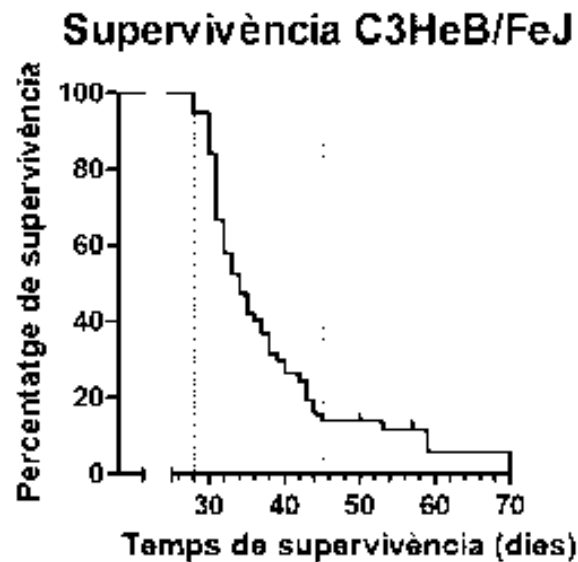


Figura 12: Gràfica de supervivència del model. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). En aquesta gràfica hi ha representats un total de 60 animals (de 5 repeticions diferents). A l'eix de les X s'ha representat el temps de supervivència, en dies, i a l'eix de les Y el percentatge d'animals supervivents (%). Les línies de punts marquen el dia 28, moment en el qual comencen a morir els animals, i el dia 45, moment en què queden vius menys d'un 20% dels animals.

4.2 Evolució de la càrrega bacil·lar

La càrrega bacil·lar als pulmons es va mesurar al llarg del temps. El dia 14 postinfecció hi havia als pulmons una concentració de 5×10^5 CFU/mL aproximadament, que va augmentar al llarg del temps fins arribar a un valor d'uns 5×10^8 CFU/ml el dia 28 postinfecció, i va romandre a aquest nivell fins al dia 34, en els pocs animals que van sobreviure 34 dies (Figura 13).

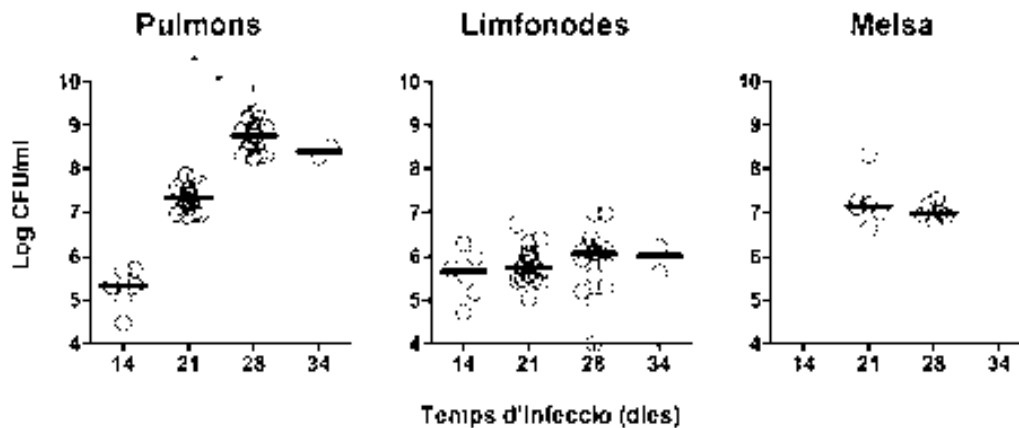


Figura 13: Evolució de la càrrega bacil·lar. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). En aquesta figura trobem representada la càrrega bacil·lar (eix Y, en Log CFU/ml) als pulmons, limfonodes hiliars i melsa, a diferents temps d'infecció (eix X, en dies). * $p < 0,05$, T test. Cada cercle representa un animal. Les dades de pulmons i limfonodes pertanyen a 3 experiments diferents. Les dades de melsa corresponen a un sol experiment.

4.3 Origen i evolució de les lesions

El dia 21 postinfecció es podien observar petites lesions d'uns 0,5 mm als pulmons. Una setmana més tard, les lesions havien incrementat en nombre i mida: el dia 28 feien entre 1 i 2 mm i entre el dia 31 i 33 ja havien arribat a una mida d'entre 5 i 12 mm. En aquest punt, el teixit pulmonar ja quedava extensament ocupat per les lesions (Figura 14A, B i C).

Els estudis d'histometria van mostrar que la mida individual dels granulomes incrementava exponencialment amb el temps (equació de creixement exponencial; $r^2 = 0,9023$, $p < 0,01$) (Figura 14D). El nombre de granulomes també incrementava fins al dia 28, però curiosament, després decreixia fins al dia 30 (Figura 14E). Es va observar que les lesions molt grans (que es van anomenar superlesions) semblaven estar dividides en sublesions, com si diverses lesions properes, en créixer, s'haguessin ajuntat, formant-ne una de sola molt més gran (Figura 14G). Aquesta coalescència de les lesions explicaria la disminució del nombre de lesions a partir del dia 28. Un cop feta aquesta observació, es va fer un recompte del nombre de sublesions de cada lesió i es va observar que incrementava des del dia 28 ($p < 0,05$, one-way ANOVA) fins als dies 30-33 (Figura 14F), confirmant doncs que les lesions comencen la coalescència el dia 28.

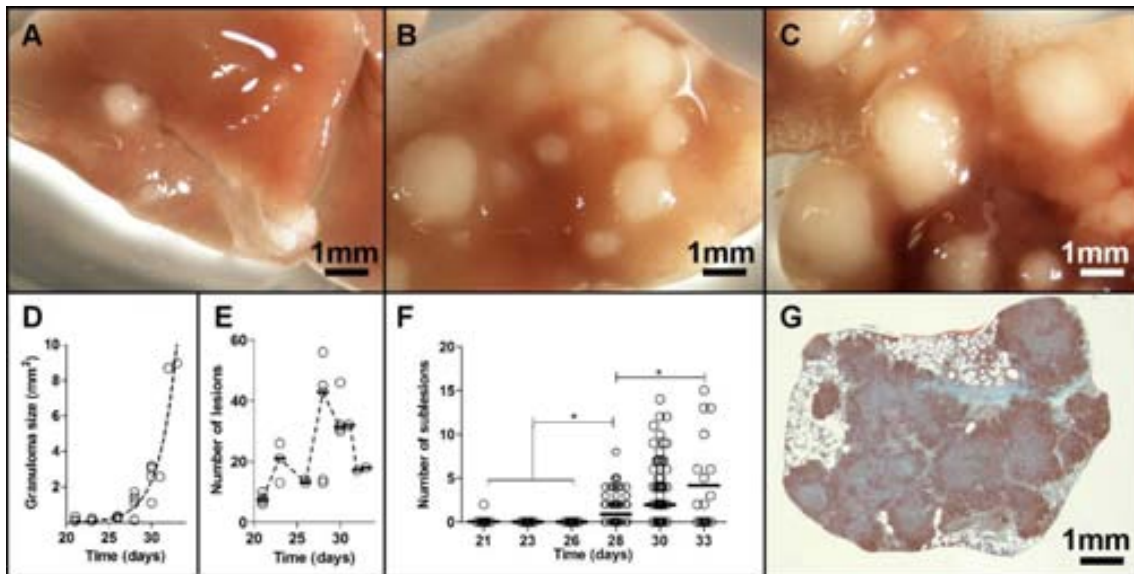


Figura 14: Evolució macroscòpica de les lesions en el ratolí C3HeB/FeJ. Figura publicada a (Marzo et al. 2014). Imatges macroscòpiques dels pulmons a dia 21 (A), 28 (B) i 31 (C) postinfecció. D: Evolució de la mida dels granulomes en funció del temps. Cada cercle representa la mitjana de la mida dels granulomes en un animal. La corba de regressió està representada com una línia discontinua (funció de creixement exponencial; $r^2 = 0,9023$, $p < 0,01$). E: Evolució del nombre de lesions amb el temps. Cada cercle representa un animal. La línia discontinua uneix les medianes de diferents animals a cada punt de temps postinfecció. F: Nombre de sublesions a cada punt de temps. Cada cercle representa una lesió (superlesió). Les línies representen les mitjanes. Cada asterisc indica significació estadística (T-test, $p < 0,05$). G: Tinció de MTC que mostra com les lesions originals, petites, estan coalescent en superlesions molt més grans.

4.4 Necrosi caseosa i liqüefacció

Els estudis histopatològics (Figura 15) van mostrar que les primeres lesions apareixien entre els dies 21 i 23 postinfecció. Aquestes lesions eren petites i consistien en infiltració intraalveolar, principalment neutròfils envoltant macròfags escumosos (Figura 15A i B). Conforme la lesió creixia, els granulomes presentaven dues àrees diferenciades: un anell extern basofílic, consistent en infiltració neutrofílica i estructures que semblaven “Neutrophil extracellular traps” (NETs) (Figura 15D), i una àrea central més clara que contenia neutròfils necròtics. Aquesta àrea central va evolucionar cap a una destrucció cel·lular progressiva (Figura 15E), quedant al final un producte uniforme i acel·lular (Figura 15F) on inicialment les parets alveolars es conservaven (necrosi caseosa) (Figura 15G), per acabar destruint-se (necrosi liqüefactiva). Hi havia bacils agregats tant a les regions neutrofíliques com a les regions acel·lulars (Figura 15H i I), fet que podria indicar un creixement extracel·lular.

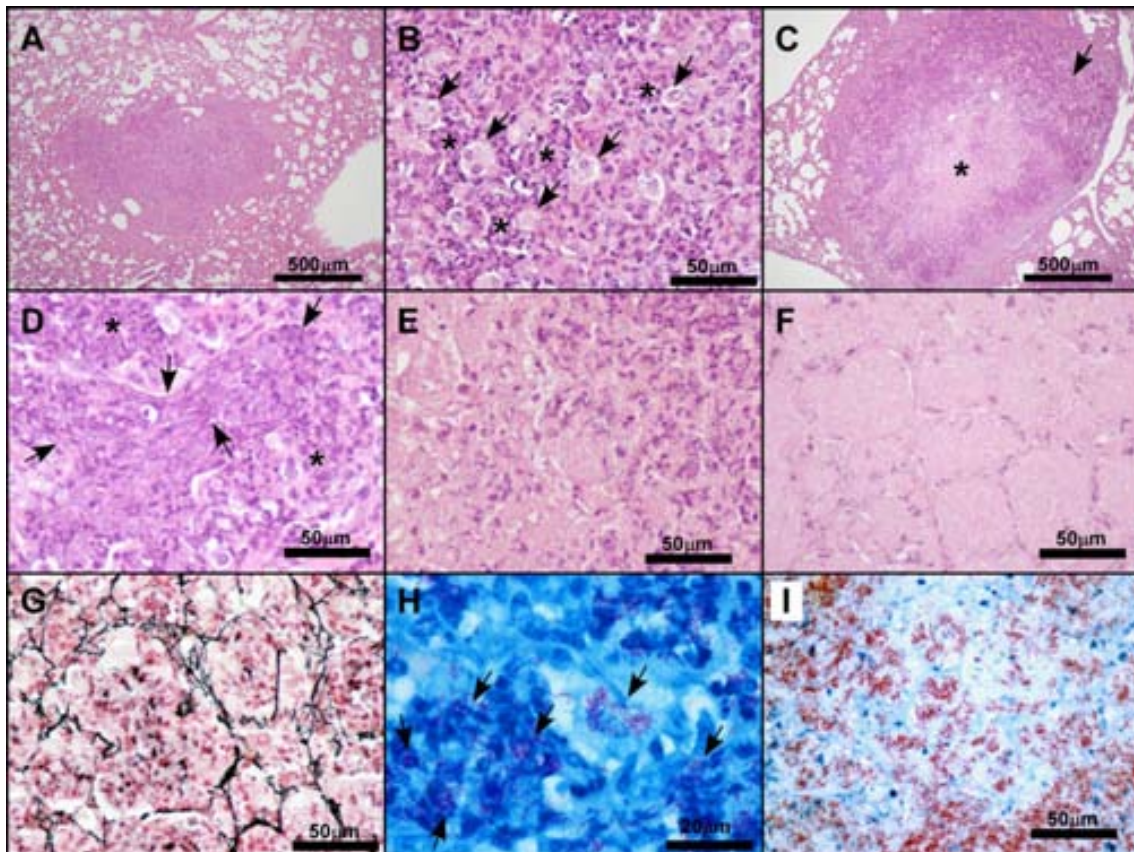


Figura 15: Evolució microscòpica de les lesions en el model amb C3HeB/FeJ. Figura publicada a (Marzo et al. 2014). Totes les fotos corresponen a talls de pulmó. Els panells A-F mostren talls amb tinció d'H/E. A: Lesió al dia 21 postinfecció. B: Infiltració intraalveolar que consisteix principalment en neutròfils (asteriscs), sovint envoltant macròfags escumosos (fletxes). C: Dia 28, lesió més evolucionada, on es distingeix infiltració cel·lular (fletxa) a la perifèria i al centre, una regió menys basofílica (asterisc). D: Necrosi (asterisc) i estructures amb aparença de NETs (fletxes) el dia 21. E: Desaparició progressiva dels nuclis necròtics i les estructures cel·lulars. F: Producte homogeni i acel·lular a l'espai alveolar. G: Estroma alveolar conservat dins les regions necròtiques (Tinció de reticulina). H: Presència de bacils (fletxes) a les regions neutrofil·liques i dins els macròfags alveolars (Tinció Ziehl-Neelsen). I: Presència massiva de bacils a les regions necrotitzades, on ara ja no es distingeixen nuclis, indicant un creixement extracel·lular (Ziehl-Neelsen).

La regió necròtica central va aparèixer al voltant del dia 28 postinfecció, i la seva àrea en proporció a l'àrea total de cada lesió va incrementar amb el temps (Figura 16A). Tot i així es va observar que hi havia una àrea mínima del granuloma ($0,15\text{mm}^2$) per tal que presentés la regió central necròtica, i d'altra banda a partir d'una certa mida (3mm^2) tots els granulomes presentaven l'àrea central necròtica (Figura 16C). Fruit d'aquesta observació es va calcular la correlació entre la mida de la lesió i la proporció de lesió necrosada. Es va trobar una correlació positiva estadísticament significativa (r de spearman = 0.7945, $p < 0.0001$). A la Figura 16B es mostra aquesta relació, així com la regressió lineal entre aquests dos paràmetres ($r^2 = 0.3047$, $p < 0.0001$).

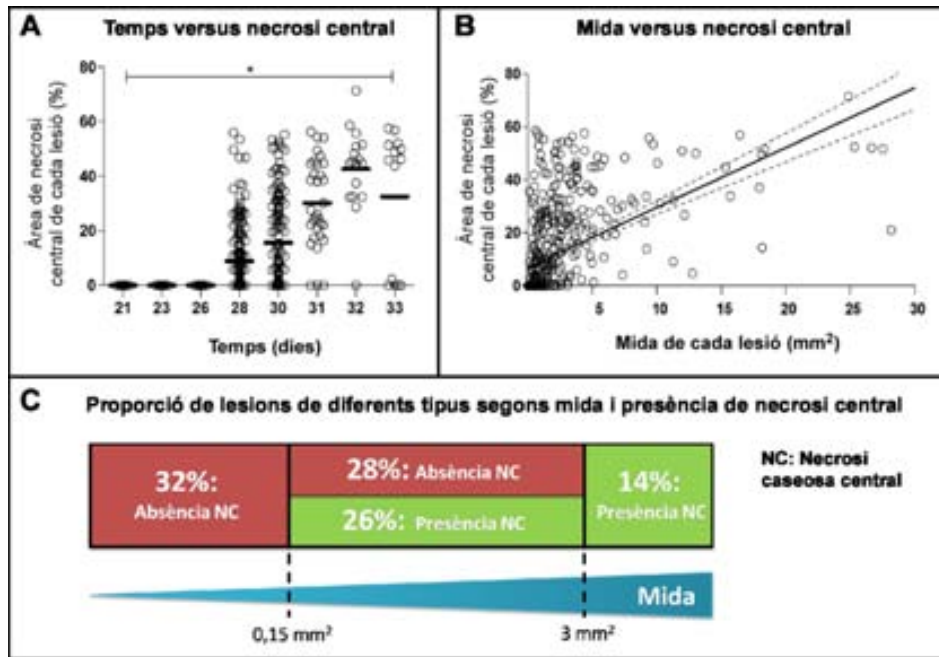


Figura 16: Necrosi central a les lesions dels ratolins C3HeB/FeJ. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). Cada cercle representa una lesió. A: Temps versus necrosi central. Les línies són mitjanes. L'asterisc indica que l'increment és estadísticament significatiu (ANOVA de 1 via) des dels dies 21,22,23 o 26 fins als dies 28,30,31,32 i 33 ($p < 0,0001$), des del dia 28 fins als dies 30,31,32 i 33 ($p < 0,05$), des del dia 30 al 31 ($p < 0,05$) i del dia 31 al 32 ($p < 0,0001$). B: Mida versus necrosi central. La línia continua representa la regressió lineal ($r^2 = 0,3047$, $p < 0,0001$), i l'error està representat amb línies discontinues (95% d'interval de confiança). C: Classificació de les lesions segons la mida i la presència de necrosi central. El percentatge de lesions pertanyents a cada grup està indicat a cada requadre. Dades de 18 animals en total.

4.5 Caracterització de la resposta immunològica local i sistèmica

La resposta immunològica es va mesurar a nivell local (ambient citocínic al pulmó) i a nivell sistèmic (cultiu d'esplenòcits estimulats amb PPD). Es van trobar diferències molt rellevants entre aquestes dues respostes.

A nivell local, les citocines i quimiocines inflammatòries, en especial TNF- α , CXCL2 (MIP-2), CXCL1 (KC) i IL-17 van incrementar de forma significativa amb el temps (de setmana 3 a setmana 4 postinfecció) ($p < 0,05$, Student's t-test). També IL-6 i CXCL5 (LIX) van incrementar, però no de forma significativa. En canvi, a nivell sistèmic hi va haver una disminució amb el temps de les quimiocines inflammatòries CXCL2 i CXCL1, així com d'IFN- γ ($p < 0,05$, Student's t-test) (Figura 17).

Les concentracions de totes les citocines i quimiocines a cada punt temporal es presenten a la Taula 3.

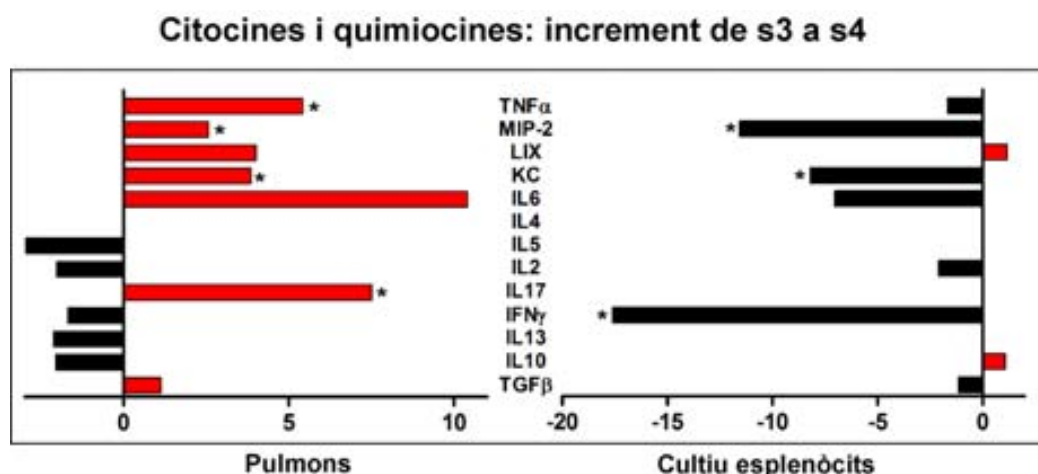


Figura 17: Comparativa del perfil citoquínic a nivell local i sistèmic en el ratolí C3HeB/FeJ. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). Concentració de citocines o quimiocines als pulmons (esquerra) o al sobrenedant dels cultius d'esplenòcits PPD-específics (dreta), expressada com a ràtio del nivell a la setmana 4 postinfecció, respecte el nivell a la setmana 3 postinfecció. Les barres representen l'increment (en vermell) o la disminució (en negre) de la concentració de citocines. Els canvis estadísticament significatius estan marcats amb un asterisc ($p < 0,05$, t-test). $n = 6$ ratolins/grup/timepoint.

Taula 3: Concentració de citocines i quimiocines al pulmó homogenitzat i al esplenòcits estimulats amb PPD, a les setmanes 3 i 4 postinfecció. Taula adaptada de (Marzo et al. 2014).

	Mitjana \pm SD (pg de citocina/mg de proteïna)			
	Pulmons setmana 3	Pulmons setmana 4	Esplenòcits setmana 3	Esplenòcits setmana 4
TGF- β	336,94 \pm 168,19	381,86 \pm 128,31	193,40 \pm 239,97	168,50 \pm 155,04
IL-10	2,07 \pm 1,10	1,01 \pm 0,29	268,09 \pm 168,13	284,41 \pm 152,09
IL-13	25,34 \pm 6,84	11,97 \pm 5,77	BDL*	BDL*
IFN γ	4,86 \pm 2,03	2,87 \pm 0,35	3422,37 \pm 3457,36	194,55 \pm 207,28
IL-17	1,46 \pm 0,90	10,95 \pm 5,23	BDL*	BDL*
IL-2	4,34 \pm 0,67	2,13 \pm 1,59	5,06 \pm 3,67	2,43 \pm 3,76
IL-5	1,20 \pm ,79	0,41 \pm 0,18	BDL*	BDL*
IL-4	BDL*	BDL*	BDL*	BDL*
IL-6	35,74 \pm 21,84	371,67 \pm 103,85	498,36 \pm 475,62	70,83 \pm 52,90
CXCL1	240,91 \pm 118,63	929,82 \pm 91,72	129,42 \pm 76,49	15,80 \pm 12,27
CXCL5	44,00 \pm 32,61	175,66 \pm 11,39	13,46 \pm 17,58	15,69 \pm 24,35
CXCL2	280,41 \pm 152,88	720,00 \pm 0,00	1287,92 \pm 591,22	111,52 \pm 173,32
TNF- α	5,48 \pm 2,43	29,66 \pm 5,96	39,88 \pm 22,50	24,00 \pm 17,26

*BDL: per sota el llindar de detecció. $n = 6$ animals/grup/timepoint

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

També es van determinar els nivells sèrics dels eicosanoids LTB₄, LXA₄ i PGE₂. El LTB₄, de caràcter proinflamatori, va disminuir amb el temps, mostrant una correlació negativa (r de Spearman = 0,4594, $p < 0,001$) mentre que la LXA₄, antiinflamatòria, va incrementar (r de Spearman = 0,7285, $p < 0,0001$) (Figura 18) i va correlacionar positivament amb el nombre de lesions (r de Spearman = 0,5673, $p < 0,01$), tal i com es mostra a la Figura 18. Els nivells sèrics de PGE₂ eren tan elevats que van quedar per sobre el nivell de detecció de la tècnica.

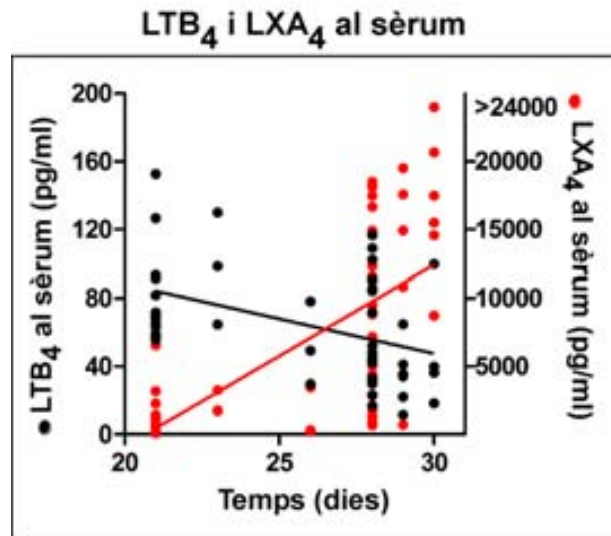


Figura 18: Perfil inflamatori al sèrum en el ratolí C3HeB/FeJ. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). Cada punt representa un animal. En vermell els nivells de LXA₄ (eix Y dret) i en negre els nivells de LTB₄ (eix Y esquerre), en pg/ml. A l'eix de les X el temps en dies. Les línies representen la regressió lineal del temps amb els nivells de LXA₄ (en vermell, $r^2 = 0,4553$, $p < 0,0001$) o amb LTB₄ (en negre, $r^2 = 0,1942$, $p < 0,001$).

5 Estudi 2: El paper de la inflamació en la tuberculosi activa

5.1 Estudi comparatiu entre les soques C3HeB/FeJ i C3H/HeN

5.1.1 Supervivència i càrrega bacil·lar

Els ratolins de la soca C3H/HeN van sobreviure almenys 43 dies d'infecció, mentre que la corba de supervivència dels C3HeB/FeJ disminuïa abruptament entre els dies 28 i 35, com ja s'ha vist a l'estudi 1. La càrrega bacil·lar també va ser molt inferior en els ratolins C3H/HeN respecte als C3HeB/FeJ, a tots els temps estudiats (Figura 19).

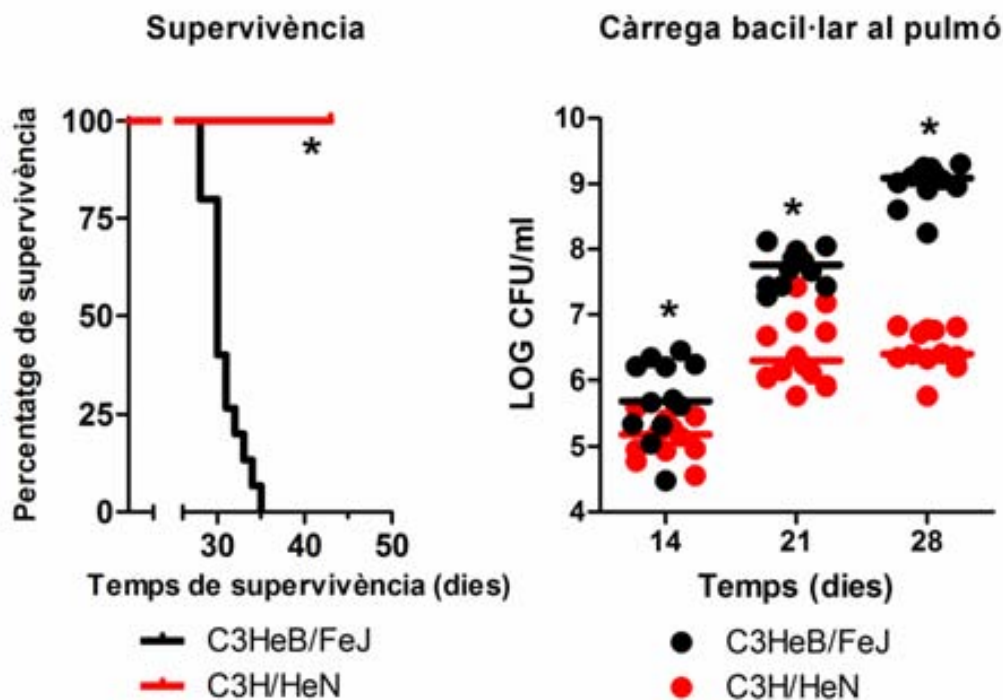


Figura 19: Supervivència i Càrrega bacil·lar a pulmó del C3H/HeN. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). A l'esquerra hi ha representades les corbes de supervivència del C3HeB/FeJ (en negre) i del C3H/HeN (en vermell). $n=12$ animals/grup. La diferència entre les dues corbes és estadísticament significativa ($*p<0,05$, Mantel-Cox Test). A la dreta hi ha la càrrega bacil·lar al pulmó dels ratolins C3HeB/FeJ (negre) i els ratolins C3H/HeN (vermell). Cada bola representa un ratolí. Les dades pertanyen a 2 experiments. Les línies indiquen les medianes. A tots els temps postinfecció, la diferència és estadísticament significativa ($*p<0,05$, T-test).

5.1.2 Estudi histopatològic i histomètric

Als 28 dies postinfecció els pulmons dels ratolins C3HeB/FeJ estaven severament afectats, plens de lesions dures, grans i compactes (Figura 20A) mentre que els ratolins C3H/HeN presentaven una afectació mínima (Figura 20B). La histometria va confirmar aquesta diferència entre els dos grups (Figura 21).

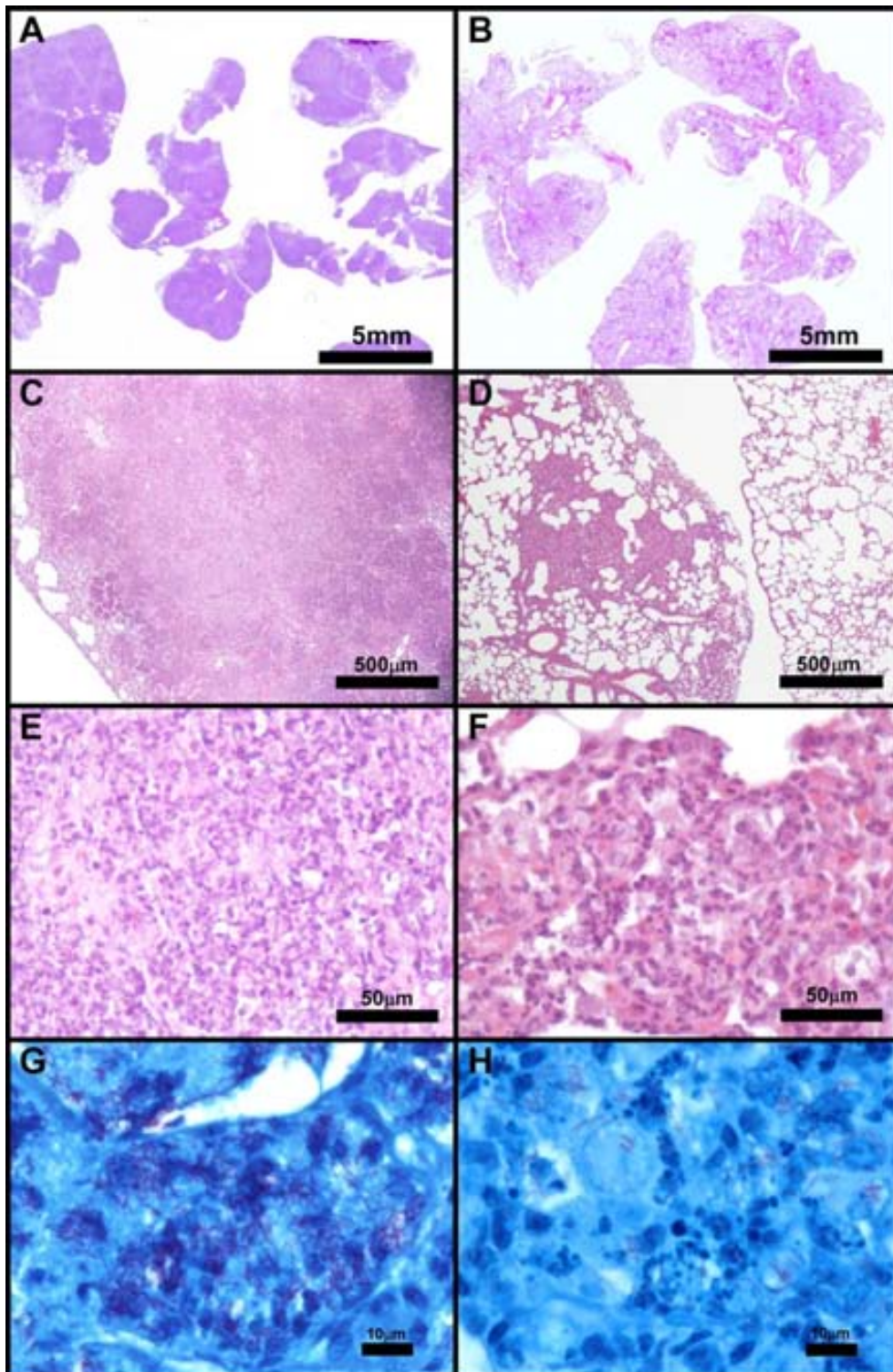


Figura 20: Histopatologia comparada dels ratolins C3HeB/FeJ i C3H/HeN. Figura publicada a (Marzo et al. 2014). Talls histològics amb tinció d., H/E. Fotos macroscòpiques: pulmons de ratolí C3HeB/FeJ (A) i C3H/HeN (B) del dia 28 postinfecció. Fotos microscòpiques: lesions del C3HeB/FeJ (C) i del C3H/HeN (D) del dia 28 postinfecció. Necrosi dels neutròfils a una lesió del C3HeB/FeJ (E) i predominança d'apoptosi en una lesió del C3H/HeN (F) del dia 28. Talls histològics amb tinció de Ziehl-Neelsen: Detritus cel·lulars necrosats que contenen gran quantitat de bacils extracel·lulars, segurament en creixement (G) i zona amb apoptosi i molt pocs bacils, segurament intracel·lulars (H).

Els percentatges d'àrea afectada respecte l'àrea total del pulmó (mitjana i desviació estàndard) van ser el següents: dia 21 postinfecció C3HeB/FeJ $22,33 \pm 4,81\%$, C3H/HeN $1,17 \pm 1,13\%$, t-test, $p < 0,0005$; dia 28 postinfecció C3HeB/FeJ $79,85\% \pm 10,44\%$, C3H/HeN $4,44 \pm 1,49\%$, t-test, $p < 0,0005$.

Contràriament als ratolins C3HeB/FeJ, els C3H/HeN, no van presentar necrosi a la regió central de les lesions (Figura 20C i Figura 20D). L'anàlisi histomètric va confirmar que cap lesió presentava regió necròtica central al grup C3H/HeN, ni tampoc coalescència. Pel que fa a la mida de les lesions, la histometria també va demostrar una diferència estadísticament significativa entre el grup C3HeB/FeJ, amb lesions més grans, i el grup C3H/HeN (Figura 21). Tot i que tots dos grups van presentar infiltració neutrofílica, en l'anàlisi histopatològic es van observar diferències qualitatives quant a la mort cel·lular dels neutròfils. Mentre que en la soca C3H/HeN va predominar l'apoptosi dels neutròfils, amb poca presència de bacils (Figura 20F i Figura 20H), a la soca de C3HeB/FeJ va predominar la necrosi dels neutròfils, amb un gran nombre de bacils envoltant-los (Figura 20E i Figura 20G).

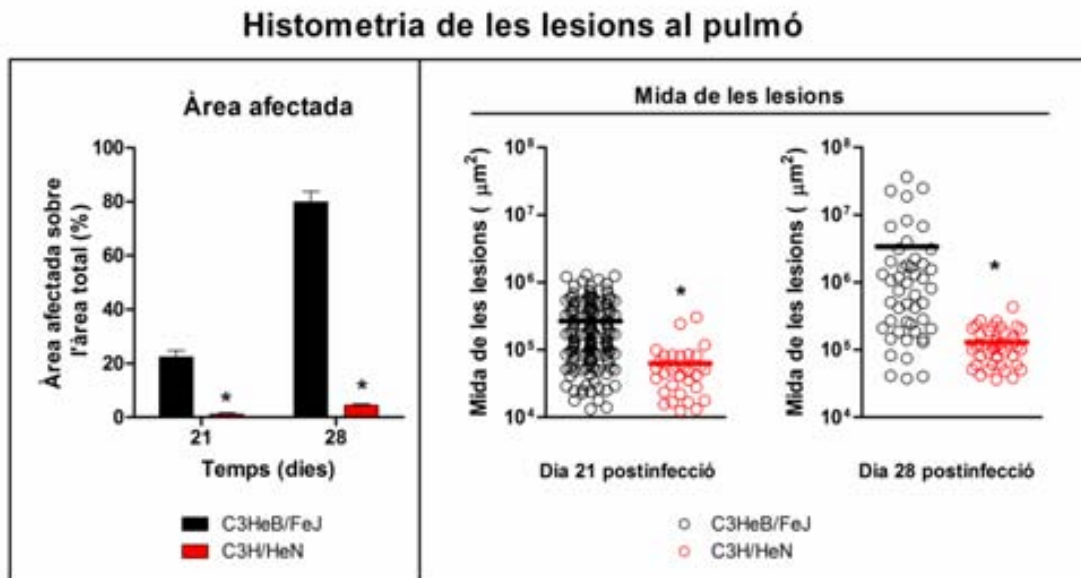


Figura 21: Comparació de la histometria de la soca C3H/HeN amb la C3HeB/FeJ. Figura modificada de (Benito 2013). Esquerra: A l'eix de les Y percentatge de l'àrea afectada sobre l'àrea total del pulmó. A l'eix de les X el temps postinfecció, en dies. Les barres negres mostren la mitjana corresponent al grup C3HeB/FeJ, i les vermelles al C3H/HeN, i les barres d'error indiquen el SEM. $n=6$ ratolins/grup/timepoint. Dreta: Mida de l'àrea de les lesions, en μm^2 . Cada cercle representa una lesió, en negre les corresponents a la soca C3HeB/FeJ, i en vermell les corresponents a la soca C3H/HeN. Les línies respresenten la mitjana de cada grup. Les diferències entre els dos grups són estadísticament significatives per a tots els paràmetres presentats ($*p < 0,05$, t-test).

5.2 Efecte dels fàrmacs antiinflamatoris en el desenvolupament de tuberculosi activa en el model murí

5.2.1 Efecte sobre la supervivència i la càrrega bacil·lar

En un primer moment la hipòtesi de la tesi consistia en que un desequilibri entre les forces de reparació del teixit (fibrosi i TGF- β) i les forces de destrucció del teixit (fibrinòlisi, metaloproteases) portaven a la líquefacció de les lesions, tal i com es dona en l'abscessificació, on la coagulasa secretada per *S.aureus* promou la formació del coàgul facilitant-ne el procés. Així doncs, inicialment es va avaluar l'efecte de la doxiciclina (inhibidora de les MMP) i l'heparina (anticoagulant) sobre la supervivència dels animals infectats. La doxiciclina no va tenir cap efecte sobre la supervivència. En canvi l'heparina sí que va incrementar la supervivència dels animals (Log-rank test, Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $p < 0,05$) (Figura 22).

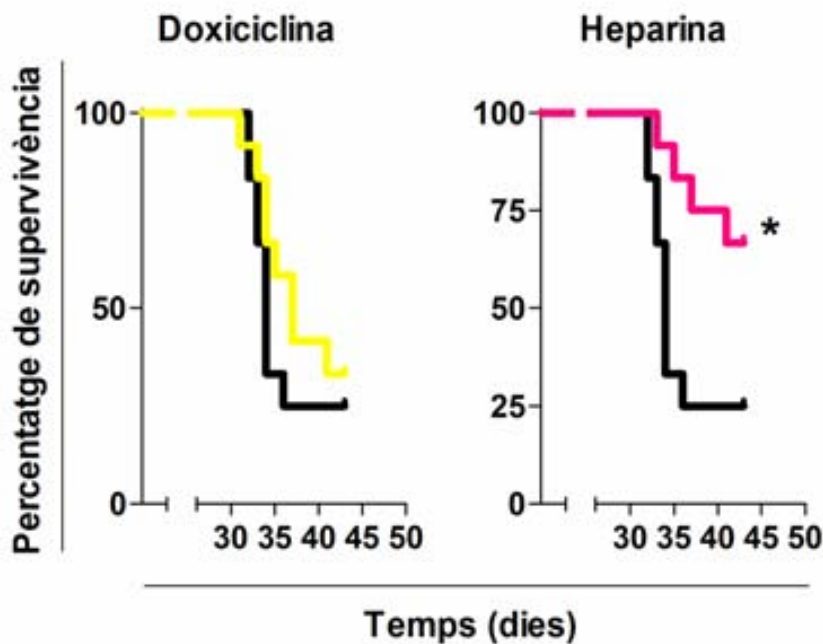


Figura 22: Efecte de la doxiciclina i l'heparina sobre la supervivència. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014). Les línies de colors representen la corba de supervivència del tractament indicat, i les negres la del control no tractat. Les diferències entre controls i tractats són estadísticament significatives en el cas de l'heparina (* $p < 0,05$. Prova de Mantel-Cox). $n = 12$ animals/grup.

Davant la possibilitat que l'efecte de l'heparina fos degut a les seves propietats antiinflamatòries i no pas a les propietats anticoagulants, es van avaluar els tractaments amb ibuprofè i AAS, i el resultat obtingut va ser el mateix: van incrementar la supervivència dels animals (Log-rank test, Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $p < 0,05$) (Figura 23).

Pel que fa a la càrrega bacil·lar al pulmó, l'àcid acetilsalicílic (AAS) va incrementar-ne lleugerament el valor el dia 14 postinfecció, però a partir del dia 21 va reduir la

càrrega bacil·lar respecte el control ($p < 0,01$, t-test). L'efecte de l'ibuprofè administrat el dia 21 postinfecció també es va traduir en una reducció de la càrrega bacil·lar a dia 28 ($p < 0,0001$, t-test) (Figura 23).

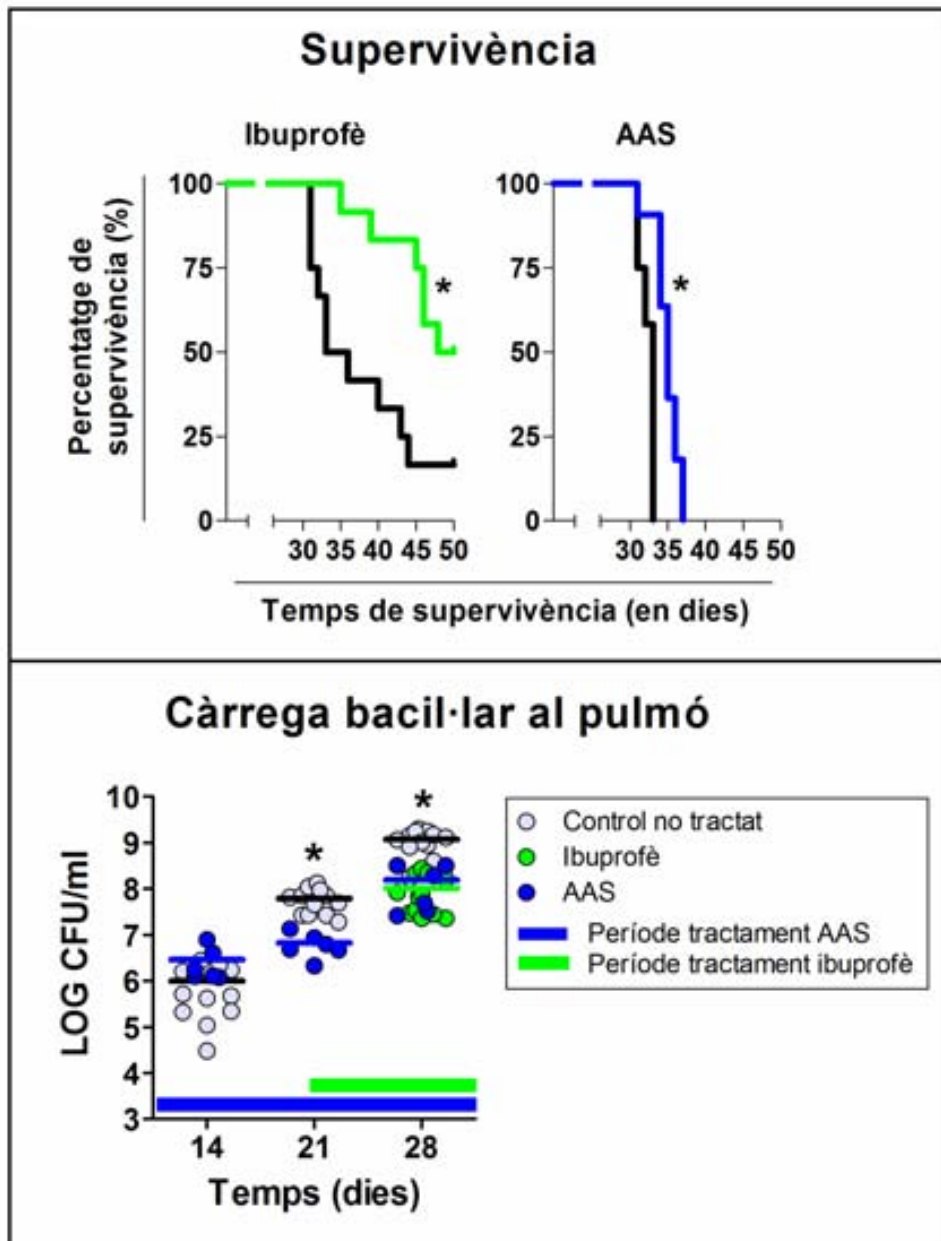


Figura 23: Efecte dels AINEs en la supervivència i la càrrega bacil·lar. Figura adaptada de (Marzo et al. 2014) i (Vilaplana et al. 2013). Al requadre superior, supervivència. Les línies de colors representen la corba de supervivència del tractament indicat, i les negres la del control no tractat (n=12 animals/grup). Les diferències entre controls i tractats són estadísticament significatives en els dos casos ($*p < 0,05$. Prova de Mantel-Cox). Al requadre inferior, càrrega bacil·lar al pulmó. Cada cercle representa un animal, i les línies són medianes. Les barres de color blau (AAS) i verd (ibuprofè) representen el període en el qual s'ha administrat el medicament.

5.2.2 Histopatologia i histometria

L'anàlisi histopatològic i histomètric es va realitzar per al tractament amb ibuprofè, però no per al tractament amb AAS ni la resta de tractaments. En l'observació directa ja es va detectar clarament una afectació menor en els animals tractats (Figura 24 A i B) així com en les laminetes tenyides amb H/E (C i D).

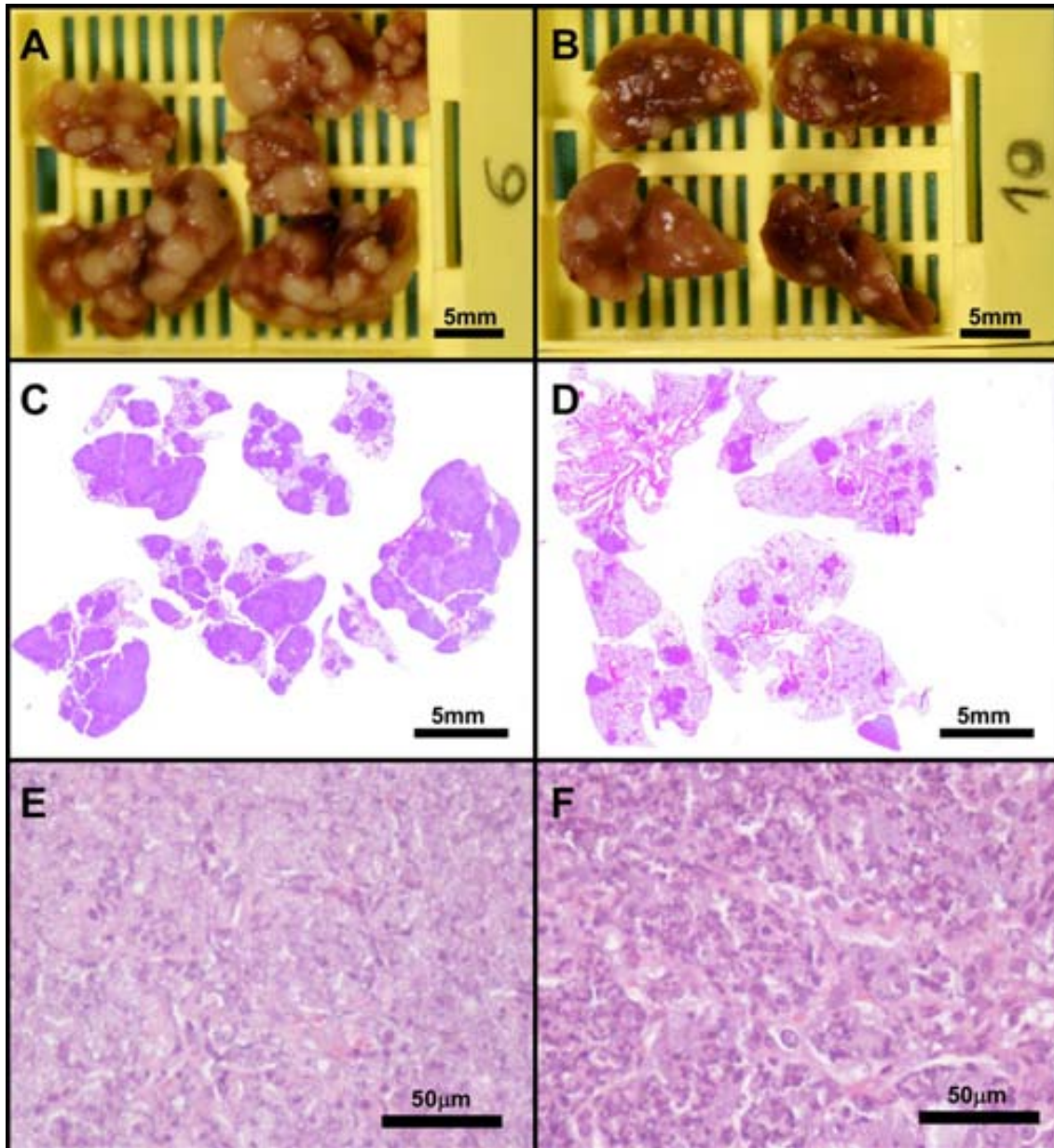


Figura 24: Efecte de l'ibuprofè en la histopatologia. Figura publicada a (Vilaplana et al. 2013). Imatges macroscòpiques i microscòpiques que mostren les diferències entre el grup control (A, C i E) i el grup tractat amb ibuprofè (B, D i F), del dia 28 postinfecció. A i B, pulmons amb lesions blanques arrodonides. C i D, talls histològics de pulmons tenyits amb H/E. Les lesions es tenyeixen en color més fosc (blau/morat). Els animals tractats (B i D) van mostrar menys lesions i més petites que els no tractats (A i C). E i F, detall de la regió central d'una lesió característica de cada grup. En el control (E), es veu una massa amorfa que ocupa l'espai alveolar, mentre que en el tractat (F) es veuen principalment neutròfils, sobretot apoptòtics, però fins i tot algun que sembla viu.

Histometria de les lesions al pulmó (dia 28 postinfecció)

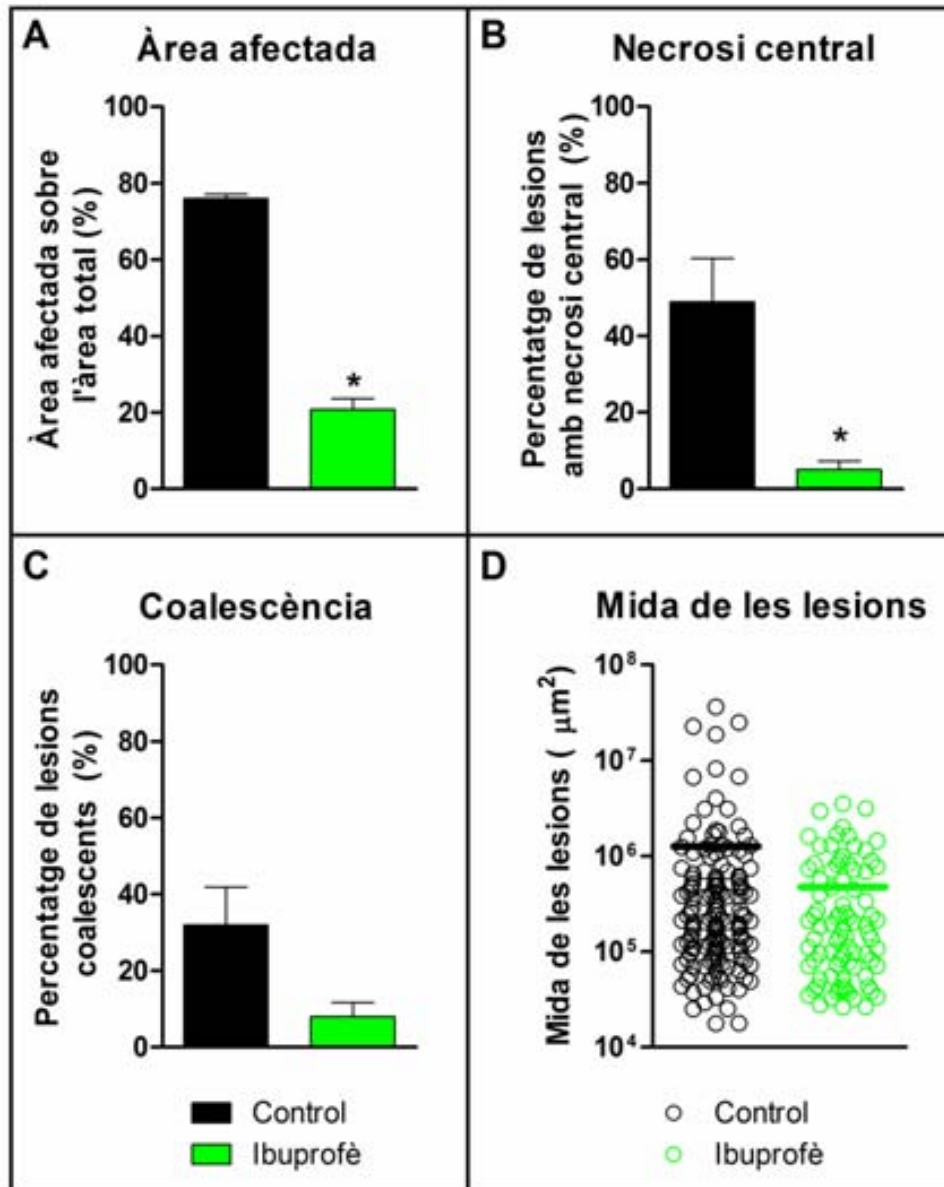


Figura 25: Histometria de l'efecte de l'ibuprofè en la patologia pulmonar a dia 28 postinfecció.

Figura modificada de (Vilaplana et al. 2013) i (Benito 2013). Les barres indiquen la mitjana de l'àrea afectada respecte l'àrea total del pulmó (A), el percentatge de lesions amb necrosi central (B) o el percentatge de lesions coalescents (C), i les barres d'error indiquen el SEM. Cada cercle representa una lesió, i la línia horitzontal representa la mitjana de cada grup (D). Les diferències entre els dos grups són estadísticament significatives en els casos indicats amb un asterisc (* $p < 0,05$, t-test). $n = 6$ animals/grup.

De totes maneres es va confirmar mitjançant l'exercici d'histometria. El percentatge de l'àrea afectada sobre l'àrea total del pulmó dels animals tractats amb ibuprofè va ser de $20,78 \pm 7,94\%$ (mitjana \pm SD) el dia 28, molt menor que la que s'havia mesurat en el control (apartat 5.1.2, control $79,85 \pm 10,44\%$), tal i com es mostra a la Figura 25 A. A més, el percentatge de lesions que presentaven necrosi central també va

disminuir de forma estadísticament significativa amb el tractament amb ibuprofè (Figura 25 B). El percentatge de lesions que presentaven coalescència i la mitjana de la mida individual de les lesions també va ser menor amb l'ibuprofè, però no de forma estadísticament significativa (Figura 25 C i D respectivament).

Pel que fa a l'anàlisi microscòpic de les lesions, a dia 28 postinfecció es va constatar que al centre de les lesions, mentre que en el control hi havia un contingut amorf que ocupava els espais intraalveolars, en els tractats amb ibuprofè hi havia un contingut cel·lular on dominaven els neutròfils principalment apoptòtics, contrastant amb la necrosi o NETosi que dominava en els animals control (Figura 24 E i F).

5.3 Estudi comparatiu dels paràmetres immunològics: soca resistent C3H/HeN i efecte del tractament amb ibuprofè

Un cop comprovat que la soca C3H/HeN tenia una evolució més favorable davant la mateixa infecció que el model desenvolupat, i que amb l'administració d'ibuprofè també hi havia aquesta millora, es van voler estudiar els mecanismes immunològics que podien influenciar aquesta evolució.

Es va determinar la concentració de diferents quimiocines i citocines al pulmó, i els nivells sèrics de LTB₄, LXA₄ i PGE₂, tal i com es presenta la Figura 26.

La concentració als pulmons de INF- γ , IL-13 i IL-4 estava per sota del límit de detecció de la tècnica, i la concentració de IL-10 no va variar entre els grups, pel que aquestes dades no s'han presentat. La concentració de citocines proinflamatòries (TNF- α , IL-17 i IL-6) va disminuir tant en el grup tractat amb ibuprofè com en els ratolins C3H/HeN, mentre que la concentració de TGF- β , IL-5 i IL-2 va ser major en aquests grups. La quimiocina proinflamatòria CXCL5 (LIX) es va trobar molt elevada en el control respecte el C3H/HeN i el grup tractat amb ibuprofè. En canvi, els nivells de CXCL1 (KC) i CXCL2 (MIP-2), que van ser menors en el C3H/HeN, no es van veure afectats (CXCL2) o bé van ser mínimament afectats (CXCL1) per l'ibuprofè. La PGE₂ no es va veure afectada pel tractament amb ibuprofè, i en canvi, sí que va presentar nivells molt més elevats en el C3H/HeN, respecte el control. Els nivells de LTB₄ i LXA₄ van ser estables i equilibrats en el grup C3H/HeN i el grup tractat amb ibuprofè, però en el grup control van variar en sentits oposats, mostrant un desequilibri cap a un excés de LTB₄ el dia 21, i un desequilibri cap a un excés de LXA₄ el dia 28.

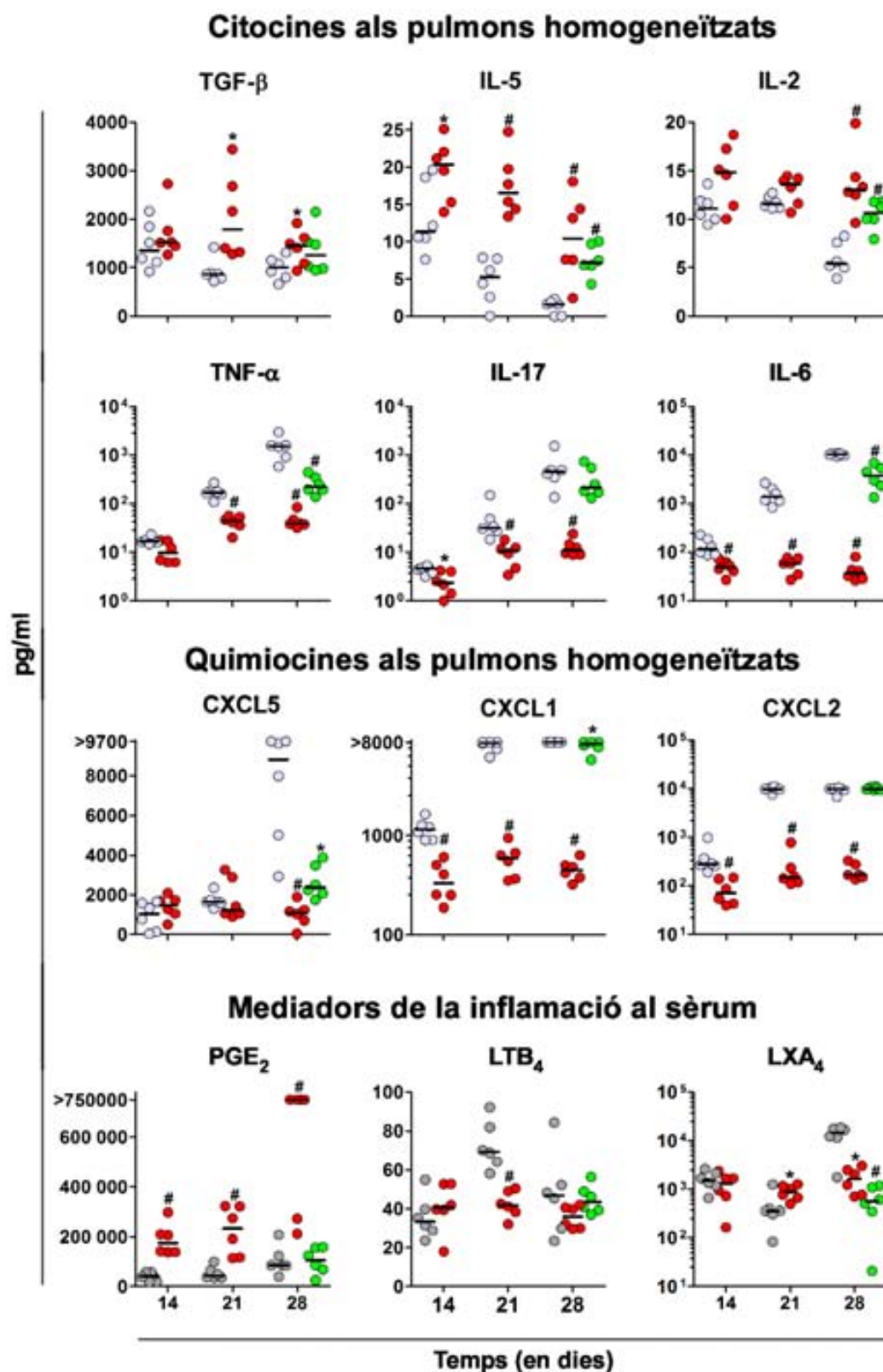


Figura 26: Diferències en el perfil de citocines, quimiocines i mediadors de la inflamació. Figura modificada de (Marzo et al. 2014). Cada cercle representa un animal. C3HeB/FeJ (gris), C3H/HeN (vermell) o C3HeB/FeJ tractats amb ibuprofè (verd). Les línies són medianes. Un asterisc $^*(p<0,05)$ i un hash tag $\#(p<0,005)$ indiquen les diferències estadísticament significatives respecte el control (t-test).

6 Estudi 3: Desenvolupament d'una estratègia terapèutica per tractar la tuberculosi mitjançant l'administració de dosis baixes de micobacteris inactivats

6.1 Efecte sobre la supervivència de tractaments elaborats amb diferents soques micobacterianes

Es van administrar bacils de *M.tuberculosis* inactivats per calor per via oral als ratolins infectats, per tal de veure si la inducció de tolerància oral al bacil de la tuberculosi en un model de tuberculosi activa modificava la progressió de la malaltia. Es va avaluar la supervivència dels ratolins i es va veure que amb el tractament s'incrementava de forma estadísticament significativa. Es van provar diferents dosis i pautes d'administració, i els resultats van ser positius tant amb l'administració preinfecció com postinfecció. Els resultats detallats per a cada pauta d'administració i dosi es mostren a la Taula 4, i la corba de supervivència d'un experiment representatiu a la Figura 27.

Donat que la manipulació i administració de *M.tuberculosis* comporta un risc biològic considerable, es van provar altres micobacteris no patogènics o menys patogènics per induir tolerància oral als bacils de *M.tuberculosis*. Es van provar diferents espècies, incloent *M.bovis* BCG i espècies ambientals. Els resultats van ser encoratjadors, ja que els animals tractats amb *M.bovis* BCG, *M.kansasii* i *M.manresensis*, una nova espècie de micobacteri ambiental, del complex *M.fortuitum* (Caracterització taxonòmica en progrés) van mostrar major supervivència en comparació als controls no tractats (Figura 27). Tot i que també es va provar el tractament amb *M.avium*, aquest no va millorar la supervivència. Els resultats detallats es presenten a la Taula 5 per la *M.bovis* BCG, *M.kansasii* i *M.avium*, i a la Taula 6 per *M.manresensis*.

Davant dels resultats tan positius del tractament amb *M.manresensis*, i la innocuïtat d'aquest micobacteri, es va considerar com a molt bon candidat per a desenvolupar un nou tractament contra la tuberculosi activa (en aquests moments protegit per patent, Nyaditum resae®). Per això es van provar diferents dosis i pautes d'administració, i s'en va avaluar la supervivència en aquest model murí. Diferents dosis entre 10^4 i 10^7 de CFU inactivades/animal van incrementar la supervivència, tant administrades abans com després de la infecció. Els resultats es presenten a la Taula 6.

Taula 4: Tractaments de tolerància oral amb bacils inactivats de *Mycobacterium tuberculosis*

Número d'experiment	Dosi (CFU inactivades/animal)	Pauta d'administració	Mediana de la supervivència (dies)		Significació estadística ⁴	n (animals per grup)	Dosi d'infecció amb <i>Mtb</i> (CFU/animal)
			Controls	Tractats			
1	10 ⁶	Pauta curta ¹ des del dia 9 preinfecció	31,5	41,5	p<0,05	6	2,4x10 ⁴
1	10 ⁵		31,5	36,5	p<0,05	6	2,4x10 ⁴
1	10 ⁴		31,5	37,5	p<0,05	6	2,4x10 ⁴
1	10 ³		31,5	49	p<0,05	6	2,4x10 ⁴
1	10 ⁶	Pauta curta ¹ des del dia 12 postinfecció	31,5	60	p<0,01	6	2,4x10 ⁴
1	10 ⁵		31,5	60,5	p<0,01	6	2,4x10 ⁴
1	10 ⁴		31,5	44	p<0,05	6	2,4x10 ⁴
1	10 ³		31,5	40	p<0,05	6	2,4x10 ⁴
4	10 ⁵	Contínuament ² des del dia de la infecció	34,5	37,5	NS	12	4,4x10 ⁴
4	10 ⁵	Contínuament ² des del dia 28 postinfecció	34,5	40,5	NS	12	4,4x10 ⁴
6	10 ⁵	Pauta curta ¹ des del dia 11 postinfecció i després contínuament ² .	30	33	p<0,05	12	9,8x10 ⁴
6	10 ³	Pauta curta ¹ des del dia 10 preinfecció i després contínuament ² .	30	33	p<0,005	12	9,8x10 ⁴
7	10 ³	Pauta curta modificada ³ des del dia 29 preinfecció	37,5	38	NS	12	4,4x10 ⁴

¹Pauta curta: 5 dosis administrades cada 48h. ²Contínuament: 3 dosis per setmana (Dilluns, dimecres i divendres), durant tot l'experiment. ³Pauta curta modificada: 13 dosis administrades 3 cops per setmana.

⁴Les corbes de supervivència de cada tractament amb el seu control es van comparar i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan p<0,05 tant en el Test de Log-rank (Mantel-Cox) com el Test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, i així s'ha indicat a la taula. NS: No significatives, *Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*

Taula 5: Tractaments de tolerància oral amb micobacteris inactivats

Número d'experiment	Mycobacteria spp.	Dosi (CFU inactivades/animal)	Pauta d'administració	Mediana de la supervivència (dies)		Significació estadística ⁴	n (animals per grup)	Dosi d'infecció amb <i>Mtb</i> (CFU/animal)
				Controls	Tractats			
2	<i>M.bovis</i> BCG	10 ⁴	Pauta curta ¹ des del dia 9 pre-infecció	34	36,5	NS	12	6,5x10 ⁴
2	<i>M.bovis</i> BCG	10 ⁶	Pauta curta ¹ des del dia 12 postinfecció	34	35,5	NS	12	6,5x10 ⁴
2	<i>M.bovis</i> BCG	10 ⁶	Pauta curta ¹ des del dia 12 postinfecció i després contínuament ² .	34	>43*	p<0,05	12	6,5x10 ⁴
3	<i>M.bovis</i> BCG	10 ⁴	Pauta curta modificada ³ des del dia 29 preinfecció.	40,5	>57*	p<0,05	12	3,0x10 ⁴
10	<i>M.bovis</i> BCG	10 ⁴	Contínuament ² des del dia 30 preinfecció.	32	35	p<0,01	12	1,1x10 ⁵
10	<i>M.kansasii</i>	8x10 ³	Contínuament ² des del dia 30 preinfecció.	32	32	NS	12	1,1x10 ⁵
10	<i>M.kansasii</i>	8x10 ²	Contínuament ² des del dia 30 preinfecció.	32	37	P<0,0005	12	1,1x10 ⁵
10	<i>M.kansasii</i>	8x10 ³	Contínuament ² des del dia de la infecció.	32	39	P<0,0001	12	1,1x10 ⁵
10	<i>M.kansasii</i>	8x10 ²	Contínuament ² des del dia de la infecció.	32	39	P<0,0001	12	1,1x10 ⁵
15	<i>M.avium</i>	4x10 ⁶	Pauta curta modificada ³ des del dia 29 preinfecció.	28,5	30	NS	12	6,0x10 ⁴
15	<i>M.avium</i>	4x10 ⁵	Pauta curta modificada ³ des del dia 29 preinfecció.	28,5	30	NS	12	6,0x10 ⁴
15	<i>M.avium</i>	4x10 ⁴	Pauta curta modificada ³ des del dia 29 preinfecció.	28,5	29	NS	12	6,0x10 ⁴
15	<i>M.avium</i>	4x10 ⁶	Contínuament ² des del dia de la infecció.	28,5	30	NS	12	6,0x10 ⁴
15	<i>M.avium</i>	4x10 ⁵	Contínuament ² des del dia de la infecció.	28,5	29,5	NS	12	6,0x10 ⁴
15	<i>M.avium</i>	4x10 ⁴	Contínuament ² des del dia de la infecció.	28,5	29,5	NS	12	6,0x10 ⁴

¹Pauta curta: 5 dosis administrades cada 48h. ²Contínuament: 3 dosis per setmana (Dilluns, dimecres i divendres), durant tot l'experiment. ³Pauta curta modificada: 13 dosis administrades 3 cops per setmana. ⁴Les corbes de supervivència de cada tractament amb el seu control es van comparar i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan p<0,05 tant en el Test de Log-rank (Mantel-Cox) com el Test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, i així s'ha indicat a la taula. NS: No significatives. *Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*. Asterisc (*): més del 50% dels animals van sobreviure fins al final de l'experiment, pel que no es pot determinar la mediana de supervivència.

Taula 6: Tractaments de tolerància oral amb bacils inactivats de *Mycobacterium manresensis*

Número d'experiment	Dosi (CFU inactivades/animal)	Pauta d'administració	Mediana de la supervivència (dies)		Significació estadística ²	n (animals per grup)	Dosi d'infecció amb <i>Mtb</i> (CFU/animal)
			Controls	Tractats			
16	1,50x10 ⁷	Pauta curta modificada ¹ des del dia 3 postinfecció.	21,5	25	p<0,01	12	7,48x10 ⁵
16	1,5 x10 ⁵	Pauta curta modificada ¹ des del dia 3 postinfecció.	21,5	27	p<0,0001	12	7,48x10 ⁵
16	1,50x10 ⁷	De dilluns a divendres, des del dia 6 postinfecció (2 setmanes).	21,5	26	p<0,0001	12	7,48x10 ⁵
16	1,5 x10 ⁵	De dilluns a divendres, des del dia 6 postinfecció (2 setmanes).	21,5	28	p<0,0001	12	7,48x10 ⁵
19	1,5 x10 ⁶	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 5 postinfecció.	36,5	39,5	p<0,05	12	5,9x10 ⁴
21	6 x10 ⁶	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 21 preinfecció.	19,5	20	NS	12	2,6x10 ⁶
21	6 x10 ⁵	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 21 preinfecció.	19,5	22	p<0,05	12	2,6x10 ⁶
21	6 x10 ⁶	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 7 postinfecció.	19,5	21	NS	12	2,6x10 ⁶
21	6 x10 ⁵	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 7 postinfecció.	19,5	22	p<0,05	12	2,6x10 ⁶
23	6 x10 ⁵	Dosi diària durant 14 dies, des del dia de la infecció.	38	43	NS	12	1,20x10 ⁵
23	6 x10 ⁴	Dosi diària durant 14 dies, des del dia de la infecció.	38	47,5	NS	12	1,20x10 ⁵
24	6 x10 ⁵	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 17 preinfecció.	39	38	NS	12	1,56x10 ⁵
24	6 x10 ⁴	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 17 preinfecció.	39	41	NS	12	1,56x10 ⁵
25	6 x10 ⁴	Dosi diària durant 14 dies, des del dia de la infecció.	30	36	p< 0,0001	12	1,48x10 ⁵
29	6 x10 ⁴	Dosi diària durant 14 dies, des del dia 7 postinfecció.	27	29	P<0,05	6	6,1x10 ⁴
34	1,3 x10 ⁵	Dosi diària durant 14 dies, des del dia de la infecció.	24	27,5	p<0,0001	12	2,82x10 ⁴

¹Pauta curta modificada: 13 dosis administrades 3 cops per setmana. ²Les corbes de supervivència de cada tractament amb el seu control es van comparar i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan p<0,05 tant en el Test de Log-rank (Mantel-Cox) com el Test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, i així s'ha indicat a la taula. NS: No significatives. *Mtb*: *mycobacterium tuberculosis*.

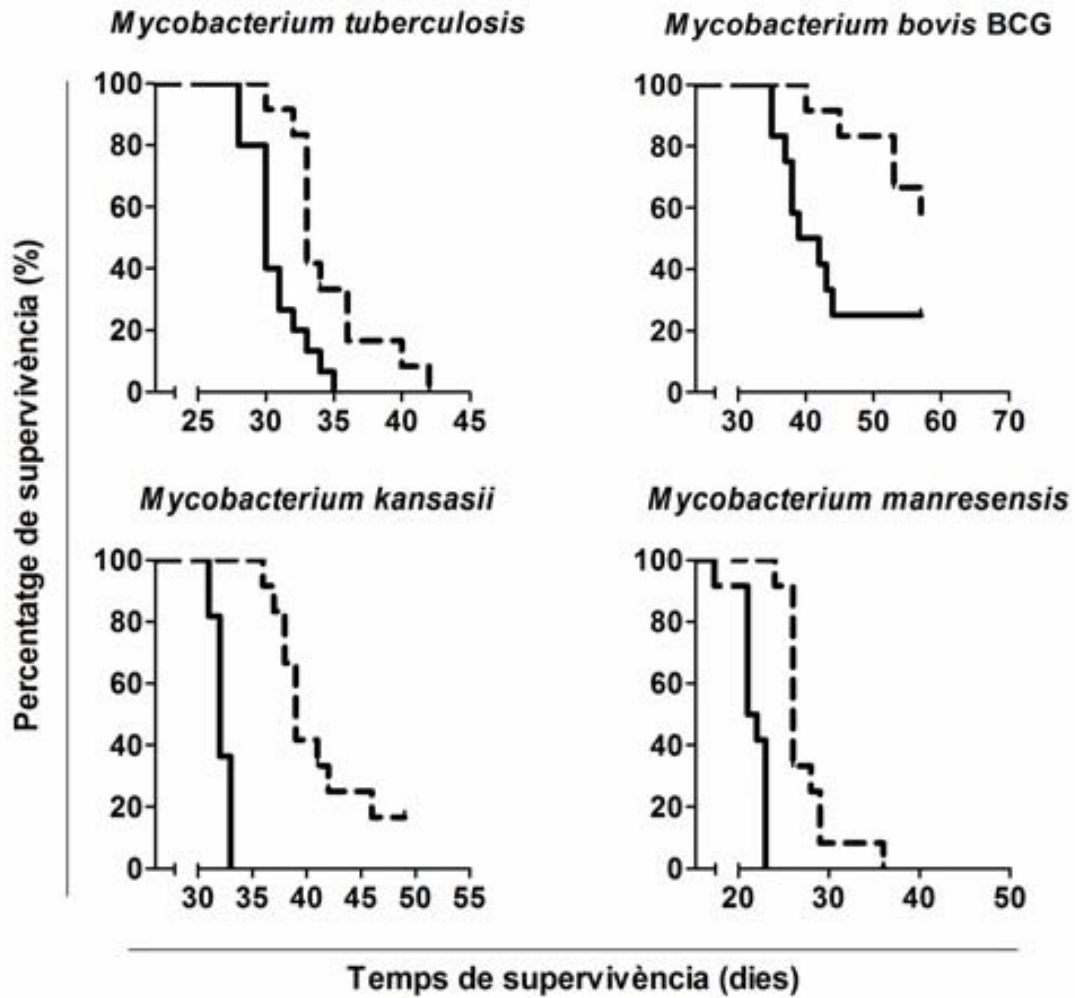


Figura 27: Corbes de supervivència dels tractaments amb diferents espècies micobacterianes. En aquest gràfic es mostren les corbes de supervivència de cada tractament (línia discontinua) comparades amb els respectius controls no tractats (línia contínua). Les diferències són estadísticament significatives per a tots els tractaments ($p < 0,05$, Test de Mantel-Cox). $n = 12$ animals/grup.

6.2 Efecte sobre la càrrega bacil·lar i la histopatologia

L'efecte sobre la histopatologia i la càrrega bacil·lar al pulmó es va avaluar per a tractaments orals amb 3 micobacteris inactivats: *M.tuberculosis*, *M.bovis* BCG i *M.manresensis*.

Pel que fa a la histopatologia pulmonar, tots els tractaments van disminuir el percentatge d'àrea afectada dels pulmons respecte els controls no tractats. Les diferències entre els grups tractats i els no tractats van ser estadísticament significatives, tant als 21 com als 28 dies postinfecció. ($p < 0,05$, t-test)(Figura 28).

Pel que fa a la càrrega bacil·lar al pulmó, aquesta va disminuir amb els tractaments amb *M.tuberculosis* i BCG, tant a dia 21 com a dia 28 postinfecció, de forma estadísticament significativa ($p < 0,05$, t-test), tal i com es mostra a la Figura 29A i B. D'altra banda, el tractament amb *M.manresensis* va disminuir la càrrega bacil·lar a dia 21 postinfecció (estadísticament no significatiu) però no a dia 28 postinfecció (Figura 29C).

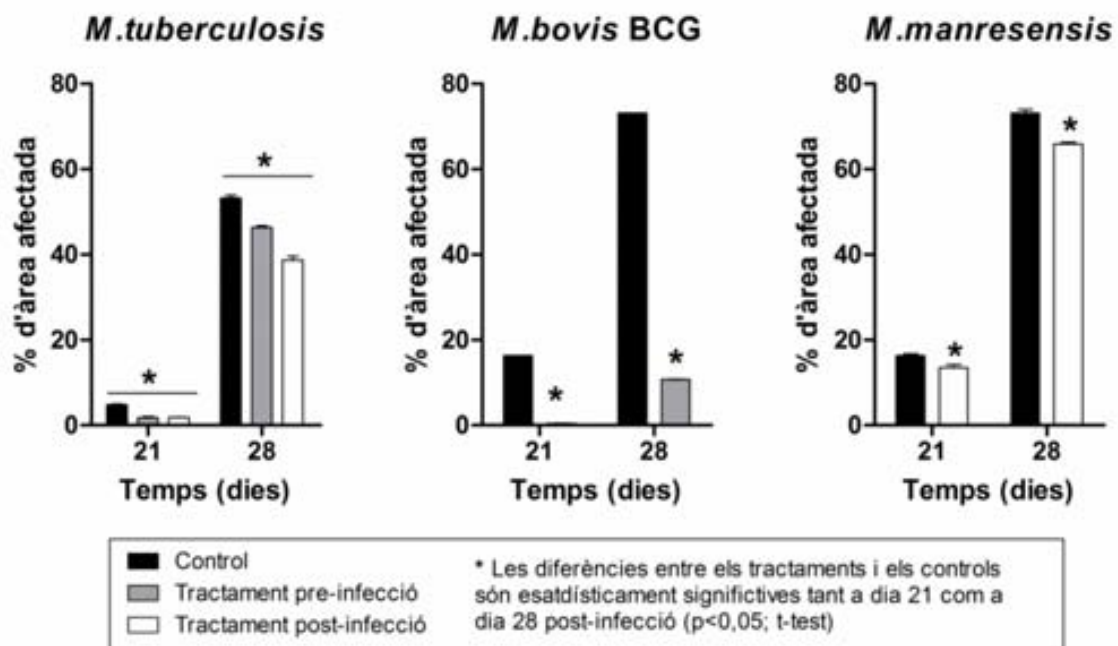


Figura 28: Histometria comparada entre els tractaments i els controls. Les barres indiquen la mitjana del percentatge d'àrea pulmonar lesionada respecte l'àrea total del pulmó, a dia 21 i dia 28 postinfecció, i les barres d'error indiquen el SEM. A cada gràfic hi ha comparat el resultat del control no tractat (en negre) amb el del tractament indicat (en gris si es va administrar abans de la infecció, i en blanc si es va administrar després de la infecció). n=6 animals/grup/timepoint.

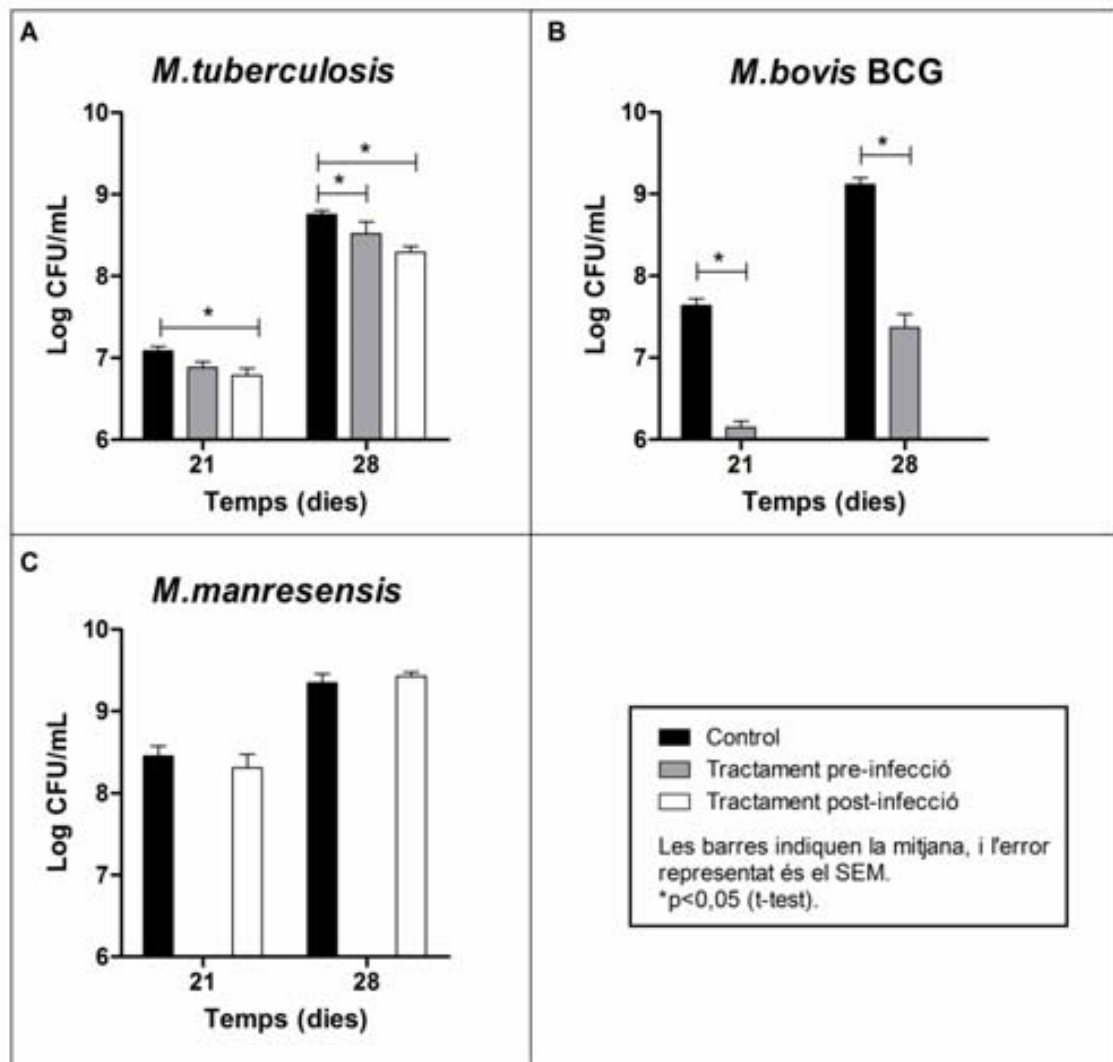


Figura 29: Efecte dels tractaments en la càrrega bacil·lar al pulmó. En aquestes gràfiques es representa la mitjana i SEM de la càrrega bacil·lar (expressada com a logaritme de CFU per ml) del grup tractat (barra grisa si es va administrar preinfecció, o blanca si es va administrar postinfecció) respecte el seu grup control, per als tractaments amb *M.tuberculosis* (A), *M.bovis* BCG (B) i *M.manresensis* (C). L'asterisc indica diferències estadísticament significatives (*p<0,05, t-test) entre el grup tractat i el grup control. n=6 animals/grup/timepoint.

6.3 Rol protector de les cèl·lules T reguladores en la tuberculosi

Com que la hipòtesi inicial sobre el tractament era que la protecció ve donada per modulació de la resposta immunològica específica mitjançant la inducció de tolerància, es va estudiar el paper de les cèl·lules T reguladores en el sistema experimental desenvolupat.

6.3.1 Estudi comparatiu C3HeB/FeJ i C3H/HeN

En un primer pas es vas estudiar la població de Tregs en el model de tuberculosi activa desenvolupat a l'estudi 1 (C3HeB/FeJ) i en la soca resistent C3H/HeN. Els

ratolins es van infectar via endovenosa i la població Treg es va determinar a la melsa i als limfonodes mitjançant citometria de flux, tres setmanes després de la infecció. Tal i com es mostra a la Figura 30, la mitjana del percentatge de Treg (CD4+CD25+Foxp3+) entre el total de T CD4+ a la melsa va ser més alt en el ratolí resistent C3H/HeN que en el C3HeB/FeJ (C3HeB/FeJ: 8,03%; C3H/HeN: 10,1%; $p < 0,005$, t-test). Als limfonodes, la diferència entre els dos grups no va ser estadísticament significativa (C3HeB/FeJ: 7,61%; C3H/HeN: 8,07%).

Es va repetir el mateix experiment, però els animals es van sacrificar el dia 14 postinfecció, i es van cultivar els esplenòcits i es van estimular amb PPD. El ratolí resistent C3H/HeN va presentar major percentatge de Tregs tant al cultiu basal com al PPD-específic (Figura 30). L'anàlisi estadístic de les dades en conjunt va confirmar que la diferència entre les dues soques era estadísticament significativa ($p < 0,05$, ANOVA de dues vies).

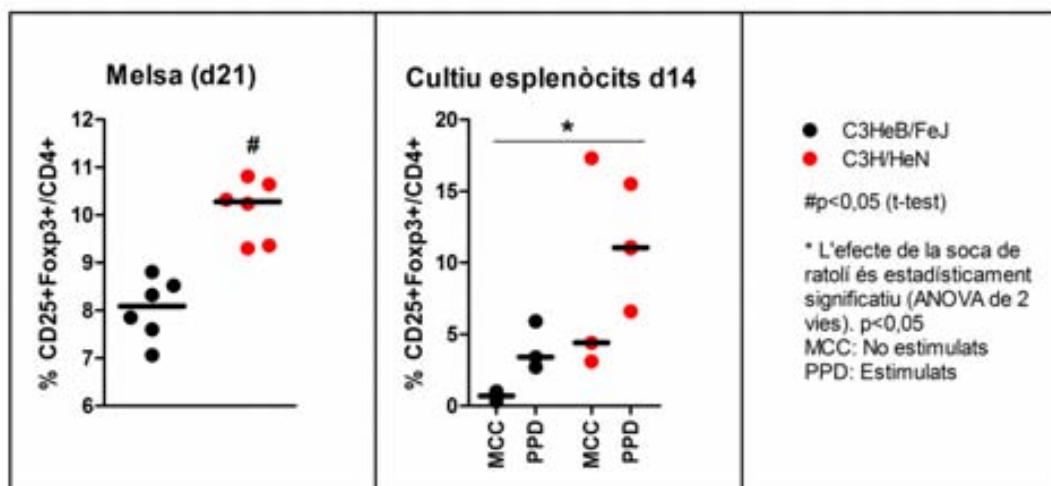


Figura 30: Percentatge de Tregs a la soca C3H/HeN en comparació a la soca C3HeB/FeJ: En aquests gràfics hi ha representats per a cada soca de ratolí els percentatges de Treg (CD25+Foxp3+) respecte el total de T CD4+ de cada animal estudiats als esplenòcits sense cultivar (esquerra) i als esplenòcits cultivats sense estimular, o bé estimulats amb PPD (dreta). Cada boleta representa un animal. Les línies representen la mediana de cada grup.

6.3.2 Estudi de depleció de Tregs in vivo en el ratolí resistent C3H/HeN

En vista dels resultats, es va practicar una depleció de les cèl·lules Treg en els ratolins C3H/HeN mitjançant l'administració d'anti-CD25 i es van infectar amb *M.tuberculosis* per veure com afectava la depleció al progrés de la infecció. Els animals tractats amb anti-CD25 van patir una depleció efectiva de les Treg, tal i com es mostra a la Figura 31A, excepte un animal, que es va excloure de l'estudi per aquest motiu. Un animal del grup deplecionat es va sacrificar el dia 32 per motius ètics, i la necròpsia va revelar gran afectació tuberculosa als pulmons. La resta dels animals

es van sacrificar el dia 46 postinfecció i els pulmons es van processar per l'anàlisi histològic quantitatiu i qualitatiu.

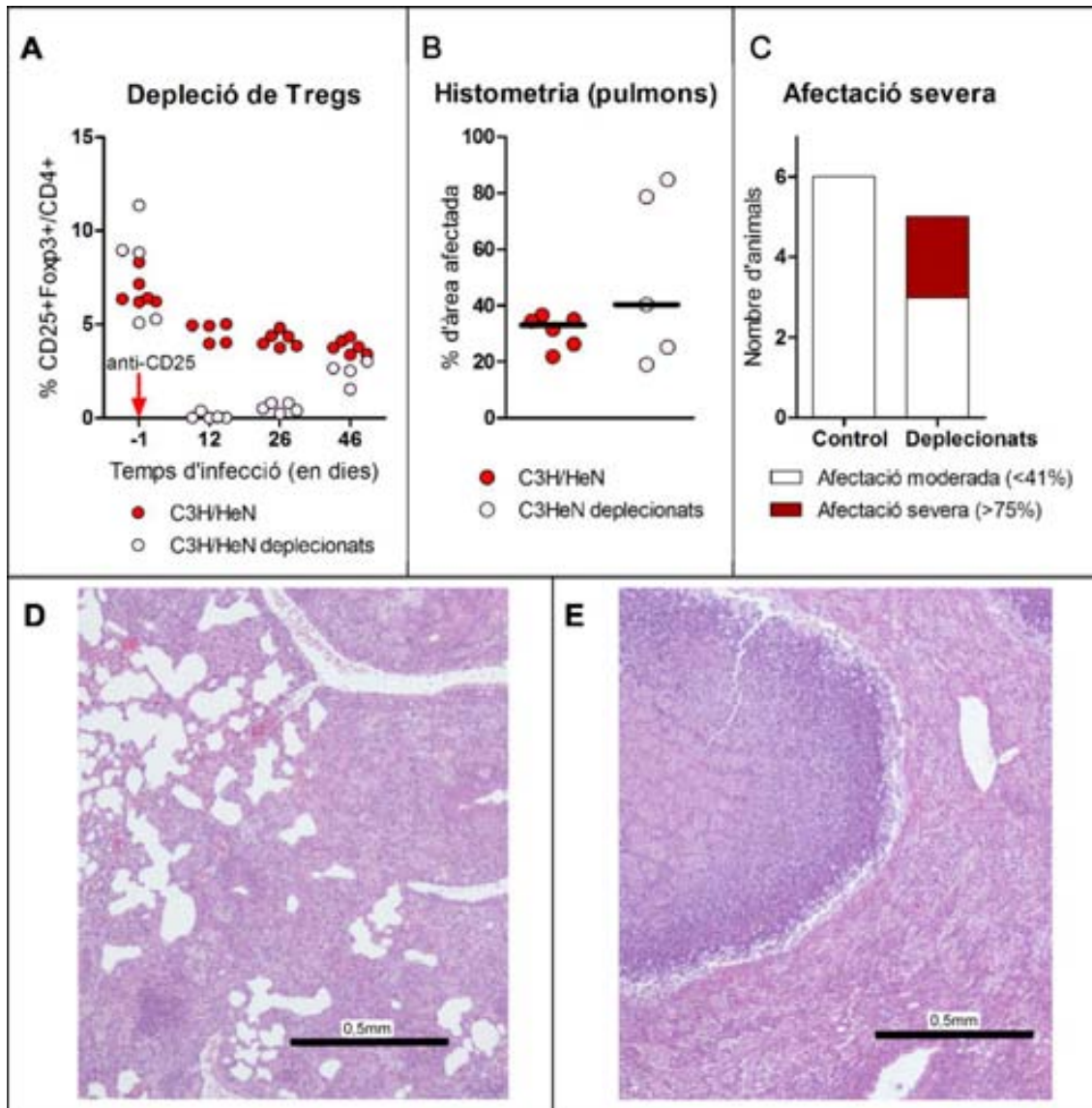


Figura 31: Depleció de les Treg en el ratolí C3H/HeN. A: Percentatge de Tregs (eix Y) de cada animal (cada boleta representa un animal), per a cada temps d'infecció analitzat: 1 dia preinfecció (-1), i 12, 26 i 46 dies postinfecció. La fletxa vermella indica el dia que es va inocular l'anticòs per deplecionar les Treg. B: Percentatge d'àrea lesionada respecte l'àrea total del pulmó de cada animal (cada boleta representa un animal) en cada grup experimental. Les línies representen la mediana de cada grup. C: Proporció d'animals amb afectació pulmonar severa de cada grup. La barra indica el nombre d'animals de cada grup amb afectació moderada (en blanc) o severa (en granat). Les fotografies microscòpiques dels talls histològics amb tinció d'H/E mostren una lesió tipus dels animals amb afectació moderada (D) o bé dels animals amb afectació severa E.

L'anàlisi quantitatiu va mostrar diferències entre els dos grups pel que fa al percentatge d'àrea afectada, malgrat aquesta no va ser estadísticament significativa (Figura 31B). Els resultats en el grup deplecionat van ser molt dispersos: 3 dels animals van presentar un percentatge d'àrea afectada molt similar al dels controls

(entre 20 i 40%), mentre que els altres 2 animals van presentar un percentatge d'afectació molt més elevat (al voltant del 80%). L'anàlisi qualitatiu es va correspondre amb aquestes dades: els animals amb patologia moderada (menys del 41% del teixit pulmonar danyat) presentaven lesions petites o mitjanes, sense cap signe de necrosi o altres formes de mort cel·lular, amb una infiltració sobretot de macròfags i limfòcits, i pocs neutròfils envoltant macròfags escumosos (Figura 31D), mentre que aquells amb afectació severa (més del 75% de teixit pulmonar danyat) presentaven lesions molt grans amb necrosi caseosa central (Figura 31E). Així doncs, en classificar els animals d'acord amb el grau d'afectació pulmonar, es va trobar que la freqüència d'afectació severa (>75% de teixit pulmonar danyat) va ser 0 en el grup control, i 2/5 en el grup deplecionat (Figura 31C). Aquests resultats interpretats conjuntament indiquen un paper de protecció de les Treg en el nostre sistema experimental.

6.4 Estudi de la modulació immunològica exercida pel tractament amb *M.manresensis* (Nyaditum resae®)

Prèviament al desenvolupament del tractament amb *M.manresensis* s'havien fet estudis preliminars quant a l'efecte dels tractaments sobre les Treg. L'efecte del *M.bovis* BCG havia estat un augment estadísticament significatiu de les Treg Foxp3+ en sang, el dia 21 postinfecció (Mitjana \pm SD; Control: $2,73 \pm 0,60\%$; Tractament: $3,95 \pm 0,87\%$; $p < 0,05$, t-test), i pel que fa al tractament amb *M.tuberculosis*, sí que havia augmentat les Treg a melsa el dia 28 postinfecció, però no de forma estadísticament significativa (Mitjana \pm SD; Control: $11,47 \pm 3,56\%$; Tractament preinfecció: $12,65 \pm 2,21\%$; Tractament postinfecció: $13,12 \pm 1,30\%$)

Com que es va considerar que el tractament amb *M.manresensis* era un bon candidat per al desenvolupament d'una teràpia immunomoduladora, es va voler fer una caracterització més completa de l'efecte d'aquest tractament en el sistema immunitari.

A més de les Treg CD4+CD25+Foxp3+, es van estudiar altres tipus de cèl·lules T CD4+ que es van considerar rellevants: CD25+CD39+ (Treg de memòria), CD25-CD39+ (T efectores de memòria), CD25+CD39- (potencials T efectores), i CD25-CD39- (T naïve), d'acord amb la caracterització efectuada per Dwyer et al. (Ref Dwyer 2010), tal i com es pot veure a l'exemple de la Figura 32.

Així que es va fer l'estudi d'aquests tipus cel·lulars en els esplenòcits sense cultivar, el dia 28 postinfecció. No es va veure cap efecte estadísticament significatiu sobre les Treg CD25+CD39+, i les Treg Foxp3+ fins i tot es van veure disminuïdes pel tractament de forma estadísticament significativa (Figura 33).

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

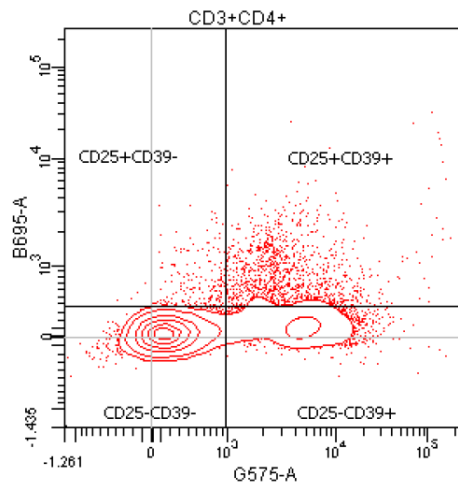


Figura 32: Anàlisi de les subpoblacions de T CD4+ segons l'expressió de CD25 i CD39 en una mostra representativa de melsa.

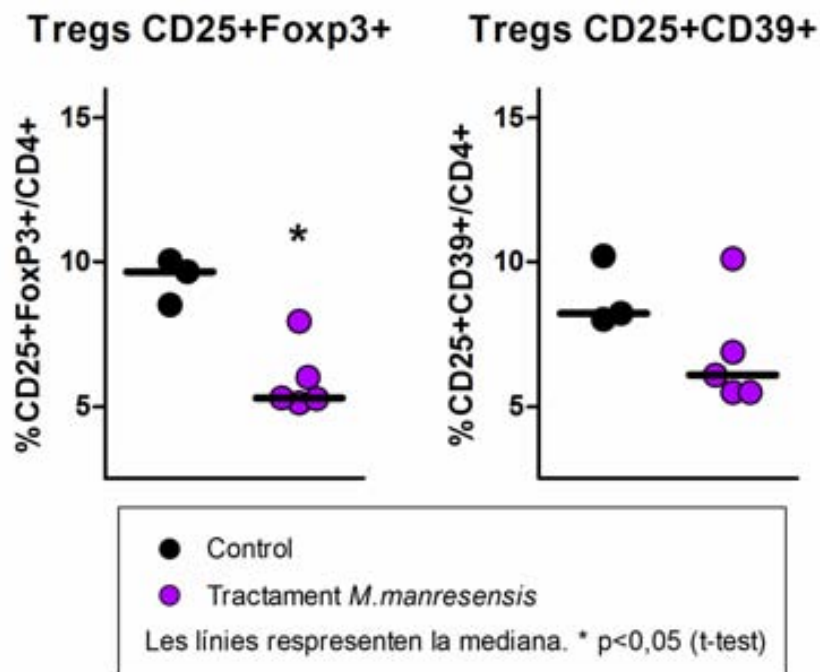


Figura 33: Efecte del tractament en el percentatge de Tregs a la melsa. Percentatge de Tregs (Foxp3+ al gràfic de l'esquerra, CD39+ al gràfic de la dreta) respecte el total de T CD4+ per a cada animal dels dos grups experimentals, analitzats directament a la melsa el dia 28 postinfecció. Cada cercle representa un animal, i les línies representen la mediana. * $p < 0,05$ (t-test)

En un segon pas es van explorar les Tregs en moments anteriors de la infecció i en cultiu, estimulant els esplenòcits amb PPD per tal de veure un efecte específic. Els resultats es mostren a la Figura 34.

El dia 14 postinfecció en el cultiu d'esplenòcits es va observar un increment de les Treg Foxp3+ en els animals tractats, en els pouets no estimulats ($p < 0,05$, Bonferroni post-test) però no es va observar un efecte específic en els animals tractats, ja que no

va canviar el percentatge de Tregs amb l'estímul de PPD. En canvi, el percentatge de Treg CD39+ es va incrementar amb l'estimulació de PPD tant en els animals tractats com els control. Va haver-hi, doncs, un increment específic de Tregs en els dos grups. A més, el percentatge de Tregs en el pouet estimulat va ser major en els controls que en els tractats ($p < 0,05$, Bonferroni post-test). El percentatge de T efectores de memòria (Tmeff) va disminuir amb la estimulació amb PPD als dos grups, però no es van observar diferències entre el grup tractat i el grup control.

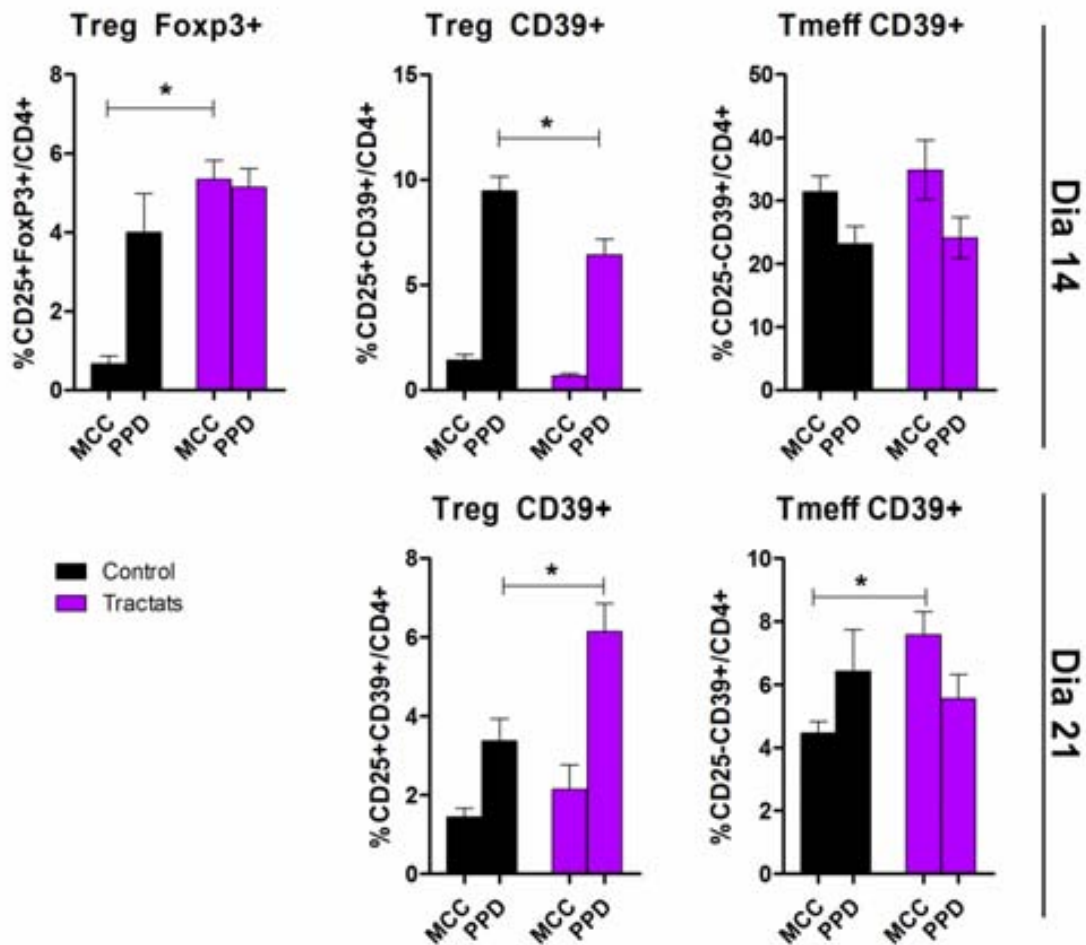


Figura 34: Efecte del tractament amb *M.manresensis* sobre la resposta específica a melsa. Percentatge de Tregs o Tmeff (segons s'indica en cada gràfic) sobre el total de cèl·lules T CD4+, en els esplenòcits cultivats 7 dies amb estímulo (PPD) o sense (MCC) segons s'indica sota cada barra. Les barres assenyalen la mitjana de 6 ratolins, i les línies d'error indiquen l'error estàndard (SEM). Segons la prova estadística ANOVA de dues vies, hi ha diferències entre els dos grups pel que fa a Tregs en tots els casos. A més, en l'anàlisi post-test de Bonferroni, hi ha diferències entre grups pel que fa al pou de MCC o de PPD, en els casos indicats amb un asterisc.

El dia 21 postinfecció, les Treg CD39+ van incrementar amb l'estimulació amb PPD. No es van observar diferències entre el grup control i el grup tractat en els cultius

no estimulats, però sí que es va detectar un augment estadísticament significatiu ($p < 0,05$, Bonferroni post-test) en el cultiu PPD estimulat, del grup tractat respecte el grup control. Tot i que el percentatge de Tmeff en els esplenòcits no estimulats va ser major en el grup no tractat ($p < 0,05$, Bonferroni post-test), després de l'estimulació amb PPD el % de Tmeff va incrementar en el grup no tractat, mentre que va disminuir en el grup tractat.

Per una major caracterització de l'efecte immunomodulador del tractament amb *M.manresensis* es van estudiar aquests subtipus cel·lulars directament als pulmons, als mateixos temps d'infecció (dia 14 i dia 21 postinfecció). Els resultats es presenten a la Figura 35.

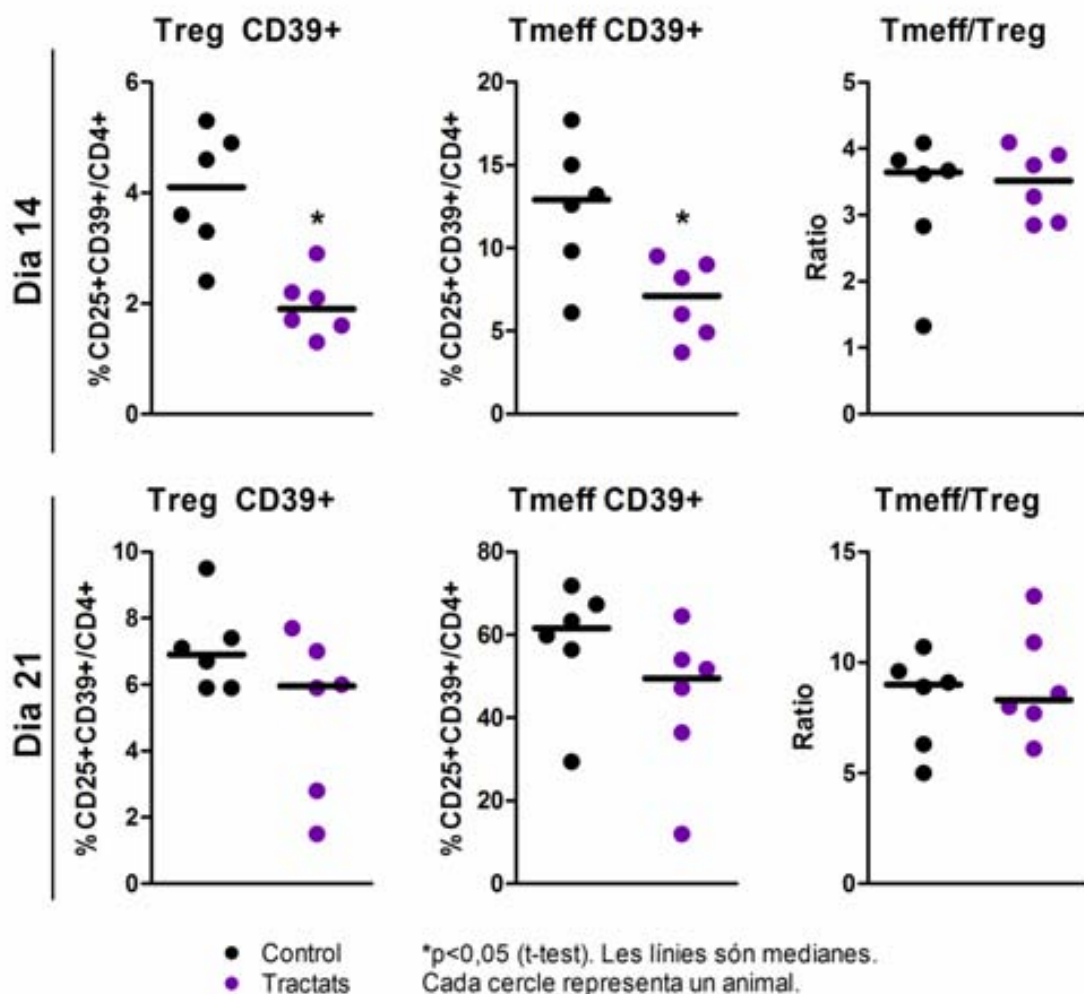


Figura 35: Efecte del tractament amb *M.manresensis* sobre les Treg i Tmeff al pulmó. Percentatge de Treg, Tmeff o ràtio de Tmeff respecte Treg, segons s'indica al títol de cada gràfic, mesurats directament al pulmó, en el grup control i el grup tractat amb *M.manresensis*. Cada cercle indica un animal, negre (control) o lila (tractat). Les línies representen la mediana del grup. Els resultats de dia 14 postinfecció són els de la fila superior, i els del dia 21 postinfecció els de la fila inferior. Les diferències estadísticament significatives s'han assenyalat amb un asterisc (* $p < 0,05$, t-test).

Es va trobar que el dia 14 les Treg i les Tmeff van disminuir en els animals tractats, de forma estadísticament significativa ($p < 0,05$, t-test). El ràtio Tmeff/Treg era lleugerament menor en els animals tractats tot i que no de forma estadísticament significativa. El dia 21 postinfecció, ni les Treg ni les Tmeff van presentar diferències estadísticament significatives entre grups.

Finalment es van analitzar conjuntament els resultats dels 4 subtipus cel·lulars estudiats: Treg, Tmeff, Teff i Tnaïve. D'aquest anàlisi va destacar l'increment del percentatge de Tnaïve en el cultiu d'esplenòcits, des del dia 14 al dia 21, i per tant, la disminució dels altres subtipus efectors (Treg, Tmeff i Teff). D'altra banda, als pulmons es va observar l'efecte contrari: un gran increment de Tmeff de dia 14 a dia 21, i a més a més, aquest increment va ser molt més important en el grup control no tractat (Figura 36).

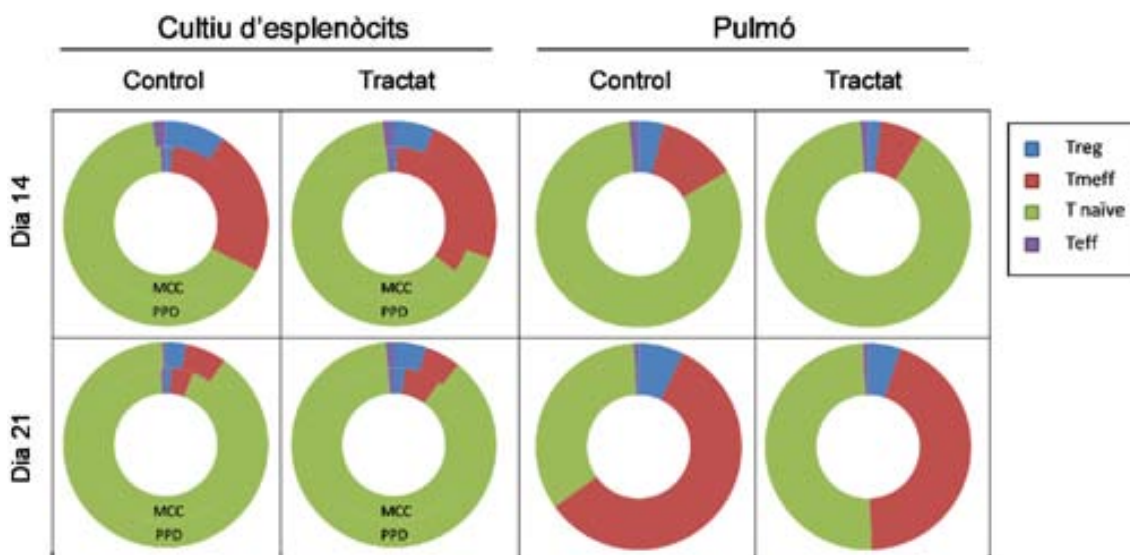


Figura 36: Comparació de les proporcions cel·lulars al cultiu d'esplenòcits i als pulmons a diferents temps. Proporcions de cèl·lules T CD4+ (Treg, Tmeff, Tnaïve i Teff) en els controls i els tractats amb *M.manresensis*, determinades a dia 14 o dia 21, al cultiu d'esplenòcits i al pulmó, segons s'indica a cada gràfic. Cada tipus cel·lular està representat amb un color, segons s'indica a la llegenda. n=6 ratolins/grup/timepoint.

7 Discussió

7.1 Sobre el sistema experimental desenvolupat per a l'estudi de la tuberculosi activa

En aquest treball s'ha desenvolupat i caracteritzat un model on, davant la infecció endovenosa amb *M.tuberculosis*, els ratolins C3HeB/FeJ desenvolupen lesions que presenten necrosi caseosa central, que fins i tot en fases finals arriba a la líquüefacció. Grosset descriu (Grosset 2003) que el procés de formació de cavitats comença amb la necrosi caseosa, que posteriorment líquüefacta, i quan aquesta lesió arriba a obrir-se a un bronquíol, el líquid es buida a l'arbre bronquial, formant-se una cavitat. En aquest model desenvolupat els ratolins infectats desenvolupen invariablement aquestes lesions amb necrosi caseosa, que posteriorment líquüefacta, semblants a les lesions descrites per Grosset prèvies a la cavitació. Fins i tot en algun cas aïllat s'ha observat una cavitat (dades no publicades ni presentades en aquesta tesi), però aquesta presentació no és reproduïble totes les vegades. La inducció de cavitats és la presentació més característica de la tuberculosi pulmonar en adults immunocompetents (Cardona 2014), i és també la responsable de la propagació de la malaltia, donat que és la lesió que conté més càrrega bacil·lar, i la única que drena bacils cap a l'exterior del malalt de manera massiva (Grosset 2003). És per això que per investigar la malaltia o desenvolupar eines per combatre-la és molt rellevant disposar d'un model precisament de tuberculosi activa, que desenvolupi el mateix tipus de lesions que s'observen en les persones.

Aquest tipus de lesions en la soca C3HeB/FeJ havien estat descrites prèviament per Kramnik et al (Chackerian et al. 2001; Pan et al. 2005; Yan et al. 2006; Driver et al. 2012), i aquesta soca s'havia utilitzat en estudis genètics (Chackerian et al. 2001; Kamath et al. 2003; Yan et al. 2006; Sissons et al. 2009), de bioimatge (Davis et al. 2009) i per assaig de fàrmacs antituberculosos (Driver et al. 2012; Harper et al. 2012; Rosenthal et al. 2012; Skerry et al. 2012) donades les condicions d'hipòxia a l'interior de les lesions (Harper et al. 2012). Però fins ara ningú havia utilitzat el ratolí C3HeB/FeJ com a model de tuberculosi activa.

A nivell pràctic, un model de tuberculosi activa que es desenvolupi tan ràpid és molt útil. Tot i que en altres àmbits 3 o 4 setmanes es consideri molt de temps, en el camp de la tuberculosi és un interval de temps prou acceptable tenint en compte que el *M.tuberculosis* és un bacil de creixement molt lent. Pel que fa a la reproductibilitat es pot dir que tots els ratolins infectats han desenvolupat sempre la malaltia, amb el mateix tipus de lesions, un gran creixement bacil·lar i un desenllaç fatal. Ara bé, sí que

és cert que sempre hi ha una variabilitat quan a la velocitat del procés, amb una oscil·lació d'entre 2 i 3 setmanes. Aquest aspecte és una limitació del model a l'hora de planificar la recerca, i a l'hora de comparar l'evolució dels paràmetres experimentals entre experiments diferents. Això ha dificultat en alguns casos poder trobar el punt òptim per mesurar certs paràmetres, i fins i tot a vegades la mort dels animals s'ha avançat més del que s'havia previst i no s'han pogut fer les determinacions desitjades. Aquesta variació podria ser deguda al pes dels animals al moment de la infecció, ja que aquest paràmetre tampoc és constant en totes les entregues de l'empresa subministradora dels ratolins, i aquest factor podria influir en el curs de la infecció. Una altra possibilitat és que la dosi d'infecció variï d'un experiment a un altre. L'inòcul es prepara a partir d'un cultiu de la soca de referència de la UTE (H37Rv Pasteur) en estat de creixement logarítmic, i es congela. L'objectiu d'aquesta metodologia és obtenir bacils en estat no replicatiu, però amb la menor agregació possible, i es va desenvolupar a la UTE després de nombrosos estudis (Caceres 2011; Caceres et al. 2013). Per tant, és poc probable que la variabilitat es degui a l'inòcul en si mateix, tot i que en algun cas, per exemple en l'experiment 19 durant el desenvolupament del *Nyaditum resae*®, sí que hi va haver una variació important fàcilment explicable per un error en l'inòcul.

A més de desenvolupar i caracteritzar el model consistent en la infecció amb *M.tuberculosis* de la soca de ratolins C3HeB/FeJ, també s'ha caracteritzat el procés de la infecció en la soca C3H/HeN. Aquesta soca, com que comparteix l'haplotip de MHC amb la soca C3HeB/FeJ, i per tant és genèticament molt propera, pot desenvolupar una resposta específica adquirida semblant a determinats antígens, tal i com s'ha descrit per exemple en models d'asma (Sarlo et al. 2000). Malgrat aquesta similitud presenta una susceptibilitat molt menor a la infecció, de manera que proporciona un control positiu excel·lent, essent les dues soques genèticament prou properes, però amb diferent susceptibilitat. Aquesta comparació de les dues soques també ha sigut clau en la comprensió dels fenòmens observats. Així doncs, no només s'ha desenvolupat un model experimental si no tot un sistema experimental per estudiar la tuberculosi activa, malgrat les limitacions exposades.

La utilització de ratolins com a model per estudiar la tuberculosi presenta certs avantatges, com ara la disponibilitat de soques diferents, models transgènics, reactius específics de l'espècie (com ara anticossos), una logística menys complicada respecte els grans animals, i normalment un cost més assequible. En canvi, tenen com a principal inconvenient que es diferencien molt dels humans quant a mida i estructura del pulmó (Cardona 2006; Cardona 2010), quant a resposta al bacil, ja que són més aviat tolerants - permeten un gran creixement bacil·lar al pulmó sense presentar

lesions - i que quan finalment desenvolupen lesions no s'assemblen a les lesions humanes: no presenten ni cavitats ni granulomes estructurats (Cardona 2014). Però aquest nou model de ratolí supera alguns d'aquests inconvenients, concretament el fet de tenir una resposta poc tolerant al bacil i reproduir lesions típicament humanes, mentre que conserva tots els avantatges d'un model murí.

Pel que fa a l'avaluació de fàrmacs aquesta nova eina pot ser de gran utilitat ja que permet quantificar no només el control de la càrrega bacil·lar - que pot ser una característica equívoca com s'ha vist en el cas del Nyaditum resae®, on una major supervivència no anava lligada a un major control de la càrrega bacil·lar - sinó també l'evolució de la patologia pulmonar, paràmetre que sí que s'ha associat a una millor supervivència en aquest estudi. A més, en no limitar-se a l'estudi de la càrrega bacil·lar també podria ser útil per al desenvolupament de fàrmacs que enlloc de tenir una acció sobre el bacil tinguin una acció sobre l'hostatger, com és el cas de l'ibuprofè o el Nyaditum resae®.

És per tot això que pesen més els avantatges que els inconvenients, i aquesta nova eina ha demostrat ser molt útil tant en l'estudi de la patogènia de la tuberculosi activa com en el desenvolupament de nous fàrmacs antituberculosos.

7.2 Sobre l'estudi de la progressió a tuberculosi activa en el model desenvolupat

Per intentar comprendre el desenvolupament de la tuberculosi activa s'ha investigat com es desenvolupen les lesions més característiques d'aquesta: les cavitats. En adults immunocompetents, la forma de tuberculosi pulmonar més freqüent és l'afectació del lòbul superior, en un 80% dels casos amb infiltració, i en un 50% amb cavitació (Lee et al. 1995; Andreu et al. 2004; Baker et al. 2004). Aquestes lesions que liquèfacten tenen una mida aproximada de 10 a 40 mm de diàmetre (Andreu et al. 2004). En canvi, durant la ITBL els granulomes no són ni tan sols visibles en una radiografia, ja que mesuren aproximadament 0,5 mm de diàmetre (Gil et al. 2010). Per tant, per entendre el progrés cap a la tuberculosi activa, la clau era comprendre com és possible passar d'una lesió de 0,5 mm de diàmetre a una de fins a 40 mm de diàmetre (Figura 37A).

En el model estudiat, les lesions passen d'un diàmetre de 0,5 mm el dia 21 postinfecció a un diàmetre de 5-12 mm el dia 31. Aquest increment exponencial, corroborat per l'anàlisi histomètric, va acompanyat de l'aparició de sublesions en el mateix moment que el nombre total de lesions comença a disminuir. Tot plegat, recolzat també per l'imatge histològica, demostra que hi ha una creixement de cada lesió per separat, però que quan aquestes entren en contacte amb les lesions

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

properes s'uneixen, multiplicant així la seva velocitat de creixement. Per tant, el passar d'un petit granuloma a una gran cavitat s'explica, en part, per la coalescència de les lesions properes (Figura 37 B).

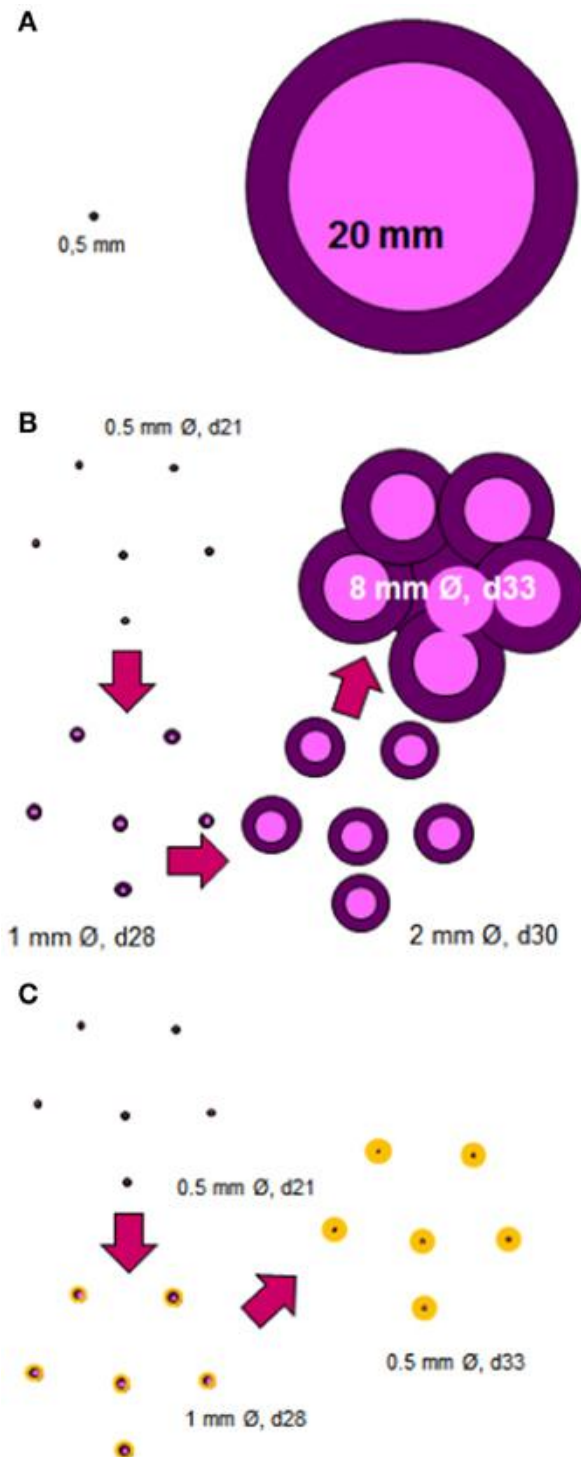


Figura 37: Inducció de lesions cavitades. Figura publicada a (Vilaplana et al. 2014a). **A:** Com és possible que un granuloma de 0,5mm de diàmetre esdevingui una lesió de 25mm, mida necessària per començar la cavitació? **B:** En el model murí desenvolupat la mida de les lesions incrementa ràpidament a causa de la infiltració neutrofilica, i a la coalescència de les lesions veïnes. **C:** La intervenció amb AINEs o amb Nyaditum resae® causaria un alentiment del creixement de les lesions, permetent el procés d'encapsulació de les lesions, evitant així la colasecència de les lesions i la formació de cavitats.

D'altra banda, hi ha d'haver un altre motiu perquè les lesions individuals creixin tan ràpidament i es produeixi la necrosi caseosa central. Abans de començar aquesta tesi, que de fet provisionalment es titulava "Efecte de la fibrosi en la patogènia de la

infecció per *M.tuberculosis*", la hipòtesi sobre la formació de lesions proposava que un desequilibri entre la fibrosis i la fibrinòlisis del teixit necròtic era responsable de la destrucció de teixit que dóna lloc a la líquüefacció, i a la cavitat un cop es buida el material líquüefet. És a dir, que si hi havia un ambient profibròtic de forma predominant, el teixit danyat es reparava i s'encapsulava, frenant la destrucció del teixit i la disseminació dels bacils. Si per contra no hi havia un ambient prou fibròtic, la fibrinòlisis i l'acció de les metaloproteases de la matriu destruïen el teixit fins a formar una lesió líquüefeta (Cardona 2011). De fet, segons la hipòtesi inicial la formació de la líquüefacció era un procés similar a la formació de l'abscess per *S.aureus*. En el cas de l'abscess, l'acumulació de neutròfils es deu en part a les coagulases sintetitzades pels bacils, que mitjançant la fibrinòlisi provoquen dipòsits de fibrina, que ajuden a mantenir la infecció al centre de la lesió (Cheng et al. 2011). Per això inicialment es va avaluar l'efecte de la bleomicina, un fàrmac profibròtic, la doxiciclina, que té un efecte negatiu sobre les metaloproteases de la matriu, i l'heparina, per la seva acció fibrinolítica o anticoagulant. Sorprenentment ni la bleomicina ni la doxiciclina van funcionar, però en canvi l'heparina sí que va allargar la supervivència dels ratolins infectats.

L'anàlisi histopatològic va revelar que en els animals infectats es produïa una infiltració massiva de neutròfils, que a partir de dia 28 donava lloc a la necrosi caseosa central. Diversos estudis en tuberculosi indiquen que el paper dels neutròfils podria ser rellevant i perjudicial en l'evolució de la infecció, sobretot en una fase avançada (Barnes et al. 1988; Keller et al. 2006; Berry et al. 2010; Nandi et al. 2011; Lowe et al. 2012). Els resultats de l'anàlisi de la resposta immunològica local també van en aquesta direcció, doncs a més de la infiltració neutrofílica també es va veure un augment (de setmana 3 a setmana 4 postinfecció) de citocines i quimiocines inflammatòries (TNF- α , MIP-2, KC i IL-17) al pulmó. Tots aquests resultats indiquen que un excés d'inflamació pot ser la causa del creixement exponencial de les lesions i la posterior líquüefacció d'aquestes. Així doncs, veient un possible paper de la inflamació en l'evolució a tuberculosi activa, es va valorar la possibilitat de que l'efecte positiu que l'heparina va causar en animals infectats fos degut a les seves propietats antiinflamatòries i no pas a les anticoagulants.

Per confirmar i caracteritzar millor el rol de la inflamació en la inducció de malaltia tuberculosa es va estudiar l'efecte dels AINEs ibuprofè i AAS en el model, així com l'estudi de la infecció en el C3H/HeN. La soca resistent C3H/HeN, com era d'esperar, va presentar major supervivència, menor càrrega bacil·lar i menor afectació pulmonar, però també menys inflamació tant pels eicosanoids mesurats al sèrum com per l'anàlisi de citocines i quimiocines al pulmó. Aquesta menor inflamació podria ser conseqüència de la poca càrrega bacil·lar, enlloc de ser-ne la causa. Però en tot cas,

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

el curs de la infecció es va veure afectat positivament per l'administració tant d'ibuprofè, AAS o heparina, demostrant ara sí, que la inflamació contribueix a la patogènia de la tuberculosi.

En els animals tractats amb l'AAS, el dia 14 hi havia un petit augment de càrrega bacil·lar, que podria concordar amb el fet que el salicilat estimula el creixement *in vitro* dels micobacteris (Bernheim 1940), però en tot cas els dies posteriors sí que va controlar el creixement bacil·lar, així com l'ibuprofè. Si bé alguns estudis han vist que l'ibuprofè i derivats (carprofen i diclofenac) tenen un efecte bacteriostàtic o bactericida *in vitro* sobre *M.tuberculosis* (Dutta et al. 2007; Guzman et al. 2013), en aquesta tesi l'efecte més important de l'ibuprofè ha estat sobre l'hostatger, tal i com indica l'estudi immunològic. A més l'AAS també redueix la càrrega bacil·lar malgrat *in vitro* tingui l'efecte contrari.

Aquests resultats s'adiuen amb la "Damage theory" aplicada a la infecció tuberculosa (Cardona 2010). Tenint en compte la hipòtesi dinàmica (Cardona 2009), la progressió d'infecció latent a malaltia es podria explicar per l'arribada de bacils a l'apex pulmonar a causa del procés constant de reinfecció endògena, sumat a una predisposició de l'hostatger a presentar una reacció altament inflamatòria davant el bacil tuberculós (Berry et al. 2010; Tobin et al. 2010; O'Garra et al. 2013). A l'apex pulmonar, on es localitzen preferentment els tuberculomes i les lesions cavitades (Lee et al. 2004) la xarxa de capil·lars és menys densa i els espais alveolars són més amples (Glenny et al. 2011). Això fa que el flux sanguini i el flux limfàtic siguin més lents en aquesta localització, fet que facilitaria l'acumulació de neutròfils però també un retard en el drenatge dels bacils (Dock 1946), tot plegat portant a l'acumulació de lesions en aquesta localització (Cardona 2014), que a més en créixer es fusionarien, donant lloc a un tuberculoma de grans dimensions. A més, en funció de la intensitat de la resposta inflamatòria de l'hostatger, el tuberculoma podria líquuefactar i donar lloc a una cavitat, ja que una resposta exacerbada i desenfrenada portaria a una espiral d'inflamació i destrucció del teixit, impossible d'equilibrar pels processos fibròtics de reparació del teixit.

Segons l'anàlisi histomètric, la presència i mida de la regió necròtica central no es correlaciona amb el temps d'infecció de l'animal, sinó amb la mida de la lesió, indicant que aquest fenomen es dona a causa d'un efecte mecànic quan la lesió arriba a una determinada mida. S'ha observat en el detall histològic, que les parets cel·lulars dels alvèols romanen intactes (necrosi caseosa) fins ben avançat el procés, tant a la tinció de reticulina com a la tinció d'H/E, on s'observa la presència de vasos sanguinis al centre necròtic. Però finalment la pressió sobre les parets alveolars resulta en manca d'irrigació de la paret alveolar, pel que també s'acaba destruint, donant lloc a la

necrosi líquüefactiva, ja que en no haver-hi teixit connectiu que sostingui la massa de detritus cel·lulars generada per la necrosi dels neutròfils, el contingut necrosat perd consistència. Aquest fenomen de passar de necrosi caseosa a líquüefactiva es coneix com a “softening” (estovament) del granuloma, i s’ha descrit en humans (Grosset 2003). En aquest model es produeix de forma exponencial a partir del dia 28 postinfecció. Per tant, es podria entendre que una lesió caseosa és com un abscess, però que gràcies a les parets alveolars conservades té una consistència més sòlida (Grosset 2003), i es diferencia també per la velocitat de formació de la lesió, essent molt més lenta en comparació a l’abscess.

Aquests estudis també han posat de manifest la importància de la localització de cada fenomen durant el desenvolupament de la malaltia, tal i com es proposa en una recent publicació del nostre grup (Vilaplana et al. 2014b). Els resultats del luminex a pulmó i a melsa, han posat en evidència que la resposta immunològica és ben diferent en aquestes dues localitzacions. Al pulmó, a partir del dia 21 la inflamació va incrementar, mentre que a la melsa va disminuir. A més, la càrrega bacil·lar també ha mostrat diferències rellevants entre òrgans: així com al pulmó la càrrega bacil·lar es va disparar a partir del dia 14, a la melsa i limfonodes es va controlar, mantenint uns nivells estables. Finalment, també l’anàlisi de Tregs concorda amb aquests resultats: a dia 14 les cèl·lules efectores (Tregs, Tmeff i Teff) es veien molt més representades a la melsa que al pulmó, i el dia 21 la situació s’invertia. Tot indica que a la melsa es controla tant la inflamació com la càrrega bacil·lar, i per tant hi ha una menor atracció dels limfòcits específics cap a aquest òrgan. En canvi als pulmons és on es concentra el creixement bacil·lar i la inflamació, i per tant atrau cada cop més limfòcits i altres cèl·lules inflamatòries.

Pel que fa al mecanisme pel qual els antiinflamatoris han millorat el progrés dels ratolins infectats, hi hauria diverses opcions. Els AINEs poden modular l’activació dels neutròfils directament (Abramson et al. 1984; Kaplan et al. 1984) independentment de la via d’inhibició de les COX compartida amb d’altres antiinflamatoris. És molt rellevant que l’ibuprofè disminuís la concentració de LIX, ja que això podria haver comportat una menor atracció de neutròfils. En canvi CXCL1 (KC) i CXCL2 (MIP-2) no s’han vist tant afectades per l’ibuprofè. Aquest fenomen també s’ha observat en el cas de la cortisona en altres models d’inflamació (Rovai et al. 1998), on la dexametasona influeix en els nivells de CXCL5 però no en els de CXCL1 o CXCL2. Ara bé, els nivells reduïts de CXCL5 també podrien ser una conseqüència indirecta de l’ibuprofè, per la reducció de la patologia pulmonar que s’ha observat.

Un altre possible mecanisme és la via de mort cel·lular dels neutròfils. Les NETs són estructures derivades de la mort cel·lular dels neutròfils (Brinkmann et al. 2007;

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

Fuchs et al. 2007; Ermert et al. 2009) que s'han relacionat amb el dany tissular a pulmó (Narasaraju et al. 2011; Cadrillier et al. 2012), i el *M.tuberculosis* pot induir NETs, que s'uneixen als bacils encara que no són capaces de matar-lo (Ramos-Kichik et al. 2009). Tot i que no s'ha confirmat per cap tècnica específica, les estructures observades en les lesions dels ratolins infectats C3HeB/FeJ podrien ser NETs. Fins i tot, donat que *M.tuberculosis* creix millor en agregats (Caceres et al. 2013) podria ser que les NETs proporcionessin als bacils una base sòlida per replicar-se. Així com en el C3HeB/FeJ s'ha observat la necrosi com a forma predominant de mort cel·lular, i també NETosi, en la soca C3H/HeN i els ratolins tractats amb ibuprofè, s'ha observat amb més freqüència la mort cel·lular per apoptosi. Tot i que això s'ha detectat en l'anàlisi histopatològic, i no s'ha quantificat per cap tècnica específica, és una dada rellevant i prou fiable, que podria indicar que l'estimulació de l'apoptosi seria un mecanisme de control del dany tissular i del creixement dels bacteris, tal i com s'ha descrit en altres desordres pulmonars relacionats amb la inflamació (Bates et al. 2004; Negrotto et al. 2006; Gillis et al. 2007), entre ells la tuberculosi (Blomgran et al. 2011; Blomgran et al. 2012).

El paper de la PGE₂ és controvertit. Alguns autors consideren que la PGE₂ és perjudicial ja que aquesta interfereix en la producció de IL-1, TNF- α i reactius d'oxigen per part dels macròfags, i inhibeix IL-12, IFN- γ i IL-2 en els limfòcits (Ivanyi et al. 2013). Però també se n'ha destacat el seu paper protector ja que promou l'apoptosi dels macròfags infectats, limitant així el creixement de *M.tuberculosis* i limitant la inflamació (Chen et al. 2008; Divangahi et al. 2009). Els resultats d'aquesta tesi mostren que des de l'inici de la infecció la soca susceptible C3HeB/FeJ manté nivells molt més baixos de PGE₂ que la soca resistent C3H/HeN, i en aquesta fins i tot es disparen encara més el dia 28, indicant un paper protector - o si més no, no perjudicial - de la PGE₂ durant tot el procés, a més de corroborar la gran capacitat de resposta antiinflamatòria d'aquesta soca de ratolí. Per contra, en el cas de l'ibuprofè, com que els nivells de PGE₂ ja són baixos en la soca C3HeB/FeJ, no hi té cap efecte afegit, indicant que hi ha altres mecanismes de regulació més rellevants, si més no quan la infecció ja està avançada. Tenint en compte els resultats en global, es pot interpretar que la PGE₂ és protectora sobretot a l'inici de la infecció, abans del dia 21 postinfecció.

El paper de la LXA₄ en la inflamació causada per la tuberculosi també és controvertit. Mentre que alguns estudis en destaquen el seu rol antiinflamatori (Tobin et al. 2010; Tobin et al. 2012) d'altres n'han destacat el seu paper pronecròtic (Hachicha et al. 1999; Mitchell et al. 2002). La modulació de la hidrolasa LTA₄, que controla l'equilibri entre LXA₄ i LTB₄, s'ha trobat crucial en la infecció per *M.tuberculosis*, ja que un excés d'algun d'aquests dos eicosanoids portaria a una desregulació del TNF- α ,

causant la malaltia tuberculosa, bé per excés o per manca de resposta inflamatòria (Tobin et al. 2010). En el model descrit, mentre que en els ratolins C3H/HeN mantenen uns nivells estables i equilibrats entre sí de LXA₄ i LTB₄, en el model C3HeB/FeJ, la LXA₄ disminueix durant la tercera setmana d'infecció, i es dispara exageradament durant la quarta setmana. Ben bé a la inversa, el LTB₄ es dispara durant la tercera setmana i retorna a nivells normals durant la quarta setmana. D'una banda aquest comportament oposat és coherent segons Tobin et al (Tobin et al. 2010), però de l'altra, els nivells disparats de LXA₄ i controlats de LTB₄ que s'observen el dia 28 postinfecció són contradictoris amb l'augment d'inflamació observat. Una primera hipòtesi seria que l'augment de LXA₄ es produeix en un intent de compensar l'excés d'inflamació, però és inefectiu en el grup control, mentre que en els grups C3H/HeN i tractats no es veu aquest augment perquè en no haver-hi tanta inflamació no es requereix. Una altra hipòtesi seria que pesa més el paper pronecròtic de la LXA₄, i aquests alts nivells de LXA₄ contribueixen a una major susceptibilitat dels C3HeB/FeJ. Tot i que amb aquestes dades no és fàcil entendre els mecanismes que donen lloc a l'evolució diferenciada en les dues soques de ratolí, segurament la primera opció és més versemblant, donat que al dia 28 el procés està molt avançat, i en canvi el dia 21 postinfecció, en el moment en que les lesions comencen a créixer desmesuradament, i per tant, moment clau que determina el curs fatal de la infecció en la soca C3HeB/FeJ, sí que trobem un augment de TNF- α i LTB₄ en el control, i una caiguda de la LXA₄.

7.3 Desenvolupament de noves estratègies terapèutiques

7.3.1 Discussió sobre la utilitat dels tractaments desenvolupats

En aquest treball s'han desenvolupat dues estratègies terapèutiques diferents per combatre la tuberculosi activa, que comparteixen el fet que actuen sobre els sistema immunològic de l'hostatger. Aquesta forma de tractament s'està explorant per diverses vies, i amb èxit, en el món de la tuberculosi (Hawn et al. 2013; O'Garra et al. 2013).

Primer, i de forma quasi accidental, les investigacions sobre el desenvolupament de tuberculosi activa han portat a la proposta de l'administració de fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus com l'ibuprofè o l'AAS com a tractament adjuvant de la tuberculosi. Aquesta troballa és molt rellevant, doncs és una família de fàrmacs segura, que fins i tot s'administra a nens, i com que ja està en el mercat podria començar a aplicar-se avui mateix: només caldria que el metge ho considerés adequat. De fet, és habitual que s'administrin antiinflamatoris com la dexametasona per guarir els pacients amb formes severes de tuberculosi, i hi hagut estudis clínics on s'ha avaluat l'AAS com a tractament coadjuvant en pacients amb meningitis

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

tuberculosa (Misra et al. 2010; Schoeman et al. 2011). Però en aquest treball es proposa per primer vegada utilitzar els AINEs amb l'objectiu de frenar l'excessiva inflamació que dona lloc a la tuberculosi activa pulmonar en adults immunocompetents. Curiosament alguns AINEs (ibuprofè i derivats) s'havien utilitzat en experiments *in vitro* o en ratolins com a tractament de la tuberculosi, però el seu efecte s'havia atribuït a propietats bactericides o bacteriostàtiques, i no pas a l'efecte antiinflamatori per se (Byrne et al. 2007; Dutta et al. 2007).

Aquesta nova estratègia proporciona una alternativa de tractament en les tuberculosis resistents als antibiòtics, ja que actua sobre l'hostatger i no sobre el bacil. De cares a dissenyar les pautes d'administració més adients seria interessant investigar més a fons el mecanisme d'acció de l'ibuprofè i de l'AAS en el tractament de tuberculosi. En aquest cas com que s'ha administrat ibuprofè al ratolí C3HeB/FeJ des del dia 21 postinfecció, que podria equivaler en humans al moment del diagnòstic, es suggereix que seu ús podria consistir en un tractament adjuvant als antibiòtics. Però també seria interessant explorar l'efecte de l'ibuprofè a temps més precoços, per comprovar si seria perjudicial per al desenvolupament de la resposta immunitària tal i com s'ha suggerit (Ivanyi et al. 2013). De totes maneres, degut als efectes secundaris, que tot i que no són molt importants, n'hi ha (Ivanyi et al. 2013), tampoc en seria adient un ús profilàctic. Pel que fa l'AAS, que es va administrar als ratolins des del moment de la infecció, sí que es podria administrar profilàcticament, de forma similar al tractament amb aspirina a dosis baixes que prenen alguns malalts cardíacs, i en aquest sentit ja s'està estudiant aquesta possibilitat a la UTE, ja que s'ha obtingut finançament per organitzar estudis clínics amb aquesta finalitat. Tanmateix, s'ha desenvolupat una nou mètode profilàctic seguint una estratègia diferent. Així com l'ibuprofè i l'AAS tenen una acció molt inespecífica, sobre diverses vies de la inflamació, amb el desenvolupament del Nyaditum resae® s'ha buscat una acció molt més específica, a través de la inducció de tolerància oral als antigens micobacterians, per tal de que es moduli la resposta immunitària evitant la inflamació excessiva que condiona la progressió a tuberculosi activa. Aquesta estratègia també és molt segura, fins i tot més que l'ibuprofè i l'AAS, ja que consisteix en administrar un bacil innoeu, que de fet es troba habitualment a l'aigua potable, i que a més a més s'administrarà inactivat. Per aquest motiu ni tan sols s'ha considerat que sigui un medicament sinó un complement alimentari, fet que facilitarà les necessitats regulatòries per acceptar la seva entrada al mercat i per tant la disponibilitat per a la població infectada amb tuberculosi. L'administració de Nyaditum resae® teòricament podria ser més rellevant en les fases inicials de la infecció, contràriament a l'ibuprofè. De fet els experiments han demostrat que les pautes d'administració amb èxit han

sigut aquelles administrades abans del dia 13 postinfecció, i justament un experiment en que es va administrar el dia 28 postinfecció no va tenir èxit. El seu paper, doncs, seria més aviat de prevenir la malaltia, un cop el pacient s'ha infectat.

Tot i que en els ratolins només augmenta la supervivència una setmana, no és irrellevant, ja que aquesta setmana de marge representa una velocitat molt menor d'infiltració de les lesions, del procés inflamatori i de la formació de les lesions en conjunt. Els ratolins no tenen septes interlobulars, i per tant tampoc capacitat d'encapsular les lesions fins que aquestes no arriben a la pleura. Per això l'alentiment del procés inflamatori només dóna lloc a que els ratolins acabin morint una setmana més tard, de la mateixa manera que els ratolins resistents d'altres soques, quan s'infecten amb *M.tuberculosis* també acaben morint per infiltració de l'espai alveolar, però molt més lentament (Dharmadhikari et al. 2008). Els humans sí que tenim capacitat d'encapsulació, pel que és raonable pensar que amb aquesta setmana de marge que ens donaria el tractament amb Nyaditum resae® en tindriem prou per encapsular les lesions, evitant així la progressió a la tuberculosi activa (Figura 37 C, pàgina 100).

Així doncs, s'ha desenvolupat un tractament de tuberculosi activa i un tractament preventiu, tots dos amb cap o pocs efectes secundaris, i amb un cost molt assequible tant a nivell de fabricació com d'emmagatzematge. Tant l'ibuprofè com l'AAS són fàrmacs barats i disponibles a molts països, i el Nyaditum resae®, tot i que ara per ara està protegit per una patent, no comporta grans costos d'elaboració, donada la innocuïtat del bacil *M.manresensis* i la via d'administració oral. Per tant, si les companyies llicenciàries de la patent ho permeten, podrà tenir un cost assequible a aquells països amb recursos econòmics escassos, que són justament els que presenten major incidència de tuberculosi. També com l'ibuprofè, no necessita condicions de conservació especials. Aquestes últimes característiques que s'apropen més a la logística que a la ciència mèdica, són tant o més importants que les característiques intrínseques del tractament, ja que finalment determinaran que un tractament hagi estat útil per a algú, o bé s'hagi quedat en potencialment útil.

7.3.2 Desenvolupament del tractament amb micobacteris inactivats

La inducció de tolerància oral s'ha avaluat mitjançant la supervivència després de l'administració de tractaments elaborats a partir de micobacteris inactivats de diferents espècies: *M.tuberculosis*, *M.bovis* BCG, *M.kansasii*, *M.avium* i *M.manresensis*. Hi ha diverses publicacions que reporten estudis de la reactivitat creuada entre diversos micobacteris (patogènics i oportunistes) mitjançant l'estudi de la immunogenicitat de les diferents espècies (Collins 1971) o la reacció de derivats PPD de les diferents

espècies (Ogunmekan 1978; Vandiviere et al. 1980; Shigeto et al. 1993) i així com *M.kansasii* o *M.avium* presenten més o menys reactivitat creuada amb *M.tuberculosis* o amb la vacunació per BCG, precisament *M.fortuitum* provoca molt poca reactivitat en els casos estudiats. En canvi, els nostres resultats indicarien que les espècies *M.tuberculosis*, BCG, *M.kansasii* i *M.manresensis* conferirien protecció enfront de *M.tuberculosis*, i precisament *M.avium* no ho faria. *M.manresensis*, tot i que encara no està del tot caracteritzat, pertany al complex de *M.fortuitum* precisament. Aquesta disparitat de resultats es pot explicar pel fet que, tal i com comenta Collins (Collins 1971), aquests estudis poden diferir molt en funció de la soca específica utilitzada. Per un altre cantó, en els estudis esmentats es mesurava la immunogenicitat produïda per una injecció subcutània de l'antigen, mentre que en aquest treball s'estaria mesurant la capacitat de l'antigen d'induir tolerància oral. A més, en els estudis esmentats s'utilitza PPD de les diferents espècies per immunitzar, que conté tota mena d'antígens, a diferència del treball presentat en aquesta tesi, on s'han administrat bacils sencers, i per tant segurament predominen antígens de la paret i proteïnes secretades.

Quant a les pautes administrades, es pot criticar que no s'ha fet una planificació racional per determinar-ne la més adequada, ja que no s'han provat les mateixes dosis i pautes en els mateixos tractaments, sinó que s'ha anat decidint segons la tàctica assaig i error. No obstant això, el resultat ha estat molt positiu, doncs s'ha determinat una pauta i una dosi que funcionen amb prou reproductibilitat, i de fet, al contrari de ser negatiu, el fet de provar tantes dosis i pautes que han funcionat dona solidesa al tractament, tant administrat preinfecció com postinfecció. És cert que en alguns experiments els tractaments no han funcionat, però pot ser degut a la variabilitat del model, més que no pas a causa del tractament.

També s'han avaluat tres dels tractaments mitjançant l'estudi de la càrrega bacil·lar i la histopatologia. Així com en els tres tractaments hi hagut un efecte significatiu sobre la patologia pulmonar, la càrrega bacil·lar no ha disminuït de forma estadísticament significativa en el cas del *M.manresensis*. El fet que hi hagi un efecte positiu i estadísticament significatiu sobre la histopatologia, encara que sigui menor que en els altres tractaments, però no en la càrrega bacil·lar, indica que aquest paràmetre no es correlaciona totalment amb l'èxit del tractament. De fet Dannenberg i Collins (Dannenberg et al. 2001) a conseqüència dels seus estudis amb conills van arribar a la conclusió que el cultiu dels pulmons per estimar la càrrega bacil·lar no era un bon indicador de pronòstic sense un estudi histopatològic de les lesions. Però també és cert que la variabilitat del desenvolupament del model podria justificar aquesta diferència, doncs en l'experiment concret on es va avaluar la càrrega bacil·lar i la histopatologia del *Nyaditum resae*®, la progressió dels controls va ser més ràpida que

en els experiments dels altres tractaments, tal i com s'ha valorat amb els percentatges d'afectació del pulmó, però també la càrrega bacil·lar, que és molt més elevada ja a dia 21 en els animals de l'experiment amb *M.manresensis* que en els altres dos. Encara que aquesta hipòtesi fos certa, no deixa de ser rellevant que la histopatologia ha mostrat l'efecte del tractament, mentre que la càrrega bacil·lar no.

7.3.3 Discussió sobre el mecanisme d'acció de Naditum resae®

La dosi i la ruta d'administració determinen la resposta immunitària de l'hostatger a un determinat antigen, de manera que un mètode terapèutic que consistís en administrar un antigen a dosis baixes per via oral de forma continuada, hauria d'induir tolerància cap a l'antigen (Faria et al. 2005). En el cas d'aquest estudi, doncs, és més que possible que el mètode desenvolupat hagi induït tolerància als micobacteris inactivats que s'han administrat. I donat que diverses espècies de micobacteri han augmentat la supervivència, cal pensar que s'ha induït una reacció creuada entre *M.tuberculosis* i els altres micobacteris, ja que deuen compartir antigens rellevants per al sistema immunitari de l'hostatger. Aquesta estratègia s'ha utilitzat abundantment en el món de les malalties autoimmunes, tal i com revisen Weiner et al. (Weiner et al. 2011), i precisament la resposta DTH és especialment susceptible a la supressió per la tolerància oral. En el camp de la tuberculosi, l'administració repetida d'antígens de *M.tuberculosis* amb la finalitat de guarir la malaltia tampoc és nova del tot. A l'era preantibiòtica diferents metges del moment, entre ells Robert Koch, van començar a desenvolupar un tractament que consistia en injectar extracte de cultius de *M.tuberculosis* (tuberculina) als pacients de tuberculosi, a diferents dosis i amb diferents pautes, fet que posteriorment va portar al desenvolupament del TST com a mètode diagnòstic. Però pel que fa al tractament, segons la revisió sobre la història de la tuberculina publicada pel nostre grup (Vilaplana et al. 2012), en aquests tractaments la dosi i pauta d'administració eren claus, juntament amb l'estat del pacient, per obtenir una resposta positiva o negativa al tractament. La resposta negativa consistia en una exacerbació de la malaltia, que sovint comportava la mort del pacient, encara que si aquest a pesar de tot sobrevivia, hi havia una fase "tolerant" amb la qual s'aconseguia la guarició. En canvi les respostes positives eren aquelles que passaven directament a la fase tolerant, o bé passaven per una reacció inflamatòria mínima. Es pot interpretar que l'efecte immunomodulador seria perjudicial quan s'exacerbés la inflamació, o beneficiós quan es limités. En el cas del mètode terapèutic presentat en aquesta tesi, el fet que l'administració s'efectuï per via oral garanteix que la resposta induïda serà tolerant, sense perill de causar una resposta perjudicial, i així ho corroboren els resultats de supervivència en el model murí. Yamamura et al. (Yamamura et al. 1986)

van comprovar que la formació de cavitats es deu a la DTH, o en definitiva a la resposta cel·lular, en el model de cavitació de conills. No tan sols això, sinó que també van aconseguir evitar la cavitació mitjançant la desensitització amb diferents components del micobacteri (Yamamura et al. 1974). Ara bé, a diferència del mètode terapèutic desenvolupat en aquesta tesi, on l'administració de petites dosis per via oral té l'objectiu de generar una resposta reguladora mitjançant la inducció de Tregs, Yamamura et al. provocaven una anèrgia als antigens de *M.tuberculosis*, mitjançant la injecció endovenosa dels pèptids tuberculosos, mesurada per la negativització del TST. Per tot això, és perfectament possible que el tractament Nyaditum resae® protegeixi del desenvolupament de tuberculosi activa mitjançant la inducció de tolerància al *M.tuberculosis*.

Tot i així s'ha volgut caracteritzar l'efecte del tractament en el sistema immunitari, per tal de demostrar que s'indueix tolerància amb el tractament. Es va considerar com a possibilitat versemblant que la tolerància oral s'articulés a partir de les Treg, donat que l'administració d'un antigen per via oral a dosis baixes i continuades indueixen la tolerància mediada per Tregs, mentre que si les dosis són altes indueixen anèrgia, la supressió de la resposta immunològica adquirida i les conseqüències negatives que se'n deriven (Weiner et al. 2011). A més, en diverses malalties on hi ha un excés d'inflamació és clar que les Treg confereixen protecció (Baecher-Allan et al. 2006; Umetsu et al. 2006; Dwyer et al. 2010). Ara bé, en el camp de tuberculosi, no és així. Hi ha diversos estudis que atribueixen la baixa efectivitat de la vacuna BCG a la producció de Tregs (Roberts et al. 2007; Ho et al. 2010), i també s'ha atribuït un rol negatiu a les Tregs durant la malaltia, argumentant que provoquen una immunosupressió que dona lloc al progrés cap a tuberculosi activa, ja que hi ha major expansió de les Tregs en pacients de tuberculosi que en pacients amb ITBL (Ribeiro-Rodrigues et al. 2006; Chiacchio et al. 2009). No obstant això, si tenim en compte que la tuberculosi activa en adults immunocompetents es produeix per un excés d'inflamació, és poc probable que les Treg produeixin una immunosupressió que doni lloc a la formació de cavitats, de manera que l'expansió de Tregs no tindria perquè ser la causa de la tuberculosi activa, sinó que podria ser una reacció compensatòria a la inflamació que s'està produint durant la malaltia activa. En estudis amb ratolins hi ha controvèrsia quant a l'efecte de les Tregs. Shaffiani et al. van demostrar que les Tregs específiques causarien un augment de la càrrega bacil·lar en ratolins infectats (Shaffiani et al. 2010), tot i que aquest resultat es contradeia amb un altre estudi (Quinn et al. 2006), on la depleció de Tregs no afectava la càrrega bacil·lar. Però com ja s'ha comentat abans, la càrrega bacil·lar no té perquè ser indicativa de l'evolució de la malaltia, especialment en el model de ratolí d'una soca resistent. En aquest sentit,

estudis realitzats per Leepiyasakulchai et al van indicar un rol protector de les Treg, doncs hi havia major expansió d'aquestes en les soques resistents que en les susceptibles (Leepiyasakulchai et al. 2012). Per tan, donat que el rol de les Treg en la tuberculosi és controvertit, es va començar per l'estudi d'aquestes cèl·lules en el sistema experimental desenvolupat. El ratolí C3H/HeN va presentar major percentatge de Treg a la melsa després de la infecció amb *M.tuberculosis*, i també en el cultiu d'esplenòcits, un augment en la població específica de Treg (estimulats amb PPD). Llavors es va deplecionar el ratolí C3H/HeN de cèl·lules Treg mitjançant l'administració d'anti-CD25. Això va incrementar la susceptibilitat d'aquests ratolins, doncs 2 de 5 van desenvolupar lesions necròtiques, i un d'ells fins i tot va morir abans que els altres, essent aquest resultat molt rellevant si tenim en compte que en cap dels experiments realitzats amb aquests ratolins en el nostre grup no havia mort mai cap ratolí d'aquesta soca. Tot i que les cèl·lules T CD4+CD25+, deplecionades eficaçment, no són 100% Treg, segons l'anàlisi amb CD39+ només inclourien el subtipus Th TCD4+CD25+CD39- a banda de les Treg, i aquestes només signifiquen al voltant d'un 1% del total de T CD4+, pel que la depleció de Tregs és molt més rellevant que la de les CD25+CD39-. En conjunt aquests experiments recolzen la hipòtesi de que el paper de les Treg en tuberculosi és protector. Així que es va seguir estudiant l'efecte dels tractaments sobre les Treg.

Els tractaments van disminuir el percentatge de Tregs (tant les Foxp3+com les CD39+) en la melsa dels animals tractats amb *M.manresensis*, i en canvi van augmentar-ne el percentatge (Foxp3+) en el tractament amb *M.bovis* BCG i amb *M.tuberculosis*, però en aquest últim no de forma estadísticament significativa. Novament, aquesta diferència en els resultats es pot explicar per la diferència de velocitat en la progressió dels tres experiments revelat per l'anàlisi histopatològic. També cal tenir en compte que la determinació de Tregs en el tractament amb BCG es va fer en sang i el dia 14 postinfecció. Tot plegat justificaria la disparitat de resultats. De totes maneres, per corroborar-ho hauria estat més correcte repetir l'experiment amb *M.manresensis* i determinar-ne el percentatge de Tregs als "timepoints" inicials. Però es va optar per passar directament a estudiar l'efecte en les Treg específiques mitjançant el cultiu d'esplenòcits estimulat amb PPD, i mitjançant l'estudi de Tregs directament al punt d'inflamació, als pulmons, i incloent el CD39 que permet un anàlisi més complert, perquè permet identificar a més de les Tregs, les Tmeff, Teff i Tnaïve. A més aquest marcador ja ha estat validat com a marcador de Tregs en tuberculosi (Chiacchio et al. 2009). Si bé a la determinació a melsa del dia 28 es va obtenir el mateix resultat amb els dos marcadors, a dia 14 en el cultiu no va ser així, segurament degut a que les determinacions amb els dos marcadors s'han fet en dos experiments

Tuberculosi pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

diferents. Per tant, l'anàlisi global és el que dona una informació més fiable: malgrat l'increment específic de Tregs en el cultiu el dia 21 postinfecció, als pulmons les Treg disminueixen. En canvi les Tmeff disminueixen amb el tractament, tant de forma específica el dia 21 en el cultiu, com el dia 14 i el dia 21 postinfecció als pulmons. Aquest resultat, malgrat ser inesperat van en la línia de la hipòtesi inicial. Segons Dwyer et al. la proporció de Tmeff respecte les Treg és més important que el percentatge de Tregs en sí, en el rebuig d'òrgans trasplantats (Dwyer et al. 2010). A més, un desequilibri Treg-Th17 on les Th17 pesen més és segurament el que determina la inflamació exacerbada, tal i com es descriu en el IRIS en malalts de tuberculosi i VIH (Liu et al. 2011). I de fet, segons de Cassan, l'exposició a micobacteris disminueix la resposta Th17 desenvolupada a una vacuna (de Cassan et al. 2010), pel que és raonable pensar que el tractament oral amb micobacteris també produeixi una limitació de la resposta Th17 enfront a la infecció amb *M.tuberculosis*. El fet que el tractament limiti l'expansió de les Tmeff, que serien potencials productores de IL-17, també és indicador d'una regulació de la resposta immunitària, probablement per un efecte en les Treg, que no s'ha pogut detectar en aquest estudi. De fet podria ser que el tractament no incrementés el nombre de Treg, sinó que incrementés la seva funcionalitat antiinflamatòria, factor que caldrà tenir en compte en futures investigacions.

Tot i que no s'ha pogut demostrar el mecanisme exacte d'acció del tractament, sí que s'aporten evidències suficients per demostrar que la millora que presenten els animals tractats es deu a una inducció de tolerància cap al bacil de la tuberculosi. Seria interessant realitzar altres estudis per definir el mecanisme d'acció, potser sense limitar-se al paper de les Treg. En un primer pas, es podria corroborar que hi ha menys inflamació mesurant les citocines, quimiocines i eicosanoids al pulmó, tal i com s'ha fet per al tractament amb ibuprofè i la soca C3H/HeN. També es podria mesurar la concentració de citocines, especialment IL-17 i TNF- α , al sobrenedant dels cultius d'esplenòcits. Finalment, per demostrar el paper de les Treg en el tractament es podrien utilitzar alternatives per mesurar les Tregs. Seria interessant detectar-les a diversos "timepoints" seguits en el mateix experiment, especialment a l'inici de la infecció, i paral·lelament cultivar els esplenòcits amb una incubació més curta. Per acabar, es podrien fer estudis de depleció de Treg en els animals tractats, i fins i tot transferència de Tregs d'un animal tractat a un altre d'infectat per veure si és suficient per obtenir la mateixa millora en el progrés de la infecció que la millora obtinguda amb el tractament.

7.4 Valoració global i fites assolides

S'ha desenvolupat un model animal de tuberculosi activa, que malgrat presentar algun inconvenient ha estat molt útil per determinar dos factors claus pel desenvolupament de les lesions, la coalescència de les lesions i la inflamació exacerbada que resulta en una infiltració massiva de neutròfils. Falta encara determinar quina és la causa de l'atracció dels neutròfils, si els neutròfils en sí, els macròfags escumosos, la necrosi o algun altre factor. Però en tot cas s'han tret conclusions de valor amb l'estudi d'aquest model, que a més en ser un model murí comporta grans avantatges logístiques i de disponibilitat de reactius per fer recerca amb més profunditat.

Adicionalment, el model també ha servit per desenvolupar dos tractaments, amb utilitat potencial en dues situacions diferents: prevenció d'emmalaltir un cop infectat (Nyaditum resae®) i tractament coadjuvant per als malalts amb tuberculosi activa (AINEs), o fins i tot prevenció de la tuberculosi (AAS). A més, aquests tractaments haurien d'estar disponibles per als pacients en poc temps, donat el perfil de seguretat i els costos assequibles de la producció. De fet, el Nyaditum resae® ja està essent avaluat en un assaig clínic amb voluntaris sans per estudiar-ne l'efecte sobre el sistema immunitari, i ja s'ha obtingut finançament per organitzar també un assaig clínic per demostrar la utilitat dels AINEs en pacients amb tuberculosi activa. A més, en ser tractaments immunomoduladors, amb un efecte sobre l'hostatger i no sobre el bacil, proporcionen una alternativa per al problema de les resistències als antibiòtics que han desenvolupat algunes soques.

Així doncs, els resultats obtinguts en aquesta tesi són molt positius i esperançadors, i a més són un clar exemple de com la recerca bàsica, en aquest cas la investigació del desenvolupament de la malaltia, acaba essent d'utilitat més enllà del coneixement científic bàsic, en aquest cas per trobar dues propostes terapèutiques.

7.4.1 Fites assolides en cada estudi

Estudi 1

- S'ha desenvolupat un model animal de tuberculosi activa, reproduïble, que en pocs dies desenvolupa lesions que presenten gran similitud amb les lesions de la tuberculosi pulmonar humana, la forma més prevalent de tuberculosi activa en adults immunocompetents.
- S'ha observat, mesurat i descrit el fenomen de la coalescència de les lesions inicials properes, així com la infiltració massiva de neutròfils, mecanismes pels quals es pot explicar el creixement sobtat que

Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

experimenten les lesions tuberculoses que determina en part el desenvolupament de la tuberculosi activa.

- S'ha descrit la presència de NETs a les lesions, i s'han trobat evidències que podrien indicar la importància de la forma de mort cel·lular dels neutròfils (apoptosi versus necrosi i NETosi) en el desenllaç de la infecció.

Estudi 2

- S'ha demostrat que un excés d'inflamació, i més concretament una infiltració massiva de neutròfils vehiculada per la desregulació de IL-17, IL-6, TNF- α i CXCL5 (LIX), participen en el desenvolupament de la tuberculosi activa.
- S'ha provat que l'ús d'antiinflamatoris millora el progrés de la tuberculosi activa, en un model murí de tuberculosi activa, fet que indica que l'ús d'AINEs podria ser un bon tractament terapèutic coadjuvant, i fins i tot profilàctic en el cas de l'AAS, i a més molt barat, per guarir la tuberculosi activa.

Estudi 3

- S'ha desenvolupat un nou mètode profilàctic per la tuberculosi, que augmenta la supervivència i disminueix la patologia pulmonar dels ratolins en un model de tuberculosi activa.
- El mètode desenvolupat podria evitar el desenvolupament de tuberculosi activa en persones infectades. A més, donat el baix risc que comporta la seva administració i el cost assequible de la seva producció, s'ha patentat i llicenciat a una empresa, pel que podrà administrar-se ben aviat i arribar als països amb alta incidència, contribuint així al control de l'epidèmia global.
- S'ha vist que el control de la patologia pulmonar i una major supervivència no té perquè anar lligat amb un major control de la càrrega bacil·lar, en el model de tuberculosi activa desenvolupat.
- S'ha demostrat que el paper de les cèl·lules Treg és protector en el sistema experimental de tuberculosi activa desenvolupat.
- S'ha caracteritzat en part l'efecte del mètode profilàctic sobre el sistema immunitari, indicant que provoca una disminució de les cèl·lules Tmeff (CD4+CD25-CD39+) que probablement contribueix a la disminució de patologia pulmonar que s'observa. Tot i així, es requeriran més estudis per acabar de caracteritzar el mecanisme exacte pel qual el tractament regula la resposta immunològica menys inflamatòria que s'ha observat.

8 Conclusions finals

1. El model murí de tuberculosi activa desenvolupat en aquesta tesi és útil per avaluar estratègies terapèutiques i profilàctiques contra la tuberculosi, així com per l'estudi de la tuberculosi activa.
2. La inflamació, concretament la infiltració massiva de neutròfils, juga un paper perjudicial en la patogènesi de la tuberculosi activa.
3. Els AINEs podrien ser una bona eina en el tractament coadjuvant de la tuberculosi activa.
4. L'administració oral de dosis baixes de micobactèries inactiades constitueix una nova estratègia profilàctica contra la tuberculosi.

9 Bibliografia

- Abramson, S., H. Edelson, H. Kaplan, R. Ludewig and G. Weissmann (1984). "Inhibition of neutrophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs." Am J Med **77**(4B): 3-6.
- Afzali, B., P. Mitchell, R. I. Lechler, S. John and G. Lombardi (2010). "Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells." Clin Exp Immunol **159**(2): 120-130.
- Aleman, M., S. de la Barrera, P. Schierloh, N. Yokobori, M. Baldini, R. Musella, E. Abbate and M. Sasiain (2007). "Spontaneous or Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response." Eur J Immunol **37**(6): 1524-1537.
- Aliberti, J., S. Hieny, C. Reis e Sousa, C. N. Serhan and A. Sher (2002). "Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity." Nat Immunol **3**(1): 76-82.
- Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo and M. K. Levings (2007). "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production." Int Immunol **19**(4): 345-354.
- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis and A. G. Betz (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." Nat Immunol **5**(3): 266-271.
- Andreu, J., J. Caceres, E. Pallisa and M. Martinez-Rodriguez (2004). "Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis." Eur J Radiol **51**(2): 139-149.
- Appelberg, R. (1992). "Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils." J Leukoc Biol **51**(5): 472-477.
- Arcos, J., S. J. Sasindran, N. Fujiwara, J. Turner, L. S. Schlesinger and J. B. Torrelles (2011). "Human lung hydrolases delineate Mycobacterium tuberculosis-macrophage interactions and the capacity to control infection." J Immunol **187**(1): 372-381.
- Aston, C., W. N. Rom, A. T. Talbot and J. Reibman (1998). "Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide." Am J Respir Crit Care Med **157**(6 Pt 1): 1943-1950.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-1253.
- Baecher-Allan, C. and D. A. Hafler (2006). "Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease." Immunol Rev **212**: 203-216.
- Bafica, A., C. A. Scanga, C. Serhan, F. Machado, S. White, A. Sher and J. Aliberti (2005). "Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production." J Clin Invest **115**(6): 1601-1606.
- Baker, S. K. and J. Glassroth (2004). Miliary tuberculosis. Tuberculosis. W. N. Rom and S. M. Garay. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 427-444.
- Barnes, P. F., J. M. Leedom, L. S. Chan, S. F. Wong, J. Shah, L. A. Vachon, G. D. Overturf and R. L. Modlin (1988). "Predictors of short-term prognosis in patients with pulmonary tuberculosis." J Infect Dis **158**(2): 366-371.
- Bates, J. J., R. W. Watson, C. M. Glynn, A. J. O'Neill, J. M. Fitzpatrick and D. J. Buggy (2004). "Aspirin preserves neutrophil apoptosis after cardiopulmonary bypass." Shock **21**(6): 495-499.
- Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick and W. J. Britton (1999). "Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin." J Immunol **162**(6): 3504-3511.

- Benito, P. (2013). Treball de recerca: Aproximacions al desenvolupament de la tuberculosi activa a través de l'experimentació animal i la modelització.
- Bernheim, F. (1940). "The Effect of Salicylate on the Oxygen Uptake of the Tubercle Bacillus." *Science* **92**(2383): 204.
- Berry, M. P., C. M. Graham, F. W. McNab, Z. Xu, S. A. Bloch, T. Oni, K. A. Wilkinson, R. Banchereau, J. Skinner, R. J. Wilkinson, C. Quinn, D. Blankenship, R. Dhawan, J. J. Cush, A. Mejias, O. Ramilo, O. M. Kon, V. Pascual, J. Banchereau, D. Chaussabel and A. O'Garra (2010). "An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis." *Nature* **466**(7309): 973-977.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bhatia, M., R. L. Zemans and S. Jeyaseelan (2012). "Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**(5): 566-572.
- Blomgran, R., L. Desvignes, V. Briken and J. D. Ernst (2012). "Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells." *Cell Host Microbe* **11**(1): 81-90.
- Blomgran, R. and J. D. Ernst (2011). "Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection." *J Immunol* **186**(12): 7110-7119.
- Boer, M. C., K. E. van Meijgaarden, J. Bastid, T. H. Ottenhoff and S. A. Joosten (2013). "CD39 is involved in mediating suppression by Mycobacterium bovis BCG-activated human CD8(+) CD39(+) regulatory T cells." *Eur J Immunol* **43**(7): 1925-1932.
- Bolin, C. A., D. L. Whipple, K. V. Khanna, J. M. Risdahl, P. K. Peterson and T. W. Molitor (1997). "Infection of swine with Mycobacterium bovis as a model of human tuberculosis." *J Infect Dis* **176**(6): 1559-1566.
- Brinkmann, V. and A. Zychlinsky (2007). "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs." *Nat Rev Microbiol* **5**(8): 577-582.
- Broughan, J. M., T. R. Crawshaw, S. H. Downs, J. Brewer and R. S. Clifton-Hadley (2013). "Mycobacterium bovis infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 2: A review of diagnostic methods." *Vet J* **198**(2): 346-351.
- Bru, A. and P. J. Cardona (2010). "Mathematical modeling of tuberculosis bacillary counts and cellular populations in the organs of infected mice." *PLoS One* **5**(9): e12985.
- Bruns, H., F. Stegelmann, M. Fabri, K. Dohner, G. van Zandbergen, M. Wagner, M. Skinner, R. L. Modlin and S. Stenger (2012). "Abelson tyrosine kinase controls phagosomal acidification required for killing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." *J Immunol* **189**(8): 4069-4078.
- Buddle, B. M., M. A. Skinner, D. N. Wedlock, G. W. de Lisle, H. M. Vordermeier and R. Glyn Hewinson (2005). "Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)* **85**(1-2): 19-24.
- Byrne, S. T., S. M. Denkin and Y. Zhang (2007). "Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis." *J Antimicrob Chemother* **59**(2): 313-316.
- Caceres, N. (2011). Estudi de la Infecció Tuberculosa Latent : importàcia del macròfag escumós i del cording en la supervivència de Mycobacterium tuberculosis Departament de genètica i microbiologia. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona. **Tesi doctoral**.
- Caceres, N., G. Tapia, I. Ojanguren, F. Altare, O. Gil, S. Pinto, C. Vilaplana and P. J. Cardona (2009). "Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models." *Tuberculosis (Edinb)* **89**(2): 175-182.

- Caceres, N., C. Vilaplana, C. Prats, E. Marzo, I. Llopis, J. Valls, D. Lopez and P. J. Cardona (2013). "Evolution and role of corded cell aggregation in *Mycobacterium tuberculosis* cultures." Tuberculosis (Edinb) **93**(6): 690-698.
- Cai, S., S. Batra, S. A. Lira, J. K. Kolls and S. Jeyaseelan (2010). "CXCL1 regulates pulmonary host defense to *Klebsiella* Infection via CXCL2, CXCL5, NF-kappaB, and MAPKs." J Immunol **185**(10): 6214-6225.
- Calderon, V. E., G. Valbuena, Y. Goez, B. M. Judy, M. B. Huante, P. Sutjita, R. K. Johnston, D. M. Estes, R. L. Hunter, J. K. Actor, J. D. Cirillo and J. J. Endsley (2013). "A humanized mouse model of tuberculosis." PLoS One **8**(5): e63331.
- Calmette, A., A. Boquet and L. Negre (1924). "Essais de vaccination contre l'infection tuberculeuse par voie buccale chez les petits animaux de laboratoire." Annales de l'Institut Pasteur **XXXVIII**: 399-404.
- Canetti, G. (1955). The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man; histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis. New York, Springer Pub. Co.
- Cardona, P. J. (2006). "RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection." Tuberculosis (Edinb) **86**(3-4): 273-289.
- Cardona, P. J. (2007). "New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment." Inflamm Allergy Drug Targets **6**(1): 27-39.
- Cardona, P. J. (2009). "A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection." Infection **37**(2): 80-86.
- Cardona, P. J. (2010). "Revisiting the natural history of tuberculosis. The inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **58**(1): 7-14.
- Cardona, P. J. (2011). "A spotlight on liquefaction: evidence from clinical settings and experimental models in tuberculosis." Clin Dev Immunol **2011**: 868246.
- Cardona, P. J. (2012). Ten Questions to Challenge the Natural History of Tuberculosis Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of *Mycobacterium Tuberculosis* Pathogenicity. P. J. Cardona, InTech.
- Cardona, P. J. (2014). On the spectrum of human pulmonary tuberculosis and its reproducibility in experimental modelling. Manuscript in preparation.
- Cardona, P. J., S. Gordillo, J. Diaz, G. Tapia, I. Amat, A. Pallares, C. Vilaplana, A. Ariza and V. Ausina (2003). "Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **71**(10): 5845-5854.
- Cardona, P. J. and J. Ivanyi (2011). "The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle bacilli." Enferm Infecc Microbiol Clin **29 Suppl 1**: 14-19.
- Cardona, P. J., R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, I. Ojanguren, A. Ariza and V. Ausina (2000). "Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*." Scand J Immunol **52**(2): 156-163.
- Cardona, P. J. and C. Vilaplana (2014). "Multiple consecutive infections might explain the lack of protection by BCG." PLoS One **9**(4): e94736.
- Caruso, A. M., N. Serbina, E. Klein, K. Triebold, B. R. Bloom and J. L. Flynn (1999). "Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis." J Immunol **162**(9): 5407-5416.
- Casadevall, A. and L. A. Pirofski (2003). "The damage-response framework of microbial pathogenesis." Nat Rev Microbiol **1**(1): 17-24.
- Caudrillier, A., K. Kessenbrock, B. M. Gilliss, J. X. Nguyen, M. B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb and M. R. Looney (2012). "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury." J Clin Invest **122**(7): 2661-2671.
- Chackerian, A. A., T. V. Perera and S. M. Behar (2001). "Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **69**(4): 2666-2674.

- Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R. M. Samstein, Y. Liang, A. Kas and A. Y. Rudensky (2009). "CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner." *Science* **326**(5955): 986-991.
- Chen, C. Y., D. Huang, R. C. Wang, L. Shen, G. Zeng, S. Yao, Y. Shen, L. Halliday, J. Fortman, M. McAllister, J. Estep, R. Hunt, D. Vasconcelos, G. Du, S. A. Porcelli, M. H. Larsen, W. R. Jacobs, Jr., B. F. Haynes, N. L. Letvin and Z. W. Chen (2009). "A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000392.
- Chen, M., M. Divangahi, H. Gan, D. S. Shin, S. Hong, D. M. Lee, C. N. Serhan, S. M. Behar and H. G. Remold (2008). "Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death." *J Exp Med* **205**(12): 2791-2801.
- Cheng, A. G., A. C. DeDent, O. Schneewind and D. Missiakas (2011). "A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation." *Trends Microbiol* **19**(5): 225-232.
- Chevalier, M. F. and L. Weiss (2013). "The split personality of regulatory T cells in HIV infection." *Blood* **121**(1): 29-37.
- Chiacchio, T., R. Casetti, O. Butera, V. Vanini, S. Carrara, E. Girardi, D. Di Mitri, L. Battistini, F. Martini, G. Borsellino and D. Goletti (2009). "Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis." *Clin Exp Immunol* **156**(3): 463-470.
- Clay, H., H. E. Volkman and L. Ramakrishnan (2008). "Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death." *Immunity* **29**(2): 283-294.
- Collins, F. M. (1971). "Immunogenicity of various mycobacteria and the corresponding levels of cross-protection developed between species." *Infect Immun* **4**(6): 688-696.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-569.
- Comstock, G. W. (1999). "How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults?" *Int J Tuberc Lung Dis* **3**(10): 847-850.
- Condos, R., B. Raju, A. Canova, B. Y. Zhao, M. Weiden, W. N. Rom and R. Pine (2003). "Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients." *Infect Immun* **71**(4): 2058-2064.
- Coomes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid and F. Powrie (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." *J Exp Med* **204**(8): 1757-1764.
- Cooper, A. M. (2009). "Cell-mediated immune responses in tuberculosis." *Annu Rev Immunol* **27**: 393-422.
- Cruz, A., A. G. Fraga, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, E. Torrado, M. Saraiva, D. R. Pereira, T. D. Randall, J. Pedrosa, A. M. Cooper and A. G. Castro (2010). "Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis." *J Exp Med* **207**(8): 1609-1616.
- Cruz, A., S. A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J. E. Pearl, J. Pedrosa, A. M. Cooper and A. G. Castro (2006). "Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection." *J Immunol* **177**(3): 1416-1420.
- Dannenbergs, A. J. (2006). *Pathogenesis of Human Pulmonary Tuberculosis: Insights from the Rabbit Model*. Washington, DC, ASM Press.
- Dannenbergs, A. M., Jr. and F. M. Collins (2001). "Progressive pulmonary tuberculosis is not due to increasing numbers of viable bacilli in rabbits, mice and guinea pigs,

- but is due to a continuous host response to mycobacterial products." Tuberculosis (Edinb) **81**(3): 229-242.
- Davis, S. L., E. L. Nuernberger, P. K. Um, C. Vidal, B. Jedynek, M. G. Pomper, W. R. Bishai and S. K. Jain (2009). "Noninvasive pulmonary [18F]-2-fluoro-deoxy-D-glucose positron emission tomography correlates with bactericidal activity of tuberculosis drug treatment." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4879-4884.
- de Cassan, S. C., A. A. Pathan, C. R. Sander, A. Minassian, R. Rowland, A. V. Hill, H. McShane and H. A. Fletcher (2010). "Investigating the induction of vaccine-induced Th17 and regulatory T cells in healthy, Mycobacterium bovis BCG-immunized adults vaccinated with a new tuberculosis vaccine, MVA85A." Clin Vaccine Immunol **17**(7): 1066-1073.
- de Val Perez, B., S. Lopez-Soria, M. Nofrarias, M. Martin, H. M. Vordermeier, B. Villarreal-Ramos, N. Romera, M. Escobar, D. Solanes, P. J. Cardona and M. Domingo (2011). "Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with Mycobacterium caprae." Clin Vaccine Immunol **18**(11): 1872-1881.
- Deknuydt, F., G. Bioley, D. Valmori and M. Ayyoub (2009). "IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells." Clin Immunol **131**(2): 298-307.
- Denis, M. (1991). "Human neutrophils, activated with cytokines or not, do not kill virulent Mycobacterium tuberculosis." J Infect Dis **163**(4): 919-920.
- Dharmadhikari, A. S. and E. A. Nardell (2008). "What animal models teach humans about tuberculosis." Am J Respir Cell Mol Biol **39**(5): 503-508.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz and G. Schuler (2002). "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." J Exp Med **196**(2): 247-253.
- Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger and G. Schuler (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med **193**(11): 1303-1310.
- Diedrich, C. R., J. T. Mattila, E. Klein, C. Janssen, J. Phuah, T. J. Sturgeon, R. C. Montelaro, P. L. Lin and J. L. Flynn (2010). "Reactivation of latent tuberculosis in cynomolgus macaques infected with SIV is associated with early peripheral T cell depletion and not virus load." PLoS One **5**(3): e9611.
- Divangahi, M., M. Chen, H. Gan, D. Desjardins, T. T. Hickman, D. M. Lee, S. Fortune, S. M. Behar and H. G. Remold (2009). "Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair." Nat Immunol **10**(8): 899-906.
- Divangahi, M., D. Desjardins, C. Nunes-Alves, H. G. Remold and S. M. Behar (2010). "Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis." Nat Immunol **11**(8): 751-758.
- Dock, W. (1946). "Apical localization of phthisis; its significance in treatment by prolonged rest in bed." Am Rev Tuberc **53**: 297-305.
- Dorhoi, A., C. Desel, V. Yeremeev, L. Pradl, V. Brinkmann, H. J. Mollenkopf, K. Hanke, O. Gross, J. Ruland and S. H. Kaufmann (2010). "The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control." J Exp Med **207**(4): 777-792.
- Dorhoi, A., M. Iannaccone, J. Maertzdorf, G. Nouailles, J. Weiner, 3rd and S. H. Kaufmann (2014). "Reverse translation in tuberculosis: neutrophils provide clues for understanding development of active disease." Front Immunol **5**: 36.
- Doz, E., R. Lombard, F. Carreras, D. Buzoni-Gatel and N. Winter (2013). "Mycobacteria-infected dendritic cells attract neutrophils that produce IL-10 and specifically shut down Th17 CD4 T cells through their IL-10 receptor." J Immunol **191**(7): 3818-3826.
- Driver, E. R., G. J. Ryan, D. R. Hoff, S. M. Irwin, R. J. Basaraba, I. Kramnik and A. J. Lenaerts (2012). "Evaluation of a mouse model of necrotic granuloma formation

- using C3HeB/FeJ mice for testing of drugs against Mycobacterium tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **56**(6): 3181-3195.
- Dutta, N. K., K. Mazumdar, S. G. Dastidar and J. H. Park (2007). "Activity of diclofenac used alone and in combination with streptomycin against Mycobacterium tuberculosis in mice." Int J Antimicrob Agents **30**(4): 336-340.
- Dwyer, K. M., D. Hanidziar, P. Putheti, P. A. Hill, S. Pommey, J. L. McRae, A. Winterhalter, G. Doherty, S. Deaglio, M. Koulmanda, W. Gao, S. C. Robson and T. B. Strom (2010). "Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype." Am J Transplant **10**(11): 2410-2420.
- Elkington, P., T. Shiomi, R. Breen, R. K. Nuttall, C. A. Ugarte-Gil, N. F. Walker, L. Saraiva, B. Pedersen, F. Mauri, M. Lipman, D. R. Edwards, B. D. Robertson, J. D'Armiento and J. S. Friedland (2011). "MMP-1 drives immunopathology in human tuberculosis and transgenic mice." J Clin Invest **121**(5): 1827-1833.
- Ermert, D., C. F. Urban, B. Laube, C. Goosmann, A. Zychlinsky and V. Brinkmann (2009). "Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections." J Innate Immun **1**(3): 181-193.
- Eruslanov, E. B., I. V. Lyadova, T. K. Kondratieva, K. B. Majorov, I. V. Scheglov, M. O. Orlova and A. S. Apt (2005). "Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice." Infect Immun **73**(3): 1744-1753.
- Eum, S. Y., J. H. Kong, M. S. Hong, Y. J. Lee, J. H. Kim, S. H. Hwang, S. N. Cho, L. E. Via and C. E. Barry, 3rd (2010). "Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB." Chest **137**(1): 122-128.
- Faria, A. M. and H. L. Weiner (2005). "Oral tolerance." Immunol Rev **206**: 232-259.
- Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak and B. R. Bloom (1995). "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." Immunity **2**(6): 561-572.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Fox, W., G. A. Ellard and D. A. Mitchison (1999). "Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications." Int J Tuberc Lung Dis **3**(10 Suppl 2): S231-279.
- Fu, L. M. (2003). "The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy." Int J Tuberc Lung Dis **7**(11): 1027-1032.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann and A. Zychlinsky (2007). "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." J Cell Biol **176**(2): 231-241.
- Gagneux, S. and P. M. Small (2007). "Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development." Lancet Infect Dis **7**(5): 328-337.
- Gao, Y., F. Lin, J. Su, Z. Gao, Y. Li, J. Yang, Z. Deng, B. Liu, A. Tsun and B. Li (2012). "Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of FOXP3(+) regulatory T cells." Genes Immun **13**(1): 1-13.
- Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs and A. Y. Rudensky (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6659-6664.

- Gil, O., I. Diaz, C. Vilaplana, G. Tapia, J. Diaz, M. Fort, N. Caceres, S. Pinto, J. Cayla, L. Corner, M. Domingo and P. J. Cardona (2010). "Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs." PLoS One **5**(4): e10030.
- Gill, W. P., N. S. Harik, M. R. Whiddon, R. P. Liao, J. E. Mittler and D. R. Sherman (2009). "A replication clock for Mycobacterium tuberculosis." Nat Med **15**(2): 211-214.
- Gillis, R. C., B. J. Daley, B. L. Enderson, D. P. Kestler and M. D. Karlstad (2007). "Regulation of apoptosis in eicosapentaenoic acid-treated HL-60 cells." J Surg Res **137**(1): 141-150.
- Glenny, R. W. and H. T. Robertson (2011). "Spatial distribution of ventilation and perfusion: mechanisms and regulation." Compr Physiol **1**(1): 375-395.
- Gold, B., M. Pingle, S. J. Brickner, N. Shah, J. Roberts, M. Rundell, W. C. Bracken, T. Warriar, S. Somersan, A. Venugopal, C. Darby, X. Jiang, J. D. Warren, J. Fernandez, O. Ouerfelli, E. L. Nuermberger, A. Cunningham-Bussel, P. Rath, T. Chidawanyika, H. Deng, R. Realubit, J. F. Glickman and C. F. Nathan (2012). "Nonsteroidal anti-inflammatory drug sensitizes Mycobacterium tuberculosis to endogenous and exogenous antimicrobials." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(40): 16004-16011.
- Gonzalez-Juarrero, M., A. Bosco-Lauth, B. Podell, C. Soffler, E. Brooks, A. Izzo, J. Sanchez-Campillo and R. Bowen (2013). "Experimental aerosol Mycobacterium bovis model of infection in goats." Tuberculosis (Edinb) **93**(5): 558-564.
- Gordon, A. H., P. D. Hart and M. R. Young (1980). "Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages." Nature **286**(5768): 79-80.
- Grant, C. R., R. Liberal, B. S. Holder, J. Cardone, Y. Ma, S. C. Robson, G. Mieli-Vergani, D. Vergani and M. S. Longhi (2014). "Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis." Hepatology **59**(3): 1007-1015.
- Green, A. M., J. T. Mattila, C. L. Bigbee, K. S. Bongers, P. L. Lin and J. L. Flynn (2010). "CD4(+) regulatory T cells in a cynomolgus macaque model of Mycobacterium tuberculosis infection." J Infect Dis **202**(4): 533-541.
- Grosset, J. (2003). "Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary." Antimicrob Agents Chemother **47**(3): 833-836.
- Gupta, U. D. and V. M. Katoch (2005). "Animal models of tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **85**(5-6): 277-293.
- Guzman, J. D., D. Evangelopoulos, A. Gupta, K. Birchall, S. Mwaigwisya, B. Saxty, T. D. McHugh, S. Gibbons, J. Malkinson and S. Bhakta (2013). "Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic assay." BMJ Open **3**(6).
- Hachicha, M., M. Pouliot, N. A. Petasis and C. N. Serhan (1999). "Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis." J Exp Med **189**(12): 1923-1930.
- Happel, K. I., P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson and J. K. Kolls (2005). "Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae." J Exp Med **202**(6): 761-769.
- Harats, D., N. Yacov, B. Gilburd, Y. Shoenfeld and J. George (2002). "Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates Mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions." J Am Coll Cardiol **40**(7): 1333-1338.
- Harizi, H., C. Grosset and N. Gualde (2003). "Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes." J Leukoc Biol **73**(6): 756-763.
- Harper, J., C. Skerry, S. L. Davis, R. Tasneen, M. Weir, I. Kramnik, W. R. Bishai, M. G. Pomper, E. L. Nuermberger and S. K. Jain (2012). "Mouse model of necrotic

- tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions." J Infect Dis **205**(4): 595-602.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.
- Harris, J. and J. Keane (2010). "How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity." Clin Exp Immunol **161**(1): 1-9.
- Hawn, T. R., A. I. Matheson, S. N. Maley and O. Vandal (2013). "Host-directed therapeutics for tuberculosis: can we harness the host?" Microbiol Mol Biol Rev **77**(4): 608-627.
- Ho, P., X. Wei and G. T. Seah (2010). "Regulatory T cells induced by Mycobacterium chelonae sensitization influence murine responses to bacille Calmette-Guerin." J Leukoc Biol **88**(6): 1073-1080.
- Hunninghake, G. W., A. J. Glazier, M. M. Monick and C. A. Dinarello (1987). "Interleukin-1 is a chemotactic factor for human T-lymphocytes." Am Rev Respir Dis **135**(1): 66-71.
- Iliopoulos, A., K. Psathakis, S. Aslanidis, L. Skagias and P. P. Sfikakis (2006). "Tuberculosis and granuloma formation in patients receiving anti-TNF therapy." Int J Tuberc Lung Dis **10**(5): 588-590.
- Ivanyi, J. and A. Zumla (2013). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs for adjunctive tuberculosis treatment." J Infect Dis **208**(2): 185-188.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (1999). "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." J Exp Med **190**(2): 229-239.
- Izcue, A., J. L. Coombes and F. Powrie (2006). "Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation." Immunol Rev **212**: 256-271.
- Jaron, B., E. Maranghi, C. Leclerc and L. Majlessi (2008). "Effect of attenuation of Treg during BCG immunization on anti-mycobacterial Th1 responses and protection against Mycobacterium tuberculosis." PLoS One **3**(7): e2833.
- Jones, B. E., R. Ryu, Z. Yang, M. D. Cave, J. M. Pogoda, M. Oyata and P. F. Barnes (1997). "Chest radiographic findings in patients with tuberculosis with recent or remote infection." Am J Respir Crit Care Med **156**(4 Pt 1): 1270-1273.
- Jones, G. S., H. J. Amirault and B. R. Andersen (1990). "Killing of Mycobacterium tuberculosis by neutrophils: a nonoxidative process." J Infect Dis **162**(3): 700-704.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-1294.
- Kamath, A. B., J. Alt, H. Debbabi and S. M. Behar (2003). "Toll-like receptor 4-defective C3H/HeJ mice are not more susceptible than other C3H substrains to infection with Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **71**(7): 4112-4118.
- Kang, D. D., Y. Lin, J. R. Moreno, T. D. Randall and S. A. Khader (2011). "Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis." PLoS One **6**(1): e16161.
- Kaplan, H. B., H. S. Edelson, H. M. Korchak, W. P. Given, S. Abramson and G. Weissmann (1984). "Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on human neutrophil functions in vitro and in vivo." Biochem Pharmacol **33**(3): 371-378.
- Kaufmann, S. H., S. T. Cole, V. Mizrahi, E. Rubin and C. Nathan (2005). "Mycobacterium tuberculosis and the host response." J Exp Med **201**(11): 1693-1697.

- Kaul, V., D. Bhattacharya, Y. Singh, L. Van Kaer, M. Peters-Golden, W. R. Bishai and G. Das (2012). "An important role of prostanoid receptor EP2 in host resistance to Mycobacterium tuberculosis infection in mice." J Infect Dis **206**(12): 1816-1825.
- Kaushal, D., S. Mehra, P. J. Didier and A. A. Lackner (2012). "The non-human primate model of tuberculosis." J Med Primatol **41**(3): 191-201.
- Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel and M. M. Braun (2001). "Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent." N Engl J Med **345**(15): 1098-1104.
- Keller, C., R. Hoffmann, R. Lang, S. Brandau, C. Hermann and S. Ehlers (2006). "Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes." Infect Immun **74**(7): 4295-4309.
- Khader, S. A. and A. M. Cooper (2008). "IL-23 and IL-17 in tuberculosis." Cytokine **41**(2): 79-83.
- Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko and F. Ramsdell (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-342.
- Kim, J. J., H. M. Lee, D. M. Shin, W. Kim, J. M. Yuk, H. S. Jin, S. H. Lee, G. H. Cha, J. M. Kim, Z. W. Lee, S. J. Shin, H. Yoo, Y. K. Park, J. B. Park, J. Chung, T. Yoshimori and E. K. Jo (2012). "Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action." Cell Host Microbe **11**(5): 457-468.
- Kindler, V., A. P. Sappino, G. E. Grau, P. F. Piguet and P. Vassalli (1989). "The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection." Cell **56**(5): 731-740.
- Kishimoto, T. (2005). "Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology." Annu Rev Immunol **23**: 1-21.
- Kisich, K. O., M. Higgins, G. Diamond and L. Heifets (2002). "Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils." Infect Immun **70**(8): 4591-4599.
- Koch, R. (1882). "Aetiologie der Tuberculose." Berl Klin Wochenschr **19**: 221-230.
- Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots and I. Joosten (2008). "Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells." Blood **112**(6): 2340-2352.
- Komatsu, N., M. E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann and S. Hori (2009). "Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(6): 1903-1908.
- Komatsu, N., K. Okamoto, S. Sawa, T. Nakashima, M. Oh-hora, T. Kodama, S. Tanaka, J. A. Bluestone and H. Takayanagi (2014). "Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis." Nat Med **20**(1): 62-68.
- Kong, N., Q. Lan, M. Chen, J. Wang, W. Shi, D. A. Horwitz, V. Quesniaux, B. Ryffel, Z. Liu, D. Brand, H. Zou and S. G. Zheng (2012). "Antigen-specific transforming growth factor beta-induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance." Arthritis Rheum **64**(8): 2548-2558.
- Koo, M. S., C. Manca, G. Yang, P. O'Brien, N. Sung, L. Tsenova, S. Subbian, D. Fallows, G. Muller, S. Ehrt and G. Kaplan (2011). "Phosphodiesterase 4 inhibition reduces innate immunity and improves isoniazid clearance of Mycobacterium tuberculosis in the lungs of infected mice." PLoS One **6**(2): e17091.
- Korf, H., S. Vander Beken, M. Romano, K. R. Steffensen, B. Stijlemans, J. A. Gustafsson, J. Grooten and K. Huygen (2009). "Liver X receptors contribute to

- the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice." J Clin Invest **119**(6): 1626-1637.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." Nature **448**(7152): 484-487.
- Kota, S. K., S. Jammula, P. R. Tripathy, S. Panda and K. D. Modi (2011). "Effect of vitamin D supplementation in type 2 diabetes patients with pulmonary tuberculosis." Diabetes Metab Syndr **5**(2): 85-89.
- Krysko, D. V., K. D'Herde and P. Vandenabeele (2006). "Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences." Apoptosis **11**(10): 1709-1726.
- Kuijl, C., N. D. Savage, M. Marsman, A. W. Tuin, L. Janssen, D. A. Egan, M. Ketema, R. van den Nieuwendijk, S. J. van den Eeden, A. Geluk, A. Poot, G. van der Marel, R. L. Beijersbergen, H. Overkleeft, T. H. Ottenhoff and J. Neefjes (2007). "Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1." Nature **450**(7170): 725-730.
- Lalvani, A., R. Brookes, R. J. Wilkinson, A. S. Malin, A. A. Pathan, P. Andersen, H. Dockrell, G. Pasvol and A. V. Hill (1998). "Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 270-275.
- Lam, K. K., X. Zheng, R. Forestieri, A. D. Balgi, M. Nodwell, S. Vollett, H. J. Anderson, R. J. Andersen, Y. Av-Gay and M. Roberge (2012). "Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*." PLoS Pathog **8**(5): e1002691.
- Langermans, J. A., P. Andersen, D. van Soolingen, R. A. Vervenne, P. A. Frost, T. van der Laan, L. A. van Pinxteren, J. van den Hombergh, S. Kroon, I. Peekel, S. Florquin and A. W. Thomas (2001). "Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on *Mycobacterium tuberculosis* infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11497-11502.
- Langermans, J. A., T. M. Doherty, R. A. Vervenne, T. van der Laan, K. Lyashchenko, R. Greenwald, E. M. Agger, C. Aagaard, H. Weiler, D. van Soolingen, W. Dalemans, A. W. Thomas and P. Andersen (2005). "Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6." Vaccine **23**(21): 2740-2750.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.
- Lee, H. S., J. Y. Oh, J. H. Lee, C. G. Yoo, C. T. Lee, Y. W. Kim, S. K. Han, Y. S. Shim and J. J. Yim (2004). "Response of pulmonary tuberculomas to anti-tuberculous treatment." Eur Respir J **23**(3): 452-455.
- Lee, K. S. and J. G. Im (1995). "CT in adults with tuberculosis of the chest: characteristic findings and role in management." AJR Am J Roentgenol **164**(6): 1361-1367.
- Leepiyasakulchai, C., L. Ignatowicz, A. Pawlowski, G. Kallenius and M. Skold (2012). "Failure to recruit anti-inflammatory CD103+ dendritic cells and a diminished CD4+ Foxp3+ regulatory T cell pool in mice that display excessive lung inflammation and increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **80**(3): 1128-1139.
- Levy, L. and Y. Ilan (2007). "Oral immune regulation: a new mode of therapy against chronic viral infections." Recent Pat Antiinfect Drug Discov **2**(3): 217-221.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins and L. A. Fouser (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed

- by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." J Exp Med **203**(10): 2271-2279.
- Lin, P. L., A. Myers, L. Smith, C. Bigbee, M. Bigbee, C. Fuhrman, H. Grieser, I. Chiosea, N. N. Voitenek, S. V. Capuano, E. Klein and J. L. Flynn (2010). "Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent Mycobacterium tuberculosis infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model." Arthritis Rheum **62**(2): 340-350.
- Lin, Y., S. Ritchea, A. Logar, S. Slight, M. Messmer, J. Rangel-Moreno, L. Guglani, J. F. Alcorn, H. Strawbridge, S. M. Park, R. Onishi, N. Nyugen, M. J. Walter, D. Pociask, T. D. Randall, S. L. Gaffen, Y. Iwakura, J. K. Kolls and S. A. Khader (2009). "Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen Francisella tularensis." Immunity **31**(5): 799-810.
- Liu, F., J. Poursine-Laurent, H. Y. Wu and D. C. Link (1997). "Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation." Blood **90**(7): 2583-2590.
- Liu, P. T., S. Stenger, D. H. Tang and R. L. Modlin (2007). "Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin." J Immunol **179**(4): 2060-2063.
- Liu, Y. X., G. L. Yang, Y. Zhou, H. M. Zhang, J. Y. Zhang, S. Y. Wang, Y. Liu, S. T. Liu, L. K. Zhang and H. Wang (2011). "[Preliminary study of the Th17/Treg immunoregulation in patients coinfecting with TB and HIV before and after HAART]." Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi **25**(5): 348-350.
- Longhi, M. S., M. J. Hussain, R. R. Mitry, S. K. Arora, G. Mieli-Vergani, D. Vergani and Y. Ma (2006). "Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis." J Immunol **176**(7): 4484-4491.
- Lowe, D. M., A. K. Bandara, G. E. Packe, R. D. Barker, R. J. Wilkinson, C. J. Griffiths and A. R. Martineau (2013). "Neutrophilia independently predicts death in tuberculosis." Eur Respir J **42**(6): 1752-1757.
- Lowe, D. M., P. S. Redford, R. J. Wilkinson, A. O'Garra and A. R. Martineau (2012). "Neutrophils in tuberculosis: friend or foe?" Trends Immunol **33**(1): 14-25.
- Lu, L. F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng and R. J. Noelle (2006). "Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance." Nature **442**(7106): 997-1002.
- Lurie, M. B., S. Abramson and A. G. Heppleston (1952). "On the response of genetically resistant and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human type tubercle bacilli and the nature of resistance to tuberculosis." J Exp Med **95**(2): 119-134.
- Ly, D., Q. S. Mi, S. Hussain and T. L. Delovitch (2006). "Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **177**(6): 3695-3704.
- Lyadova, I. (2012). Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity. P. J. Cardona, InTech.
- Maeda, H., Y. Yamamura, Y. Ogawa and J. Maeda (1977). "Mycobacterial antigens relating to experimental pulmonary cavity formation." Am Rev Respir Dis **115**(4): 617-623.
- Mahajan, S., H. K. Dkhar, V. Chandra, S. Dave, R. Nanduri, A. K. Janmeja, J. N. Agrewala and P. Gupta (2012). "Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPARgamma and TR4 for survival." J Immunol **188**(11): 5593-5603.

- Maiga, M., N. Agarwal, N. C. Ammerman, R. Gupta, H. Guo, M. C. Maiga, S. Lun and W. R. Bishai (2012). "Successful shortening of tuberculosis treatment using adjuvant host-directed therapy with FDA-approved phosphodiesterase inhibitors in the mouse model." PLoS One **7**(2): e30749.
- Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **11**(8): 519-531.
- Marin, N. D., S. C. Paris, V. M. Velez, C. A. Rojas, M. Rojas and L. F. Garcia (2010). "Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **90**(4): 252-261.
- Martineau, A. R. (2012). "Old wine in new bottles: vitamin D in the treatment and prevention of tuberculosis." Proc Nutr Soc **71**(1): 84-89.
- Martineau, A. R., S. M. Newton, K. A. Wilkinson, B. Kampmann, B. M. Hall, N. Nawroly, G. E. Packe, R. N. Davidson, C. J. Griffiths and R. J. Wilkinson (2007a). "Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria." J Clin Invest **117**(7): 1988-1994.
- Martineau, A. R., P. M. Timms, G. H. Bothamley, Y. Hanifa, K. Islam, A. P. Claxton, G. E. Packe, J. C. Moore-Gillon, M. Darmalingam, R. N. Davidson, H. J. Milburn, L. V. Baker, R. D. Barker, N. J. Woodward, T. R. Venton, K. E. Barnes, C. J. Mullett, A. K. Coussens, C. M. Rutterford, C. A. Mein, G. R. Davies, R. J. Wilkinson, V. Nikolayevskyy, F. A. Drobniowski, S. M. Eldridge and C. J. Griffiths (2011). "High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial." Lancet **377**(9761): 242-250.
- Martineau, A. R., R. J. Wilkinson, K. A. Wilkinson, S. M. Newton, B. Kampmann, B. M. Hall, G. E. Packe, R. N. Davidson, S. M. Eldridge, Z. J. Maunsell, S. J. Rainbow, J. L. Berry and C. J. Griffiths (2007b). "A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria." Am J Respir Crit Care Med **176**(2): 208-213.
- Marzo, E., C. Vilaplana, G. Tapia, J. Diaz, V. Garcia and P. J. Cardona (2014). "Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **94**(1): 55-64.
- McCune, R. M., F. M. Feldmann, H. P. Lambert and W. McDermott (1966). "Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues." J Exp Med **123**(3): 445-468.
- McMurray, D. N. (1994). Guinea pig model of tuberculosis. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. B. R. Bloom. Washington, DC, American Society for Microbiology: 135-147.
- Medlar, E. M. and K. T. Sasano (1936). "A study of pathology of experimental tuberculosis." Am Rev Tuberc **34**: 456.
- Milanes-Virelles, M. T., I. Garcia-Garcia, Y. Santos-Herrera, M. Valdes-Quintana, C. M. Valenzuela-Silva, G. Jimenez-Madrigal, T. I. Ramos-Gomez, I. Bello-Rivero, N. Fernandez-Olivera, R. B. Sanchez-de la Osa, C. Rodriguez-Acosta, L. Gonzalez-Mendez, G. Martinez-Sanchez and P. A. Lopez-Saura (2008). "Adjuvant interferon gamma in patients with pulmonary atypical Mycobacteriosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." BMC Infect Dis **8**: 17.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" Nat Rev Immunol **4**(11): 841-855.
- Misra, U. K., J. Kalita and P. P. Nair (2010). "Role of aspirin in tuberculous meningitis: a randomized open label placebo controlled trial." J Neurol Sci **293**(1-2): 12-17.
- Mitchell, S., G. Thomas, K. Harvey, D. Cottell, K. Reville, G. Berlasconi, N. A. Petasis, L. Erwig, A. J. Rees, J. Savill, H. R. Brady and C. Godson (2002). "Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of

- inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo." J Am Soc Nephrol **13**(10): 2497-2507.
- Mitchison, D. A. and K. C. Chang (2009). "Experimental models of tuberculosis: can we trust the mouse?" Am J Respir Crit Care Med **180**(3): 201-202.
- Miyao, T., S. Floess, R. Setoguchi, H. Luche, H. J. Fehling, H. Waldmann, J. Huehn and S. Hori (2012). "Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells." Immunity **36**(2): 262-275.
- Molloy, A., P. Laochumroonvorapong and G. Kaplan (1994). "Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin." J Exp Med **180**(4): 1499-1509.
- Morel, C., E. Badell, V. Abadie, M. Robledo, N. Setterblad, J. C. Gluckman, B. Gicquel, S. Boudaly and N. Winter (2008). "Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice." Eur J Immunol **38**(2): 437-447.
- Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg and H. Cheroutre (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.
- Munoz-Elias, E. J., J. Timm, T. Botha, W. T. Chan, J. E. Gomez and J. D. McKinney (2005). "Replication dynamics of Mycobacterium tuberculosis in chronically infected mice." Infect Immun **73**(1): 546-551.
- Nandi, B. and S. M. Behar (2011). "Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection." J Exp Med **208**(11): 2251-2262.
- Napier, R. J., W. Rafi, M. Cheruvu, K. R. Powell, M. A. Zaunbrecher, W. Bornmann, P. Salgame, T. M. Shinnick and D. Kalman (2011). "Imatinib-sensitive tyrosine kinases regulate mycobacterial pathogenesis and represent therapeutic targets against tuberculosis." Cell Host Microbe **10**(5): 475-485.
- Narasaraju, T., E. Yang, R. P. Samy, H. H. Ng, W. P. Poh, A. A. Liew, M. C. Phoon, N. van Rooijen and V. T. Chow (2011). "Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis." Am J Pathol **179**(1): 199-210.
- Negrotto, S., E. Malaver, M. E. Alvarez, N. Pacienza, L. P. D'Atri, R. G. Pozner, R. M. Gomez and M. Schattner (2006). "Aspirin and salicylate suppress polymorphonuclear apoptosis delay mediated by proinflammatory stimuli." J Pharmacol Exp Ther **319**(2): 972-979.
- Nouailles, G., A. Dorhoi, M. Koch, J. Zerrahn, J. Weiner, 3rd, K. C. Fae, F. Arrey, S. Kuhlmann, S. Bandermann, D. Loewe, H. J. Mollenkopf, A. Vogelzang, C. Meyer-Schwesinger, H. W. Mittrucker, G. McEwen and S. H. Kaufmann (2014). "CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis." J Clin Invest **124**(3): 1268-1282.
- Nursyam, E. W., Z. Amin and C. M. Rumende (2006). "The effect of vitamin D as supplementary treatment in patients with moderately advanced pulmonary tuberculous lesion." Acta Med Indones **38**(1): 3-5.
- O'Garra, A., P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson and M. P. Berry (2013). "The immune response in tuberculosis." Annu Rev Immunol **31**: 475-527.
- Ochi, H., M. Abraham, H. Ishikawa, D. Frenkel, K. Yang, A. S. Basso, H. Wu, M. L. Chen, R. Gandhi, A. Miller, R. Maron and H. L. Weiner (2006). "Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells." Nat Med **12**(6): 627-635.
- Ogunmekan, D. A. (1978). "The sensitization of children by opportunist mycobacteria in Lagos, Nigeria." J Hyg (Lond) **80**(3): 321-325.
- Okamoto Yoshida, Y., M. Umemura, A. Yahagi, R. L. O'Brien, K. Ikuta, K. Kishihara, H. Hara, S. Nakae, Y. Iwakura and G. Matsuzaki (2010). "Essential role of IL-17A

- in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung." J Immunol **184**(8): 4414-4422.
- Oliveira, S. H., C. Canetti, R. A. Ribeiro and F. Q. Cunha (2008). "Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF-alpha and IL-1beta released by mast cells." Inflammation **31**(1): 36-46.
- Orme, I. M. (2005). "Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines." Tuberculosis (Edinb) **85**(1-2): 13-17.
- Ouyang, W., J. K. Kolls and Y. Zheng (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-467.
- Pan, H., B. S. Yan, M. Rojas, Y. V. Shebzukhov, H. Zhou, L. Kobzik, D. E. Higgins, M. J. Daly, B. R. Bloom and I. Kramnik (2005). "Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis." Nature **434**(7034): 767-772.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Parrish, N. M., J. D. Dick and W. R. Bishai (1998). "Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*." Trends Microbiol **6**(3): 107-112.
- Peres, C. M., L. de Paula, A. I. Medeiros, C. A. Sorgi, E. G. Soares, D. Carlos, M. Peters-Golden, C. L. Silva and L. H. Faccioli (2007). "Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*." Microbes Infect **9**(4): 483-489.
- Petrofsky, M. and L. E. Bermudez (1999). "Neutrophils from *Mycobacterium avium*-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 beta and have a putative role in early host response." Clin Immunol **91**(3): 354-358.
- Pinault, L., J. S. Han, C. M. Kang, J. Franco and D. R. Ronning (2013). "Zafirlukast inhibits complexation of Lsr2 with DNA and growth of *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2134-2140.
- Prophet, E. B., B. Mills, J. B. Arrington and L. H. Sobin, editors. (1992). AFIP Laboratory methods in histotechnology Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology.
- Quinn, K. M., R. S. McHugh, F. J. Rich, L. M. Goldsack, G. W. de Lisle, B. M. Buddle, B. Delahunt and J. R. Kirman (2006). "Inactivation of CD4+ CD25+ regulatory T cells during early mycobacterial infection increases cytokine production but does not affect pathogen load." Immunol Cell Biol **84**(5): 467-474.
- Rajaram, M. V., M. N. Brooks, J. D. Morris, J. B. Torrelles, A. K. Azad and L. S. Schlesinger (2010). "Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses." J Immunol **185**(2): 929-942.
- Ramos-Kichik, V., R. Mondragon-Flores, M. Mondragon-Castelan, S. Gonzalez-Pozos, S. Muniz-Hernandez, O. Rojas-Espinosa, R. Chacon-Salinas, S. Estrada-Parra and I. Estrada-Garcia (2009). "Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*." Tuberculosis (Edinb) **89**(1): 29-37.
- Reyes-Ruvalcaba, D., C. Gonzalez-Cortes and O. M. Rivero-Lezcano (2008). "Human phagocytes lack the ability to kill *Mycobacterium gordonae*, a non-pathogenic mycobacteria." Immunol Lett **116**(1): 72-78.
- Rhoades, E. R., A. M. Cooper and I. M. Orme (1995). "Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **63**(10): 3871-3877.
- Rhoades, E. R., A. A. Frank and I. M. Orme (1997). "Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*." Tuber Lung Dis **78**(1): 57-66.
- Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, R. Rojas, Z. Toossi, R. Dietze, W. H. Boom, E. Maciel and C. S. Hirsch (2006). "A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis." Clin Exp Immunol **144**(1): 25-34.

- Riley, R. L. (1957). "Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis." Am Rev Tuberc **76**(6): 931-941.
- Rivas-Santiago, B., R. Hernandez-Pando, C. Carranza, E. Juarez, J. L. Contreras, D. Aguilar-Leon, M. Torres and E. Sada (2008). "Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells." Infect Immun **76**(3): 935-941.
- Roach, D. R., A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe and W. J. Britton (2002). "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection." J Immunol **168**(9): 4620-4627.
- Roberts, T., N. Beyers, A. Aguirre and G. Walzl (2007). "Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta , and interleukin-4 mRNA levels." J Infect Dis **195**(6): 870-878.
- Roberts, V., J. Stagg and K. M. Dwyer (2014). "The Role of Ectonucleotidases CD39 and CD73 and Adenosine Signaling in Solid Organ Transplantation." Front Immunol **5**: 64.
- Roca, F. J. and L. Ramakrishnan (2013). "TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species." Cell **153**(3): 521-534.
- Rosenthal, I. M., R. Tasneen, C. A. Peloquin, M. Zhang, D. Almeida, K. E. Mdluli, P. C. Karakousis, J. H. Grosset and E. L. Nuermberger (2012). "Dose-ranging comparison of rifampin and rifapentine in two pathologically distinct murine models of tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **56**(8): 4331-4340.
- Rovai, L. E., H. R. Herschman and J. B. Smith (1998). "The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia." J Leukoc Biol **64**(4): 494-502.
- Ruemmele, F. M. and H. Garnier-Lengline (2013). "Transforming growth factor and intestinal inflammation: the role of nutrition." Nestle Nutr Inst Workshop Ser **77**: 91-98.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol **22**: 531-562.
- Sanchez, J., L. Tomas, N. Ortega, A. J. Buendia, L. del Rio, J. Salinas, J. Bezos, M. R. Caro and J. A. Navarro (2011). "Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitary pulmonary tuberculosis in naturally infected goats." J Comp Pathol **145**(2-3): 107-117.
- Sarlo, K., J. S. Parris, E. D. Clark, P. A. Horn, M. K. Robinson, J. A. McCay, V. L. Peachee, Y. L. Veloso and K. L. White, Jr. (2000). "Influence of MHC background on the antibody response to detergent enzymes in the mouse intranasal test." Toxicol Sci **58**(2): 299-305.
- Sasindran, S. J. and J. B. Torrelles (2011). "Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium?" Front Microbiol **2**: 2.
- Sawant, K. V. and D. N. McMurray (2007). "Guinea pig neutrophils infected with Mycobacterium tuberculosis produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures." Infect Immun **75**(4): 1870-1877.
- Schoeman, J. F., A. Janse van Rensburg, J. A. Laubscher and P. Springer (2011). "The role of aspirin in childhood tuberculous meningitis." J Child Neurol **26**(8): 956-962.
- Schoeman, J. F., P. Springer, A. J. van Rensburg, S. Swanevelder, W. A. Hanekom, P. A. Haslett and G. Kaplan (2004). "Adjunctive thalidomide therapy for childhood tuberculous meningitis: results of a randomized study." J Child Neurol **19**(4): 250-257.

- Seiler, P., P. Aichele, S. Bandermann, A. E. Hauser, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, S. Ehlers, H. J. Mollenkopf and S. H. Kaufmann (2003). "Early granuloma formation after aerosol Mycobacterium tuberculosis infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines." Eur J Immunol **33**(10): 2676-2686.
- Shafiani, S., C. Dinh, J. M. Ertelt, A. O. Moguche, I. Siddiqui, K. S. Smigiel, P. Sharma, D. J. Campbell, S. S. Way and K. B. Urdahl (2013). "Pathogen-specific Treg cells expand early during mycobacterium tuberculosis infection but are later eliminated in response to Interleukin-12." Immunity **38**(6): 1261-1270.
- Shafiani, S., G. Tucker-Heard, A. Kariyone, K. Takatsu and K. B. Urdahl (2010). "Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis." J Exp Med **207**(7): 1409-1420.
- Sharma, S., I. Verma and G. K. Khuller (2000). "Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against Mycobacterium tuberculosis H37Rv: in vitro and ex vivo study." Eur Respir J **16**(1): 112-117.
- Shigeto, E., H. Tasaka, M. Yamamoto, T. Kataoka, S. Haga, S. Nagao, H. Tajima, A. Kurashima, A. Aoyagi, R. Wada and et al. (1993). "[Tuberculin sensitivity to purified protein derivatives from Mycobacterium other than tuberculosis (PPD-B, PPD-Y, PPD-F and PPD-C) and PPDs among patients with mycobacteriosis--cooperative study of the Research Committee for the Mycobacteriosis in Japan]." Kekkaku **68**(5): 351-360.
- Shu, C. C., M. F. Wu, C. L. Hsu, C. T. Huang, J. Y. Wang, S. L. Hsieh, C. J. Yu, L. N. Lee and P. C. Yang (2013). "Apoptosis-associated biomarkers in tuberculosis: promising for diagnosis and prognosis prediction." BMC Infect Dis **13**: 45.
- Singh, S. P., H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick and J. M. Farber (2008). "Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6." J Immunol **180**(1): 214-221.
- Singh, V., S. Jamwal, R. Jain, P. Verma, R. Gokhale and K. V. Rao (2012). "Mycobacterium tuberculosis-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype." Cell Host Microbe **12**(5): 669-681.
- Sissons, J., B. S. Yan, A. V. Pichugin, A. Kirby, M. J. Daly and I. Kramnik (2009). "Multigenic control of tuberculosis resistance: analysis of a QTL on mouse chromosome 7 and its synergism with sst1." Genes Immun **10**(1): 37-46.
- Skerry, C., J. Harper, M. Klunk, W. R. Bishai and S. K. Jain (2012). "Adjunctive TNF inhibition with standard treatment enhances bacterial clearance in a murine model of necrotic TB granulomas." PLoS One **7**(6): e39680.
- Skinner, M. A., B. M. Buddle, D. N. Wedlock, D. Keen, G. W. de Lisle, R. E. Tascon, J. C. Ferraz, D. B. Lowrie, P. J. Cockle, H. M. Vordermeier and R. G. Hewinson (2003). "A DNA prime-Mycobacterium bovis BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis." Infect Immun **71**(9): 4901-4907.
- Skinner, M. A., D. N. Wedlock, G. W. de Lisle, M. M. Cooke, R. E. Tascon, J. C. Ferraz, D. B. Lowrie, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson and B. M. Buddle (2005). "The order of prime-boost vaccination of neonatal calves with Mycobacterium bovis BCG and a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins Hsp65, Hsp70, and Apa is not critical for enhancing protection against bovine tuberculosis." Infect Immun **73**(7): 4441-4444.
- Slight, S. R. and S. A. Khader (2013). "Chemokines shape the immune responses to tuberculosis." Cytokine Growth Factor Rev **24**(2): 105-113.
- Smith, D. W., D. N. McMurray, E. H. Wiegand, A. A. Grover and G. E. Harding (1970). "Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. IV. Early events in the course of infection in vaccinated and nonvaccinated guinea pigs." Am Rev Respir Dis **102**(6): 937-949.

- Strang, J. I., H. H. Kakaza, D. G. Gibson, D. J. Girling, A. J. Nunn and W. Fox (1987). "Controlled trial of prednisolone as adjuvant in treatment of tuberculous constrictive pericarditis in Transkei." Lancet **2**(8573): 1418-1422.
- Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser and D. G. Russell (1994). "Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase." Science **263**(5147): 678-681.
- Subbian, S., L. Tsenova, P. O'Brien, G. Yang, M. S. Koo, B. Peixoto, D. Fallows, V. Dartois, G. Muller and G. Kaplan (2011a). "Phosphodiesterase-4 inhibition alters gene expression and improves isoniazid-mediated clearance of Mycobacterium tuberculosis in rabbit lungs." PLoS Pathog **7**(9): e1002262.
- Subbian, S., L. Tsenova, P. O'Brien, G. Yang, M. S. Koo, B. Peixoto, D. Fallows, J. B. Zeldis, G. Muller and G. Kaplan (2011b). "Phosphodiesterase-4 inhibition combined with isoniazid treatment of rabbits with pulmonary tuberculosis reduces macrophage activation and lung pathology." Am J Pathol **179**(1): 289-301.
- Sugawara, I., T. Udagawa and H. Yamada (2004). "Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis." Infect Immun **72**(3): 1804-1806.
- Sugawara, I., H. Yamada, S. Hua and S. Mizuno (2001). "Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection." Microbiol Immunol **45**(11): 743-750.
- Taams, L. S., J. M. van Amelsfort, M. M. Tiemessen, K. M. Jacobs, E. C. de Jong, A. N. Akbar, J. W. Bijlsma and F. P. Lefeber (2005). "Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells." Hum Immunol **66**(3): 222-230.
- Tadokera, R., K. A. Wilkinson, G. A. Meintjes, K. H. Skolimowska, K. Matthews, R. Seldon, M. X. Rangaka, G. Maartens and R. J. Wilkinson (2013). "Role of the interleukin 10 family of cytokines in patients with immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV infection and tuberculosis." J Infect Dis **207**(7): 1148-1156.
- Tan, B. H., C. Meinken, M. Bastian, H. Bruns, A. Legaspi, M. T. Ochoa, S. R. Krutzik, B. R. Bloom, T. Ganz, R. L. Modlin and S. Stenger (2006). "Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens." J Immunol **177**(3): 1864-1871.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-296.
- Thwaites, G. E., D. B. Nguyen, H. D. Nguyen, T. Q. Hoang, T. T. Do, T. C. Nguyen, Q. H. Nguyen, T. T. Nguyen, N. H. Nguyen, T. N. Nguyen, N. L. Nguyen, N. T. Vu, H. H. Cao, T. H. Tran, P. M. Pham, T. D. Nguyen, K. Stepniewska, N. J. White and J. J. Farrar (2004). "Dexamethasone for the treatment of tuberculous meningitis in adolescents and adults." N Engl J Med **351**(17): 1741-1751.
- Tobin, D. M., F. J. Roca, S. F. Oh, R. McFarland, T. W. Vickery, J. P. Ray, D. C. Ko, Y. Zou, N. D. Bang, T. T. Chau, J. C. Vary, T. R. Hawn, S. J. Dunstan, J. J. Farrar, G. E. Thwaites, M. C. King, C. N. Serhan and L. Ramakrishnan (2012). "Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections." Cell **148**(3): 434-446.
- Tobin, D. M., J. C. Vary, Jr., J. P. Ray, G. S. Walsh, S. J. Dunstan, N. D. Bang, D. A. Hagg, S. Khadge, M. C. King, T. R. Hawn, C. B. Moens and L. Ramakrishnan (2010). "The It4h locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans." Cell **140**(5): 717-730.
- Torrado, E. and A. M. Cooper (2010). "IL-17 and Th17 cells in tuberculosis." Cytokine Growth Factor Rev **21**(6): 455-462.
- Trevor, A., B. Katzung and S. Masters (2010). Katzung & Trevor's Pharmacology Examination and Board Review, Ninth Edition USA, McGraw-Hill.

- Trunz, B. B., P. Fine and C. Dye (2006). "Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness." Lancet **367**(9517): 1173-1180.
- Ueda, Y., D. W. Cain, M. Kuraoka, M. Kondo and G. Kelsoe (2009). "IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia." J Immunol **182**(10): 6477-6484.
- Ulrichs, T., G. A. Kosmiadi, V. Trusov, S. Jorg, L. Pradl, M. Titukhina, V. Mishenko, N. Gushina and S. H. Kaufmann (2004). "Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung." J Pathol **204**(2): 217-228.
- Umetsu, D. T. and R. H. DeKruyff (2006). "The regulation of allergy and asthma." Immunol Rev **212**: 238-255.
- van Crevel, R., T. H. Ottenhoff and J. W. van der Meer (2002). "Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis." Clin Microbiol Rev **15**(2): 294-309.
- Vandiviere, H. M., I. G. Melvin, R. Narain, W. D. Harris and S. D. Chaparas (1980). "Profiles of skin test reactivity to antigens of various mycobacterial species in a human population and in experimental infections." Tubercle **61**(4): 245-257.
- Verreck, F. A., R. A. Vervenne, I. Kondova, K. W. van Kralingen, E. J. Remarque, G. Braskamp, N. M. van der Werff, A. Kersbergen, T. H. Ottenhoff, P. J. Heidt, S. C. Gilbert, B. Gicquel, A. V. Hill, C. Martin, H. McShane and A. W. Thomas (2009). "MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, phoP deficient M. tuberculosis vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques." PLoS One **4**(4): e5264.
- Via, L. E., P. L. Lin, S. M. Ray, J. Carrillo, S. S. Allen, S. Y. Eum, K. Taylor, E. Klein, U. Manjunatha, J. Gonzales, E. G. Lee, S. K. Park, J. A. Raleigh, S. N. Cho, D. N. McMurray, J. L. Flynn and C. E. Barry, 3rd (2008). "Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates." Infect Immun **76**(6): 2333-2340.
- Via, L. E., D. M. Weiner, D. Schimel, P. L. Lin, E. Dayao, S. L. Tankersley, Y. Cai, M. T. Coleman, J. Tomko, P. Paripati, M. Orandle, R. J. Kastenmayer, M. Tartakovsky, A. Rosenthal, D. Portevin, S. Y. Eum, S. Lahouar, S. Gagneux, D. B. Young, J. L. Flynn and C. E. Barry, 3rd (2013). "Differential virulence and disease progression following Mycobacterium tuberculosis complex infection of the common marmoset (*Callithrix jacchus*)." Infect Immun **81**(8): 2909-2919.
- Vilaplana, C. and P. J. Cardona (2012). The Hidden History of Tuberculin. Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity. P. J. Cardona, InTech.
- Vilaplana, C. and P. J. Cardona (2014a). "The lack of a big picture in tuberculosis: the clinical point of view, the problems of experimental modeling and immunomodulation. The factors we should consider when designing novel treatment strategies." Front Microbiol **5**: 55.
- Vilaplana, C., E. Marzo, G. Tapia, J. Diaz, V. Garcia and P. J. Cardona (2013). "Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis." J Infect Dis **208**(2): 199-202.
- Vilaplana, C., C. Prats, E. Marzo, C. Barril, M. Vegue, J. Diaz, J. Valls, D. Lopez and P. J. Cardona (2014b). "To achieve an earlier IFN-gamma response is not sufficient to control Mycobacterium tuberculosis infection in mice." PLoS One **9**(6): e100830.
- Volkman, H. E., T. C. Pozos, J. Zheng, J. M. Davis, J. F. Rawls and L. Ramakrishnan (2010). "Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium." Science **327**(5964): 466-469.
- Vordermeier, H. M., P. C. Cockle, A. Whelan, S. Rhodes, N. Palmer, D. Bakker and R. G. Hewinson (1999). "Development of diagnostic reagents to differentiate

- between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle." Clin Diagn Lab Immunol **6**(5): 675-682.
- Vordermeier, H. M., B. Villarreal-Ramos, P. J. Cockle, M. McAulay, S. G. Rhodes, T. Thacker, S. C. Gilbert, H. McShane, A. V. Hill, Z. Xing and R. G. Hewinson (2009). "Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis." Infect Immun **77**(8): 3364-3373.
- Walker, F., H. H. Zhang, V. Matthews, J. Weinstock, E. C. Nice, M. Ernst, S. Rose-John and A. W. Burgess (2008). "IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice." Blood **111**(8): 3978-3985.
- Walker, N. F., G. Meintjes and R. J. Wilkinson (2013). "HIV-1 and the immune response to TB." Future Virol **8**(1): 57-80.
- Wallace, J. G. (1961). "The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice." Am Rev Respir Dis **83**: 866-871.
- Wang, J., A. Ioan-Facsinay, E. I. van der Voort, T. W. Huizinga and R. E. Toes (2007). "Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells." Eur J Immunol **37**(1): 129-138.
- Waters, W. R., M. F. Maggioli, J. L. McGill, K. P. Lyashchenko and M. V. Palmer (2014). "Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms." Vet Immunol Immunopathol **159**(3-4): 113-132.
- Wedlock, D. N., M. A. Skinner, N. A. Parlane, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, G. W. de Lisle and B. M. Buddle (2003). "Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **83**(6): 339-349.
- Weiner, H. L., A. P. da Cunha, F. Quintana and H. Wu (2011). "Oral tolerance." Immunol Rev **241**(1): 241-259.
- Wejse, C., V. F. Gomes, P. Rabna, P. Gustafson, P. Aaby, I. M. Lisse, P. L. Andersen, H. Glerup and M. Sodemann (2009). "Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." Am J Respir Crit Care Med **179**(9): 843-850.
- WHO (2010). Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed., World Health Organization.
- WHO (2013). Global Tuberculosis report 2013, World Health Organization.
- Wiegshaus, E. H., D. N. McMurray, A. A. Grover, G. E. Harding and D. W. Smith (1970). "Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. 3. Relevance of microbial enumeration to acquired resistance in guinea pigs." Am Rev Respir Dis **102**(3): 422-429.
- Wing, K., S. Lindgren, G. Kollberg, A. Lundgren, R. A. Harris, A. Rudin, S. Lundin and E. Suri-Payer (2003). "CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells." Eur J Immunol **33**(3): 579-587.
- Xu, J., O. Laine, M. Masciocchi, J. Manoranjan, J. Smith, S. J. Du, N. Edwards, X. Zhu, C. Fenselau and L. Y. Gao (2007a). "A unique *Mycobacterium* ESX-1 protein co-secretes with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation." Mol Microbiol **66**(3): 787-800.
- Xu, L., A. Kitani, I. Fuss and W. Strober (2007b). "Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta." J Immunol **178**(11): 6725-6729.
- Yamamura, Y., H. Maeda, Y. Ogawa and T. Hashimoto (1986). "Experimental pulmonary cavity formation by mycobacterial components and synthetic adjuvants." Microbiol Immunol **30**(11): 1175-1187.
- Yamamura, Y., Y. Ogawa and H. Maeda (1974). "Prevention of tuberculous cavity formation by desensitization with tuberculin-active peptide." Am Rev Respir Dis **109**(6): 594-601.

- Yan, B. S., A. Kirby, Y. V. Shebzukhov, M. J. Daly and I. Kramnik (2006). "Genetic architecture of tuberculosis resistance in a mouse model of infection." Genes Immun **7**(3): 201-210.
- Yao, S., D. Huang, C. Y. Chen, L. Halliday, G. Zeng, R. C. Wang and Z. W. Chen (2010). "Differentiation, distribution and gammadelta T cell-driven regulation of IL-22-producing T cells in tuberculosis." PLoS Pathog **6**(2): e1000789.
- Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen and M. K. Spriggs (1995). "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor." Immunity **3**(6): 811-821.
- Ye, P., P. B. Garvey, P. Zhang, S. Nelson, G. Bagby, W. R. Summer, P. Schwarzenberger, J. E. Shellito and J. K. Kolls (2001a). "Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(3): 335-340.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon and J. K. Kolls (2001b). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med **194**(4): 519-527.
- Ye, Z. J., Q. Zhou, R. H. Du, X. Li, B. Huang and H. Z. Shi (2011). "Imbalance of Th17 cells and regulatory T cells in tuberculous pleural effusion." Clin Vaccine Immunol **18**(10): 1608-1615.
- Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Conte, P. Mosci, F. Bistoni, P. Puccetti, R. A. Kastelein, M. Kopf and L. Romani (2007). "IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance." Eur J Immunol **37**(10): 2695-2706.
- Zhang, X., L. Majlessi, E. Deriaud, C. Leclerc and R. Lo-Man (2009). "Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils." Immunity **31**(5): 761-771.
- Zheng, S. G., J. Wang and D. A. Horwitz (2008). "Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6." J Immunol **180**(11): 7112-7116.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler and D. R. Littman (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function." Nature **453**(7192): 236-240.
- Zhou, X., N. Kong, J. Wang, H. Fan, H. Zou, D. Horwitz, D. Brand, Z. Liu and S. G. Zheng (2010). "Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu." J Immunol **185**(5): 2675-2679.

10 Annexos

10.1 Annex 1: Article "Ibuprofen Therapy Resulted in Significantly Decreased Tissue Bacillary Loads and Increased Survival in a New Murine Experimental Model of Active Tuberculosis"

Referència:

Vilaplana, C., E. Marzo, G. Tapia, J. Diaz, V. Garcia and P. J. Cardona (2013). "Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis." J Infect Dis **208**(2): 199-202.

Enllaç:

<http://jid.oxfordjournals.org/content/208/2/199.full.pdf?keytype=ref&%2520ijkey=2lyQ4hYyY0u7gza>

10.2 Annex 2: Article “Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis”

Referència:

Marzo, E., C. Vilaplana, G. Tapia, J. Diaz, V. Garcia and P. J. Cardona (2014). "Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **94**(1): 55-64.

Enllaç:

<http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792%2813%2900164-9/abstract>

10.3 Annex 3: Patent internacional amb número de publicació WO2013186409 A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/186409 A1

(43) Fecha de publicación internacional
19 de diciembre de 2013 (19.12.2013) **WIPO | PCT**

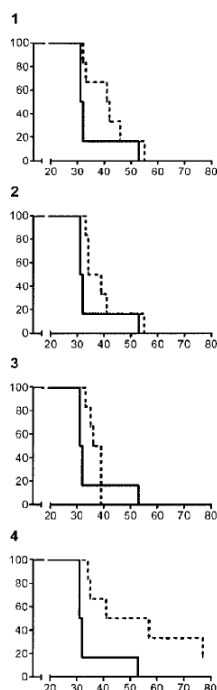
- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/04 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/000145
- (22) Fecha de presentación internacional:
13 de junio de 2013 (13.06.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P 201200640 15 de junio de 2012 (15.06.2012) ES
- (71) Solicitantes: **FUNDACIÓ INSTITUT PER A LA INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT**
- (72) Inventores: **CARDONA IGLESIAS, Pere-Joan**; C/ Osona, 3, àtic 1a, 08023 Barcelona (ES). **VILAPLANA MASSAGUER, Cristina**; C/ Tuset, 14, 2n, 08006 Barcelona (ES). **MARZO ESCARTÍN, Elena**; Av. Famers, 16, Urb. Santa Coloma Residencial, 17430 Santa Coloma de Farnès (Girona) (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: INACTIVATED MYCOBACTERIA FOR ORAL USE IN THE PREVENTION OF TUBERCULOSIS

(54) Título : MICOBACTERIAS IN ACTIVADAS PARA SU USO POR VÍA ORAL EN LA PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS

Figura 1



(57) Abstract: The invention relates to inactivated mycobacteria for oral use in the prevention of tuberculosis, which are administered using a multi-dose regimen and with a reduced time interval between doses, such as to induce a tolerance response to infection by the tubercle bacillus. The inactivated bacteria can be used with the aforementioned regimen to control the progression of the infection from a latent state to active tuberculosis.

(57) Resumen: Las micobacterias inactivadas para su uso por vía oral en la prevención de la tuberculosis se administran según una pauta de administración de múltiples dosis, administradas con un intervalo temporal reducido entre las mismas, de modo que induce una respuesta tolerizante frente a la infección por el bacilo de la tuberculosis. La utilización de las bacterias inactivadas de acuerdo con dicha pauta permite controlar el progreso de la infección desde un estado latente a tuberculosis activa.

WO 2013/186409 A1

MICOBACTERIAS INACTIVADAS PARA SU USO POR VÍA ORAL EN LA PREVENCIÓN
DE LA TUBERCULOSIS

Campo de la técnica

5 La presente invención se enmarca en la provisión de medicamentos para ser administrados por vía oral para la prevención de la tuberculosis, en particular para controlar el paso de la infección latente a la infección activa de dicha enfermedad.

Estado de la técnica anterior

10 La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica ocasionada por las bacterias pertenecientes al grupo *Mycobacterium tuberculosis-complex* (MTB-C), que incluye actualmente los bacilos *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*, siendo el *M. tuberculosis* el agente más importante y frecuente en relación con la tuberculosis humana. Dicha enfermedad afecta principalmente a los pulmones, si bien en
15 algunos casos puede extenderse también a otros órganos. Si no se trata adecuadamente, la tuberculosis puede resultar mortal.

Según el informe del 2011 de la Organización Mundial de la Salud, anualmente se registran 9 millones de nuevos casos a nivel mundial de personas que manifiestan la enfermedad y se contabilizan aproximadamente 1,7 millones de
20 fallecimientos. Se considera, así mismo, que en el mundo existen más de 2.500 millones de personas infectadas y que cada año se generan unos 100 millones de infectados nuevos.

La tuberculosis se transmite por el aire, de manera que los pacientes con una cavidad tuberculosa en sus pulmones son la principal fuente de la transmisión de
25 esta enfermedad, tal como se describe, por ejemplo, en J. Grosset, *Studies in short-course chemotherapy for tuberculosis. Basis for short-course chemotherapy*, Chest, 1981, 80, 719-720, y en J. Grosset, *Mycobacterium tuberculosis in the Extracellular Compartment: an Underestimated Adversary*, Antimicrob. Agents Chemother., 2003, 47, 833-836.

30 Según se describe en dichos artículos, los pacientes expulsan, mediante la tos o el estornudo, una gran cantidad de microgotas capaces de transportar bacilos, que pueden entrar en el espacio alveolar de la persona que los inhala.

Tras la inhalación, el bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares, y es dentro de esta célula donde el bacilo puede crecer, hasta causar la destrucción de la
35 misma. De nuevo en el espacio extracelular, el bacilo es fagocitado por nuevos macrófagos y este proceso se va repitiendo hasta que, al ser drenados y generar una

PCT/ES 2013/000145

2

infección en los ganglios linfáticos hiliares, se genera una respuesta inmune basada en una inmunidad celular.

Unas 6 semanas después de la infección, el crecimiento bacilar cesa, el hospedador positiviza la prueba cutánea de la tuberculina, caracterizada por una
5 respuesta de hipersensibilidad retardada (o DTH, del inglés *Delayed Type Hypersensitivity*), y se genera la denominada necrosis caseosa en el punto de infección.

Una de las características principales de la infección tuberculosa, es el hecho de que *M. tuberculosis* es capaz de permanecer durante años en el tejido del
10 hospedador sin desarrollar la enfermedad, en forma de infección tuberculosa "latente", pero manteniendo sus posibilidades de generar una tuberculosis activa.

Este estado latente de la infección está relacionado con la aparición de la denominada necrosis caseosa, que se genera en la lesión alveolar inicial y en el tejido pulmonar circundante, resultando en la destrucción de los macrófagos que contienen los bacilos que se están multiplicando, produciéndose una lesión necrótica sólida.

15 El origen de esta reacción necrótica no se conoce con exactitud, pero se relaciona con la reacción de tipo DTH. Esencialmente, la respuesta inmune que permite el control de la población bacilar es de tipo celular y mayoritariamente dirigida por linfocitos CD4 de tipo Th1, es decir, capaz de generar la respuesta de tipo DTH y también de identificar macrófagos infectados y de activarlos para destruir a los bacilos de su
20 interior.

Aproximadamente en un 10% de los individuos infectados, dicha necrosis sólida se reblandece, siendo uno de los episodios más importantes en la infección tuberculosa, puesto que es entonces cuando la infección progresa a tuberculosis activa, o sea a enfermedad tuberculosa.

25 En la mayoría de los casos, el reblandecimiento se asocia con el drenaje del tejido reblandecido hacia el árbol bronquial, formándose una cavidad tuberculosa, y un crecimiento extracelular explosivo del bacilo, con la entrada de oxígeno a través del orificio bronquial. Con la tos, este caseum reblandecido y repleto de bacilos, es diseminado por otras partes de los bronquios, del pulmón y del exterior.

30 El tratamiento farmacológico de la tuberculosis se caracteriza por ser una terapia prolongada, cosa que dificulta su seguimiento a la vez que favorece la aparición de bacterias resistentes a los fármacos.

Se considera que la mejor estrategia para la contención de la tuberculosis se basa en un enfoque preventivo de la misma.

35 La vacuna actual, administrada por vía parenteral, que se emplea en el tratamiento preventivo contra la tuberculosis está basada en bacterias de la cepa

denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), una variante atenuada de *M. bovis*. Sin embargo, se ha observado que su eficacia disminuye con el tiempo y que es ineficaz para la prevención de la enfermedad en adultos, de hecho se considera que tan solo protege a los nichos del desarrollo de una enfermedad tuberculosa mortal (miliar o meníngea).

5 Se han desarrollado otros tratamientos profilácticos de la tuberculosis basados principalmente en otras cepas de micobacterias vivas atenuadas, o bien en subunidades bacterianas.

Así mismo, en el estado de la técnica también se han explorado tratamientos profilácticos de la tuberculosis basados en micobacterias inactivadas, con el objeto de obtener una respuesta inmune análoga a la obtenida con las vacunas basadas en micobacterias atenuadas, es decir, del tipo Th1, generadora de interferón- γ .

10 Así, por ejemplo, en el artículo Opie *et al.*, *Protective inoculation against human tuberculosis with heat-killed tubercle bacilli*, Am. J. Hyg., 1939, 29, 155-164, se describe un estudio clínico en el que se administraron cinco dosis por vía intracutánea de bacilos de *M. tuberculosis* inactivados por calentamiento, con el objetivo de generar protección frente a la enfermedad.

15 Así mismo, en el artículo Agger *et al.* *Specific acquired resistance in mice immunized with killed mycobacteria*, Scand. J. Immunol., 2002, 56, 443-447, se describe un estudio experimental con ratones que fueron vacunados con tres dosis administradas por vía subcutánea de 1000 μ g de bacilos *M. tuberculosis* inactivados por calentamiento, con un intervalo de 2 semanas entre cada dosis, observándose una inducción de inmunidad específica basada en linfocitos T.

También se han ensayado otras micobacterias inactivadas para inducir protección frente a la tuberculosis, habitualmente por vía parenteral.

25 Por ejemplo, en Gupta *et al.*, *Immunogenicity and protective efficacy of "Mycobacterium w" against Mycobacterium tuberculosis in mice immunized with live versus heat-killed M. w by the aerosol or parenteral route*, Infect. Immun., 2009, 77 (1), 223-231, se describe que se administraron micobacterias *M. w* vivas o inactivadas por calentamiento. Estas últimas fueron administradas como monodosis por vía subcutánea, y se observó una respuesta inmunitaria basada en la inducción de linfocitos Th1, que generaban interferonas.

Es particularmente deseable, disponer de un tratamiento profiláctico que sea efectivo por vía oral, ya que dicha vía facilita considerablemente la administración del fármaco y la adherencia al tratamiento.

35 En este sentido, existen algunos documentos en el estado de la técnica referidos a la administración por vía oral de bacterias inactivadas por el calor de otra

PCTES 2013/000145

4

micobacteria, *Mycobacterium vaccae*, para conseguir un efecto terapéutico de la tuberculosis activa, según una pauta combinada con los fármacos habituales en quimioterapia.

5 A nivel experimental, en Hernández-Pando *et al.*, *Orally administered Mycobacterium vaccae modulates expression of immunoregulatory molecules in BALB/c mice with pulmonary tuberculosis*, Clin. Vaccine Immunol., 2008, 15(11), 1730-1736, se describe un ensayo realizado con ratones a los que se les administró por vía oral 5 dosis de 0,1 µg de *M. vaccae* inactivado por calentamiento, con un intervalo de 28 días entre cada administración, y induciéndose una infección con *M. tuberculosis* por vía
10 intratraqueal 23 h después de la primera dosis. En dicho estudio se confirmó que se generaba una respuesta inmune de tipo celular aumentándose la secreción de linfocitos Th1, mientras que disminuía la inmunidad tipo humoral, como se demostraba por una disminución de los linfocitos tipo Th2, y del factor de crecimiento TGF-beta.

En general, en el estado de la técnica se sugiere que es deseable una
15 inducción de tipo Th1, con la consiguiente generación de interferón-γ, mientras que una respuesta Th2, con la consiguiente generación de IL-4, o la Th3, que conlleva la generación de células T reguladoras (Treg), pueden tener un efecto inductor de la tuberculosis activa.

Así se describe, por ejemplo, en Kursar *et al.*, *Cutting Edge: Regulatory T Cells Prevent Efficient Clearance of Mycobacterium tuberculosis*, J. Immunol., 2007, 178, 2661-2665, en donde la generación de células T reguladoras (Treg) se atribuye a la incapacidad de los linfocitos CD4 para esterilizar las lesiones caseosas y evitar la infección latente en el modelo de tuberculosis experimental en ratón. En dicho artículo se sugiere que una desregulación que permite el desequilibrio entre la respuesta Th1 y Treg
20 a favor de la segunda puede ser la causa de la inducción de tuberculosis activa.

A la vista de lo descrito en el estado de la técnica, subsiste la necesidad de disponer de un tratamiento eficaz de la tuberculosis, administrable por vía oral, para prevenir el desarrollo de la tuberculosis activa, y el subsiguiente surgimiento del estado patológico de la enfermedad, tanto en individuos no infectados (efecto profiláctico) como
30 en individuos infectados por *M. tuberculosis* en los que la infección se encuentra en estado latente (efecto terapéutico).

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es el uso de micobacterias inactivadas
35 para la preparación de un medicamento para su administración oral para la prevención de la tuberculosis.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 En la Figura 1, el tiempo de supervivencia expresado en días se
representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de
ordenadas. El Grupo Control se representa con un trazo continuo, y los animales del
Grupo 1 se representan en trazo discontinuo. Los animales del Grupo 1 fueron sometidos
a un tratamiento con micobacterias inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* por vía
10 oral antes de la infección, mediante la administración de 5 dosis de dichos bacilos, una
cada 48 horas empezando el día 10 antes de la infección. Los gráficos 1, 2, 3 y 4
corresponden a los animales de los grupos 1a, 1b, 1c y 1d, respectivamente, a los que se
les administró diferente cantidad de producto, según las diluciones 1:1, 1:10, 1:100 y
1:1000. (Ejemplo 1)

15

Figura 2

 En la Figura 2, el tiempo de supervivencia expresado en días se
representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de
ordenadas. En la misma se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 2
20 (trazo discontinuo). Los animales del Grupo 2 fueron sometidos a un tratamiento con
micobacterias inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* por vía oral después de la
infección mediante la administración de 5 dosis de dichos bacilos, una cada 48 horas
empezando el día 11 después de la infección. Los gráficos 5, 6, 7 y 8 corresponden a los
animales de los grupos 2a, 2b, 2c y 2d, respectivamente, a los que se les administró
25 diferente cantidad de producto, según las diluciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000. (Ejemplo
1)

Figura 3

 En la Figura 3, el tiempo de supervivencia expresado en días se
30 representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de
ordenadas. En la misma se compara el Grupo Control (trazo continuo) con los animales
del Grupo 1 (trazo discontinuo), que fue tratado con micobacterias inactivadas de *M.
bovis* BCG por vía oral después de la infección. (Ejemplo 2)

35 Figura 4

PCT/ES 2013/000147

6

En la Figura 4, el tiempo de supervivencia expresado en días se representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de ordenadas. En la misma se compara el Grupo Control (trazo continuo) con los animales del Grupo 1 (trazo discontinuo), que fue tratado con micobacterias inactivadas de *M. bovis* BCG por vía oral antes de la infección. (Ejemplo 3)

Figura 5

En la Figura 5, el tiempo de supervivencia expresado en días se representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de ordenadas. En el gráfico 1 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 1 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento con micobacterias inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* administradas por vía oral iniciado antes de la infección. En el gráfico 2 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 2 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento con micobacterias inactivadas administradas por vía oral iniciado después de la infección. (Ejemplo 4)

Figura 6

En la Figura 6 se representan los porcentajes de células T reguladoras con el fenotipo CD4+CD25+ Foxp3+, respecto al total de células T CD4+, para cada uno de los tratamientos con micobacterias inactivadas de *M. tuberculosis* y el control, a la semana 3 (gráfico 1) y a la semana 4 (gráfico 2) después de la infección. En el eje de ordenadas se representa dicho porcentaje de células T reguladoras. En el eje de abscisas se representan los diferentes grupos de animales. Los cuadrados representan animales no tratados (Grupo Control), los triángulos representan animales del Grupo 1, tratados previamente a la infección (efecto profiláctico), y los círculos representan los animales del Grupo 2, tratados posteriormente a la infección (efecto terapéutico). Las líneas horizontales trazadas representan la media aritmética de cada grupo. (Ejemplo 4)

Figura 7

En la Figura 7, el tiempo de supervivencia expresado en días se representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de ordenadas. En el gráfico 1 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 1 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento con micobacterias inactivadas de *Mycobacterium kansasii* administradas por vía oral, iniciado antes de la infección (efecto profiláctico). En el gráfico 2 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 2 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento con micobacterias inactivadas de

Mycobacterium kansasii administradas por vía oral, iniciado después de la infección (efecto terapéutico). (Ejemplo 5)

Figura 8

5 En la Figura 8, el tiempo de supervivencia expresado en días se representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de ordenadas. En el gráfico 1 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 1 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento con micobacterias inactivadas de *Mycobacterium fortuitum* administradas por vía oral, iniciado antes de la infección (efecto profiláctico). En el gráfico 2 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 2 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento con micobacterias inactivadas de *Mycobacterium fortuitum* administradas por vía oral, iniciado después de la infección (efecto terapéutico). (Ejemplo 6)

15 Figura 9

En la Figura 9, el tiempo de supervivencia expresado en días se representa en el eje de abscisas, y el porcentaje de animales supervivientes en el eje de ordenadas. Los animales fueron infectados y posteriormente tratados con el fármaco anti-tuberculoso RIMSTAR. El Grupo 1, tras el tratamiento con RIMSTAR, fue sometido a un tratamiento tolerizante posterior con micobacterias inactivadas de *Mycobacterium fortuitum* administradas por vía oral (efecto anti-recaída). Se compara el Grupo Control (trazo continuo, sin tratamiento tolerizante) con el Grupo 1 (trazo discontinuo, con tratamiento tolerizante). Sobre el eje de abscisas se indican los períodos del tratamiento con RIMSTAR (rectángulo negro) y del tratamiento posterior tolerizante (rectángulo blanco). (Ejemplo 7).

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es el uso de micobacterias inactivadas para la preparación de un medicamento para la prevención de la tuberculosis, en donde:

- 30
- las micobacterias inactivadas se administran periódicamente por vía oral,
 - el intervalo entre las dosis no es superior a 5 días, y
 - el número de dosis administradas es de al menos 5.

Alternativamente, el objeto de la presente invención se puede formular como micobacterias inactivadas para su uso para la prevención de la tuberculosis, en donde:

- 35
- las micobacterias se administran periódicamente por vía oral,

2018/000145

8

- el intervalo entre las dosis no es superior a 5 días, y
- el número de dosis administradas es de al menos 5.

Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo tratamiento preventivo de la tuberculosis que se basa en la administración de micobacterias inactivadas, según una pauta de administración de múltiples dosis, administradas con un intervalo temporal reducido entre las administraciones.

Los autores han observado que dicho tratamiento preventivo, efectuado antes de la infección por *M. tuberculosis* (efecto profiláctico) o después de la infección (efecto terapéutico) es capaz de prevenir el desarrollo de la tuberculosis activa mediante el control de la progresión de la infección desde un estado latente a tuberculosis activa.

De acuerdo con dicho tratamiento, la administración periódica oral de bacilos muertos, preferentemente a dosis bajas, y con un intervalo temporal reducido entre las dosis, induce una tolerización o respuesta tolerizante que, sorprendentemente, tiene un efecto positivo en el control de la infección por *M. tuberculosis*, esto es, en el paso de la infección latente a la infección activa.

Efectivamente, los autores han observado que este tipo de tratamiento, tanto administrado previamente, como con posterioridad a la infección por *M. tuberculosis*, desencadena una respuesta tolerizante, caracterizada por un incremento del porcentaje de las células T reguladoras (Treg).

El uso de la invención está dirigido a individuos no infectados y a individuos infectados por *M. tuberculosis* en los que la infección se encuentra en estado latente. En el primer caso el tratamiento preventivo se considera que tiene un efecto profiláctico, mientras que en el segundo caso se considera que tiene un efecto terapéutico.

Un aspecto particular de este segundo caso, es decir, del tratamiento preventivo con efecto terapéutico (referido a sujetos infectados por *M. tuberculosis* en los que la infección se encuentra en estado latente) lo constituyen aquellos individuos que previamente habían desarrollado la tuberculosis activa y en los que dicha enfermedad ha remitido posteriormente, por ejemplo mediante tratamiento con terapia anti-tuberculosa convencional, habiendo revertido así de nuevo la tuberculosis a un estado de infección latente. Este caso particular del tratamiento preventivo se considera que tiene un efecto terapéutico anti-recaída.

En el caso del tratamiento preventivo con efecto anti-recaída, por lo tanto, los individuos habitualmente han estado sujetos previamente a un tratamiento farmacológico con agentes anti-tuberculosos. Estos agentes anti-tuberculosos son bien conocidos por el experto en la materia, siendo los principales, por ejemplo, isoniazida,

etambutol, pirazinamida, rifampicina, estreptomina; y los de segunda línea, aplicados en caso de aparición de resistencias, por ejemplo, tioamidas (protionamida, etionamida, entre otros), aminoglicósidos (amikacina, kanamicina, entre otros), cicloserina, rifabutina, rifapentina, fluorquinolonas (moxifloxacina, levofloxacina, ofloxacina), PAS, claritromicina, 5 clofazimida, linezolid o tioridazina entre otros, o sus mezclas.

En general, se entiende por "tratamiento preventivo" aquel que permite preservar un individuo de una enfermedad.

En este sentido, en el contexto de la invención, el tratamiento preventivo es aquel tratamiento capaz de prevenir el desarrollo de la tuberculosis activa mediante el 10 control de del paso de la infección latente a la infección activa.

En general, se entiende por "tolerización" como la inducción intencionada de tolerancia por medio de agentes biológicos o químicos, en donde el término "tolerancia" significa un estado de hiporespuesta específica al agente biológico o químico.

Por ello, en el contexto de la invención, se entiende por la expresión 15 "inducción de una respuesta tolerizante" como un método por medio del cual se induce un estado de falta de respuesta en el sistema inmune del huésped frente a un antígeno específico, con el resultado de una atenuación del trastorno.

En el estado de la técnica se han descrito pautas de tolerización en el contexto de otras enfermedades como, por ejemplo, la aterosclerosis. Así, en George *et al.*, *Suppression of early atherosclerosis in LDL-receptor deficient mice by oral tolerance with h2-glycoprotein 1*, *Cardiovasc. Res.*, 2004, 62, 603-609 se describe el empleo de la 20 β 2-glicoproteína 1 para inducir tolerancia oral y suprimir la aterosclerosis temprana, y en Harats *et al.*, *Oral Tolerance With Heat Shock Protein 65 Attenuates Mycobacterium Tuberculosis-Induced and High-Fat-Diet-Driven Atherosclerotic Lesions*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002, 40, 1333-1338, se describe el empleo de la proteína 65 de choque de 25 calor para inducir tolerancia oral frente a lesiones ateroscleróticas.

Micobacterias inactivadas

El género de las micobacterias pertenecen a la familia de las 30 *Mycobacteriaceae* y está formado por bacilos aerobios.

Todos los bacilos pertenecientes al género de las micobacterias forman parte del objeto de la presente invención, por ejemplo las especies *M. abscessus*, *M. africanum*, *M. asiaticum*, *M. aurum*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum* y *M. avium hominissuis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. 35 gastri*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. immunogenum*, *M. haemophilum*, *M. habana*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. leprae*, *M. lepromatosis*, *M. lufu*, *M. mageritense*, *M.*

PCT/ES 2013/000142

10

malmoense, *M. marinum*, *M. massiliense*, *M. microti*, *M. monacense*, *M. mucogenicum*, *M. neoaurum*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. ulcerans*, *M. vaccae* y *M. xenopi*, entre otros.

5 Las micobacterias tienen muchos antígenos comunes con *M. tuberculosis*, y por ello resultan apropiadas para el uso de la presente invención. Así, en el artículo de Stanford *et al.*, *Mycobacteria and their world*, Int. J. Mycobacteriol., 2012, 3-12, se describe una clasificación de los diferentes grupos de antígenos en micobacterias y como estos se distribuyen y comparten entre diferentes especies de la familia *Mycobacteriaceae*.

10 Preferiblemente, las micobacterias inactivadas que forman parte de la presente invención son: las micobacterias del grupo denominado *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTB-C), *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium kansasii*. Es decir, preferiblemente las micobacterias inactivadas se eligen de entre el grupo formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, y *M. microti*, *M. bovis* BCG, *M. fortuitum* y *M.*
15 *kansasii*. Más preferiblemente, las micobacterias inactivadas se eligen de entre el grupo formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. fortuitum* y *M. kansasii*.

Por micobacterias inactivadas, también denominadas micobacterias muertas, se entienden aquellas micobacterias que han sido sometidas a un tratamiento físico o químico que transforma la micobacteria viva en una forma incapaz de replicarse.

20 Algunos métodos adecuados para inactivar las micobacterias, dentro del ámbito de la presente invención son, por ejemplo, el tratamiento con formaldehído, por irradiación o por calentamiento.

Preferiblemente, las micobacterias inactivadas objeto de la presente invención se inactivan mediante un proceso de calentamiento.

25 Un procedimiento adecuado para inactivar las micobacterias por calentamiento comprende, por ejemplo, cultivar una cepa de la micobacteria en un medio de cultivo adecuado, según son bien conocidos por el experto en la materia, tales como, el agar Middlebrook tipo 7H10 o tipo 7H11, el medio de cultivo Sauton o el medio de cultivo Proskauer-Beck, entre otros. El cultivo se mantiene preferiblemente hasta
30 conseguir una concentración aproximadamente comprendida entre 1×10^5 y 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFCs) por ml.

A continuación, el cultivo se inactiva por calentamiento. Preferiblemente, el calentamiento se efectúa a una temperatura comprendida entre 70° C y 90° C. Preferiblemente, el período de calentamiento está comprendido entre 30 minutos y 3
35 horas. También mediante el uso del autoclavado, preferiblemente efectuándose el calentamiento a una temperatura de 121°C durante 20 minutos.

Prevención de la tuberculosis

La expresión "prevención de la tuberculosis" se refiere a prevenir la manifestación de la tuberculosis activa mediante el control de la progresión de la infección desde un estado latente a tuberculosis activa.

Dicha prevención se puede efectuar en individuos no infectados y también en individuos infectados por *M. tuberculosis* en los que la infección está en estado latente, bien porque no se ha desarrollado aún la enfermedad, o bien porque la enfermedad activa ya se había desarrollado y había remitido posteriormente, por ejemplo por tratamiento con fármacos anti-tuberculosos.

Los autores de la presente invención han desarrollado un tratamiento preventivo de la tuberculosis que impide la progresión de la infección latente, de manera que se evita la progresión de las lesiones caseosas sólidas a lesiones licuefactadas y, por lo tanto, se evita la manifestación de la tuberculosis activa.

Los autores de la presente invención han utilizado un modelo experimental que se basa en el empleo de ratones C3HeB/FeJ, en los que se puede simular una patología del pulmón tras la infección por *M. tuberculosis* equivalente a la que se desarrolla en los humanos.

En dichos animales se observa la formación de necrosis caseosas que pueden licuefactar en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*, a diferencia de lo que sucede en otros modelos animales que no desarrollan dicha necrosis, tal como se describe en el artículo Harper *et al.*, *Mouse model of necrotic tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions*, J. Infect. Dis., 2012, 205, 595-601.

En caso de ser infectados con una alta dosis por vía endovenosa, el crecimiento de la necrosis y de las lesiones en dichos animales es tal que puede ocasionar un 100% de mortalidad aproximadamente a las cuatro semanas después de la infección, tal como se describe en el artículo Sissons *et al.*, *Multigenic control of tuberculosis resistance: analysis of a QTL on mouse chromosome 7 and its synergism with sst1*, Genes Immun., 2009, 10, 37-46.

Sin querer estar ligados por ninguna teoría, los autores de la presente invención consideran que el efecto preventivo del tratamiento objeto de la presente invención se debe a que la administración oral de dosis periódicas frecuentes de bacilos muertos, preferiblemente a dosis bajas, constituye una pauta capaz de inducir tolerancia en los sujetos, generándose una respuesta en la que preferiblemente se inducen los linfocitos T reguladores (Tregs). Dichos linfocitos están relacionados con el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta, del inglés *transforming growth-factor beta*), es

PCT/ES 2013/000145

12

decir, se genera una respuesta inmune mayoritariamente de tipo Th3 o tolerizante, a diferencia de los sistemas de vacunación tradicionales, donde básicamente se desencadena una respuesta inmune del tipo Th1.

Sorprendentemente, los autores de esta invención han constatado que la inducción de tolerancia es eficaz para detener la progresión de la infección por *M. tuberculosis*, esto es, el paso de la infección latente a la infección activa.

Para desencadenar esta respuesta tolerizante es imprescindible que las micobacterias inactivadas se administren de forma repetida y con intervalos temporales reducidos entre cada administración, no superiores a 5 días; preferiblemente, el intervalo entre las dosis no es superior a 3 días; y más preferiblemente, el intervalo entre las dosis no es superior a 2 días.

Así mismo, el tratamiento tolerizante requiere de una administración repetida de las micobacterias inactivadas, siendo el número de dosis administradas de al menos 5; preferiblemente, el número de dosis administradas es de al menos 7; más preferiblemente el número de dosis administradas es de al menos 9, y aún más preferiblemente el número de dosis administradas es de al menos 14.

En el uso de la invención, se administra una cantidad inmunológicamente efectiva de micobacterias inactivadas.

Es conocido que la dosis a emplear depende de la edad y del peso del individuo a administrar las micobacterias.

Generalmente las dosis adecuadas se encuentran comprendidas en el rango entre 10^3 y 10^{10} micobacterias inactivadas; preferiblemente entre 10^3 y 10^8 , y más preferiblemente entre 10^4 y 10^6 .

Para demostrar el efecto terapéutico preventivo sobre la licuefacción de las lesiones caseosas de la pauta de administración tolerizante que forma parte de la presente de invención, los ratones C3HeB/FeJ empleados en el modelo descrito anteriormente, se sometieron a un protocolo en el que se administraron por vía oral entre 5 y 14 dosis de micobacterias inactivadas, con un intervalo entre las dosis comprendido entre 1 y 3 días.

El modelo murino utilizado simula una terapia preventiva de la tuberculosis, bien al administrarse el tratamiento antes de la infección, tal como se describe en los Ejemplos 1 y 3-6, o bien cuando el tratamiento se inicia después de la infección por *M. tuberculosis*, tal como se describe en los Ejemplos 1,2, y 4-6, pero administrado en una fase temprana (hasta 15 días después de la infección cuando los animales ya han desarrollado lesiones, pero éstas todavía no han evolucionado hacia la su licuefacción y consiguiente manifestación de la enfermedad); o alternativamente, según se describe en

el Ejemplo 7, el tratamiento se administra después de la infección cuando los animales han desarrollado lesiones y han licuefactado, pero éstas han regresado a la forma de las pequeñas lesiones características de la infección latente.

5 A partir de los resultados obtenidos en los ejemplos, se concluye que la administración por vía oral de pautas tolerizantes de micobacterias inactivadas, tanto antes como después de la infección por *M. tuberculosis*, aumenta la supervivencia de los animales, al retardarse la inducción de la enfermedad, esto es, el paso de la infección latente a la infección activa.

10 Por ello, se considera que el uso de micobacterias inactivadas según la presente invención es apropiado para la prevención de la tuberculosis.

Composiciones

Según el objeto de la presente invención, las micobacterias inactivadas se administran por vía oral.

15 Dichas micobacterias pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada para la administración oral, como son bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, son adecuados para la administración por vía oral: comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, dispersiones, polvos, granulados, o aerosoles.

20 Preferiblemente, las micobacterias se administran en forma de cápsulas o comprimidos.

En general, las composiciones farmacéuticas comprenden las micobacterias inactivadas y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Las composiciones se preparan de acuerdo con los métodos habituales que son bien conocidos por el experto en la materia, como los que figuran en manuales de tecnología farmacéutica, como el libro Remington The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, 2000 [ISBN: 0-683-306472].

30 Entre los excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en la composición farmacéutica se encuentran, por ejemplo, agentes antiapelmazantes como sílice coloidal, fosfato cálcico tribásico, silicato cálcico, silicato de magnesio, trisilicato de magnesio o talco; agentes diluyentes como lactosa anhidra, lactosa monohidrato, fosfato cálcico, hidrógeno fosfato de calcio anhidro, hidrógeno fosfato de calcio dihidrato, sulfato cálcico, carbonato cálcico, carboximetilcelulosa cálcica, celulosa microcristalina o en polvo, acetato de celulosa, dextratos, dextrinas, dextrosa, fructosa, gliceril palmitoestearato, caolín, lactitol, carbonato magnésico, óxido de magnesio,

35

PCT/ES 2013/000143

14

maltitol, maltodextrinas, maltosa, polimetacrilatos, almidón pregelatinizado, cloruro de sodio, almidón, sucrosa o sacarosa; agentes lubricantes como estearato de magnesio, estearato de calcio, palmitoestearato de glicerina, poloxámeros, óxido de magnesio, benzoato de sodio, sílice coloidal, lauril sulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, ácido esteárico, talco o behenato de glicerina; agentes suspensores como goma xantana, goma guar, ácido algínico, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa sódica o cálcica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropil alginato, celulosa microcristalina o en polvo, sílice coloidal anhidra, dextrinas, gelatinas, caolín, silicato aluminico magnésico, maltitol, povidona, esterres de sorbitán o tragacanto; 5
 10 agentes aglutinantes como trisilicato de magnesio, celulosa, almidón, dextrina, dextrosa, polidextrosa, maltosa, maltodextrina, etilcelulosa, metilcelulosa, polimetacrilatos, talco, povidona, ácido esteárico o sacarosa; agentes disgregantes como hidroxipropilcelulosa de bajo grado de sustitución, fosfato de calcio tribásico, carboximetilcelulosa sódica o cálcica, croscarmelosa sódica, crospovidona o metilcelulosa; agentes de recubrimiento 15
 como quitosano, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, ftalato de dietilo, ftalato de dimetilo, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, maltodextrina polimetacrilatos, acetato ftalato de polivinilo, o citrato de trietilo; agentes dispersantes como poloxámeros o esterres de sorbitán; agentes edulcorantes como aspartamo, manitol, sorbitol, sacarina de sodio, ciclamato de sodio, sacarosa, dextrosa, fructosa, 20
 glucosa, inulina, isomaltosa, lactitol, maltosa, maltol, manitol, sucralosa, trehalosa, xilitol o taumatina; agentes aromatizantes y saborizantes, y/o mezclas de los mismos.

Una lista más exhaustiva de los excipientes, así como sus características físico-químicas, así como los nombres de los productos comerciales bajo los que se comercializan se pueden encontrar en el libro R.C. Rowe *et al.*, Handbook of 25
 Pharmaceutical Excipients, 4ª edición, Pharmaceutical Press, Londres, 2003 [ISBN: 0-85369-472-9].

Los ejemplos que siguen a continuación tienen como objeto ilustrar la invención, si bien no deben ser entendidos como limitantes de la misma.

30 Ejemplo 1.- Tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. tuberculosis* inactivados, administrados antes o después de la infección (efecto profiláctico o terapéutico)

Para preparar las micobacterias inactivadas se partió de una cepa clínica de *M. tuberculosis* (TOL-3), proveniente de la colección de cepas de la Unitat de 35
 Tuberculosi Experimental del Institut Germans Trias i Pujol, cultivada en medio líquido

Proskauer Beck hasta conseguir un crecimiento exponencial y una concentración de $1,7 \times 10^7$ unidades formadoras de colonias (UFCs) por ml.

Se procedió a su inactivación tras calentar el cultivo a 75°C durante 2 horas y a su congelación posterior a -80°C . Posteriormente se diluyó 50:50 en una solución de sacarosa al 10%, se embotelló y liofilizó en viales en volúmenes de 0,5 ml. Posteriormente estos viales se reconstituyeron con 3 ml de agua bidestilada, constituyendo la dilución 1:1, equivalente a $4,25 \times 10^6$ UFCs.

En los ensayos se administraron 0,3 ml de producto, tanto a esta dilución 1:1, como a diluciones 1:10, 1:100, y 1:1000. Estas administraciones corresponden a unas dosis de, respectivamente, a $4,25 \times 10^5$, $4,25 \times 10^4$, $4,25 \times 10^3$ y $4,25 \times 10^2$ UFCs.

La efectividad de las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos.

Los ratones se dividieron en tres grupos de 6 animales cada uno, y cada uno de los grupos se sometió al siguiente protocolo de tolerización.

- 1) Grupo Control: Sin tratamiento.
- 2) Grupo 1 (tratamiento pre-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 5 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas cada 48 horas empezando por el día 10 antes de la infección. Se administró un volumen de 0,3 ml en cada dosis, y se probaron un total de 4 diluciones: 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 (grupos 1a, 1b, 1c y 1d, respectivamente)
- 3) Grupo 2 (tratamiento post-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 5 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas cada 48 horas empezando por el día 11 después de la infección. Se administró un volumen de 0,3 ml en cada dosis, y se probaron un total de 4 diluciones: 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 (grupos 2a, 2b, 2c y 2d, respectivamente)

Para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70°C hasta su utilización.

Los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 2×10^4 bacilos viables.

Los animales eran observados y pesados diariamente hasta que las condiciones del animal requerían su sacrificio, según el procedimiento detallado en la Tabla 1.

PCT/ES 2013/000145

TABLA 1

Observación del animal		Puntuación
Peso	Normal (no hay pérdida de peso, el animal crece normalmente)	0
	Pérdida de peso < 10%	1
	Pérdida de peso entre 10-15%. Posible alteración del aspecto o cantidad de heces	2
	Pérdida de peso > 15%. El animal no consume agua ni alimento	3
Aspecto	Normal	0
	Pelaje en mal estado	1
	Pelaje en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales	2
	Postura anormal	3
Observación de indicios de dolor	Ausencia de indicios (no se observan automutilaciones ni vocalizaciones extrañas)	0
	Observación de automutilaciones o vocalizaciones extrañas	3
Respuesta a estímulos	Normal (no agresivo ni comatoso)	0
	Muy agresivo o comatoso	3
0-2: normal. 3: Aumentar la frecuencia de la aplicación del protocolo de supervisión a 2 veces/día. Si se obtiene un 3 en más de un concepto, todos los 3 pasan a 4. Cuando una o más de las puntuaciones alcanzan el valor 4, se sacrifica el animal.		

5 Los resultados obtenidos se han representado en forma gráfica en las Figuras 1 y 2, en donde se muestra la evolución de la supervivencia de los animales tras la infección, para los diferentes grupos experimentales. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia, expresado en días, mientras que en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de supervivientes.

En la Figura 1 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con los animales del Grupo 1 (trazo discontinuo), que fueron tratados antes de la infección. Los gráficos 1, 2, 3 y 4 corresponden a los animales de los grupos 1a, 1b, 1c y 1d, respectivamente, a los que se les administró diferente cantidad de producto, según las diluciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000.

En la Figura 2 se compara el grupo control (trazo continuo) con los animales del Grupo 2 (trazo discontinuo), que fueron tratados después de la infección. Los gráficos 5, 6, 7 y 8 corresponden a los animales de los grupos 2a, 2b, 2c y 2d, respectivamente, a los que se les administró diferente cantidad de producto, según las diluciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000.

Para valorar el efecto del tratamiento sobre la supervivencia de los animales, se compararon las curvas de supervivencia mediante dos métodos: test de Mantel-Cox (o test Log Rank, LR t) y test de Gehan-Breslow-Wilcoxon (GBW t). En el primer método se asume que el riesgo (muertes/unidad de tiempo) es constante durante todo el experimento, mientras que el segundo tiene más en cuenta las muertes en los primeros días (muertes más tempranas). Si el riesgo es constante, el test de Mantel-Cox tiene más poder estadístico, pero si no es así, y hay un grupo que está en mayor riesgo que el otro, el Gehan-Breslow-Wilcoxon resulta más adecuado.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0,05$, GBW t), respecto a los grupos control. En los tratamientos correspondientes a gráficos 4, 5, 6 y 7, hay también significación estadística para LR t ($p < 0,05$).

Los resultados reflejan una respuesta protectora cuando se utilizó la pauta pre-infección con la dilución más baja (1:1000, Figura 1, gráfico 4), mientras que con la pauta post-infección, se observó protección con las diluciones 1:1, 1:10 y 1:100 (Figura 2, gráficos 5, 6 y 7, respectivamente), siendo especialmente importante en la pauta de dilución 1:10.

Las autopsias en el grupo control reflejaron una evolución muy rápida entre los días 26 y 30, período en el que las lesiones aumentaron mucho de tamaño y acabaron confluyendo generando grandes lesiones con necrosis con consistencia cremosa en su interior.

Por tanto, se puede concluir que la administración de pautas tolerizantes por vía oral, tanto antes (efecto profiláctico) como después de la infección (efecto terapéutico) por *M. tuberculosis*, aumenta la supervivencia de los animales al retrasar el paso de la infección latente a la infección activa. Por ello, se considera que el uso de micobacterias inactivadas según la invención es apropiado como tratamiento preventivo de la tuberculosis.

Ejemplo 2.- Tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. bovis* BCG inactivados, administrados después de la infección (efecto terapéutico)

El agente terapéutico empleado en este ejemplo fue preparado a partir de una cepa comercial de *M. bovis* BCG (SSI) cultivada en medio líquido Proskauer Beck hasta conseguir un crecimiento exponencial y una concentración de $1,03 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFCs) por ml. Se procedió a su inactivación siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La efectividad de las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos. En cada dosis, se les administró un volumen de 0,3 ml. correspondiente a una dilución 1:10, lo que corresponde a $2,575 \times 10^5$ UFCs.

Los ratones se dividieron en dos grupos de 12 animales cada uno de ellos, y cada uno de los grupos se sometió al siguiente protocolo de tolerización:

- 1) Grupo Control: Sin tratamiento.
- 2) Grupo 1 (tratamiento post-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 5 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas cada 48 horas empezando por el día 12 después de la infección, y posteriormente 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) hasta el final del experimento, en virtud del tiempo de supervivencia de cada ratón

Para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70° C hasta su utilización.

Los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 2×10^4 bacilos viables.

Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta que las condiciones del animal requerían su sacrificio, según el mismo procedimiento que se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Los resultados obtenidos se representan de forma gráfica en la Figura 3. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia (en días), mientras que en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de supervivientes.

Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia menor que el Grupo 1 tratado (trazo discontinuo), observándose diferencias significativas (test Log Rank, $p=0,0147$; test Gehan-Breslow-Wilcoxon, $p=0,0052$).

Los resultados reflejan una respuesta protectora después del tratamiento continuo de los animales infectados. Por lo tanto, se puede concluir que la administración de pautas tolerizantes por vía oral de *M. bovis* BCG inactivados, después de la infección por *M. tuberculosis*, aumenta la supervivencia de los animales al retrasarse la inducción de la enfermedad. Por ello, se considera que el uso de micobacterias inactivadas según la invención es apropiado como tratamiento preventivo de la tuberculosis al retrasar el paso de la infección latente a la infección activa.

Ejemplo 3.- Tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. bovis* BCG inactivados, administrados pre-infección (efecto profiláctico)

Los bacilos inactivados de *M. bovis* BCG se prepararon siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

La efectividad de las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos.

Los ratones se dividieron en dos grupos de 12 animales cada uno, y se sometieron al siguiente tratamiento:

- 1) Grupo Control: Sin tratamiento.
- 2) Grupo 1 (tratamiento pre-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 13 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) empezando 29 días antes de la infección. En cada dosis, se les administró un volumen de 0,3 ml. correspondiente a una dilución 1:1000, lo que corresponde a $2,575 \times 10^3$ UFCs.

Al igual que en los ejemplos anteriores, para la infección se empleó la cepa virulenta de *M. tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70° C hasta su utilización.

Los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 2×10^4 bacilos viables.

Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta que las condiciones del animal requerían su sacrificio, según el mismo procedimiento que se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Los resultados obtenidos se representan de forma gráfica en la Figura 4. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia (en días), mientras que en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de supervivientes.

Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia menor que el Grupo 1 tratado (trazo discontinuo), observándose

PCT/ES 2013/000145

20

diferencias significativas, según el test Log Rank ($p=0,0020$) y el test Gehan-Breslow-Wilcoxon ($p=0,0019$).

Los resultados reflejan una respuesta protectora después de la inducción de tolerancia por administración oral de la micobacteria *M. bovis* BCG inactivada, previamente a la infección por *M. tuberculosis*, observándose que dicho tratamiento evita la inducción de la enfermedad en un alto porcentaje.

10 Ejemplo 4.- Efectividad de un tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. tuberculosis* inactivados, administrados pre-infección o post-infección (efecto profiláctico o terapéutico) y monitorización de la tolerancia inducida mediante análisis de las células T reguladoras en el bazo.

Los bacilos inactivados de *M. tuberculosis* (TOL-3) se prepararon siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

15 La efectividad de las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos.

Los ratones se dividieron en tres grupos de 24 animales cada uno, y se sometieron al siguiente tratamiento:

- 1) Grupo Control: Sin tratamiento.
- 20 2) Grupo 1 (tratamiento pre-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 5 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas cada 48 horas, empezando el día 10 antes de la infección, y posteriormente 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) hasta el final del experimento. Se administró cada vez un volumen de 0,3 ml con una dilución 1:1000.
- 25 3) Grupo 2 (tratamiento post-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 5 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas cada 48 horas, empezando el día 11 después de la infección, y posteriormente 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) hasta el final del experimento. Se administró un volumen de 0,3 ml en cada dosis, con una dilución
- 30 1:10.

Al igual que en los ejemplos anteriores, para la infección se empleó la cepa virulenta de *M. tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70° C hasta su utilización.

35 Los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 1×10^5 bacilos viables.

La mitad de los animales de cada grupo (12) se preservaron para el estudio de la supervivencia. Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta que las condiciones del animal requerían su sacrificio, según el mismo procedimiento que se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

5 En la Figura 5, en los gráficos 1 y 2, se muestran los resultados de supervivencia de los diferentes grupos experimentales. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia (en días), mientras que en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de animales supervivientes.

10 En el gráfico 1 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 1 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento iniciado previamente a la infección. Se observa que el grupo control presenta una supervivencia menor que el grupo tratado, con unos resultados estadísticamente significativos según el test Log Rank ($p=0,0011$) y Gehan-Breslow-Wilcoxon ($p=0,0014$).

15 En el gráfico 2 se compara el Grupo Control (trazo continuo) con el Grupo 2 (trazo discontinuo), que fue sometido a un tratamiento iniciado después de la infección. Se observa que el grupo control presenta una supervivencia menor que el grupo tratado, con unos resultados estadísticamente significativos según el test Log Rank ($p=0,04541$), mientras que según el test Gehan-Breslow-Wilcoxon las diferencias no son estadísticamente significativas.

20 En ambos casos se concluye que los animales tratados con una pauta tolerizante con micobacterias inactivadas sobreviven más tiempo tras la infección con *M. tuberculosis* que los animales no tratados.

25 Del resto de animales de cada grupo (12), la mitad se sacrificó a la semana 3 (6 animales por grupo) y la otra mitad a la semana 4 (6 animales por grupo) para el estudio de las células T reguladoras presentes entre los esplenocitos.

30 Según se describe en el artículo Faria *et al.*, *Oral tolerance*, Immunol. Rev., 2005, 206(1), 232-259, las células T reguladoras son un grupo de células claves en la inducción de tolerancia oral, que se definen como una población implicada en la regulación de la respuesta inmunológica, y que expresan los marcadores de membrana CD4 y CD25.

35 En el artículo 2003 Hori *et al.*, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*, Science, 2003, 299(5609), 1057-61, se describe que el factor de transcripción Foxp3 resulta clave para el desarrollo de las células T reguladoras. Por eso se considera que las células T con el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ tienen función reguladora.

PCT/ES 2013/000145

22

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, previa anestesia inhalatoria con isoflurano. Se extrajeron los bazos y se obtuvieron los esplenocitos mediante disgregación mecánica, filtración con separadores celulares (BD Falcon Cell Strainer, Nylon, 40 μ m), y lisis de los eritrocitos. Se realizó el marcaje de los esplenocitos CD4 y CD25 de membrana, y Foxp3 intracelular mediante un Kit de marcaje de células T reguladoras (eBioscience), y se analizaron mediante citometría de flujo (BD LSR-Fortessa cell analyzer). Los resultados se procesaron mediante el software de análisis BD FACSDiva.

En la figura 6 se han representado los porcentajes de células T reguladoras, aquéllas que tienen el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ respecto el total de células T CD4+, de los distintos tratamientos y el control, a semana 3 (gráfico 1) y semana 4 (gráfico 2) post-infección. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células T reguladoras. En el eje de abscisas se representan los distintos tipos de tratamiento y el control.

Los cuadrados representan animales no tratados (Grupo Control), los triángulos representan animales del grupo 1, tratados previamente a la infección, y los círculos representan los animales del grupo 2, tratados posteriormente a la infección. Las líneas horizontales trazadas representan la media aritmética de cada grupo.

Se observa que, efectivamente, hay un aumento del porcentaje de células T reguladoras entre la semana 3 y la semana 4, sólo en los grupos tratados de acuerdo con la pauta tolerizante, ya sea iniciada antes de la infección con *M. tuberculosis*, o posteriormente a la misma.

Ejemplo 5.- Tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. kansasii* inactivados, administrados antes o después de la infección (efecto profiláctico o terapéutico)

El *Mycobacterium kansasii* es una micobacteria no tuberculosa de crecimiento lento. Para preparar las micobacterias inactivadas se partió de una cepa clínica de *M. kansasii* (TOL), proveniente de la colección de cepas de la Unitat de Tuberculosi Experimental del Institut Germans Trias i Pujol, cultivada en medio líquido Proskauer Beck hasta conseguir un crecimiento exponencial y una concentración de $8,07 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias (UFCs) por ml.

Se procedió a su inactivación tras autoclavar el cultivo a 121° C durante 20 minutos y a su congelación posterior a -80° C. Posteriormente se diluyó 50:50 en una solución de sacarosa al 10%, se embotelló en viales en volúmenes de 2 ml y se conservaron a -80°C.

La efectividad de las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos.

En cada dosis, se les administró un volumen de 0,3 ml. correspondiente a una dilución 1:10, lo que corresponde a $2,42 \times 10^4$ UFCs.

5 Los ratones se dividieron en tres grupos de 12 animales cada uno de ellos, y cada uno de los grupos se sometió a al siguiente protocolo de tolerización:

1) Grupo Control: Sin tratamiento.

2) Grupo 1 (tratamiento pre-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 13 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes). La infección se llevó a cabo 24 horas después de administrar la última dosis.

3) Grupo 2 (tratamiento post-infección): 15 días después de la infección, se procedió al tratamiento por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 13 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes).

Para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70° C hasta su utilización.

20 Los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 2×10^4 bacilos viables.

Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta que las condiciones del animal requerían su sacrificio, según el mismo procedimiento que se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

25 En la Figura 7, en los gráficos 1 y 2, se muestran los resultados de supervivencia de los diferentes grupos. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia (en días), mientras que en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de supervivientes.

30 El gráfico 1 se refiere al tratamiento profiláctico, comparándose el Grupo Control con el Grupo 1 que fue sometido a un tratamiento iniciado previamente a la infección. Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia menor que el Grupo 1 (trazo discontinuo), observándose diferencias significativas (test Log Rank, $p < 0,0001$; test Gehan-Breslow-Wilcoxon, $p < 0,0001$).

35 El gráfico 2 se refiere al tratamiento terapéutico, comparándose el Grupo Control con el Grupo 2, que fue sometido a un tratamiento iniciado después de la infección. Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia

107-2013/000145

24

menor que el Grupo 2 tratado (trazo discontinuo), observándose diferencias significativas (test Log Rank, $p < 0,0001$; test Gehan-Breslow-Wilcoxon, $p < 0,0001$).

En ambos casos, los resultados reflejan una respuesta protectora. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento con pautas tolerizantes por vía oral de micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento (*M. kansasii*) inactivadas, administradas antes o después de la infección por *M. tuberculosis*, aumenta la supervivencia de los animales al retrasarse la inducción de la enfermedad. Por ello, se considera que el uso de micobacterias inactivadas según la invención es apropiado como tratamiento preventivo de la tuberculosis al retrasar el paso de la infección latente a la infección activa.

Ejemplo 6.- Tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. fortuitum* inactivados, administrados antes o después de la infección (efecto profiláctico o terapéutico)

El *Mycobacterium fortuitum* es una micobacteria no tuberculosa de crecimiento rápido. Para preparar las micobacterias inactivadas se partió de una cepa ambiental de *M. fortuitum* (cepa Manresa), proveniente de la colección de cepas de la Unitat de Tuberculosis Experimental del Institut Germans Trias i Pujol, cultivada en medio sólido Middlebrook 7H9 hasta conseguir una concentración de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFCs) por ml.

Se procedió a su inactivación tras autoclavar el cultivo a 121°C durante 20 minutos y a su congelación posterior a -80°C . Posteriormente se diluyó 50:50 en una solución estéril de sacarosa al 10%, se embotelló en viales en volúmenes de 2 ml y se conservaron a -80°C .

La efectividad de las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos.

En cada dosis, se les administró un volumen de 0,3 ml, correspondiente a una dilución 1:1000, lo que corresponde a 6×10^5 UFCs.

Los ratones se dividieron en tres grupos de 12 animales cada uno de ellos, y cada uno de los grupos se sometió al siguiente protocolo de tolerización:

- 1) Grupo Control: Sin tratamiento.
- 2) Grupo 1 (tratamiento pre-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 10 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas 5 veces por semana (de lunes a viernes). La infección se llevó a cabo 24 horas después de administrar la última dosis.

3) Grupo 2 (tratamiento post-infección): Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 10 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas 5 veces por semana (de lunes a viernes), empezando el tratamiento 5 días después de la infección.

5 Para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70° C hasta su utilización.

10 Los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 2×10^6 bacilos viables.

Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta que las condiciones del animal requerían su sacrificio, según el mismo procedimiento que se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

15 En la Figura 8, en los gráficos 1 y 2, se muestran los resultados de supervivencia de los diferentes grupos. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia (en días), mientras que en el eje de ordenadas se representa el porcentaje de supervivientes.

20 Los resultados obtenidos en cuanto al tratamiento profiláctico se muestran en el gráfico 1. Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia menor que el Grupo 1 tratado (trazo discontinuo), observándose diferencias significativas (test Log Rank, $p < 0,0001$; test Gehan-Breslow-Wilcoxon, $p < 0,0001$).

25 Los resultados obtenidos en cuanto al tratamiento terapéutico se muestran en el gráfico 2. Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia menor que el Grupo 2 tratado (trazo discontinuo), observándose diferencias significativas (test Log Rank, $p < 0,0001$; test Gehan-Breslow-Wilcoxon, $p < 0,0001$).

30 En ambos casos, pues, los resultados reflejan una respuesta protectora. Por lo tanto, se puede concluir que la administración de pautas tolerizantes por vía oral de micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido (*M. fortuitum*), antes o después de la infección por *M. tuberculosis*, aumenta la supervivencia de los animales al retrasarse la inducción de la enfermedad. Por ello, se considera que el uso de micobacterias Inactivadas según la invención es apropiado como tratamiento preventivo de la tuberculosis al retrasar el paso de la infección latente a la infección activa.

PCT/ES 2013/000145

26

Ejemplo 7.- Tratamiento oral tolerizante con bacilos de *M. fortuitum* inactivados, administrados después del tratamiento de la tuberculosis activa experimental (efecto contra la recaída)

Se prepararon bacilos inactivados de *M. fortuitum* (cepa Manresa) siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6.

La efectividad las micobacterias inactivadas se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C3HeB/FeJ, libres de patógenos específicos.

En cada dosis, se les administró un volumen de 0,3 ml correspondiente a una dilución 1:100, lo que corresponde a 6×10^6 UFCs.

En este caso se estudió la efectividad del tratamiento preventivo tolerizante según la invención en cuanto a su efecto anti-recaída, es decir, tras haber desarrollado los animales la tuberculosis activa y haberlos tratado con fármacos anti-tuberculosos.

Así, al inicio del experimento, los ratones se infectaron por vía endovenosa introduciendo un inóculo aproximado de 2×10^5 bacilos viables.

Al igual que en los ejemplos anteriores, para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70° C hasta su utilización.

Los animales se observaron y pesaron diariamente hasta que las condiciones del animal indicaban que se tendría que proceder a su sacrificio, según el mismo procedimiento que se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

En este momento (día 21) se empezó a hacer un tratamiento utilizando la combinación antibiótica contenida en el preparado comercial RIMSTAR (isoniazida, etambutol, pirazinamida y rifampicina), ajustada al peso del animal, 5 días a la semana.

La última dosis se administró el día 60.

A continuación, los ratones se dividieron en dos grupos de 12 animales cada uno, y cada uno de los grupos se sometió al siguiente protocolo de tolerización:

- 1) Grupo Control: Sin tratamiento tolerizante.
- 2) Grupo 1: Tratados por vía oral, mediante una sonda gástrica, con 14 dosis de producto conteniendo las micobacterias inactivadas, administradas 7 veces por semana (de lunes a domingo), iniciándose dicho tratamiento tolerizante 72 horas después de finalizar el tratamiento de la tuberculosis activa con RIMSTAR (día 63), y administrándose la última dosis el día 76.

Los resultados obtenidos en cuanto al tratamiento contra la recaída se representan de forma gráfica en la Figura 9. En el eje de abscisas se representa el tiempo de supervivencia (en días), mientras que en el eje de ordenadas se representa el

PCT/ES 2013/000145

27

porcentaje de supervivientes. Así mismo, sobre el eje de tiempo de abscisas se ha indicado con un rectángulo negro el período de tratamiento con RIMSTAR y con un rectángulo blanco el período con el tratamiento tolerizante del Grupo 1.

5 Se observa que el Grupo Control (trazo continuo) presenta una supervivencia menor que el Grupo 1 tratado (trazo discontinuo).

Los resultados reflejan una respuesta protectora y, por lo tanto, se puede concluir que la administración de pautas tolerizantes por vía oral de micobacteria, previene contra la recaída posterior al tratamiento de la tuberculosis activa.

PCTES 2013/000145

28

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de micobacterias inactivadas para la preparación de un medicamento para la prevención de la tuberculosis, en donde:
- 5 – las micobacterias se administran periódicamente por vía oral,
 – el intervalo entre las dosis no es superior a 5 días, y
 – el número de dosis administradas es de al menos 5.
- 2.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque las micobacterias inactivadas se
10 eligen de entre el grupo formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, y *M. microti*,
M. bovis BCG, *M. fortuitum* y *M. kansasii*.
- 3.- Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque las micobacterias inactivadas se
 eligen entre *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. fortuitum* y *M. kansasii*.
- 15 4.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las
 micobacterias se inactivan mediante un proceso de calentamiento.
- 5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el intervalo
20 entre las dosis no es superior a 3 días.
- 6.- Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque el intervalo entre las dosis no es
 superior a 2 días.
- 25 7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el número
 de dosis administradas es de al menos 7.
- 8.- Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque el número de dosis administradas
 es de al menos 9.
- 30 9.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cada
 dosis comprende entre 10^3 y 10^{10} micobacterias inactivadas.
- 10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque las
35 micobacterias se administran en forma de una composición farmacéutica que comprende
 las micobacterias inactivadas y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 11.- Uso según la reivindicación 10, caracterizado porque la composición farmacéutica está en forma de cápsulas.
- 5 12.- Uso según la reivindicación 10, caracterizado porque la composición farmacéutica está en forma de comprimidos.
- 13.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque se administra a un individuo infectado por *M. tuberculosis* en el que la infección se encuentra en estado latente.
- 10 14.- Uso según la reivindicación 13, caracterizado porque el individuo había desarrollado previamente la tuberculosis activa.
- 15 15.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque se administra a un individuo no infectado por *M. tuberculosis*.

PCT/ES 2013/000145

30

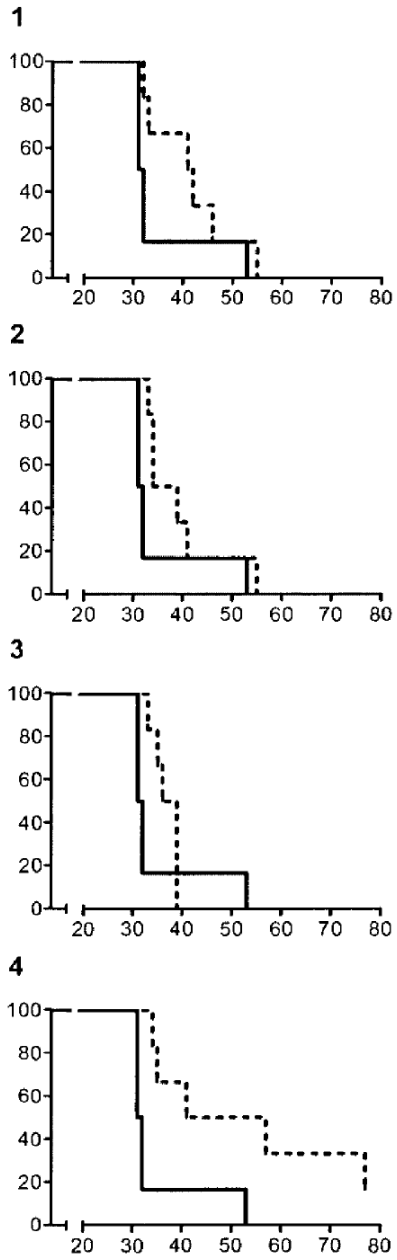
RESUMEN

Micobacterias inactivadas para su uso por vía oral en la prevención de la tuberculosis

- 5 Las micobacterias inactivadas para su uso por vía oral en la prevención de la tuberculosis se administran según una pauta de administración de múltiples dosis, administradas con un intervalo temporal reducido entre las mismas, de modo que induce una respuesta tolerizante frente a la infección por el bacilo de la tuberculosis. La utilización de las bacterias inactivadas de acuerdo con dicha pauta permite controlar el progreso de la
- 10 infección desde un estado latente a tuberculosis activa.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. de J.', is located in the lower right quadrant of the page.

Figura 1



2/8 PCT/ES 2013/000145

Figura 2

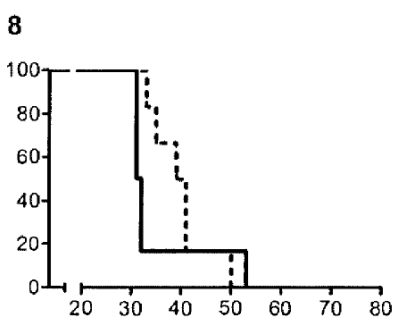
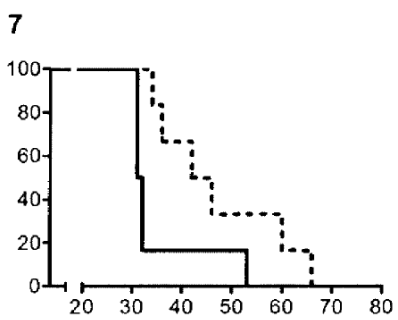
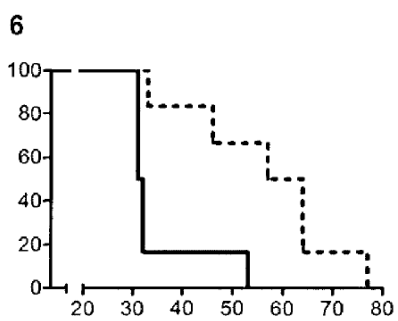
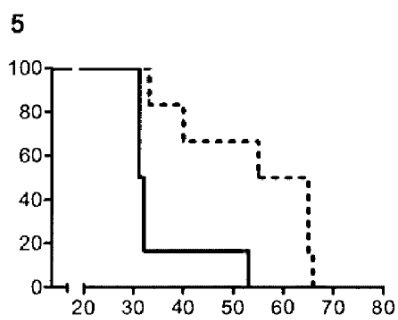


Figura 3

Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat

3/8 PCT/ES 2013/000145

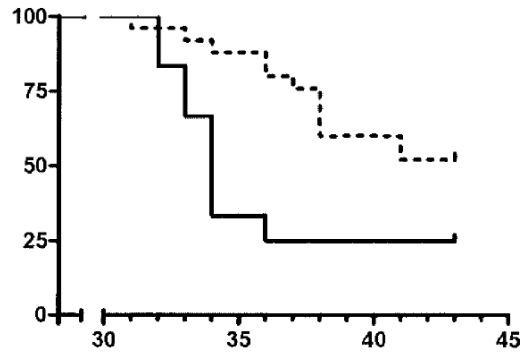
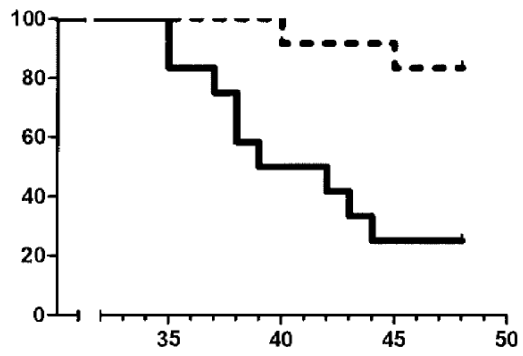


Figura 4



PCT/ES 2013/000145

4/8

Figura 5

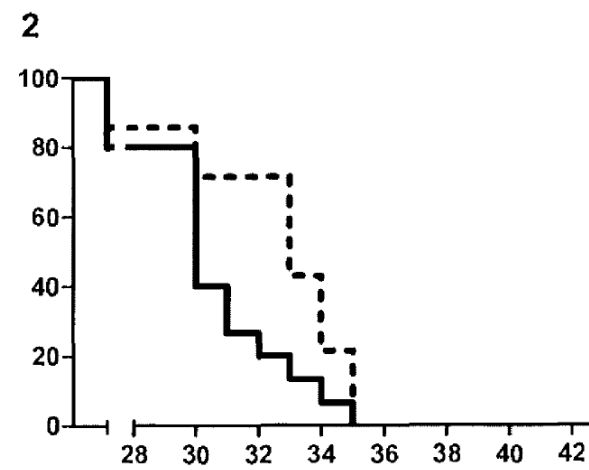
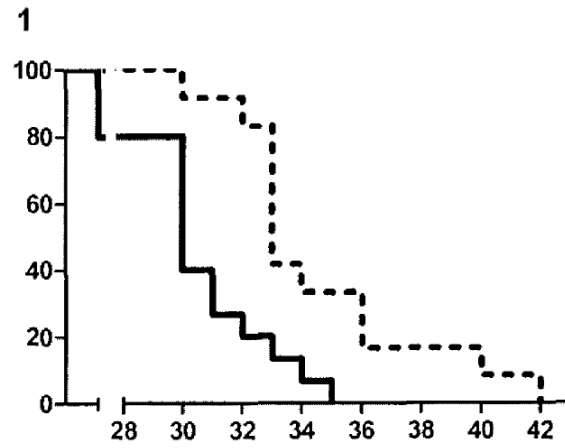
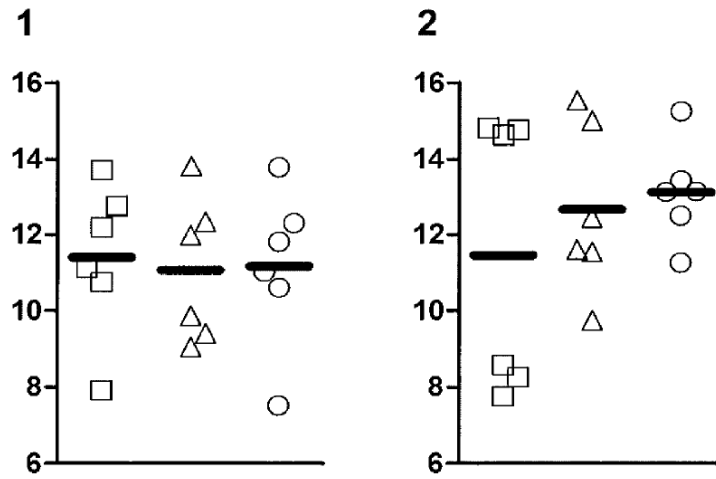


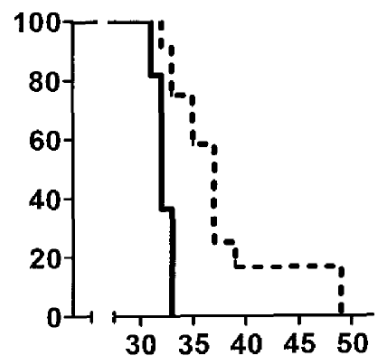
Figura 6



6/8 PCT/ES 2013/000145

Figura 7

1



2

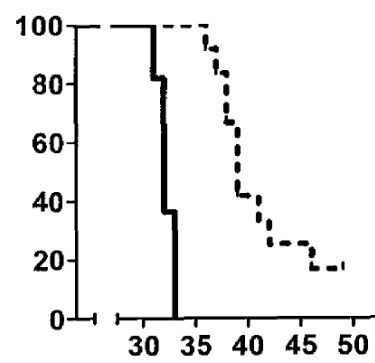
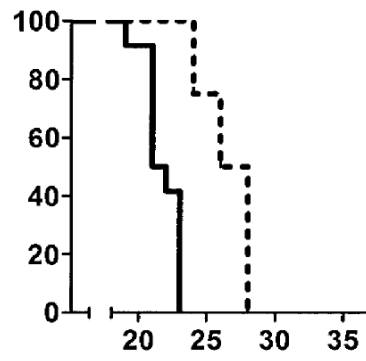
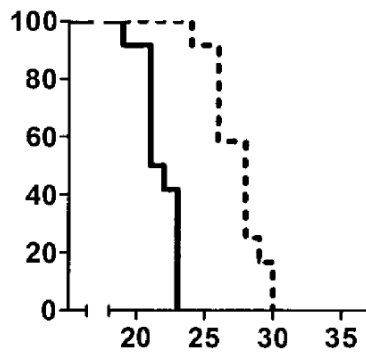


Figura 8

1



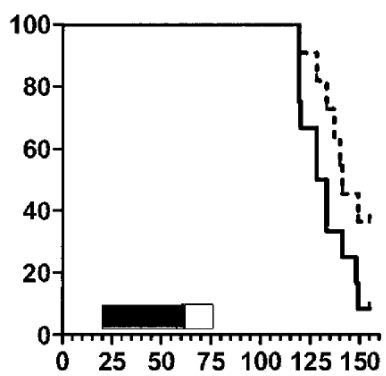
2



PCT/ES 2013/000145

8/8

Figura 9



10.4 Annex 4: Esborrany d'article "New Host-directed therapy against active tuberculosis has been developed and characterized in Cardona's mice model"

Referència:

Elena Marzo, Paula Cardona, Jorge Diaz, Vanessa Garcia, Sonia Rebollo, Antoni Planella, Cristina Vilaplana, Pere-Joan Cardona (2014). "New Host-Directed Therapy against Active Tuberculosis has been developed and characterized in Cardona's mice model". [Esborrany d'article](#)

L'enllaç no està disponible perquè l'article encara no està publicat.