

Tesi Doctoral

Caracterització de la resposta immune induïda per RUTI en el tractament de la infecció tuberculosa latent experimental



Evelyn Guirado Cáceres

**Director de Tesi: Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias
Departament de Genètica i Microbiologia, UAB 2008**

**Caracterització de la resposta immune
induida per RUTI en el tractament de la
infecció tuberculosa latent experimental**

Evelyn Guirado Cáceres



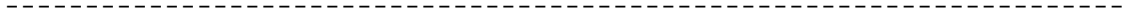
**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Genètica i de Microbiologia
Unitat docent Germans Trias i Pujol**

Caracterització de la resposta immune induida per RUTI en el tractament de la infecció tuberculosa latent experimental

Evelyn Guirado Cáceres

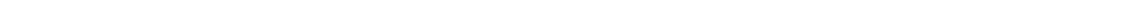
**Memòria de tesi presentada per obtenir el grau de
Doctora en Microbiologia per la Universitat
Autònoma de Barcelona, Febrer de 2008.**

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



Para Jesús.

Por estar ahí siempre.



*En realidad prefiero la ciencia a la religión.
Si me dan a escoger entre Dios y el aire acondicionado,
me quedo con el aire.*

Woody Allen



Unitat de Tuberculosi Experimental

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

FA CONSTAR:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de tesi titulada **“CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNE INDUÏDA PER RUTI EN EL TRACTAMENT DE LA INFECCIÓ TUBERCULOSA LATENT EXPERIMENTAL”** han estat realitzats per na Evelyn Guirado Cáceres i considera que és apta per al tràmit de lectura i defensa pública davant d'un tribunal, per optar al grau de Doctora en Microbiologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que quedi constància signa aquest document a Badalona,
de de 2008.

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

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

La infecció per *Mycobacterium tuberculosis* afecta avui dia a un terç de la humanitat, és a dir a 2.000 milions de persones. S'estima que cada any apareixen 8 milions de nous casos, i que més de 2 milions de persones moren degut a la malaltia.

Ja als anys 60, es va començar a impulsar el tractament de les persones infectades en països amb el suficient poder econòmic, per intentar reduir aquest reservori, així com reduir el risc de reinfecció i de malaltia en ambients amb una baixa incidència. Lamentablement, aquesta estratègia ha trobat un gran contratemps: el tractament establert per a la infecció tuberculosa latent és extremadament llarg, cal l'administració d'isoniazida durant 9 mesos. Aquest fet ha dificultat moltíssim l'adherència al tractament de les persones infectades, donat que no pateixen cap simptomatologia. Per aquesta raó, el Comitè per a l'Eradicació de la Tuberculosi va promulgar l'any 1998 la necessitat d'obtenir una vacuna terapèutica contra aquesta infecció globalitzada.

En la memòria de tesi, que es presenta com a compendi d'articles, queda reflexada la cronologia dels estudis realitzats. Aquesta cronologia permet entendre com es va portar a terme el desenvolupament d'un projecte de tal magnitud, com pot ser fer una vacuna terapèutica contra la infecció tuberculosa latent.

De fet, amb els tres articles que es presenten, i un quart article pendent de publicar que quedarà annexat, queden perfectament retratades les quatre etapes claus del nostre projecte, que s'engloben dins de la fase preclínica de la vacuna terapèutica contra la infecció tuberculosa latent.

Primer, l'establiment d'un model murí de tuberculosi "humanitzat" que ens va permetre estudiar la infecció tuberculosa latent, sobretot els mecanismes relacionats amb la generació de necrosi intragranulomatosa, l'escenari local durant la fase crònica-latència de la infecció. I també l'estudi de les hipòtesis "estàtica" i "dinàmica" en l'origen de la infecció tuberculosa latent.

Segon, el desenvolupament i la caracterització de la vacuna terapèutica contra la tuberculosi, que vam anomenar RUTI, en el model experimental murí d'infecció tuberculosa crònica.

Tercer, un estudi sobre la resposta immune humoral obtinguda mitjançant immunoteràpia amb RUTI, respecte del fenomen de reactivació que té lloc després d'una pauta curta de tractament quimioteràpic, en el model mutant de ratolí SCID.

I quart, i encara pendent de publicació, un estudi sobre la caracterització de la resposta immune cel·lular obtinguda mitjançant immunoteràpia amb RUTI, en els models experimentals d'infecció tuberculosa crònica de ratolí i conill porquí, després d'una pauta curta de tractament quimioteràpic.

En aquesta tesi, doncs, queden patents els coneixements adquirits treballant amb models animals, concretament ratolí i conill porquí, pel que fa al tractament de la infecció tuberculosa latent després d'una pauta curta de tractament antibiòtic, i seguidament la immunoteràpia amb la nostra vacuna.

La positivitat dels resultats ha fet possible portar a terme estudis complementaris amb models animals més grans, com són porcs i cabres. I finalment, el desenvolupament d'un Assaig Clínic Fase I, de la vacuna terapèutica contra la infecció tuberculosa latent RUTI en humans.

RESUM

La infecció tuberculosa latent (ITBL) afecta actualment a un terç de la humanitat, és a dir, a 2.500 milions de persones. L'interès en el seu estudi i tractament es basa en el fet que en un 10% dels casos tindrà lloc un recreixement bacil·lar, que donarà lloc a una tuberculosi (TB) activa.

Aquest fet és especialment perillós perquè encara es desconeixen els mecanismes implicats en aquesta reactivació, o sigui que ens manquen factors pronòstics. I perquè, a més a més, el tractament de la ITBL és extremadament llarg (9 mesos d'isoniazida), i això fa que moltes vegades aquesta mesura terapèutica ni es plantegi a nivell de mesura sanitària.

A partir de les observacions obtingudes en l'estudi de l'evolució de les lesions en el model de TB experimental en el ratolí, es va generar un model de TB "humanitzat" que generava necrosi intragranulomatosa pulmonar (INPG). Inicialment, la INPG s'originava mitjançant la inoculació de LPS intranasal, però degut a l'elevada taxa de mortalitat dels animals, el model es va estandarditzar portant a terme la infecció per aerosol amb soques de *M. tuberculosis* capaces de desenvolupar INPG de manera espontània.

Gràcies a aquest model humanitzat es va poder provar un nou règim terapèutic basat en la hipòtesi que la inoculació, després d'una pauta curta de tractament antibiòtic, amb fragments de *M. tuberculosis* cultivats en condicions d'estrès i detoxificats (vacuna RUTI) seria capaç de controlar la reactivació bacil·lar, i ser una eina terapèutica eficaç per reduir el temps de tractament actual de la ITBL.

En aquest sentit, els estudis inicials mostraven la reactivitat de diferents subtipus d'IgG contra proteïnes presents en la vacuna, i la

capacitat bactericida de la resposta immune generada, en soques de ratolí resistent (C57BL/6) i susceptible (DBA/2).

Portant a terme estudis més amplis sobre la resposta immune generada mitjançant la immunoteràpia amb RUTI després d'una pauta curta de tractament antibiòtic, s'ha volgut avaluar tant el component humoral, com el cel·lular.

Realitzant sèrum-teràpia passiva amb anticossos, obtinguts després de portar a terme aquest tractament combinat en ratolins DBA/2, es va veure que el model de ratolí severament immunodeprimit SCID era capaç de controlar la reactivació bacil·lar i presentava un nombre inferior d'abscessos pulmonars.

Pel que fa a l'avaluació de la resposta cel·lular, els resultats obtinguts mitjançant el mateix esquema de tractament confirmen el que s'observa en els estudis anteriors.

I finalment, cal destacar una total absència de toxicitat deguda a la inoculació de la vacuna RUTI, ni en el model de ratolí, ni en el conill porquí.

LLISTAT D'ARTICLES

Aquesta memòria de tesi es basa en els següents articles:

- Guirado E**, Gordillo S, Gil O, Díaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ausina V, Cardona PJ. **Intrgranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol.** International Journal of Experimental Pathology 2006;87:139-49

 - Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, **Guirado E**, Díaz J, Vilaplana C, Tapia G, Ausina V. **Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis.** Vaccine 2005;23:1393-98

 - Guirado E**, Amat I, Gil O, Díaz J, Arcos V, Caceres N, Ausina V, Cardona PJ. **Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice.** Microbes and Infection 2006;8:1252-9
-

LLISTAT D'ABREVIATURES

ADN	àcid desoxiribonucleic
Ag	antigen
APC	cèl·lula presentadora d'antigen
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	àcid ribonucleic missatger
BAL	rentat broncoalveolar
BCG	bacil de Calmette i Guérin
BL	bacil latent
CD	clúster de diferenciació
CT	grup control
DTH	resposta immune de tipus hipersensibilitat retardada
EBA	activitat bactericida primerenca
FE	fase estacionària
FMtbC	paret cel·lular fragmentada de <i>M.tuberculosis</i>
GM-CSF	factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags
HS	sèrum hiperimmune
IFN- γ	interferó-gamma
Ig	immunoglobulina
IL-12p40	interleuquina 12, subunitat p40
INH	isoniazida
iNOS	òxid nítric sintasa induïble
ITBL	infecció tuberculosa latent
KO	Knock Out
LAM	lipoarabinomanà
LPS	lipopolisacàrid
ME	macròfag escumós
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
MW	pes molecular

NAD	poder reductor
NK	cèl·lules <i>natural killer</i>
NO	òxid nítric
NOS	òxid nítric sintasa
OMS	Organització Mundial de la Salut
PBMC	cèl·lules monocítiques de sang perifèrica
PMN	cèl·lules polimorfonuclears
PPD	derivat proteínic purificat
PZA	pirazinamida
RANTES	citocina regulada, expressada i secretada per cèl·lules T activades
RIF	rifampicina
SIDA	síndrome d'immunodeficiència adquirida
TB	tuberculosis
TBMR	tuberculosis multiresistent
TBR	tuberculosis resistent
TDO	tractament directament observat
TNF- α	factor de necrosi tumoral-alfa
UFC	unitat formadora de colònia

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 La TB: Pinzellades de la seva història.....	2
L'antic Egipte.....	3
Europa actual: societats prehistòriques	4
L'antiguitat clàssica.....	4
L'Amèrica precolombina.....	5
Europa: de l'Edat Mitjana al segle XVIII	6
El Romanticisme.....	7
El bacil de Koch.....	8
El descens de la TB.....	9
TB: una malaltia reemergent.....	12
1.2 La infecció tuberculosa latent.....	13
Models <i>in vitro</i> de latència	14
Models <i>in vivo</i> de latència.....	16
El model murí “humanitzat.....	24
1.3 El projecte RUTI: desenvolupament d'una vacuna terapèutica.....	30
El tractament antibiòtic de la infecció tuberculosa latent i la hipòtesi “dinàmica.....	30
RUTI: la vacuna terapèutica contra la TB latent	37
Efectivitat de RUTI.....	41
2. OBJECTIUS I HIPÒTESIS.....	47

3. RESULTATS.....49

3.1 Estudi sobre la relació existent entre la necrosi intragranulomatosa i la resistència a la infecció tuberculosa crònica en el model de ratolí..... 49

3.2 Estudi dels efectes del tractament immunoteràpic amb RUTI sobre la quimioteràpia en el model murí d'infecció tuberculosa crònica 59

3.3 Estudi dels efectes de la sèrum-teràpia passiva amb anticossos policlonals en el model experimental de ratolí SCID 65

4. DISCUSSIÓ I PERSPECTIVES73

4.1 El model murí “humanitzat” 76

4.2 La vacuna terapèutica RUTI 81

4.3 La resposta humoral induïda per RUTI..... 83

4.4 La resposta cel·lular induïda per RUTI..... 86

5. CONCLUSIONS.....89

6. BIBLIOGRAFIA91

7. COMPENDI D'ARTICLES 111

7.1 Intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol..... 113

7.2 Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis 125

7.3 Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice..... 131

8. ANNEX: LLISTAT D'ALTRES PUBLICACIONS 139

8.1 RUTI induces a strong polyantigenic cellular immunity and controls pulmonary pathology and bacillary concentration in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis 141

9. AGRAÏMENTS 171

1 INTRODUCCIÓ

La tuberculosi (TB) representa més d'un quart de les morts adultes en el món que es podrien evitar (1). Segons dades de la Organització Mundial de la Salut (OMS) s'estima que l'any 2005 van haver 8.8 milions de nous casos, 7.4 milions d'aquests a l'Àsia i l'Àfrica subsahariana. I que 1.6 milions de persones van morir de TB, entre elles 195 000 infectats per el virus de la immunodeficiència humana (VIH) (2). Això es tradueix en què cada 3.5 segons una persona s'infecta per TB i cada 19 segons una persona es mor de TB. A continuació es mostra un mapa en el qual es representa la distribució de la TB a nivell mundial.

TB: Incidència estimada, 2005

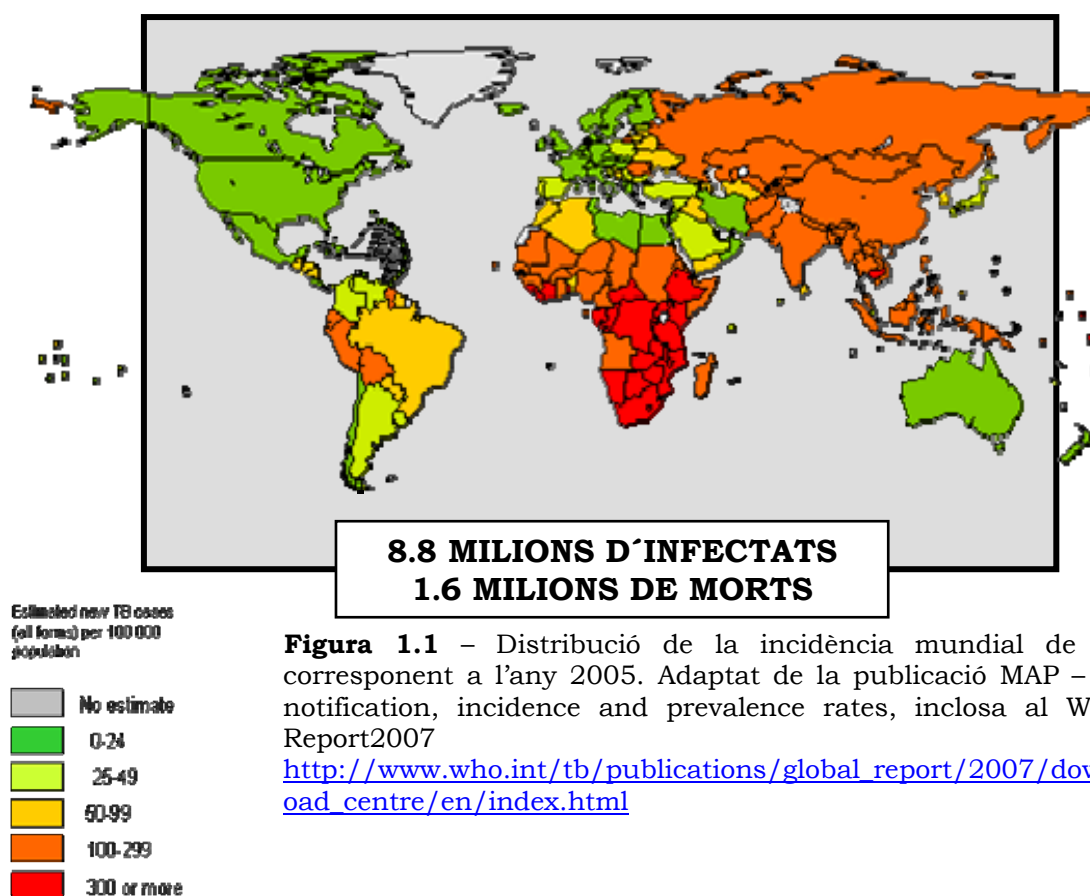


Figura 1.1 – Distribució de la incidència mundial de TB corresponent a l'any 2005. Adaptat de la publicació MAP – TB notification, incidence and prevalence rates, inclosa al WHO Report2007

http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/download_centre/en/index.html

1.1 La TB: pinzellades de la seva història

L'origen de *Mycobacterium tuberculosis* és incert, i al llarg del temps s'han proposat diferents teories per tal d'explicar-lo. La teoria més àmpliament acceptada proposa que el gènere *Mycobacterium* derivaria d'un avantpassat comú, que s'anomena *Mycobacterium archaicum*, i que s'hauria anat ramificant fins a donar lloc a la complexitat d'espècies actuals (3).

Proposa que l'espècie ancestral hauria viscut en estat lliure, i que d'ella, fruit de l'evolució, haurien sorgit una branca conservadora, que comprèn les actuals espècies lliures, i una branca no conservadora, amb espècies associades a organismes multicel·lulars en forma de paràsits patògens. Es diu que l'associació entre micobacteris i vertebrats hauria tingut lloc fa uns 300 milions d'anys, abans dels vertebrats terrestres. Per tant, proposa una transmissió vertical entre els vertebrats de llurs paràsits.

D'acord amb aquestes afirmacions, avui dia sabem que *Mycobacterium tuberculosis* prové d'una forma bovina. I que, segurament, l'evolució va tenir lloc a l'Àfrica, relacionat amb la domesticació dels bòvids. I potser alguna forma africana de *Mycobacterium* va intervenir en el procés, com a intermediari.

Finalment, cal destacar que l'any 2005 es va publicar un article sobre el possible origen de *Mycobacterium tuberculosis* (4). En aquest estudi, els investigadors, analitzant genèticament unes troballes realitzades a la població de Djibouti (E-Àfrica), van concloure que els membres del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), els responsables de la TB, (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* i *M. caprae*), que mostren diferents característiques fenotípiques i que comprenen un ampli rang d'hostes, representen un dels exemples més extrems d'homogeneïtat genètica. I encara més rellevant, que es tracta

d'un conjunt d'espècies que pertanyen a la progènie clonal d'un sol ancestre comú que va aparèixer fa 3 milions d'anys.

L'Antic Egipte

La TB és una malaltia present constantment a la història de la humanitat. Es tracta de la malaltia social infecciosa i d'evolució crònica per excel·lència

Gràcies a les proves realitzades amb àcid desoxiribonucleic (ADN) fòssil recollit en excavacions arqueològiques, s'ha pogut demostrar que la TB ja era present en l'Egipte de fa més de 5 500 anys i fins al 500 aC (5).

La literatura assiriobabilònica fa nombroses referències a la TB, però cal dir que s'ha d'anar amb molta cura a l'hora de valorar aquestes referències, donat que moltes altres malalties podrien deixar signes a les restes semblants als que deixaria el pas de la TB. Si bé, es fa difícil afirmar la presència de la TB gràcies als textos, com hem dit, existeixen altres dues fonts que la confirmen: 1) les representacions artístiques i 2) les restes humanes, les mòmies, a les quals es poden realitzar proves d'ADN. La majoria de casos descrits corresponen a TB òssia. I encara que hom sospita de l'existència de TB pulmonar, ganglionar i intestinal a l'antic Egipte, no ha estat possible trobar lesions visceral, donat que aquestes, s'extreien i es guardaven en vasos canopis un cop arribat el moment de la momificació.

Europa actual: societats prehistòriques

Les primeres troballes europees daten del Neolític. Gràcies a la paleopatologia el nombre de casos documentats és molt alt. Per exemple, el cas d'unes vèrtebres dorsals afectades d'un adult jove trobat a un cementiri proper de Heidelberg, que data del 5 000 aC aproximadament (6,7), casos d'espondilitis tuberculosa a Itàlia, que daten del 4 000 aC (8,9), casos trobats a Alemanya i Dinamarca, que

daten del 2 500-1 500 aC (10). O un cas trobat a Anglaterra i que data de l'edat de Ferro, fa aproximadament 2 200 anys (11).

L'antiguitat clàssica

Pel que fa a l'extrem orient, la TB es troba present des dels primers escrits que ens han arribat. El més antic de tots és el Rig-Veda, 1 500 aC, que anomena Yaksma a la TB i li dedica un himne sencer al seu guariment.

A la Xina, el primer text amb al·lusions a la TB és de caràcter mèdic, i s'atribueix a l'emperador Shen Nung, al 2 700 aC, es tracta d'un recull de remeis contra la malaltia.

A la Grècia clàssica, la TB passa a anomenar-se "tisi". El primer personatge del qual hom pot trobar textos sobre la tisi és Heròdot, al 481 aC, que descriu com un general no pot incorporar-se a la guerra fruit d'aquesta malaltia. Hipòcrates, al seu *Tractat sobre les malalties, llibre I*, la col·loca a la llista d'afectacions que invariablement resulten mortals. I, posteriorment, fruit del desenvolupament de l'Observació Clínica per part de la Medicina Hipocràtica, podem veure una discussió detallada sobre els principals símptomes de la tisi, la seva edat d'incidència, les variacions estacionals i el seu pronòstic, a l'obra *Col·lecció Hipocràtica*.

Es fa difícil conèixer la incidència de la TB en aquella època, però podem deduir del elevat nombre de descripcions clíniques que la TB pulmonar era una malaltia molt freqüent.

Va ser Aristòtil, l'any 350 aC, el primer en assenyalar la natura contagiosa de la TB. A aquesta corrent d'opinió s'hi van afegir importants metges de l'època. Com a tractament dels casos aguts de TB es prescrivia repòs, banys i dieta líquida, mentre que per als casos crònics es recomanava exercici moderat i dieta de fàcil assimilació.

L'Amèrica precolombina

S'ha discutit molt sobre si els europeus són els responsables de la introducció d'una soca molt virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* al Nou món, i/o si van ser ells els qui van introduir el microorganisme per primera vegada.

Actualment, existeixen estudis que confirmen la presència de TB al continent americà abans del contacte amb els europeus (12). La hipòtesi més àmpliament acceptada és que la TB hauria arribat a Amèrica fa 10 000-20 000 anys, fruit de les migracions procedents d'Àsia, a través del pont de Beringia. I hauria assolit nivells epidèmics lligat al fet sociocultural de canviar el tipus de vida nòmada dels petits grups per l'establiment de comunitats sedentàries molt més poblades (12,13).

Tot i així, altres fets socioculturals, la diferent patogènia de les soques europees... van provocar que la població autòctona rebés un fort impacte per la TB durant el descobriment del continent per part dels europeus.

Europa: de l'Edat Mitjana al segle XVIII

Els coneixements sobre la TB van restar inalterats fins al segle XVII. No és fàcil concretar la incidència que va tenir la malaltia a l'Edat Mitjana, però podem deduir de manera indirecta que va ser important, degut a l'establiment de la cerimònia del "toc reial". L'única causa possible de la malaltia era la intervenció divina, segons la creença popular. I donat que també es suposava que els monarques tenien poder guaridor, el tractament més desitjat era ser tocat per ells, mentre pronunciaven la frase "El Rei et toca, i Deu et guareix" (14).



Figura 1.2 – Gravat on es pot veure a Henri IV de França tocant als malalts d'escròfula, mot referit a diverses formes de TB no pulmonar, sobretot la ganglionar cervical. Gravat de Pierre Firers, extret del treball d'André de Laurens.

La incidència de TB va augmentar progressivament durant l'Edat Mitjana i el Renaixement. Desplaçant inclús a la lepra. I ja al segle XVII és considerada un greu problema de salut pública en tots els països occidentals.

La gran epidèmia europea, que minvà incontablement la població, va rebre el nom de “Pesta Blanca”, amb inici al segle XVII i fi al segle XIX (15). Els valors màxims de mortalitat s'enregistren entre el 1780 i el 1880, coincidint amb la migració massiva dels camperols cap a les ciutats buscant un lloc de treball a les fàbriques. Traduït en dades numèriques, per exemple a Espanya les estadístiques oficials parlen de 30 000-75 000 morts anuals per TB.

Però no tot va ser negatiu en aquest període de la història. La nova visió de l'anatomia sorgida durant el Renaixement va permetre realitzar estudis anatòmic-patològics. Silvius (1614-1672), gràcies a les autòpsies, va ser capaç de relacionar els tubèrculs descoberts en el teixit necrosat amb els símptomes de tisi que havia patit el pacient (3,14). Richard Morton (1637-1698) va incloure dins del concepte de tisi l'afebliment que pateix l'organisme, tot ben descrit en la seva obra *Phthisiologia* (1720), una obra monogràfica sobre la malaltia tuberculosa que resumeix tots els coneixements sobre TB que existien fins aquell moment. I Pierre Dessault (1675-1737) va establir que es tractava d'una malaltia infecciosa i que els esputs podrien ser la causa

del contagi, però es tractava d'un punt de vista massa avançat per a la seva època, i fou ràpidament oblidat.

El Romanticisme

Durant el Romanticisme la TB es va convertir en la malaltia de moda. Hom percebia la mort com un vehicle per alliberar-se. El suïcidi o l'abandonament personal fins a contraure la TB i morir eren els objectius més desitjats. L'aparença ideal era una natura malaltissa, on hi destacaven la pal·lidesa, l'aspecte fràgil, l'expressió de sofriment i una sensibilitat extrema.

La TB s'esdevé culturalment "la malaltia dels privilegiats" i es creu que confereix als malalts un increment de la creativitat. Es relaciona sobretot amb la classe social amb elevat poder adquisitiu, els joves i les dones.

Gràcies a les estadístiques hom ha pogut comprovar que no es tractava d'una malaltia de rics, ni molt menys. La TB afectava principalment a la classe treballadora degut a les condicions de vida, d'habitatge, de treball i d'alimentació (16).

Ja durant el segle XIX, té lloc un canvi d'actitud de la societat envers la TB, i el personatge del malalt adquireix les mateixes connotacions que té avui dia. El tísic passa de ser un heroi a convertir-se en un marginat social.

La causa de la tisi encara era desconeguda. La polèmica sobre el seu caràcter hereditari o contagiós encara romania present a la societat. I a mitjans del segle XIX el tractament encara era variat i ineficaç, basat en sagnies, purgants, emètics i una dieta enfortidora. I va ser durant aquesta època, que es va considerar que l'aire atmosfèric tenia qualitats benefactores, la qual cosa precedeix segurament el culte a l'aire pur que va tenir lloc durant l'època sanatorial.

El fet més destacat s'atribueix al metge militar Jean-Antoine Villemin (1827-1892), que realitzant experiments sobre la transmissió de la TB, inoculant conills amb matèria tuberculosa i pus de malalts humans i bòvids, va ser capaç l'any 1865 de demostrar que la TB havia de ser inclosa dins dels grup de les malalties virulentes. Cal dir però, que la seva opinió no va ser àmpliament acceptada, fins que al 1877 Julius Conheim i Carl Salomonsen van ser capaços de reproduir experiments semblants.

El bacil de Koch

Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910) era un metge prussià que ha estat considerat el fundador de la bacteriologia. Gràcies als estudis que va portar a terme sobre el carboncle, va ser capaç de descobrir-ne l'agent causal, el *Bacillus anthracis*.

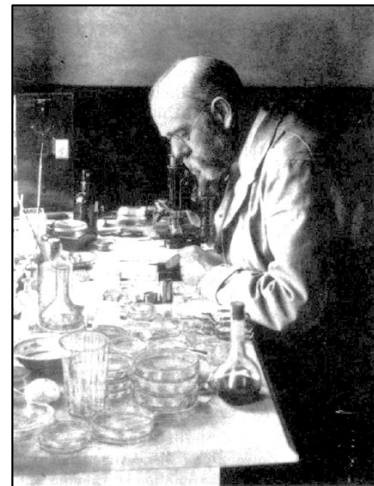


Figura 1.3 – Foto de Koch

Però no sols això, gràcies aquests estudis previs també havia estat capaç de desenvolupar la tècnica dels cultius purs, considerada com una de les major aportacions del científic alemany a la microbiologia, i desenvolupà noves tècniques de tinció. També cal destacar que gràcies al seu treball al pavelló de tísics de l'Hospital de la Charité de Berlín, tenia accés a material patològic. I, tot això, li va proporcionar una base sòlida per a iniciar l'estudi de l'agent causal de la TB el 18 d'agost de 1881 (17,18).

Només 8 mesos més tard, el 24 de març de 1882, aplicant els seus propis postulats, "Els postulats de Koch", a aquesta malaltia, havia estat capaç descobrir-ne l'agent causal, el *Mycobacterium tuberculosis* (19). Va observar i aïllar el bacil de lesions tuberculosos, el va cultivar *in vitro*, el va inocular en animals i va veure que produïa la mateixa malaltia i, finalment, va poder recuperar novament el bacil de les

lesions. Des d'aquest moment, el dia 24 de març s'esdevé el Dia Mundial de la Tuberculosi.

El descens de la TB

Gràcies a la millora en les condicions de vida, incloses les millores laborals, la higiene i la nutrició, la incidència de la TB va començar a disminuir. I aquesta és la tendència que s'ha mantingut fins a la segona meitat del segle XX, exceptuant els períodes de catàstrofes mundials, com van ser la Primera i la Segona Guerra Mundial.

Aviat la presència del bacil tuberculós a l'esput va ser considerada com la prova diagnòstica per excel·lència. Els descobriment dels raigs X, que va portar a terme W.C. Röntgen (1845-1925), va permetre l'estudi de les lesions pulmonars i es va implantar arreu ràpidament.

Encara no es disposava d'un tractament efectiu contra la malaltia, i la medicació es basava en cures de repòs, combinades amb exercici suau i aire pur, complementades amb una bona alimentació. Els sanatoris eren centres hospitalaris, amb una rigorosa reglamentació, a vegades més estrambòtica que terapèutica, que tenien una doble missió: aïllar els malalts tuberculosos per evitar contagis i "curar" aquests malalts. El primer sanatori europeu el va fundar Hermann Brehmer al 1854 (15). I el primer sanatori americà, en Edward Livingston Trudeau, al 1884 (20). Com a complement de la teràpia sanatorial, es va desenvolupar la col·lapsoteràpia, amb una peça clau, el pneumotòrax artificial de Forlanini (1906), i també la toracoplastia.

El 4 d'agost de 1890, R. Koch va desvetllar els resultats que havia obtingut sobre una substància que podia prevenir el creixement del bacil tuberculós, la tuberculina (21). Avui dia sabem que el Govern Prussià va pressionar al científic perquè fes públic el seu descobriment. I és fruit d'un assaig clínic molt poc rigorós, on no es van respectar les indicacions terapèutiques d'en R. Koch i on l'estudi estadístic mostra

mancances importants, que es va condicionar i es condiciona encara avui dia l'ús de la immunoteràpia contra la TB (19).

Tot i així, existeixen moltes evidències [22,23,24,25] que demostren que l'ús terapèutic de la tuberculina va estar àmpliament estès fins a la segona meitat del segle XX. I, òbviament, no existeix cap dubte del potencial diagnòstic de la infecció mitjançant la tuberculina, donat que és el sistema que encara s'empra actualment, substituint la tuberculina antiga de la prova originària per un derivat proteínic purificat (PPD), que presenta menys reaccions inespecífiques.

Les aproximacions quimioterapèutiques van començar a generalitzar-se cap al 1920, amb l'ús de sals d'or (sanocrisina). Però no va ser fins a la meitat de la Segona Guerra Mundial, que es va descobrir el primer antibiòtic eficaç contra *Mycobacterium tuberculosis*, l'estreptomicina, per Selman Abraham Waksman. Paradoxalment, i per combatre mutacions resistents a l'estreptomicina (26), es van realitzar tractaments combinats amb isoniazida (INH), que s'havia descobert al 1912, però que havia passat desapercebuda (3). Posteriorment, es van anar introduint la resta d'antibiòtics, que utilitzem encara per combatre la TB: cicloserina (1955), kanamicina (1957), rifampicina (RIF) (1965), etionamida (1966), etambutol (1968) i pirazinamida (PZA) (1970).

L'any 1956 es va portar a terme l'estudi de Madràs, amb la finalitat de valorar la possibilitat d'eliminar el ingrés hospitalari del malalt, per tal de rebaixar el cost de les campanyes antituberculosos, sobretot al Tercer Món. Aquest experiment va aclarir dos fets del tractament: la possibilitat que el malalt contagiés a les persones del seu entorn, i la influència de la dieta en el tractament. Al 1966 va quedar demostrat que la possibilitat de contagi no era superior si el malalt es quedava a casa, i que el règim alimentari no influïa en la resposta al tractament. Això va fer que molts sanatoris tanquessin, i que es modifiqués l'enfocament terapèutic de la malaltia.

A més a més, estudiant el problema de l'autoadministració, al Centre de Quimioteràpia Tuberculosa de Madràs, es va veure que els efectes secundaris desagradables del tractament feien que el malalt no el prenguessin. Aquest fet ja s'havia vist a altres parts del món, i la única solució que es veia al problema era que s'administrés el tractament per part del personal sanitari, una proposta inviable de posar en pràctica. Aquest fet va ser, sens dubte, una "visió futurista" de la implantació, per part de la OMS, de l'actual "Tractament Directament Observat" (TDO).

Junt amb l'esperit de voler guarir la TB, al segle XX també hi va haver l'esperit de voler prevenir la malaltia. Encara que cal dir que l'obtenció de la vacuna adequada va ser fruit d'una observació casual. Albert Calmette (1863-1933) i el seu ajudant Camille Guérin (1872-1961) van cultivar el bacil de la TB bovina, *Mycobacterium bovis*, en un medi glicerinat de patata amb bilis de bou, per afavorir-ne l'emulsió, i van descobrir que els successius cultius provocaven una disminució progressiva de la virulència. Al cap de 231 passades, el bacil atenuat de Calmette i Guérin, la vacuna BCG, va participar en el primer assaig clínic (1921-1927), mostrant la seva protecció en nens (14). Tot i la presència de diversos estudis amb conclusions contradictòries, el fet que es determinés que era innòcua i que produïa un cert grau d'immunitat, va fer que el seu ús s'estengués, un cop registrat el fort increment de la TB després de la Segona Guerra Mundial (27).

Actualment, la BCG és encara la vacuna de referència utilitzada a nivell mundial, i es continua administrant en llocs d'elevada incidència. Cal dir però, que ens resulta difícil determinar amb precisió quina pot haver estat la influència de la vacunació massiva amb BCG sobre el descens de la TB, donat que la seva eficàcia és motiu de discussió encara avui dia.

TB: una malaltia reemergent

La situació assolida feia pensar que el problema de la TB es podria resoldre durant les properes dècades als països desenvolupats, i poc després a la resta del món. Es confiava plenament en la vacunació massiva i en la quimioteràpia, i s'havia començat a treballar en tractaments que actuessin contra la infecció tuberculosa latent (ITBL).

Però l'aparició de l'epidèmia de la Síndrome d'Immunodeficiència Humana Adquirida (SIDA), a principis dels anys 80, va fer que la regressió de la TB s'aturés. El VIH no ha fet altra cosa que augmentar les probabilitats d'emmalaltir en el cas d'individus amb ITBL i de morir en el cas dels malalts. I el problema encara s'ha fet més complicat amb l'aparició de soques de *M.tuberculosis* resistents (TBR) i multiresistents (TBMR) als fàrmacs emprats (28).

Fruit d'uns programes de control de TB inadequats, les xifres d'incidència, prevalença i mortalitat assolides van obligar a la OMS, l'any 1993, a declarar la TB com una emergència de salut pública.

La OMS va començar a promoure el TDO l'any 1991 (29,30), i ja al 1994 va produir un marc per al control eficaç de la TB (31), on feia una descripció de l'estratègia TDO. Aquest marc fou revisat i ampliat l'any 2002 (32), per promoure una expansió geogràfica del camp d'actuació i per incloure-hi la problemàtica de les TBR i TBMR.

Molt breument, els principis bàsics del TDO són:

- Intervenció organitzada i sostinguda per part dels governs
- Identificació ràpida dels casos
- Quimioteràpia eficaç i fàcil, administrada de manera directa i sota supervisió
- Maneig eficient dels fàrmacs
- Sistema de comunicació i registre de dades

L'objectiu general de la OMS és eradicar la TB l'any 2050. Amb aquesta finalitat l'any 2006 es va formular "The Global Plan to Stop TB" (2006-2015) (33); amb els objectius concrets de millorar i reforçar els sistemes sanitaris, augmentar els recursos humans, incloure aspectes relacionats amb el control del VIH i les soques resistents i multiresistents als plans d'actuació; promoure noves proves diagnòstiques, així com promoure la investigació i el desenvolupament de nous fàrmacs i noves vacunes. Els resultats publicats a l'informe anual de l'any 2007 (2) mostren que anem assolint objectius. Tot i ser així, la victòria final contra la TB encara ens queda lluny.

1.2 La infecció tuberculosa latent (ITBL)

La infecció per *M.tuberculosis* afecta avui dia a un terç de la humanitat, és a dir, a 2 500 000 000 de persones. L'interès en l'estudi de la ITBL i el seu tractament es basa en el fet que, en un 10% dels casos tindrà lloc un recreixement bacil·lar donant lloc a una TB (34).

Podem dir que s'estableix la infecció quan *M.tuberculosis* té la capacitat de créixer al interior dels macròfags alveolars. Avui dia, aquest fet el podem demostrar a través de la inoculació intradèrmica de PPD, també anomenada prova de Mantoux, i la posterior avaluació de la resposta immune d'hipersensibilitat retardada (DTH) que genera (34). O visualitzant la presència de cèl·lules T efectores productores d'IFN- γ en cultius de cèl·lules monocítiques de sang perifèrica (PBMCs), després d'un estímul curt amb antígens específics, (35) mitjançant la tècnica d'ELISPOT. O bé, detectant la producció d'IFN- γ en el sobrenedant d'aquests mateixos cultius, mitjançant la tècnica d'ELISA.

Un cop comprovada la infecció, cal realitzar una radiografia de tòrax, per tal de visualitzar lesions pulmonars. Si es detecten lesions actives o

de nova generació, es diagnostica una TB (34). Si pel contrari, no es troben lesions, estem davant d'una ITBL.

L'aparició del bacil latent (BL) ha estat un punt clau de la infecció per *M.tuberculosis*. Segurament, aquest ha estat un dels aspectes que més ha motivat als científics estudiosos de la TB, fins al punt que la infecció per *M.tuberculosis* ha passat a dir-se "infecció tuberculosa latent".

D'una banda, sabem que qualsevol gènere bacterià presenta formes de resistència o formes metabòlicament enlentides que fan front a l'estrès ambiental, a la manca de nutrients, mitjançant un canvi metabòlic que condueix a la inducció de la Fase Estacionària (FE) (36). I en totes aquestes bactèries s'ha pogut demostrar que, aquest estat els confereix una major capacitat de resistència (37).

I, d'altra banda, es pot destacar que mitjançant estudis de genòmica i proteòmica s'ha demostrat que els micobacteris no difereixen gaire de la resta de microorganismes (38).

Per què tanta importància, doncs, per respondre a la pregunta : Què és el BL ? Doncs, la solució la trobem en què cal conèixer molt bé aquest bacil per poder demostrar la validesa d'un nou tractament contra la ITBL.

Models *in vitro* de latència

Sens cap dubte, l'interès sobre els BL va començar l'any 1948, quan els investigadors van adonar-se que les recaigudes de la malaltia, que tenien lloc mesos o anys després del tractament, no es podien justificar per l'adquisició de resistències als antibiòtics utilitzats, donat que es feien servir pautes farmacològiques múltiples (39).

A finals de la dècada dels anys 70, amb la introducció de la rifampicina i determinats estudis per explicar per què amb l'addició d'aquest fàrmac

al tractament es podien esterilitzar les lesions més ràpidament, Mitchinson i Dickinson van predir l'existència d'una població bacil·lar que no presentava activitat metabòlica o que la tenia molt reduïda. (40). De fet, els seus estudis són la base per a les teories sobre les poblacions bacil·lars en les lesions de TB, fonamentades en la velocitat de proliferació dels microorganismes (41,42) Aquests descobriments van donar sentit a les observacions clàssiques sobre la capacitat de persistència de *M.tuberculosis* en cultius antics (43) i es corresponen amb les reactivacions que poden tenir lloc a la ITBL (44,45).

Totes aquestes observacions van donar lloc a l'origen del mecanisme de "ressuscitar", que recentment s'ha vist afermat per la troballa de proteïnes per "ressuscitar", capaces d'induir el creixement de BL que es trobaven en condicions de FE durant molt de temps, al llarg del qual la seva viabilitat no s'havia pogut demostrar per altres mètodes (46). Però, aquest mecanisme difícilment pot explicar com els BL de lesions tuberculoses antigues poden créixer i generar una TB activa, si tenim en compte que les proteïnes per "ressuscitar" les generen bacils en creixement actiu.

Per demostrar la capacitat dels bacils per adaptar-se a condicions de microaerobiosi i d'anaerobiosi, Wayne i Lin (47,48) van portar a terme experiments amb medis artificials. Van demostrar que, induint progressivament una baixa pressió d'oxigen, *M.tuberculosis* canviava el seu metabolisme a través de l'estimulació d'alguns enzims. Aquest canvi metabòlic va rebre el nom del *shunt* del glioxilat (49), i es va veure que tenia dos finalitats, obtenir poder reductor (NAD) per poder portar a terme una respiració de tipus fermentació anaeròbica i obtenir energia a partir de compostos lipídics (50).

Aquest estudi es pot criticar per la relativa importància que té la baixa pressió d'oxigen perquè *M.tuberculosis* proliferi als teixits de l'hostatger.

De fet, les condicions microaeròfiles generades artificialment són les que ja existeixen als macròfags de forma fisiològica (51).

També és criticable perquè, els resultats de cultius en anaerobiosi, per contra, demostren que els bacils no sobreviurien més enllà d'alguns mesos. De fet, l'anaerobiosi podria donar-se en el cas de grans lesions presents en TB actives, o inclús en aquelles fibrosades a mig camí de ser calcificades, però, fins a la data, aquest ambient mai s'ha trobat en la ITBL. Com a molt, s'ha pogut demostrat un ambient de microaerobiosi, que d'altra banda és habitual en la majoria de teixits cel·lulars.

I finalment, també s'ha pogut veure creixement bacil·lar exponencial en experiments portats a terme amb ratolins Knock Out (KO) per citocines bàsiques en la resposta immune, com IFN- γ o TNF- α , o de cèl·lules T CD4, que presentaven grans lesions necròtiques, definides com lesions amb baixa concentració d'oxigen (52,53).

Models *in vivo* de latència

Podem afirmar que, la major part de la informació disponible sobre l'origen dels BL prové dels estudis portats a terme amb models experimentals d'infecció tuberculosa. Això ha estat possible gràcies al paral·lelisme existent entre fase crònica i ITBL.

Els estudis clàssics d'en Wallace (54) van demostrar en el model murí que els bacils de pulmons infectats en fase crònica eren molt més resistents a l'estrès per calor que quan aquests mateixos bacils eren aïllats en fase aguda. Ja que els bacils aïllats de cultius en FE també eren més resistents a aquest estrès que els bacils procedents de fase en creixement exponencial (FIG 1.4A), es va concloure que la resistència a l'estrès per part del bacil en fase crònica tenia el seu fonament en el metabolisme enlentit que presentava com a conseqüència de trobar-se en FE.

Aquesta teoria ha estat confirmada recentment per altres autors (55), mitjançant la comparació entre la concentració de bacils viables i l'ADN cromosòmic, un paràmetre que reflexa tant els bacteris viables com els bacteris morts. Durant la infecció crònica, els recomptes de UFC es mostren estables, i podem tenir dos possibles situacions per explicar aquest fet. Que tingui lloc un equilibri estàtic, on la replicació és mínima o nul·la i per tant, veiem una petita diferència en l'evolució i la quantitat d'ambdós paràmetres, bacils viables i ADN cromosòmic (FIG 1.4B). O bé, que tingui lloc un equilibri dinàmic, on l'elevada taxa de replicació queda compensada amb una elevada mortalitat, fruit de la resposta immune adquirida, i a on podríem veure nombres constants de bacils viables però quantitats creixents d'ADN cromosòmic, donat que aquest pateix un procés d'acumulació. Doncs bé, aquests autors demostren que l'acumulació d'ADN cromosòmic és mínima durant la fase crònica. I aquesta dada reflexa que els bacils en fase crònica es troben predominantment en FE, com va predir en Wallace al 1961.

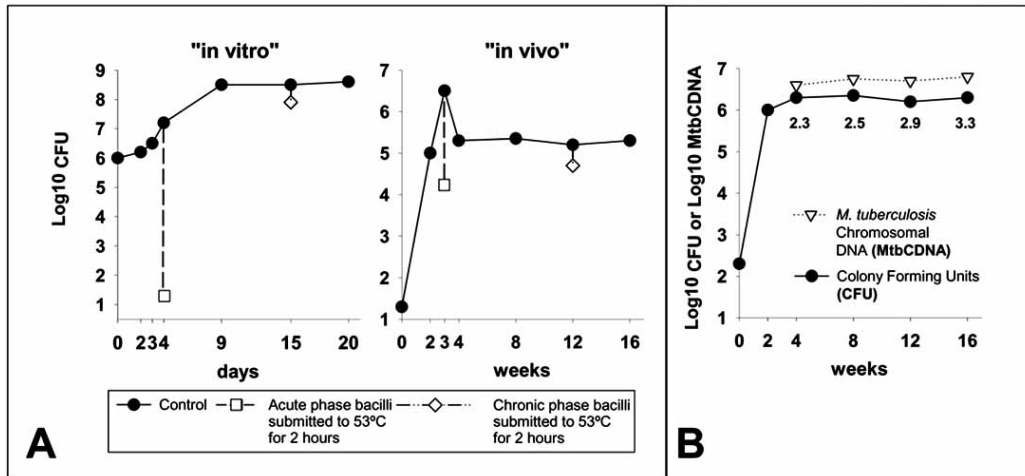


Figura 1.4 – Paral·lelisme existent entre fase crònica i ITBL. (A) Experiments clàssics d'en Wallace. (B) Demostració de l'equilibri estàtic en fase crònica. Adaptat de la publicació Cardona. *Inflammation & Allergy-Drug targets* 2007;6:27-39 (56)

Per tant, es pot concloure que els BL són la població bacil·lar capaç de sobreviure a la immunitat específica de l'hoste i de persistir durant la fase crònica de la infecció, i es troben predominantment en FE.

La TB presenta unes característiques fonamentals, com són la presència, a les lesions, de diferents poblacions bacterianes segons la seva fase metabòlica, distribuïdes en diferents nínxols ecològics, bacils intra i extracel·lulars, amb diferents concentracions de pH, pressió d'oxigen, i molts altres paràmetres, que fan massa complicada la tasca de modelitzar-ho tot *in vitro*. Per aquest motiu, els models experimentals animals han estat tan importants en l'estudi de la TB. Sobretot, el model murí de TB, que ha estat clau en l'estudi de la patogènia de la malaltia, així com en l'estudi del seu tractament.

Des de fa molts anys, el coneixement sobre la histopatologia de la TB humana es basa en els estudis portats a terme per Lurie (57,58,59,60) amb dues soques de conills, *sensible* i *resistent*, i que van ser posteriorment completats i interpretats per Dannenberg (61,62,63,64,65,66). D'aquests experiments es dedueix que el model de TB desenvolupat en la soca *resistent* de conills de Lurie és el que més mimetitza l'evolució de la TB en l'ésser humà immunocompetent. Aquests animals són capaços de desenvolupar una resposta immune molt important, amb la presència de lesions cavitades, i d'evitar la disseminació de noves lesions.

Els conills porquins són molt més susceptibles a *M.tuberculosis* si els comparem amb els conills i els ratolins. Els conills porquins requereixen d'un inòcul aproximadament 100 vegades menor que el conill i el ratolí, i la infecció progressa cap a la mort en tots els casos. Cal destacar que, en aquests animals té lloc una forta disseminació hematògena, i que desenvolupen lesions necròtiques i cavitades (67). La presència de DTH en aquests animals és molt important i té una durada molt llarga en el temps. De fet, aquesta va ser la reacció inicialment descrita per Koch (68). S'estimula a dosis molt baixes de PPD, i és extraordinàriament similar a la reacció produïda en humans, tant macro com microscòpicament. Per això es tracta d'un bon model per estandarditzar les tuberculines.

Si comparem el model de conill porquí amb el model murí, podem afirmar que es tracta d'animals amb molta més capacitat per respondre contra *M.tuberculosis*, capaços d'exercir un millor control sobre la concentració bacil·lar. Histopatològicament, mostren granulomes més ben definits i estructurats, amb una capa gruixuda de fibrosi a l'exterior, necrosi intragranulomatosa, i no es detecten gaire bacils, sols en la perifèria del granuloma i dins dels macròfags escumosos. I aquest fet s'explica molt fàcilment: tenen un volum 50 vegades major que els ratolins. El fet de tenir un volum superior, si assumim que el tamany de les cèl·lules del sistema immune és similar en tots els mamífers, fa que puguin desenvolupar una resposta immune molt més intensa, generant teixit necròtic ("teoria dels volums")[69]. Actualment, en el cribatge de vacunes profilàctiques, s'utilitza aquest model per avaluar la toxicitat, monitoritzant la pèrdua de pes al llarg del temps.

La utilització del model murí de TB, en l'actualitat, supera molt als models anteriorment descrits. Lògicament, una de les raons de pes ha estat el preu, i l'altre raó ha estat el manteniment dels animals. També cal destacar que la immunologia del ratolí es coneix millor que la dels altres models citats. I que existeix un major ventall de reactius per poder estudiar la resposta immune en aquest model.

El model experimental de Cornell (70,71) es va convertir en la primera prova experimental de l'existència de BL. Aquest model es va fer servir durant molt de temps i, encara avui dia hi ha científics que el fan servir. Es basa en la inoculació endovenosa a ratolins d'una elevada concentració de *M.tuberculosis*, aproximadament 10^5 UFCs. Es deixa que la infecció es desenvolupi durant dos setmanes; pulmons i melsa arriben a assolir concentracions bacil·lars de 10^7 UFCs. Després es realitza un tractament antibiòtic amb INH 25mg/Kg i PZA 1g/Kg. I es pot comprovar que a les 12 setmanes els òrgans són aparentment estèrils, donat que no s'observa cap bacteri cultivable. Quan es tracten els animals amb cortisona, durant quatre setmanes, a partir del segon o

del tercer mes posterior a la finalització del tractament antibiòtic, es pot observar la reactivació de la infecció en el 100% dels casos. Es postula, doncs, que durant aquest temps que els teixits semblen estèrils, els bacils es trobarien en fase latent.

El model murí ha estat presentat com el paradigma de l'hoste capaç de posar en marxa una resposta immune eficaç contra *M.tuberculosis*, donat que exerceix un control sobre la infecció sense provocar necrosi als teixits infectats, és a dir, sense gaire toxicitat per a les cèl·lules.

Gràcies als avenços tècnics en immunologia i biologia molecular s'han pogut conèixer millor els mecanismes implicats en la resposta immune del model murí. Existeixen estudis (72,73,74) que demostren la presència d'una resposta immune de tipus cel·lular on intervien limfòcits T CD4 del subtipus Th1, capaços de secretar IFN- γ , que junt amb el TNF- α present, provoquen un efecte bactericida contra *M.tuberculosis*. Sembla que, en aquest fet, podrien intervenir radicals d'oxigen i de nitrogen, així com la disminució del pH a l'interior del fagosoma (75,76).

També s'ha pogut demostrar, gràcies a aquest model, la participació de les cèl·lules T del tipus $\gamma\delta$ per regular l'estructura del granuloma (77), la presència de cèl·lules *natural killer* (NK) a l'inici de la resposta immune inespecífica (78,79), així com una població de limfòcits de memòria capaços de proliferar davant d'una reinfecció (80,81). La relació entre la inducció de la DTH i les cèl·lules T CD4 productores de IFN- γ és controvertida. Per un cantó s'ha observat una població de cèl·lules T CD4 responsables de portar a terme la DTH diferenciada de la població de limfòcits T CD4 que sintetitzen IFN- γ (82). Per un altre, s'ha demostrat que ambdues poblacions es sobreposaven (83). I un fet observat, molt important, és que la població de limfòcits T CD4 responsables de la resposta immune protectora s'estimulava amb la

presentació d'antígens secretats per *M.tuberculosis* al interior del fagosoma.

La nostra experiència amb el model murí d'infecció per aerosol de baixa dosi (84) ens va portar a formular una hipòtesi ben diferent de la establerta i a introduir dubtes sobre l'eficiència de la resposta immunitària del ratolí contra el micobacteri (85). Als nostres estudis sobre l'evolució de la histopatologia (FIG 1.5), vam poder observar lesions primàries, poques, representades per acúmuls de neutròfils, macròfags i limfòcits, que amb el temps s'acabaven limitant per un anell limfocític. Posteriorment en el temps, apareixien lesions secundàries, moltes, formades per un petit nombre inicial de macròfags que eren ràpidament envoltats per limfòcits. Això s'explica perquè quan es desenvolupen aquestes lesions, l'hoste ja disposa d'una resposta immune adquirida important.

Malgrat que inicialment no es va tractar d'un fet que ens cridés l'atenció, donat que són cèl·lules que es troben presents en lesions pulmonars de diverses etiologies, el fet més important de les nostres observacions ha estat descobrir l'enorme importància que tenen els macròfags escumosos (ME).

Amb el temps, tant les lesions primàries com les secundàries, apareixien envoltades d'una corona de ME, que ocupaven l'espai intraalveolar. Es tracta de macròfags que "netegen" les lesions de detritus cel·lulars. Molts d'aquests macròfags estarien activats directament per limfòcits o bé per la ingesta de detritus que contenen restes de paret cel·lular bacteriana. Això s'ha pogut comprovar gràcies a l'expressió de la Òxid Nítric Sintasa (NOS). Vam poder observar que els ME podien portar algun bacil al seu interior, i si s'observava la presència de molts bacils en l'interior de ME, aquests es trobaven fora dels granulomes, i amb aspecte força deteriorat.

Pensem que l'hostatger podria ser "enganyat" pel bacteri, donat que davant de la situació d'estrès es tornaria "invisible" per a les cèl·lules de la resposta immune, probablement disminuint el seu metabolisme i entrant en una fase de latència, de manera que no hi hauria creixement bacil·lar. Cal tenir en compte que la resposta immune es dirigeix contra pèptids que sintetitzen els bacils en creixement, i per tant, els BL passarien desapercebuts.

O bé, una altra explicació possible, que no exclou, seria que el nivell d'activació d'aquests ME no els permetria portar a terme la destrucció dels bacils, donat que sintetitzen Òxid Nítric (NO), que pot provocar immunosupressió local. Quan aquestes cèl·lules es trobaven plenes de cossos lipídics i no podien fagocitar res més, es dirigien cap als espais alveolars, per ser conduïts cap als espais bronquials superiors mitjançant l'epiteli ciliar (86). Els bacils que carreguen al seu interior podien, doncs, iniciar una fase de creixement exponencial en zones del parènquima pulmonar lliures de la pressió immune. I, d'aquesta manera, aquestes cèl·lules serien capaces de generar noves lesions secundàries constantment, mitjançant la disseminació.

Aquestes cèl·lules serien doncs, el factor clau per a l'"escapament" dels bacils cap a fora del granuloma. Aquesta hipòtesi també ens ajuda a explicar per què s'observen nivells constants de citocines claus per a la resposta immune, com IFN- γ o TNF- α , al teixit dels animals infectats i, tot i així, no s'aconsegueix esterilitzar-los. I aquesta també podria ser la raó per la qual els ratolins moren per la quasi total ocupació del parènquima pulmonar (87,88,89).

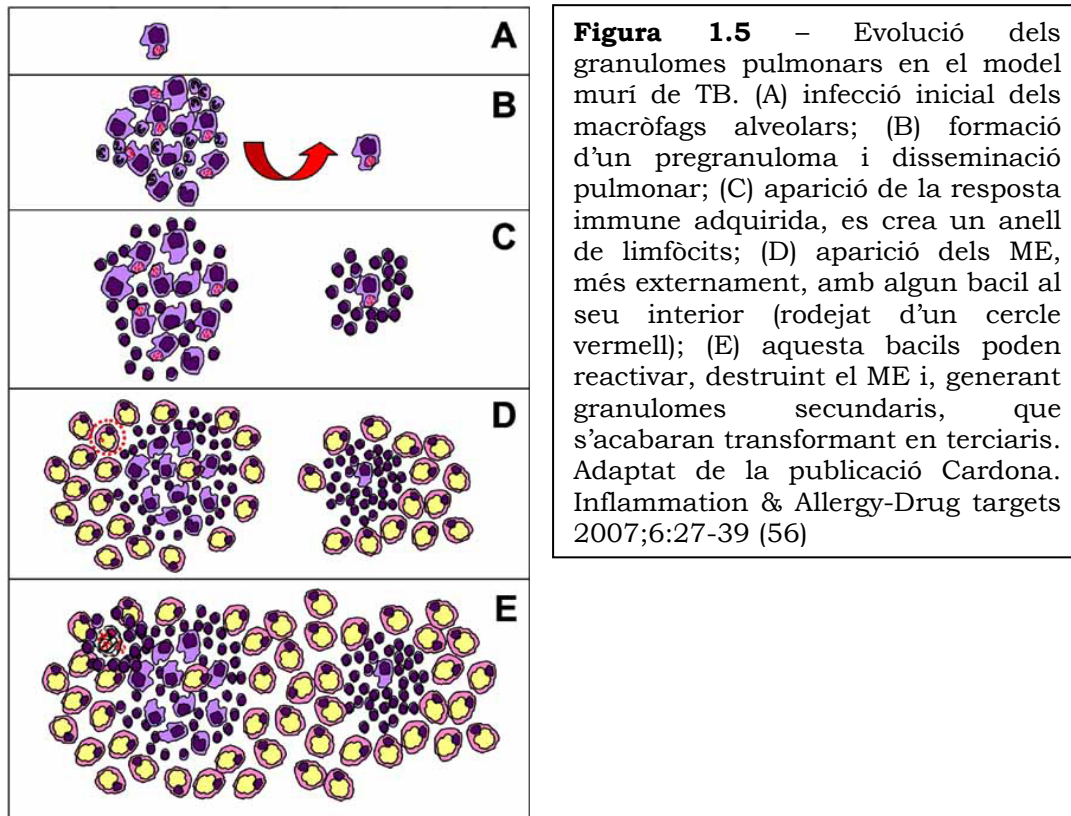


Figura 1.5 – Evolució dels granulomes pulmonars en el model murí de TB. (A) infecció inicial dels macròfags alveolars; (B) formació d'un pregranuloma i disseminació pulmonar; (C) aparició de la resposta immune adquirida, es crea un anell de limfòcits; (D) aparició dels ME, més externament, amb algun bacil al seu interior (rodejat d'un cercle vermell); (E) aquesta bacils poden reactivar, destruint el ME i, generant granulomes secundaris, que s'acabaran transformant en terciaris. Adaptat de la publicació Cardona. *Inflammation & Allergy-Drug targets* 2007;6:27-39 (56)

Tot i que el model murí d'infecció crònica és el més emprat en l'actualitat, molt possiblement la seva utilitat no sempre es porti a terme de la manera més adient. Cal destacar que alguns dels investigadors que treballen amb models murins de TB, sovint semblen oblidar la història natural d'aquesta malaltia. I, o bé per comoditat, o bé per economitzar els estudis, i sovint amb plantejaments experimentals erronis, porten a terme la infecció dels animals mitjançant inoculació endovenosa d'elevades concentracions de *M.tuberculosis*, en comptes de portar a terme la infecció per aerosol. Òbviament, quan s'inocula una elevada concentració bacil·lar en la melsa, es genera de manera quasi immediata una immunitat específica contra *M.tuberculosis*, i així s'obté una població a nivell pulmonar molt més minsa que la induïda per aerosol. Podem dir, que es tracta d'un model molt menys agressiu (88,89). I sols seria adient per a determinats tipus d'estudis.

El model murí “humanitzat”

Una de les característiques més importants de la infecció per *M.tuberculosis* en els humans, és el fet d'induir necrosi intragranulomatosa (90). Altres micobacteris, com per exemple *M. avium*, no ho poden fer (91).

Que al model clàssic de ratolí no es generés aquesta necrosi (92), ens va semblar, si més no, inoportú, per tal que implicava dos fets importants. Primer, feia disminuir molt la capacitat d'extrapolar les observacions realitzades en aquest model, a l'humà. I segon, provocava que al model no existís una població bacil·lar extracel·lular, necessària per valorar l'efecte de nous antibiòtics i noves vacunes terapèutiques.

Sabem que la concentració bacil·lar que s'assoleix en la fase d'infecció és similar a la que es detecta en humans, en conills i conills porquins, on si que es produeix la necrosi intragranulomatosa (58,78,93). Per aquesta raó, pensem que l'única explicació possible per aquesta manca de necrosi és que el ratolí sigui un hoste menys sensible (o el que seria el mateix, més tolerant) als antigens de *M.tuberculosis* i que, per tant, necessiti d'una concentració bacil·lar superior perquè s'indueixi. Dues dades que afermen aquesta teoria són que, s'han aconseguit concentracions bacil·lars elevadíssimes en ratolins KO per IFN- γ (52), on es pot observar necrosi intragranulomatosa; i que per aconseguir una resposta DTH mitjançant tuberculina PPD RT-23 en ratolí ens calen 50 μ g, al conill porquí 5 μ g i en el humà en tenim prou amb 0,04 μ g (83,94,95).

Amb l'objectiu de mimetitzar al màxim les condicions presents en la TB humana, el nostre grup va desenvolupar el model murí de TB “humanitzat” (96).

Abans de poder induir necrosi intragranulomatosa en el model havíem de saber quina era la causa d'aquesta necrosi, com podíem induir la seva aparició. En aquest sentit, cal dir que l'estudi bibliogràfic ens va ajudar molt. L'origen de la necrosi s'havia relacionat des de l'inici de les investigacions sobre TB amb el fenomen de Koch (97).

Buscant un mètode terapèutic contra la TB, Robert Koch va veure que quan infectava un conill porquí intradèrmicament, als 10-14 dies podia veure un petit nòdul amb ulceració al lloc d'inoculació, junt amb la disseminació cap als ganglis limfàtics propers i cap a diferents òrgans, provocant la mort de l'animal en pocs mesos. Però també va veure que si reinfectava aquest animal, la reacció immune que es produïa era ben diferent. A les 24-48 hores, observava una escara que es resolia sense problemes, els ganglis no es veien afectats i no hi havia disseminació sistèmica. Utilitzant cultius estèrils filtrats i concentrats per evaporació va crear la "tuberculina antiga". Posteriorment, Von Pirquet va extrapolar que la reacció a la tuberculina implicava un contacte previ de la persona amb *M.tuberculosis* (98), i va introduir el mètode diagnòstic que, sense gaires modificacions, encara fem servir avui dia.

La "Reacció de Koch" es va definir com una resposta immune d'hipersensibilitat retardada (99). Gràcies al seu estudi, es va veure que les cèl·lules presentadores d'antígens locals (APCs), macròfags o cèl·lules dendrítiques, eren capaces de captar i de processar els antígens inoculats, i els presentaven als limfòcits Th1 específics, provocant l'alliberament de quimiocines, amb la finalitat de fomentar el reclutament de més macròfags i de cèl·lules polimorfonuclears (PMNs). També es secretava IL-3 i factor estimulador de colònies de granulòcits i de monòcits (GM-CSF), provocant 3 efectes claus. Produir l'estimulació de la producció de monòcits en la medul·la òssia, activar als macròfags i el seu alliberament de factors inflamatoris, com l'IFN- γ , i promoure l'expressió de molècules d'adhesió a vasos sanguinis locals, com el

TNF- α . Entre les 48 i les 72 hores següents, s'havia provocat una forta acumulació local de cèl·lules, sobretot macròfags i limfòcits al humà o macròfags, limfòcits i neutròfils al ratolí, i una induració local deguda de l'edema produït per l'extravasació de fluids dels vasos sanguinis cap al teixit (100).

Dannerberg (63,64), amb la seva interpretació i aprofundiment en els estudis de Lurie (60), va explicar com tenia lloc l'evolució de la TB en l'ésser humà i va relacionar l'aparició de necrosi amb la DTH. Ell (64) considerava que, tant la DTH com la immunitat cel·lular són mecanismes que s'associen a la resposta immune adquirida, que té com a objectiu controlar el creixement bacil·lar. I això ho faria, o bé generant necrosi per evitar el creixement bacil·lar a l'interior del macròfags infectats no activats, mitjançant la DTH, o bé activant els macròfags gràcies als limfòcits específics (64), mitjançant la immunitat cel·lular. Per un altre cantó, hi ha almenys un estudi que fa dubtar sobre la relació necrosi-DTH. Lucas i Nelson (101), en els seus estudis sobre la patogènia de la TB en pacients infectats pel VIH, van enunciar que els pacients anèrgics eren els que desenvolupaven major necrosi als seus teixits.

Aquesta va ser la teoria sostinguda durant molt de temps, però els mecanismes exactes mitjançant els quals la DTH generava la necrosi intragranulomatosa no s'havien aconseguit esclarir.

Llavors, Rook i Al Attiyah (102) van establir una possible relació entre la necrosi i la reacció d'Schwartzman. Aquesta reacció havia estat enunciativa als anys 30 (103), i descriu un fenomen de reactivitat local en la pell, provocat per la inoculació intradèrmica prèvia d'una endotoxina (injecció preparadora), i d'una injecció endovenosa a les 18-24 hores de la mateixa endotoxina (injecció provocadora) (103).

Aproximadament a les 4 hores es desenvolupa una necrosi hemorràgica en el punt de l'inòcul inicial. Si les dos injeccions d'endotoxina es fan endovenoses, té lloc una reacció generalitzada, sovint acompanyada de coagulació intravascular disseminada. La reacció depèn de les cèl·lules polimorfonuclears i de la coagulació dels vasos sanguinis.

En aquest sentit, Rook i Al Attiyah (102) van pensar que els granulomes tuberculosos actuarien com a zona "preparada", i l'alliberament de TNF- α , per part dels macròfags locals en resposta al creixement bacterià, seria la "provocació" necessària per al desenvolupament de la necrosi intragranulomatosa.

Gràcies a tota la informació disponible, el nostre grup va decidir dissenyar experiments per aconseguir un model murí de TB "humanitzat". Segons les nostres observacions prèvies, ens vam deixar influenciar per les teories de Rook i Al Attiyah (102), i vam considerar que els granulomes eren un "teixit preparat". Així doncs, ens calia trobar una "injecció provocadora". Vam portar a terme la inoculació local de lipopolisacàrid (LPS) d'*Escherichia coli* O111:B4, en el pulmó, per via intranasal, 3 setmanes després de la infecció per aerosol. I vam aconseguir induir necrosi als granulomes primaris als 10 dies. Així com una disminució de les UFCs a les 24h, que es resolia als 10 dies, i un augment del nombre de lesions secundàries. A les 9 setmanes post-infecció podíem observar una necrosi intragranulomatosa ben estructurada, bàsicament eosinofílica i de consistència caseosa.

Mentre que al model murí clàssic, la infecció es produïa habitualment per via endovenosa, i es començava el tractament antibiòtic a les 3 setmanes, quan encara no hi havia població bacil·lar latent, molt possiblement perquè encara no hi ha una resposta immune adquirida, al nostre model "humanitzat", la infecció es produïa per aerosol de baixa dosi (entre 10-50 bacils als pulmons), amb un inòcul de 25 μ g de

LPS al dia 20, intranasalment, per a generar la reacció d'Schwartzman i, per tant, la necrosi intragranulomatosa. Posteriorment, portàvem a terme un procés de reactivació bacil·lar mitjançant l'administració diària d'hidrocortisona, de la setmana 9 a la 18, basat en les teories de Rook, que relacionen un increment del cortisol amb la "reactivació endògena" que té lloc en els humans. A la setmana 18, amb uns granulomes ben estructurats, amb un centre necròtic, un exterior densament fibrosat i una concentració de UFCs elevada, iniciàvem el tractament antibiòtic.

Amb aquest model vam aconseguir dos fites molt importants. La primera, demostrar que la presència de necrosi intragranulomatosa podria estar lligada a la reacció d'Schwartzman (103). I la segona, d'aquesta manera aconseguíem imitar millor que amb cap altre model existent les alteracions que sofreix l'humà (96).

La nostra hipòtesi és que l'increment agut i massiu de LPS s'aconseguiria just abans de l'entrada en escena de la resposta immune adquirida, quan la concentració de *M.tuberculosis* augmenta de manera exponencial (60,63,64). En aquest cas la font de LPS, o en aquest cas de la toxina necessària, serien el lipoarabinomanà (LAM) i el *cord factor*, entre d'altres, presents abundantment en la paret cel·lular micobacteriana (104). L'augment de l'endotoxina provocaria l'activació dels macròfags, que secretarien molt TNF- α , provocant la necrosi pel propi alliberament de proteases, junt amb la necrosi produïda per els PMNs acumulats, i junt amb la coagulació de vasos sanguinis locals, que podrien produir uns petits fenòmens d'isquèmia local, amb la producció d'anòxia (103,105).

Però, amb aquest model vam observar una elevada taxa de mortalitat, aproximadament del 20% dels ratolins. Vam associar aquesta mortalitat a la inoculació de LPS, hipotetitzant que el LPS no es distribuïa

homogèniament mitjançant la inoculació intranasal, i que, en alguns casos, podia produir pneumònia massiva, provocant la mort de l'animal. Per aquesta raó, el nostre següent objectiu va ser estandarditzar l'administració de LPS mitjançant aerosol, per aconseguir distribuir àmpliament la mateixa dosi de LPS al llarg de tot el parènquima pulmonar (106).

Amb aquest model vam portar a terme un treball comparatiu sobre l'efecte que produïen diferents soques de *M.tuberculosis*, l'H37Rv, CL-511 i alguns aïllats clínics (UTE0335R, UTE0423R, UTE0705R i UTE0824R), respecte dos soques de ratolí, C57BL/6 (*resistent*) i DBA/2 (*sensible*). Gràcies a aquest treball, vam poder observar que determinades soques de *M.tuberculosis*, postulem que degut a la seva virulència, eren capaces d'induir necrosi intragranulomatosa de manera espontània en el model murí, sobretot en la soca de ratolins *resistent* (107), sense la necessitat d'introduir cap altre endotoxina, com el LPS.

Amb un treball final sobre la relació entre la necrosi intragranulomatosa i la resistència-susceptibilitat, segons la dotació H-2, de diferents soques de ratolí a la infecció tuberculosa, el nostre model murí "humanitzat" de TB va quedar estandarditzat (108). La figura següent mostra l'evolució dels paràmetres més importants del model.

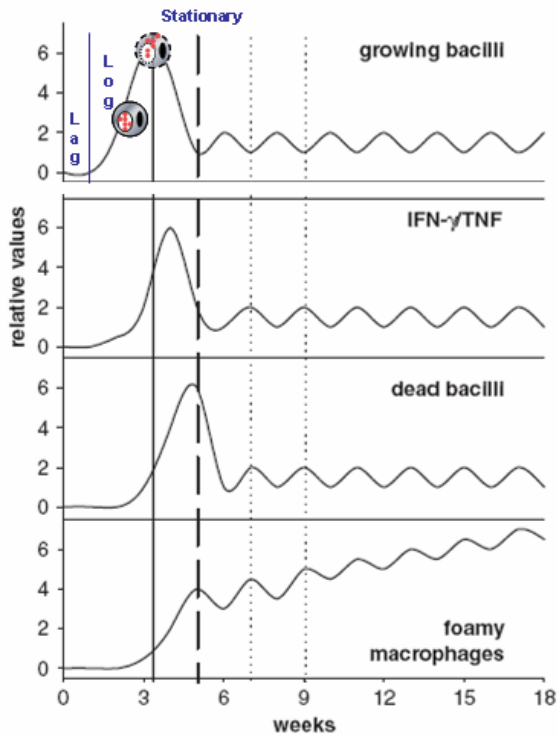


Figura 1.6 – Cinètiques típiques del model experimental murí. Les línies contínua i discontinua mostren el màxim i el mínim dels bacils en creixement actiu. Les línies puntejades representen un cicle en l'evolució de la fase crònica. En les fases *log* i *estacionaria* es mostren macròfags infectats, amb creixement bacil·lar al seu interior i en procés de necrosi, respectivament. Adaptat de la publicació Cardona. *Inflammation & Allergy-Drug targets* 2007;6:27-39 (56) i de la publicació Cardona. *Tuberculosis* 2006;86:273-89 (69)

1.3 El projecte RUTI: desenvolupament d'una vacuna terapèutica

El plantejament de RUTI va sorgir com a resposta a les preguntes plantejades respecte a la fisiopatologia de la ITBL.

El tractament antibiòtic en la ITBL i la hipòtesi “dinàmica”

Gràcies als estudis realitzats hem pogut oferir una visió més racional dels mecanismes implicats en la ITBL, la “hipòtesi dinàmica”, en contraposició a la hipòtesi “estàtica”, que ha estat la base clàssica per explicar l'aparició de la ITBL (56).

Des dels treballs realitzats per Comstock (109) el tractament establert per a la ITBL és l'administració d'INH durant 9 mesos (34). Però si fem

un estudi de l'EBA (early bactericidal activity) en pacients amb TB pulmonar podem veure que l'efecte màxim del fàrmac té lloc a les 48 hores de tractament, amb una reducció de $0,7\text{Log}_{10}$ de la càrrega bacteriana (110). És més, podem dir que l'efecte màxim bactericida de la INH té lloc durant els primers 15 dies de tractament. Per aquesta raó, hom es qüestiona perquè calen 9 mesos de tractament.

La hipòtesi dinàmica és l'única capaç d'argumentar la necessitat d'aquest tractament antibiòtic per evitar que es generi una TB a partir d'una ITBL. La hipòtesi estàtica defensa 3 premisses per raonar la ITBL:

- després de la infecció i disseminació inicial dels bacils, es formen uns granulomes estancs, que són capaços de contenir la infecció mitjançant la formació d'una banda fibrosa exterior. Tot plegat crea un ambient d'anaerobiosi (48)
- aquests granulomes resten inalterats durant anys (90,111)
- el bacil latent, que ha quedat tancat dins del granuloma durant anys, i que haurà estat capaç de resistir l'ambient anaeròbic (112), pot reactivar el seu creixement en presència d'un factor de "ressuscitació" (111)

La hipòtesi dinàmica té en compte els aspectes fisiològics de l'hoste, com el temps de vida mitjana que tenen les cèl·lules i la regeneració dels teixits danyats, i explica que el bacil genera la ITBL degut a 3 particularitats:

- una velocitat de creixement extremadament lenta
- la capacitat que té *M.tuberculosis* de generar necrosi intragranulomatosa
- la seva paret cel·lular

No implica l'existència d'anaerobiosi. Suposant que n'hi hagués, s'ha pogut demostrar en models *in vitro* que els bacils no sobreviuen més

enllà d'uns mesos. I en tercer lloc, per generar aquesta anaerobiosi caldria un consum d'oxigen constant per mantenir-la, com passa per exemple als budells, fet que no succeeix precisament en lesions on hi ha BL (113).

Tampoc implica l'aparició en escena de cap factor "màgic" que, si bé és cert que s'han descobert algunes proteïnes amb la capacitat d'induir reactivació en bacils latents, la seva procedència sempre és deguda a bacils en creixement actiu (46), que no es troben en aquest tipus de lesions.

En el context de la hipòtesi "dinàmica", quan *M.tuberculosis* entra a l'espai alveolar, té la necessitat de ser fagocitat per un macròfag, donat que l'ambient que el rodeja es troba ple de surfactant i enzims que van erosionant la seva paret cel·lular (114). Un cop dins de la cèl·lula, un percentatge de bacteris poden multiplicar-se i sobreviure. Evitant la unió fago-lisosòmica, poden iniciar una fase de creixement (*Log*) i destruir el macròfag (115). Novament al medi extracel·lular, ara encara més agressiu degut a l'elevada mort cel·lular (surfactant, enzims bactericides, radicals lliures d'oxigen, radicals lliures de nitrogen, pH àcid (116)...), els bacils entren en FE fins a ser fagocitats per un altre macròfag. Fruit del creixement bacil·lar i del reclam de nous macròfags atrets cap al procés inflamatori, el cicle es va reproduint. D'aquesta manera es generen bacils en creixement actiu i bacils en FE, que s'acumulen al teixit necròtic.

Un cop apareix la resposta immune adquirida, capaç d'atacar als bacils en creixement actiu (117), el creixement bacil·lar queda aturat i els macròfags comencen a ser activats. És en aquest punt que entren en escena els ME. Aquests macròfags són els mateixos que teníem abans en la lesió, però en ser activats, ja no són destruïts pel creixement bacil·lar i poden fagocitar més quantitat de teixit necròtic, restes cel·lulars, acumulant gran quantitat de cossos lipídics al seu

citoplasma. Quan un ME fagocita un bacil, junt amb el teixit necròtic, el bacil no es multiplica, però el macròfag tampoc és capaç d'executar la seva destrucció (107). Segurament la seva càrrega lipídica els dificulta la unió fago-lisosoma (118), o bé no porten a terme una bona presentació d'antigen als limfòcits (119), o bé amb la secreció de NO generen un ambient d'immunosupressió al seu voltant (120).

Aquests ME acaben formant la capa més externa del granuloma i, viatjant cap a les vies respiratòries superiors amb la finalitat de ser expulsats o deglutits. O bé el ME fagocita el bacil que es troba entre els detritus cel·lulars sense adonar-se, o bé la resposta immune sap que aquests bacils hi són presents però prefereix centrar el seu efecte en els bacils en creixement actiu, perquè els considera més perillosos.

La qüestió és què els bacils han estat capaços d'adaptar-se a aquesta situació i de persistir en el temps.

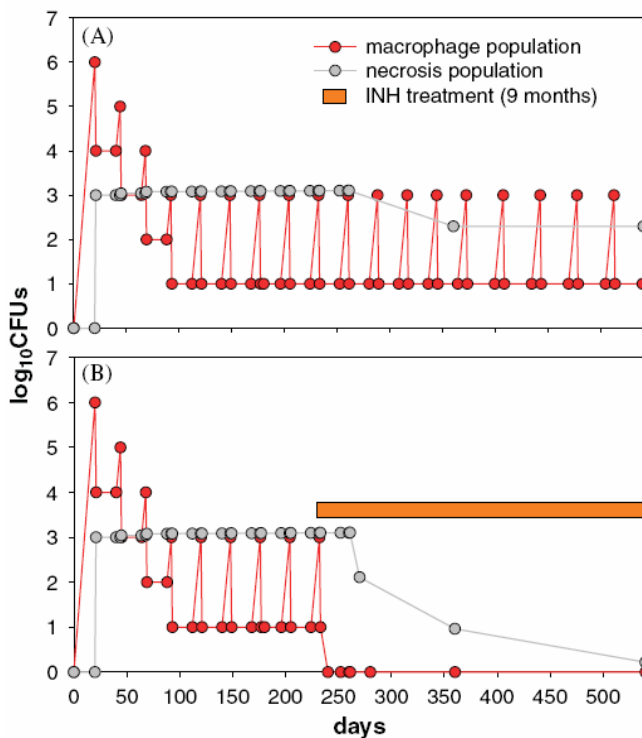
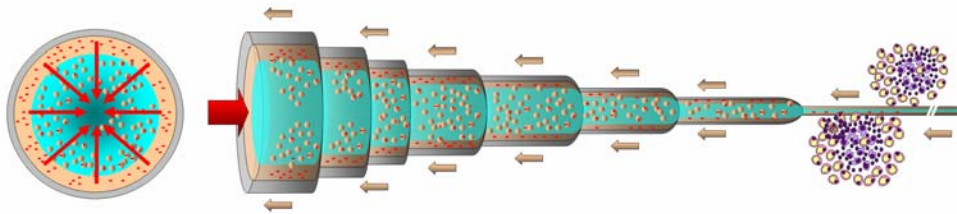


Figura 1.7 – Aproximació matemàtica del model dinàmic de latència. Durant la fase aguda els bacils arriben al seu valor màxim d'UFCs després de 20 dies de creixement. Quan s'estableix la immunitat el 99% de la càrrega bacteriana es destruïda. (A) Aquesta reacció crea un 0,1% de bacils latents al teixit necròtic. L'1% restant recreixen durant 20 dies, fins a ser destruïts novament, es repeteix el mateix esquema. Aquesta dinàmica continua fins a establir-se un equilibri, que té el llindar a 2Log₁₀ en humans. El nombre de bacils en el teixit necròtic disminueix, mentre que el percentatge de patir la malaltia va disminuint amb el temps, 0,74% el primer i segon any, 0,31% entre el tercer i el cinquè...

(B) es mostra el final del recreixement constant gràcies a la quimioteràpia, i l'eliminació periòdica dels bacils latents del teixit necròtic. El nombre dels bacils localitzats dins dels macròfags es mostra en vermell, mentre que els del teixit necròtic es mostren en gris. Adaptat de la publicació Cardona. Tuberculosis 2006;86:273-89 (69)

El procés de drenatge dels bacils es troba molt relacionat amb un mecanisme fisiopatològic clau però, que no ha estat gaire relacionat amb la fisiopatologia de la TB, la generació d'aerosols. La formació d'aquests aerosols té lloc a les vies respiratòries superiors amb la finalitat d'acondicionar l'aire entrant, afegint calor i humitat (121). I per a la formació d'aquests aerosols cal fluid alveolar, que en el cas d'una ITBL, pot contenir aquests bacils que havien de ser drenats. I els aerosols, un cop units a l'aire inspirat, tenen com a destí tornar a l'espai alveolar.

A. Inspiració



B. Espiració

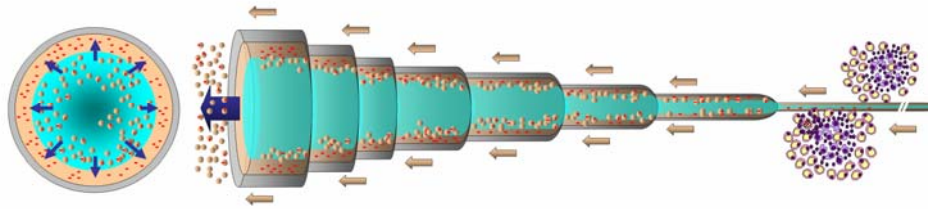
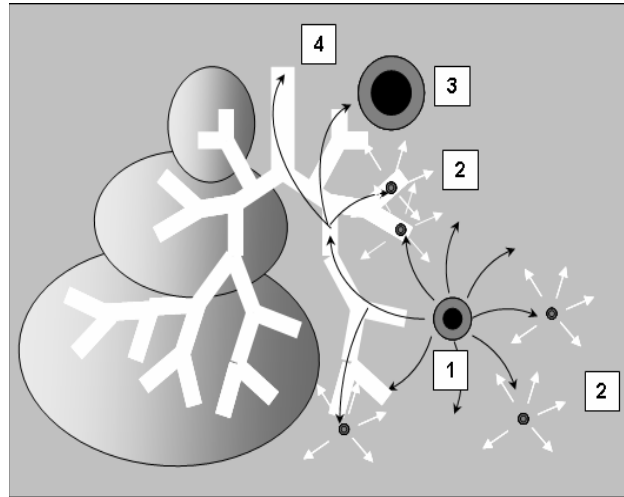


Figura 1.8 – Dinàmica dels aerosols. Les figures mostren la relació entre la capa mucosa que conté el surfactant, la generació d'aerosols i el drenatge bacil·lar. Un cop el bacil es troba a l'espai alveolar, serà drenat cap a les vies respiratòries superiors amb la mucositat, per a ser expulsat o deglutit. La inspiració d'aire fred i sec provoca la formació d'aerosols des de la capa mucosa cap al lumen de l'arbre bronquial, donant una possibilitat a la reinfecció endògena. Durant l'expiració el refredament de l'aire condensa

Doncs, bé, la cinètica d'aquests aerosols, junt amb la capacitat de resistència a l'estrès que presenten els bacils latents, pot explicar que la ITBL podria ser fruit d'una reinfecció endògena, o d'una disseminació i reactivació constants. I amb aquesta hipòtesi “dinàmica” sí s'explica que el tractament d'INH durant 6-9 mesos sigui eficaç. Mentre que la

hipòtesi “estàtica”, que postula que durant la disseminació inicial es generen petits granulomes en la part apical dels pulmons, que contenen bacils latents, que tenen la capacitat de reactivar molts anys després, fruit d’un factor per “ressuscitar”, el tractament actual seria ineficaç. Segons aquesta hipòtesi, l’administració d’INH s’hauria d’establir durant tota la vida, o una gran part d’aquesta (122).

Figura 1.9 - Esquema dels volums pulmonars i de la cinètica que tindria lloc segons la hipòtesi dinàmica. Es pot observar com té lloc una constant reinfecció endògena fruit dels bacils drenats per els ME. Segons aquesta hipòtesi la TB activa seria la conseqüència d’una reinfecció que ha tingut lloc a l’apex pulmonar, degut a les condicions favorables que es donen en aquesta zona per al creixement bacil·lar. Adaptat de la publicació Cardona. Keystone Symposia 2007



La hipòtesi dinàmica no contradiu el fet que als lòbuls pulmonars superiors l’elevada concentració d’oxigen faci que siguin una zona on el bacil pugui créixer més ràpid, i amb tanta intensitat que pugui arribar a generar cavitats (123,124), sols postula que el creixement bacil·lar és fruit d’una reinfecció endògena constant.

Això doncs, gràcies a la hipòtesi “dinàmica” s’explica que amb el tractament d’INH de 6-9mesos, l’hoste pugui portar a terme el drenatge dels bacils en FE, evitant que puguin reactivar el seu creixement.

D’una banda, el tractament quimioteràpic presenta avantatges per l’hoste, com poden ser reduir la resposta inflamatòria (125), permetre l’estabilització de la població bacil·lar cap a un mínim inactiu, reduir l’acúmulo de ME al voltant del granuloma i el possible creixement dels

bacils al seu interior, així com la font d'immunosupressió local que suposen, i també disminuir les possibilitats de generar una resposta de tipus Koch tòxica.

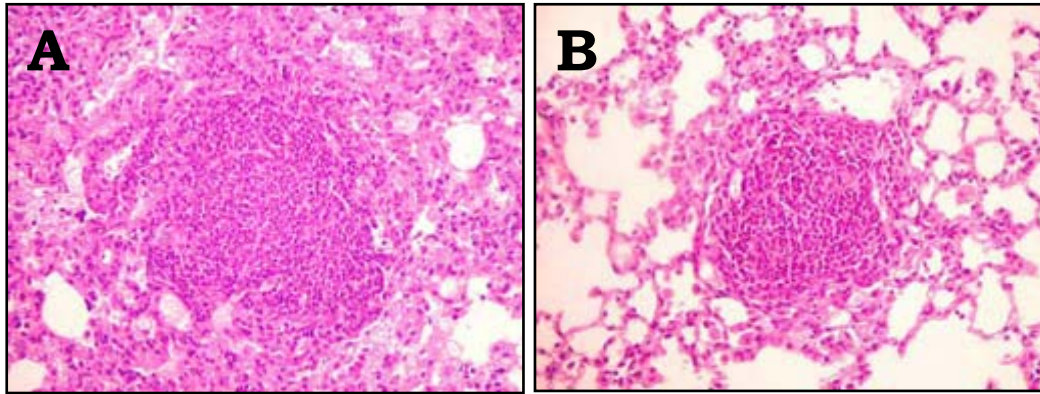


Figura 1.10 – Aspecte dels granulomes en fase crònica de la infecció, setmana 6, en el model de TB experimental en ratolins (A) i un cop s'ha finalitzat el tractament antibiòtic (B). Es pot observar la desaparició de la capa de macròfags escumosos, responsables de la immunosupressió local. Adaptat PJCardona; Tuberculosis 2006;86:273-89 (69)

Però d'altra banda, també crea immunodepressió per sí mateix. Com els bacils no es multipliquen, no reestimulen la resposta immune, no s'arriba al llindar mínim necessari per a la formació de noves cèl·lules efectores i, la resposta immune acaba cedint (125). Degut a la manca de resposta inflamatòria i immunitat local, els bacils en FE poden iniciar una nova fase de creixement. I és per aquesta raó, que les pautes de tractaments quimioteràpiques curtes no funcionen.

Però, aquest panorama podria canviar substancialment si es realitzés un tractament immunoteràpic després del període curt de quimioteràpia que evités, per un costat, la reactivació bacil·lar dels BLs i, per l'altre, la inducció d'una immunodepressió local específica.

RUTI: La vacuna terapèutica contra la TB latent

El disseny de RUTI respon a 5 qüestions:

1) RUTI es va dissenyar per a ser utilitzada després d'una pauta curta de tractament quimioteràpic, per reomplir aquest espai "buit" de resposta inflamatòria i d'immunitat local que es genera un cop s'acaba el tractament antibiòtic.

Portant a terme investigacions prèvies, amb el model experimental murí, el nostre grup havia vist que després d'una pauta curta de tractament antibiòtic, tenia lloc una reactivació del creixement bacil·lar que no es seguia per una resposta immune immediatament. Aquesta reactivació podia arribar inclús als 4Log_{10} de càrrega bacil·lar i, la resposta immune podia aparèixer amb un retard de 2 mesos respecte el moment de la reactivació (126).

Segurament, aquest fet es troba relacionat amb el fenomen de "tolerància" que presenta el model experimental d'infecció tuberculosa crònica en ratolí (96), comparat amb d'altres hostatgers que tenen un volum corporal superior, com els humans.

Doncs, bé, la finalitat de la vacuna terapèutica RUTI seria fer un "boosting", una reestimulació, a la resposta immune, per tal d'accelerar la seva actuació.

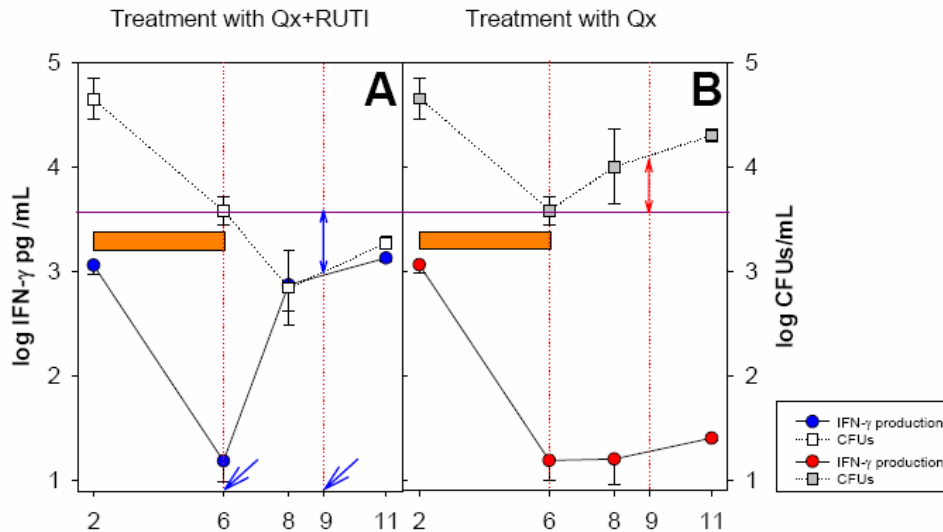


Figura 1.11 – Estudi dels mecanismes de la ITBL. (A) Es pot observar que la inoculació de RUTI (en fletxes blaves) aconsegueix augmentar la resposta immune, resumit segons la producció d'IFN- γ (en vermell) després del tractament antibiòtic (franja taronja), impedit la reactivació bacil·lar. (B), Es pot observar com el fet d'administrar una pauta curta de tractament antibiòtic permet que la resposta immune decreixi i tingui lloc la reactivació bacil·lar. Adaptat del dossier de premsa: El desenvolupament de la vacuna antituberculosa RUTI 2007

2) RUTI també es va voler dissenyar per mostrar a la resposta immune antígen propis dels bacils latents.

Realitzant l'estudi de l'evolució dels granulomes, ens vam adonar de l'"escapament" dels bacils latents de les lesions. Els bacils latents són "invisibles" per a la resposta immune, fruit de la transformació que pateixen (cèl·lules amb una taxa de creixement molt baixa, amb un temps de divisió llarguíssim, amb menys ADN i ARN i pocs nucleòtids per cèl·lula, amb substancials canvis en la seva paret cel·lular, que impliquen un engruiximent, un augment en la presència de l'antigen de 16KDa...), en resposta a l'estrès que es genera en contra d'ells. A partir d'aquest fet, que la resposta immune es focalitzi sols en els bacils en creixement actiu (127), va sorgir la idea d'immunitzar amb fragments de bacils cultivats en condicions d'estrès.

3) RUTI és una vacuna feta amb bacils que han crescut sota condicions d'estrès. Els cultius de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv es porten a terme en medi sòlid, en agar Middlebrook 7H11, a 37°C. D'aquesta manera, el cultiu pateix una davallada progressiva de la pressió parcial d'oxigen i del pH (128,129).

En resum, els bacils que s'utilitzen per fer RUTI es troben sotmesos a les condicions fisiològiques que trobem en els granulomes dels hostes amb una immunitat activa, és a dir, baixa concentració d'oxigen degut a l'estructura fibròtica del granuloma i baix pH dins del fagolisosoma dels macròfags activats.

4) RUTI es presenta com a fragments de bacils liposomats per optimitzar el procés de presentació d'antigen (130).

Portant a terme estudis amb microscòpia electrònica de transmissió, vam poder veure que RUTI es componia d'una barreja de liposomes unilamelars i multilamelars. I, portant a terme estudis amb un analitzador de mides de partícules per difracció làser, vam poder veure que les partícules tenien un diàmetre mig de 100nm, i que el 99,9% d'elles el tenien inferior a 1µm.

5) D'altra banda, se sap que els components de la paret cel·lular micobacteriana tenen propietats adjuvants (131), per tant, no cal afegir res més per a induir una resposta immunològica capaç de reconèixer els bacils latents. Una part bàsica del procés de producció de RUTI és la "detoxificació" dels fragments de paret cel·lular obtinguts que han de ser liposomats.

En estudis previs amb models experimentals de ratolins, portant a terme la recerca d'un model "humanitzat", vam poder relacionar la

presència de necrosi intragranulomatosa amb la reacció d'Schwartzman (una resposta Koch-like). El fenomen de Koch (102) s'atribueix clàssicament a l'administració de vacunes terapèutiques en pacients infectats, on la presència d'endotoxines, com poden ser glicolípid localitzats en la part més externa de la paret cel·lular (96), poden provocar reaccions immunes inespecífiques.

Per eliminar el risc potencial de desenvolupar un "fenomen de Koch" vam decidir treure totes les molècules "endotòxiques" (132,133) contingudes als fragments utilitzant el detergent suau Tritó X-114 (134).

El canvi substancial en la pauta de tractament seria el següent:

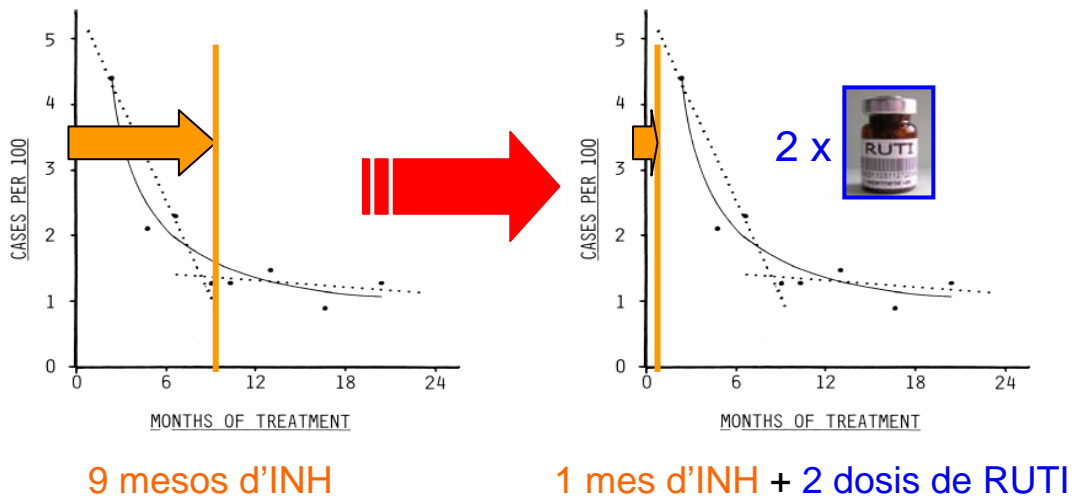


Figura 1.12 – Modificació en la pauta de tractament antibiòtic per tractar la ITBL

En la nostra opinió la vacunació terapèutica hauria de constar de dues fases. En primer lloc, un període curt de tractament quimioteràpic que estandarditzarà les proporcions relatives de les diferents poblacions bacil·lars que es troben en les lesions. Que també destruirà els bacils actius i ajudarà a reduir la resposta immune local i la inflamació. Que

reduirà la presència de ME, i la possible font d'immunosupressió local. Que també reduirà el tamany dels granulomes i afavorirà la reabsorció del teixit necròtic present. I, per últim, reduirà la probabilitat que la inoculació de la vacuna terapèutica pugui induir una reacció de Koch tòxica. I en segon lloc, la immunització amb una vacuna poliantigènica, que contingui, tan antigens procedents de bacils en creixement actiu, com antigens procedents de bacils latents. I que indueixi una immunitat ampla, intensa i perllongada en el temps, mitjançant una resposta immune cel·lular i humoral equilibrada.

Efectivitat de la vacuna RUTI

L'absència d'una correlació directa entre els resultats que s'obtenen mitjançant models experimentals animals i el que realment passa en els humans dificulta molt la interpretació de les dades. Per exemple, en la ITBL el tractament establert en humans té una eficàcia contra la reactivació del 90%, mentre que en el model del ratolí aquesta eficàcia no supera el 10%. Quan s'avaluen assaigs d'efectivitat de noves vacunes contra la TB cal tenir molt present aquesta afirmació. I una altra qüestió molt important és fer una bona elecció del model experimental animal segons les necessitats de l'estudi.

Per tal d'avaluar l'efectivitat de la vacuna terapèutica RUTI, inicialment es va escollir el model "humanitzat" d'infecció crònica en el ratolí. Gràcies a estudis previs s'havia pogut observar un fenomen de "tolerància" del model enfront els antigens micobacterians, la qual cosa podria infravalorar els resultats obtinguts mitjançant un nou tractament. Per aquest motiu, es van establir com a paràmetres a avaluar la reducció de la concentració bacil·lar i el seu control després d'una pauta curta de tractament quimioteràpic.

Els experiments inicials van mostrar que RUTI, després d'una pauta curta de tractament quimioteràpic, produïa una elevada reducció

bacil·lar, aproximadament de 2Log_{10} , i que era capaç de mantenir aquesta davallada un mínim d'11 setmanes més, després de l'última inoculació de la vacuna.

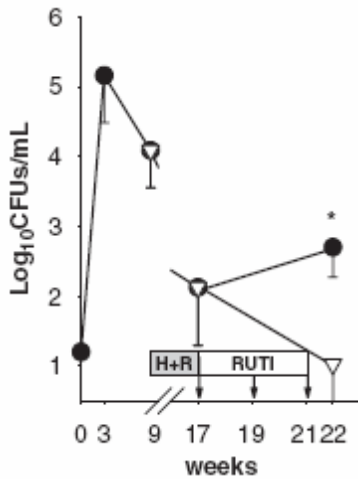


Figura 1.13 – Activitat bactericida de RUTI en pulmó, en ratolins C57BL/6. Les marques negres corresponen al grup control, mentre que les blanques corresponen al grup tractat amb RUTI. Els valors corresponen a la mitjana i la desviació estàndard. Les diferències significatives es marquen amb * quan $p < 0,005$. Adaptat de la publicació Cardona. Tuberculosis 2006;86:273-289 (69)

Tenint en compte el fenomen de “tolerància” descrit en aquest model, es van iniciar experiments amb el model de conill porquí. La nostra hipòtesi sobre aquest fenomen es basa en la “teoria dels volums”, com ja hem comentat anteriorment. Pensem que quan més gran és el volum de l'hostatger, més gran serà la resposta inflamatòria que podrà desenvolupar contra *M.tuberculosis*, degut a que té molta més quantitat de parènquima pulmonar per comprometre.

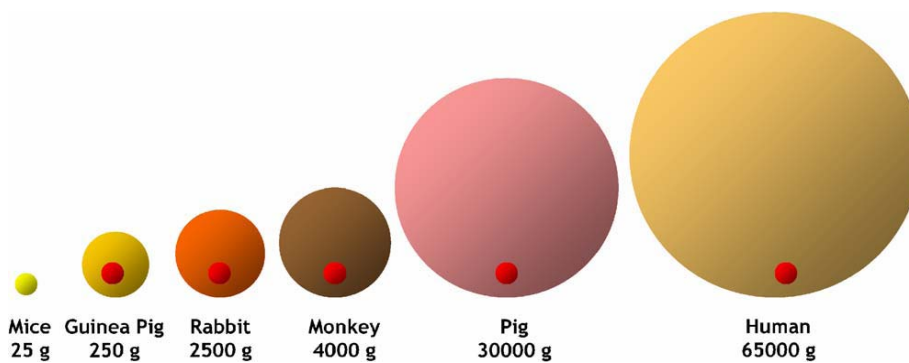


Figura 1.14 – Comparació entre diferents hostatgers segons el seu pes. Amb una esfera vermella es mostra el pes de 25g que sol tenir una caverna pulmonar. Adaptat de la publicació Cardona. Tuberculosis 2006;86:273-289 (69)

El model de conill porquí que es va triar va ser també un model “humanitzat”. L’administració de RUTI després d’una pauta curta de tractament antibiòtic, 4 setmanes d’INH + RIF, va promoure un descens de la concentració bacil·lar, aproximadament de 0,7Log₁₀.

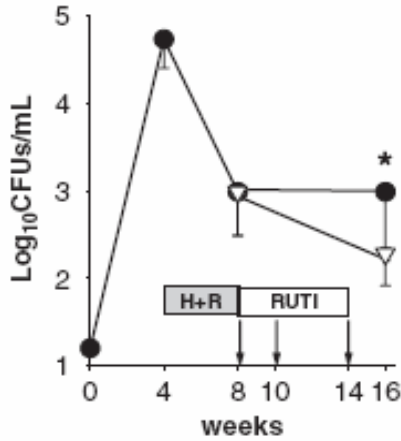
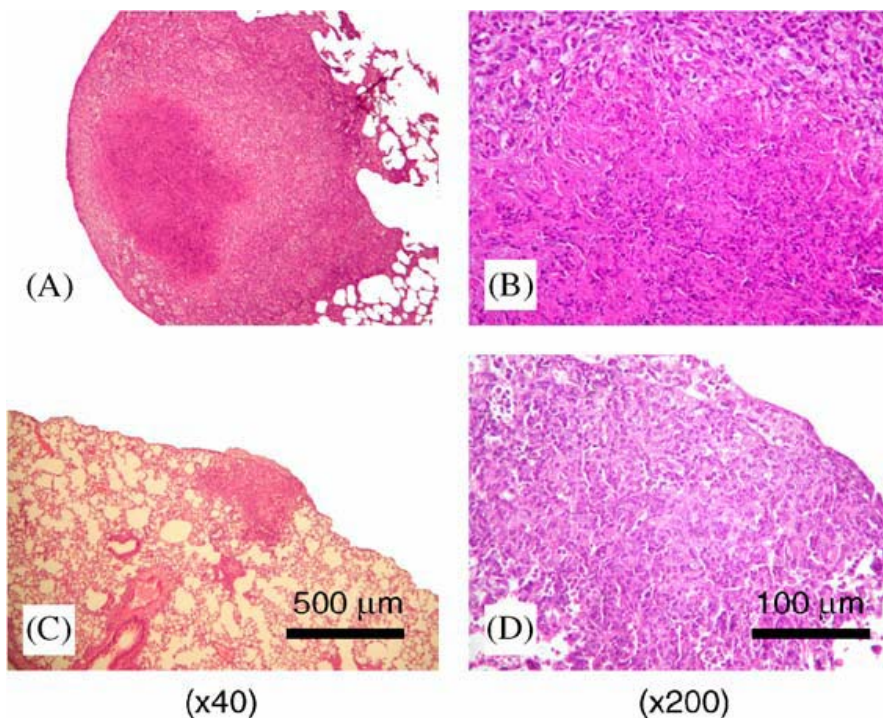


Figura 1.15 – Activitat bactericida de RUTI en pulmó, en conills porquins. Les marques negres corresponen al grup control, mentre que les blanques corresponen al grup tractat amb RUTI. Els valors corresponen a la mitjana i la desviació estàndard. Les diferències significatives es marquen amb * quan $p < 0,005$. Adaptat de la publicació Cardona. Tuberculosis 2006;86:273-289 (69)

L’estudi histopatològic, realitzat en la setmana 4 després de la infecció, revela diferències entre ambdós models. Mentre que al ratolí s’observen lesions granulomatoses petites, plenes de bacils i sense gaire fibrosi, al conill porquí els granulomes es mostren ben estructurats, amb elevada fibrosi i necrosi intragranulomatosa, i sols es poden detectar alguns bacils a l’interior de ME situats a la part exterior del granuloma.



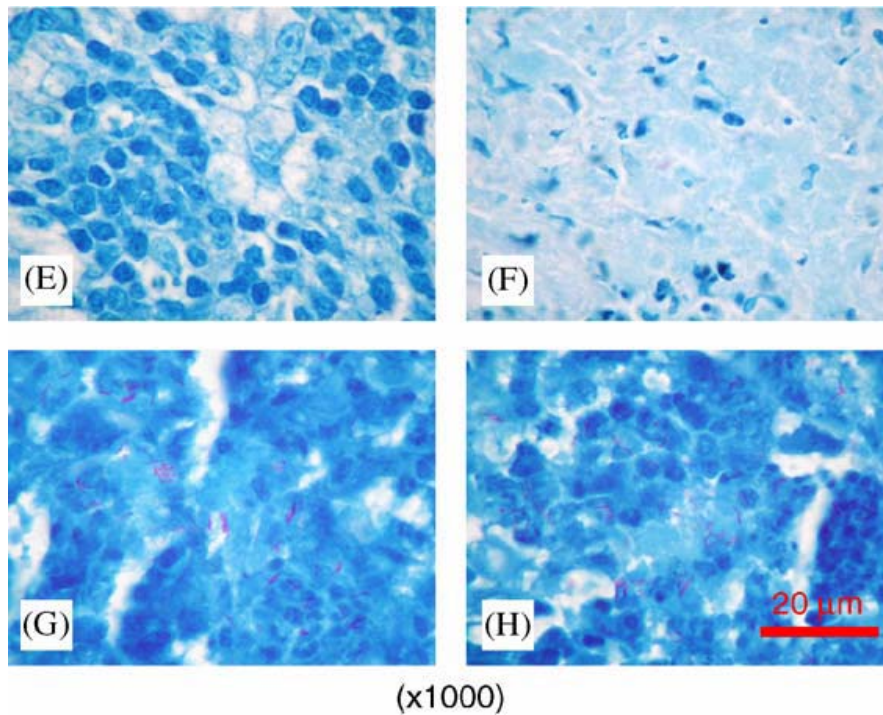


Figura 1.16 – Comparació de la histopatologia dels models de ratolí (C, D, G i H) i conill porquí (A, B, E, F), en la setmana 4 després de la infecció. Les figures A-D mostren tinció amb hematoxilina-eosina, mentre que les E-H mostren Ziehl-Neelsen. Adaptat de la publicació Cardona. Tuberculosis 2006;86:273-289 (69)

Per portar a terme el control de la població bacil·lar, el conill porquí ha de desenvolupar una resposta inflamatòria superior a la que desenvolupa el ratolí, la qual cosa mata l'hostatger molt més ràpidament. Però no per aquesta raó podem assumir que el ratolí és molt més resistent a la infecció que el conill porquí, sinó que és molt més "tolerant". El fet de desenvolupar una resposta inferior, permet la constant disseminació bacil·lar, li permet viure més temps, però també acaba morint per la total ocupació del parènquima pulmonar.

Tant en el model de ratolí, com en el model de conill porquí es van portar a terme estudis de toxicitat. Sols es va poder observar una petita resposta inflamatòria en el lloc d'inoculació de la vacuna, que es resolia en qüestió d'hores. En cap dels models es van veure fenòmens de

toxicitat sistèmica (pèrdua de pes o augment de la resposta granulomatosa).

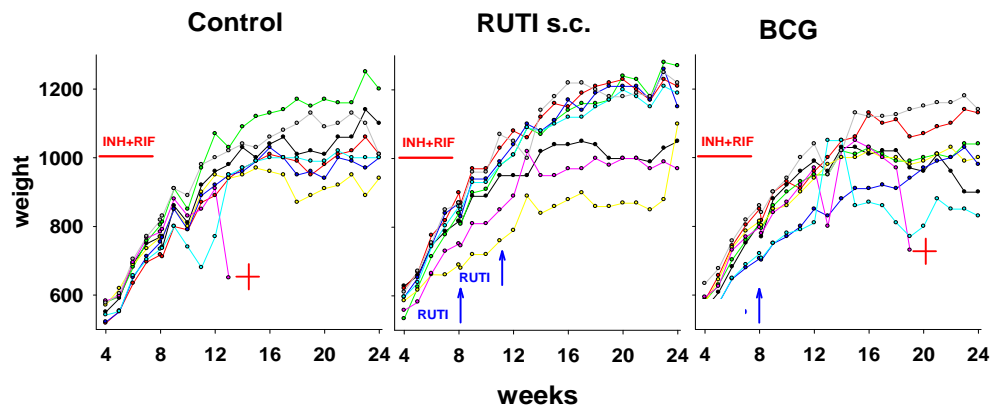


Figura 1.17 – Control de pes de conills porquins per avaluar la possible toxicitat induïda per RUTI.

2 HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Una de les propietats més extraordinàries de la infecció per *Mycobacterium tuberculosis* és la seva capacitat de persistir en els teixits de l'hostatger durant llargs períodes de temps. Això fa que el bacil pugui gaudir d'un reservori increïble: un terç de la humanitat és portadora de bacils. Aquesta capacitat de persistència, anomenada latència, encara presenta un altre problema afegit: la necessitat de tractament quimioteràpic durant 6-9 mesos.

Els coneixements sobre els mecanismes implicats en la immunopatologia de la infecció i la fisiologia del bacil ens apropen al disseny de noves estratègies més efectives per lluitar contra la TB.

És per això, que es varen generar les següents hipòtesis:

1.- La inducció de necrosi intragranulomatosa provocada artificialment mitjançant la inoculació local de LPS, té les mateixes característiques que la induïda espontàniament per certes soques clíniques de *M.tuberculosis*. D'aquesta manera, es podrà treballar amb un model humanitzat més senzill i menys agressiu per l'animal.

2.- La inducció de la necrosi intragranulomatosa pot estar relacionada amb característiques de l'hostatger, com la susceptibilitat contra la infecció per *M.tuberculosis*, relacionada amb el perfil de resposta immune Th1/Th2 o el background genètic.

3.- La inoculació de la vacuna RUTI en models de TB experimental generen una resposta immune poliantigénica contra antígens presents en bacils en creixement i bacils latents.

4.- La inoculació de RUTI permet la destrucció dels bacils latents i, per tant, és capaç de controlar la reactivació del creixement bacil·lar.

5.- La resposta humoral induïda amb el tractament antibiòtic de curta duració i la inoculació de RUTI presenta efectes protectors en el model experimental d'infecció de ratolí SCID.

És per això, que els objectius concrets que es van plantejar per portar a terme en aquest estudi són els que es citen a continuació:

1.- Valorar les característiques de la necrosi intragranulomatosa induïda espontàniament per soques clíniques de *M.tuberculosis*, i comparar-les amb la induïda mitjançant la inoculació local de LPS.

2.- Valorar la relació entre la inducció de necrosi intragranulomatosa i la resistència de l'hostatger contra la infecció per *M.tuberculosis*.

3.- Caracteritzar la resposta immune induïda mitjançant la vacuna terapèutica RUTI en models experimentals animals.

4.- Avaluat la resposta humoral generada mitjançant la immunoteràpia amb RUTI en el model de tuberculosi experimental provocat en ratolins severament immunodeprimits (SCID)

3 RESULTATS

3.1 Estudi sobre la relació existent entre la necrosi intragranulomatosa i la resistència a la infecció tuberculosa crònica en el model de ratolí

Una de les característiques clau en la història natural de la TB en humans és el desenvolupament de lesions amb necrosi intragranulomatosa. Aquest fenomen no s'observa en el model experimental d'infecció tuberculosa en ratolins. S'ha pogut induir de manera artificial aquesta necrosi mitjançant la inoculació de LPS per aerosol, 3 setmanes després de la infecció amb *Mycobacterium tuberculosis*. El centre dels granulomes primaris mostra una necrosi eosinofílica, a la setmana 9 post-infecció, en les soques de ratolí C57BL/6 i 129/Sv (H-2^b), mentre que aquesta necrosi no es desenvolupa en les soques BALB/c i DBA/2 (H-2^d). Quan s'infecta amb una soca procedent d'un aïllat clínic, anomenat UTE0335R, es veu el mateix patró de necrosi, sense la necessitat d'inocular cap endotoxina. En totes les soques de ratolí estudiades s'observa la mateixa resposta immune, avaluada segons l'expressió local d'ARNm d'alguns dels gens claus en la immunopatologia de la infecció. El nostre estudi demostra que la inducció de necrosi intragranulomatosa en el model experimental d'infecció per aerosol en ratolí és independent de la "resistència" o "susceptibilitat" associada al model, segons la seva dotació H-2.

El LPS provoca la inducció de necrosi intragranulomatosa en la setmana 9 post-infecció.

En setmana 3 post-infecció, la inoculació de LPS va provocar una forta infiltració de cèl·lules PMN a les 24 hores de l'inòcul, tant en els granulomes com en els espais alveolars. Es va poder observar aquest fet en totes les soques de ratolí emprades, excepte en la soca C3H/HeJ (control negatiu, LPS-resistent). Aquesta infiltració no es va veure quan els ratolins sols eren infectats amb H37Rv, ni amb la soca UTE 0335R. La següent figura mostra un esquema dels diferents experiments que es van portar a terme.

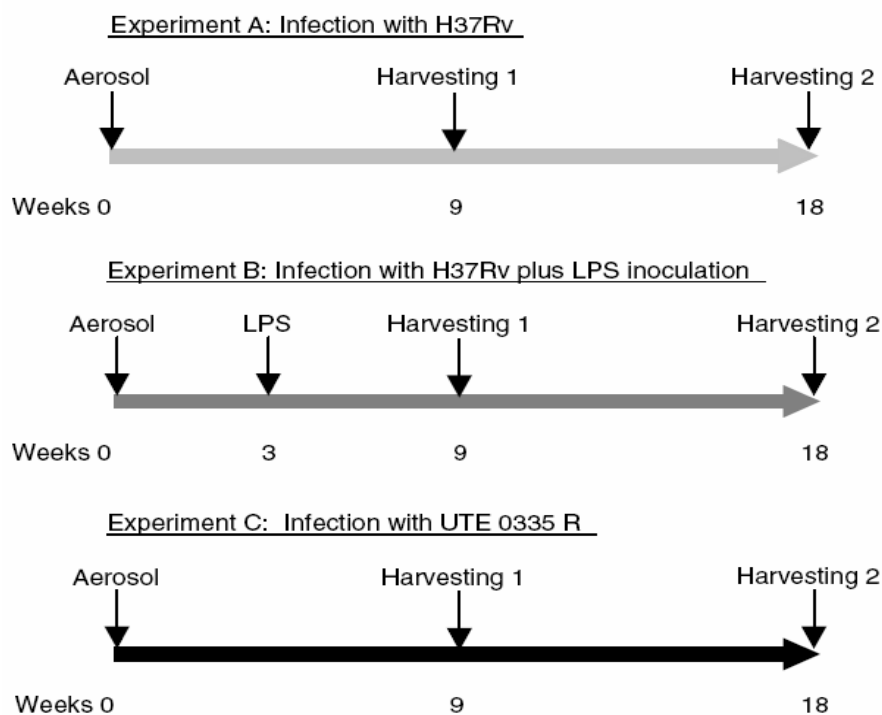


Figura 3.1 – Disseny experimental de l'estudi.

A la setmana 9 post-infecció, i amb tinció d'hematoxilina-eosina, es va poder veure que la necrosi granulomatosa localitzada en el centre dels granulomes era bàsicament eosinofílica, amb una presència molt reduïda de macròfags. La tinció de tricròmic de Masson va revelar un grau de fibrosi en les lesions molt elevat.

A continuació es mostren imatges d'un granuloma primari en setmana 9 post-infecció, en les soques de ratolí C57BL/6 i 129/Sv, infectats amb H37Rv sol o H37Rv amb LPS. Es pot observar la presència i absència de necrosi, amb i sense LPS, respectivament. En ratolins C3H/HeN es van poder induir les mateixes lesions, però no va ser així en les soques DBA/2, BALB/c i C3H/HeJ.

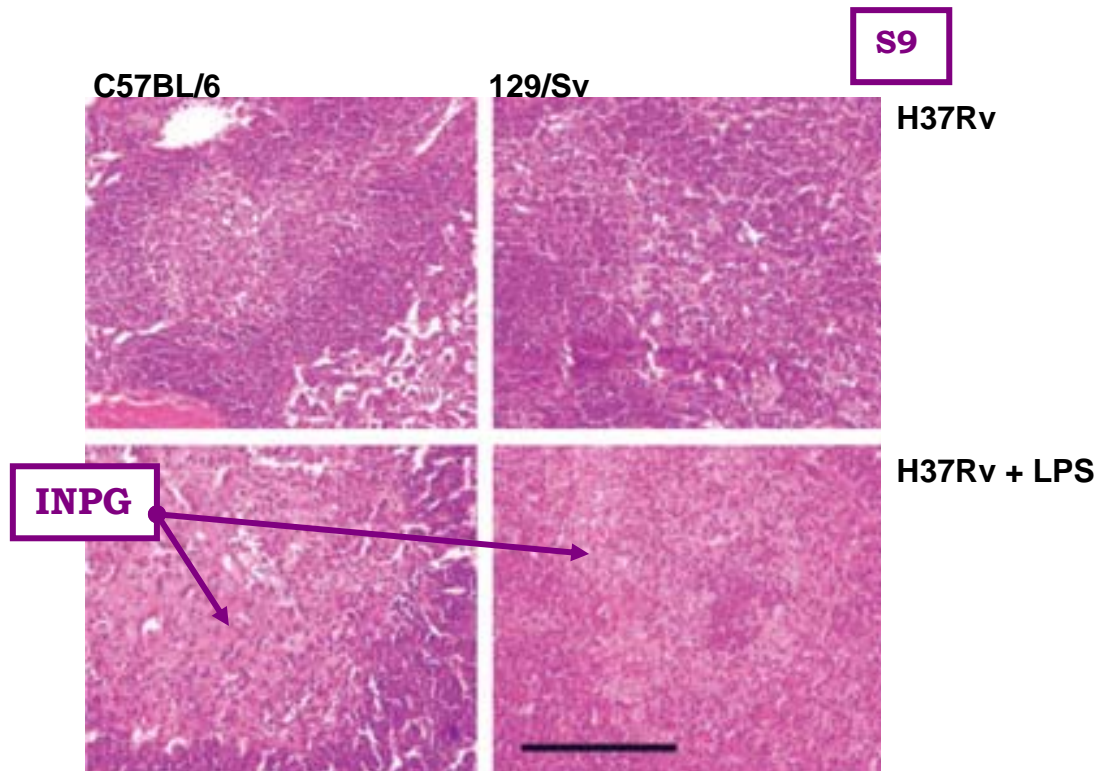


Figura 3.2– Imatges d'histologia de granulomes pulmonars de l'experiment B, infecció amb H37Rv i inoculació de LPS en setmana 3 post-infecció. En la setmana 9 post-infecció s'observa necrosi eosinofílica, amb alguns macròfags en el centre dels granulomes primaris dels ratolins inoculats amb LPS. Tinció d'hematoxilina-eosina. La barra representa 200µm.

I, a continuació, es mostra un granuloma primari en setmana 9 post-infecció amb la soca UTE 0335R, que indueix necrosi de manera espontània. Amb la tinció de tricròmic de Masson també es demostra un elevat grau de fibrosi dels granulomes.

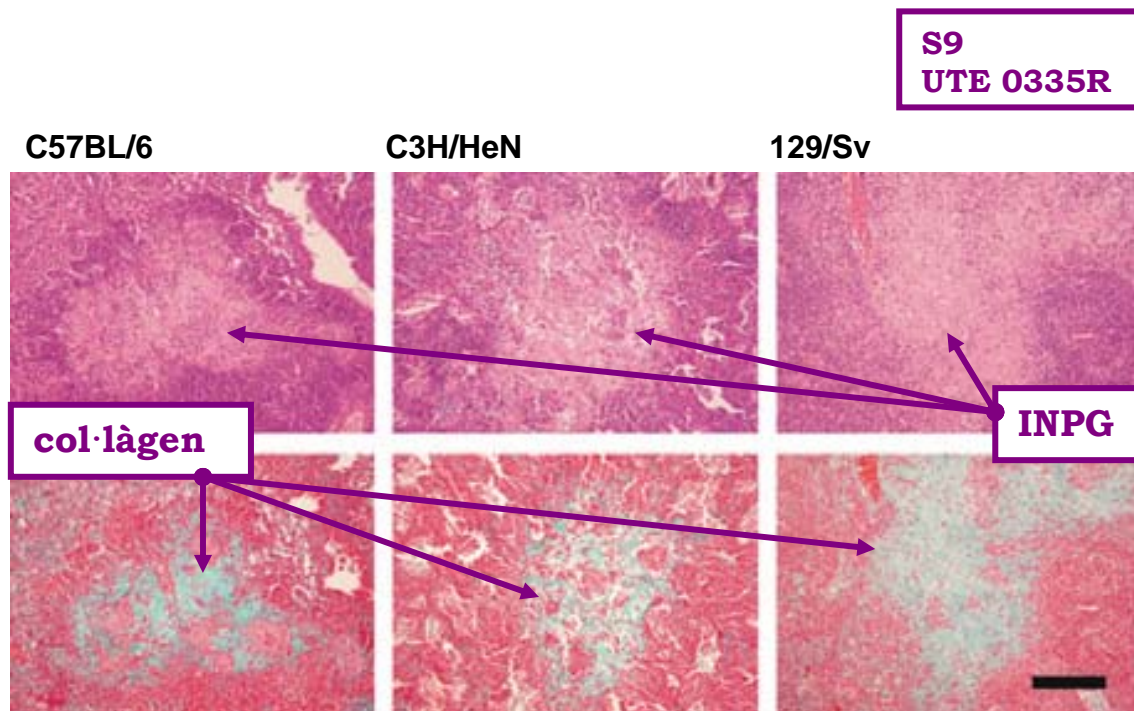


Figura 3.3– Imatges d’histologia de granulomes pulmonars de l’experiment C, infecció amb la soca UTE 0335R. En la setmana 9 post-infecció s’observa necrosi eosinofílica amb un elevat grau de fibrosi. Tincions d’hematoxilina-eosina i tricròmic de Masson. La barra representa 200µm.

A continuació es mostra l’evolució al llarg del temps de les fibres de col·lagen, des de la perifèria de la lesió cap al centre necròtic, en ratolins C57BL/6, infectats amb la soca UTE 0335R. De fet, passa el mateix amb els ratolins 129/Sv i C3H/HeN infectats amb la mateixa soca de micobacteri. I el mateix que en les 3 soques de ratolí infectades amb H37Rv, que han rebut LPS i que han generat la necrosi.

En la setmana 3 post-infecció es pot veure com el centre del granuloma es compon d’una barreja de neutròfils i monòcits, que s’esdevé més necròtica i ocupada per debris cel·lulars, fibrina i més neutròfils en setmana 6. Finalment, en setmana 9, el centre s’esdevé una lesió eosinofílica compacte.

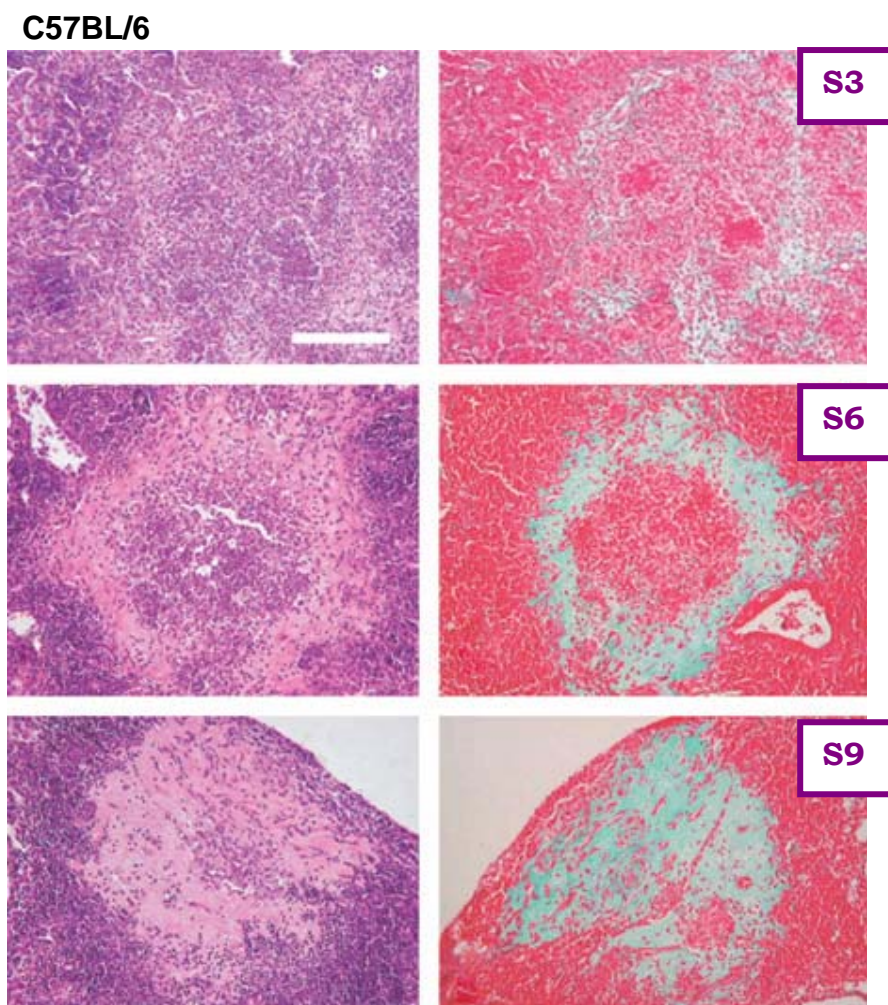


Figura 3.4— Imatges d'histologia que mostren l'evolució de la necrosi intragranulomatosa en l'experiment C, infecció amb la soca UTE 0335R, en la soca de ratolins C57BL/6. Tincions d'hematoxilina-eosina i tricròmic de Masson. La barra representa 100 μ m.

La infiltració pulmonar no es relaciona amb la inducció de necrosi intragranulomatosa pulmonar.

A continuació es mostra el percentatge d'infiltració granulomatosa pulmonar, que és el ràtio obtingut després de dividir l'àrea pulmonar infiltrada entre l'àrea pulmonar total, i multiplicant per 100, per a totes les soques de ratolins, en els 3 experiments: (A) infecció amb H37Rv, (B) infecció amb H37Rv més LPS i (C) infecció amb UTE 0335R.

Es pot observar com la inoculació de LPS provoca un augment important en la infiltració pulmonar en les soques 129/Sv i DBA/2; i

com la infecció amb UTE 0335R provoca un augment encara més gran del percentatge d'infiltració en totes les soques, excepte les de background C3H.

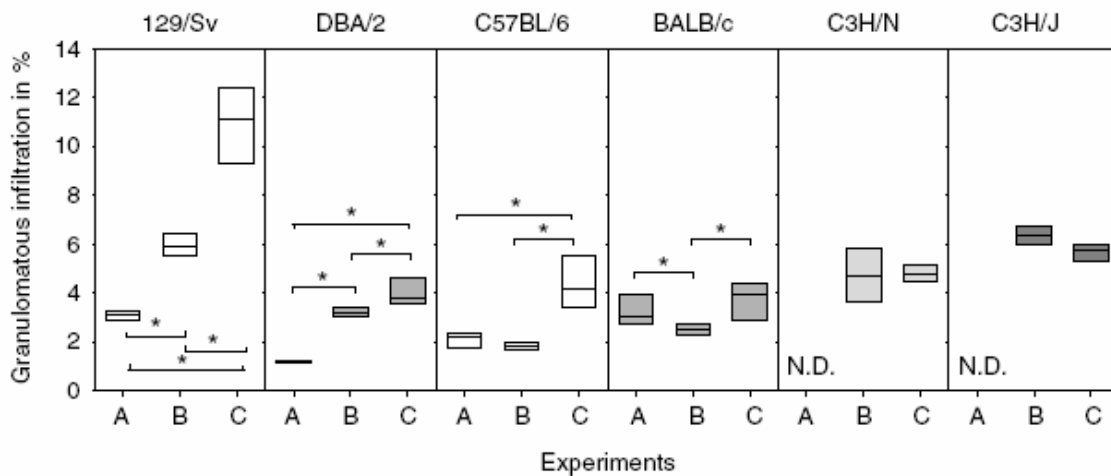


Figura 3.5– Percentatge d'infiltració pulmonar en els 3 experiments, on A és infecció amb H37Rv, B és infecció amb H37Rv més LPS i C és infecció amb UTE 0335R. La caixa engloba els valors entre els percentils 25 i 75. Mentre que la divisió de la caixa mostra la mediana. Les diferències estadísticament significatives entre grups es marquen amb * quan $p < 0,05$.

L'estudi estadístic va revelar diferències entre tots els grups excepte entre 129/Sv i BALB/c en l'experiment A. Sols es van observar diferències entre 129/Sv, C3H/HeN i C3H/HeJ a l'experiment B. I en l'experiment C sols es van observar diferències entre 129/Sv i C3H/HeJ quan es comparaven amb la resta de soques.

Aquests resultats demostren que la infiltració pulmonar induïda per la infecció amb H37Rv no està relacionada amb el background H-2, les respostes de tipus Th1/Th2 o la susceptibilitat de les soques davant *M.tuberculosis*. Això es demostra igualment en el ratolins inoculats amb LPS i, en el cas de la infecció amb UTE 0335R. És a dir, que l'augment en la infiltració pulmonar no es troba relacionat amb la inducció de necrosi intragranulomatosa.

La inoculació de LPS provoca una reducció transitòria en la càrrega bacteriana pulmonar.

Després de l'administració de LPS, la càrrega bacteriana tenia tendència a disminuir, en pulmons i en melsa, encara que sols es van poder observar diferències estadísticament significatives en teixit pulmonar de ratolins 129/Sv i BALB/c, com es mostra en la figura següent.

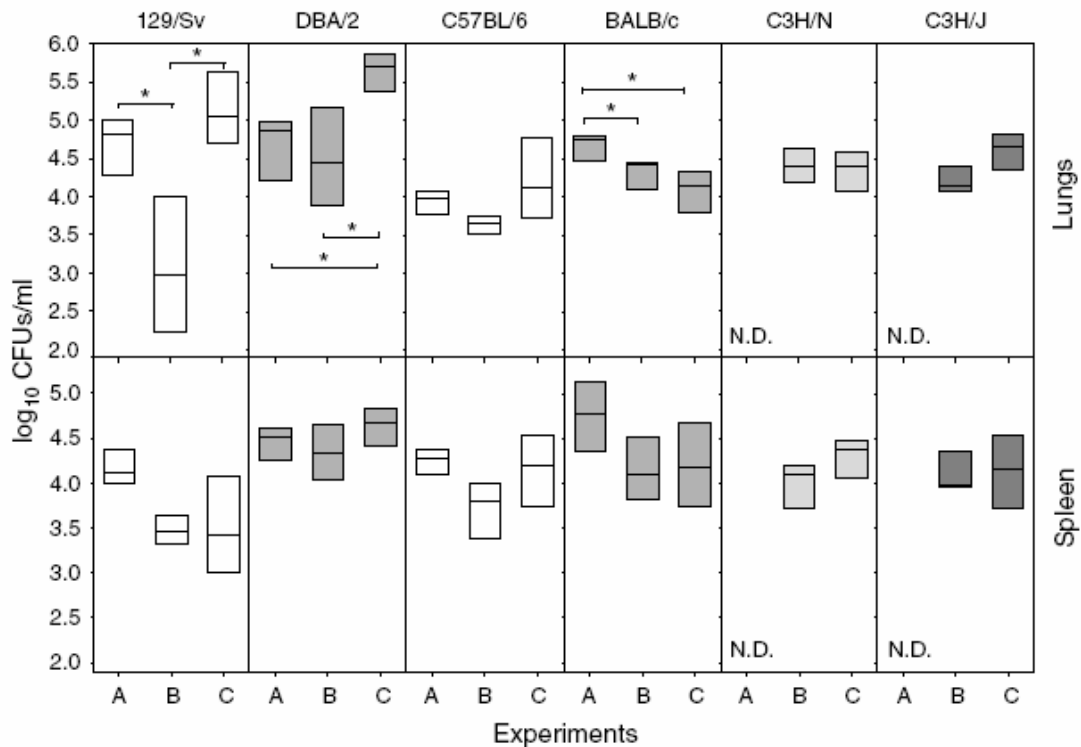


Figura 3.6– Concentració bacil·lar pulmonar en la setmana 9 post-infecció en els 3 experiments, on A és infecció amb H37Rv, B és infecció amb H37Rv més LPS i C és infecció amb UTE 0335R. La caixa engloba els valors entre els percentils 25 i 75. Mentre que la divisió de la caixa mostra la mediana. Les diferències significatives entre grups es marquen amb * quan $p < 0,05$.

Aquestes diferències no es van poder observar en setmana 18 post-infecció. Cal destacar que, quan els ratolins s'infectaven amb la soca UTE 0335R, el patró que es podia observar era tot el contrari, la càrrega bacteriana tenia tendència a augmentar, en pulmons i en melsa. Excepte en el cas de BALB/c, on s'apreciaven valors d'UFCs més baixos.

Quan es van analitzar les dades dels valors obtinguts dins del mateix experiment, per a les diferents soques de ratolí, sols es van poder observar diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) en pulmó de l'experiment C, entre les soques DBA/2 - C57BL/6 i DBA/2 - BALB/c. I en melsa, en l'experiment B, entre les soques DBA/2 - 129/Sv.

L'expressió de citocines clau en la resposta immune, iNOS i RANTES no es relaciona amb la inducció de necrosi intragranulomatosa.

L'expressió d'IFN- γ , TNF- α , iNOS i RANTES va mostrar una certa tendència a augmentar en els ratolins inoculats amb LPS. I a ser encara superior en els ratolins infectats amb la soca UTE 0335R, com es pot observar en la següent figura.

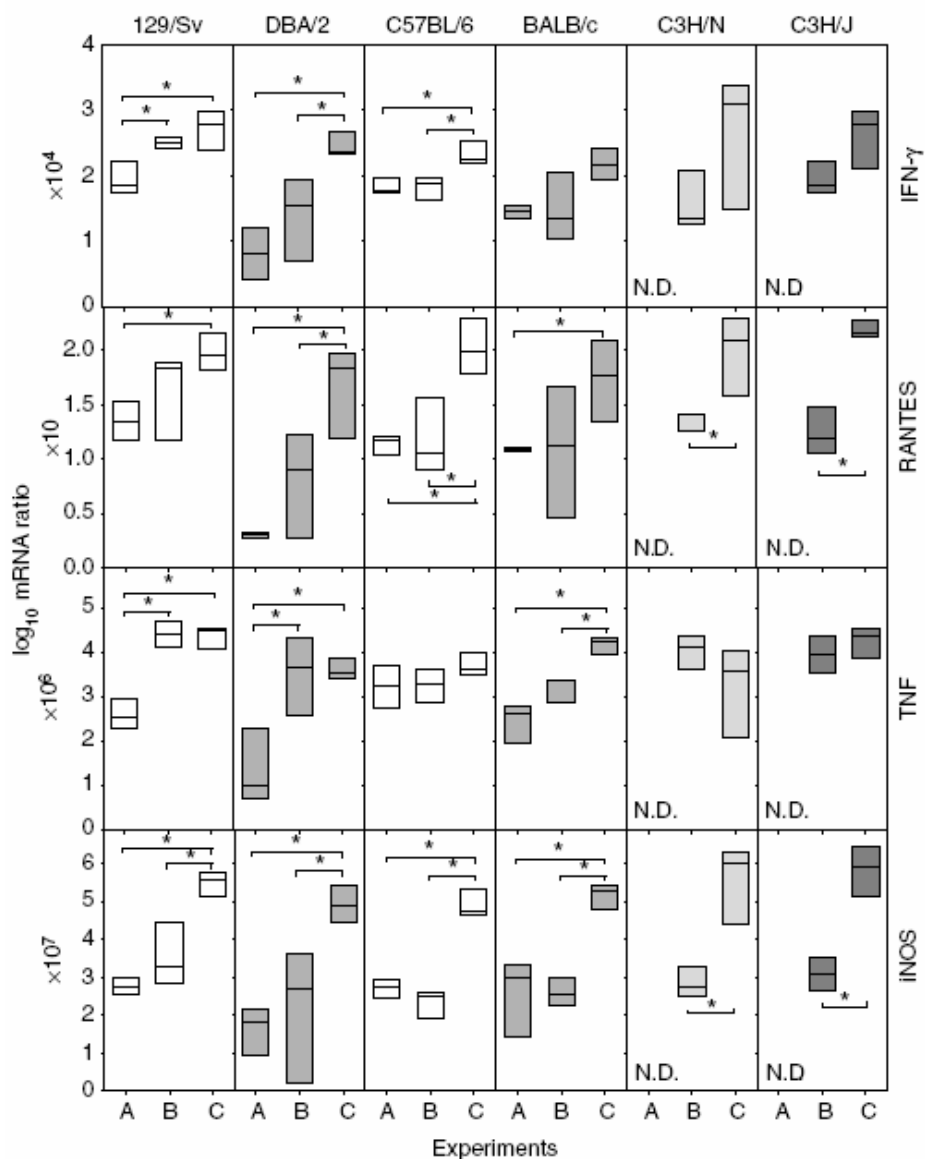


Figura 3.7– Evolució de l'expressió d'ARNm en els 3 experiments, on A és infecció amb H37Rv, B és infecció amb H37Rv més LPS i C és infecció amb UTE 0335R. El ràtio s'obté després de dividir els valors obtinguts entre l'expressió d'HPRT i multiplicant per un factor, de 10 a 10⁷. La caixa engloba els valors entre els percentils 25 i 75. La divisió mostra el percentil 50. Les diferències significatives entre experiments es marquen amb * quan $p < 0,05$.

No es van poder observar diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) entre les diferents soques, dins del mateix experiment. Excepte per TNF- α entre les soques 129/Sv – C57BL/6.

Novament, el nivell d'intensitat d'aquests paràmetres no mostra relació amb la inducció de necrosi intragranulomatosa.

Ni la infecció amb la soca UTE 0335R, ni l'administració de LPS afecten al benestar animal.

Ni la inoculació d'LPS, ni la infecció amb la soca UTE 0335R, mitjançant aerosol, van afectar negativament al benestar animal. Prova d'això és que el "protocol de punt final" no va ser necessari en cap cas. I tampoc es van poder observar ni pèrdues de pes, ni mortalitat espontània, ni conductes estereotipades en cap cas.

3.2 Estudi dels efectes del tractament immunoteràpic amb RUTI sobre la quimioteràpia, en el model murí d'infecció tuberculosa crònica.

S'estima que un terç de la humanitat es troba latentment infectada per *Mycobacterium tuberculosis*. Els bacils latents han estat capaços d'adaptar-se a les condicions d'estrès generades per l'hoste gràcies a les seves "armes", els seus factors de virulència:

- un metabolisme enlentit
- una gruixuda paret cel·lular hidròfoba
- l'habilitat de generar necrosi intragranulomatosa

Donat que, tant la resposta immune com els tractament antibiòtics, afecten solament als bacils en creixement actiu, la seva destrucció en un període curt de temps es fa difícil. Des de fa molt de temps, s'ha hipotetitzat sobre la possibilitat de fer servir vacunes immunoterapèutiques per poder portar a terme aquesta fita. En aquest estudi, s'han demostrat els beneficis que comporta l'administració de la vacuna terapèutica RUTI després d'una pauta curta de tractament antibiòtic, en el model de TB d'infecció crònica en el ratolí. D'una banda, es pot observar una important reducció en la càrrega bacil·lar. D'altra banda, RUTI desenvolupa una resposta immune Th1/Th2, com es demostra per la producció d'anticossos IgG1, IgG2a i IgG3 contra un ampli ventall de pèptids. L'anàlisi histològic no va mostrar ni eosinofília ni necrosi, i el percentatge d'infiltració pulmonar sols va augmentar lleugerament quan RUTI era administrat intranasalment.

Immunoteràpia amb RUTI, intranasal o subcutània.

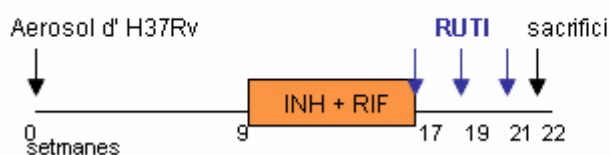


Figura 3.8– Disseny experimental de la immunoteràpia amb RUTI després d'una pauta curta de tractament antibiòtic.

RUTI té activitat bactericida en pulmó i melsa.

La inoculació de RUTI, intranasalment o subcutàniament, en ratolins *resistents*, C57BL/6, o *susceptibles*, DBA/2, induïa un efecte bactericida, tant en pulmó com en melsa.

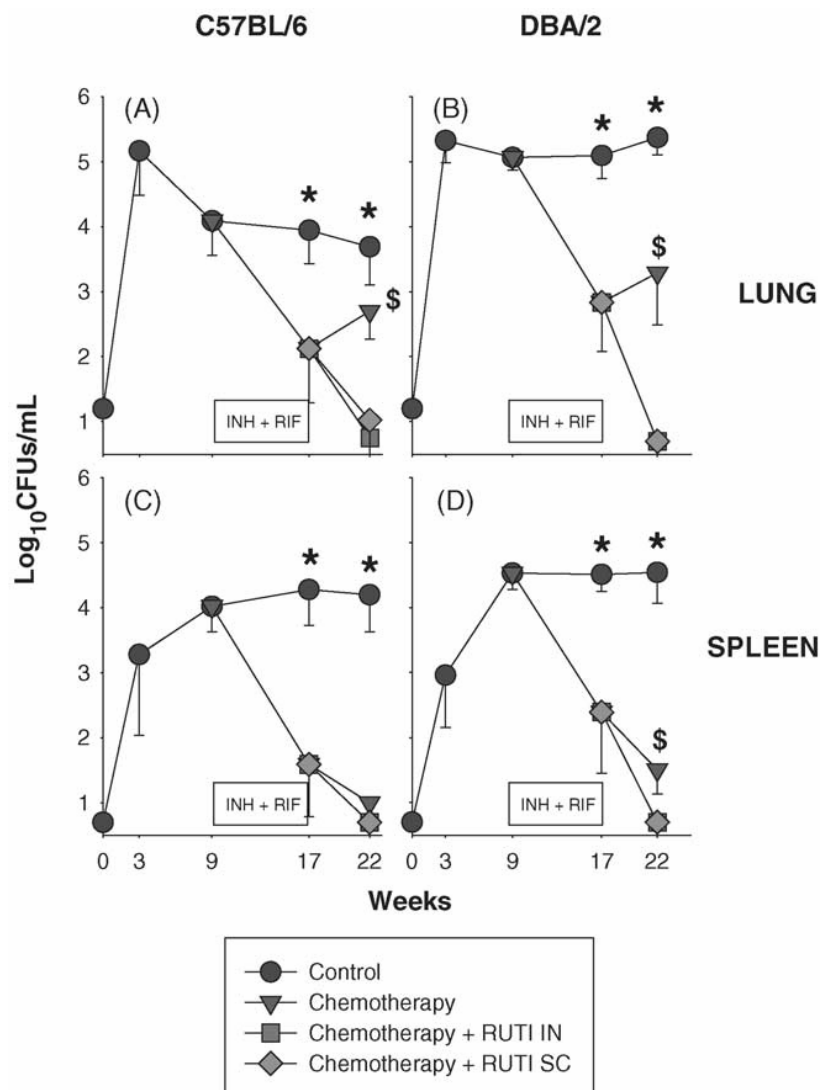


Figura 3.9 - Activitat bactericida de RUTI en pulmó (A, B) i melsa (C, D), en ratolins C57BL/6 i DBA/2. Els resultats mostren la mitjana i la desviació estàndard. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) entre el grup control i la resta, es marquen amb * i, entre el grup tractat amb quimioteràpia i la resta, amb \$.

Quan els ratolins no rebien tractament quimioteràpic previ a la inoculació immunoterapèutica de RUTI, aquesta davallada en la concentració d'UFCs no s'observava.

RUTI indueix un augment en l'expressió d'IFN- γ .

Com es pot veure en la taula següent, la inoculació de RUTI provocava un increment en l'expressió, en pulmó, d'una citocina clau per a la resposta immune, l'IFN- γ , respecte dels ratolins tractats sols amb quimioteràpia. Aquest efecte era més evident en ratolins C57BL/6, que en DBA/2, i sols va ser estadísticament significatiu quan RUTI era inoculat intranasalment.

Table 1
Local expression of cytokines (IFN- γ and TNF) and granulomatous infiltration in the pulmonary parenchyma at week 22

	Ratio cytokine/HPRT x 10 ³		Morphometry (% of infiltration)
	IFN- γ	TNF	
DBA/2			
Control	193.5 ± 80.32*	313 ± 60.61*	11.92 ± 1.3*
Chemotherapy	1.16 ± 0.45*	0.07 ± 0.07*	5.01 ± 2.26*
Chemotherapy + RUTI IN	1.88 ± 1.95	0.32 ± 0.47	3.38 ± 2.31
Chemotherapy + RUTI SC	1.31 ± 0.43	0.08 ± 0.07	1.66 ± 0.88
C57BL/6			
Control	220.3 ± 35.75*	198.8 ± 96.32*	4.22 ± 0.7 [§]
Chemotherapy	0.70 ± 0.51 ^{**}	0.02 ± 0.01*	2.43 ± 0.4 ^{§, #}
Chemotherapy + RUTI IN	4.42 ± 2.43 ^{**}	0.05 ± 0.02	5.25 ± 1.26 ^{#, ∞}
Chemotherapy + RUTI SC	2.45 ± 1.94	0.05 ± 0.05	3.53 ± 0.59 [∞]

Sigma Stat (SPSS Software, San Rafael, CA, USA) was used to compare the differences between groups through all pairwise multiple comparison procedures (Student–Newman–Keuls method).

- * $p < 0.05$.
- ** $p = 0.009$.
- § $p = 0.012$.
- # $p = 0.002$.
- ∞ $p = 0.03$.

Taula 3.1– Expressió local de citocines, segons mesures d'ARNm en pulmó, i percentatge d'infiltració pulmonar, en setmana 22 després de la infecció.

No es van poder observar increments en l'expressió de TNF- α .

Cal destacar que, els valors tan elevats que s'observaven en els ratolins controls, són deguts a l'elevadíssima càrrega bacteriana que tenien aquests animals.

RUTI no indueix necrosi.

En cap cas es va poder observar eosinofilia ni necrosi. I respecte del percentatge d'infiltració granulomatosa, sols es va veure lleugerament augmentat quan RUTI era administrat intranasalment en la soca de ratolins *resistents*, com es pot veure en la taula anterior.

RUTI genera una resposta immune equilibrada.

Un cop coneguda la composició de la vacuna terapèutica RUTI, el seu perfil peptídic, vam portar a terme l'estudi de la resposta humoral que era generada per l'administració de la vacuna.

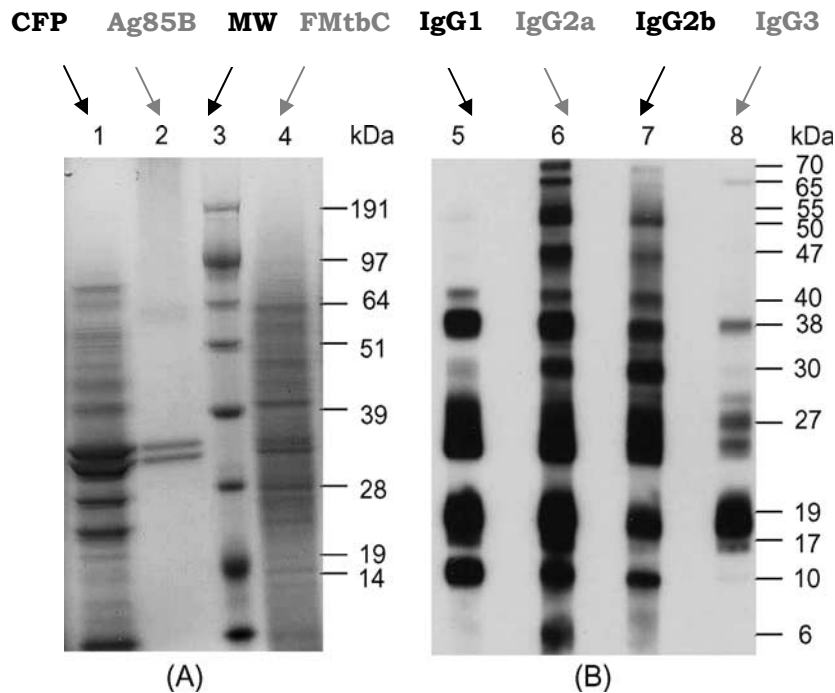


Figura 3.10– Composició de RUTI. (A) Perfil peptídic en un gel SDS-PAGE al 12%, el tercer carril és un marcador de pes molecular de 14-198KDa. (B) mostra l'anàlisi per Western Blot de cèl·lules de *M.tuberculosis* fragmentades, utilitzant sèrum control de ratolins inoculats amb RUTI i un perfil de bandes (KDa) definit amb anticossos específics i el patró de l'SDS-PAGE. Els carrils 5, 6, 7 i 8 s'obtenen contra anticossos conjugats IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3, respectivament.

Aquest estudi de la resposta humoral ens va donar una visió que la immunitat generada era equilibrada. És a dir, que es podien observar anticossos de diferents isotips, IgG2a i IgG3, relacionats amb una resposta de tipus Th1, anticossos IgG1, relacionats amb una resposta de tipus Th2 i, anticossos IgG2b, relacionats amb una resposta de tipus Th3.

Com es pot veure en la següent figura, RUTI era capaç de generar una resposta immune àmplia, contra un gran ventall de pèptids, tant en la soca de ratolins *resistent*, C57BL/6, com en la *susceptible*, DBA/2, a on estaven implicats tots els isotips IgG.

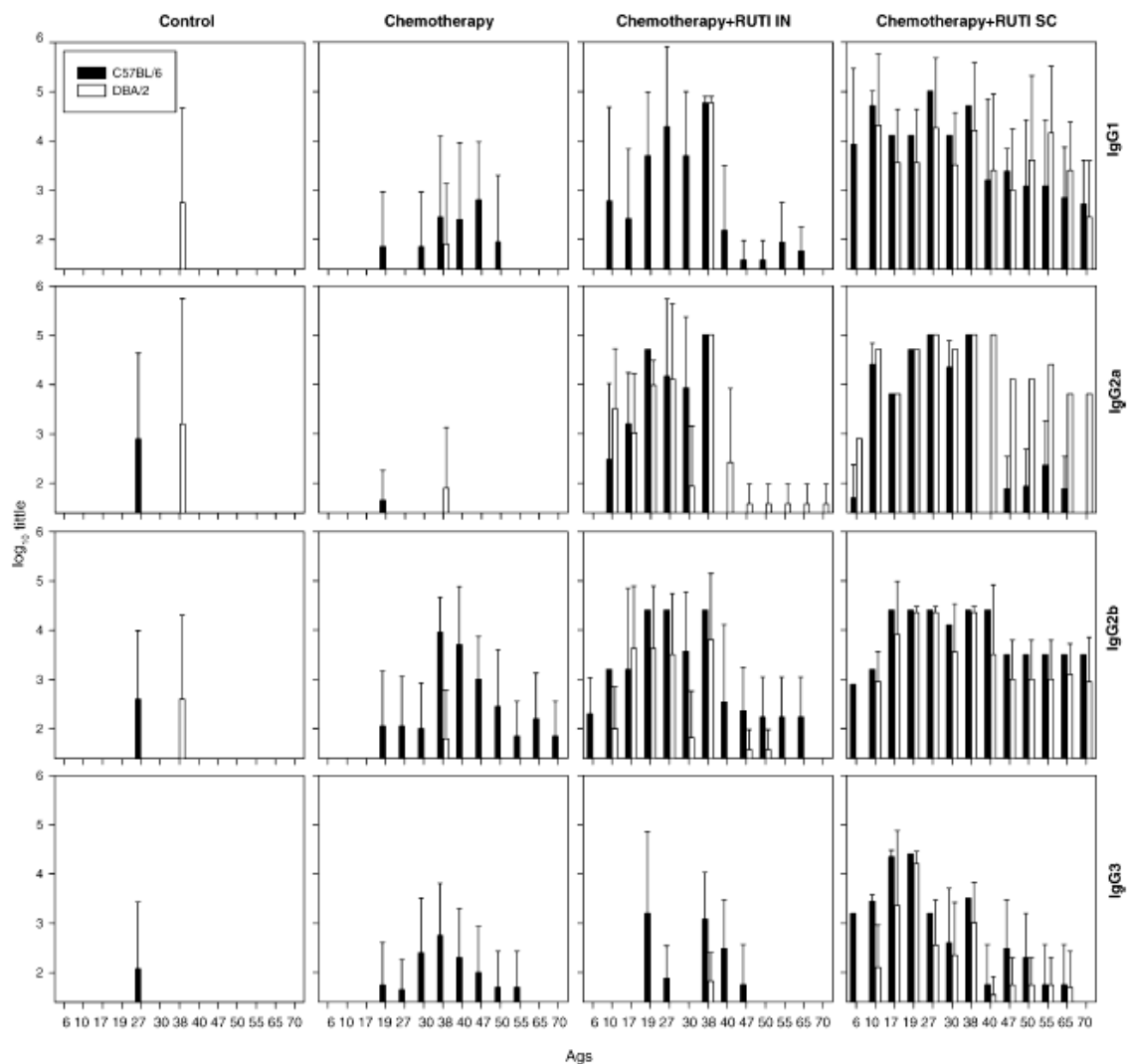


Figura 3.11– Resposta humoral IgG desenvolupada contra les proteïnes de cèl·lules de *M.tuberculosis* fragmentades, per western Blot, en setmana 22 post-infecció. Es representen la mitjana i la desviació estàndard.

No es van detectar nivells d'IgE en cap cas.

Es va poder demostrar la producció d'IgA en BAL, després de la inoculació de RUTI, intranasal i subcutània, en ratolins DBA/2. I també en ratolins C57BL/6 immunitzats intranasalment.

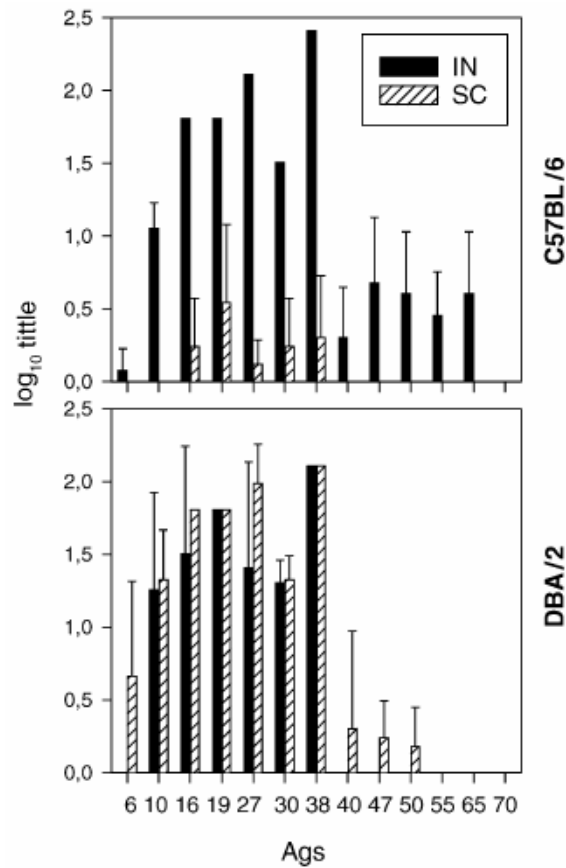


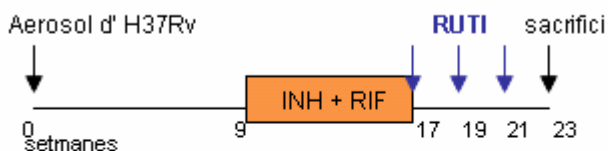
Figura 3.12– Resposta per IgA contra proteïnes de cèl·lules de *M.tuberculosis* fragmentades, per Western Blot, en setmana 22 post-infecció. Es representen la mitjana i la desviació estàndard.

3.3 Estudi dels efectes de la sèrum-teràpia passiva amb anticossos policlonals en el model experimental de ratolí SCID.

Clàssicament, la immunitat cel·lular de tipus Th1 ha jugat un paper central en el control de la infecció per *Mycobacterium tuberculosis*. I encara que s'han pogut observar limfòcits B a l'interior dels granulomes, especialment durant la fase crònica de la infecció, la hipòtesi que els anticossos podrien jugar un paper protector en la ITBL, encara avui dia, és font de controvèrsia.

En aquest estudi s'ha avaluat el rol protector de la immunoteràpia passiva amb sèrum, obtingut a partir de ratolins inoculats amb RUTI, en el model de ratolí SCID. Es tracta d'un model mutant immunològicament deficient que, donat que no posseeix ni cèl·lules T ni B, ens ha permès explorar l'efecte protector de la resposta humoral, sense interferències per part de la resposta cel·lular. S'ha pogut observar una restricció en la disseminació bacil·lar en pulmó, una infiltració pulmonar inferior i un menor nombre d'animals amb abscessos pulmonars en els animals tractats amb immunoteràpia passiva. La qual cosa suggereix que la resposta d'anticossos contra múltiples antigens de *M.tuberculosis* té un paper protector contra la infecció tuberculosa.

1. Producció de sèrum hiperimmune en ratolins DBA/2



2. Sèrum-teràpia passiva en ratolins SCID

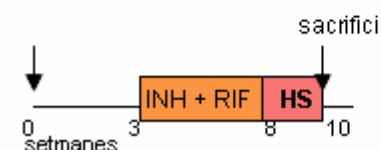


Figura 3.13– Disseny experimental de la sèrum-teràpia passiva en els ratolins SCID. (1) Esquema de l'obtenció del sèrum hiperimmune en ratolins DBA/2. (2) Esquema del tractament

El tractament de ratolins infectats amb sèrum hiperimmune fa disminuir notablement el nombre de bacils en els pulmons.

Els ratolins SCID infectats tenien $5.98 \pm 0.43 \text{Log}_{10}$ UFCs en els pulmons i $3.51 \pm 0.29 \text{Log}_{10}$ UFCs en la melsa, en setmana 3 post-infecció. Després de 5 setmanes de tractament antibiòtic amb INH i RIF (10 i 25 mg/Kg, respectivament), aquesta valors havien disminuït, $2.98 \pm 0,026 \text{Log}_{10}$ UFCs i $2.12 \pm 1.02 \text{Log}_{10}$ UFCs, en pulmó i melsa, respectivament.

En la següent figura es pot veure com la immunoteràpia passiva amb sèrum hiperimmune inhibia la reactivació que tenia lloc després del tractament quimioteràpic; aquesta inhibició era molt més evident en els pulmons, on les UFCs disminuïen 2Log_{10} ($3.68 \pm 2.02 \text{Log}_{10}$ vs. $5.72 \pm 1.41 \text{Log}_{10}$ UFCs). Els recomptes de la concentració bacil·lar en melsa també es veien disminuïts però no es van poder veure diferències estadísticament significatives ($4.75 \pm 1.84 \text{Log}_{10}$ vs. $5.79 \pm 1.02 \text{Log}_{10}$). Cal destacar que el límit de detecció de la tècnica es trobava en 2Log_{10} , per això es pot veure que sis ratolins presenten aquest valor i, és indicatiu que alguns d'ells podrien tenir recomptes encara inferiors.

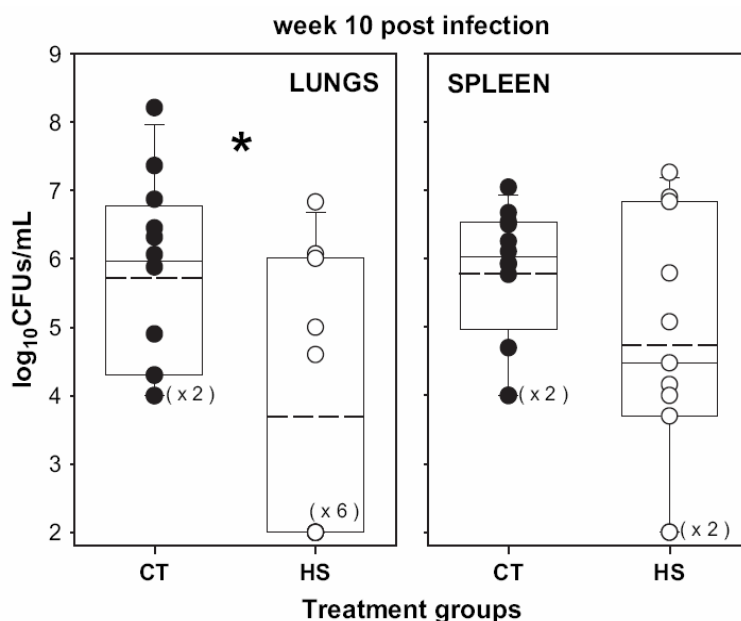


Figura 3.14— Concentració bacil·lar en la setmana 10 post-infecció en els animals control (CT) i els tractats amb sèrum-teràpia (HS). La caixa engloba els valors entre els percentils 25 i 75. Les particions contínua i discontinua de la caixa corresponen a la mediana i la mitjana, respectivament. I el límit superior, al percentil 95%. Les diferències significatives entre grups es marquen amb * quan $p < 0.05$.

La immunoteràpia passiva protegeix contra la disseminació bacil·lar en els pulmons.

La següent figura mostra imatges sobre la histologia dels lòbuls pulmonars en setmana 10 post-infecció. Es pot apreciar que els granulomes estaven formats per un centre ric en macròfags, infiltrat amb cèl·lules mononuclears i neutròfils (A). Es pot veure com la infiltració neutrofílica va augmentant progressivament, engrandint els granulomes (B). I que, finalment, es formen abscessos, representats com un nucli de teixit necròtic, envoltat sobretot de neutròfils fragmentats, i alguna cèl·lula encara sencera (C).

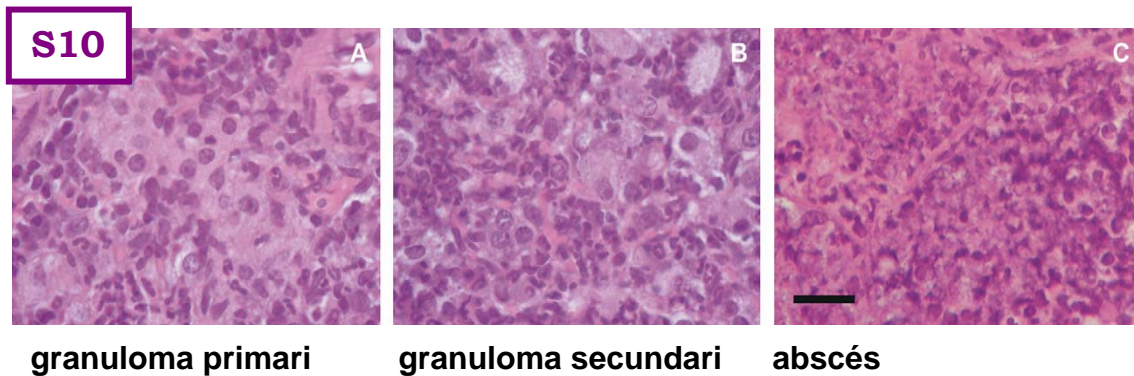


Figura 3.15– Imatges d'histologia de seccions pulmonars en setmana 10 post-infecció (1000x). La barra representa 100µm.

L'exploració macroscòpica dels pulmons en setmana 10 post-infecció va revelar la presència de grans abscessos (de diàmetre igual o superior als 3mm) en 10 dels 12 ratolins del grup control. En el grup tractat amb sèrum hiperimmune, sols 6 dels 11 ratolins presentaven abscessos, i aquests tenien un tamany inferior (de diàmetre igual o inferior als 2mm). Això implica que sols el 16.7% dels ratolins controls no presentaven abscessos, enfront del 45.5% en el grup tractat (FIG 3.17C).

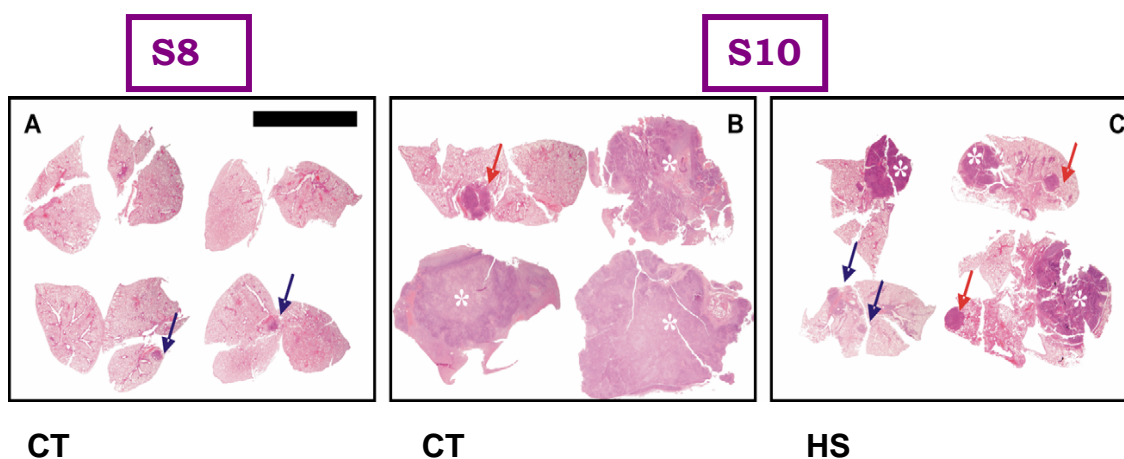


Figura 3.16– Histologia de seccions pulmonars en setmana 8 (A) i 10 (B, C) després de la infecció. Tinció d'hematoxilina-eosina. (A) mostra imatges després del tractament antibiòtic. (B) mostra seccions del grup control i (C) mostra seccions del grup tractat amb sèrum-teràpia. Els abscessos es marquen amb *, els granulomes es marquen amb fletxes blaves, i els granulomes secundaris es marquen amb fletxes vermelles. La barra representa 3mm.

El percentatge d'infiltració pulmonar, que s'obté després de dividir l'àrea pulmonar infiltrada respecte de l'àrea pulmonar total, i multiplicant per 100, va disminuir significativament (FIG 3.17B), més del triple, en el grup tractat amb sèrum hiperimmune respecte del control ($10.33 \pm 0.67\%$ vs. $31.2 \pm 1.77\%$).

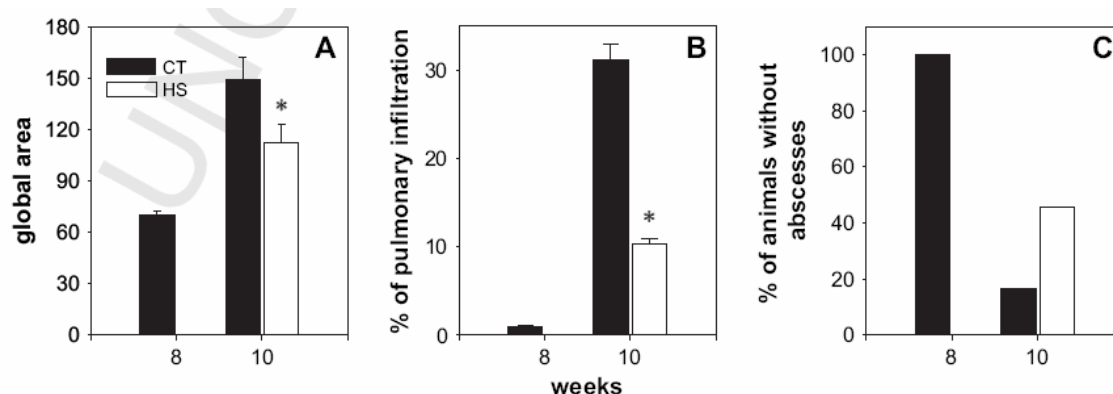


Figura 3.17– Quantificació de la infiltració pulmonar. (A) Mostra l'àrea global dels lòbuls estudiats. (B) Mostra el percentatge d'infiltració pulmonar. (C) Mostra el percentatge d'animals sense abscessos. Les diferències significatives es marquen amb * quan $p < 0.05$.

L'expressió de citocines pulmonars i de iNOS tendeix a ser inferior en el grup tractat.

Com es pot observar en la següent figura, no es van trobar diferències estadísticament significatives en l'expressió pulmonar d'IFN- γ , TNF- α , IL-12p40, RANTES i iNOS, en setmana 10 post-infecció, entre els dos grups, encara que els nivells d'expressió tendien a ser menors en el grup tractat respecte del control.

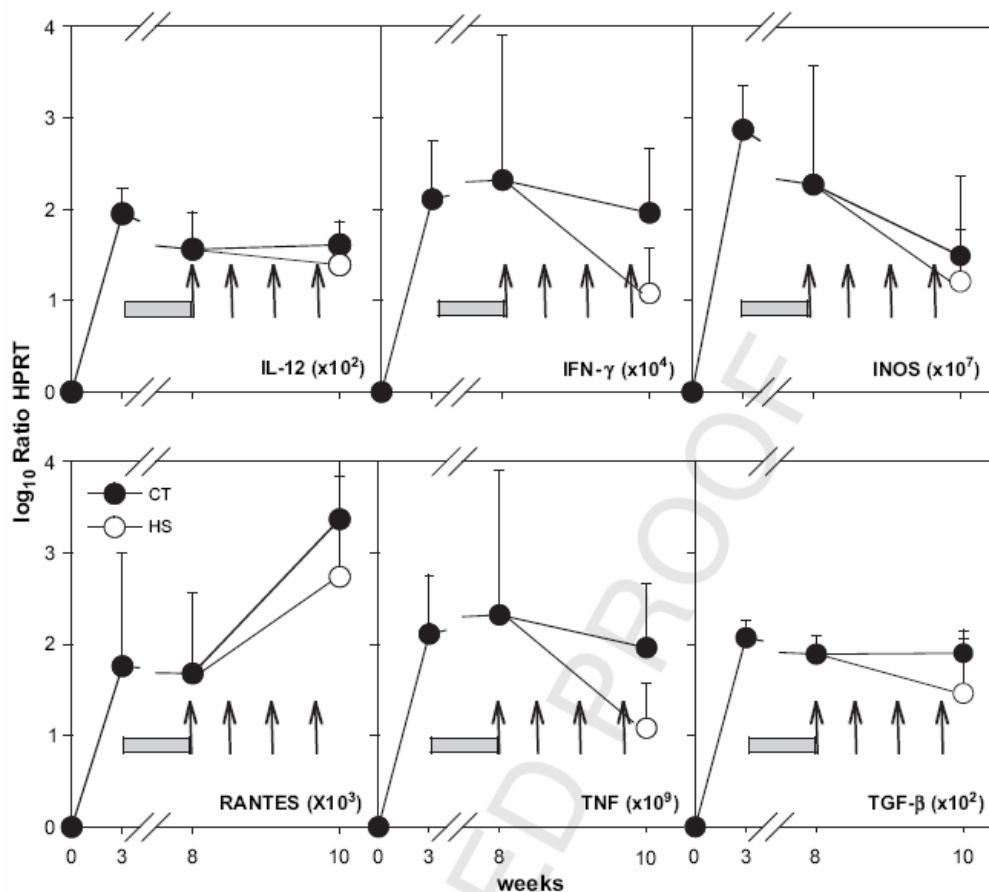


Figura 3.18– Expressió de citocines, RANTES i iNOS en pulmó. No s'observen diferències estadísticament significatives. Les fletxes mostren les inoculacions de sèrum hiperimmune. La barra mostra el tractament quimioteràpic amb INH i RIF.

En el BAL dels ratolins tractats s'observa l'absència d'anticossos contra pèptids entre 40 i 70 KDa.

Com s'havia descrit anteriorment, els títols serològics d'anticossos IgA i IgM es trobaven per sota de 2, el límit de detecció de la tècnica.

El patró de producció d'anticossos de l'isotip IgG en el sèrum dels ratolins SCID era exactament el mateix que l'obtingui en el sèrum hiperimmune obtingut dels ratolins DBA/2 immunitzats amb RUTI, amb predominança $IgG2a > IgG2b > IgG1 > IgG3$. Cal destacar que aquests anticossos eren menys abundants en els ratolins SCID, amb una diferència mitjana d'1Log₁₀.

En els ratolins SCID, els nivells d'anticossos en BAL van ser molt més inferiors que en sèrum. I cal destacar que, en BAL no es detectaven anticossos contra pèptids de 40 a 70KDa, com es pot veure en la següent figura.

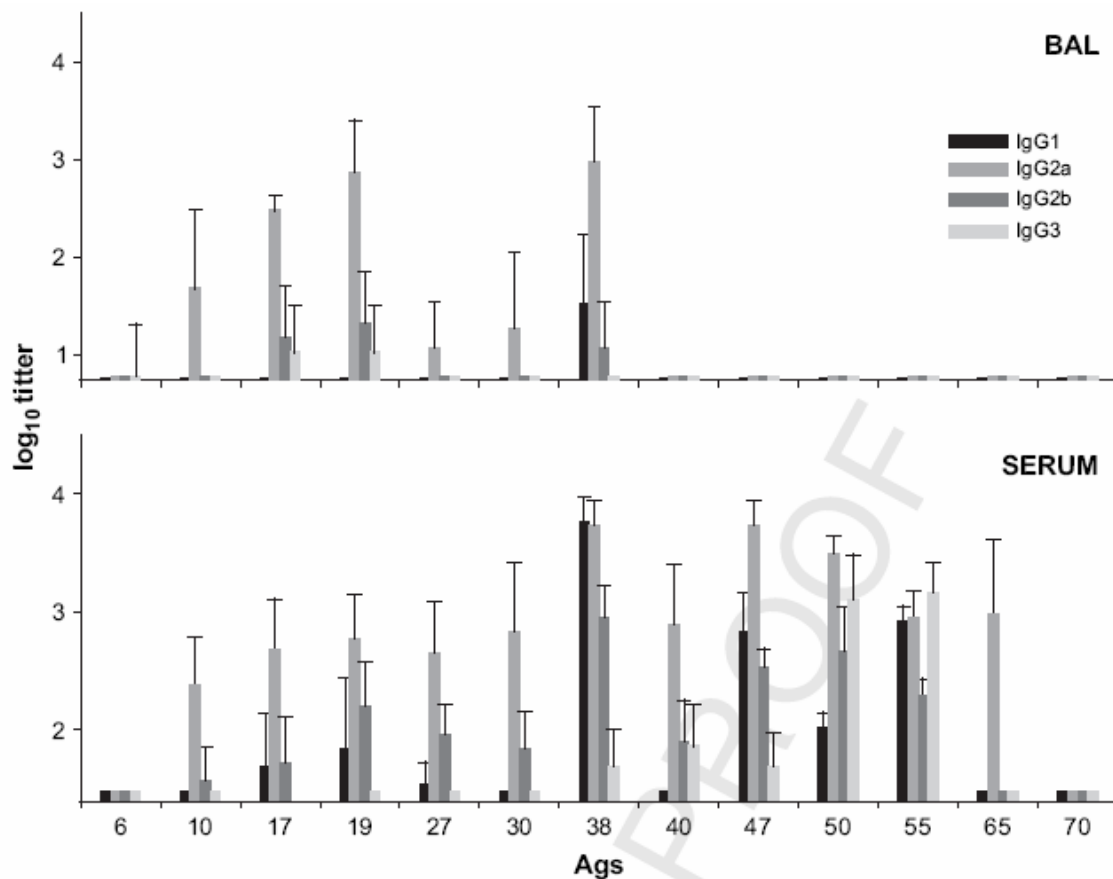


Figura 3.19– Nivells d'anticossos IgG en sèrum i en BAL en setmana 10 post-infecció. Els Western Blots van ser portats a terme utilitzant dilucions 1:25 fins a 1:51200 en sèrum i 1:25 fins a 1:256 en BAL. Les dades corresponen a la mitjana i la desviació estàndard en cada punt de l'experiment.

Absència d'IFN- γ i TNF- α en el sèrum hiperimmune.

Les concentracions d'IFN- γ i de TNF- α en el sèrum hiperimmune es trobaven per sota del límit de detecció del kit comercial d'ELISA utilitzat.

4 DISCUSSIÓ I PERSPECTIVES

Tradicionalment, s'ha considerat que el tret distintiu de la infecció per *M.tuberculosis* és la capacitat del bacil per romandre en estat latent, dins de lesions granulomatoses que romanen “enquistades” durant tota una vida. Aquest bacil adormit, pot reactivar el seu creixement en entrar en contacte amb factors de ressuscitació i/o en presència de fenòmens immunodepressors.

Pel contrari, en valorar la naturalesa dinàmica de la fisiologia animal en general, i valorant els temps de vida mitja de les cèl·lules i la constant capacitat de regeneració dels teixits lesionats, sembla difícil defensar una teoria que propugni la persistència de petits granulomes durant tota una vida.

Igualment, el tractament actual de la ITBL es basa en l'administració d'isoniazida durant 9 mesos. Aquest antibiòtic només és actiu contra bacils en fase de multiplicació. Aquesta és la gran paradoxa ! Si realment el fenomen de la ITBL es basés en la persistència del bacil durant anys en fase latent enquistat en una lesió vella, l'actual pauta de tractament, que ha demostrat una eficàcia del 90% en la prevenció de la TB, no funcionaria. Caldria un tractament preventiu de per vida.

Finalment, la visualització que els ME, són capaços de drenar els bacils en estat estacionari (latents) cap a l'espai alveolar, recolza el fet que aquests bacils tenen l'oportunitat d'incorporar-se en els aerosols generats a partir del fluid alveolar, que va pujant constantment cap als

espais bronquials superiors. D'aquesta manera, els bacils, bo i prenent part dels propis aerosols que constantment inspirem, poden generar noves lesions constantment. Aquest fet explicaria l'efectivitat del tractament amb isoniazida, donat que durant el temps d'administració es previndria la reactivació del bacil, i a la vegada s'agilitzaria el drenatge dels bacils latents que encara son dins del teixit necròtic dels granulomes que poden restar en actiu.

Tot plegat, s'inscriu en una relació bacil-hostatger que fa uns 3 milions d'anys que dura, i que manté un equilibri molt subtil, tal com es ressenya en la taula següent:

LA HIPÒTESI DINÀMICA. CONCLUSIONS	
ESTRATÈGIA DE L'HOSTATGER	ESTRATÈGIA BACIL·LAR
<ol style="list-style-type: none"> 1. Induir una resposta immune potent contra els bacils en creixement (117) <ol style="list-style-type: none"> 1a. Més perillosos 1b. Més susceptibles (54) 2. Drenar els bacils latents <ol style="list-style-type: none"> 2a. Menys perillosos 2b. Més resistents (54) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Multiplicar-se al màxim 2. Romandre en fase latent al llarg del temps <ol style="list-style-type: none"> 2a. Per escapar de la immunitat 2b. Per ser més resistent l'estrès i més capaç de reinfectar exògena i endògenament

Taula 4.1– Esquema de la hipòtesi dinàmica

Segons aquesta hipòtesi, la immunoteràpia contra la ITBL hauria de tenir 2 fases:

- tractament quimioteràpic inicial per destruir els bacils en creixement actiu i afavorir la desaparició de la inflamació i la resposta immune local, disminuint el tamany dels granulomes, reduint la presència de ME (i, per tant, de la immunodepressió local que indueixen) i afavorint la reabsorció de teixit necròtic
- immunització amb una vacuna terapèutica que ha de contenir tant antígens estructurals com antígens secretats, oferint així una immunització àmplia, intensa i equilibrada, que estimuli en l'hostatger una resposta immune cel·lular i humoral capaç de destruir els bacils, independentment del seu estat metabòlic

D'acord amb les premisses establertes, el nostre grup ha desenvolupat una vacuna terapèutica, la RUTI, a partir de la fragmentació i liposomació de cèl·lules de *M.tuberculosis* cultivades en condicions d'estrès (baixa pressió d'oxigen i baix pH). Aquesta vacuna, després d'una pauta curta de tractament quimioteràpic, indueix una resposta immune de tipus Th1/Th2/Th3 que ja ha demostrat la seva eficàcia en el model "humanitzat" d'infecció crònica tuberculosa en el ratolí, que sí presenta necrosi intragranulomatosa. També hem pogut demostrar, sortosament, que la inoculació de RUTI, en contra del que plantegen alguns estudis publicats recentment que recomanen evitar l'ús de vacunes fetes amb bacteris, no indueix l'aparició de cap reacció tòxica. Aquest fet és degut al procés de producció de la vacuna, que inclou un pas de detoxificació, per extreure'n els possibles components de la paret cel·lular micobacteriana, que podrien donar lloc a aquest tipus de reaccions immunes. En aquesta absència de toxicitat també juga un paper molt important el tractament quimioteràpic previ, que disminueix la concentració bacil·lar i la resposta immune local, disminuint així les

probabilitats de generar una resposta tòxica, com la reacció de Koch, inductora de la necrosi intragranulomatosa.

El model murí “humanitzat”

Tradicionalment, el control de la infecció per *M.tuberculosis* s’ha volgut portar a terme com el de qualsevol altre patògen intracel·lular, sense tenir en compte les seves característiques bàsiques: el seu metabolisme enlentit (100 vegades més lent que *E. coli*) i la seva capacitat per generar necrosi (56).

El model experimental triat tant per a l’estudi de la TB, com per a l’estudi de nous tractaments, vacunes, etc. ha estat des de sempre el ratolí. Clàssicament, es va determinar que el ratolí era un hostatger “resistent”, en contraposició al conill porquí, que es considerava un hostatger “susceptible”. Aquesta classificació, entre d’altres fets, tenia en compte que la resposta immune en el ratolí no generava necrosi intragranulomatosa. Durant molt de temps, s’ha considerat que la generació de necrosi és perjudicial per l’hostatger, un fenomen tòxic, perquè mostra un mecanisme immune “descontrolat” i poc eficaç. Des dels anys 80 aquesta necrosi s’ha anomenat reacció “Koch-like” i, ha estat associada a la DTH, i com a conseqüència d’una resposta immune cel·lular dèbil. Més recentment, es va postular que podria estar relacionada amb una resposta immune de tipus Th2 molt predominant sobre la resposta de tipus Th1.

L’objectiu d’aquest treball va ser optimitzar el model “humanitzat” d’infecció crònica tuberculosa en el ratolí (96), per tal de poder avaluar el fenomen de la necrosi intragranulomatosa i la suposada “resistència” del model murí. Es tracta d’un model experimental que intenta mimetitzar el que ocorre en humans, l’hostatger que ha sofert la

selecció natural més rigorosa contra *M.tuberculosis*, fet pel qual només un 10% dels humans infectats desenvolupen la malaltia, i d'aquests sols un 40% moriran. Al contrari del que passa en el ratolí, on tots els animals infectats desenvolupen una malaltia de tipus crònic, que provocarà la total ocupació del parènquima pulmonar amb granulomes, i tots moriran.

Inicialment, en aquest model la necrosi intragranulomatosa s'aconseguia mitjançant l'inòcul de LPS intranasalment, provocant una reacció d'Schwartzman, donat que el granuloma es comportaria com una "zona preparada" i, els elevats nivells de TNF- α (102) secretats per la resposta immune local en resposta a l'elevada concentració bacil·lar, actuarien d'injecció "provocadora". Es va observar que la inoculació de LPS provocava un ràpid i momentani augment de neutròfils en el BAL, mentre que la necrosi intragranulomatosa tenia lloc a les 6 setmanes post-infecció, 3 setmanes després de l'inòcul intranasal. I que s'obtenien granulomes típics, ben estructurats, en la setmana 9 post-infecció (96). Però, desafortunadament, en aquest model, també associat a la inoculació intranasal de LPS, s'observava un increment de la mortalitat superior al 20%.

El següent pas en la optimització del model va ser inocular el LPS mitjançant la generació d'un aerosol. I, portant a terme aquest estudi, vam poder observar que determinades soques de *Mycobacterium tuberculosis*, entre elles alguns aïllats clínics, postulem que degut a la seva virulència, podien provocar necrosi de manera espontània en el ratolí (107).

Un cop establert el model "humanitzat" hem demostrat que la necrosi intragranulomatosa no es relaciona amb la resistència contra la infecció tuberculosa. Aquest estudi obre qüestions relacionades amb el

mecanisme inductor de necrosi en els humans, que s'ha relacionat amb una resposta de tipus Th2, en un entorn ric en TNF- α (102,135). Les nostres dades mostren que hem estat capaços d'induir necrosi en les soques C57BL/6 i 129/Sv però no en les soques DBA/2 i BALB/c. Alguns autors suggereixen que aquestes soques tendeixen a polaritzar cap a respostes de tipus Th1 i Th2, respectivament (136,137).

Existeix un model murí d'infecció endotraqueal on la resposta Th2 es relaciona amb l'aparició de necrosi. Però la comparació entre aquest model i el model "humanitzat" es fa molt complicada donat que són força diferents. En aquest model, la influència de IL-4 combinada amb el TNF- α promou la inducció de necrosi en BALB/c (138), mentre que aquesta és una de les soques que no desenvolupa necrosi al model "humanitzat". Aquest altre model utilitza una elevada dosi infectiva, mitjançant la inoculació intratraqueal. I la necrosi sols es pot observar durant la fase inicial de la infecció. Mentre que al model murí "humanitzat" la dosi infectiva és molt baixa (entre 10-50 bacils als pulmons), mitjançant aerosol, de manera que els animals desenvolupen una malaltia de progressió molt lenta, amb una càrrega bacil·lar baixa, relacionada amb una resposta Th1 forta i on els animals poden sobreviure durant més de 2 anys, en comptes de mig any. Amb uns nivells d'UFCs tan baixos, és molt poc probable veure resposta de tipus Th2. En defensa d'ambdós models, cal dir que el model Th2-necrosi (138) és un model de TB desenvolupada, mentre que el model "humanitzat" el que pretén és mimetitzar la necrosi induïda en els humans (90).

Existeixen altres models, que fent servir aerosol de baixa dosi, aconsegueixen induir necrosi intragranulomatosa. Es tracta de models de ratolins immunodeficients per alguna de les citocines clau en la resposta immune (IFN- γ en resposta Th1, TNF- α en resposta Th2....),

o deficients en limfòcits $\alpha\beta$ T (52,139). Es tracta de models on s'indueix necrosi massiva i on es poden veure bacils en creixement actiu dins del teixit necròtic. No es tracta de bons models per a l'estudi de la latència. Podríem dir que, en aquests models, la necrosi intragranulomatosa es troba relacionada amb l'elevada càrrega bacil·lar (52,53).

Portant a terme estudis comparatius entre la necrosi generada mitjançant la inoculació de LPS i la generada naturalment, en la setmana 9 post-infecció, es podia observar el mateix patró histològic independentment del mecanisme d'inducció de la necrosi.

S'observaven diferències importants entre les soques *resistents* i les *susceptibles*. En les soques *susceptibles*, la inoculació de LPS provocava un augment en la infiltració granulomatosa pulmonar i una disminució en la concentració bacil·lar. I s'observava un increment en l'expressió de TNF- α i d'IFN- γ . Quan la infecció es portava a terme amb la soca UTE 0335R, la infiltració pulmonar augmentava, a l'igual que l'expressió de TNF- α , IFN- γ , iNOS i RANTES. Però el fet més important era un increment en les UFCs.

Respecte les soques de ratolins *resistents*, el LPS no modificava la infiltració pulmonar i tampoc s'observaven gaires variacions en l'expressió de TNF- α , IFN- γ , iNOS i RANTES, encara que la càrrega bacil·lar pulmonar tendia a disminuir. Quan la infecció es portava a terme amb el aïllat clínic UTE 0335R, la infiltració pulmonar tenia tendència a augmentar, al igual que l'expressió de TNF- α , IFN- γ , iNOS i RANTES, mentre que es controlava la càrrega bacil·lar en els pulmons.

Les soques C3H (140) es caracteritzen per ser *susceptibles* a la infecció per *M.tuberculosis*. Però es varen fer servir com a control de la inoculació de LPS, donat que la soca C3H/HeJ és LPS-resistent. En ambdues soques, l'única diferència que es va poder observar va ser l'aparició de necrosi intragranulomatosa en la soca C3H/HeN.

Aquestes dades recolzen la hipòtesi que l'augment en la resposta inflamatòria, l'augment en la resposta immune local, la infiltració granulomatosa pulmonar i la concentració bacil·lar en els pulmons no són paràmetres claus per a la inducció de necrosi intragranulomatosa.

Si analitzem el patró d'expressió de TNF- α , IFN- γ , iNOS i RANTES, ens adonem que existeix una tendència cap a una resposta de tipus Th1 (107). Per això, el control de la concentració bacil·lar que s'exerceix amb el inòcul de LPS no és gens sorprenent. Aquestes dades haurien de ser interpretades com una inducció externa de la resposta inflamatòria, on el LPS afavoriria l'hostatger, en la lluita que manté amb al bacil. I el fet que es pot deduir en la comparació entre soques *resistents* i *susceptibles* és que en les resistents no augmenta el percentatge d'infiltració pulmonar. I es tracta d'un fet molt més important del que pot semblar a primera vista, donat que aquests animals moren per la total ocupació del parènquima pulmonar, de manera que la soca resistent podria extreure del LPS una avantatge en termes de supervivència.

Quan es porta a terme la infecció amb la soca UTE 0335R, es pot observar que malgrat que aquests paràmetres també es troben augmentats, no s'exerceix un control sobre la població bacil·lar. Això demostra que l'augment d'aquests paràmetres no sempre implica un millor control bacil·lar. De fet, en la progressió de la infecció per *M.tuberculosis*, aquests valors sempre augmenten després que hagi tingut lloc un augment en la càrrega bacil·lar. Fet que proposa que el bacil és qui porta la iniciativa en la infecció (84,96,107,141).

Un dels fets més importants és l'absència de diferències histopatològiques entre la necrosi induïda amb LPS i la induïda amb la soca UTE 0335R. Això implica que la generació de la necrosi

intragranulomatosa ha de ser un fenomen limitat temporalment a l'inici de la infecció. I aquesta afirmació recolza la hipòtesi que la necrosi (reacció de Koch) es troba relacionada amb una reacció d'Schwartzman, i que es desenvolupa arrel d'una resposta no-específica contra un "factor provocador", com el LAM, el cord-factor, etc. I, a més a més, que la DTH no es troba implicada en la necrosi. Les diferències en la composició i en la quantitat d'aquestes molècules "endotòxiques" en les diferents soques podrien explicar perquè es produeix la necrosi de manera espontània o no.

En resum, el model "humanitzat" ens ha permès observar que:

- la inducció de la necrosi intragranulomatosa es relaciona amb un ambient Th1
- la inducció de la necrosi intragranulomatosa té lloc en la fase inicial de la infecció
- la necrosi intragranulomatosa no es troba relacionada amb la *resistència* o *susceptibilitat* contra la infecció, sinó amb la presència de molècules "endotoxin-like"

La vacuna terapèutica RUTI

Ruti podria ser una vacuna immunoterapèutica útil per portar a terme la reducció del temps de tractament quimioteràpic en la ITBL. Segons els nostres resultats, el seu mecanisme d'acció podria estar relacionat amb la inducció d'una resposta protectora de tipus Th1 contra un ampli ventall d'antígens de *M.tuberculosis* (142). La seva efectivitat també es troba relacionada amb el tractament quimioteràpic previ, donat que el tractament sols amb RUTI no aconsegueix reduir la càrrega bacteriana. I també amb el fet que la quimioteràpia indueix una disminució de la inflamació i de la resposta immune, augmentant indirectament l'efectivitat de RUTI i disminuint la possibilitat de desenvolupar respostes tòxiques (125).

RUTI podria actuar tant com un estímul (booster) per a la resposta immune existent, com un inductor d'una resposta immune capaç de reconèixer pèptids estructurals, independents de l'activació metabòlica, i pèptids secretats, típics de bacils en creixement actiu, permetent el reconeixement dels bacils latents. RUTI faria canviar la tendència de la infecció natural d'estimular la resposta constantment cap al control dels bacils en creixement bo i negligint, per qüestions "econòmiques" òbvies, la resposta contra els bacils que no es multipliquen i que per tant no són "perillosos". Aquest bacils simplement els drena amb el fluid alveolar, per ser posteriorment destruïts a l'estómac.

A banda de la resposta immune de tipus Th1, RUTI també seria capaç de desenvolupar mecanismes relacionats amb respostes de tipus Th2 i Th3. Encara que s'ha demostrat que la resposta de tipus Th2 té tendència a contrarestar la resposta de tipus Th1 (138,143), recentment s'ha vist que la resposta mixta Th1/Th2 desenvolupada amb BCG és igual o més eficient que la resposta Th1 sola, contra la infecció per *M.tuberculosis* (144). La resposta de tipus Th3 encara no és gaire coneguda però es relaciona amb un paper antiinflamatori per part del TGF- β , que permet el control de reaccions massa tòxiques en el desenvolupament de la infecció tuberculosa en el model de ratolí (145).

Hem pogut avaluar que la inoculació de RUTI no indueix ni toxicitat sistèmica, ni local. Aquest ha estat un dels fets que més ha preocupat en la vacunació terapèutica contra *M.tuberculosis* des de l'assaig amb *tuberculina antiga* per R. Koch (97). RUTI no desenvolupa cap resposta tòxica perquè al seu procés de producció s'inclou una fase de detoxificació, on s'extreuen totes les molècules endotòxiques (LAM, cord-factor...) (104) amb Tritó X-114 (146). D'altra banda, el tractament antibiòtic previ redueix la resposta immune i la inflamació (125) induïdes per la càrrega bacteriana, disminuint així la probabilitat de

desenvolupar una reacció de Koch (96). I, finalment, el tractament antibiòtic també promou la reducció del tamany dels granulomes, eliminant la corona de ME, possibles inductors potencials d'immunosupressió local (147), la qual cosa també ajuda a augmentar l'eficiència de la vacuna.

La resposta humoral induïda per RUTI

Els models experimentals animals han demostrat que la immunitat cel·lular és bàsica en el control de les infeccions per patògens intracel·lulars com *C. neoformans*, *L. monocytogenes*, o *M.tuberculosis*. De fet, no es detecta resposta humoral en els models murins de TB induïda per aerosol o sols es detecta una producció molt limitada d'anticossos contra glicolípid (125). Únicament es pot detectar una forta resposta humoral en els estadis finals de la malaltia, quan els pulmons es troben greument infiltrats i els ratolins es troben molt propers a la mort. Una altra dada interessant és que, l'elevat percentatge de cèl·lules B que es troben en els granulomes durant la fase crònica de la infecció no es correlacionen amb la producció d'anticossos (148). Per aquests motius, el paper dels anticossos en la ITBL és font de controvèrsia.

La total predominança de la resposta cel·lular en el control de la infecció tuberculosa va ser el fet clau que ens va portar a plantejar el disseny de l'experiment amb ratolins SCID, com ja havien fet abans altres autors (149,150), per poder eliminar les interferències de la resposta específica i poder avaluar l'efecte protector de la immunitat humoral. Vam triar un model de ratolí on la extremada virulència de la soca H37Rv provoca la mort de tots els animals sense tractar, en sols 4 setmanes, per tal de poder avaluar la capacitat d'inhibir la reactivació bacil·lar dels anticossos.

En estudis previs havíem vist que la immunoteràpia amb RUTI permetia no sols un control de la reactivació cel·lular, sinó també un efecte bactericida. Per aquest motiu vam hipotetitzar que aquesta protecció havia d'estar relacionada amb mecanismes antigènics Th1 i respostes citotòxiques, però que també era necessària una important resposta humoral. Encara que la quimioteràpia per sí mateixa ja és una important inductora de la resposta basada en anticossos en els humans, i pot tenir un paper molt important en el control de la concentració bacil·lar (151,152), no ocorre el mateix en el model murí. Utilitzant ratolins DBA/2 s'ha pogut demostrar que la producció d'anticossos és molt limitada.

Els resultats que hem obtingut després de la inoculació de sèrum hiperimmune, procedent de ratolins prèviament immunitzats amb RUTI, en ratolins SCID, han superat les nostres expectatives. A nivell macroscòpic ja vam poder observar l'absència de grans abscessos en els ratolins tractats. La càrrega bacteriana pulmonar va ser 2Log_{10} més baixa en els animals tractats i, la infiltració granulomatosa pulmonar, tres vegades més baixa. A més a més, la reducció en la càrrega bacil·lar es relacionava amb una disminució en la resposta inflamatòria en el grup tractat. Ara bé, si la reducció era proporcional a la càrrega bacteriana o, si pel contrari, es quedava relativament elevada per ajudar al control del creixement bacil·lar, encara no se sap i haurà de ser aclarit en nous estudis.

Les dades obtingudes suggereixen que l'efecte protector es troba localitzat a l'interior dels espais alveolars, perquè se sap que el control de la reactivació bacil·lar es troba associat al control de la disseminació pulmonar (84). Encara que la immunoteràpia passiva amb sèrum també té un efecte protector en la melsa, la qual cosa avala un efecte sistèmic també.

En relació als mecanismes implicats en el control de la infecció, les nostres dades només proposen que es tractaria d'un efecte Th1 independent. Però aquesta hipòtesi es basa en el fet d'haver utilitzat com a hostatger ratolins SCID, en el fet que les citocines Th1 no augmentessin durant el tractament, i en el fet que la resposta no fos mediada per IgA. Els títols d'IgM i d'IgA es trobaven per sota de 2, el límit de detecció de la tècnica. Per això sembla que tot el paper protector sigui mediat per anticossos IgG. De fet, ja ha estat suggerit en la literatura el possible paper protector que tindrien els anticossos IgG (153) en experiments que fan servir cèl·lules de *M.tuberculosis* o de BCG, envoltades d'anticossos monoclonals abans de la inoculació en ratolins.

En el nostre estudi, hem obtingut una forta resposta humoral amb predominança IgG2a > IgG2b > IgG1 > IgG3. Calen estudis addicionals per determinar quina fracció del sèrum és la responsable de l'efecte protector que trobem.

En resum, la immunització passiva amb anticossos generats contra RUTI protegeix contra la reactivació bacil·lar de *M.tuberculosis* en ratolins SCID que han estat tractats amb una pauta curta de quimioteràpia, la qual cosa recolza la hipòtesi que els anticossos també tenen un paper protector central en el control de la ITBL.

La resposta cel·lular induïda per RUTI

En estudis previs, la vacuna RUTI ha demostrat que produeix una resposta immune equilibrada Th1/Th2/Th3 i poliantigènica (126) . Per a l'estudi de la resposta cel·lular induïda per RUTI es van portar a terme experiments amb tres models diferents d'infecció tuberculosa latent.

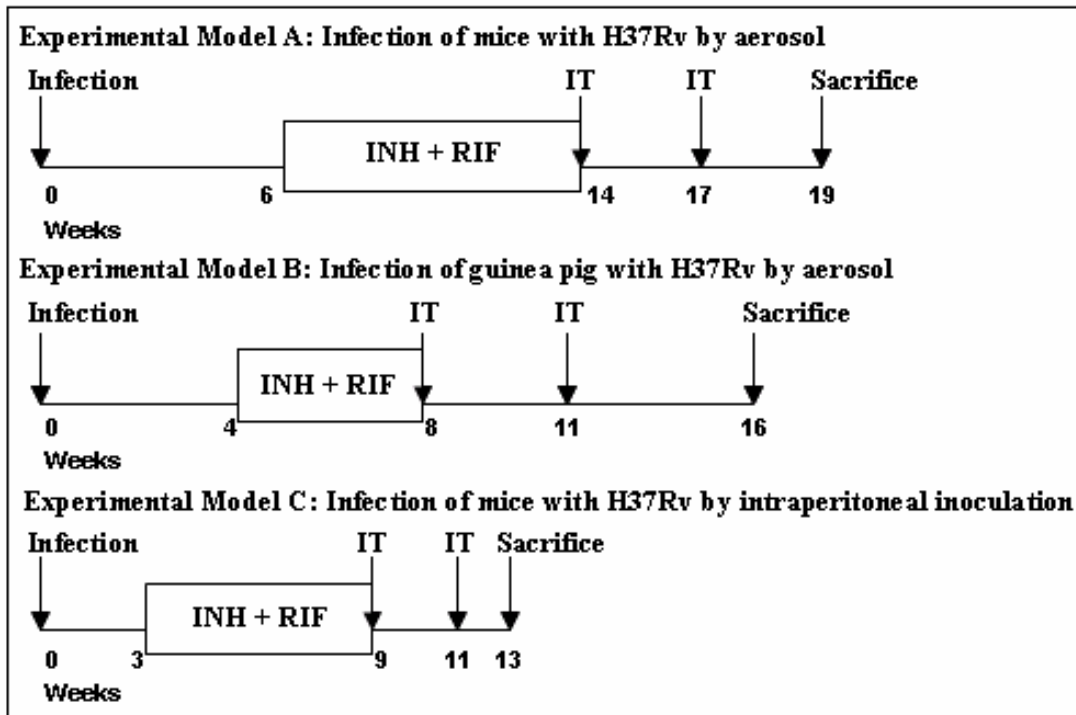


Figura 4.1- Disseny experimental dels models animals. En el model A els animals es van infectar amb aerosol de baixa dosi amb la soca H37Rv, seguit d'una pauta curta de tractament antibiòtic amb INH i RIF, i es va realitzar immunoteràpia amb RUTI o BCG. En el model B els conills porquins es van infectar amb aerosol de baixa dosi amb la soca H37Rv, seguit d'una pauta curta de tractament antibiòtic, més curta que en el model A, sols de 4 setmanes, amb INH i RIF, i es va realitzar immunoteràpia amb RUTI. En el model C els ratolins es van inocular intraperitonealment amb la soca H37Rv, seguit d'una pauta curta de tractament antibiòtic amb INH i RIF, i es va realitzar immunoteràpia amb RUTI.

Les dades obtingudes sobre l'estudi de la resposta immune cel·lular suggereixen que el mecanisme d'acció més important de RUTI implica una inducció d'una resposta immunològica de tipus Th1 contra un ampli ventall d'antigens secretats i estructurals.

En general, la immunoteràpia amb RUTI després d'una pauta curta de tractament antibiòtic permet:

- un millor control de la infecció tuberculosa latent
- nombres més elevats de cèl·lules T CD4+ i CD8+ efectores, productores d'IFN- γ
- una major secreció d'aquesta citocina
- una restricció en la disseminació bacil·lar en els pulmons dels animals infectats

Tot i que existeixen estudis recents que recomanen no fer servir vacunes terapèutiques, ja sigui amb micobacteris morts o vius, donat que poden produir efectes tòxics (132,154), cal posar de manifest que la immunoteràpia amb RUTI no se n'ha mostrat cap, ni en els models experimentals murins, ni en el model de conill porquí. En aquest sentit, cal destacar la importància del tractament quimioteràpic previ per reduir la resposta immunològica i la resposta inflamatòria local en els pulmons. D'aquesta manera es redueix la probabilitat de generar una reacció local de Koch. D'altra banda, estimula la reabsorció de la lesió i drena l'acúmul de macròfags escumosos localitzats en la part més externa dels granulomes, importants inductors d'immunodepressió, així com potencials vehicles de bacils en estat latent.

Sabem de la importància en el control de la infecció tuberculosa crònica que tenen els limfòcits T CD8+(155). I per tant, aquest és un tema que cal tenir molt en compte en el desenvolupament de vacunes terapèutiques contra la infecció latent. RUTI, en el model experimental murí d'infecció per aerosol de baixa dosi, ha demostrat que augmenta les poblacions de limfòcits T CD4+ i T CD8+ productors d'IFN- γ , mitjançant l'estímul amb diferents antígens, secretats i estructurals.

En estudis previs, es va demostrar que l'administració terapèutica de RUTI o BCG aconseguen augmentar 10 vegades la població de cèl·lules T CD4⁺ IFN- γ ⁺ específiques per PPD, mentre que solament RUTI aconseguia augmentar també la població de cèl·lules T CD8⁺ IFN- γ ⁺. Encara no coneixem el mecanisme mitjançant el qual la vacuna RUTI augmenta aquesta població de limfòcits, però el seu alliberament mitjançant liposomes podria ser la clau en aquest procés. Pensem que una part important dels antigens micobacterians de la vacuna podrien ser presentats per MHC de classe I, afavorint la resposta per part de limfòcits T CD8 (156).

Sens dubte, la part més complexa en la recerca de noves vacunes contra la ITBL és la manca d'un mètode per correlacionar l'efectivitat de les vacunes en models animals i en l'home. Per tant, la limitació més important que presenta aquest treball és el fet que ha estat desenvolupat en models animals. La qual cosa implica que les dades han de ser traslladades al model humà amb molta precaució. Per poder imitar realment què passa en els humans hem fet servir un model murí d'infecció crònica, que presenta necrosi intragranulomatosa. Així com, un model de conill porquí que supera les limitacions de "tolerància" que s'observen en el ratolí. Amb la mateixa finalitat, hem portat a terme estudis amb cabres, i estem posant a punt un model d'infecció en minipigs. Els estudis inicials ens mostren resultats molt similars als obtinguts amb els models de menor tamany, un clar efecte protector de RUTI, amb total absència de toxicitat.

5 CONCLUSIONS

Les conclusions més remarcables que poden ser extretes dels estudis que presentem es poden resumir com segueix:

- 1) La necrosi intragranulomatosa dels granulomes pulmonars és independent del grau de resistència contra la infecció per *M.tuberculosis* en el model murí “humanitzat”.
- 2) La inducció de la necrosi intragranulomatosa, que té lloc en les fases inicials de la infecció, es basa en la reacció d’Schwartzman.
- 3) La immunoteràpia amb RUTI posterior a la quimioteràpia de curta duració genera una resposta immune poliantigènica dirigida contra antígens relacionats amb les fases de multiplicació i de latència del bacil, que expliquen la seva activitat bactericida contra els bacils latents i la seva capacitat per controlar-ne la reactivació.
- 4) La immunoteràpia amb anticossos policlonals contra *M.tuberculosis* protegeix contra la reactivació bacil·lar que té lloc en la infecció tuberculosa en el model murí SCID.

6 BIBLIOGRAFIA

- 1. Global Tuberculosis control – surveillance, planning, financing.** Global Tuberculosis control report 2003. Geneva, World Health Organization, 2007. WHO/CDS/TB/2003.316
- 2. Global Tuberculosis control – surveillance, planning, financing.** Global Tuberculosis control report 2007. Geneva, World Health Organization, 2007. WHO/HTM/TB/2007.376
- 3. Báguena Cervellera MJ.** La TB i la seva història. Fundació Uriach 1838. Col.lecció Històrica de Ciències de la Salut.
- 4. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V.** Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoSPathogens 2005;**1**(1):55-61
- 5. Zink A.R., Grabner W., Reischl U., Wolf H. and Nerlich A.G.** Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol. Infect.* 2003;**130**:239-49
- 6. Ploss H, Bartels M, Bartels P.** Das Weib in der Natur und Völkerkunde. Anthropologische Studien. Leipzig 1908
- 7. Ploss H, Bartels M, Bartels P.** Das Weib in der Natur und Völkerkunde. Neu hgg. und bearbeitet von Freiherr und von Reitzenstein. 1-3. Berlin 1927

8. **Formicola V, Milanesi Q, Scarsini C.** Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millenium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy). *Am J Phys Anthropol* 1987;**72**:1-6
9. **Canci A, Minozzi S, Tarli SMB.** New evidence of tuberculosis spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). *Int J Osteoarcheol* 1996;**6**:497-501
10. **Aufderheide AC, Rodriguez-Martín C.** Tuberculosis. 1998. In: *The Cambridge encyclopedia of human paleopathology*, pp. 118-140. Cambridge: Cambridge University Press.
11. **Taylor GM, Young D, Mays S.** Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:2236-40
12. **Gómez i Prat J, Mendonça de Souza SMF.** Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;**98**:151-9
13. **Daniel TM.** The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out ? *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;**4**:395-400
14. **Bloom BR, Murray CJL.** Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992;**257**:1055-64
15. **Ruggiero D.** A glimpse at the colourful history of tuberculosis: its toll and its effect on the US and the World. 2000. In: *TB Notes*, pp. 1-7. Edited by Centers for Diseases Control and Prevention
16. **Dubos R, Dubos J.** *The White Plague: Tuberculosis, man and society*. 1996. New Brunswick: 3rd Ed. Rutgers University Press

-
- 17. Brock TD.** Robert Koch, a life in medicine and bacteriology. 1999. Washington: ASM Press
- 18. Murray JF.** *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption. From discovery to fact. Am J Respir Crit Care Med 2004;**169**:1086-8
- 19. Cardona PJ.** Robert Koch tenía razón. Hacia una nueva interpretación de la terapia con tuberculina. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006;**24(6)**:385-91
- 20. Daniel TM.** The history of tuberculosis. Resp Med 2006;**100(11)**:1862-70
- 21. Kaufmann SHE.** A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. Tuberculosis 2003;**83**:86-90
- 22. Pottenger FM.** Tuberculin in diagnosis and treatment. C. V. Mosby Company, St. Louis 1913.
- 23. Pottenger FM.** Tuberculosis in child and the adult. C. V. Mosby Company, St. Louis 1934.
- 24. Darier A.** Vacunas Sueros y Fermentos. Mariano Roig S. Barcelona 1918.
- 25. Dunnill M.** The plato of Praed Street. The life and times of Almroth Wright. The Royal Society of Medicine Press Ltd. London 2000.
- 26. British Medical Research Council.** The prevention of streptomycin resistance by combined chemotherapy. British Medical Journal, 1952. pp. 1157-1162

-
- 27. Andersen P, Doherty TM.** The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005;**3**:656-62
- 28. Espinal MA.** The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* 2003;**83**:44-51
- 29. What is DOTS? A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy known as DOTS.** Geneva, World Health Organization, 1999. WHO/CDS/CPC/ TB/99.270
- 30. Kochi A.** The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;**72**:1-6
- 31. WHO Tuberculosis programme: Framework for effective Tuberculosis control.** Geneva, World Health Organization, 1994. WHO/TB/94.179
- 32. STOP TB. Communicable disease.** An expanded DOTs: A framework for effective tuberculosis control. Geneva, World Health Organization, 2002. WHO/CDS/TB/2002.297
- 33. Global Plan to Stop Tuberculosis.** The global plan to stop TB (2006-2015). Geneva, World Health Organization, 2006. WHO/HTM/STB/ 2006.35
- 34. American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention.** Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**,(suppl): S221-S247

-
- 35. Rothel JS, Andersen P.** Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent?. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;**3**:981-93
- 36. Mason CA, Egli T.** Dynamics of microbial growth in the decelerating and stationary phase of batch culture. 1993. In: Kjelleberg S, ed. *Starvation in bacteria*, pp. 81-102. Edited by New York: Plenum Press
- 37. Hengge-Aronis R.** Role of rpoS in early stationary-phase gene regulation in *Escherichia coli* K12. 1993. In: Kjelleberg S, ed. *Starvation in bacteria*, pp. 171-200. Edited by New York: Plenum Press
- 38. Cole ST et al.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;**393**:537-44
- 39. Fox W, Ellard GA, Mitchinson DA.** Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;**3**,(suppl):S231-79
- 40. Mitchinson DA, Dickinson JM.** Bactericidal mechanisms in short-course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc* 1978;**53**:254-9
- 41. Mitchinson DA.** Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1979;**76**,(suppl):771S-775S
- 42. Mitchinson DA.** The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle* 1985;**66**:219-25

- 43. Corper HJ, Cohn ML.** The viability and virulence of old cultures of tubercle bacilli: studies on twelve-year broth cultures maintained at incubator temperature. *Am Rev Tuberc* 1933;**28**:856-874
- 44. Canetti G.** Exogenous reinfection: its relative impact with regard to development of pulmonary tuberculosis. A study of the pathology. *Tubercle* 1950;**31**:224-33
- 45. Opie EL, Aronson JD.** Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions in lung tissue without tuberculous lesions. *Arch Pathol* 1927;**4**:121
- 46. Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov, Mukamolova GV, Young M, Kell DB, Kaprelyants,AS.** Formation and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged station. *Microbiology* 2002;**148**(5):1581-92
- 47. Wayne LG.** Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am Rev Respir Dis* 1976;**114**:807-11
- 48. Wayne LG.** Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur L Clin Microbiol Infec Dis* 1994;**13**:908-14
- 49. Wayne LG. Lin KY.** Glyoxilate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infec Immun* 1982;**37**:1042-49
- 50. McKinney JD et al.** Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxilate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000;**406**:735-8

- 51. Mochizuki M.** Kinetics of oxygen and carbon dioxide reactions. 1991. In:Crystal RG, West JB et al., pp. 1241-52. Edited by New York: Raven Press Ltd
- 52. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM.** Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993;**178**:2243-7
- 53. Gil O, Guirado E, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V, Cardona PJ.** Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is not related to the induction of protective immunity. *Microbes Infect* 2006;**8**(3):628-36
- 54. Wallace JG.** The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice . *Am Rev Respir Dis* 1961;**83**:866-71
- 55. Muñoz-Elias EJ, Timm J, Botha T, Chan WT, Gomez JE, McKinney JD.** Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *IAI* 2005;**73**(1):546-51
- 56. Cardona PJ.** New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Inflammation & Allergy – Drug targets* 2006;**6**:27-39
- 57. Lurie MB.** The correlation between the histological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. *JEM* 1932;**55**:31-58
- 58. Lurie MB, Abramson S, Heppleston AG.** 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. *JEM* 1952;**95**:119-37

- 59. Allison MJ, Zappasodi P, Lurie MB.** Host-parasite relationship in natively resistant and susceptible rabbit on quantitative inhalation of tubercle bacilli. Their significance for the nature of genetic resistance. *Am Rev Respir Dis* 1962;**85**:553-69
- 60. Lurie MB.** Resistance to tuberculosis: experimental studies in native and acquired defensive mechanisms. 1964. Cambridge, Massachusetts. Edited by Harvard University Press
- 61. Rojas-Espinosa O, Dannenberg AM Jr, Sternberger LA, Tsuda T.** The role of cathepsin D in the pathogenesis of tuberculosis. *Am J Pathol* 1974;**74**:1-17
- 62. Dannenberg AM Jr.** Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* 1989;**(suppl 2)**:269-378
- 63. Dannenberg AM Jr.** Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991;**12**:228-33
- 64. Dannenberg AM Jr.** Rabbit model of tuberculosis. 1994. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*, pp 149-56. Edited by Washington DC: American Society for Microbiology
- 65. Dannenberg AM Jr, Rook GAW.** Pathogenesis of pulmonary tuberculosis and interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. 1994. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*, pp 459-83. Edited by Washington DC: American Society for Microbiology
- 66. Converse PJ et al.** Cavitory tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. *IAI* 1996;**64**:4776-78

- 67. Smith DW.** Diseases in guinea pig. 1984. In: Kubica GP, Wayne LG, editors. The mycobacteria: a source book, pp 925-46. Edited by New York: Marcel Dekker
- 68. Bothamley GH, Grange JM.** The Koch phenomenon and delayed hypersensitivity. *Tubercle* 1991;**72**:7-11
- 69. Cardona PJ.** RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis* 2006;**26**:273-89
- 70. McCune RM, Feldmann FM, Harold PL, McDermott W.** Microbial persistence: I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *JEM* 1966;**123**:445-68
- 71. McCune RM, Feldmann FM, McDermott W.** Microbial persistence: II. Characteristics of the sterile state of tubercle bacilli. *JEM* 1966;**123**:469-86
- 72. Orme IM.** Immunity to mycobacteria. 1995. In Austin: RG. Edited by Landes Company
- 73. Orme IM, Collins FM.** Mouse model of tuberculosis. 1994. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control, Vol **8**, pp 113-34. Edited by Washington DC: American Society for Microbiology
- 74. North RJ.** The action of cortisone acetate on cell-mediated immunity to infection. Suppression of host cell proliferation and alteration of cellular composition of infective foci. *J Exp Med* 1971;**134**:1485-1500

- 75. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR.** Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992;**175**:1111-22
- 76. Laochumroonvorapong P, Paul S, Manca C, Freedman VH, Kaplsn G.** Mycobacterial growth and sensitivity to H₂O₂ killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* 1997;**65**:4850-57
- 77. D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM.** An anti-inflammatory role for $\gamma\delta$ T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997;**158**:1217-21
- 78. Orme IM, McMurray DN.** The immune response to tuberculosis in animal models. 1996. In: Rom WN, Garay SM editors, Vol **22**, pp 269-80. Edited by Tuberculosis, Boston: Little, Brown and Company
- 79. Scott P.** IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 1993; **260**:496-98
- 80. Griffin JP, Orme IM.** Evolution of CD4 T cell subsets in naive and memory immune mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1994;**62**:1683-90
- 81. Orme IM.** Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1988;**140**:3589-93
- 82. Johnson CM, Cooper AM, Frank AA, Orme IM.** Adequate expression of protective immunity in the absence of granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infected mice with a disruption in the intracellular adhesion molecule 1 gene. *Infect Immun* 1998;**66**:1666-70

- 83. Pais TF, Silva RA, Smedegaard B, Appelberg R, Andersen P.** Analysis of T cells recruited during delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) versus LPS-inoculation with tuberculosis infection. *Immunology* 1998;**95**:119-37
- 84. Cardona PJ, Llatjós R, Gordillo S, Díaz J, Ojanguren I, Ariza A, Ausina V.** Evolution granulomas in mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scan J Immunol* 2000;**52**:156-63
- 85. Cardona PJ, Ausina V.** Histopathology of tuberculosis. Approximation to the clinical course of lung lesions in animal experimentation models induced with aerosols. *Arch Bronconeumol* 2000;**36**:645-50.
- 86. Katzenstein AA, Askin FB.** Surgical pathology of non-neoplastic lung disease. 1990. In: Philadelphia, Saunders WB
- 87. Grenn GM, Burlington VT.** Alveolobronchiolar transport mechanisms. *Arch Intern Med* 1973;**131**:109-14
- 88. North RJ.** *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J Infect Dis* 1995;**172**:2550-53
- 89. Cardona PJ, Cooper A, Luquin M, Ariza A, Filipino F, Orme IM, Ausina V.** The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity. *Scand J Immunol* 1999;**49**:362-366
- 90. Grange JM.** Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. 1998. In: Davies PDO, pp 113-27. Edited by Clinical Tuberculosis. Chapman & Hall, London

- 91. Farhi DC, Mason UG 3rd, Horsburgh CR Jr.** Pathologic findings in disseminated *Mycobacterium avium* intracellular infection. A report of 11 cases. Am J Clin Pathol 1986;**85**:67-72
- 92. Lefford MJ.** Diseases in mice and rats. 1984. In: Kubica GP, Wayne LG editors, pp 947-77. Edited by The Mycobacteria: a source book. New York: Marcel Dekker Inc
- 93. Smith DW.** Diseases in guinea pig. 1984. In: Kubica GP, Wayne LG editors, pp 925-46. Edited by The Mycobacteria: a source book. New York: Marcel Dekker Inc
- 94. Comstock GW, Edwards LB, Philip RN, Winn WA.** A comparison in the United States of America of tuberculins PPD and RT23. WHO Bull 1964;**31**:2.45
- 95. Mestas J, Hughes CCW.** Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. JI 2004;**172**:2731-8
- 96. Cardona PJ, Llatjós R, Gordillo S, Diaz J, Viñado B, Ariza A, Ausina V.** Towards a 'human-like' model of tuberculosis: intranasal inoculation of LPS induces intragranulomatous lung necrosis in mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol 2001;53:65-71.
- 97. Koch R.** Witere Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberculose. Dtsch Med Wochenschr 1891;171:**101**-102
- 98. Von Pirquet C.** Demonstration zur Tuberculindiagnose durch Hautimpfung. Berl Klin Wochenschr 1909;**481**:699

- 99. Coombs RRA, Gell PGH.** Classification of allergic reactions responsible for hypersensitivity and disease. 1975. In: Gell PGH, Coombs RRA editors. *Clinical Aspects of Immunology*, pp 761-81. Edited by Oxford: Blackwell
- 100. Janeway CA, Travers P.** Immunobiology. The immune system in health and disease. 1997. Edited by Londres/New York: Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc
- 101. Lucas S, Nelson AM.** Pathogenesis of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected people. 1994. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*, Vol **29**, pp 503-13. Edited by Washington DC: American Society for Microbiology
- 102. Rook GAW, Al Attiyah R.** Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle* 1991;**72**:13-20
- 103. Swartzman G.** Phenomenon of local tissue reactivity and its immunological, pathological and clinical significance. 1937. In New York: Hoeber PB, chapter IV. Edited by Medical Book Department of Harper & Brothers
- 104. Roach TIA, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM.** Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes *c-fos*, *KC*, *JE* and *tumor necrosis factor- α* . *J Immunol* 1993;**150**:1886-96
- 105. Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;**320**:365-76

- 106. Gonçalves de Moraes VL, Singer M, Vargaftig BB, Chignard M.** Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br J Pharmacol* 1998;**123**:631-6
- 107. Cardona PJ, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Amat I, Pallarés A, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V.** Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *IAI* 2003;**71**:5845-54
- 108. Guirado E, Gordillo S, Gil O, Díaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ausina V, Cardona PJ.** Intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol. *Int J Exp Pathol* 2006;**87**:139-49
- 109. Comstock GW.** How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;**3**:847-50
- 110. Jindani A, Dore CJ, Mitchinson DA.** Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**167**:1348-54
- 111. Ulrichs T, Kaufmann SH.** New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006;**208**:261-9
- 112. Barry CE 3rd.** Preclinical candidates and targets for tuberculosis therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;**2**:198-201

- 113. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI.** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;**307**:1915-20
- 114. Rooney SA, Young S, Mendelson CR.** Molecular and cellular processing of lung surfactant. *Faseb J* 1994;**8**:957-67
- 115. Gomes MS, Paul S, Moreira AL, Appelberg R, Rabinovitch M, Kaplan G.** Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. *IAI* 1999;**67**:3199-206
- 116. Boros DL.** The cellular immunological aspects of the granulomatous response. 2003. In: Boros DL editor. Granulomatous infections and inflammations. Cellular and molecular mechanisms, vol 1, pp 1-20. Edited by Washington DC: ASM Press
- 117. Andersen P.** Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scan J Immunol* 1997;**45**:115-31
- 118. Roth P, Celada A, Cruchaud A.** Evaluation of human monocyte function in vitro. *Ann Immunol* 1979;**130C**:611-20
- 119. Ordway D, Henaio-Tamayo M, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M.** Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF- receptor-associated factor family. *J Immunol* 2005;**175**:3873-81

- 120. Strickland D, Kees UR, Holt PG.** Regulation of T-cell activation in the lung: alveolar macrophages induce reversible T-cell anergy in vitro associated with inhibition of interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunolgy* 1996;**87**:250-8
- 121. Bui TD, Dabdub D, George SC.** Modeling bronchial circulation with application to soluble gas exchange: description and sensitivity analysis. *J Appl Physiol* 1998;**84**:2070-88
- 122. Cardona PJ, Ruiz-Manzano J.** On the nature of *Mycobacterium tuberculosis* latent bacilli. *Eur Respir J* 2004;**24**:1044-51
- 123. Perez-Padilla R, Franco-Marina F.** Impact of altitude on mortality from tuberculosis and pneumonia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;**8**:1315-20
- 124. Vargas MH, Furuya ME, Pérez-Guzmán C.** Effect of altitude on the frequency of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;**8**:1321-4
- 125. Cardona PJ, Julián E, Vallés X, Gordillo S, Muñoz M, Luquín M, Ausina V.** Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. *Scand J Immunol* 2002;**55**:639-45
- 126. Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, Vilaplana C, Tapia G, Ausina V.** Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* 2005;**23**:1393-98
- 127. Orme IM, Andersen P, Boom WH.** T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993;**167**:1481-97

- 128. Peters AC, Wimpenny JW, Coombs JP.** Oxygen profiles in and in the agar beneath colonies of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus* and *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 1987;**133**:1257-63
- 129. Robinson TP, Wimpenny JW, Earnshaw RG.** pH gradients through colonies of *Bacillus cereus* and surrounding agar. J Gen Microbiol 1991;**137**:2885-9
- 130. Leserman L.** Liposomes as protein carriers in immunology. J Liposoma Res 2004;**14**:175-89
- 131. Larson CL, Bell JF, Ribí E, Witch WC.** Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties II host-reactive properties of cell walls and protoplasm from mycobacteria. Bacteriol Rev 1963;**27**:341-51
- 132. Moreira AL et al.** Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis* infected mice . IAI 2002;**70**:2100-7
- 133. Taylor JL, Ordway DJ, Troudt J, Gonzalez-Juarrero M, Basabara RJ, Orme IM.** Factors associated with severe granulomatous pneumonia in *Mycobacterium tuberculosis* infected mice vaccinated with therapeutically with hsp65 DNA. IAI 2005;**73**:5189-93
- 134. Brennan PJ.** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003;**83**:91-7
- 135. Rook GA, Hernández-Pando R, Dheda K, Teng Seah G.** IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. Trends Immunol 2004;**25**:483-88

- 136. Mattner F et al.** Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. Eur J Immunol 1996;**26**:1553-59
- 137. Mills CD, Kincaid K Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-2/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol 2000;**164**:6166-73
- 138. Hernández-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G.** Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. IAI 1997;**65**:3317-27
- 139. North RJ, Jung YJ.** Immunity to tuberculosis. Annu Rev Immunol 2004;**22**:599-623
- 140. Medina E, North RJ.** Resistance rankine of some comon increat mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp-1 genotype. Immunology 1998;**93**:271-4
- 141. Cardona PJ, Gordillo S, Amat I, Díaz J, Lonca J, Vilaplana C, Pallarés A, Llatjós R, Ariza A, Ausina V.** Catalase-peroxidase activity has no influence on virulence in a murine model of tuberculosis. Tuberculosis 2003;**83**:351-59
- 142. Andersen P, Askgaard D, Ljunqvist L, Bentzon MW, Heron I.** T-cell proliferative response to antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. IAI 1991;**59**:1558-63
- 143. Power CA, Wei G, Bretscher PA.** Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous, or intradermal route. IAI 1998;**66**:5743-50

- 144. Gruppo V, Orme IM.** Dose of BCG does not influence the efficient generation of protective immunity in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2002;**82**:267-73
- 145. Hernández-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V.** Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997;**90**:607-17
- 146. Karplus TE, Ulevitch RJ, Wilson CB.** A new method for reduction of endotoxin contaminations from protein solutions. *J Immunol Methods* 1987;**105**:211-20
- 147. Holt PG, Stumbles PA, McWilliam AS.** Functional studies on dendritic cells in the respiratory tract and related mucosal tissues. *JLeukBio* 1999;**66**:272-5
- 148. Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Marietta P, Brooks JV, Orme IM.** Temporal and spatial arrangements of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *IAI* 2001;**69**:1722-28
- 149. Winslow GM, Yager E, Shilo K, Volk E, Reilly A, Chu FK.** Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Erichia chaffeensis* during active infection. *IAI* 2000;**68**:2187-95
- 150. Edelson BT, Cossart P, Unanue ER.** Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J Immunol* 1999;**163**:4087-90

- 151. Pereira Arias-Bouda LM, Kuijper S, Van Der Werf A, Nguyen LN, Jansen HM, Kolk AHJ.** Changes in avidity and level of immunoglobulin G antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in sera of patients undergoing treatment for pulmonary tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2003;**20**:702-9
- 152. Bothamptey GH.** Epitope-specific antibody levels demonstrate recognition of new epitopes and changes in titer but not affinity during treatment of tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2004;**11**:942-51
- 153. Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schröder U, Källenius G, Svenson SB.** A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab')₂ fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Exp Immunol 2004;**138**:30-38.
- 154. Turner J, Rhoades ER, Keen M, Belisle JT, Frank AA, Orme IM.** Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. Infect Immun 2000;**68**:1706-9
- 155. Van Pinxteren LAH, Cassidy P, Smedegaard BHC, Agger EM, Andersen P.** Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on CD8 T cells. Eur J Immunol 2000;**30**:3689-98
- 156. Altin JG, Parish CR.** Liposomal vaccines targeting the delivery of antigen. Methods 2006;**40**(1):39-52.

7 COMPENDI D'ARTICLES

Guirado E, Gordillo S, Gil O, Díaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ausina V, Cardona PJ. **Intrgranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol.** International Journal of Experimental Pathology 2006;**87**:139-49

Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, **Guirado E**, Díaz J, Vilaplana C, Tapia G, Ausina V. **Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis.** Vaccine 2005;**23**:1393-98

Guirado E, Amat I, Gil O, Díaz J, Arcos V, Caceres N, Ausina V, Cardona PJ. **Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice.** Microbes and Infection 2006;**8**:1252-9

ORIGINAL ARTICLE

Intrgranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol

Evelyn Guirado*, Sergi Gordillo*, Olga Gil*, Jorge Diaz*, Gustavo Tapia[†], Cristina Vilaplana*, Vicenc Ausina* and Pere-Joan Cardona*

*Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundacio Institut per a la Investigacio en Cie`ncies de la Salut Germans Trias i Pujol and Universitat Auto`noma de Barcelona, Catalonia, Spain and [†]Department of Pathology, Fundacio Institut per a la Investigacio en Cie`ncies de la Salut Germans Trias i Pujol and Universitat Auto`noma de Barcelona, Catalonia, Spain

INTERNATIONAL
JOURNAL OF
EXPERIMENTAL
PATHOLOGY

Summary

Intrgranulomatous necrosis is a primary feature in the natural history of human tuberculosis (TB). Unfortunately, this phenomenon is not usually seen in the experimental TB murine model. Artificial induction of this necrosis in pulmonary granulomas (INPG) may be achieved through aerosol inoculation of lipopolysaccharide (LPS) 3 weeks after *Mycobacterium tuberculosis* infection. At week 9 post-infection, the centre of primary granulomas became larger, showing eosinophilic necrosis. Interestingly, INPG induction was related to mice strains C57BL/6 and 129/Sv, but not to BALB/c and DBA/2. Furthermore, the same pattern was obtained with the induction of infection using a clinical *M. tuberculosis* strain (UTE 0335R) that naturally induces INPG. In all the mice strains tested, the study of pulmonary mRNA expression revealed a tendency to increase or to maintain the expression of RANTES, interferon-g, tumour necrosis factor and iNOS, in both LPS- and UTE 0335R-induced INPG, thus suggesting that this response must be necessary but not sufficient for inducing INPG. Our work supports that INPG induction is a local phenomenon unrelated to the resistant (C57BL/6 and BALB/c) or susceptible (129/Sv and DBA/2) background of mice strains against *M. tuberculosis* infection.

Keywords

intrgranulomatous necrosis, Koch's reaction, murine model, *Mycobacterium tuberculosis*, Shwartzman reaction

Received for publication:
15 September 2005
Accepted for publication:
30 December 2005

Correspondence:

Pere-Joan Cardona, MD, PhD, Unitat de Tuberculosi Experimental Department of Microbiology Hospital Universitari 'Germans Trias i Pujol' Crta del Canyet s/n 08916 Badalona Catalonia Spain
Tel.: +34 93 497 8894 Fax: +34 93 497 8895 E-mail: pcardona@ns.hugtip.scs.es

Intrgranulomatous necrosis in pulmonary granulomas (INPG) is a characteristic feature in lesions induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection in humans. These lesions are well structured, with a macrophage-based ring surrounding INPG and an outer lymphocyte-based layer well

limited by a fibrotic container (Grange 1998). This is basic in the natural history of TB, because INPG is an important source of latent bacilli (Gomez & McKinney 2004). The difficulty in finding a successful short-course chemotherapy (Mitchison & Dickinson 1978) to control both TB and latent

TB infection (as well as the 8000,000 annual incidental new cases and prevailing 2,000,000,000 infected people, respectively) lies in the presence of these bacilli (World Health Organization 2001). Unfortunately, the most commonly used experimental model of tuberculosis (TB) does not show INPG. At the most, similar lesions (named primary granulomas) (Cardona et al. 2000) with a macrophage-based centre surrounded by lymphocytes may be seen in the murine model of TB. After a few weeks, these lesions are also surrounded by a mantle of foamy macrophages profusely filling alveolar spaces immediately related to the granuloma.

A few years ago, our group described a technique to induce INPG in the murine model based on old data obtained with the experimental TB model in rabbits (Lurie 1932). As other authors did before (Rook & al Attiyah 1991), we supported the hypothesis that the origin of INPG was related to the Shwartzman reaction (Shwartzman 1937). This reaction was originally described as a local skin reaction triggered by an intradermal injection of endotoxin (preparatory injection), followed 24 h later by an intravenous injection (provoking injection). Approximately, 4 h later, a haemorrhagic skin necrosis developed at the intradermal injection site (Shwartzman 1937). In this regard, tumour necrosis factor (TNF) secreted by locally activated macrophages would cause haemorrhagic necrosis in mycobacteria-infected tissues reacting as a 'prepared site'. Indeed, intranasal inoculation of lipopolysaccharide (LPS) 3 weeks after *M. tuberculosis* infection induced INPG in primary granulomas of mice, thus providing a kind of 'human-like' model of TB (Cardona et al. 2001). In this model, LPS inoculation caused the infiltration of lung parenchyma with neutrophils (PMNs) after 24 h. Necrosis could only be detected in primary granulomas at week 3 after LPS inoculation, when the presence of eosinophilic necrosis became apparent in the centre of the granulomas. At week 6 post-LPS inoculation, necrosis extended and presented a compact caseous consistency made by collagen (Cardona et al. 2001). However, this model was also associated with a high mortality rate in mice.

Further experiments showed the convenience of aerosol LPS inoculation to induce the same effects without such a high mortality rate. Searching for a model of 'human TB disease', and thus combining induction of INPG with spontaneous reactivation, resulted in new experiments with a susceptible mice strain, such as DBA/2 (Medina & North 1998). The outcome was clear after tests had been conducted using both intranasal and aerosol LPS inoculation: no INPG was induced in either case, and thus additional experiments were carried out with new mice strains. BALB/c and 129/Sv strains were chosen to search for strains that shared the same H-2 background but also had different susceptibility to *M. tuberculosis*

infection, defined on the survival time after infection (Medina & North 1998).

The aim of this work was to obtain more extensive data on this 'human-like' model and the origin of intragranulomatous necrosis in TB; hence, we used different common inbred mouse strains with different resistance degrees against *M. tuberculosis* infection to test a more refined and equally effective model in which LPS mortality may be avoided using an aerosol instead of an intranasal LPS inoculation. INPG was not induced in all strains, appearing in H-2^b mice strains (e.g. C57BL/6 and 129/Sv), but not in H-2^d strains (e.g. BALB/c and DBA/2). Interestingly, this phenomenon was not related to the resistant (C57BL/6 and BALB/c) or susceptible (129/Sv and DBA/2) background of mice strains against *M. tuberculosis* infection (Medina & North 1998). The association between LPS inoculation and INPG was demonstrated by its induction in C3H/HeN mice, but not in LPS-resistant C3H/HeJ mice. Furthermore, the accidental finding of clinical *M. tuberculosis* strains that spontaneously induce INPG (Cardona et al. 2003) has led to similar histopathological findings. These data support the hypothesis of a Shwartzman reaction-like response as the origin of INPG in the experimental murine TB models of infection probably linked to the 'provoking' action of endotoxin-like molecules of the *M. tuberculosis* cell wall, like cord-factor. Finally, our data suggest that the induction of INPG is not related to the degree of resistance against *M. tuberculosis* infection.

Materials and methods

Mice

Parental inbred specific pathogen-free (spf) female mice, 6–8 weeks old, were obtained from Charles River Laboratories (St Germain sur l'Abresle, France). The parental strains were C57BL/6 (H-2^b), 129/Sv (H-2^b), BALB/c (H-2^d), DBA/2 (H-2^d), C3H/HeJ (H-2^k) and C3H/HeN (H-2^k). They were shipped in adequate travel conditions, with the corresponding certificate of health and origin. All the animals were kept under controlled conditions in a P3 High Security Facility with sterile food and water ad libitum.

Bacteria and infection

M. tuberculosis strains H37Rv NC007416 and UTE 0335R (Cardona et al. 2003a, b) were grown in Proskauer Beck medium containing 0.01% Tween 80 to mid-log phase and stored at -70 °C in 2 ml aliquots. Mice were placed in the exposure chamber of an airborne infection apparatus (Glas-Col Inc., Terre Haute, IN, USA). The nebulizer compartment

was filled with 7 ml of a *M. tuberculosis* suspension at a previously calculated concentration ($2.5 \cdot 10^6$ CFU/ml) to provide an approximate uptake of 20 viable bacilli within the lungs. Four mice were used for every time-point in every experimental group. The numbers of viable bacteria in the left lung and spleen homogenates were followed in weeks 9 and 18 by plating serial dilutions on nutrient Middlebrook 7H11 agar (Biomedics s.l., Madrid, Spain) and counting bacterial colony formation after incubation for 21 days at 37 °C. Special care was taken not to include hilar lymph nodes when removing the left lung so as not to artificially increase colony-forming units (CFU) values. Lungs were immediately removed after euthanasia by means of a halothane overdose (Zeneca Farma, Pontevedra, Spain).

LPS aerosol inoculation

In Experiment B (Figure 1), mice were placed in the exposure chamber of an airborne infection apparatus (Glas-Col Inc.) at week 3 post-infection and submitted for half an hour to the aerosol obtained after filling the nebulizer compartment with 3 ml of distilled water with 100 mg of *Escherichia coli* 0111:B4 LPS (St Louis, MO, USA). Animals were then sacrificed at weeks 9 and 18 post-infection.

Animal health

Mice were weighed once a week. They were supervised every day under a protocol paying attention to weight loss, apparent good health (bristled hair and wounded skin) and behaviour (signs of aggressiveness or isolation). Animals were euthanized with halothane (Fluothane, Zeneca Farma) overdose so as to avoid any suffering. Sentinel animals were used to check spf conditions in the facility. Tests for 25 known mouse pathogens were all negative. All experimental proceedings were approved and supervised by the Animal Care Committee of 'Germans Trias i Pujol' University Hospital in agreement with the European Union Laws for protection of experimental animals.

MRNA quantification

The procedures are described elsewhere (Cardona et al. 2003b). In short, total RNA from the middle right lobe was removed with a commercial phenol-chloroform method, RNAzol (Cinna/Biotecx, Friendswood, TX, USA). After a Dnase treatment with DNA-free kit (Ambion, Woodward Austin, TX USA), a denaturing agarose gel was used to assess the stability of RNA. Five microgram of RNA was reverse transcribed using a Superscript RT kit (Gibco BRL, Grand

Island, NY, USA) following the manufacturer's recommendations to obtain cDNA. The quantitative analysis for interferon-g (IFN-g), RANTES, iNOS and TNF was performed using a LightCycler™ System (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID, USA). A real-time PCR was carried out in glass capillaries to a final volume of 10 µl in the presence of 1 µl of ·10 reaction buffer (Taq Polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBRGreen, Roche Biochemicals), 1 µl of cDNA (or water as negative control, which was always included), MgCl₂ to a final concentration of 2–5 mM, and primers to a final concentration of 0.5 mM were also added. A single peak was obtained for each PCR product by melting the curve analysis, and only one band of the estimated size was observed on the agarose gel. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA expression was analysed for every target sample to normalize for efficiency in cDNA synthesis and RNA loading. A ratio based on the HPRT mRNA expression was obtained for each sample.

Histology and morphometry

Procedures have been described in previous works (Cardona et al. 2003b). Briefly, two right lung lobes from each mouse were fixed in buffered formalin and subsequently embedded in paraffin. Every sample was stained with haematoxylin and eosin (H&E). For histometry, 5mm thick sections from each specimen were stained with H&E and photographed at ·6 using a Stereoscopic Zoom SMZ800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a Coolpix 990 digital camera (Nikon). Sections of eight lung lobes were studied in each case. A sequence of appropriate software programs was used, SCION IMAGE (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) and PHOTOSHOP 5.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose', CA, USA), to determine the area of each single lesion and the total tissue area on photomicrographs. Sections were blindly evaluated to get a more objective measurement.

Statistical analysis

Sigma Stat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA) was used to compare values. Mann–Whitney Rank Sum Test or Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks and All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student–Newman–Keuls Method) were used to determine the differences among experimental groups when comparisons were done between two groups or more, respectively. Differences were significant when marked with * for $P < 0.05$.

Results

Induction of INPG in pulmonary granulomas at week 9 after aerosol infection

Preliminary data revealed that LPS aerosol inoculation at week 3 post-infection with strain H37Rv caused a profuse PMN infiltration both in the granulomas and in the alveolar spaces after 24 h in all the mice strains tested but C3H/HeJ. Furthermore, this infiltration was not seen in mice infected only with either H37Rv or UTE 0335R strain (data not shown).

The presence of primary granulomas was detected in an average of one out of eight lobes in all the 5 mm sections examined (data not shown), as observed earlier (Cardona et al. 2001).

INPG was described as the presence of an eosinophilic necrosis with a scanty presence of macrophages in H&E staining in the enlarged centre of a primary granuloma. This lesion revealed a profuse presence of collagen as demonstrated by Masson's trichromic staining, thus reflecting scarring of an older necrotic process. The presence of these lesions may be detected at week 9 after infection, as described elsewhere when LPS was administered by intranasal inoculation at week 3 after infection (Cardona et al. 2001).

Figure 2 shows a primary granuloma at week 9 after infection with H37Rv strain both with and without LPS aerosol inoculation in C57BL/6 and 129/Sv mice, demonstrating the presence and the absence of INPG after H&E staining. These lesions may also be induced in C3H/HeN mice, but not in DBA/2, BALB/c and C3H/HeJ mice (pictures not shown).

Figure 3 shows primary granulomas in C57BL/6, C3H/HeN and 129/Sv mice at week 9 after infection with the *M. tuberculosis* clinical strain UTE 0335R (Cardona et al. 2003a), which may naturally induce INPG. In this case, images obtained after Masson's trichromic staining are also shown to demonstrate the presence of collagen in the INPG at this point.

Figure 4 shows the evolution through time of the collagen-based fibrotic tissue from the periphery to the necrotic centre in C57BL/6 mice infected with *M. tuberculosis* clinical strain UTE 0335R, which is also representative to what happens in 129/Sv and C3H/HeN mice strains, and also to the same mice strains after being infected with H37Rv strain and inoculated with LPS aerosol at week 3 post-infection. Trichromic of Masson reveals the progressive occupation of the centre of primary granulomas by a fibrotic tissue. This centre is initially filled by a mixture of monocytes and neutrophils (week 3) and becomes mostly necrotic and occupied by debris,

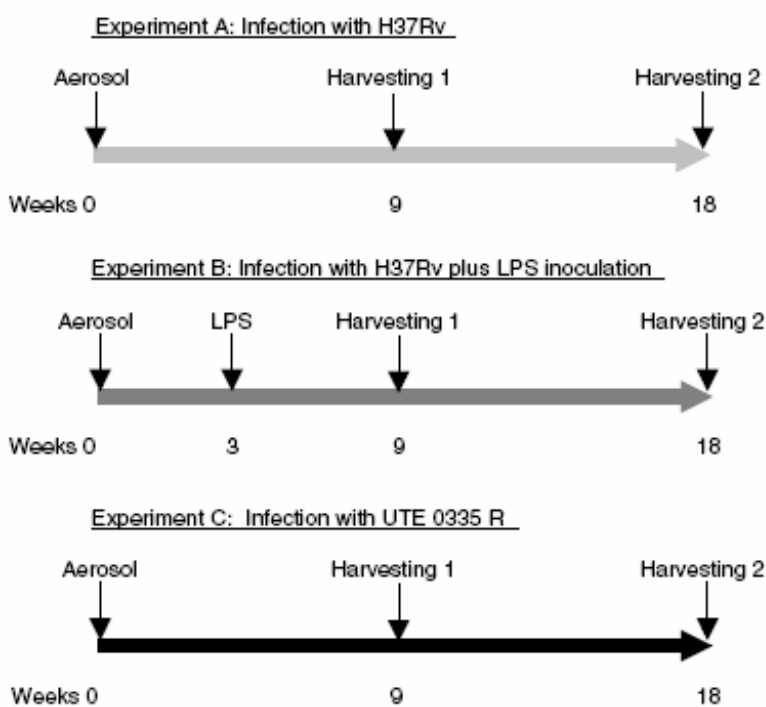


Figure 1 Designs of the experiments conducted in this study. Experiment A is run with mice only infected with H37Rv; Experiment B with mice infected with H37Rv and inoculated with lipopolysaccharide (LPS), and Experiment C with mice infected with UTE 0335R.

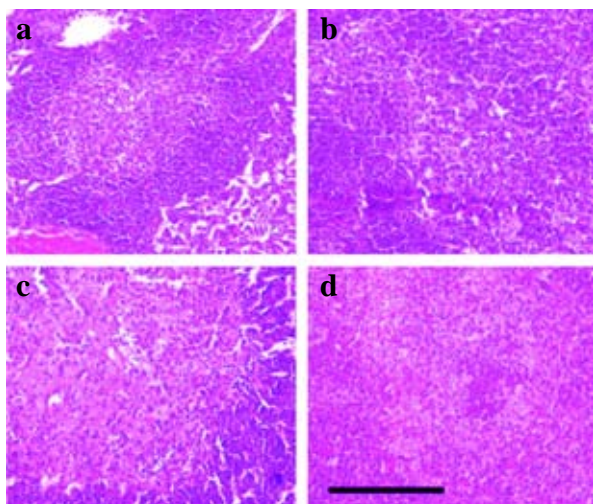


Figure 2 Induction of intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas (INPG) after haematoxylin and eosin stain at week 9 post-infection in mice infected with H37Rv (Experiment B) after LPS inoculation at week 3. INPG was described as the presence of eosinophilic necrosis with a scanty presence of macrophages in the enlarged centre of a primary granuloma. Panels (a) and (b) show C57BL/6 and 129/Sv control mice. Panels (c) and (d) show LPS-inoculated mice, C57BL/6 and 129/Sv, respectively. Bar represents 200 μ m.

karyorrhexis, fibrin and some neutrophils by week 6. At week 9, this centre finally forms a compact eosinophilic scar.

PGIP is not related to the induction of INPG

Figure 5 shows pulmonary granulomatous infiltration percentage (PGIP), which is the ratio obtained by dividing the area of granulomatous infiltration by the total area of the lung section, multiplied by 100. LPS inoculation in H37Rv-infected

mice to strains 129/Sv and DBA/2 caused a significant increase of PGIP compared with those mice non-inoculated with LPS. Furthermore, infection with UTE 0335R generated a significantly higher percentage of infiltration in all strains but C3H/HeN and C3H/HeJ, compared with mice infected with H37Rv and inoculated with LPS.

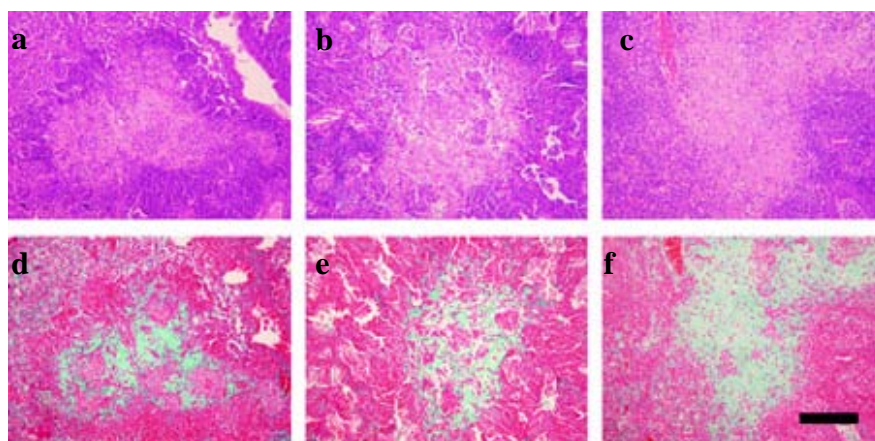
One way analysis on the variance on ranks and all pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls Method) revealed significant differences among all mice strains but except for the comparison of 129/Sv and BALB/c mice in Experiment A. No differences were seen only among 129/Sv, C3H/HeN and C3H/HeJ in Experiment B. In Experiment C, differences were only significant when comparing 129/Sv and C3H/HeJ strains to the other strains.

These data established that infection with H37Rv induces different PGIP values that are not related to the H-2 background, the Th1 or Th2 type or the resistance of the strains against *M. tuberculosis* infection. This trend is also seen in LPS-challenged mice. However, PGIP induced by UTE 0335R seems not to be related to the infected mice strain and shows similar values, except for the significant highest infiltration found in strain 129/Sv. This analysis indicates that the increase in granulomatous infiltration is not related to the induction of INPG.

Inoculation of LPS transiently reduces bacillary concentration in the lungs of H-2 haplotype mice

Bacillary concentration in the lungs and spleen tended to decrease after LPS administration, although these differences were only significant in the lungs of 129/Sv and BALB/c (Figure 6). These differences were not observed when bacillary concentration was assessed at week 18 after infection (data not shown). Interestingly, UTE 0335R-infected mice

Figure 3 Intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas in mice C57B/6 (a, d), C3H/HeN (b, e) and 129/Sv (c, f) induced by the *Mycobacterium tuberculosis* strain UTE 0335R at week 9 post-infection (Experiment C). Panels (a–c) represent cuts stained with haematoxylin and eosin (H&E). Panels (d–f) represent cuts stained with Trichromic of Masson which reveal a profuse presence of collagen (in green) in the enlarged centre of a primary granuloma, where H&E stain shows eosinophilic necrosis. Bar represents 200 μ m.



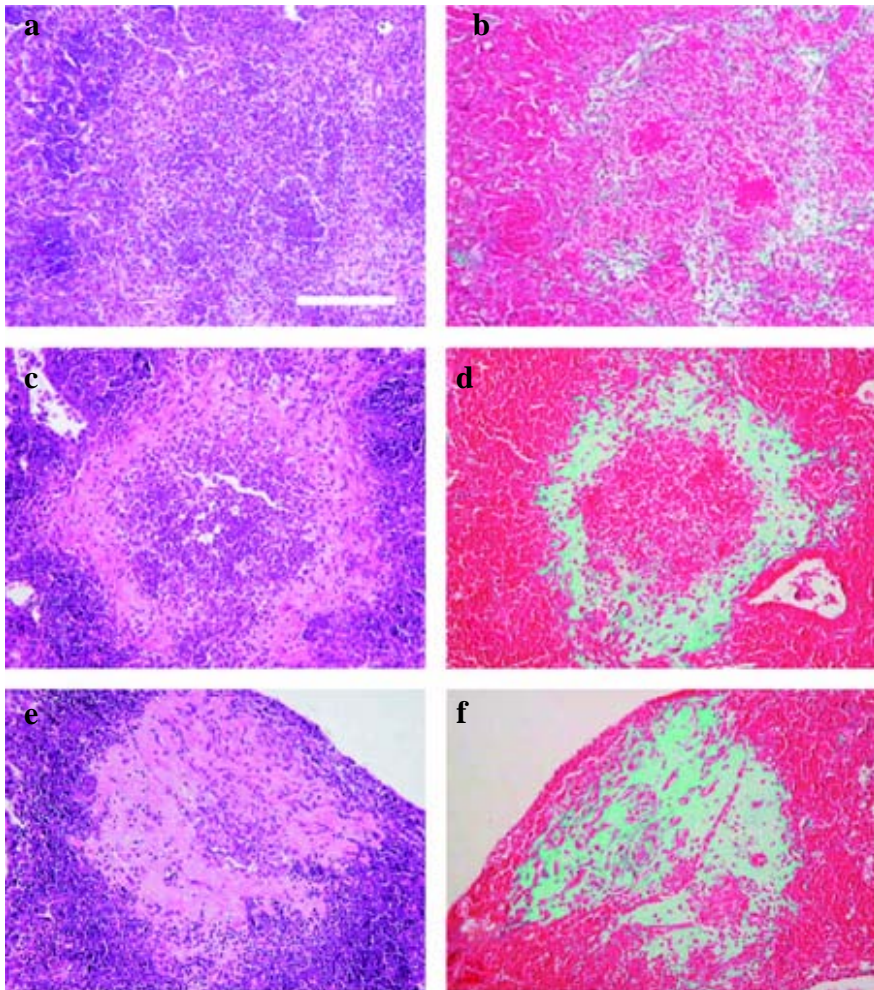


Figure 4 Evolution of intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas (INPG) through time in mice C57B/6 infected by the Mycobacterium tuberculosis strain UTE 0335R at week 3 (a, b), 6 (c, d) and 9 (e, f) post-infection (Experiment C). Panels (a), (c), (e) represent cuts stained with haematoxylin and eosin (H&E). Panels (b), (d), (f) represent cuts stained with Trichrome of Masson which reveals the progression from the periphery to the centre of the collagen-based fibrotic tissue (in green) to occupy the necrotic centre of a primary granuloma. Haematoxylin and eosin stain shows a mixture of monocytes and neutrophils at week 3; a centre occupied by debris, karyorrhexis, fibrin and some neutrophils at week 6 and a compact eosinophilic scar at week 9. Bar represents 100 mm.

tended to show the opposite pattern when comparing with H37Rv-infected mice, but in the case of BALB/c, that showed lower values.

Furthermore, there were almost no significant differences among the values obtained in the same experiment. The only differences were observed in the lungs from Experiment C

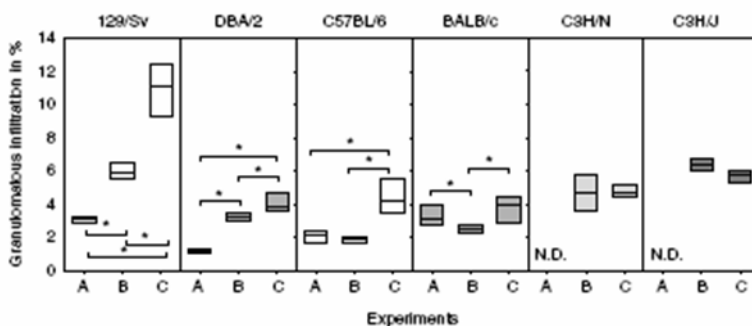


Figure 5 Values of pulmonary granulomatous infiltration percentage (PGIP) in all experiments (A to C). PGIP values were obtained after dividing the area of granulomatous infiltration by the total area of the lobes multiplied by 100. Data are graphed as a box representing statistical values. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, a line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Differences between mice groups were significant when marked with * ($P < 0.05$).

between DBA/2 and the other mice, save for 129/Sv ($P < 0.05$). In the spleen, differences were only significant among strains 129/Sv and DBA/2 in Experiment B ($P < 0.05$).

Expression of mRNA in the lungs

Expression of IFN- γ , RANTES, TNF and iNOS tended to increase in LPS-challenged mice and to be even higher in UTE 0335R-infected mice, when comparing with mice only infected with H37Rv (Figure 7). Usually, mice infected with UTE 0335R present higher expression values than mice infected with H37Rv (LPS-challenged or not). This difference is somewhat correlated with PIPG, although the relation is the opposite in C3H/HeJ, because PIPG is lower. Again, the intensity level of the expression of these parameters has no correlation with the induction of INPG.

Significant differences between the strains in the same experiment group were not found in any on the parameters investigated, save for TNF expression in Experiment B between 129/Sv and C57BL/6 strains ($P < 0.05$).

No expression of IL-4 and IL-10 was detected in any mice strains, either in those infected with H37Rv and challenged or not with LPS or in those infected with UTE 0335R (data not shown).

Aerosol LPS inoculation and infection with UTE 0335R did not affect the animal welfare

Aerosol LPS inoculation and infection with UTE 0335R did not induce any suffering to the animals. End point protocol

was not required in any case. No weight loss or spontaneous mortality was detected in any experimental protocol.

Discussion

This study aimed to improve the 'human-like' model of experimental TB in C57BL/6 mice described elsewhere (Cardona et al. 2001). In this model, INPG may be induced by intranasal LPS inoculation, thus resembling the Shwartzman reaction because TB granuloma would be considered to be a 'prepared zone' due to high levels of TNF (Rook & al Attiyah 1991). In this context, local inoculation of LPS suddenly increased neutrophil count in mice BAL, whereas INPG was first detected at week 6 after infection (3 weeks after intranasal LPS inoculation) and was well structured by week 9 (Cardona et al. 2001). Unfortunately, this procedure resulted in a high mortality rate in mice (up to 20%) and thus required further refining.

We have demonstrated that the induction of INPG is not related to the resistance against *M. tuberculosis* infection. Moreover, this study raises some questions on the mechanism of INPG in human TB, because it has been related to the activity of TNF in a Th2 environment (Rook & al Attiyah 1991; Rook et al. 2004). Our data show that INPG has been associated to C57BL/6 and 129/Sv strains but not to the BALB/c and DBA/2 ones. This is very interesting because several authors suggest that these strains tend to polarize towards Th1 and Th2-type responses, respectively (Mattner et al. 1996; Mills et al. 2000). In this regard, future studies

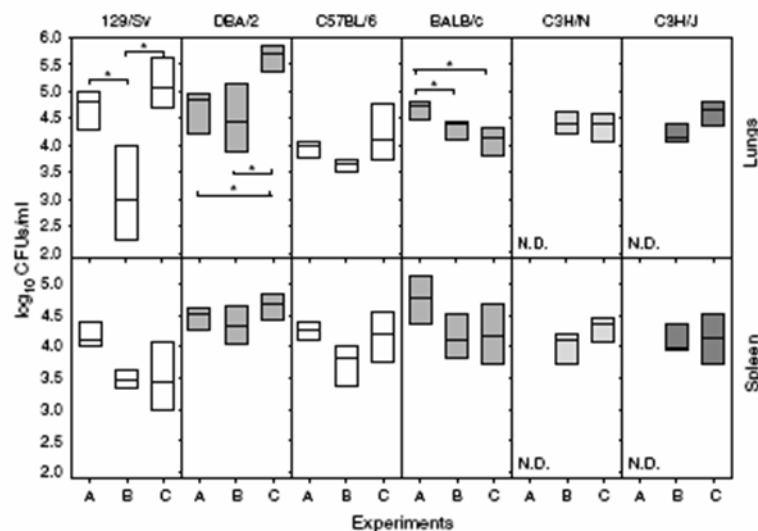


Figure 6 Bacillary concentration in the lungs at week 9 post-infection in all experiments (A to C). Data are graphed as a box representing statistical values. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, a line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Differences between mice groups were significant when marked with * ($P < 0.05$).

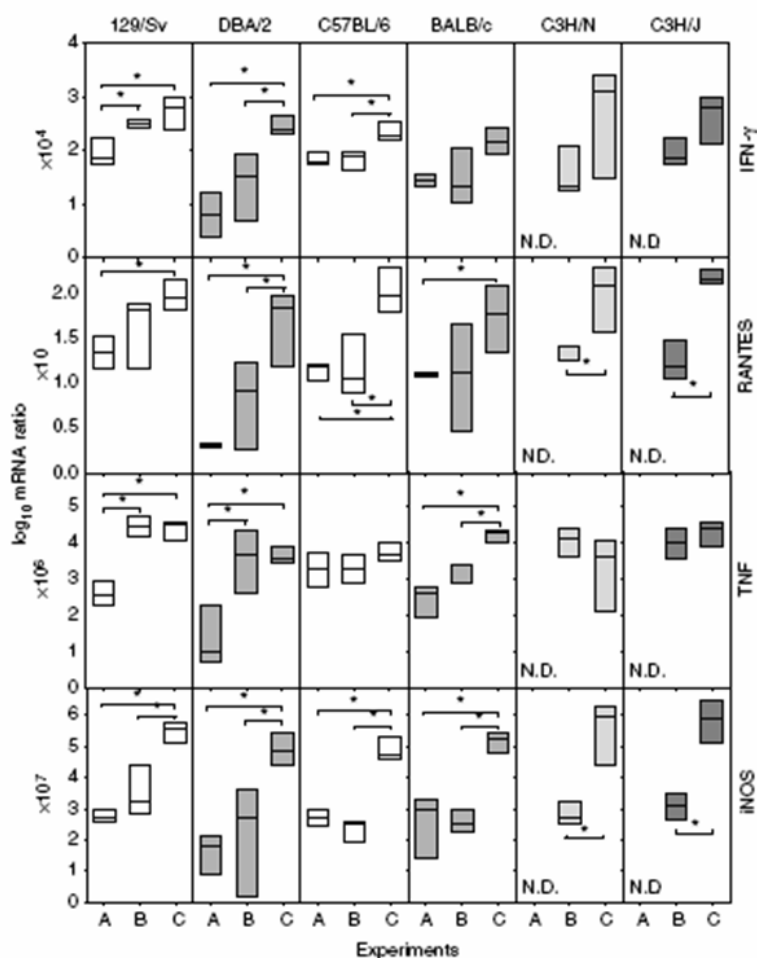


Figure 7 Evolution of mRNA expression of Th1 response related cytokines, TNF and iNOS in the lungs at week 9 post-infection. These are expressed as the \log_{10} of the ratio obtained after dividing every value by the expression of HPRT in each sample and multiplying it by a factor (ranging from 10^4 to 10^7). Data are graphed as a box representing statistical values. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, a line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Differences between mice groups were significant when marked with * ($P < 0.05$).

need to be carried out to further determine whether H-2 background or Th1-Th2 response is responsible for INPG. The experimental model in which the participation of the Th2 response in the necrotic process was demonstrated is completely different from the model presented in this study. Therefore, it is difficult to compare both models. In fact, in this study, we could not produce necrotic granulomas in BALB/c; however, the model in which the influence of IL-4 combined with TNF induced necrosis was actually achieved using this mouse strain (Hernandez-Pando et al. 1996). Besides, that model used a very high infecting dose by intratracheal inoculation, and necrosis was exclusively observed during the progressive phase of infection. Nevertheless, in our model, the infecting dose was very low, and animals developed a very slow progressive disease, with very few

CFU that is usually related with a strong Th1 response and where survival is prolonged for 2 years, instead of half a year. In fact, it is quite difficult to induce an evident Th2 response when the CFU is very low, and the lungs exclusively show granulomas, but not pneumonia. In this regard, it must be stated that the model used by Hernandez-Pando et al. (1996) tries to induce a model of developed TB, whereas our model tries to resemble the natural *M. tuberculosis* infection by aerosol, which also induces necrosis in humans (Grange 1998).

There are other experimental models that use a low dose aerosol, which are able to induce extensive INPG. In these models, immunodeficient mice strains are used that lack clue Th1 cytokines (i.e. IFN-g or IL-12), ab T cells or TNF (Cooper et al. 1993; North & Jung 2004). Unfortunately, these are not

good models for looking at latent bacilli, as they induce extensive INPG, but growing bacilli are easily seen in the necrotic tissue (Cooper et al. 1993). In this case, INPG is much related to the presence of a high bacillary concentration.

Previous studies carried out to establish the virulence of different clinical strains of *M. tuberculosis* revealed a natural induction of INPG (Cardona et al. 2003b), and thus new experiments were conducted to determine whether an association existed between artificial induction caused by LPS inoculation and INPG induced by one of the strains. The time point chosen for these experiments was week 9 after infection again. Interestingly, the UTE 0335R strain showed the same histological INPG pattern in the same mice strains, as seen with the LPS inoculation.

Clear differences can be established between *M. tuberculosis* susceptible (129/Sv and DBA/2) and resistant (C57BL/6 and BALB/c) mice strains. In susceptible strains, LPS inoculation induces an increase in PGIP and a decrease in pulmonary CFUs (although not significant in DBA/2). Regarding mRNA expression, there is an increase in TNF, and in IFN- γ (only significant in 129/Sv strain). After infection with UTE 0335R, a different scenario can be seen, as PGIP raises, as well as the expression of IFN- γ , RANTES, TNF and iNOS, but the important fact is that pulmonary CFUs also tend to increase.

In resistant mice strains, LPS challenge does not modify PGIP (in fact, it decreases in BALB/c). The expression of IFN- γ , RANTES, TNF and iNOS does not vary either, although there is a tendency to decrease bacillary concentration in the lungs. Regarding UTE 0335R infection, there is a tendency to increase PGIP (at least in C57BL/6) as well as the expression of IFN- γ , RANTES, TNF and iNOS. Nonetheless, the most important point is that bacillary concentration in the lungs is controlled.

The aim to use C3H mice strains, which are also susceptible against *M. tuberculosis* infection (Medina & North 1998), was to obtain a negative control of LPS inoculation, as C3H/HeJ is a LPS-resistant strain. Interestingly, the only difference between both strains was that C3H/HeN developed INPG. In this case, the parameters were almost the same as those used to compare LPS or natural induction of INPG, although the latter also induced a greater inflammatory and immunological response, because it triggered a higher mRNA expression of RANTES and iNOS. Once again, these data support the hypothesis that the increase in the inflammatory and immunological response, PGIP and bacillary concentration in the lungs are not paramount for the induction of INPG.

Regarding on the increase in the mRNA expression of RANTES, TNF, IFN- γ and iNOS, we must take into account that the expression of the former tends to favour Th1 response (Cardona et al. 2003b); TNF is a key factor that induces the formation of granulomas and synergizes with IFN- γ in the

activation of infected macrophages to trigger a bactericidal response against bacilli. The expression of iNOS is a marker of macrophage activation (Rhoades & Orme 1997) involved in the production of reactive nitrogen intermediates (RNIs). Because all these parameters tend to increase, a bacillary control after LPS inoculation is not surprising, although this response is observed 6 weeks after challenge. These data may be interpreted as an external induction of an inflammatory response, where LPS favours the host in its fight against infection as previously described (Cardona et al. 2001), although the difference between resistant and susceptible strains is that the former do not increase PGIP. This is a crucial factor, because the survival of mice infected with

M. tuberculosis is directly correlated with the control of PGIP, and these animals finally die due to complete infiltration of the lungs (Cardona et al. 2000, 2003b; Medina & North 1998). Hence, only resistant strains would take advantage from this external agent in terms of survival.

Besides, infection with UTE 0335R also increased these parameters, but in this case, the bacillary load in the lungs was not reduced, thus indicating that the increase in these values does not always imply a control of bacilli. In fact, in the progression of *M. tuberculosis* infection, values always rise after an increase in bacillary load (Cardona et al. 2000, 2001, 2003a, b). In other words, bacilli always take the initiative. However, as an external factor, LPS inoculation stimulates this expression differently from the natural infection: it enhances an extra production of Th1 response not proportional to the magnitude of bacillary concentration, thus tending to favour the host (although, as mentioned above, PIPG may increase too much and be deleterious for the host).

The time when the immunological response is triggered is also crucial: it must be triggered at the precise moment. For example, in the evolution of iNOS expression, this parameter is related to the activation of macrophages, but also to the induction of local immunosuppression, thus being a factor that favours chronicity in infection. For instance, in a susceptible mice strain like DBA/2, this parameter tends to increase spectacularly at week 18–22 post-infection as a consequence of its accumulation in the foamy macrophages surrounding the granulomas. These cells are not sufficiently stimulated and may not induce levels of iNOS high enough to produce enough RNIs (Rhoades & Orme 1997). These micobacteriostatic levels allow bacilli to survive inside them and may also induce local immunosuppression, thus favouring the survival of bacilli, which may potentially reactivate with time (Cardona et al. 2003b).

At all events, these data are obtained when INPG takes place and, despite providing information on the later stages of INPG, they do not allow us to fully understand the direct mechanisms that induce it. In this case, the parameters related

to Th1 response (RANTES and IFN-g) and macrophage activation (TNF and iNOS) are maintained or increased, whereas Th2 expression is not found, thus not supporting previous hypothesis (Rook & al Attiyah 1991).

Moreover, the presence of PMNs is not crucial for the induction of INPG, as this reaction is induced both after favouring its local increase (with the LPS inoculation) and without such increase (after UTE 0335R infection).

Finally, the most interesting fact is that, in both cases, no histopathological differences were found between LPS and natural induction of INPG by the *M. tuberculosis* strain UTE 0335R, thus supporting the hypothesis that the generation of INPG may be a localized phenomena temporally limited at the beginning of infection. These data also support the hypothesis that the Koch reaction is related to the Shwartzman reaction (Shwartzman 1937) and thus to a nonspecific response triggered against a 'provoking' factor, like endotoxin-like molecules of *M. tuberculosis*, such as cord-factor (Roach et al. 1993), and not to a delayed-type hypersensitivity (Dannenberg 1991). Differences in the composition and quantity of these molecules in *M. tuberculosis* strains may explain why some of these molecules spontaneously induce INPG while others do not. This opens a new field to study new aspects related to the virulence of *M. tuberculosis*. Nevertheless, this aspect needs to be further studied by searching for more strains able to induce INPG and studying their endotoxin-like molecules.

In conclusion, the search for a new 'human-like' model has revealed a new feature of murine response against *M. tuberculosis* infection, i.e. that the induction of INPG is related to a Th1-type environment (as in mice C57BL/6 and 129/Sv), that it is a local phenomenon temporally limited at the beginning of infection and unrelated to an increased resistance or susceptibility against infection. This is associated with the presence of LPS or LPS-like molecules, thus linking the Koch phenomenon with the nonspecific Shwartzman reaction. Although further studies will clarify this aspect, this work opens a new field in which new experiences may help study this paramount pathological process in humans and will provide new data on the virulence of *M. tuberculosis*.

Acknowledgements

This work has been funded by Grants FIS 01/0644 and 01/ 3104. We thank Mrs Marga Ortiz, from the Center for Animal Experimentation, and the technicians of the Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, for their excellent technical support, and Mrs Deborah Cullell for her excellent work in English reviewing.

References

- Cardona P.J., Gordillo S., Amat I. et al. (2003a) Catalase-peroxidase activity has no influence on virulence in a murine model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **83**, 351–359.
- Cardona P.J., Gordillo S., Diaz J. et al. (2003b) Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71**, 5845–5854.
- Cardona P.J., Llatjos R., Gordillo S. et al. (2000) Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* **52**, 156–163.
- Cardona P.J., Llatjos R., Gordillo S. et al. (2001) Towards a 'human-like' model of tuberculosis: intranasal inoculation of LPS induces intragranulomatous lung necrosis in mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* **53**, 65–71.
- Cooper A.M., Dalton D.K., Stewart T.A., Griffin J.P., Russell D.G., Orme I.M. (1993) Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J. Exp Med.* **178**, 2243–2247.
- Dannenberg A.M. Jr. (1991) Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today* **12**, 228–233.
- Gomez J.E. & McKinney J.D. (2004) *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* **84**, 29–44.
- Grange J.M. (1998) Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. In: *Clinical Tuberculosis*. pp. 129–152. (ed. P.D.O. Davies) London: Chapman & Hall.
- Hernandez-Pando R., Pavon L., Arriaga K., Orozco H., Madrid-Marina V., Rook G. (1997) Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect. Immun.* **65**, 3317–3327.
- Lurie M.B. (1932) The correlation between the histological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. *J. Exp Med.* **55**, 31–58.
- Mattner F., Magram J., Ferrante J. et al. (1996) Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1553–1559.
- Medina E. & North R.J. (1998) Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. *Immunology* **93**, 270–274.
- Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166–6173.
- Mitchison D.A. & Dickinson J.M. (1978) Bactericidal mechanisms in short-course chemotherapy. *Bull. Int. Union Against Tuberc.* **53**, 254–259.

- North R.J. & Jung Y.J. (2004) Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599–623.
- Rhoades E.R. & Orme I.M. (1997) Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 65, 1189–1195.
- Roach T.I.A., Barton C.H., Chatterjee D., Blackwell J.M. (1993) Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes *C-fos*, *KC*, *JE* and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 150, 1886–1896.
- Rook G.A. & al Attiyah R. (1991) Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle* 72, 13–20.
- Rook G.A., Hernandez-Pando R., Dheda K., Teng Seah G. (2004) IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol.* 25, 483–488.
- Shwartzman G. (1937) Phenomenon of Local Tissue Reactivity and its Immunological, Pathological and Clinical Significance. New York: Paul B. Hober.
- World Health Organization. (2001) Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001. WHO/CDS/TB/2001.287. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis

Pere-Joan Cardona^{a,*}, Isabel Amat^a, Sergi Gordillo^a, Virginia Arcos^a, Evelyn Guirado^a, Jorge Díaz^a, Cristina Vilaplana^a, Gustavo Tapia^b, Vicenc Ausina^a

^a Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut "Germans Trias i Pujol", Universitat Autònoma de Barcelona, Crta del Canyet s/n, 08916 Badalona, Catalonia, Spain
^b Department of Pathology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut "Germans Trias i Pujol", Universitat Autònoma de Barcelona, Crta del Canyet s/n, 08916 Badalona, Catalonia, Spain

Received 28 May 2004; received in revised form 1 September 2004; accepted 8 September 2004
Available online 6 October 2004

Abstract

Reduction of colony forming units by rifampicin-isoniazid therapy given 9–17 weeks post-infection was made more pronounced by immunotherapy with a vaccine made of fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells detoxified and liposomed (RUTI), given on weeks 17, 19 and 21 post-infection, in the murine model of tuberculosis in C57BL/6 and DBA/2 inbred strains. RUTI triggered a Th1/Th2 response, as demonstrated by the production of IgG1, IgG2a and IgG3 antibodies against a wide range of peptides. The histological analysis did not show neither eosinophilia nor necrosis, and granulomatous infiltration was only slightly increased in C57BL/6 mice when RUTI was administered intranasally. © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Immunotherapy; Chemotherapy; Histological analysis

1. Introduction

It has been estimated that one third of mankind harbours a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Latent bacilli have to adapt to stressful conditions generated by the infected host against them by slowing down the metabolism or becoming dormant [2,3]. Since chemotherapy and immunity are mainly directed against growing bacilli [4,5], their destruction in a short period of time is difficult. It has been hypothesized the usefulness of an immunotherapeutic vaccine, but the results of some recent studies strongly recommend not to use post-infection vaccination with killed or alive BCG, as this induces strong tissue toxicity [6,7]. In the present study,

we have assessed the benefit of the administration of a fragmented *M. tuberculosis* cells formulation (RUTI) to reduce the bacterial load after the treatment with chemotherapy in a murine model of chronic tuberculosis infection.

2. Material and methods

2.1. Experimental infection

Specific pathogen-free DBA/2 and C57BL/6 female mice, 6 weeks old, were provided by Charles River (L'Arbresle Cedex, France) and kept under controlled conditions in a P3 High Security Facility with sterile food and water ad libitum. *M. tuberculosis* standard strain NC007416 (H37Rv) was grown in Proskauer Beck medium containing 0.01% Tween 80 to mid-log phase and stored in aliquots at – 70 °C.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 497 88 94; fax: +34 93 497 88 95.
E-mail address: pcardona@ns.hugtip.scs.es (P.-J. Cardona).

Mice were placed in a Middlebrook Airbone Infection Apparatus (Glas-col Inc., Terre Haute, IN, USA). The nebulizer compartment was filled with a 6-mL suspension at 10^6 bacteria/mL in distilled water delivering 20–50 viable bacilli into the lungs. CFUs at each time point from the left lung and the spleen homogenized in 1 mL of distilled water were monitored by plating serial dilutions on nutrient Middlebrook 7H11 agar (Biomedics s.l., Madrid, Spain) and counted after 21 days incubation at 37°C . Bronchoalveolar lavage (BAL) was obtained by gentle intratracheal injection of 1 mL phosphate-buffered saline (PBS) and lungs were immediately extracted after euthanasia by means of a halothane (Zeneca Farma, Pontevedra, Spain) overdose.

2.2. Serum samples

Blood samples were collected from the retro-orbital veins of all the animals after being anaesthetized with halothane. Samples were kept at 4°C for 8 h; serum was obtained by centrifugation at $2500 \times g$, aliquoted and then kept at -20°C until needed. A pool of previous positive samples was titrated, aliquoted and kept at -20°C to be used as controls for Western blotting.

2.3. mRNA quantification

The procedures are described elsewhere [8]. In short, total RNA from the middle right lobe was extracted with a commercial phenol–chloroform method, RNazol (Cinna/Biotechx, Friendswood, TX, USA). After a DNase treatment with DNA-free kit (Ambion, Woodward Austin, USA), a denaturing agarose gel was used to assess the stability of RNA. Five micrograms of RNA was reverse transcribed using a Superscript RT kit (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) following the manufacturer's recommendations to obtain cDNA. The quantitative analysis for IFN- γ and TNF was performed using a LightCycler™ System (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID, USA). A real-time PCR was carried out in glass capillaries to a final volume of 10 μL in the presence of 1 μL of $10\times$ reaction buffer (Taq Polymerase, dNTPs, MgCl_2 , SYBRGreen, Roche Biochemicals), 1 μL of cDNA (or water as negative control, which was always included), MgCl_2 to a final concentration of 2–5 mM and primers to a final concentration of 0.5 μM . A single peak was obtained for each PCR product by melting curve analysis and only one band of the estimated size was observed on the agarose gel. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA expression was analyzed for every target sample to normalize for efficiency in cDNA synthesis and RNA loading. A ratio based on the HPRT mRNA expression was obtained for each sample.

2.4. Histology and morphometry

The procedures have been described in previous works [8]. In short, two right lung lobes from each mouse were fixed

in buffered formalin and subsequently embedded in paraffin. Each sample was stained with hematoxylin–eosin. For histometry, 5 μm thick sections from each specimen were stained with hematoxylin–eosin and photographed at $10\times$ using a SMZ800 stereoscopic microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a Coolpix 990 digital camera (Nikon). Three sections from two lung lobes per animal were studied. Using the appropriate software (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MA, USA) and Photoshop 5.0 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA), the area of each single lesion and the total tissue area were determined on photomicrographs at each time point. The sections were blindly evaluated to obtain a more objective measurement.

2.5. RUTI

RUTI is the name of a patent-pending product (P.J. Cardona and I. Amat, 31 October 2003, Spanish Patent Office). Originally, RUTI is the name of the mountain where the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol is placed, and all the experiments were done. Nowadays, RUTI is manufactured under Good Manufacturing Procedures (GMP) by Archivel Technologies, s.l. (Mataró, Catalonia, Spain). Different batches have been tested and showed equivalent efficiency. Briefly, fragmented *M. tuberculosis* cells (FMtbC) were obtained after culturing *M. tuberculosis* H37Rv for 3 weeks in Middlebrook 7H11 agar (Biomedics s.l.) at 37°C . Colonies were carefully removed and mechanically disrupted using silica–zirconia beads in a Bead Beater (BioSpec products Inc., OK, USA) and a PBS buffer with 4% TritonX114 (Sigma–Aldrich Chemie, Stenheim, Germany). After centrifuging at $3000 \times g$ at 4°C for 30 min the supernatant was centrifuged twice at $27,000 \times g$ at 4°C for 60 min and washed with PBS to remove the lipidic supernatant, to be finally pasteurized at 65°C for 40 min and lyophilized. RUTI was obtained by dissolving FMtbC in liposomes made of phosphatidyl choline (Lipoid AG, Cham, Switzerland) and sodium cholate (New Zealand Pharmaceuticals Ltd., Palmerston North, New Zealand) (20:1.4) after mixing at high speed. Analysis of RUTI with a Laser Diffraction Particle Size Analyzer PS 13320 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) showed particles with an average diameter of 100 nm, 99.9% of them smaller than 1 μm . RUTI showed a mixture of multilamellar and unilamellar liposomes after being examined with a transmission electron microscope (JEOL 1010, Tokyo, Japan). The peptidical composition of FMtbC was determined after comparing it with the profile obtained with *M. tuberculosis* well known products like purified protein derivative (PPD), culture filtrate proteins (CFP) and Ag85 using SDS-PAGE, and with the patterns obtained through Western blot analysis with monoclonal antibodies (mAbs) against CFP peptides [9]: IT-12, 20, 23, 43, 44, 46, 51, 56, 58, 69 and 70 (Fig. 1). All these products were kindly donated by Dr. John Belisle, from the Colorado State University according to the NIH contract no. AI-75320.

2.6. Treatments

RUTI was administered subcutaneously (SC) or intranasally (IN) on weeks 17, 19 and 21 post-infection. A volume of 50 μ L containing 185 μ g of FMtbC was used. Chemotherapy was administered orally 5 days a week by gavage from week 9 to 17 post-infection. The suspension of rifampicin (RIF) (Sigma) was prepared in a one-tenth volume of water with a pH 2 and made up to volume with 5% sucrose (Sigma). Once it was well dissolved isoniazid (INH) was added (Sigma). The final suspension was stored at -20°C , and thawed at 5°C 1 day before administration. INH was administered at 25 mg/kg and RIF at 10 mg/kg.

2.7. Humoral response

Humoral response was analyzed against a pre-established peptidic profile (6, 10, 17, 19, 27, 30, 38, 40, 47, 50, 55, 65, 70 kDa) (Fig. 1). Western blot was run as described

[10] in a SDS-PAGE preparative gel (12% acrylamide Nu-PAGE BisTris Gel, Invitrogen), electrotransferred onto nitrocellulose sheets (Millipore, Bedford, MA, USA) using a semidry transfer method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) that was finally divided into 16 lanes. The strips (0.30cm wide) were incubated with 1:25 to 1:51,200 diluted sera, or 1:1 to 1:256 diluted BAL for 1h at room temperature. Appropriate horseradish peroxidase (HRP)-labeled secondary goat anti-mouse antibody (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA) was used as well as chemoluminescent substrate Super Signal West Pico (Pierce) and X-ray films Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA) for developing.

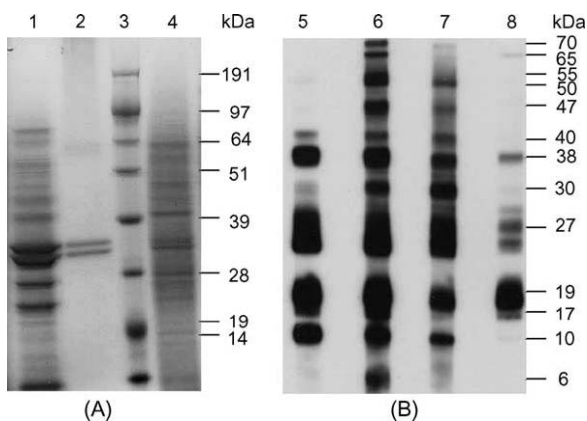


Fig. 1. Composition of RUTI. Comparison of the peptidic profiles in a 12% SDS-PAGE gel (A) of culture filtrate proteins (CFP) (1), Ag85 (2) and fragmented *M. tuberculosis* Cells (FMtbC) (4). Line 3 shows the molecular weight control of 14–198 kDa. (B) Shows a Western blot analysis of FMtbC, using the control serum of infected mice inoculated with RUTI and the kDa profile of bands previously defined with known mAbs and the SDS-PAGE pattern. Lines 5, 6, 7 and 8 are obtained against IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 conjugates, respectively.

A molecular weight standard was run in each gel (Invitrogen).

3. Results

Fig. 2 shows the bactericidal activity induced by the inoculation of RUTI IN or SC in both susceptible or resistant mice strains [8,11] after chemotherapy, which also impedes the reactivation suffered by mice treated only with chemotherapy. Besides, inoculation of RUTI without a previous chemotherapy did not affect the bacterial load although elicited a similar immunological response (data not shown). This bactericidal activity seems to be related to the Th1 response as it is demonstrated by the increase of the IFN- γ expression in the lungs after the inoculation of RUTI when compared with the group only treated with chemotherapy (Table 1). This effect was more evident in C57BL/6 mice and it was only significant in the IN inoculated. On the other hand, no significant increase on TNF expression was detected (Table 1). It must be taken into account that the expression of such cytokines are

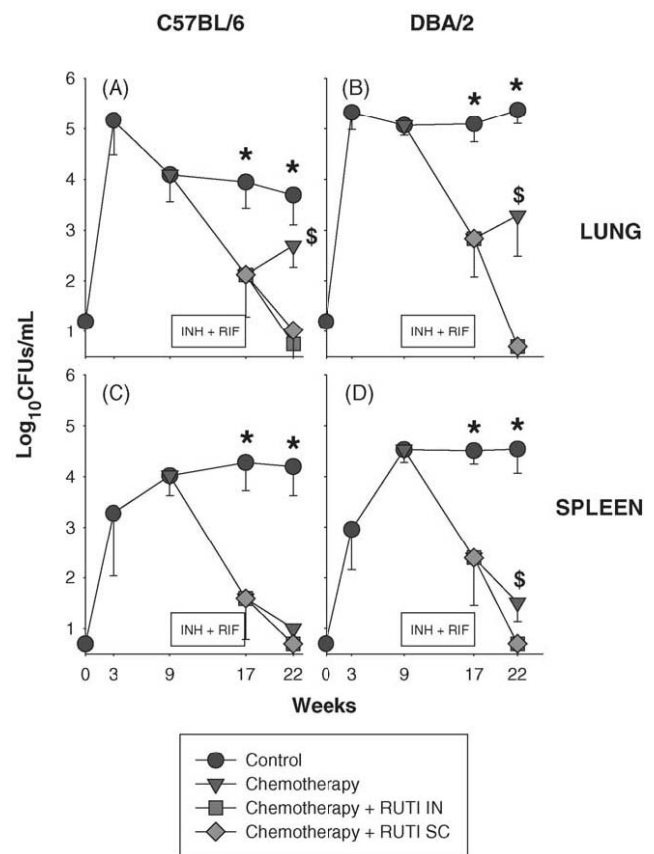


Fig. 2. Bactericidal activity of RUTI in lung (A and B) and spleen (C and D) in C57BL/6 and DBA/2 mice. The results are the mean values and the standard deviations obtained from 4 to 6 mice in each time point. Differences were considered significant when p was <0.05 and were marked with (*) among control and every other groups; and (\$) among groups treated with chemotherapy alone or groups treated with chemotherapy and both IN or SC inoculation with RUTI.

increased in control mice because they harbour a high bacillary concentration [8]. The study of the humoral response (Fig. 3) gave us an indirect view on the immunity generated as Th1, Th2 and Th3 responses are related to IgG2a and IgG3, IgG1 and IgG2b isotypes, respectively [12]. In general, RUTI triggered a wide response against FMtbC peptides in both mice strains implying all the IgG isotypes (Fig. 3). Furthermore, IgA production was detected in BAL after IN or SC inoculation in DBA/2 and also in IN immunized C57BL/6 mice (Fig. 4). No IgE levels were detected in any samples. The histological analysis did not show eosinophilia or necrosis, and granulomatous infiltration was only slightly increased in C57BL/6 mice when RUTI was administered IN (Table 1).

4. Discussion

RUTI might be a useful vaccine for reducing the period of chemotherapy in *M. tuberculosis* infection at the point when it has less efficacy because of the presence of latent bacilli in the lesions [13–16]. Its mechanism of action might be related to the induction of a Th1 response against a wide range of *M. tuberculosis* antigen able to elicit a protective response against *M. tuberculosis* infection like ESAT-6, CFP-10, Ag85 or Hsp70 [4]. Also, its effectiveness is necessarily linked to a previous chemotherapy, as treatment with RUTI alone does not induce any decrease in the bacterial load. This fact can be linked to the decrease on the immunological response induced

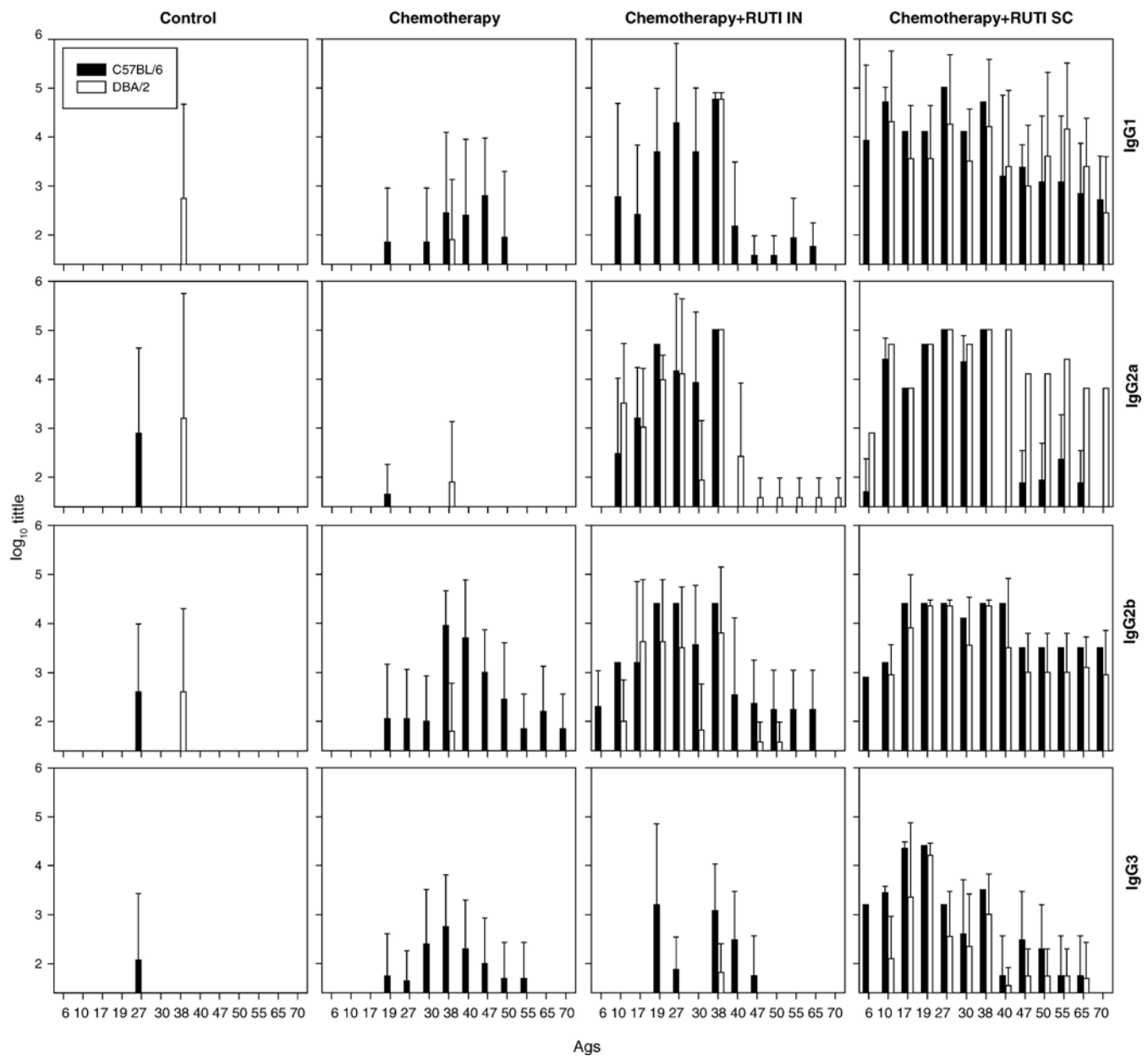


Fig. 3. Humoral IgG response to FMtbC proteins in a Western blot determination at week 22. The results are the mean values and the standard deviations of the sera obtained from 4 to 6 mice in each time point. The values in DBA/2 mice are represented with open bars and those in C57BL/6 mice with closed bars.

Table 1 Local expression of cytokines (IFN- γ and TNF- α) and granulomatous infiltration in the pulmonary parenchyma at week 22

P.-J. Cardona et al. / Vaccine 23 (2005) 1393–1398

1397

	Ratio cytokine/HPRT $\times 10^3$		Morphometry (% of infiltration)
	IFN- γ	TNF	
DBA/2			
Control	193.5 \pm 80.32*	313 \pm 60.61*	11.92 \pm 1.3*
Chemotherapy	1.16 \pm 0.45*	0.07 \pm 0.07*	5.01 \pm 2.26*
Chemotherapy + RUTI IN	1.88 \pm 1.95	0.32 \pm 0.47	3.38 \pm 2.31
Chemotherapy + RUTI SC	1.31 \pm 0.43	0.08 \pm 0.07	1.66 \pm 0.88
C57BL/6			
Control	220.3 \pm 35.75*	198.8 \pm 96.32*	4.22 \pm 0.7 [§]
Chemotherapy	0.70 \pm 0.51 ^{**}	0.02 \pm 0.01*	2.43 \pm 0.4 ^{§,¶}
Chemotherapy + RUTI IN	4.42 \pm 2.43 ^{**}	0.05 \pm 0.02	5.25 \pm 1.26 ^{§,¶,∞}

Sigma Stat (SPSS Software, San Rafael, CA, USA) was used to compare the differences between groups through all pairwise multiple comparison procedures (Student–Newman–Keuls method).

* $p < 0.05$.* $p = 0.009$.* $p = 0.012$.* $p = 0.002$.* $p = 0.03$.

by chemotherapy, as described before [17]. In this case, RUTI would act both as a booster of the previous immunity and as an inducer of a new response against other FMtbC peptides, that will favour the bacterial destruction. On the contrary, bacilli in the group treated only with chemotherapy reactivate after ceasing the treatment because of the absence of

immunological response. A threshold bacillary concentration must be achieved to trigger this immune response again [18].

On the other hand, RUTI also triggers Th2 and Th3 mechanisms. Although it has been demonstrated that Th2 response tends to counterbalance the Th1 one [19,20], recent data demonstrated Th1/Th2 response induced by BCG was as efficient as the Th1 alone against *M. tuberculosis* infection [21]. Less is known about Th3 counterbalancing, although it is linked to the anti-inflammatory role of transforming growth factor-beta (TGF- β) which has been considered one of the facts that allows the chronicity in the murine model of tuberculosis [22].

Interestingly, inoculation of RUTI did not induce local or systemic toxicity. This fact has been the major point against the use of immunotherapy against *M. tuberculosis* infection since Robert Koch firstly assayed the old tuberculin [23]. In this regard, the formulation of RUTI includes the extraction of endotoxin-like molecules like lipoarabinomannan [24] with Triton-X114 [25], which could be related to the production of intragranulomatous necrosis in tuberculosis [26]. On the other hand, it seems paramount the previous treatment with chemotherapy to decrease the inflammation induced by the growing bacilli [17], and thus reducing the chance of developing a local Koch reaction that would induce necrosis [26]. Chemotherapy also removes the accumulation of foamy macrophages outside the granulomas (data not shown). These cells are potent inducers of local immunosuppression [27], this is why its elimination would be also a major issue to make RUTI efficient.

Although further studies must be done to study specific and innate cellular immunity, as well as the particular role played by humoral response, specially regarding on local IgA production [28], our data suggest that RUTI would be a useful immunotherapeutic vaccine against *M. tuberculosis* infection

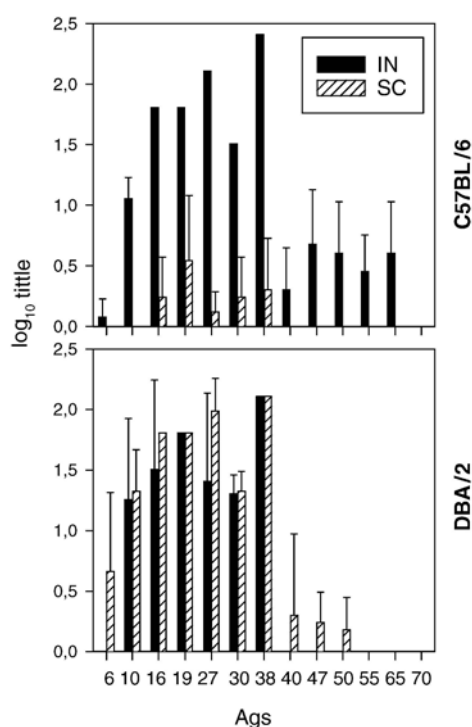


Fig. 4. IgA response to FMtbC proteins in a Western blot determination in BAL at week 22. The results are the mean values and the standard deviations of the samples obtained from 4 to 6 mice in each time point. RUTI inoculations administered intranasally or subcutaneously (IN or SC) are represented with closed or striped bars, respectively.

by triggering a wide response against a lot of peptides present both in growing and non growing bacilli.

Acknowledgement

This study was supported by Grant FIS 01/3104 of the Spanish Ministry of Health. Data were partially presented as a communication in the Experimental Biology Congress in Washington DC (USA) on April 2004.

References

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001, Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001.287.
- [2] Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 1998;180:801–8.
- [3] Michele TM, Ko C, Bishai WR. Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis sigF* gene: implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:218–25.
- [4] Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bentzon MW, Heron I. T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991;59:1558–63.
- [5] Grosset J. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980;1:231–41.
- [6] Moreira AL, Tsenova L, Aman MH, Bekker LG, Freeman S, Mangaliso B, et al. Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 2002;70:2100–7.
- [7] Turner J, Rhoades ER, Keen M, Belisle JT, Frank AA, Orme IM. Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect Immun* 2000;68:1706–9.
- [8] Cardona PJ, Gordillo S, Diaz J, Tapia G, Amat I, Pallares A, et al. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:5845–54.
- [9] Sonnenberg MG, Belisle JT. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 1997;65:4515–24.
- [10] Rabilloud T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 1990;11:785–94.
- [11] Medina E, North RJ. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. *Immunology* 1998;93:270–4.
- [12] Cobbold S, Waldmann H. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 1998;10:518–24.
- [13] Lucas SB. Histopathology. In: Davies PDO, editor. *Clinical tuberculosis*. London: Chapman & Hall; 1998. p. 113–27.
- [14] McCune RM, Feldmann FM, Lambert HP, McDermott W. Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J Exp Med* 1966;123:445–68.
- [15] Orme I. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:589–93.
- [16] Scanga CA, Mohan VP, Joseph H, Yu K, Chan J, Flynn JL. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infect Immun* 1999;67:4531–8.
- [17] Cardona PJ, Julian E, Valles X, Gordillo S, Munoz M, Luquin M, et al. Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. *Scand J Immunol* 2002;55:639–45.
- [18] Swain SL, Croft M, Dubey C, Haynes L, Rogers P, Zhang X, et al. From naive to memory T cells. *Immunol Rev* 1996;150:143–67.
- [19] Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect Immun* 1998;66:5743–50.
- [20] Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997;65:3317–27.
- [21] Gruppo V, Orme IM. Dose of BCG does not influence the efficient generation of protective immunity in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2002;82:267–73.
- [22] Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997;90:607–17.
- [23] Koch R. Weitere. Mitteilungen uber ein Heilmittel gegen Tuberkulose. *Dtsch Med Wochenschr* 1890;16:1029–32.
- [24] Roach TIA, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, Kc, JE and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 1993;150:1886–96.
- [25] Karplus TE, Ulevitch RJ, Wilson CB. A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions. *J Immunol Methods* 1987;105:211–20.
- [26] Cardona PJ, Llatjos R, Gordillo S, Diaz J, Viñado B, Ariza A, et al. Towards a 'human-like' model of tuberculosis: intranasal inoculation of LPS induces intragranulomatous lung necrosis in mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 2001;53:65–71.
- [27] Stumbles PA, McWilliam AS, Holt PG. Dendritic cells and mucosal macrophages. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 397–412.
- [28] Williams A, Reljic R, Naylor I, Clark SO, Falero-Diaz G, Singh M, et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 2004;111:328–33.



Original article

Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice[☆]

Evelyn Guirado, Isabel Amat, Olga Gil, Jorge Díaz, Virginia Arcos,
Neus Caceres, Vicenç Ausina, Pere-Joan Cardona*

Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Crta del Canyet s/n, 08916 Badalona, Catalonia, Spain

Received 26 September 2005; accepted 1 December 2005
Available online 27 January 2006

Abstract

We investigated the protective role of immune-sera against reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* infection in SCID mice and found that passive immunization with sera obtained from mice treated with detoxified *M. tuberculosis* extracts (delivered in liposomes in a composition known as RUTI) exerted significant protection. Our SCID mouse model consisted of aerosol infection by *M. tuberculosis* followed by 3 to 8 weeks of chemotherapy with isoniazid + rifampicin (INH + RIF) (25 and 10 mg/kg, respectively). After infection and antibiotic administration, two groups of mice were treated for up to 10 weeks with intraperitoneal passive immunization using hyperimmune serum (HS) obtained from mice infected with *M. tuberculosis*, treated with chemotherapy (INH + RIF) for 8 weeks and inoculated with RUTI (HS group) or with normal serum (CT group). Significant differences were found between HS and CT groups in the number of bacilli in the lungs (3.68 ± 2.02 vs. $5.72 \pm 1.41 \log_{10}$ c.f.u.), extent of pulmonary granulomatous infiltration (10.33 ± 0.67 vs. $31.2 \pm 1.77\%$), and percentage of animals without pulmonary abscesses (16.7% vs. 45.5%). These data strongly suggest a protective role of specific antibodies against lung dissemination of *M. tuberculosis* infection.

© 2006 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Murine model; SCID mouse; Serum therapy; Antibody-mediated immunity

1. Introduction

Cell-mediated immunity (CMI) by Th1-specific cells plays a central role in the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection; interferon gamma (IFN- γ) secreted by Th1 cells, in synergy with tumor necrosis factor (TNF), is crucial for the endogenous activation of antimycobacterial mechanisms, such as the production of nitric oxide and reactive nitrogen intermediates (RNI) by the inducible form of nitric oxide

synthase (iNOS) [1–3]. In this process, both CD4 and CD8 T cells play a paramount role as effector cells, which also lead to cytotoxic activity of infected macrophages [3,4]. Although B cells are found in *M. tuberculosis* granuloma, especially during the chronic phase of infection [5], the suggestion that the antibody response plays a role in protection against *M. tuberculosis* remains controversial. However, results from classical studies do not support a protective role for antibody-mediated immunity against *M. tuberculosis* [6]. In fact, in human tuberculosis, the presence of specific antibodies (Abs) against LAM or against antigen-85 complex correlated with the absence of disseminated tuberculosis in a pediatric population [7] and with a positive outcome in tuberculous Mexican Indians [8], respectively. Furthermore, several studies in murine models have revealed a protective role for IgM, IgG

[☆] Parts of this study were presented at the Keystone Symposium – Tuberculosis: Integrating Host and Pathogen Biology, Whistler, British Columbia, Canada, April 2–7, 2005.

* Corresponding author. Tel: +34 93 497 8894; fax: +34 93 497 8895.
E-mail address: pcardona@nsg.hugtip.scs.es (P.-J. Cardona).

and IgA monoclonal antibodies (mAbs) against different antigens of *M. tuberculosis* in early lung infection [9,10].

Passive immunization with specific polyclonal antibodies (pAbs) and mAbs also has a protective effect against intracellular pathogens such as *Ehrlichia chaffeensis* in SCID mice [11,12]. However, passive immunization of pAbs did not protect against other intracellular pathogens, such as *Listeria monocytogenes* [13] or *Cryptococcus neoformans* [14], whereas passive immunization with mAbs did [15,16].

The positive immune response that we observed upon treatment with chemotherapy (8 weeks with INH + RIF) and detoxified *M. tuberculosis* extracts (delivered in liposomes in a composition known as RUTI) in a latent tuberculosis mouse model encouraged us to assess the protective action of the strong humoral response elicited [17]. The present investigations reveal that passive immunization with hyperimmune serum (HS) obtained from mice immunized with RUTI restricts dissemination of bacilli in the lungs of SCID mice infected with *M. tuberculosis*. The data from our animal model strongly suggest that the antibody response against multiple antigens of *M. tuberculosis* plays an important protective role against tuberculosis infection.

2. Material and methods

2.1. Mice

Specific pathogen-free (*spf*), 6- to 8-week-old, female, DBA/2 and CB17/1cr-SCID mice were obtained from Harlan Iberica (Sant Feliu de Codines, Catalonia, Spain). The animals were shipped in appropriate conditions with the corresponding certificate of health and origin. All the animals were kept under controlled conditions in a P3 High-Security Facility with sterile food and water *ad libitum*.

2.2. Animal health

Mice were checked every day using a protocol that evaluated weight loss, apparent good health (bristled hair and wounded skin) and behavior (signs of aggressiveness or isolation) and weighed once a week. Animals were euthanized with an overdose of halothane (Fluothane, Zeneca Farma, Pontevedra, Spain), to avoid suffering. Sentinel animals were used to check *spf* conditions in the facility. Tests for 25 known mouse pathogens were all negative. All experimental proceedings were approved and supervised by the Animal Care Committee of "Germans Trias i Pujol" University Hospital in agreement with the European Union Laws for protection of experimental animals.

2.3. Bacteria and infection

M. tuberculosis strains H37Rv Pasteur were grown in Proskauer Beck medium containing 0.01% Tween-80 to mid-log phase and stored at -70°C in 2-ml aliquots. Mice were placed in the exposure chamber of an airborne infection device (Glas-col Inc., Terre Haute, IN, USA). The nebulization

provided an approximate uptake of 20 viable bacilli within the lungs. The number of viable bacteria in the left lung and spleen homogenates were monitored by plating serial dilutions on nutrient Middlebrook 7H11 agar (Biomedics s.l., Madrid, Spain) and counting bacterial colony formation (colony forming units; c.f.u.) after incubation at 37°C for 21 days. Special care was taken not to include hilar lymph nodes when removing the left lung so as to prevent an artificial increase of c.f.u. values. Lungs were immediately removed after euthanasia by means of a halothane overdose (Zeneca Farma, Pontevedra, Spain). Broncho-alveolar lavage (BAL) was obtained by gentle intratracheal injection of 1 ml phosphate-buffered saline (PBS) and lungs were removed immediately after euthanasia by means of an overdose of halothane (Zeneca Farma, Pontevedra, Spain).

2.4. Serum samples

Blood samples were collected from the retro-orbital veins of all animals after being anaesthetized with halothane. Samples were kept at 4°C for 8 h; serum was obtained by centrifugation at $2500 \times g$, aliquoted and then kept at -20°C until needed. A pool of previous positive samples was titrated, aliquoted and kept at -20°C to be used as control for Western blotting.

2.5. mRNA quantification

The procedures for mRNA quantification are described elsewhere [18]. In short, total RNA from the middle right lobe was removed with a marketed phenol-chloroform method, RNazol (Cinna/Biotec, Friendswood, TX, USA). After DNase treatment with DNA-free kit (Ambion, Woodward Austin, USA), a denaturing agarose gel was used to assess the stability of RNA. A Superscript RT kit (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) was used to obtain cDNA by reverse transcription of 5 μg of RNA, following the manufacturer's recommendations. The quantitative analysis for IFN- γ , IL-12p40, RANTES, iNOS, IL-4, IL-10 and TNF was performed using a LightCycler™ System (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID, USA). Real-time PCR was carried out in glass capillaries to a final volume of 10 μl in the presence of 1 μl of $10\times$ reaction buffer (Taq Polymerase, dNTPs, MgCl_2 , SYBRGreen, Roche Biochemicals), 1 μl of cDNA (or water as negative control, which was always included), MgCl_2 to a final concentration of 2–5 mM and primers to a final concentration of 0.5 μM were also added. Following PCR, a single peak was present in the melting-curve analysis, corresponding to a single species of the appropriate estimated size on agarose gel electrophoresis. Expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA expression was analyzed for every target sample to normalize for efficiency in cDNA synthesis and RNA loading. A ratio based on the HPRT mRNA expression was obtained for each sample.

2.6. Histology and morphometry

The procedures for histology and morphometry have been described elsewhere [20]. Briefly, two right lung lobes from

each mouse were fixed in buffered formalin and subsequently embedded in paraffin. All samples were stained with hematoxylin–eosin, trichrome of Masson and Ziehl Neelsen. For histometry, 5- μm -thick sections from each sample were stained with hematoxylin–eosin and photographed at 6 \times magnification using a Stereoscopic Zoom SMZ800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a Coolpix 990 digital camera (Nikon). Sections of eight lung lobes were studied for each sample. Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) and Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA), were used to quantify the area of each single lesion and the total tissue area on photomicrographs. In all cases, sections were blindly evaluated.

2.7. Fragmented *M. tuberculosis* cells

Liposome preparations of detoxified, fragmented *M. tuberculosis* (RUTI) were kindly provided by Archivel Technologies, s.l. (Mataró, Catalonia, Spain), manufactured under strict GMP standards. The manufacturing process of RUTI has been published elsewhere [17]. Briefly, *M. tuberculosis* H37Rv are cultured for 3 weeks in Middlebrook 7H11 agar at 37 °C, and colonies are carefully removed and mechanically disrupted using silica-zirconia beads in PBS buffer with 4% Triton X-114. After centrifuging at 3000 \times g to remove undisrupted cells, the pellet is centrifuged at 27,000 \times g, the lipidic supernatant is removed and the final product is washed, pasteurized at 65 °C for 40 min and lyophilized. Finally, liposomes are prepared after mixing the cell extracts at high speed with phosphatidylcholine and sodium cholate (20:1.4). The peptide composition of RUTI is determined using SDS–PAGE and Western blot analysis as previously described [17].

2.8. Treatments

Hyperimmune serum (HS) was obtained at week 23 post-infection from DBA/2 mice infected by aerosol with *M. tuberculosis* strain H37Rv Pasteur, treated orally with rifampicin and isoniazid (10 and 25 mg/kg, respectively) for 5 days a week from weeks 9 to 17 post infection. RUTI (245 μg) was administered subcutaneously at weeks 17, 19 and 21 post infection.

Protection studies were carried out in aerosol-infected SCID mice and treated with rifampicin and isoniazid (10 and 25 mg/kg, respectively) from week 3 until week 8. Mice were then divided into two groups and treated with HS (HS group) or non-immune serum from healthy DBA/2 mice (CT group). In both cases, sera were inoculated intraperitoneally with 100 μl of serum every 3 days (a total of four inoculations). Mice were sacrificed at week 10.

The serum obtained from infected DBA/2 mice treated with chemotherapy alone presented only low levels of antibodies against antigen 38 (the \log_{10} of the titer was below 2). Hence, this serum was not used in any other serum-therapy experimental group.

2.9. Humoral response

Western blot was carried out as described [17] following preparative SDS–PAGE (12% acrylamide NuPAGE BisTris Gel, Invitrogen), electrotransferred onto nitrocellulose sheets (Millipore, Bedford, MA, USA) using a semidry transfer method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and cutting into strips corresponding to 16 lanes. The strips were incubated with 1:25 to 1:51,200 diluted sera, or 1:2 to 1:256 diluted bronchoalveolar lavage (BAL) for 1 h at room temperature. Appropriate horseradish peroxidase (HRP)-labeled secondary goat anti-mouse antibody (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA), chemiluminescent substrate Super Signal West Pico (Pierce) and X-ray films Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA) were used. A molecular weight standard was run in each gel (Invitrogen). The humoral response was analyzed using a pre-established peptidic profile (6, 10, 17, 19, 27, 30, 38, 40, 47, 50, 55, 65, 70 kDa) [17].

2.10. Measurement of cytokines in serum

The concentrations of IFN- γ and TNF in serum were measured using specific ELISA kits (Endogen Inc., Cambridge, MA, USA). The detection limit of assays for IFN- γ and TNF was 15 and 5.1 pg/ml, respectively.

2.11. Statistical analysis

Sigma Stat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA) was used to discover differences between experimental groups with the Mann–Whitney rank sum test. Differences were significant for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Treatment of infected mice with HS markedly decreases the number of bacilli in the lungs

Infected SCID mice had $5.98 \pm 0.43 \log_{10}$ c.f.u. in the lungs and $3.51 \pm 0.29 \log_{10}$ c.f.u. in the spleen at 3 weeks after aerosol infection. After five further weeks of chemotherapy these values were $2.98 \pm 0.026 \log_{10}$ c.f.u. and $2.12 \pm 1.02 \log_{10}$ c.f.u., respectively. Fig. 1 shows that serum therapy (HS group) inhibited reactivation after chemotherapy; this inhibition was more evident in the lungs, where mean c.f.u. values decreased by $2 \log_{10}$ (3.68 ± 2.02 vs. $5.72 \pm 1.41 \log_{10}$ c.f.u.). The bacillary counts in the spleen also decreased, although not significantly (4.75 ± 1.84 vs. $5.79 \pm 1.02 \log_{10}$ c.f.u.). It must be highlighted that the lowest point of detection was at $2 \log_{10}$. This explains why six mice had the same values, and indicates that some of them could have even lower counts.

3.2. Serum therapy protects against bacillary dissemination in the lungs

Macroscopic exploration of the lungs in necropsy at week 10 post-infection revealed the presence of big abscesses

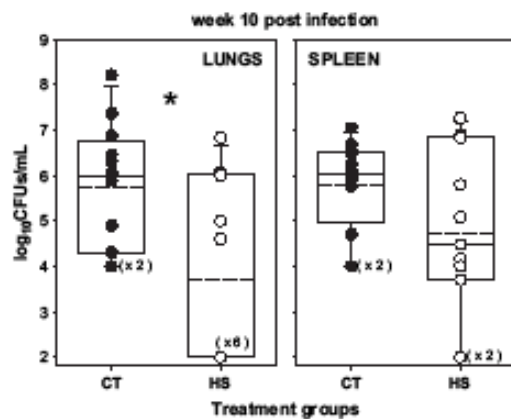


Fig. 1. Bacillary counts at week 10 post-infection in control (CT) animals and animals treated with serum therapy (HS). C.f.u. from lungs and spleens are plotted as individual values from $n = 12$ (control group) and $n = 11$ (HS group) mice and as a box representing statistical values. Continuous and dotted lines within the box indicate the median and the mean values, respectively. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, whereas the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Whisker caps show the 5th and 95th percentile. Differences were significant when marked with an asterisk for $P < 0.05$.

(diameter equal to or higher than 3 mm) in 10 out of 12 mice in the CT (control) group. In contrast, in the HS (serum therapy) group, only 6 out of 11 mice presented abscesses, which were of small size (diameter equal to or smaller than 2 mm). Therefore, only 16.7% of the CT group mice presented no abscesses in the lung, whereas this percentage increased to 45.5% in the HS group. Fig. 2 shows low-power microphotographs of the lobes obtained for histological and histometry studies, revealing an increased number of abscesses and granulomas in the CT group when compared with mice treated with serum therapy at week 10 post-infection (HT group). Granulomas were formed essentially by a macrophage-rich core infiltrated with mononuclear cells and neutrophils (Fig. 3A) that were progressively enlarged by a strong neutrophilic infiltration (Fig. 3B) to form an abscess at the end, i.e. a localized collection of necrotic tissue surrounded almost exclusively by fragmented, and rarely, entire neutrophils.

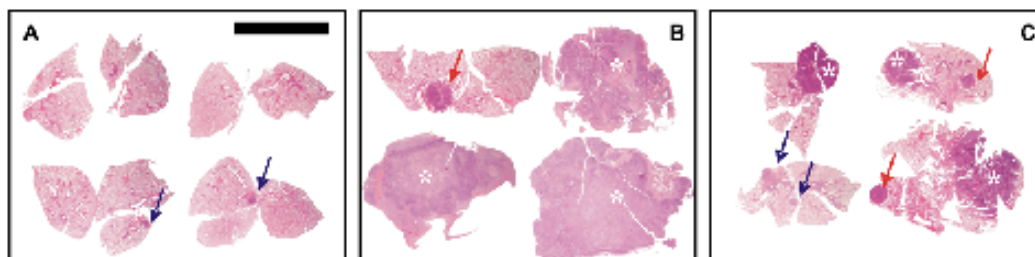


Fig. 2. Histology of representative hematoxylin–eosin stained sections from entire pulmonary lobes at week 8 (A) and week 10 post-infection, at low-power magnification ($10\times$). (B) shows sections from the control (CT) group and (C) shows sections from the group treated with serum therapy (HS). Abscesses are marked with a white asterisk; granulomas are marked with a blue arrow and enlarged granulomas with a red arrow. The bar represents 3 mm.

The percentage of pulmonary granulomatous infiltration, defined as the ratio obtained after dividing the infiltrated area by the total area of the lung section, and then multiplying by 100, decreased significantly (Fig. 4), up to threefold, in the serum-therapy group compared with the control group ($10.33 \pm 0.67\%$ vs. $31.2 \pm 1.77\%$) despite the fact that the global area was higher in the latter.

3.3. Pulmonary cytokine and iNOS expression tend to be lower in the serum therapy group

As seen in Fig. 5, no significant differences were found in the lung expression of IFN- γ , RANTES, TNF, IL-12p40 and iNOS at week 10 of the two groups, although levels were consistently lower in mice treated with HS compared with mice in the CT group.

3.4. Absence of antibodies against peptide 40 to 70 in BAL of SCID mice

Serological titers (\log_{10} of the titer) of IgA and IgM antibodies against the different antigens identified in RUTI, as previously described [17], were below 2. The production pattern of different IgG isotypes in the serum of SCID mice treated with serum therapy (Fig. 6) was the same as the hyperimmune serum (HS) obtained from DBA/2 immunized with RUTI, i.e. IgG2a > IgG2b > IgG1 > IgG3 predominance, although antibodies were much less abundant in SCID mice than in immunized DBA/2 mice (a mean difference of 1 \log_{10} ; data not shown). In SCID mice, levels of antibody in BAL were much lower than in serum and, interestingly, we were not able to detect antibodies against Ag 40 to 70 in BAL.

3.5. Absence of IFN- γ and TNF in the hyperimmune sera

Concentrations of IFN- γ and TNF in the HS were below the detection limits of the commercial kits used.

4. Discussion

After a long period of oblivion, there is an increasing interest in studying antibody-based immunity to understand fully

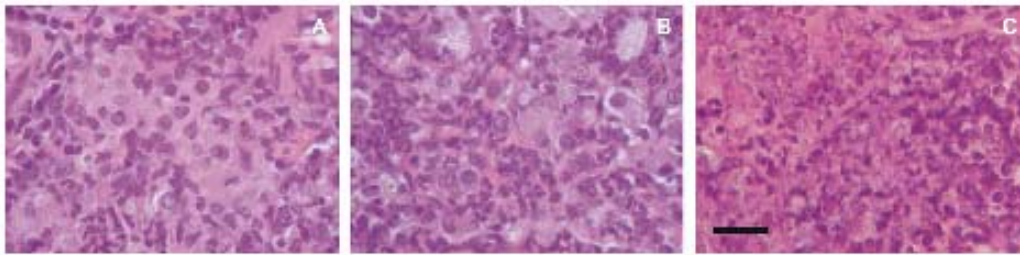


Fig. 3. Histology of the lung lesions at week 10 post-infection at high-power magnification (1000 \times). Granulomas are formed essentially by a macrophage-rich core infiltrated with mononuclear cells and neutrophils (A). Enlarged granulomas have a strong neutrophilic infiltration (B). Abscesses show a localized collection of necrotic tissue surrounded almost exclusively by fragmented, and rarely, entire neutrophils (C). The bar represents 100 μ m.

the immunological response against intracellular pathogens such as *C. neoformans*, *L. monocytogenes*, *E. chaffeensis* and *M. tuberculosis* [9,10,12,15,16]. Experimental murine models have demonstrated that cell-mediated immunity is crucial in controlling infections of these intracellular pathogens; infections by these bacteria mostly elicit responses of specific T cells that activate infected macrophages with IFN- γ or result in direct T-cell cytotoxicity against the infective agent [3]. It is noteworthy that antibody responses were not detected in murine models of tuberculosis induced with an aerosol, or only a limited production against glycolipids [19]. A strong antibody response was only detected during the final stages of infection, when lungs were highly infiltrated by granulomas and mice were close to dying (data not published). Interestingly, in murine models of tuberculosis, the high percentage of B cells in the granulomas found during the chronic phase [5] did not correlate with production of antibodies. Thus, the role of the antibody response to tuberculosis infection is controversial. Furthermore, the comparison between murine experimental models and human tuberculosis reveals important differences. In humans, the initial strong inflammatory response in the infectious foci generates intragranulomatous necrosis (*caseum*), and liquefaction of the caseous foci is the source of a large extracellular bacillary population [20]; this phenomenon is never observed in infected mice. In mice, *M. tuberculosis* spreads both through the bloodstream and by

getting out the pulmonary granulomas through foamy macrophages that occupy the alveolar spaces; it is thought that some of these infected foamy macrophages harbor a single or just a few bacilli (considered to be in a latent state) that may reactivate [18,21].

The complete predominance of cell-mediated immunity in the control of *M. tuberculosis* infection in mice encouraged us to use the model of SCID infection, as other researchers did before [12,16], to remove all specific immunity and thus explore the protective effect of antibody-mediated immunity. We investigated antibody therapy in a mouse model where the extreme virulence of *M. tuberculosis* infection kills 100% of untreated mice in just 4 weeks. Specifically, we wanted to study the protective effect of antibodies against reactivation, for which we used a mouse model treated with a short period of chemotherapy. Since immunotherapy with RUTI [17] allowed the control of reactivation and induced a bactericidal activity, we hypothesized that protection was effected not only by triggering a poly-antigenic Th1 or a cytotoxic response, but also by the strong antibody response elicited following inoculation with RUTI. Although chemotherapy by itself is a strong inducer of antibody production in humans and potentially plays some role in the control of the bacilli [22,23], this is not the case in mice. Using DBA/2 mice, the production of antibodies after chemotherapy is very limited, as reported above and previously described [17]. On the other hand, this production

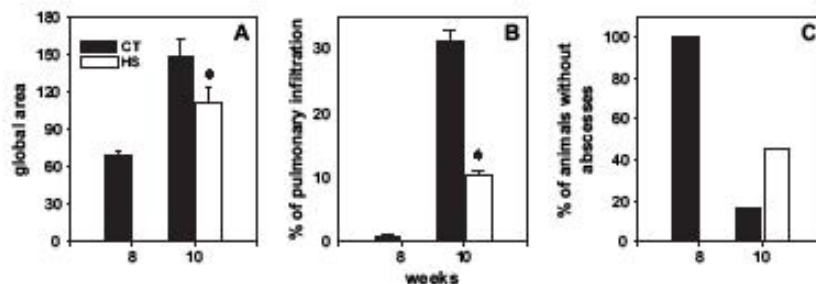


Fig. 4. Quantification of pulmonary infiltration in the lung at week 10 post-infection in control (CT) and serum-therapy (HS) groups. (A) shows the global area of the stained lobes in pre-established (arbitrary) area units. (B) shows the percentage of pulmonary infiltration obtained after dividing the infiltrated area by the total area of the lobes, and then multiplying the result by 100. Values represent the mean value and standard deviation from $n = 12$ (control group) and $n = 11$ (HS group) mice. Differences were significant when marked with an asterisk for $P < 0.05$. (C) shows the percentage of animals without abscesses.

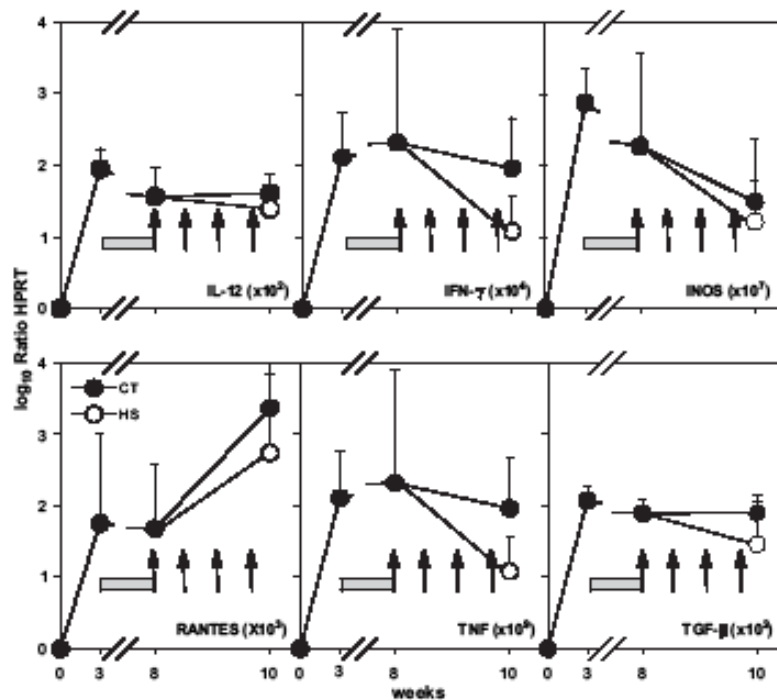


Fig. 5. Expression of cytokines, RANTES and iNOS in the lungs. These are expressed as the \log_{10} of the ratio obtained after dividing every value by the expression of HPRT in each sample and multiplying it by a factor (ranging from 10^2 to 10^5). No significant differences between CT and HS groups were detected. Arrows show every HS inoculation. The grey bar shows the chemotherapy period.

is quite higher in C57BL/6. Thus, future experiments will dissect the individual contributions of each of these factors to the generation of protective serum antibodies.

In fact, the result obtained after inoculation with HS from previously immunized mice overwhelmed all expectations. This was already evident at a macroscopic level, when no large abscesses were found in passively-immunized mice; bacillary load was 100-fold lower in treated mice compared with untreated, with up to threefold differences in pulmonary infiltration between the HS and CT groups. Besides, the bacillary reduction was correlated with a decrease in the inflammatory response in the HS group. Whether such a reduction is proportional to the bacillary load or on the contrary, remains relatively higher and helps the control of bacillary growth, is not known, and should be clarified in future studies.

Globally, these data suggest that the protective effect is localized in the intra-alveolar space, because it is known that the control of bacterial reactivation is associated to the control of pulmonary dissemination [21]. Furthermore, HS therapy appears to have little effect on the spleen, consistent with a limited systemic effect of HS therapy. Concerning the mechanisms involved in the control of infection, our data only indicate that it is independent of the presence of a Th1 response, as suggested by other authors [24,25]. The suggestion that protection of serum therapy in our experiments is independent of a Th1 response is supported by the type of hosts

used (SCID mice), by the finding that the expression of Th1-associated cytokines did not increase upon treatment, and also because the response was not mediated by IgA antibodies. The levels of IgA and IgM were negligible in the hyperimmune serum and, therefore, the protective effect appears to be mediated only by IgG antibodies. This data confirms the protective effect of IgG recently found by Hamasur et al. [26], who have demonstrated the protective value of IgG mAbs against LAM.

A protective role of IgG mAbs in experimental models of murine tuberculosis is also suggested in the literature in experiments that used *M. tuberculosis* or BCG cells pre-coated with mAbs before inoculation in mice. Specifically, *M. tuberculosis* cells coated with IgG3 against arabinomannan (AM) enhanced granulomatous formation and survival of intracheally inoculated mice [27]; *M. bovis* BCG cells coated with IgG2a and IgG3 anti heparin-binding hemagglutinin adhesin (HBHA) mAbs before intranasal inoculation limited extrapulmonary dissemination and reduced the number of bacilli in the spleen [28], whereas *M. bovis* cells coated with IgG2b anti-MPB83 mAbs before intravenous inoculation increased long-term survival but did not reduce the bacterial load [29]. In our study, we obtained a strong humoral response against a wide antigenic range with an IgG2a-IgG2b > IgG1 > IgG3 predominance. Additional studies are required to identify with greater precision the serum

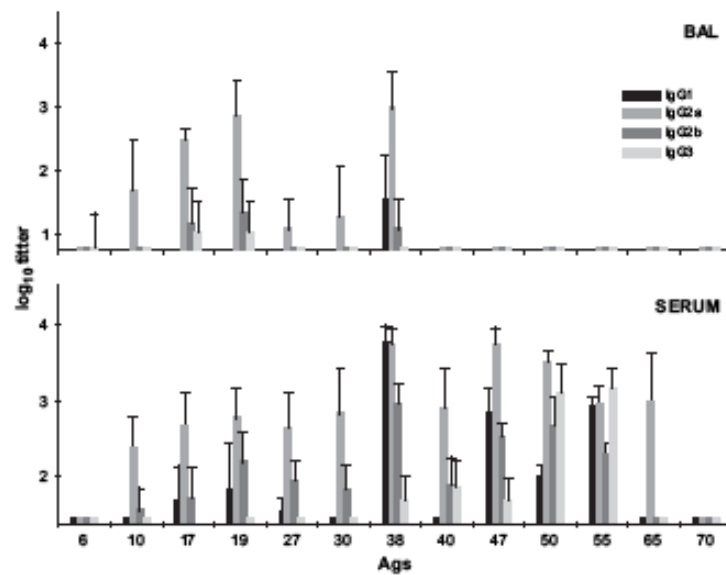


Fig. 6. IgG antibody levels in serum and BAL at week 10. Western blots were carried out using 1:25 to 1:51,200 diluted sera, or 1:2 to 1:256 diluted BAL. The results are the mean values and the standard deviations of the sera obtained from the 11 mice of the serum-therapy (HS) group for each time point.

fraction(s) that is (are) responsible for the protective effect described in this work (immunoglobulin fraction, fractionation by antibody isotype, etc).

In conclusion, passive immunization using antibodies generated against fragmented *M. tuberculosis* cells protects against reactivation of tuberculosis in SCID mice treated for a short period of time with chemotherapy, thus supporting the hypothesis that antibody-mediated immunity plays a central role in controlling *M. tuberculosis* infection.

Acknowledgements

This work was supported in part with grants from SEPAR and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 01/3104, 02/545 and 03/0757) and Archivel Technologies s.l. E.G. received a research grant from the Spanish Society for Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC). We thank Ms. Marga Ortiz from the Center for Animal Experimentation, and the technicians of the Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, for their technical support, and Deborah Culler Young for her excellent English style revision.

References

- [1] I.E. Fleisch, S.H. Kaufmann, Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tum or necrosis factor, *Infect. Immun.* 58 (1990) 2675–2677.
- [2] A.M. Cooper, D.K. Dalton, T.A. Stewart, J.P. Griffin, D.G. Russell, I.M. Ome, Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 2243–2247.
- [3] J.L. Flynn, J. Chan, Immunology of tuberculosis, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 93–129.
- [4] J.E. Grotzke, D.M. Lewinson, Role of CD8(+) T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Microbes Infect.* 7 (2005) 776–788.
- [5] M. Gonzalez-Juarren, O.C. Tumer, J. Tumer, P. Marietta, J.V. Brooks, I.M. Ome, Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1722–1728.
- [6] A. Glatman-Freedman, A. Casadevall, Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 514–532.
- [7] A.M. Costello, A. Kumar, V. Narayan, M.S. Akbar, S. Ahmed, C. Abou-Zeid, G.A. Rook, J. Stanford, C. Moreno, Does antibody to mycobacterial antigens, including lipooligosaccharide, limit dissemination in childhood tuberculosis? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86 (1992) 686–692.
- [8] C. Sanchez-Rodriguez, C. Estrada-Chavez, J. Garcia-Vigil, F. Laredo-Sanchez, J. Halabe-Cherem, A. Pereira-Suarez, R. Mancilla, An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 6 (2002) 706–712.
- [9] A. Williams, R. Reljic, I. Naylor, S.O. Clark, G. Falero-Diaz, M. Singh, S. Challacombe, P.D. Marsh, J. Ivanyi, Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs, *Immunology* 111 (2004) 328–333.
- [10] A. Glatman-Freedman, Advances in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy, *HEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39 (2003) 9–16.
- [11] J.S. Li, E. Yager, M. Reilly, C. Freeman, G.R. Reddy, A.A. Reilly, F.K. Chu, G.M. Winslow, Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Bhrobacteria chaffensis*, *J. Immunol.* 166 (2001) 1855–1862.
- [12] G.M. Winslow, E. Yager, K. Shilo, E. Volk, A. Reilly, F.K. Chu, Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Bhrobacteria chaffensis* during active infection, *Infect. Immun.* 68 (2000) 2187–2195.
- [13] G.B. Mackaness, Cellular resistance to infection, *J. Exp. Med.* 116 (1962) 381–406.

- [14] A. Casadevall, Antibody immunity and invasive fungal infections, *Infect. Immun.* 63 (1995) 4211–4218.
- [15] F. Dromer, J. Chamerelle, A. Contrepoint, C. Caillon, P. Yeni, Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody, *Infect. Immun.* 55 (1987) 749–752.
- [16] B.T. Edelson, P. Cossart, E.R. Unanue, Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection, *J. Immunol.* 163 (1999) 4087–4090.
- [17] P.J. Cardona, I. Amat, S. Gordillo, V. Arcos, E. Guirado, J. Diaz, C. Vilaplana, G. Tapia, V. Ausina, Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis, *Vaccine* 23 (2005) 1393–1398.
- [18] P.J. Cardona, S. Gordillo, J. Diaz, G. Tapia, I. Amat, A. Pallares, C. Vilaplana, A. Ariza, V. Ausina, Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect. Immun.* 71 (2003) 5845–5854.
- [19] P.J. Cardona, E. Julián, X. Vallés, S. Gordillo, M. Muñoz, M. Luquin, V. Ausina, Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis, *Scand. J. Immunol.* 55 (2002) 639–645.
- [20] S.B. Lucas, in: P.D.O. Davies (Ed.), *Histopathology, Clinical Tuberculosis*, vol. 8, Chapman and Hall, London, 1998, pp. 113–127.
- [21] P.J. Cardona, R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, I. Ojanguen, A. Ariza, V. Ausina, Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*, *Scand. J. Immunol.* 52 (2000) 156–163.
- [22] L.M. Pereira Arias-Bouda, S. Kuijper, A. Van Der Werf, L.N. Nguyen, H.M. Jansen, A.H.J. Kolk, Changes in avidity and level of immunoglobulin G antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in sera of patients undergoing treatment for pulmonary tuberculosis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (2003) 702–709.
- [23] G.H. Bothamley, Epitope-specific antibody levels demonstrate recognition of new epitopes and changes in titer but not affinity during treatment of tuberculosis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (2004) 942–951.
- [24] Y. Zhang, S. Pacheco, C.L. Acuna, K.C. Switzer, Y. Wang, X. Gilmore, G.R. Harman, I.N. Mbaruike, Immunoglobulin A-deficient mice exhibit altered T helper 1-type immune responses but retain mucosal immunity to influenza virus, *Immunology* 105 (2002) 286–294.
- [25] T. Moore, C.O. Ekwoomada, E.O. Eko, L. MacMillan, K. Ramey, G.A. Ananaba, J.W. Patrickson, P.R. Nagappan, D. Lyn, C.M. Black, J.U. Igieleme, Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 617–624.
- [26] B. Hammar, M. Haile, A. Pawlowski, U. Schröder, G. Källenius, S.B. Svenson, A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab')₂ fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin. Exp. Immunol.* 138 (2004) 30–38.
- [27] R. Teitelbaum, A. Glatman-Freedman, B. Chen, J.B. Robbins, E. Unanue, A. Casadevall, B.R. Bloom, A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 15688–15693.
- [28] K. Pethe, S. Alonso, F. Biet, G. Delogu, M.J. Brennan, C. Locht, F.D. Menozzi, The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination, *Nature* 412 (2001) 190–194.
- [29] M.A. Chambers, D. Gavriel-Widen, R.G. Hewinson, Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41 (2004) 93–100.

8 ANNEX: ALTRES PUBLICACIONS

Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona PJ. **RUTI induces a strong polyantigenic cellular immunity and controls pulmonary pathology and bacillary concentration in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis.** (enviat a *Clinical and Vaccine Immunology*, Febrer 2008)

RUTI induces a strong polyantigenic cellular immunity and controls pulmonary pathology and bacillary concentration in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis

^{1,2}Evelyn Guirado, ^{1,2}Olga Gil, ¹Neus Cáceres, ³Mahavir Singh, ^{1,2}Cristina Vilaplana, ^{1,2}Pere-Joan Cardona*

¹Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Crta del Canyet s/n, 08916, Badalona, Catalonia, Spain. ²CIBeRES. Spain. ³Lionex Diagnostics & Therapeutics GMBH, Braunschweig, Germany.

Short title: RUTI induces strong polyantigenic cellular immunity

***Corresponding author:** Pere-Joan Cardona, MD, PhD. Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Microbiology, Fundació Institut per a la Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Crta del can Ruti, camí de les escoles s/n, 08916 Badalona, Catalonia, Spain.

E-mail: pcardona@ns.hugtip.scs.es.

Tel.: +34 93 497 86 86

Fax: +34 93 497 86 54

5746 words including the abstract

◇Parts of this study were presented at the Keystone Symposia – Tuberculosis: From Lab Research to Field Trials, Vancouver, BC, Canada, March 20-25, 2007.

Abstract

RUTI is a therapeutic vaccine generated from detoxified and liposomed *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) cell fragments that has demonstrated its efficacy in the control of bacilli reactivation after short-term chemotherapy. The aim of the study was to characterize the cellular immune response generated after short-period chemotherapy supplemented by therapeutic administration of RUTI and to corroborate the lack of toxicity of the vaccine. Three different experimental models were used: mice infected either intraperitoneally or by low-dose aerosol and guinea pigs infected by aerosol. RUTI-treated animals showed the lowest bacillary load in the three experimental models used. RUTI also decreased the percentage of pulmonary granulomatous infiltration in mice, as well as the pathology scoring in the guinea-pig model. To investigate cellular immunity in these animals, IFN- γ production was monitored through intracellular staining, ELISPOT and ELISA assays following cell-stimulation with a wide range of MTB specific structural and secreted antigens. Our data show that the difference between the therapeutic administration of BCG and RUTI resides in the strong activation of IFN- γ ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ cells against PPD, ESAT-6 and Ag85B; comparison of RUTI-treated mice with mice treated only with short-term chemotherapy also implicates other MTB structural antigens, like 16, 19 and 38 kDa and hsp65, in vaccine-induced cellular-mediated immunity. The results show that RUTI plays a protective role in the control of latent tuberculosis infection by triggering a Th1-specific immune response against structural and growth-related antigens that reduces both the bacillary load and pulmonary pathology.

241 words

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, murine model, mycobacterial antigens, IFN- γ , cell-mediated immunity, latent tuberculosis infection, therapeutic vaccine RUTI.

Introduction

Tuberculosis (TB) was one of the first infectious diseases for which an etiologic agent, the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), was identified, more than 100 years ago. In fact, it was one of the first pathogens to which a vaccine, the BCG, was developed (1,2). In spite of this, MTB still generates a latent tuberculosis infection (LTBI) in one-third of humans and kills 2 million people every year, more than any other infectious disease, including AIDS and Malaria (3). This fact implies a fabulous reservoir of TB that renders the objective of controlling the disease in the short or middle term very difficult. These data clearly indicate that developing therapies against LTBI remains a priority and that new vaccines and drugs are needed to control it. In addition, it is crucial to understand the nature of LTBI better to enable the development of new antituberculous tools.

The induction of LTBI has been classically related to the generation of latent MTB bacilli. It has been proposed that the induction of intragranulomatous necrosis and the stressful extracellular environment (where bacilli find a local environment with low pH, a high number of catalytic enzymes and a mixture of toxic radicals), as well as the specific immune response, are responsible for inducing a nonreplicative state (NS) and thus latent bacilli (LB) (4).

Classical observations have demonstrated that LB are different from actively growing bacilli because they are more able to resist stressful conditions (heat, low pH, ROIs) (5), which may be why immunity against MTB is mainly triggered against the latter. Immunity against growing bacilli is focused against soluble antigens related to the multiplication of the bacilli, such as complexes ESAT-6/CFP-10 or Antigen 85 A/B. Although it has been recently confirmed that LB have a slower growth rate (6) which make them more resistant to stress (5), little is known about which are the main antigens related to LB.

The present gold-standard therapy against LTBI is based on the administration of isoniazid (INH) for a 9-month period (7). The fact that INH is only active against growing bacilli led us to elaborate the “dynamic hypothesis” of LTBI (4). The dynamic hypothesis is based on the idea that LTBI persists as a consequence of the constant

endogenous re-infection by LB that manage to escape the intragranulomatous necrosis areas drained by foamy macrophages. By reaching the alveolar fluid, these LB are able to form part of the aerosols induced to condition inspired air (8). When administering INH for a long period, the host has the opportunity to drain all the LB without having the risk of re-infection.

We previously observed that the cessation of Chemotherapy (Qx) in the TB murine model led to the reactivation of bacillary growth, as Qx also lowered the local immunological response (9). We hypothesized that the quick increase of the immunological response that was achieved with the immediate administration of the RUTI vaccine after cessation of a short period of Qx (4) inhibited the reactivation of any remaining bacilli (mainly LB). The composition of RUTI, made with fragmented MTB cells grown under stressful conditions, might have a wide-enough antigenic composition to help boost or induce new specific T cells. These T cells recognize epitopes shown by new macrophages, which return to the remaining granulomas to phagocyte LB; these various epitopes provided by the RUTI vaccine would otherwise remain “invisible” to the usual immune response. The main aim of this paper was to demonstrate the presence of such a wide immunological response.

So far, RUTI has already demonstrated its efficacy in controlling MTB infection in mice and guinea pig experimental models after a short-period of Qx. The mechanism of action of RUTI has been partially studied, by quantification of different IgG isotypes against fragments of MTB through western blotting, and is characterized by the induction of a mixed Th1/Th2/Th3 strong polyantigenic response (10,11). We have also demonstrated that RUTI plays a crucial role in controlling the reactivation of MTB infection in SCID mice after receiving serum from mice treated with RUTI, thus demonstrating the protective role of the antibody mediated immunity (12).

On the other hand, it has been postulated that therapeutic vaccination would be toxic for the host already infected by MTB, an effect known as the Koch phenomenon (13,14,15). The development of RUTI is also based on previous experiences in our group, in which we related the Koch phenomenon to a kind of local Schwartzman reaction caused by endotoxin-like molecules, rather than caused by a specific immunity triggered against MTB (16,17). To avoid such reactions, MTB fragments used in the

RUTI vaccine are cleaned with Triton, in order to remove those endotoxin-like molecules from the cell wall surface. Demonstration of a lack of toxicity is also a paramount issue in the development of vaccines. For this reason we have also tested the efficacy of RUTI in the guinea pig model, which has a special susceptibility to the reinoculation of MTB antigens (18).

The present study confirms that the inoculation of RUTI induces a polyantigenic response after short term Qx, related to both the reduction of the bacillary load and pulmonary pathology.

Material and methods

2.1. Animals

Specific pathogen-free (*spf*) C57BL/6, female mice, 6 weeks old as well as female outbred Dunkin-Hartley guinea pigs (weighing 200-240g at the beginning of the experiment) were provided by Harlan Iberica (Sant Feliu de Codines, Catalonia, Spain).

The animals were shipped in appropriate conditions with corresponding certificate of health and origin. All the animals were kept under standard controlled conditions in a P3 High Security Facility with sterile food and water *ad libitum*.

2.2. Animal health

Mice were checked every day following a protocol that paid attention to weight loss, apparent good health (bristled hair and wounded skin) and behavior (signs of aggressiveness or isolation). Guinea pigs were weighed once a week and checked every day for pain and distress using a modified Karnofsky scale (19). Mice were euthanized with a halothane overdose and guinea pigs were euthanized with ketamine (100mg/kg), plus diazepam (5mg/kg) overdose if required, in order to avoid any suffering. Sentinel animals were used to check *spf* conditions in the facility. Tests for 25 known mouse pathogens were all negative.

All experimental proceedings were approved and supervised by the Animal Care Committee of “Germans Trias i Pujol” University Hospital in agreement with the European Union Laws for protection of experimental animals.

2.3. *Bacteria and infection*

2.3.1 *Bacteria*

MTB strain H37Rv Pasteur was grown in Proskauer Beck medium containing 0.01% Tween 80 to mid-log phase and stored at -70°C in 2 ml aliquots.

2.3.2 *MTB aerosol infection*

In the aerosol infection model, animals were placed in the exposure chamber of an airborne infection apparatus (Glas-col Inc., Terre Haute, IN, USA). The nebulization provided an approximate uptake of 20-50 bacilli to mice lungs and 10 bacilli to guinea pig lungs (20).

2.3.3 *MTB intraperitoneal infection*

In the intraperitoneal (IP) infection model, mice were challenged with 1×10^5 Colony Forming Units (CFUs).

2.3.4 *CFUs*

The number of viable bacteria in target organs was determined at various time-points by plating serial dilutions of whole organ homogenates on nutrient Middlebrook 7H11 agar (Biomedics s.l., Madrid, Spain) and counting bacterial colonies after 21 days incubation at 37°C . Special care was taken to avoid hilar lymph nodes when removing the left lungs of mice, to prevent an artificial increase of CFUs values. Data were expressed as the \log_{10} of the mean number of bacteria recovered per organ.

2.4. *RUTI*

RUTI vials were kindly provided by Archivel Farma s.l. (Mataró, Catalonia, Spain), manufactured under strict GMP standards. The manufacturing process of the therapeutic vaccine RUTI has been published elsewhere (10). Briefly, MTB H37Rv are cultured for 3 weeks on Middlebrook 7H11 agar at 37°C and colonies are carefully removed and mechanically disrupted using silica-zirconia beads in PBS buffer with 4% of Triton X-114. After centrifuging at $3000 \times g$ to remove undisrupted cells, the pellet is centrifuged at $27000 \times g$, the lipidic supernatant is removed and the final product is washed, pasteurized at 65°C for 40 min and lyophilized. Finally, liposomes are prepared after mixing the cell extracts at high speed with phosphatidylcholine and sodium cholate

(20:1.4). The peptide composition of RUTI is determined using SDS-PAGE and Western blot analysis as previously described (10).

2.5. *Antigens*

PPD and BCG were obtained from the Statens Serum Institute (SSI, Copenhagen, Denmark). The rest of the antigens, ESAT-6, Ag 85B, CFP-10, Ag 38kDa, Ag 16kDa, Ag 40kDa, Ag 19kDa, MPT64 and hps65, were kindly provided by Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH (Braunschweig, Germany).

2.6. *Treatments and immunizations*

2.6.1 *Chemotherapy*

Studies were carried out in aerosol-infected mice and guinea pigs, and IP infected mice. Mice were treated with Qx from 6 to 14 weeks post-infection in the aerosol model, and from 3 to 9 weeks post-infection in the IP infection model. Guinea pigs were treated with Qx from 4 to 8 weeks. Qx in mice consisted of oral treatment with INH plus rifapentin (RIF) (25 and 10 mg/Kg, respectively), once a week. Qx in guinea pigs was oral, using INH plus rifampicin (RIF) (25 and 10 mg/Kg, respectively) in a 5% sucrose solution, 5 days a week.

2.6.2 *Immunotherapy*

In the aerosol infection models (Figure 1), three groups of animals were defined. The first group, the “control non-vaccinated group” and the “vaccinated group”, that received PBS or RUTI respectively at fixed time points (Figure 1) The third group, the “control vaccinated group”, received a single dose of BCG (2×10^6 CFU) at week 14 and PBS at week 17 in mice, or one dose of BCG at week 8 and PBS at week 11 if guinea pig. Different batches were used: batch B04 (277 μ g) in mice and batch A03 (245 μ g) and A04 (262 μ g) in guinea pigs.

In the IP-infection model, three groups of mice were defined. The first group, the “control infected group”, received nothing. The second group, the “control Qx-treated group”, only received Qx (INH plus RIF from 3 to 9 weeks). The third group, the “vaccinated group”, received Qx plus two doses of RUTI of batch A05 (285 μ g) at weeks 9 and 11.

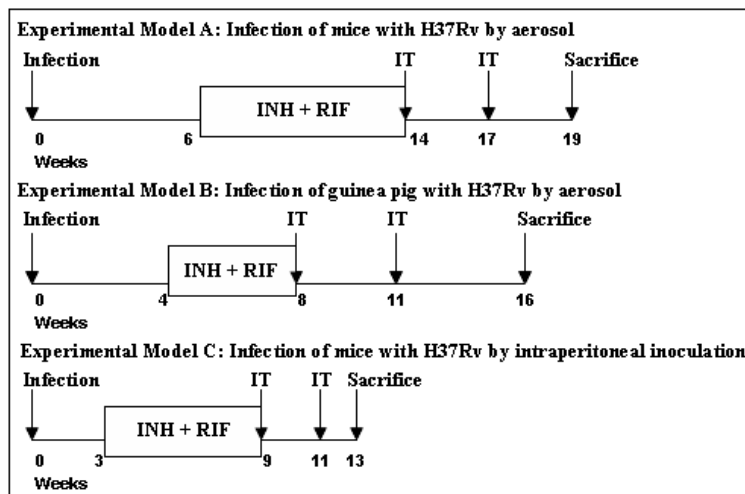


Figure 1. Designs of the experimental animal models used in this study. In the **Model A** mice were infected with a low dose aerosol with H37Rv, short-term chemotherapy with isoniazid (INH) plus rifampicin (RIF) and Immunotherapy (IT) with RUTI or BCG. In the **Model B** guinea pigs are infected through a low dose aerosol with H37Rv. Chemotherapy was shorter than in the previous one, 4 weeks instead of 8, and only two experimental groups were included, Qx and Qx plus RUTI. In the **Model C** mice were intraperitoneally inoculated with the same MTB strain, short-term chemotherapy with isoniazid plus rifampicin and Immunotherapy with RUTI. In this case, a control infected non treated group was included.

2.7 Measurement of delayed hypersensitivity response (DTH)

For the DTH evaluation, each mouse received an injection of PPD (batch RT-49, 5 μ g) into the hind foot-pad. Swelling at the hind foot-pad was measured by an engineer's micrometer before and 24 hours after the infection.

2.8. Histology and morphometry in mice

Procedures have been described previously (12). Briefly, two right-lung lobes from each mouse were fixed in buffered formalin and subsequently embedded in paraffin. Every sample was stained with hematoxilin-eosin, thrichromic of Masson and Ziehl Neelsen.

For histometry, 5 μ m thick sections from each specimen were stained with hematoxilin-eosin and photographed at 6x using a Stereoscopic Zoom SMZ800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a Coolpix 990 digital camera (Nikon). Sections of 8 lung lobes were studied in each case. A sequence of appropriate software programs was used: Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) and Photoshop 5.0 (Adobe Systems Incorporated, San José, California, USA), to determine the area of each single

lesion and the total tissue area on photomicrographs. Sections were blindly evaluated in order to get a more objective measurement.

2.9. Pathology score in lung of guinea pig

All lung lobes, left apical, left cardiac, left diaphragmatic, right apical, right cardiac and right diaphragmatic, were examined individually and the Pathology Scoring was quantified using the standards adapted from Vordermeier *et al.* (21) detailed in table 1.

Table 1: Pathology scoring in the lungs of guinea pigs

Value (points)	Type of lesion
0	no visible lesions
1	1 lesion of <2mm in diameter
2	<5 lesions of <2mm in diameter
3	>6 lesions of <2mm in diameter or a single distinct gross lesion of >5mm in diameter
4	>1 lesion of >5mm in diameter
5	1 coalescent lesion
+1 point	for each coalescent lesion (10 maximum)
+0.1 point	for each lesion of <2mm in diameter

2.10. EX VIVO analysis of antigens-specific T cells

2.10.1. IFN- γ Intracellular staining and Flow Citometry

Cell suspensions obtained from splenocytes of individual mice, at different weeks post-infection, were cultured (5×10^5 cells/well) overnight with the antigens in a 96-well round bottom plate at 37 °C and 5% CO₂.

The antigens were PPD (10 μ g/mL), ESAT-6, Ag 85B, Ag 38kDa and Ag 16kDa (all of them at a final concentration of 5 μ g/mL). Cells stimulated with NA/LE anti-mouse CD3 (CD3 ϵ chain, clone 145-2C11) plus NA/LE anti-mouse CD28 (clone 37.51) served as positive controls, whereas stimulated with media alone served as negative controls. The following antibodies used for immunophenotyping were purchased from BD Biosciences: FITC anti-mouse CD4 (L3T4, clone RM4-5), PE-Cy5 anti-mouse CD8a (Ly-2, clone 53-6.7), PerCP anti-mouse CD45 (Leukocyte common antigen, Ly-5, clone

30-F11), APC anti-mouse IFN γ (clone XMG1.2) and APC anti-mouse IgG1 isotype control.

Intracellular staining was assayed with a Flow Cytometry Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit and BD GolgiStop (BD Biosciences, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations. In brief, surface and intracytoplasmic antigen-staining were performed sequentially: the inhibition of IFN- γ secretion was done with Golgistop (monensin) for an additional 4 hours; cells were washed twice with staining buffer (1% fetal calf serum in PBS). Cells were stained first for surface markers (20 minutes, 4 °C, in the dark), washed with staining buffer, followed by a permeabilization step with Cytofix/Cytoperm (50 μ l). Finally cells were incubated with anti-IFN- γ antibody (30 minutes, 4 °C, in the dark). Unbound antibody was removed by washing; cells were resuspended in perm/wash buffer and transferred to FACS tubes.

A total of 250.000 cells from the lymphocyte gate for each sample were acquired for analysis. Data were collected using a Flow Cytometer (FACSCalibur; BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Diego, CA). Lymphocytes were identified by their characteristic size (forward light scatter) and granularity (side light scatter) and by lymphocyte surface phenotype.

2.10.2. ELISPOT

Activated antigen-specific IFN- γ secreting T-cells were detected using the BD murine IFN- γ ELISPOT kit (BD Bioscience, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, cell suspensions obtained from spleen of individual mice, at different weeks post-infection, were added to wells at an initial concentration of 2.5×10^5 cells/well.

Cells were stimulated with PPD (10 μ g/mL), BCG (10^6 CFUs), ESAT-6, Ag 85B, Ag 38kDa, Ag 16kDa, Ag 40kDa, Ag 19kDa, CFP-10, MPT64 and Hsp65 (all of them at a final concentration of 5 μ g/mL). PMA (5 ng/ml, Sigma) plus ionomycin (500 ng/ml, Sigma) stimulated cells served as positive controls, whereas non-stimulated served as negative control. The plate was incubated overnight at 37°C and 5% CO $_2$.

Next day, the plate was incubated with detection antibody (a biotinylated anti-mouse IFN- γ antibody), for 2 hours at room temperature. Unbound detection antibody was removed by washing and the enzyme conjugate (Streptavidin-HRP) was added. Following 1 hour incubation at room temperature, unbound enzyme conjugate was removed by washing and the plate stained with an AEC substrate solution for 20 minutes. The plate was washed, allowed to air dry overnight, and Spot Forming Units (SFUs) counted using an Elispot Reader.

2.11. Cytokine ELISA

Cell suspensions obtained from spleen of individual mice at different weeks post-infection, were cultured (5×10^5 cells/well) during 4 days with the antigens in 96-well round-bottom plates at 37 °C and 5% CO₂.

The antigens were PPD (10 μ g/mL), BCG (10e6 CFUs), ESAT-6, Ag 85B, Ag 38kDa, Ag 16kDa, Ag 40kDa, Ag 19kDa, CFP-10, MPT64 and Hsp65 (all of them at a final concentration of 5 μ g/mL). Supernatants were collected after 96 hours and production of IFN- γ was assayed by a double-sandwich ELISA kit (Diaclone, Besançon, France), according to the manufacturer's recommendations. The detection limit of the assay was 15pg/mL. OD was read in a multiscan plate reader at 450nm with a 620nm reference OD and concentrations were determined after correction of background values.

2.12. mRNA Quantification

Protocols for mRNA quantification have been described elsewhere (12). In short, the middle right lobe of the lungs was removed and frozen with RNA Later (AMBION, Woodward Austin, Tx, USA) at -20 °C, for extraction of total mRNA. RNA extraction was performed using TRIzol (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) in combination with FastPrep Products (Qbiogene Inc., Illkirch, France). Lysing matrix B tubes were filled with an adequate volume of TRIzol and samples were homogenized in the cell fragmenter FastPrep FP120 for two cycles of 45 and 20s at maximum speed, chilling on ice between cycles. Subsequent steps of RNA extraction were performed following the manufacturer's recommendations.

Total RNA concentration was determined by spectrophotometry with a nanodrop (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) and, in addition, a denaturing

agarose gel was used to check RNA stability. Total RNA was subjected to a DNase treatment with DNA-free kit (Ambion, Woodward Austin, TX, USA).

Then, 5µg RNA were reverse transcribed using a Transcriptor Reverse Transcriptase kit (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID, USA) according to manufacturer's recommendations, using OligodT (Gibco BRL) to obtain cDNA. The quantitative analysis of IFN-γ, TNF-α, INOS, RANTES, IL-4, IL-10 and IL-12p40 was performed using a LightCycler™ System (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID, USA). Real-time PCR was carried out in glass capillaries to a final volume of 10µl in the presence of 1µl of 10X reaction buffer (Taq Polymerase, dNTPs and SYBRGreen), 1µl of cDNA (or water as a negative control), MgCl₂ to a final concentration of 0,8mM and primers to a final concentration of 0,5µM.

Following PCR, a single peak was present in the melting-curve analysis, corresponding to a single species of the appropriate estimated size on agarose gel electrophoresis. Expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA expression was analyzed for every target sample to normalize for efficiency in cDNA synthesis and RNA loading. A ratio based on the HPRT mRNA expression was obtained for each sample.

2.13. Statistical analysis

SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San José, CA, USA) was used to compare values. Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistical significance was determined using paired two-tailed Student T-test or One Way Anova test. Differences were significant when marked with * for $p < 0.05$.

RESULTS

3.1. Immunotherapy with RUTI after short-period chemotherapy decreases the number of bacilli in the lungs

Figure 2 shows the effect of RUTI administration on the bacterial load in the three different experimental models studied: either aerosol-infected mice or guinea pigs or mice infected intra-peritoneally.

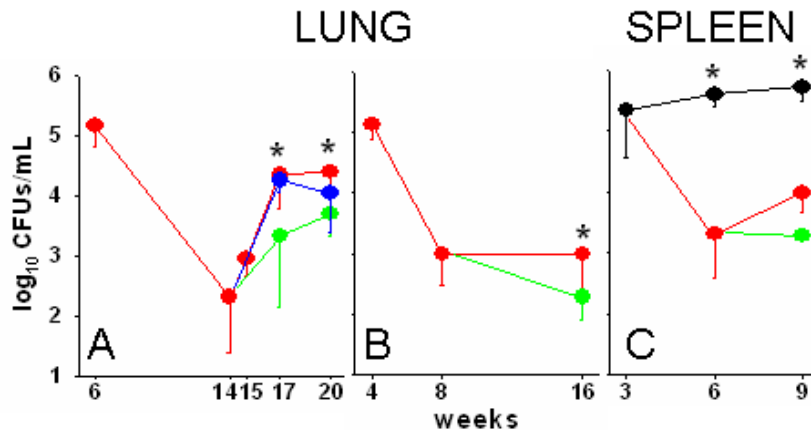


Figure 2. **A.** Bacillary concentration in the lung of aerosol infected mice. After infection, mice were treated with INH/RIF from week 6-14 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 14 and 17 (in green) or BCG at week 14 (in blue). **B.** Bacillary concentration in the lung of aerosol infected guinea pig. After infection, guinea pig were treated with INH/RIF from week 4-8 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 8 and 11 (in green). **C.** Bacillary concentration in the lung of IP infected mice. After infection, mice were non-treated (in black), treated with INH/RIF from week 3-9 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 6 and 9 (in green). The results are given as mean values with standard deviations obtained from 4 to 6 mice for each time point. Differences with control were significant when marked with * for $p < 0,05$ (t-test).

Mice experimental models showed reactivation after Qx, which was controlled in the group to whom RUTI was administered, although no bactericidal effect was observed. In the guinea pig model, no reactivation was seen in the control group, but a bactericidal effect was shown after RUTI vaccination. Figure 2A shows that inoculation of BCG did not reduce significantly the bacterial load in the only model that was tested, the aerosol model in mice.

3.2. RUTI protects against bacillary dissemination in the lungs and does not cause any toxic effect

Since the granulomatous infiltration response plays a critical role in controlling mycobacterial dissemination, we examined the granulomatous infiltration in the lungs. The percentage of pulmonary granulomatous infiltration, defined as the ratio obtained after dividing the infiltrated area by the total area of the lung section, and then multiplying by 100, decreased significantly in the RUTI group after Qx compared to the control group, in the aerosol infection model in mice (Figure 3). The quality of the lesions did not differ among the experimental groups and neither intragranulomatous nor pyogranulomatous necrosis were detected in any case.

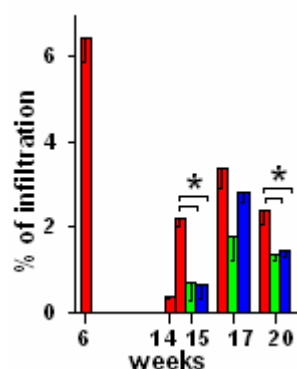


Figure 3. Quantification of the granulomatous infiltration in the lung of aerosol infected mice. After infection, mice were treated with INH/RIF from week 6-14 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 14 and 17 (in green) or BCG at week 14 (in blue). Picture shows the percentage of pulmonary infiltration obtained after dividing the area of granulomatous infiltration by the total area of the lobes multiplied by 100. Values represent the mean value and standard deviation. Differences with control were significant when marked with * for $p < 0.05$ (t-test).

In the experiments performed with guinea pigs, we examined all the pulmonary lobes individually. A pathology scoring method adapted from that employed for cattle (21) was applied to quantify the severity of disease. In our case, we noticed a slight reduction in the number of lung lobes infected, as well as reduced lung pathology scoring, in RUTI-vaccinated animals compared with the control group consisting of Qx-treated only (Figure 4).

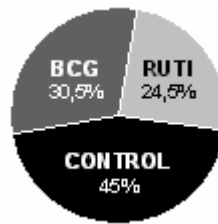


Figure 4. Pie chart represents the pathology score in the lung of aerosol infected guinea pig. After infection, guinea pig were treated with INH/RIF from week 4-8 (in black), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 8 and 11 (in red) or BCG at week 8 (in green). Values represent pathology score in percentage.

3.3 Inoculation of RUTI increases the DTH response in mice

Immunotherapy with RUTI increased the DTH response by 3-fold in vaccinated animals when compared with BCG-vaccinated animals. The swelling in the control group was undetectable (Figure 5).

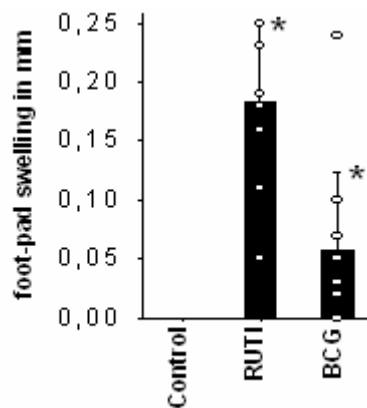


Figure 5. Delayed-type hypersensitivity response against PPD in aerosol infected mice. After infection, mice were treated with INH/RIF from week 6-14, and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 14 and 17 (in green) or BCG at week 14 (in blue). Results are expressed in mm.

3.4. RUTI increased the percentage of antigen specific T-cells in the murine experimental models

The IFN- γ intracellular staining results showed that in both the “control non-vaccinated” and “control vaccinated” groups, the percentage of CD4+ and CD8+ IFN- γ + T-cells tended to be lower than in RUTI-vaccinated mice, especially after the second inoculation of RUTI (18 and 20 weeks post-infection). These differences were significant when the cells were stimulated with PPD, ESAT-6 or Ag85B. In contrast, a difference between mice vaccinated with RUTI or BCG were not that clear after stimulation with 16 kDa or 38 kDa proteins, although these animals had higher values than the control non-vaccinated group (Figure 6).

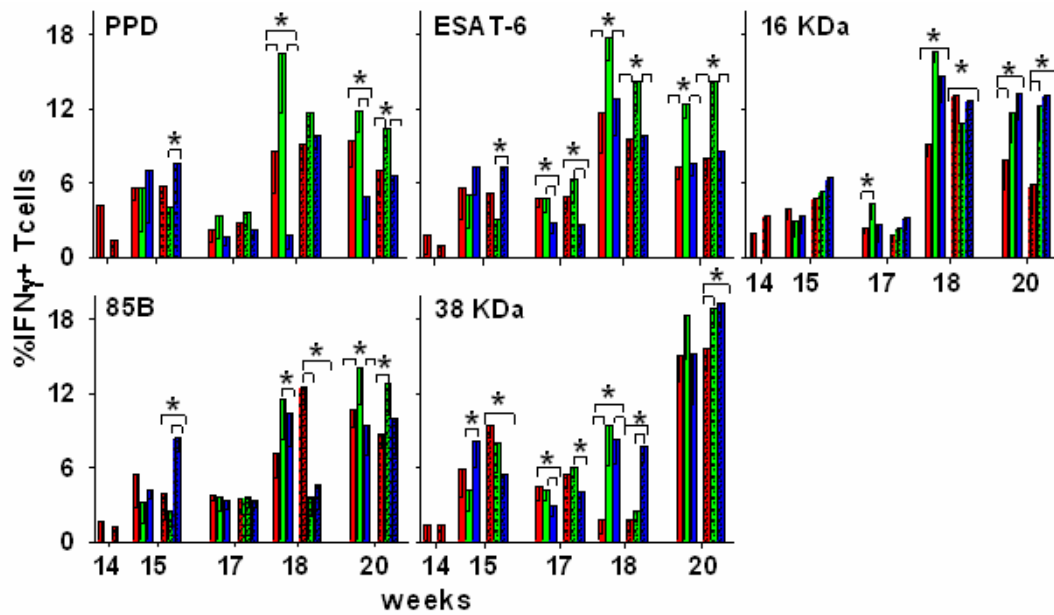


Figure 6. Evolution of T CD4⁺ and CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells from spleen in aerosol infected mice. After infection, mice were treated with INH/RIF from week 6-14 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 14 and 17 (in green) or BCG at week 14 (in blue). CD4⁺ cells are represented with plain bars and CD8⁺ cells with spotted bars. Data are expressed as the percentage of mean and standard deviation. Differences between means were compared using paired two-tailed Student T-test. Differences were significant when marked with * for $p < 0,05$.

ELISPOT results indicated that higher SFUs/250.000 cells were obtained after the second RUTI inoculation in both infection models when compared to the Qx group. In the aerosol-induced model (Figure 7) this difference was clear after the stimulation with PPD, ESAT-6 and Ag 85B one week after the first inoculation, confirming the results obtained by intracellular staining. In the IP model (Figure 8), a wider range of antigens were used to characterize better the immunological response induced by the RUTI inoculation, which was always significantly higher after the second inoculation when compared with the group only treated with Qx. In this case we wanted also to compare this response with the one obtained in untreated infected mice. It must be highlighted that the response obtained from the “only-infected” group was caused by the presence of the bacilli itself in the cultured splenocytes, as detected in non-stimulated cells. Interestingly, ESAT-6 treatment was the only one that gave an extra stimulation in the “only-infected” group, which was equivalent to that obtained after the 2nd RUTI inoculation in 7 out of the 11 antigens. Only the splenocytes stimulated with BCG, CFP-10, 40 kDa and Hsp65 had lower levels in the RUTI-treated group than in the only infected one.

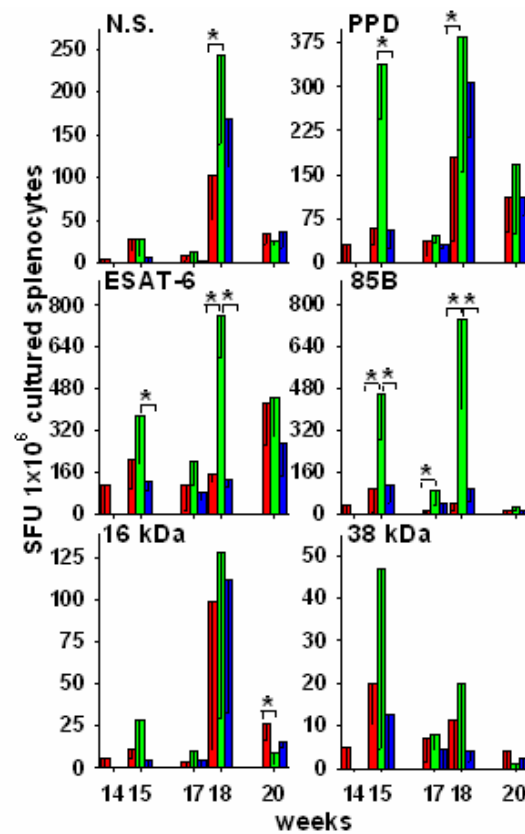


Figure 7. Activated antigen-specific IFN- γ secreting cells from spleen of aerosol infected mice. After infection, mice were treated with INH/RIF from week 6-14 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 14 and 17 (in green) or BCG at week 14 (in blue). Data represent the mean and standard deviation. Differences were significant when marked with * for $p < 0.05$ (t-test).

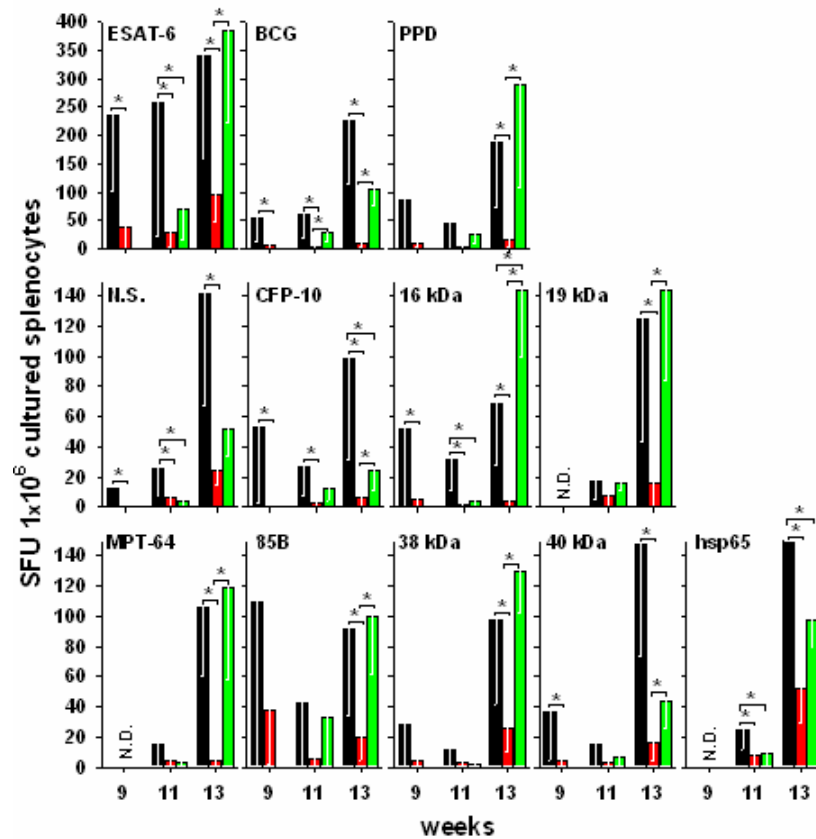


Figure 8. Activated antigen-specific IFN- γ secreting cells from spleen of intraperitoneal infected mice. After infection, mice were treated with INH/RIF from week 3-9 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 9 and 11 (in green). Mice not treated are showed in black. Data represent the mean and standard deviation. Differences were significant when marked with * for $p < 0.05$ (t-test).

When we studied the immunological response in IP model, using the detection of IFN- γ in the supernatants after the second RUTI inoculation, we observed that IFN- γ production was almost exclusive to this group (Figure 9), while the control only infected group exhibited a significant response only after ESAT-6 stimulation.

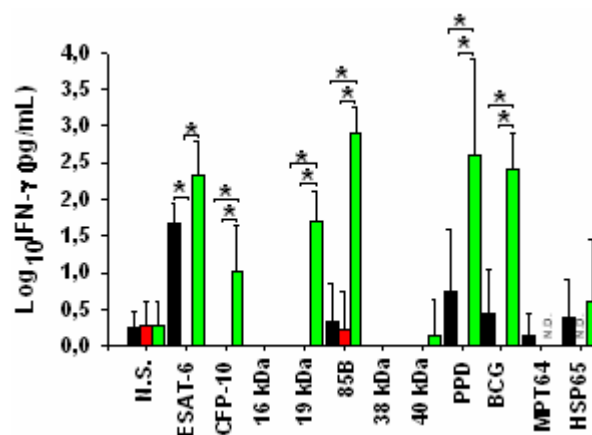


Figure 9. Levels of cytokine IFN- γ in supernatants from cultured splenocytes of intraperitoneal infected mice at week 13 post infection. Mice were treated with INH/RIF from week 3-9 (in red), and with 2 subcutaneous inoculations of RUTI at weeks 9 and 11 (in green). Mice not treated are showed in black. Data represent the mean and standard deviation. Differences were significant when marked with * for $p < 0.05$ (t-test).

3.5. mRNA expression of IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12p40, iNOS and RANTES

To assess whether the increased protection to MTB infection seen in RUTI-treated mice was associated with impaired cytokine production in lungs and spleen, mRNA expression of IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12p40, iNOS and RANTES from these tissues was compared in the various models.

The results in the IP infection model revealed no differences between the groups of infected, infected plus Qx and RUTI-treated mice, at any experimental timepoint.

In the aerosol infection model, the local cytokine expression in lung samples revealed an increase in the mRNA expression of IFN- γ , TNF- α , IL-12, iNOS and RANTES at week 17 post-infection in the groups treated with Qx plus immunotherapy with BCG or RUTI compared with the group only treated with Qx. At week 18 there is a decrease in the expression in both immunotherapy treated groups, which was less apparent in the group treated with RUTI. In contrast, the control group only treated with Qx showed a raise in all cytokines except IFN- γ . Finally, at week 20 cytokine levels are maintained in the immunotherapy groups, whereas in the control group there is a marked rise, probably as a consequence of the increased CFU. No expression of IL-10 and IL-4 was detected in any mice group (data not shown).

Discussion

The use of therapeutic vaccines against TB has been a controversial issue since Robert Koch declared the usefulness of an MTB culture extract (the tuberculin) as a therapeutic agent against initial stages of TB (22). Such declaration was not followed by the “miraculous” cure that was expected from the very beginning. Although tuberculin did not become the definitive cure of TB, it still became widely used as a therapeutic tool together with other treatments (23), up until the appearance of Qx. Robert Koch himself, however, also demonstrated the usefulness of tuberculin as a diagnostic tool in a process linked to a toxic reaction, now known as the Koch reaction, and described that 4–6 weeks after establishment of infection in guinea pigs, intradermal challenge with whole organisms or culture filtrate resulted in local necrosis in the original tuberculous lesion (13).

More recently, the Stanford’s group developed another vaccine with heat-killed *M.vaccae*. Initially, its therapeutic effect was attributed to the capacity of the antigens present in *M.vaccae* cell wall to develop a Th1 immune response and to avoid a Th2 response. This idea came from the concept of “Listeria-like” and “Koch-like” responses (24). The former was related to a typical Th1 mechanism and induced non-necrotic granulomas, while the latter was related to a Th2 mechanism, and thus responsible for the intragranulomatous necrosis generated by MTB infection, considered to be negative. Th2 response should be counterbalanced in order to control the infection better and to avoid the development of TB (25,26). The comparison of IFN- γ / IL-4 ratios measured by different techniques, following the stimulation of T-cells, have generated controversial results (27); moreover, many theories have been postulated to explain the observed polarization of T-cell responses. Recent findings suggest that IL-4 δ 2 may counterbalance IL-4 effects (28) or that T regulatory cells could counterbalance Th2 responses. Unfortunately, although several clinical trials have been run with *M.vaccae*, little or no effectiveness has been demonstrated in TB treatment (29).

The data presented here suggest that the most important mechanism of action of RUTI is linked to the induction of a Th1 immunological response against a wide range of MTB structural and secreted antigens, among other responses. RUTI induces several responses important for controlling MTB infection: increased number of CD4+ and

CD8⁺ effector T cells, more IFN- γ secretion and restricted dissemination of bacilli in the lungs of infected mice. We have previously demonstrated that RUTI produce a Th1-Th2-Th3 equilibrated immune response, instead of the “pure” Th1 response that should have more efficacy (30,31). In fact, recent data demonstrated a Th1-Th2 BCG response was as efficient as a Th1 response alone (32). Of course, the benefits of RUTI are obtained after prior treatment with Qx. By reducing the load of MTB, this short period of Qx allows a decrease in the immunological response and local inflammatory response in lungs, normally induced by growing bacilli (9). The reduction of bacillary load may also minimize the development a local Koch reaction. Qx also increases the reabsorption of the lesion and, moreover, it also removes the accumulation of foamy macrophages outside the granuloma. These cells are important inducers of local immunosuppression (33) and thus they probably play a key role in neutralizing any therapeutic vaccination.

Recent studies recommend not to use post-infection vaccines with killed or alive mycobacteria, as they could induce strong toxicity (14,15). In the manufacturing procedure of RUTI, the vaccine is detoxified by removing endotoxin-like molecules to avoid the potential risk of developing a Swartzman reaction (16,10). In experiments with both mice and guinea pigs, our data revealed that inoculation of RUTI did not induce local or systemic toxicity, but just a local transient inflammation response at the site of inoculation.

It has been demonstrated that control of the latent state of MTB is dependent on CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells (34), a finding that must be taken into consideration in the development of new vaccines against LTBI. It is noteworthy that RUTI increases CD4⁺ IFN- γ ⁺ and CD8⁺ IFN- γ ⁺ populations, following stimulation with antigens related to growing and non-growing bacilli. In our previous studies (11), we demonstrated that while the therapeutic administration of RUTI or BCG enhanced 10 fold the CD4⁺ IFN- γ ⁺ PPD specific population, only RUTI was able to enhance the CD8⁺ IFN- γ ⁺ one. The mechanism by which RUTI increases the CD8⁺ IFN- γ ⁺ population in the lung is still unclear, but its delivery through liposomes may be crucial, as a substantial quantity of mycobacterial antigens could be presented by MHC class I, which may favor a CD8 response (35).

Comparison of the immune response elicited by RUTI with that of BCG also highlights the higher response against ESAT-6 and Ag85B, as well as PPD elicited by RUTI. This different trend may explain why BCG has no efficacy when given in a therapeutic way, a fact previously demonstrated by others (14). It is well known that ESAT-6 and Ag85B have a paramount role in the induction of a protective response; the majority of vaccines in current development include either both antigens, one of them, or fusion proteins containing these antigens (36). Both antigens are made by growing bacilli and are known for eliciting a protective immunity (37). As infected hosts already have this immunity, this observation supports the theory that the protective effect of RUTI is linked to the boost of this immunity. This boosting would counterbalance the local immunodepression induced by Qx treatment, which would allow living LB to reactivate once Qx is stopped (4,9).

Furthermore, it has been recently demonstrated that BCG needs to survive in vaccinated animals to generate specific immunity (38). If the vaccine is cleared by Qx, the frequency of effector cells gradually decreases to the normal state and the protection wains. The fact that BCG needs to grow to be effective (32) may also explain its lack of efficacy because, since the vaccinated host already has immunity against mycobacteria, it can curtail its multiplication

On the other hand, as expected from previous data (10), RUTI triggers a wide immune response against structural antigens like 16, 19 and 38 kDa as well as hsp65 (39) that will help the surveillance of LB after short term Qx, by triggering or even boosting the proliferation of those specific T cells naturally induced by the destruction of the bacilli. This proliferation disappears with time [37], probably because of the pressure of the constant reactivation of the bacilli that is needed to maintain the latent infection, which will focus the immunity against the more dangerous bacillary form: the growing one (4).

Comparison of ELISPOT and ELISA results suggest that infected splenocytes are able to produce a low quantity of IFN- γ , maybe as a consequence of a local inflammatory process; this low IFN- γ is only detected through the ELISPOT technique, which has a

higher sensitivity ELISAs (40). In contrast, those cells are not able to produce enough IFN- γ to be detected in the supernatant. This observation might reflect that infected cells do not have the same ability as non-infected cells to process antigens or produce IFN- γ , as has been recently demonstrated (41). Alternatively, it may simply reflect the destruction of these cells by the bacilli on the 4th day of culture. The possible presence of bacilli in cell cultures should be taken into account in future studies designed to detect the production of cytokines in infected tissues.

Research of new vaccines against LTBI is difficult because of the lack of a validated method to correlate vaccines effectiveness in animal models and in humans. Consequently, the limitations of the present work, carried out in animal models, must be highlighted. Results obtained for the validation of new immunotherapy treatments such as RUTI must be interpreted with caution. To mimic what really happens in human, we used the chronic TB murine model induced by low-dose aerosol, because of the similarities existing between this model and LTBI in humans (5, 6). We have also used the IP model, in a modified form of the model described by Mustafa *et al* (42), to contrast the data and also to use a simplified model that requires a shorter period before evaluation of immunotherapy. We decided to run experiments also with the guinea pig model in order to avoid the “TB tolerance” phenomenon observed in mice, which may underestimate new treatments against LTBI. The guinea pig model develops a structured and defined granuloma with strong fibrosis and intragranulomatous necrosis. It is remarkable that the improved control of bacillary loads in the guinea pig model requires a bigger inflammatory response than can be observed in mice; in contrast, mice cannot develop such a high inflammatory response because it would kill the host faster than the bacilli (11). Mice triggering a weaker immune response, with no well structured granulomas, with discrete fibrosis, without necrosis and permitting the constant dissemination of bacilli throughout their lungs are able to survive longer. Our hypothesis is that, the bigger the host, the stronger the inflammatory response against MTB, because big parenchyma can be destroyed in larger animals to stop bacillary growth. For this reason, we are carrying out more experiments in hosts with a volume more comparable to humans, like naturally infected goats and mini-pigs experimental models.

Acknowledgements

Many thanks to Archivel Farma sl for sharing the therapeutic vaccine RUTI; Mahavir Singh, at Lionex Diagnostics & Therapeutics GMBH, for sharing purified mycobacterial antigens; the technicians of the Unitat de Tuberculosi Experimental (HUGTIP), from the Center for Animal Experimentation, for taking care of the animal models; the technicians of the Pathology Department (HUGTIP) and especially Gustavo Tapia MD, for their excellent technical support. This work was supported in part with grant from the Spanish Ministry of Health (FIS 03/0757). E. Guirado received a Pre-doctoral Research grant, during 3 years, from the Spanish Society for Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC). National Plan I+D+I FIS CM06/00123.

Abbreviations

Alveolar macrophage, AM; Colony Forming Units, CFUs; Chemotherapy, Qx; Delayed-type Hipersensitivity, DTH; Hypoxantine guanine phosphoribosyl transferase, HPRT; Interferon-gamma, IFN- γ ; Isoniazid, INH; Intraperitoneal, IP; Latent bacilli, LB; Latent tuberculosis infection, LTBI; *Mycobacterium tuberculosis*, MTB; Rifampicin, RIF; Standard deviation, SD; Spot Forming Unit, SFU; Non-replicative state, NS; Tuberculosis, TB.

References

1. Calmette A, and Plotz H. Protective inoculation against tuberculosis with BCG. *Am Re Tuberc* 1929;**19**:567-72
2. Koch R. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin. Germany. *Rev Infect. Dis* 1882;**4**:1270-4
3. World Health Organization. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2007, Global tuberculosis control report 2007. WHO/HTM/TB/2007.376
4. Cardona PJ. New insights on the Nature of Latent Tuberculosis Infection and its Treatment. *Inflammation and Allergy – Drug targets* 2006;**6**(1):27-39
5. Wallace JG. The heat resistance of tubercle bacilli in the lungs of infected mice. *Am Rev Respir Dis* 1961;**83**:866-71
6. Muñoz-Elias EJ, Timm J, Botha T, Chan WT, Gomez JE, McKinney JD. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infect Immun* 2005;**73**:546-51
7. Comstock GW. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;**3**(10):847-50.
8. Bui TD, Dabdub D, George SC. Modeling bronchial circulation with application to soluble gas exchange: description and sensitivity analysis. *J Appl Physiol* 1998; **84**: 2070-2088.
9. Cardona PJ, Julian E, Valles X, Gordillo S, Muñoz M, Luquin M, Ausina V. Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. *Scand J Immunol* 2002;**55**:639-45

10. Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, Vilaplana C, Tapia G, Ausina V. Immunotherapy with fragmented Mycobacterium tuberculosis cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine* 2005;**23**:1393-8
11. Cardona PJ. RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis* 2006;**86**:273-89
12. Guirado E, Amat I, Gil O, Díaz J, Arcos V, Cáceres N, Ausina V, Cardona PJ. Passive serum-therapy with polyclonal antibodies against Mycobacterium tuberculosis protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. *Microbes Infect* 2006;**8**:1252-9
13. Rook GA, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996;**50**:259-84.
14. Moreira AL, Tsenova L, Aman MH, Bekker LG, Freeman S, Mangaliso B, et al. Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 2002;**70**:2100-7
15. Turner J, Rhoades ER, Keen M, Belisle JT, Frank AA, Orme IM. Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect Immun* 2000;**68**:1706-9
16. Cardona PJ, Llatjos R, Gordillo S, Diaz J, Vinado B, Ariza A, Ausina V. Towards a 'human-like' model of tuberculosis: intranasal inoculation of LPS induces intragranulomatous lung necrosis in mice infected aerogenically with Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol* 2001;**53**(1):65-71.
17. Guirado E, Gordillo S, Gil O, Diaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ausina V, Cardona PJ. Intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against Mycobacterium tuberculosis infection in experimental murine models induced by aerosol. *Int J Exp Pathol* 2006;**87**(2):139-49.

18. Orme IM. The use of animal models to guide rational vaccine design. *Microbes Infect* 2005;7(5-6):905-10.
19. Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of nitrogen mustards in the palliative treatment of cancer. *Cancer* 1948;1:634-56.
20. Cardona PJ, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Amat I, Pallares A, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:5845-54
21. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-Specific Gamma Interferon Production with Pathology in Cattle following *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination against Experimental Bovine Tuberculosis. *IAI*. 2002;70:3026
22. Burke DS. Of postulates and peccadilloes: Robert Koch and vaccine (tuberculin) therapy for tuberculosis. *Vaccine* 1993;11(8):795-804.
23. Pottenger FM. Tuberculosis in the child and the adult. St. Louis. The C.V. Mosby Company 1934.
24. Stanford JL, Shield MJ, Rook GA. How environmental bacteria may predetermine the protective efficacy of BCG. *Tubercle* 1981;62(1):55-62
25. Hernandez-Pando R, Rook GA. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 1994;82(4):591-5
26. Rook GA, al Attiyah R. Cytikines and the Koch phenomenon. *Tubercle* 1991;72:13-20
27. Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 2004;25(9):483-8

28. Atamas SP, Choi J, Yurovsky VVY, White B. An alternative splice variant of human IL-4, IL4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *J Immunol* 1996;156(2):435-41.
29. Stanford J, Stanford C, Grange J. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of tuberculosis. *Front Biosci* 2004;9:1701-19
30. Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect Immun* 1998;66:5743-50
31. Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997;65:3317-27
32. Gruppo V, Orme IM. Dose of BCG does not influence the efficient generation of protective immunity in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2002;82:267-73
33. Stumbles PA, McWilliam AS, Holt PG. Dendritic cells and mucosal macrophages. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 397–412
34. Van Pinxteren LAH, Cassidy P, Smedegaard BHC, Agger EM, Andersen P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on CD8 T cells. *Eur J immunol* 2000;30:3689-98
35. Altin JG, Parish CR. Liposomal vaccines--targeting the delivery of antigen. *Methods* 2006;40(1):39-52.
36. Andersen P. Tuberculosis vaccines - an update. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(7):484-7.

37. Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1997;45(2):115-31.
38. Olsen AW, Brandt L, Agger EM, Van Pinxteren LAH, Andersen P. The influence of remaining live BCG organisms in vaccinated mice on the maintenance of immunity to tuberculosis. *Scand J Immunol* 2004;60:273-77
39. Andersen, P. (1997). Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 45, 115-131.
40. Favre N, Bordmann G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods* 1997;204(1):57-66.
41. Torres M, Ramachandra L, Rojas RE, Bobadilla K, Thomas J, Canaday DH, et al. Role of phagosomes and major histocompatibility complex class II (MHC-II) compartment in MHC-II antigen processing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Infect Immun* 2006;74(3):1621-30.
42. Mustafa, T., Phyu, S., Nilsen, R., Jonsson, R. & Bjune, G. (1999). A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis. *Scand J Immunol* 50, 127-136.

9 AGRAÏMENTS

Si faig una ullada al passat, tinc la sensació que no fa pas gaire que vaig començar a fer la tesi a la UTE. Encara tinc un record ben nítid d'aquell dia que vaig venir a fer l'entrevista amb en Pere-Joan, com si hagués estat ahir mateix. Encara conservo el cartell que vaig arrencar de la paret de la Facultat, aquell de color groc llampant, a on demanaven un estudiant interessat en fer la tesi a Can Ruti, (diga'm sentimental, si vols).

Però la realitat és que ja han passat més de 4 anys, més de 1.500 dies, més de 36.000 hores... Quatre anys plens de moments que seran difícils d'oblidar. Quatre anys plens de persones que han enriquit la meua quotidianitat. I tot plegat, ara que m'hi veig al final del camí, em fa molta pena haver de deixar-ho endarrere, la veritat.

És per això, que no voldria marxar sense haver donat les gràcies a tothom. Gràcies a tots aquells que m'heu ajudat i recolzat durant tot aquest temps.

Vull agrair al Dr. Ausina el seu recolzament, tan important per mi, a l'hora de demanar beques, fins i tot, en aquelles "impossibles".

Vull donar les gràcies de tot cor a en PJ (el nostre "Charlie"). Gràcies per contagiar-me sempre amb el teu esperit científic, gràcies per aixecar la UTE tan amunt, tan amunt... I sobretot, gràcies per deixar-me aprendre tantes coses de tu, coses sobre la ciència i sobre la vida.

Milions de gràcies- què dic milions?- milers de milions de gràcies als meus companys de la UTE. Són tantes hores junts, "taula amb taula", (això des de que tots tenim taules, eh? ☺). Si us hagués de donar les

gràcies un per un, per tot allò que heu fet per mi, em caldrien 4 o 5 tesis més!!. Us enyoraré tant...

I també gràcies a la resta de companys que m'he trobat pel camí, i que sempre han tingut un gest amable i un consell savi. Un fort agraïment a tot el personal de micro, als veïns d'immuno, als companys de la UDPDE, als de l'ICO, en Gus d'AP, a tots els nous coneguts de "les Escoles"... Gràcies a tots, sincerament.

No puc oblidar-me de donar les gràcies a la SEIMC, organització sense la qual no hauria obtingut la beca pre-doctoral que m'ha permès dur a terme aquesta Tesi.

I igualment, gràcies a Archivel Farma per la seva contribució.

I finalment, vull donar les gràcies a la meva família i, molt especialment, als meus pares i al meu estimat. Gràcies pel vostre recolzament, per entendre'm totes aquelles vegades que he arribat tard perquè tenia feina al laboratori, pels vostres ànims infinits, per permetre'm acabar allò que vaig començar, gràcies per estimar-me tant. MOLTÍSSIMES GRÀCIES!!