

**ESTUDI DE LA LATÈNCIA DE
Mycobacterium tuberculosis EN MODELS
EXPERIMENTALS DE RATOLÍ I *in vitro***

Sergi Gordillo Muñoz

UAB

2004

**ESTUDI DE LA LATÈNCIA DE
Mycobacterium tuberculosis EN MODELS
EXPERIMENTALS DE RATOLÍ I *in vitro***

Badalona, maig del 2004



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

Unitat de tuberculosi experimental

SERVEI DE MICROBIOLOGIA

HOSPITAL UNIVERSITARI GERMANS TRIAS I PUJOL

**ESTUDI DE LA LATÈNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* EN
MODELS EXPERIMENTALS DE RATOLÍ I *in vitro***

Treball presentat pel llicenciat
Sergi Gordillo Muñoz
per optar al grau de Doctor

Director
Dr. Pere-Joan Cardona i Iglesias

Badalona, maig del 2004

AGRAÏMENTS

Al Dr. Pere-Joan Cardona, cap pensant de la Unitat de Tuberculosi Experimental.

Quan vaig entrar a la UTE, ara fa gairebé 5 anys, el primer que va fer el Dr. Ausina va ser presentar-me a una persona, amb cert aire genial, que em va explicar la tuberculosi en el model murí en 5 minuts mentre baixàvem per unes escales infames cap a les entranyes d'una muntanya. Temps després, ell baixava les mateixes escales corrent amb una càmera de vídeo a la mà mentre sonava la música de *Tiburón* de John Williams. És clar que això em va marcar!

Realment, això no sembla el principi d'una feina en recerca bàsica ni d'una tesi doctoral...però així va ser. La qüestió és que vaig tenir la enorme sort d'incorporar-me al seu grup (de dos persones en aquell moment!!!) i poder aprofitar-me de la seva companyia i saviesa i arribar a desenvolupar tota aquesta feina. És més, sempre m'agrada recordar tots aquells moments dins de l'Estabulari d'Alta Seguretat on ens despreocupàvem de tot i disfrutàvem com xinos!! Al Jorge li agrada recordar aquell dia que vam cantar no sé quina canço [...] a *cappella*. A més a més, penso que és l'artífex de les idees més increïbles que he sentit mai un divendres a la tarda!! Sincerament, li haig d'agrair absolutament tot el que he aconseguit ja que sempre estaré en deute amb ell. Gràcies.

Al Dr. Vicenç Ausina, Catedràtic de Microbiologia i Cap del Servei de Microbiologia,

Després d'esperar més d'una hora, assegut i passejant pels passadissos d'aquest hospital, vaig poder entrevistar-me amb ell el primer dia que vaig venir. Poques vegades més ho tornaria a fer. La trobada va ser curta.

Jo venia recomanat per la Marina Luquin per fer les pràctiques en empreses. Em va preguntar: a tu què t'agrada més, la investigació bàsica o treballar en el laboratori clínic? La meua resposta va ser clara. Ràpidament, va trucar al Dr. Pere-Joan Cardona i de seguida vam marxar.

Li haig d'agrair que em donés la possibilitat de triar i permetre'm fer el que realment volia fer sense cap impediment. Gràcies per la seva sinceritat i confiança en tot moment. De nou, moltes gràcies.

Bé, sense el Jorge Díaz, no existiria res del que tenen ara a les mans. Durant llarg temps ha estat una peça clau de la UTE i gràcies a ell, desenvolupem tots la nostra feina. Personalment, és un amic i crec que té un dels esperits competitiu i lluitadors més important que he conegut. Potser ha estat això la clau de l'èxit de la UTE ja que aquesta característica estava present en tots els components de la unitat. Afegir també que sempre s'escapa (☺) dels problemes col·laterals que presenta un estabulari com ara podria ser retirada d'animals d'entre les màquines impulsadores i altres.

Isabel és una persona a la que li passen coses diferents que a la majoria de gent...Sí, sí, ho tinc comprovat. De totes formes, té la capacitat més que suficient per superar aquestes rareses i tot el que li vingui per davant. Té un esperit de vida envejable i li vull agrair la seva companyia i confidencialitat durant aquest temps.

Al Servei de Microbiologia.

El meu lloc de treball estava en un costadet de la secció d'Hemos. Allà vaig conèixer a un home anomenat Gregorio. Amb ell he passat grans moments ja que sota aquesta imatge de formal i correcte que té, hi ha tot un personatge amb el que no pots parar de riure...Espero que no segueixi amagant les nanses a sota dels calaixos!!

També vaig tenir molta sort ja que la primera secció per on passaven els residents quan arribaven al servei era Hemos. Això em va permetre conèixer des del principi a la M^a Dolores, a la M^a Àngeles, a la Cristina, a la Sònia i a la Gema.

Amb el temps, vaig conèixer una noia que no parava de preguntar-me coses...com copio aquest arxiu? Ai! He perdut les dades del diskette!!! Com canvio això de color? I un llarg etcètera. El seu *jefe* també feia moltes preguntes...hauria de ser la Secció de les Preguntes i no de Biologia Molecular. Crec que he trobat una enorme amistat en la Vicky i en l'Eduardo.

No vull deixar de recordar al carismàtic Joan Lonca, amb qui havia passat grans moments. Sempre recordaré la primera vegada que vaig anar a una d'aquestes reunions sobre tuberculosi que fa la UITB. Me'n recordo que entenia realment poc. Vaig fer-li més de 100 preguntes en dues horetetes...aquell dia vaig aprendre moltíssim.

També recordo algun sopar de comiat o semblant on l'espectacle estava servit. No crec que oblidí mai algun d'aquests sopars, encara que no recordi molt tot el que va passar!!

Impressionant! Concretament, recordo un sopar amb la Montse, amb el Joan Arnal, amb la Isabel, amb la Katy i la Marisol, amb el Jorge i amb el Pere-Joan que va passar a la història!!!

Gràcies a les *seures*, a la Belen i a la Cristina (tambe al Sergio, a la Úrsula i al Javi!). La S. Marcos té una frase característica que cal sempre contextualitzar: Qué quieres?

Gràcies a tots els tècnics; al Fede per la seva complicitat, a la Loli per la seva música, a l'Esther, al Miguel, a la Maragda, a la Cinta, al Miguel Ángel per la seva inquietud informàtica a tota velocitat, a la Maria, a la Dolors i a tots els demés. També vaig tenir la sort de conèixer a quatre residents més als quals m'agrada recordar, al Xavi Vallès (és ell!!), la Belén Viñado, a la Cris Prat i com no a la Márquez.

Al plusmarquista Manterola, a la M. Giménez, al J. Arnal i a la L. Matas, gràcies. També al J. Domínguez i a l'À. Hernández. Als becaris d'aquest servei que romanen en una fase límbica durant llarg temps. Gràcies a la Silvia, al Jesús, a l'Arantxa i a tots els altres. També vull destacar a les becàries de nova fornada, la Evelyn i l'Olga, tranquil·les que hi ha temps!!

També al Servei d'Immunologia per tota la seva ajuda. Recordo que, en un principi, no parava de fer preguntes a la Pepi que sempre i amablement responia. Posteriorment, vam conèixer a l'Aurora, amb la que vam fer una curiosa escapada a Saragossa (☺); al Jorge, a la M^a Carmen....realment ells són la *recerca*. Igualment, moltes gràcies també als ciclistes d'Immuno per compartir experiències i a tots els demés per la seva ajuda.

Als companys del CEA, i molt especialment al Ramon (cap aquí i cap allà sense parar!) i al Josep pel seu companyerisme, gràcies a tots! De forma exclusiva, vull dir-li a la Marga que moltíssimes gràcies per tot. Gràcies per estar allà quan ho necessitava, gràcies pels carmels que ens endolcen la vida tant com la teva personalitat, gràcies per la teva espontaneïtat, pel teu caràcter.

A la meva família. Moltes vegades em preguntaven que què feia? Els intentava explicar això de la recerca i la veritat és que no crec que ho tinguin massa clar encara,....algú ho té? Igualment, moltes gràcies.

Sento oblidar-me d'alguns, ja que segur que és així i perquè si realment us sentiu identificats, és perquè m'heu ajudat i us demano perdó tot agraint-vos el que heu fet!

Classical microbiology equates viability with being able to multiply (i.e. viability = culturability). A consequence of this (since we must wait for any division to occur before scoring a cell as 'alive') is that we can never state that a given cell is alive, only that it was alive, a phenomenon mirrored in the famous Schrödinger's cat paradox of quantum mechanics.

Arseny Kaprelyants



A la meva princesa

Abreviatures

ABREVIATURES

Abreviatures

| | |
|------------------|---|
| APC | Antigen Presenting Cells |
| ATP | Adenosin trifosfat |
| ATR | <i>Acid tolerance response</i> |
| BAC | <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> |
| BAL | Líquid broncoalveolar |
| BCG | Bacil Calmette - Guerin |
| CCR2 | <i>Chemokine Receptor 2</i> |
| CD4 | Cluster of differentiation 4 |
| CD8 | Cluster of differentiation 8 |
| cDNA | DNA complementari |
| Cp | <i>Crossing cycle number (crossing point)</i> |
| CR | Receptor del complement |
| dF: | Diferencial de Fluorescència |
| DNA | Àcid desoxirribunucleic |
| dNTPs | Desoxirribonucleòtids |
| dsDNA | DNA de doble cadena |
| dT | Diferencial de Temperatura |
| DTT | Dithiothreitol |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| G+C | Contingut en guanina i citosina |
| GADPH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| HCl | Àcid clorhídric |
| HIV | Virus de la SIDA |
| ICAM-1 | <i>Intercellular adhesion molecular-1</i> |
| IFN- γ | Interferó gamma |
| IgA | Immunoglobulina A |
| IL | Interleucina |
| INH ^R | Isoniazida resistent |
| IS | Fragments d'inserció |
| kDa | Quilodaltons |
| KO | <i>Knockout</i> |
| LAM | Lipoarabinomannà |

Abreviatures

| | |
|------------------|---|
| LPS | Lipopolisacàrid |
| LT | Limfotoxina |
| MA | Macròfags alveolars |
| MCP-3 | <i>Macrophage chemoattractant protein III</i> |
| MHC-II | Complexe major d'histocompatibilitat de tipus II |
| MIP-2 | <i>Macrophage Inflammatory protein-2</i> |
| MR | Receptors de manosa |
| mRNA | RNA missatger |
| NK | Cèl·lules <i>Natural Killer</i> |
| NO | Òxid Nítric |
| NO ²⁻ | Nitrat |
| NO ³⁻ | Nitrit |
| NRP | <i>Non replicating persistence</i> |
| OD | Densitat òptica |
| OMS | Organització Mundial de la Salut |
| Pbs | Parells de Bases |
| PPD | <i>Protein purified derivative</i> |
| PZA | Pirazinamida |
| RANTES | <i>Regulated upon activation Normal T cell Express Sequence</i> |
| RFLP | Patró de Fragments de Restricció |
| RNA | Àcid ribonucleic |
| RNIs | Reactius intermediaris del nitrogen |
| ROIs | Reactius intermediaris de l'oxigen |
| rRNA | Àcid ribonucleic ribosomal |
| SDS | Sodi dodecil sulfat |
| SL-I | Sulfolípid I |
| TCR | Receptor de cèl·lules T |
| TGF-β | <i>Transforming Growth Factor beta</i> |
| TLR | <i>Toll – like Receptor 2</i> |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> |
| UFCs | Unitats formadores de colònies |

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| AGRAÏMENTS | I |
| ABREVIATURES | VI |
| INTRODUCCIÓ | 1 |
| JUSTIFICACIÓ I PREÀMBUL | 2 |
| I. LA TUBERCULOSI | 4 |
| 1. Història de la tuberculosi | 5 |
| 2. Generalitats de la tuberculosi | 6 |
| 3. Evolució de la malaltia tuberculosa | 7 |
| 4. Visió general de la resposta immune a <i>M. tuberculosis</i> en el ratolí. | 8 |
| 5. La resposta a <i>M. tuberculosis</i> és diferent en funció de la soca de ratolí | 13 |
| 5.1 Els treballs de Medina i North | 13 |
| 5.2 Diferències morfològiques amb base genètica | 14 |
| 5.3 La virulència de <i>M. tuberculosis</i> juga un paper molt important. | 15 |
| 5.4 Estudis comparatius entre ratolins susceptibles i resistent | 15 |
| 5.5 La disseminació inicial, clau de la resistència a la infecció | 17 |
| | |
| II. MODELS ANIMALS | 19 |
| 1. Antecedents | 20 |
| 2. Legislació i benestar dels animals | 20 |
| 3. Criteris de treball en el model animal | 21 |
| 4. Models de tuberculosi | 21 |
| 5. Els models animals | 22 |
| | |
| III. GENÈTICA MOLECULAR DE <i>M. tuberculosis</i> | |
| 1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . generalitats i genoma | 25 |
| 2. Metabolisme general de <i>M. tuberculosis</i> | 27 |
| 3. L'expressió genètica de <i>M. tuberculosis</i> | 28 |
| 3.1 Gens relacionats amb el metabolisme general | 28 |
| 3.1.1 <i>icl</i> o <i>accA</i> (Rv0467) | 28 |
| 3.1.2 <i>lipF</i> (Rv3487c) | 28 |
| 3.1.3 <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>plcC</i> (Rv2351c, Rv2350c, Rv2349c) | 29 |
| 3.1.4 <i>panC</i> i <i>panD</i> (Rv3602, Rv3601c) | 29 |
| 3.1.5 <i>leuD</i> , <i>trpD</i> , <i>proC</i> , <i>purC</i> (Rv2987c, Rv2192c, Rv0500, Rv0780) | 29 |
| 3.1.6 <i>mgc</i> (Rv1811) | 29 |
| 3.1.7 <i>mbtB</i> , <i>ideR</i> (Rv2383c, Rv2711) | 29 |
| 3.1.8 <i>narG</i> (Rv1161) | 29 |
| 3.1.9 <i>katG</i> (Rv1908c) | 30 |
| 3.1.10 <i>sodA</i> (Rv3846) | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2 | Reguladors transcripcionals de dos components | 30 |
| 3.2.1 | <i>phoP</i> (Rv0757) | 30 |
| 3.2.2 | DevR/DevS (DosR/Rv3133) | 31 |
| 3.2.3 | <i>mprA</i> , <i>prpA</i> , <i>regX3</i> , <i>trcS</i> , <i>mtrA</i> , <i>dosR</i> (Rv0981, Rv0903c, Rv0491, Rv1032c, Rv3264c, Rv3133c) | 31 |
| 3.3 | Altres reguladors transcripcionals | 31 |
| 3.3.1 | <i>hspR</i> (Rv0353) | 31 |
| 3.3.2 | <i>relA</i> (Rv2583c) | 31 |
| 3.4 | Proteïnes secretades i constituents de la paret micobacteriana | 32 |
| 3.4.1 | Esat6/CFP-10 (Rv3875, Rv3874) | 32 |
| 3.4.2 | <i>fbpA</i> , <i>fbpB</i> , <i>fbpC</i> (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c) | 32 |
| 3.4.3 | <i>hspX</i> (Rv031c) | 32 |
| 3.4.4 | <i>erp</i> (Rv3810) | 33 |
| 3.4.5 | <i>fadD26</i> i <i>fadD28</i> (Rv2930, Rv2941) | 33 |
| 3.4.6 | <i>ino1</i> (Rv0046c) | 33 |
| 3.4.7 | <i>ompA</i> (Rv0899) | 33 |
| 3.4.8 | <i>LpqH</i> (Rv3763) | 33 |
| 3.5 | Factors sigma | 34 |
| 3.5.1 | Classificació dels factors sigma | 35 |
| 3.5.2 | Factor sigma A (Rv2703) | 35 |
| 3.5.3 | Factor sigma B (Rv2710) | 35 |
| 3.5.4 | Factor sigma E (Rv1221) | 36 |
| 3.5.5 | Factor sigma F (Rv3286c) | 36 |
| 3.5.6 | Factor sigma G (Rv0182c) | 36 |
| 3.5.7 | Factor sigma H (Rv3223c) | 37 |
| 3.5.8 | Factor sigma M (Rv3911) | 37 |
| 3.5.9 | Altres factors sigma | 37 |
| 3.6 | Factors anti-sigma | 38 |
| 3.7 | Resposta a l'estrès ambiental | 38 |
| 3.7.1 | Resposta <i>heat shock</i> | 38 |
| 3.7.2 | La regulació del ferro | 39 |
| 3.7.3 | Resposta davant dels ROIs | 39 |
| 3.7.4 | Resposta davant dels RNIs | 40 |
| 3.7.5 | La resposta SOS | 40 |
| 3.7.6 | Resposta astringent davant la privació de nutrients | 41 |
| 3.7.7 | Resposta a la hipòxia | 42 |
| 3.7.8 | Canvis de pH | 42 |

| | | |
|-----|---|----|
| IV. | FISIOLOGIA DE <i>M. tuberculosis</i> | 45 |
| | 1. Fagocitosi de <i>M. tuberculosis</i> | 46 |
| | 2. El fagosoma de <i>M. tuberculosis</i> | 47 |
| | 3. Resposta micobacteriana a la fagocitosi | 49 |
| V. | LATÈNCIA DE <i>M. tuberculosis</i> | 52 |
| | 1. Descripció de la latència | 53 |
| | 2. Definicions de latència, dormància, persistència | 54 |
| | 3. La persistència en <i>M. tuberculosis</i> | 54 |
| | 4. Models de latència | 54 |
| | 5. Mecanismes de latència | 58 |
| | 6. Mecanismes de sortida de la latència | 59 |
| | 7. El tractament de la malaltia tuberculosa i la latència | 60 |
| | 8. Estratègies de combat al bacil latent | 61 |
| | HIPÒTESIS I OBJECTIUS | 62 |
| | I. HIPÒTESIS | 63 |
| | II. OBJECTIUS | 67 |
| | MATERIAL I MÈTODES | 68 |
| | I. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT | 69 |
| | 1. Models d'infecció | 70 |
| | 2. Soques de ratolí infectades | 70 |
| | 3. Obtenció de les soques de <i>M. tuberculosis</i> | 71 |
| | 4. Estudi de l'expressió de mRNA | 73 |
| | 4.1 Extracció del RNA total | 73 |
| | 4.2 Quantificació i verificació de la integritat del RNA | 74 |
| | 4.3 Eliminació de restes de DNA | 74 |
| | 4.4 Transcriptasa reversa | 75 |
| | 4.5 Amplificació per <i>Real-Time</i> PCR | 75 |
| | 4.6 Disseny de primers | 77 |
| | 4.7 Preparació dels estàndards | 79 |
| | 4.8 Normalització de l'expressió | 80 |
| | 5. Histologia, histometria i immunohistoquímica | 81 |
| | 6. Anàlisi estadístic | 82 |
| | II. ESTUDI DE LA LATÈNCIA <i>in vitro</i> | 83 |
| | 1. Obtenció de les soques de <i>M. tuberculosis</i> | 84 |
| | 2. Preparació dels medis fets servir | 84 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3. | Acidificació dels medis | |
| 4. | Estudi de l'expressió de mRNA | 88 |
| 4.1 | Transcriptasa reversa | 88 |
| 4.2 | Disseny de primers | 88 |
| III. | ESTUDI DE LA LATÈNCIA <i>in vivo</i> | 92 |
| 1. | Model d'infecció | 93 |
| 2. | Soques de ratolí infectades | 93 |
| 3. | Obtenció de les soques de <i>M. tuberculosis</i> | 93 |
| 4. | Estudi de l'expressió de mRNA | 93 |
| 4.1 | Extracció del RNA total | 93 |
| 4.2 | Transcriptasa reversa | 94 |
| 4.3 | Disseny de primers | 95 |
| 5. | Normalització de l'expressió | 95 |
| | RESULTATS | 97 |
| I. | ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT MURINA | 98 |
| 1. | Evolució de les UFCs durant la infecció | 99 |
| 2. | Monitorització de la resposta immune durant la infecció | 100 |
| 2.1 | Corbes de <i>melting</i> | 101 |
| 3. | Evolució histològica de les soques de ratolí | 105 |
| 4. | Evolució histomètrica de les soques de ratolí | 106 |
| 5. | Estudi immunohistoquímic de les soques de ratolí | 107 |
| II. | ESTUDI DE LA LATÈNCIA <i>in vitro</i> | 109 |
| 1. | Estudi de la supervivència i activitat bacil·lar | 110 |
| 2. | La fase exponencial | 111 |
| 3. | La fase estacionària | 112 |
| 4. | Corbes de <i>melting</i> | 113 |
| III. | ESTUDI DE LA LATÈNCIA <i>in vivo</i> | 120 |
| 1. | La resposta immune i la supervivència bacil·lar | 121 |
| 2. | L'expressió bacteriana en el ratolí | 122 |
| | DISCUSSIÓ | 125 |
| 1. | Preàmbul | 126 |
| 2. | Estudi de la susceptibilitat de les soques de ratolí davant la infecció per <i>M. tuberculosis</i> | 127 |
| 2.1 | Supervivència bacil·lar | 127 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 2.2 | Resposta immune | 127 |
| 2.2.1 | Caracterització de l'expressió de IFN- γ , de RANTES i de iCAM-1. | 127 |
| 2.2.2 | Caracterització de l'expressió de quimiocines | 128 |
| 2.2.3 | Caracterització de l'expressió de iNOS | 129 |
| 2.2.4 | Caracterització de l'expressió de TNF | 129 |
| 2.2.5 | Desenvolupament de necrosi intragranulomatosa | 130 |
| 2.2.6 | Interpretació de la susceptibilitat i la latència | 130 |
| 3. | Estudi de la latència | 132 |
| 3.1 | Estudi de l'acidificació en el model <i>in vitro</i> | 132 |
| 3.1.1 | Comportament de <i>M. tuberculosis</i> davant del pH àcid | 132 |
| 3.1.2 | Susceptibilitat de <i>M. tuberculosis</i> davant del pH àcid | 133 |
| 3.1.3 | La fase exponencial | 134 |
| 3.1.4 | La fase estacionària | 134 |
| 3.1.5 | Normalització de l'expressió genètica | 135 |
| 3.1.6 | L'expressió del gen <i>fbpB</i> en fase exponencial i estacionària | 135 |
| 3.1.7 | L'expressió dels factors sigma en fase exponencial i estacionària | 137 |
| 3.1.8 | L'expressió Rv0834c en fase exponencial i estacionària | 140 |
| 3.1.9 | L'expressió de <i>id</i> en fase exponencial i estacionària | 140 |
| 3.1.10 | El metabolisme del nitrogen en fase exponencial i estacionària | 142 |
| 3.1.11 | L'expressió de <i>cysH</i> en fase exponencial i estacionària | 143 |
| 3.1.12 | L'expressió de <i>recA</i> en fase exponencial i estacionària | 145 |
| 3.1.13 | L'expressió de <i>rpoA</i> en fase exponencial i estacionària | 145 |
| 3.1.14 | L'expressió de <i>acr</i> en fase exponencial i estacionària | 146 |
| 3.1.15 | Limitacions de l'estudi <i>in vitro</i> | 148 |
| 3.2 | Estudi de <i>M. tuberculosis</i> en el model <i>in vivo</i> en ratolins <i>wild-type</i> | 149 |
| 3.2.1 | Evolució de la infecció tuberculosa | 149 |
| 3.2.2 | Estudi de la evolució de la infecció | 149 |
| 3.2.3 | Estudi de l'expressió de <i>fbpB</i> en teixit | 150 |
| 3.2.4 | Estudi de l'expressió de <i>id</i> en teixit | 150 |
| 3.2.5 | Estudi de l'expressió de <i>acr</i> en teixit | 151 |
| 3.2.6 | Estudi de l'expressió dels factors sigma en teixit | 152 |
| 3.3 | Estudi de <i>M. tuberculosis</i> en el model murí amb ratolins <i>knockouts</i> | 153 |
| 3.3.1 | Determinació de la càrrega bacil·lar | 153 |
| 3.3.2 | Determinació de la resposta immune | 153 |
| 3.3.3 | Determinació de l'expressió genètica de <i>M. tuberculosis</i> | 154 |

| | |
|---------------------|-----|
| CONCLUSIONS | 156 |
| BIBLIOGRAFIA | 159 |

INTRODUCCIÓ

JUSTIFICACIÓ I PREÀMBUL

El microorganisme bacterià més virulent del món és *Mycobacterium tuberculosis* ja que és el que mata més persones per si sol que cap altra infecció. Encara que la malaltia es tracta amb quimioteràpia i existeix una vacuna preventiva, el nombre de casos al món augmenta cada any. A més, existeix un reservori de 1,8 bilions de persones (1.800.000.000) infectades en el món en aquest moment; això representa gairebé un terç de la població mundial. Encara més, 8 milions de persones s'infecten novament cada any (1,2).

El seu creixement extremadament lent i la seva alta patogenicitat fan poc atractiu la manipulació genètica d'aquesta micobactèria. Des de que *M. tuberculosis*, l'agent causant identificat al 1882 per Robert Koch (3), la investigació sobre aquest microorganisme ha estat important, malgrat tot encara es desconeixen molts aspectes de la seva capacitat de virulència.

Treballar amb sistemes genètics com els de *Escherichia coli* o *Bacillus* spp. és molt més ràpid i és per això que es coneixen molt millor. En canvi, els models genètics per *M. tuberculosis* són escassos i incòmodes i no ha estat fins aquests últims anys que no s'han desenvolupat eines genètiques per la seva manipulació.

Totes aquestes dades ens poden explicar parcialment com és possible que aquest agent infecciós hagi acompanyat l'home en tota les etapes de la seva existència. És més, és la raó de perquè aquesta malaltia infecciosa és la més devastadora de tota la història de la humanitat. De fet, no podem oblidar-nos d'una de les característiques més desconegudes d'aquest bacil i causa principal de la seva persistència a la història, la latència.

Generalment, l'estat de latència és un equilibri entre l'hostatger i el bacil, i va ser definida inicialment com la presència de lesions tuberculosos que no produeixen simptomatologia (4). Actualment, aquesta definició caldria revisar-la.

M. tuberculosis entra per via aerosol i és fagocitat per un macròfag resident als alvèols. Després d'una resposta innata més o menys eficient, s'estableix una resposta específica contra el bacil que normalment culmina amb la definició d'un granuloma. Aquesta estructura conté el bacil evitant la seva disseminació. Així el bacil evita la seva destrucció i roman en un estat de replicació no persistent que ocasionalment pot revertir a malaltia si es trenca l'equilibri amb la resposta immune.

El principal problema que ens trobem en aquest estat no replicatiu és que es desconeix totalment la biologia del bacil latent a nivell de metabolisme, replicació,...etc. i la seva relació amb la immunitat local.

Aquest treball intenta donar més llum sobre el bacil latent a nivell genètic i immunològic basant-se en estudis de metabolisme i resposta a l'estrès en un model *in vitro* i en el model murí per aerosol. L'objectiu essencial serà doncs el de cercar marcadors moleculars que permetin determinar la presència de bacils latents en teixit. Concretament, aquest estudi ha permès conèixer com varia l'expressió de més de 60 gens de *M. tuberculosis* a la presència d'àcid en un model *in vitro* que podria reproduir les condicions presents al interior del macròfag. Posteriorment, s'ha estudiat l'expressió dels gens més rellevants en ratolins infectats per aerosol aconseguint informació sobre el comportament d'aquest bacil dins del seu hostatger durant tot el procés d'infecció mitjançant la caracterització immunològica d'un model crònic per l'estudi de 24 citocines. Prèviament, s'ha caracteritzat àmpliament la patogènia d'aquest model crònic comparant la susceptibilitat a la infecció de dues soques de ratolí.

I. LA TUBERCULOSI

1. Història de la tuberculosi

Els primers signes de malaltia tuberculosa es van trobar a ossos d'un home prehistòric que visqué fa 10000 anys. També s'han trobat restes en mòmies egípcies i asteques i en escrits hindús i xinesos. Totes aquestes troballes cal valorar-les amb compte ja que hi ha moltes malalties que poden ser semblants a la tuberculosi. El factor principal d'aquesta llarga vida simbiòtica amb l'ésser humà és la capacitat de persistència en persones asimptomàtiques (5).

Els símptomes de la tuberculosi van ser descrits per primera vegada a la Grècia Clàssica on es començà a anomenar tisi. A més, van observar l'afectació pulmonar i la formació dels tubercles. També foren aquests qui varen iniciar un tractament basat en el repòs i la dieta abundant. Posteriorment, els àrabs i els perses van detallar l'evolució anatòmica dels diferents estadis de la tuberculosi i els òrgans que podia afectar al malalt.

Durant el segle XVIII, el metge francès Pierre Desault va intuir que els espunts podien ser la causa de la disseminació de la malaltia descrivint la possible especificitat entre els tubercles i la tisi.

En el Romanticisme, la tuberculosi va ser la malaltia "de moda". Afectava a gent jove donant un aspecte fràgil i malenconiós, molt escaient per l'època. També es va associar amb un increment de la creativitat en qui la patia. Existeixen casos famosos com ara el de l'Emily Brontë, autora de "Cims borrascosos" o d'Edgar Allen Poe.

A meitats del segle XIX es van assolir xifres enormes a Europa, coincidint amb la Revolució Industrial i l'hacinament de grans zones urbanes la tornada a les zones urbanes. La mortalitat a Anglaterra va arribar a ser de 700 casos per 100.000 habitants, a Viena va ser de 800 per 100.000 i fins a 900 per 100.000 a Praga.

Finalment, la tuberculosi va ser considerada un problema de salut pública. Molts científics van dedicar molt esforç al seu estudi, entre d'ells destaca René-Théophile Laënnec (1781-1826) creador del mètode anatomo-clínic que va poder descriure la lesió més característica de la malaltia: la caverna tuberculosa; Jean-Antoine Villemin (1827-1892), va ser el primer en demostrar que la tuberculosi era contagiosa; i Robert Koch (1843-1910) qui va identificar l'agent causant de la tuberculosi: el *Mycobacterium tuberculosis* o Bacil de Koch.

Aquest descobriment va permetre diagnosticar la malaltia objectivament mitjançant la detecció del bacil tuberculós en esputs ja fos per medis de cultiu adequats o per la tinció de Ziehl-Neelsen. Cal afegir el descobriment dels raigs X per part de W.C. Rontgen (1845-1925) que va permetre l'estudi radiològic de les lesions pulmonars característiques de la tuberculosi i altres malalties. Totes aquestes descripcions i tècniques procedents d'èpoques heroiques de la medicina segueixen, paradoxalment, plenament vigents avui en dia.

2. Generalitats de la tuberculosi

La infecció humana amb *M. tuberculosis* pot donar lloc a diferents desenvolupaments, variant des de la infecció asimptomàtica a la disseminació miliar que ocasiona una malaltia mortal. Es pensa que aquest ventall enorme de possibilitats està relacionat amb la interacció de *M. tuberculosis* amb el sistema immune humà.

La gran majoria de persones que s'infecten amb *M. tuberculosis* cursen de forma asimptomàtica la resta de la seva vida i la única forma de conèixer aquesta infecció és la prova de la tuberculina. En canvi, una minoria representada per un 10-15% desenvolupa la malaltia.

La prova de la tuberculina és una reacció de hipersensibilitat de tipus IV o retardada, és a dir basada en limfòcits T. Els macròfags i les cèl·lules dendrítiques presenten l'antigen PPD als limfòcits Th1 específics que generen una resposta immune basada en l'alliberament de quimiocines que promouen el reclutament de macròfags i leucòcits polimorfonuclears. És més, segons una recent publicació serien les cèl·lules dendrítiques les encarregades de migrar als nòduls limfàtics i començar allà una resposta de tipus Th1 (6).

Els macròfags alveolars són el primer punt de trobada amb *M. tuberculosis* que normalment el fagocita. Aquest tipus de macròfag desenvolupa una funció clau en el desenvolupament de la infecció. En primer lloc, és capaç de secretar enzims proteolítics i altres metabolits amb capacitat antimicobacteriana (7,8). També és capaç de processar i presentar antígens micobacterians a limfòcits T, CD4 i CD8, peces clau en la resposta antimicobacteriana. Per últim i no menys important, els macròfags són capaços de secretar un patró de mediadors solubles (citocines i quimiocines) amb efectes immunoreguladors i mediadors de moltes de les manifestacions clíniques de la tuberculosi.

El perfil de producció de citocines va ser definit primerament en el model murí, distingint els limfòcits Th1, productors de IFN- γ , IL-2 i limfotoxina, augmentant l'activitat microbicida dels

macròfags. Les cèl·lules Th2 secretaven IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 i recolzaven la resposta de tipus humoral. També hi havia secreció de IL-13, GM-CSF i TNF per part dels dos tipus cel·lulars (9).

L'equilibri entre una resposta de tipus Th1 i Th2 modula les manifestacions de la infecció per part de patògens intracel·lulars i sembla ser que existeix una altra interleucina, la IL-12, que és un candidat ferm per controlar tota la maquinària de defensa en aquest punt clau, polaritzant la resposta cap a una resposta de tipus Th1.

3. Evolució de la malaltia tuberculosa

La infecció tuberculosa comença amb la inhalació de partícules que contenen de 1 a 3 bacils viables. Aquestes partícules han de tenir una mida molt determinada per poder romandre a l'aire que arriba als espais alveolars i no ser ni massa lleugeres ni massa pesades (10)

Després de la fagocitosi del bacil per part del macròfag alveolar, aquell pot ser destruït quan es tracta d'un macròfag activat o el bacil pot començar a créixer i acabar matant la cèl·lula.

Si succeeix el segon supòsit, *M. tuberculosis* creix exponencialment dins dels macròfags alveolars no activats començant a formar un pregranuloma amb necrosi. A continuació, es desenvolupa la resposta immune específica que acaba controlant i convertint el creixement del bacil en estacionari. En aquest moment, es forma un granuloma amb necrosi intragranulomatosa, envoltada per macròfags activats i no activats. En funció del nombre de macròfags en un estat o altre i de la supervivència del bacil, es decidirà l'evolució de la lesió.

Aquest és un dels punts claus de la malaltia. Dannenberg (11), basant-se en experiments realitzats per Lurie (12,13) fa 40 anys, va definir aquest estat amb el famós experiment dels conills resistents i susceptibles. Els conills resistents, que podrien tenir un paral·lisme amb els adults immunocompetents, desenvolupaven una immunitat específica més eficients i la necrosi era menys important, fet que aconseguia limitar la malaltia moltes vegades per tota la vida. En canvi, els conills susceptibles, que representarien als nens i adults immunodeprimits, no muntaven una resposta tan efectiva i la lesió anava creixent degut a la infecció de macròfags no activats per part dels bacils localitzats al *caseum* i a una necrosi més important i alhora es generaven més lesions fruit de la disseminació.

Finalment, i per causes encara no massa conegudes, el teixit necròtic del conill resistent es líquüefactava donant lloc a un medi de cultiu excel·lent pel bacil que creixia extracel·lularment per primera vegada. Això desemboca en la formació d'una cavitat degut a la toxicitat de la enorme càrrega antigènica present que produeix una reacció inflamatòria massiva.

Així doncs la líquüefacció, que només es donava en conills resistents perpetua la malaltia en l'espècie humana ja que en el moment que es formen les cavitats, el portador és capaç de infectar a altres persones. Per un altre cantó, l'hostatger *drena* les seves pròpies lesions i té més oportunitats de guarir-se espontàniament.

Actualment, existeixen altres interpretacions de l'evolució granulomatosa basades en evidències histopatològiques on es defineixen categories de granulomas en funció del moment de la infecció davant del que ens trobem (14)

4. Visió general de la resposta immune a *M. tuberculosis* en el ratolí.

La infecció per *M. tuberculosis* via aerosol comença per la inhalació d'un nombre petit de bacils (de 20 a 50) per part del ratolí. Hi ha una progressió durant 20-30 dies fins l'establiment d'una immunitat cel·lular adquirida, caracteritzada pel desenvolupament d'una població de limfòcits CD4 capaços de secretar IFN- γ que a la vegada activa els macròfags infectats per intentar destruir al bacil (15).

Aquest plantejament és, en teoria, el fet més important en la resposta immune davant de la infecció. Existeixen, però, molts altres factors que influiran en la progressió davant *M. tuberculosis*.

Les cèl·lules T γ/δ tenen funcions semblants a les cèl·lules T CD4, com ara secretar IFN- γ (15). Existeixen estudis amb ratolins KO pels gens TCR γ/δ on demostren que després d'una infecció per aerosol eren capaços de controlar el creixement exponencial i desenvolupar una resposta immune efectiva, però posteriorment l'eliminació del bacil era més lenta (16). El grup d'Orme es decanta cap a una funció més "innata" d'aquestes cèl·lules com ara la producció de quimiocines com la MCP-1 (17) o altres anti-inflamatòries (18). Últimament, i per treballs fets en models experimentals sembla clar que aquests limfòcits no són essencials pel control de la infecció tuberculosa. Sembla que els animals amb dèficit en aquests limfòcits tenien un temps de supervivència igual als animals normals (19). Potser el paper més important seria el de controlar la inflamació produïda per la infecció (20).

Un altre tipus cel·lulars són les cèl·lules T CD8. Aquestes cèl·lules tenen una funció important en el control de la infecció crònica però encara no definida clarament. Les cèl·lules T CD8 són capaces de proliferar i secretar IFN- γ davant l'estímul de micobactèries vives o dels seus antígens (21). També poden tenir funcions citotòxiques en destruir macròfags no activats per poder alliberar micobactèries que seran fagocitades per altres macròfags activats o poden matar directament el bacil intracel·lular. Existeix un ratolí CD8-*knockout* on les diferències trobades giren

al voltant de l'establiment de la infecció crònica més que diferències en els primers moments d'establiment de la resposta immune (22).

Existeixen més poblacions cel·lulars minoritàries i no massa estudiades com ara les CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻, les NK 1.1⁺ CD4⁺ o les NKT, les funcions de les quals no queden massa ben aclarides (23) i que estarien relacionades amb l'activació dels macròfags infectats secretant IFN- γ mitjançant el reconeixement dels epítops a través de receptors diferents al del MHC, com el CD-1.

Els macròfags són de vital importància en la infecció per *M. tuberculosis*. El bacil s'allotja al seu interior i el macròfag ha de ser capaç de destruir-lo en ser activat mitjançant citocines, reduint el pH dins del fagosoma i exposant el bacil a reactius intermediaris de l'oxigen i del nitrogen (ROIs i RNIs). Estudis recents han posat de manifest la importància de les cèl·lules dendrítiques en relació als macròfags (23,24,25). Fins i tot s'ha arribat a relacionar la *heat shock protein 70* amb la maduració de les cèl·lules dendrítiques (26). La capacitat de migració als nòduls limfàtics on començaria una resposta efectiva Th1 seria per part d'aquestes cèl·lules dendrítiques i no pels macròfags, limitant la seva funció a secreció de quimiocines i ajuda a la resposta.

Hi ha moltes citocines i quimiocines implicades en la resposta davant *M. tuberculosis* tot i que moltes de les seves funcions no són del tot conegudes.

La citocina clau és, com ja hem dit abans, l'IFN- γ . Les cèl·lules T CD4 amb un fenotip Th1 són capaces de secretar-lo afavorits per la presència de IL-12 activant el macròfag infectat i poder així eliminar els bacils intracel·lulars (27). Actualment, existeixen diversos estudis en els que es discuteix activament quina seria a base d'aquesta relació entre la producció de IFN- γ i *M. tuberculosis* (28,29,30). Com a fet notable cal destacar el paper que juga el IRF-1 en aquest escenari, un factor de transcripció que és produït en presència d'alts nivells d' IFN- γ i que s'encarrega de la inducció d'altres gens necessaris davant de la infecció amb *M. tuberculosis*. El grup de Richard Pine ha trobat que *M. tuberculosis* té la capacitat de limitar l'augment d'IRF-1 afavorint així el seu creixement. Sembla ser que aquesta inhibició seria a nivell de transport del nucli al citoplasma (30). Recentment, en una publicació al *Science* es descriu un dels possibles mecanismes relacionats amb aquest factor IRF-1. Es tracta de la molècula LRG-47 de la família de les GTPses p47 i sembla confirmar-se la seva importància cabdal en la resposta immune independentment de NOS2 amb una eficàcia comparable (31)

Altres citocines proinflamatòries com ara el TNF són de importància vital per reclutar leucòcits i per definir l'estructura del granuloma (32) També cal remarcar la funció de la IL-1 a nivell proinflamatori (33). La producció de IL-1 per part de monòcits estimulats amb *M. tuberculosis*, lipoarabinomanà i proteïnes micobacterianes de pes molecular de 20 i 46 kDa (34) contribueix a la resposta inflamatòria. A més, la seva presència estimula la secreció de IL-6 i de TNF, juntament amb l'estimulació de l'expressió de receptors de IL-2 per part de les cèl·lules T i la mateixa producció de IL-2 (35). Les cèl·lules mononuclears i els macròfags produeixen grans quantitats de TNF en resposta a bacils vius i/o morts de *M. tuberculosis*, lipoarabinomanà i proteïnes sintetitzades per *M. tuberculosis* de pes molecular de 20, 44, 58 i 65 kDa. Aquesta secreció de TNF és dependent de la presència de grups acil al lipoarabinomanà, així com de la molècula CD14 del macròfag (36). La funció primordial d'aquesta molècula seria la protecció davant de *M. tuberculosis* i la formació del granuloma (37). Encara que existeixen evidències per afirmar que causaria efectes patològics en quantitats excessives donant lloc a necrosi en el teixit. Caldria afegir un altre paper molt important del TNF que recentment s'ha confirmat per l'ús de *infliximab*, un anticòs humanitzat contra TNF per al tractament de la malaltia de Crohn i l'artritis reumatoide. Realment, el TNF podria jugar un paper clau en la reactivació de cursos llargs de la malaltia latent humana, fet que el proposaria com un candidat clau per a l'estudi de la latència (38). És més, un estudi d'aquest mateix any, classifica aquesta molècula com un modulador de la resposta Th1 excessiva segons un estudi fet en ratolins TNF^{-/-} controlant la destrucció del teixit i la proliferació de cèl·lules T (39)

Existeixen diferents estudis on es defineix la importància de la resposta a nivell de quimiocines. Principalment, cal remarcar l'acció de MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, MIP-3 α , MIP-3 β , RANTES, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3 (37,40).

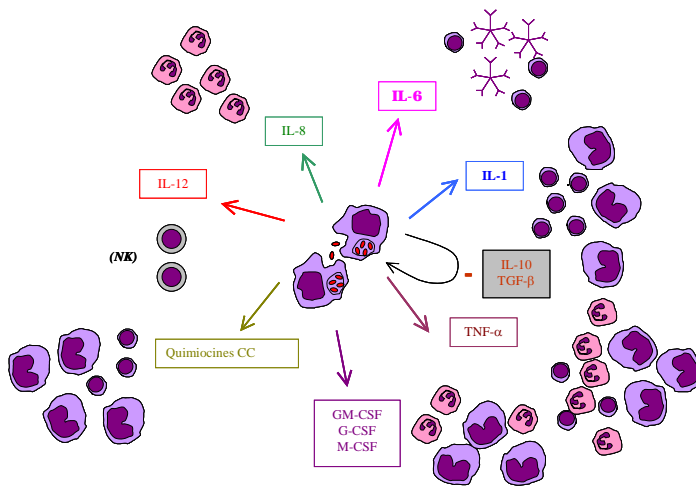
A grans trets, MIP-2 és un potent atractor de neutròfils (41). MCP-1 atrauria monòcits i limfòcits T activats (42). MIP-1 α i MIP-1 β atrauen i activen leucòcits polimorfonuclears (43). La IP-10 s'encarregaria de reclutar i activar cèl·lules T i monòcits als focs inflamatoris. MIP3 α i MIP-3 β té activitat selectiva per atraure cèl·lules B i T *naïve* i cèl·lules dendrítiques, sent de vital importància en facilitar la presentació antigènica a nivell de mucosa i epiteli (44). RANTES és clau en la formació del granuloma (45), a més, indueix l'activació i proliferació de cèl·lules T i macròfags (46).

| | | Neutròfils | Basòfils | Eosinòfils | Cèls NK | Monòcits | Limfòcits | CDs |
|---------------------------|------------|------------|----------|------------|---------|----------|-----------|-----|
| MIP-1 <i>alpha</i> | CC | | | ++ | +++ | +++ | | |
| MIP-1 <i>beta</i> | CC | | | | +++ | +++ | | |
| MIP-2 | CXC | +++ | | | | | | |
| MIP-3 <i>alpha</i> | CC | | | | | | +++ | +++ |
| MIP-3 <i>beta</i> | CC | | | | | | +++ | +++ |
| MCP-1 | CC | | ++ | | +++ | ++ | + | |
| MCP-2 | CC | | | | | + | | |
| MCP-3 | CC | | ++ | ++ | | ++ | | |
| RANTES | CC | | +++ | ++ | + | +++ | | |
| IP-10 | CXC | | | | | | +++ | |
| G-CSF | FE | ++ | ++ | ++ | | | | |
| GM-CSF | FE | +++ | ++ | +++ | | +++ | | |
| M-CSF | FE | | | | | +++ | | |
| ICAM-1 | MA | ++ | | | | +++ | | |
| VCAM | MA | ++ | | | | +++ | | |

CC: sense residu entre les cisteïnes. CXC: amb qualsevol aminoàcid entre les cisteïnes. Quimiotactisme de les quimiocines. FE: Factors estimulants de colònies. MA: Molècules d'adhesió. DCs: cèl·lules dendrítiques De *Roitt et al* Infectious diseases in Immunology

Introducció

| CITOCINES | Produïda per | Limfòcits B | Limfòcits T | Macròfags | Cèl. Hematopoiètiques | Altres tipus Cel·lulars |
|--------------------------------|---|--|--|---|---|--|
| IL-4 | Th2 mastòcits | Activació, Increment Ig1 i IgE, Inducció MHC classe II | Increment de la supervivència, Inducció de Th2 | Inhibició de l'activació | Increment dels mastòcits | |
| IL-6 | Th2, Macròfags, PMNs | Increment i diferenciació | Co-estimulador | | Inductor de factors estimuladors de colònies | Alliberament de proteïnes de fase aguda |
| IL-10 | Th2, Macròfags | Inducció MHC classe II | Inhibició de Th1 | Inhibició de l'alliberament de citocines | Co-estimulador del creixement de mastòcits | |
| IL-2 | Th1 Alguns Limfòcits CD8 | Estímul del creixement | Estímul de la multiplicació. Inducció de Th1 | | Estímul del creixement de les cèl·lules NK | |
| IFN-γ | Th1 Alguns Limfòcits CD8 | Diferenciació a síntesi de IgA | Apoptosi, Inducció Th1 | Activació Inducció de MHC de classe I i II | Activació de cèl·lules NK | Antiviral Inducció de MHC de classe I i II |
| LT-α | Th1 Alguns Limfòcits CD8 | Inhibició | Destrucció | Activació Inducció de la síntesi de NO | Activació de PMNs | Destrucció de fibroblasts i cèl·lules tumorals |
| IL-12 | Macròfags, PMNs | | Inducció de Th1 | | | |
| TNF | Macròfagos PMNs Limfòcits Th1 Th2 i cèl·lules T CD8 | | | Activació Inducció de la síntesi de ROI i RNI | | |
| GM-CSF | Th1, alguns Th2 i cèl·lules T CD8 | Diferenciació | Inhibició del creixement | Creixement | Estimulació de la producció de PMNs i Macròfags | |
| TGF-β | Limfòcits T, Macròfags i PMNs | Inhibició del creixement, Diferenciació a IgA | | Inhibició de l'activació | Activació dels PMNs | Inhibició/estimulació del creixement cel·lular |



Esquema de la resposta innata davant de la infecció per tuberculosi on observem el paper cabdal que realitza el macròfag

5. La resposta a *M. tuberculosis* és diferent en funció de la soca de ratolí

És sabut que davant de la infecció de diferents soques de ratolí per *M. tuberculosis* existeixen variacions en la seva resistència innata (47,48). No obstant, no està clar quina és la base que explica aquestes diferències malgrat hi hagi molts estudis que tractin d'aclarir-ho.

5.1 Els treballs de Medina i North

El grup de Medina i North (49) van establir les bases de les diferents susceptibilitats trobades a soques de ratolí consanguínies en funció dels temps de supervivència davant d'una infecció per aerosol i intravenosa. Van infectar diverses soques de ratolí, BALB/c, CBA, C3H, DBA/2, C57Bl/6, 129/SvJ, i la F₁ B6D2F1 (C57Bl/6 x DBA/2), CD2F1 (BALB/c x DBA/2), CB6 F1 (BALB/c x C57Bl/6), B6129F1 (C57Bl/6 x 129SvJ) amb *M. tuberculosis* H37Rv via aerosol (80 UFCs) o intravenós (10⁵ UFCs).

En aquest gran experiment van intentar trobar una relació amb el complex major de histocompatibilitat murí (H-2) i la funció del gen *Bcg* (*Nramp1*), estudi que es veuria ampliat amb altres publicacions (50).

Van classificar les diferents soques de ratolins en altament susceptibles (CBA, DBA/2, C3H, 129/SvJ) i altament resistents (BALB/c i C57Bl/6) on les F1 també van ser resistents. L'anàlisi de les soques congèniques H-2 va permetre demostrar que l'haplotip H-2^k podia conferir susceptibilitat a una soca resistent. En referència al gen *Bcg* les soques resistents portaven l'alel susceptible d'aquest gen.

En experiments posteriors, aquests mateixos autors van vacunar les soques de ratolí BALB/c i DBA/2 mitjançant inoculació intravenosa de 10⁶ UFCs de BCG Pasteur. De nou, els

resultats mostraren que els ratolins DBA/2 no van controlar la infecció als pulmons. També cal ressenyar que les dues soques de ratolins tenien el mateix nivell de immunitat sistèmica i van ser capaces de desenvolupar una resposta immune correcta al fetge i a la melsa (51)

5.2 Diferències morfològiques amb base genètica

També s'han fet treballs comparant la estructura pulmonar i altres paràmetres entre ratolins mascle DBA/2, C57Bl/6 i la seva F1 per determinar si existeix un origen genètic associat (52). Les seves troballes indicaren que les dues soques diferien en el tamany del cos i del pulmó i que aquests factors estaven associats a nivell genètic. En els ratolins F1 van definir un efecte matern sobre alguns paràmetres morfomètrics com ara el pes del cos, pes del pulmó, volum pulmonar, proporció alveolar i altres. Es tracta d'un treball molt complet en quant a les dades obtingudes i treballades a nivell estadístic, però realment només demostra que els factors genètics són importants en el desenvolupament pulmonar. Ells conclouen afirmant que en un futur es podrà determinar algun *locus* genètic responsable de les diferències a nivell de l'estructura pulmonar.

Mitsos *et al* intentà identificar un control genètic per aquesta diferència de susceptibilitat. Per identificar els gens responsables en la resposta a la infecció per *M. tuberculosis*, van infectar 95 animals C57Bl/6J x DBA/2J d'un creuament F2 per via intravenosa amb 10^5 UFCs per poder determinar la supervivència com una mesura fenotípica quantitativa de la susceptibilitat en un estudi total del genoma.

Aquest anàlisi quantitatiu dels locus (QTL) confirmà que el control genètic és multigènic, fet previsible. Van trobar dos relacions significants en la porció distal del cromosoma 1 (Trl-1, LOD, 4.80) i en la porció proximal del cromosoma 7 (Trl-3, LOD, 4.66) que corresponia aproximadament a un 21% de la variació fenotípica. En la porció proximal del cromosoma 3 (Trl-2, LOD, 3.93; s'afegeix un 18% de la variació fenotípica) van trobar una altra relació significativa. Aquest treball va extrapolar les zones del cromosoma identificades en ratolí amb les mateixes zones als cromosomes humans i en relació amb la susceptibilitat a la infecció per *M. tuberculosis* (53).

Aquest mateix grup ha caracteritzat recentment 2 loci *Trl3* i *Trl4* (*Tuberculosis resistance locus 3* i 4) situats al cromosoma 19 relacionats amb la replicació als pulmons en un model murí per aerosol comparant C57BL/6 i DBA/2 i comprovant que aquest últim no presenta aquesta regulació i la substitueix amb un procés d'inflamació molt important (54).

Cal afegir que una publicació de l'any 1998 i del 2000 (55,56) confirmen l'existència d'un altre locus amb un efecte més important a nivell de la susceptibilitat davant de la infecció, el *sst1*

(susceptibilitat a tuberculosi). Aquest està situat en el cromosoma 1 del ratolí. Els autors afirmen que aquest gen és l'encarregat de controlar la progressió de la infecció tuberculosa específicament en el pulmó. Finalment, indiquen que calen altres gens candidats per controlar la infecció tuberculosa ja que no creuen que sigui unigènic.

5.3 La virulència de *M. tuberculosis* juga un paper molt important

L'any 1999, el grup de Collins va publicar un treball sobre la infecció amb soques de *M. tuberculosis* amb diferents graus de virulència en ratolins amb diferent susceptibilitat davant de la infecció (57). En aquest treball, van infectar de forma aerogènica i intravenosa ratolins C57Bl/6 sense trobar cap diferència significativa en la virulència de les diferents soques en relació amb el seu creixement, però sí tenint en compte la supervivència. Les soques que van fer servir van ser la soca H37Rv, Erdman, Indian 79157 i la CDC 1551. Aquesta última presentava uns nivells inusualment alts d'infectivitat i virulència en humans. Totes tres soques mostraren el mateix perfil de creixement en melsa i pulmó transcorreguts 120 dies després de la infecció per aerosol en les tres soques de ratolins infectades (C57Bl/6, DBA/2 i BALB/c).

Dins d'aquesta mateixa línia, un recent treball ens defineix la patogènia de 12 soques diferents de *M. tuberculosis* que representen els 4 genotips més importants al món, la soca control H37Rv i la protecció de BCG en un model intratraqueal amb BALB/c. Les soques amb genotip *Beijing* eren les més virulentes, i les que pitjor responien a la vacuna BCG. La protecció amb IFN- γ va ser la més important encara que no definitiva en soques de tipus Beijing. També va ser important l'acció de TNF i de iNOS (58).

5.4 Estudis comparatius entre ratolins susceptibles i resistents

De nou el grup d'Orme (59), intentà abordar les diferents susceptibilitats de les soques de ratolí en funció de la reactivació tuberculosa basant-se en evidències histopatològiques i en molècules d'adhesió. Després d'infectar via aerosol tres soques de ratolí amb diferent susceptibilitat davant la infecció (C57Bl/6, DBA/2 i CBA/J) i trobar que en fins al dia 60 no existeixen diferències significatives a nivells de creixement, afirmen que els ratolins més susceptibles a la infecció no són capaços d'establir una infecció crònica prou ràpid i finalment moren. També conclouen que existeix un augment en l'expressió de les molècules d'adhesió CD11a i en les CD54 (ICAM-1) presents a la superfície dels limfòcits CD4 i CD8 de ratolins més resistents com ara el C57Bl/6. A nivell histopatològic, les diferències que ells observen es basen en que els ratolins CBA presenten unes ferides granulomatoses més petites i amb més presència de macròfags cap al dia 60

que evolucionen cap a ferides més grans i dominades per macròfags en presència de necrosi cap als 295 dies de infecció. En canvi, les ferides del ratolí resistents són més localitzades i controlades amb més presència d'agregats limfocítics i més macròfags activats durant els 295 dies.

Una publicació molt interessant de l'any 2000 sobre cèl·lules T recuperades de ratolins amb diferent susceptibilitat ens pot ajudar a comprendre millor les diferències trobades entre soques més o menys susceptibles a la infecció (60). En aquest treball infecten per via intravenosa ratolins I/St (susceptibles), I/Sn (resistents) i la F1 (A/Sn x I/St, hiperresistents). Els primers resultats al pulmó indicaren que la població de limfòcits CD4 activats capaços de secretar IFN- γ i en conseqüència activar els macròfags per produir NO s'acumulava amb la progressió de la malaltia de forma semblant en les tres soques de ratolins. En canvi, la proporció de cèl·lules CD8 acumulades en pulmons de ratolins susceptibles era significativament menor.

En referència a les cèl·lules T recuperades de les diferents soques, cal dir que les cèl·lules del pulmó i les cèl·lules T del ratolí susceptible van produir més IL-5 i IL-10 que no les dels ratolins resistents. També cal remarcar que la producció de IFN- γ per part dels ratolins resistents i hiperresistents va ser més important.

Es tracta d'un treball que recolza l'equilibri Th1/Th2 com a una de les causes primordials de les diferències entre soques. Corresponent el perfil Th2 a soques més susceptibles i el patró Th1 a soques de ratolí capaces de controlar millor la infecció. De totes maneres, la seva conclusió i explicació seria que aquell animal que fos capaç d'equilibrar de forma més acurada els dos perfils de resposta obtindria el millor resultat davant la infecció, fet que coincideix amb la soca hiperresistent F1 que ells estudien.

Per una altra banda, cal valorar els últims estudis del grup d'Orme en que demostra que la immunitat basada en Th2 no interfereix en el desenvolupament i en la protecció exercida per la resposta Th1 (61).

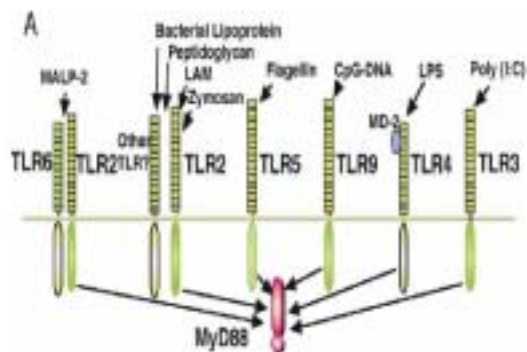
Aquest estudi ha estat complementat amb una caracterització cel·lular posterior molt completa davant una infecció intratraqueal. La conclusió a la que han arribat aquests investigadors és que la base de la diferència entre aquestes dues soques és la incapacitat de la soca susceptible de produir menys citocines de tipus Th1 (62).

5.5 La disseminació inicial, clau de la resistència a la infecció

Cal remarcar també un treball del grup de Chackerian *et al* on tornen a qüestionar-se el perquè de la diferent disseminació de *M. tuberculosis* a diferents soques de ratolí (63). Es tracta d'un treball molt interessant en quant a les idees finals. Acaben resolent que en els ratolins C57Bl/6, la disseminació de *M. tuberculosis* es dona abans i en conseqüència, es desenvolupa abans la immunitat contribuint a una superior resistència. Ells conclouen dient que la resistència a tuberculosi és multifactorial i que a més, és controlada per factors genètics i ambientals. Suggereixen que cap dels gens mencionats anteriorment (*Nramp1* i *sst1*) tenen importància en la disseminació de tuberculosi, sinó que es tracta d'una interacció de *M. tuberculosis* amb la resposta innata de l'hostatger. En referència a aquesta resposta innata, assenyalada tan important per tants autors, cal remarcar la importància del TNF a nivell dels seus receptors específics TLR2.

Podem dir que encara que hi hagi una presentació de moltes i diferents fraccions micobacterianes, totes requereixen el TLR-2 per la inducció de TNF en els macròfags, és a dir, sembla ser essencial per la inducció d'una resposta immune protectora (64). També existeixen treballs sobre altre tipus de receptors com ara el CCR2 (65) on descriuen també que aquest tipus de receptor és clau en el desenvolupament d'una resposta protectora eficient.

El TLR2 està clarament relacionat amb la resposta a endotoxines com el LAM, a més a més, està relacionat amb la regulació de la inflamació (66). Per una altra part, la funció del TLR4 no està molt clara encara. Recentment, s'ha desvinculat de la susceptibilitat a la infecció tuberculosa en ratolí, encara que és la peça clau davant de la resposta al LPS (67). El TLR3 sembla estar relacionat amb la resposta a RNA de doble cadena i el TLR5 amb el reconeixement de la flagelina. El TLR9 és cabdal pel reconeixement del cDNA micobacterià involucrat en el desenvolupament de la inflamació. Els principals TLRs implicats en la resposta a la micobàcteria, TLR2, 4 i 9 tenen com a mediador de senyal al MyD88, que a més està involucrat en les respostes de tipus Th1 i la seva senyalització (68).



Chackerian *et al* apunten com a possibles diferències de susceptibilitat, el tràfic cel·lular, infectibilitat cel·lular de l'hostatger, control bacterià per part de les cèl·lules de l'hostatger o supervivència de cèl·lules de l'hostatger, és a dir, factors innats en l'hostatger. En referència a aquest article cal remarcar que la infecció per aerosol realitzada es basa en un inhalador nasal individual que és capaç d'inocular 350 ± 200 UFCs. Aquest nombre és bastant alt per ser una inoculació per aerosol individual i cal com a mínim qüestionar-se la seva utilitat.

II. MODELS ANIMALS

1. Antecedents

Actualment, l'ús d'animals d'experimentació és un punt clau en l'estudi de moltes malalties infeccioses. Cal dir que en la gran majoria de casos l'animal s'utilitza com a substitut o model de l'home i que la investigació biomèdica i les proves de seguretat són els objectius més comuns dels models.

L'experimentació animal entesa com un procediment específic on intervinguin animals siguin vertebrats o invertebrats, té el seu origen a Grècia on es van practicar ja les primeres viviseccions. Aquestes queden reflectides al primer llibre mèdic, el *Corpus Hippocraticum* 400 anys abans de Crist. El filòsof i metge Galè, va ser un dels primers en treballar amb animals en els primers segles de la nostra història. Posteriorment, cap al segle XVI-XVII Harvey i Vesalius van escriure tractats sobre l'anatomia humana i animal.

No és fins al segle XVIII que la ciència de l'animal de laboratori comença a agafar una certa rellevància a Anglaterra que és ràpidament aturada al segle següent per societats anti-viviseccionistes. Tot això porta cap a la creació de la primera llei per la protecció dels animals d'experimentació l'any 1876 (*Cruelty to Animals Act*).

Actualment, i gràcies al desenvolupament d'algunes disciplines mèdiques com ara la farmacologia, toxicologia o immunologia, la troballa dels primers anestèsics cap al 1850 o llibres com la *Introducció a l'estudi de la medicina experimental* de Claude Bernard s'ha vist incrementat molt el nombre i el tipus d'animals emprats en experimentació. El 1865, Claude Bernard publicà la introducció a l'estudi de la medicina experimental que va ser el principi de la utilització de models experimentals humans com a base per l'estudi científic de malalties en els humans.

2. Legislació i benestar dels animals

L'opinió general sobre l'experimentació animal ha estat sempre molt crítica, encara que existeix una gran part de la població que està d'acord amb l'ús d'animals per l'experimentació.

Persisteix una línia directriu pel treball amb animals que es podria resumir en el concepte de les tres R de Russell i Birch (69), reemplaçament, reducció i refinament. Com a reemplaçament s'entén que la substitució d'animals viu per mètodes *in vitro* és prioritària. La reducció es refereix a intentar disminuir sempre el nombre d'animals a utilitzar en un experiment. I el refinament és un concepte que s'associa a benestar animal a nivell d'alimentació, condicions ambientals, tracte que en el fons contribuirà a l'homeostasi de l'animal i a una millora de la qualitat de l'experiment.

La legislació actual sobre l'ús i protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres finalitats va ser elaborada al Consell d'Europa al 1986 (70). El *Real Decreto 223/1988 del 14 de març de 1988*(B.O.E. N67 18-3-1988) (71) regeix a nivell de l'Estat Espanyol per la *Orden de 13-10-1989* (B.O.E. N250 18-10-1989) (72) i pel *Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo* (B.O.E. N256 25-10-1990) (73).

La directiva creada pel Consell d'Europa al 1986 resumeix en poques frases la idea principal a assolir dient "...la armonización debería garantizar que el número de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos se reduzca al mínimo, que a dichos animales se les conceda la atención adecuada, que no se les cause dolor, sufrimiento, angustia o lesión permanente innecesariamente y que, en caso de no poderse evitar, estos perjuicios sean mínimos."

3. Criteris de treball en el model animal

Des de fa més d'un segle els models animals han possibilitat el coneixement de la fisiopatologia de diverses malalties i han servit per estudiar la seva prevenció i tractament. El model d'una determinada malaltia busca la major semblança amb el que passa a l'home o en un animal superior. Intenten reproduir les característiques de la infecció natural com ara el microorganisme causant, la via d'entrada, la disseminació als òrgans i l'afectació tisular. Cal que el curs, la duració i els resultats siguin reproduïbles i analitzables.

El concepte de model animal podria ser un individu o individus on s'estudia la biologia o conducta normativa o en el que s'investiga un procés patològic induït o espontani i on aquest fenomen se sembla en algun aspecte al cas humà o alguna altra espècie (74)

4. Models de tuberculosi

Fa ja més d'un segle que es van dur a terme les primeres infeccions experimentals amb *M. tuberculosis*. Durant aquests anys, s'han fet servir varis models. La seva elecció afecta clarament als resultats i la conclusió obtinguda que poden variar significativament. És difícil determinar quin és el millor model per treballar ja que cada un té unes característiques molt concretes. És per això que cada model és emprat per unes finalitats diferents.

Els models de tuberculosi més utilitzats són aquells per via aerosol i per inoculació intravenosa. El model que reproduïx millor la història natural de la tuberculosi és el model per via

aerosol encara que té un perill potencial evident i això fa que només un nombre reduït de laboratoris l'utilitzi. El model per via aerosol es fonamenta en l'ús de la màquina de Middlebrook capaç de crear inòculs constants i molt reproduïbles (75).

En el model de tuberculosi experimental s'ha treballat essencialment amb tres espècies animals: el conill, el conill-porquí i el ratolí. L'any 1955 Lurie *et al* (76) van establir dos conceptes clau en l'estudi de la tuberculosi al conill. Van establir la importància del macròfag i de la necrosi intragranulomatosa en funció de dues soques de conills amb diferent grau de sensibilitat davant de soques de *M. tuberculosis* i *M. bovis* amb diferents graus de virulència. Els ratolins més susceptibles a la infecció van experimentar una disseminació més hematògena semblant a la trobada en nens i adults immunodeprimits; mentre que els ratolins més resistents desenvoluparen una disseminació broncògena amb cavitacions com la trobada en humans immunocompetents. Els conills susceptibles sempre sobreviuen, fins i tot després de 12 mesos, tot presentant diversos focus primaris i secundaris. Els més resistents feien una cavitació important sense progressió ni focus secundaris.

Estudis d'infecció tuberculosa en conill-porquí van demostrar que aquests animals eren extremadament susceptibles (77). El inòcul emprat era especialment baix (de 1 a 3 bacils) donant lloc al mateix patró de desenvolupament de la infecció i posterior malaltia. Aquest model s'ha fet servir principalment per desenvolupar vacunes i valorar la hipersensibilitat retardada ja que té una resposta molt semblant a la humana.

Finalment, el ratolí pot ser fàcilment infectat al laboratori amb una gran varietat de espècies micobacterianes. En els últims anys, aquest model ha estat el més emprat degut en part a raons econòmiques, pel gran repertori de reactius disponible, pel profund coneixement dels mecanismes immunològics que se'n té, però sobretot per l'àmplia disponibilitat d'animals transgènics i de diverses soques amb diferents graus de susceptibilitat.

5. Els models animals

Els rosegadors constitueixen l'ordre més nombrós dins dels mamífers amb quasi 2000 espècies. La família *Muridae* inclou als ratolins com a membre amb més espècies i subespècies, d'on cal destacar els ratolins domèstics, en anglès *house mouse* (*Mus musculus*) com a membre representatiu per l'estudi científic. Algunes de les subespècies més importants són *Mus musculus musculus*, *Mus musculus castaneus* i *Mus musculus bactrianus* (78).

Les raons per les quals aquest petit animal ha estat fet servir com a paradigma d'animal de laboratori responen al seu petit tamany, a que es reproduïx ràpidament i amb facilitat, i a que el seu manteniment és senzill i econòmic. Encara que també caldria destacar la facilitat en l'obtenció de línies consanguínies per a crear individus genèticament idèntics, en la creació d'híbrids i de ratolins modificats genèticament amb tècniques de mutagènesi dirigida.

Podem assegurar que l'establiment de les línies de ratolins actuals van aparèixer a principis del segle XX realitzades per a venta i cria de ratolins. Ara per ara, la primera línia homozigòtica va ser la DBA; posteriorment van aparèixer altre de molta importància com ara les C57BL/6, C57BL/10, C3H, CBA i BALB/c. (79)

La majoria de soques de ratolí fetes servir actualment en models d'infecció tenen la característica de ser lliures de patògens específics, de l'anglès *specific pathogen free (spf)*. Actualment, el mètode més utilitzat per a iniciar l'obtenció d'aquests animals és la transferència d'embrions.

L'estandardització genètica dels rosegadors de laboratori es caracteritza perquè la seva constitució genètica està fixada de forma casi definitiva, on les línies consanguínies són un clar exemple. La consanguinitat és l'acoblament entre membres emparentats, i una línia consanguínia és el resultat de l'acoblament seguit i ininterromput entre germans i germanes durant més de 20 generacions tots provinents d'un mateix parell de progenitors resultant en una progènie amb una homologia genètica del 99,9%.

També podem parlar d'una uniformitat fenotípica i una estabilitat genètica durant llarg temps. Es pot afirmar llavors que qualsevol variabilitat en els paràmetres experimentals es degut a causes ambientals o metodològiques així com la comparació entre diferents laboratoris i en diferents moments de la història.

Finalment, la creació de mutacions específiques en qualsevol gen i la incorporació a les línies germinals permet obtenir línies específiques de ratolins mutants KO. La mutagènesi dirigida permet crear aquests gens nuls, mitjançant recombinació homòloga entre les seqüències de DNA dels cromosomes murins i del DNA clonat forani introduït a aquestes cèl·lules.

**III. GENÈTICA MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*:
Virulència i adaptacions a ambients canviants**

1. *M. tuberculosis*: generalitats i genoma

Pertany a la família *Mycobacteriaceae* i a l'ordre dels *Actinomycetales*. És un bacil aeròbic, no esporulador i sense moviment amb una paret cel·lular composta majoritàriament per lípids d' alt pes molecular. El seu creixement és lent amb un temps de generació de 15 a 20 hores i l'obtenció de colònies visibles en medis estàndard comporta unes 3 setmanes mínim. Són bacils d'aproximadament 2-4µm de llarg per 0,2-5µm d'ample.

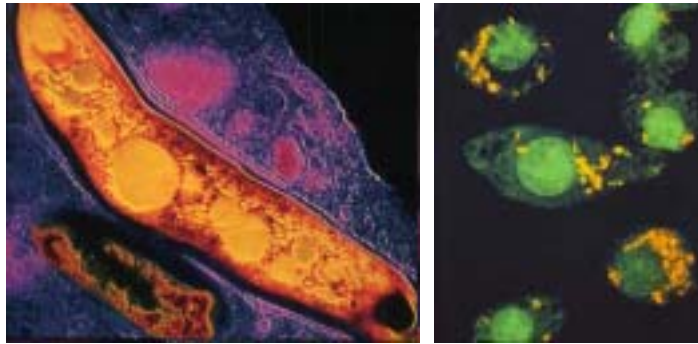


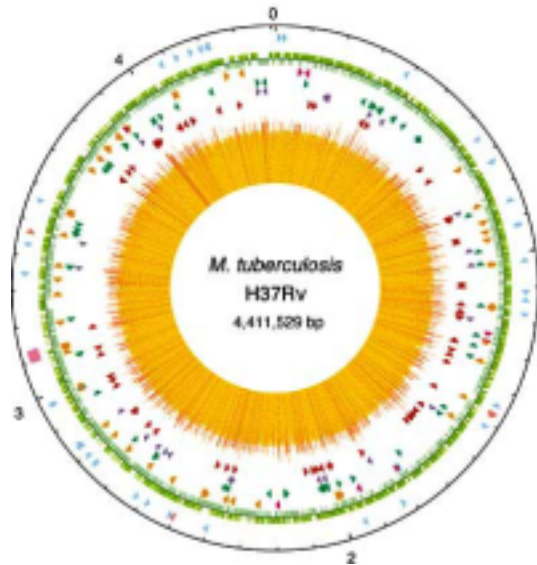
Foto de *M. tuberculosis* a gran resolució on s'observen grans vacuoles i bacils de *M. tuberculosis* dins de macròfags murins.

La disponibilitat de la seqüència completa del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv i la seva informatització ha dotat als investigadors de una eina potentíssima per l'estudi de les característiques d'aquest bacil.

La construcció de mapes genòmics ha estat la peça clau per integrar tota la informació existent sobre el genoma, la seva seqüència i la seva estructura. Aquests mapes consten d'un esquema del cromosoma, la seva disposició dins de la cèl·lula, la representació de tots els còsmids o BACs i la seqüència genòmica (80).

El genoma de *M. tuberculosis* va ser seqüenciat a partir de la combinació de fragments randomitzats de llibreries clonades, BACs seleccionats i còsmids. Són 4.411.532 pb i té un contingut de G+C del 65,6% (81). Inicialment, es van detectar 3.937 gens potencials. El 51% d'aquests gens s'atribueixen a una proteïna amb una funció coneguda. Actualment i segons anotacions posteriors, el nombre de gens ha pujat a 4056, amb un 91% de regions codificants conegudes i amb un 52% de gens amb funció associada ja sigui precisa o suposada. Es van catalogar tots els gens en 11 categories àmplies i funcionals.

Existeixen regions inusualment riques i pobres en G+C que corresponen a la família de gens PE-PGRS o a proteïnes de transmembranes, respectivament (82,83) que representarien un 8% del genoma. També hi ha zones on la distribució de nucleòtids està esbiaixada i corresponen a una nova família de proteïnes, les PPE-MPTR (84). La densitat de gens és la típica d'un procariota, 1 gen cada 1,1Kb.



Representació del genoma de *M. tuberculosis*.

Es va atribuir a totes les seqüències codificants un número de Rv i un nom de gen específic (Rv0987, *hmp*). Cal destacar que el 6% dels gens tenen un producte relacionat amb el metabolisme de lípids; curiosament encara mantenen una maquinària anabòlica bo i essent un representant manifest de patogen intracel·lular, fet que *M. leprae*, paràsit intracel·lular obligatori, ha perdut. En referència a les proteïnes, podem dir que el seu contingut en aminoàcids és ric en glicina, alanina, prolina, arginina, lisina i asparragina.

Interessantment, *M. tuberculosis* presenta 13 factors sigma i 22 proteïnes reguladores incloent 13 sistemes de regulació de dos components. En comparació amb altres microorganismes que necessiten adaptar-se a condicions canviants com ara *Streptomyces coelicolor*, cal dir que aquest últim té 55 factors sigma i 74 gens reguladors. La raó exacta d'aquestes diferències no es coneixen.

El 3,4% del genoma està ocupat per ISs i per profags. S'han identificat fins a la data 56 ISs que pertanyen a diferents famílies (IS3, IS5,...etc) on el més abundant i millor caracteritzat element d'inserció és el IS6110. Existeixen més tipus de DNA repetitius que es disposen en tàndem com

són els MIRUs. Aquestes seqüències es repeteixen 65 vegades en el genoma i s'hipotetitza que codifiquen per petits pèptids (85).

2. Metabolisme general de *M. tuberculosis*

Fa temps que es coneix el fet que *M. tuberculosis* pot fer servir una gran varietat de fonts de carboni (86). És capaç de metabolitzar carbohidrats, hidrocarburs, alcohols, cetones i àcids carboxílics, així com un rang ample de lípids i proteïnes.

M. tuberculosis té la capacitat de sintetitzar els aminoàcids essencials, vitamines i cofactors que necessita encara que se sap poc en referència al transport d'aminoàcids i el metabolisme de pèptids. El grup de Ratledge hipotetitza que el metabolisme d'amino àcids de les micobactèries és idèntic al trobat en altres microorganismes i que la diferència radicaria en la seva regulació (87).

La maquinària biosintètica és molt extensa i important, fet que el permet créixer en medis molt pobres amb una mínima font de carboni. Com a exemple, podem dir que el 22% dels gens de *M. tuberculosis* estan relacionats amb el metabolisme micobacterià i amb la respiració, mentre que el 13% es dediquen a la síntesi de la paret cel·lular (86)

L'any 1990 els autors Stahl i Urbance (88) van classificar les micobactèries en funció del número d'operons de rRNA que presentaven en creixedores lentes (1 operó pel rRNA com *M. tuberculosis* i *M. leprae*, anomenat *rrnA*) i creixedores ràpides (2 operons pel rRNA com *M. smegmatis*). Posteriorment, s'ha estudiat a fons aquest tema i s'ha pogut saber que el segon operó, present en creixedores ràpides, no és significatiu ja que la seva disrupció, no altera la taxa de creixement (89). També, s'ha valorat la presència de més promotors en algunes creixedores ràpides a part dels que normalment funcionen amb *rrnA*, el P1 i el PCL-1 (90). El que queda clar és que existeix una relació entre la taxa de creixement i la capacitat de sintetitzar rRNA que encara cal aprofundir.

Com hem comentat anteriorment, *M. tuberculosis* és un bacil aeròbic. Per tant, l'exposició a ROIs propis del metabolisme i de l'hostatger que infecta podria destruir a la micobactèria. Els mecanismes per evitar això passa per utilitzar enzims com catalases, superoxidases, peroxidases, ...etc., però no posseeix un sistema de resposta l'estrès aerobi. Aquest fet ha promogut varies interpretacions molt interessants com la del grup de Deretic (91) que proposa una resposta constitutiva l'estrès oxidatiu o fins i tot que alguns components de la paret cel·lular podrien donar una resistència important als ROIs promovent una resistència major en aquest bacil (92). Tota aquesta capacitat metabòlica pot permetre al bacil tuberculós sobreviure en condicions totalment hostils dins del granuloma.

3 L'expressió genètica de *M. tuberculosis*

El bacil de Koch no presenta uns factors de virulència establerts com poden ser les toxines produïdes per *Vibrio cholerae* o *Shigella dysenteriae*, i és per això que cal definir uns elements els quals facilitin la progressió de *M. tuberculosis* per a identificar-los com a virulents. Abans d'entrar a discutir cada un dels gens relacionats amb la virulència, caldria definir uns marcadors relacionats amb la patogènia que ens ajudaran a entendre-la millor i fins i tot poder quantificar-la.

La inflamació generada per l'hostatger apareix com una peça clau en aquest escenari ja que la seva presència és necessària per la defensa davant la infecció, però un excés pot portar a una destrucció massiva del teixit provocant efectes negatius. Això mateix passa amb alguna citocina com el TNF (93) i fins i tot l'endocitosi del bacil per part del macròfag pot portar a l'apoptosi d'aquest i a una destrucció tisular important si no és controlat (94)

Per determinar el paper d'un gen en la virulència del bacil tuberculós, cal fer servir moltes estratègies d'aproximació, on la més important podrien ser estudis d'inactivació.

3.1 Gens relacionats amb el metabolisme general

Un dels punts més interessants i clau de tots els estudis *in vivo* i *in vitro* radica en la forma d'obtenció d'energia. Cal recordar que fa més de 50 anys que es va establir que el metabolisme de *M. tuberculosis* en models *in vitro* es basa en la catàlisi de carbohidrats, mentre que quan creix dins del seu hostatger, fa servir el metabolisme dels lípids (86).

3.1.1 *icl*o *aceA* (Rv0467)

La isocitrat liasa és un enzim que permet el *shunt* del glioxilat dins el cicle de Krebs, convertint el isocitrat en succinat. L'expressió d'aquest gen es veu incrementada en fases estacionàries del cicle (95) i també en infectar als macròfags (96). La seva inactivació no permet a *M. tuberculosis* superar la fase de resposta específica en un model murí, i a més, no pot aprofitar fonts de carboni de C₂ (97). La seva expressió en soques *wild-type* ha estat monitoritzada mitjançant *Real-Time* PCR augmentant amb la progressió de la infecció (98). Estudis recents situen la seva expressió dins dels macròfags en teixit, però no en la lesió necròtica central (99,100,101)

3.1.2 *lipF* (Rv3487c)

Segons estudis realitzats recentment, aquest gen seria necessari per a la supervivència del bacil *in vivo*. Està relacionat amb la degradació dels lípids i és induïble per pH (102,103).

3.1.3 *plcA, plcB, plcC* (Rv2351c, Rv2350c, Rv2349c)

Tots aquests gens corresponen a fosfolipases C. Aquests enzims estan molt relacionats amb la virulència de *M. tuberculosis* encara que la seva funció precisa no es coneix. En principi són proteïnes secretades encara que se les associa amb la paret cel·lular. Com a funcions hipotètiques, es pot dir que estarien relacionades amb la nutrició de la micobactèria aportant àcids grassos provinents de l'hostatger, destrucció de la membrana del fagosoma i modulació de la resposta immune. El resultat de la seva inactivació és l'atenuació d'aquestes soques (104).

3.1.4 *panC* i *panD* (Rv3602, Rv3601c)

El producte d'aquests gens és essencial per a la síntesi de CoA. La seva inactivació promou una atenuació de la virulència en un model per aerosol i a més dóna protecció davant soques virulentes de *M. tuberculosis*.

3.1.5 *leuD, trpD, proC, purC* (Rv2987c, Rv2192c, Rv0500, Rv0780)

Aquests gens estan relacionats amb la biosíntesi dels aminoàcids leucina, triptòfan, prolina i purina. La seva inactivació causa una atenuació de major o menor grau en funció del aminoàcid afectat (105,106,107)

3.1.6 *mgtC* (Rv1811)

Es relaciona la seva activitat amb l'absorció de Mg^{2+} . Existeixen dos estudis contraris que difereixen en l'atenuació de les soques on aquest gen ha estat inactivat (108,109)

3.1.7 *mbtB, ideR* (Rv2383c, Rv2711)

El primer és el principal encarregat de sintetitzar micobactines, els principals sideròfors de *M. tuberculosis*. Aquest ve reprimat pel producte del segon gen, *ideR*, que és el regulador principal de l'absorció de ferro i del seu emmagatzematge. Actualment, el ferro es relaciona amb la virulència perquè l'hostatger tendeix a emmagatzemar el ferro soluble, fet que podria restringir la seva disponibilitat a les necessitats metabòliques del bacil. Per una altra part, sembla clar que el bacil resultant de la inactivació de gens relacionats amb l'absorció de ferro és un bacil atenuat (110,111,112,113)

3.1.8 *narG* (Rv1161)

El seu producte és una nitrat reductasa i juga un paper clau en l'absència d'oxigen. Cal dir que darreres investigacions qüestionen el paper de aeròbic obligat del bacil tuberculós. Els estudis

d'inactivació d'aquest gen (i del seu *cluster narGHJ*) s'han realitzat en *M. bovis* no observant-se cap afectació en un model *in vitro* al creixement en situacions d'anaerobiosi. En canvi, l'atenuació demostrada en un model murí demostren la importància d'aquest tipus de metabolisme alternatiu durant la infecció (114).

3.1.9 *katG* (Rv1908c)

KatG és un enzim catalasa-peroxidasa capaç d'activar la INH per a inhibir la formació d'àcids micòlics, formar ROIs i destruir el DNA micobacterià. Existeix molta controvèrsia entorn a l'activitat catalasa-peroxidasa i la virulència de les soques INH^R la qual està fora de l'abast d'aquest apartat (115,116,117).

3.1.10 *sodA* (Rv3846)

El seu producte és una superòxid dismutasa capaç de degradar superòxids, producte típic de degradació de la resposta aeròbica. No ha estat possible inactivar aquest gen en *M. tuberculosis*. Però cal destacar l'estudi de Shi on l'expressió d'aquest gen disminueix amb la progressió de la infecció i s'associa a una disminució del metabolisme i de la multiplicació bacteriana (118).

3.2 Reguladors transcripcionals de dos components

Lògicament, aquests factors són capaços de controlar la transcripció de molts gens i és evident que la seva funció en la virulència serà molt destacada. Aquests sistemes són sensors i factors adaptatius en resposta a un ventall ampli de canvis ambientals. Un dels més ben caracteritzats és el sistema PhoP/PhoR de *M. tuberculosis* on *phoP* sembla que actuaria com a regulador transcripcional. La inactivació d'aquest gen no permet el creixement del bacil al interior del macròfag en un model *in vivo* intravenós, però permet la seva persistència i viabilitat. Recentment, s'està valorant la seva utilitat com a vacuna immunoterapèutica (119).

3.2.1 *phoP* (Rv0757)

La seva funció principal seria la de respondre a l'estímul de falta de Mg²⁺ com faria el seu homòleg de *S. enteric serovar Typhimurium*. Com era d'esperar, la inactivació d'aquest gen produeix una soca que creix molt poc en condicions de Mg²⁺ restringents i en el model murí intravenós (120,121)

3.2.2 DevR/DevS (DosR/Rv3133)

És més important en soques virulentes que no avirulentes (122). DosR s'ha identificat com un factor de transcripció que controla gens relacionats amb la hipòxia en el bacil tuberculós, com ara el *acr* (123). Pel contrari, un estudi recent en ratolins immunocompetents ha demostrat que el fenotip del DevR KO és (124), fet que contrasta amb l'estudi dels gens homòlegs de *M. smegmatis* (125) on es confirma la relació amb la hipòxia (126).

3.2.3 *mprA*, *prxA*, *regX3*, *trcS*, *mtrA*, *dosR* (Rv0981, Rv0903c, Rv0491, Rv1032c, Rv3264c, Rv3133c)

Són altres sistemes de dos components que han estat menys estudiats o amb una importància menor (127,128,129) on cal destacar el sistema *dosR* com a modulador de la resposta a la hipòxia

3.3 Altres reguladors transcripcionals

3.3.1 *hspR* (Rv0353)

Es tracta d'una molècula repressora de *heat shock genes*, és a dir, s'uneix específicament a la seva seqüència de DNA a la regió promotora de *hsp70*, per exemple. La seva inactivació provoca un resultat bipolar. En un model *in vitro* és capaç de créixer millor presumiblement degut a la major presència de *heat shock proteins*. En canvi, en un model murí es comporta com una soca atenuada ja que la major presència de *heat shock proteins* fan que l'hostatger respongui millor davant la infecció suposadament (130).

3.3.2 *relA* (Rv2583c)

Els estudis realitzats demostren que podria tenir una gran importància en la persistència del bacil. El producte d'aquest gen és una ATP:GTP/GDP/ITP 3'-pirofosforiltransferasa i Mn^{2+} dependent (p)ppGpp 3'-pirofosfilhidrolasa. Manté una homologia molt important amb la guanina hiperfosforilada (ppGpp) de *E. coli*. La seva inactivació va suggerir problemes en condicions anaeròbiques encara que era capaç de sobreviure dins del macròfag. Els estudis murins han demostrat que aquesta soca mutada no era capaç de establir una infecció crònica segurament associat als gens que veien afectada la seva activitat transcripcional: enzims de biosíntesi de paret cel·lular, *heat shock proteins*, antígens secretats,...etc (131,132,133)

3.4 Proteïnes secretades i constituents de la paret micobacteriana

Les micobactèries en créixer alliberen proteïnes al seu medi i algunes d'aquestes han estat proposades com a antigens protectors responsables del reconeixement del bacil per l'hostatger. Algunes d'aquestes proteïnes són excretades al medi en grans quantitats durant els primers dies de cultiu. Altres són secretades a través de la membrana citoplasmàtica acumulant-se durant tot el temps de cultiu i es poden localitzar a la part més externa de la paret cel·lular del bacil. Finalment, antigens citoplasmàtics alliberats de bacteris morts apareixen en la fase estacionària de forma sobtada i en grans quantitats (134)

La protecció davant la infecció tuberculosa està basada en una resposta de tipus cel·lular i per això és interessant trobar un antigen capaç d'estimular una resposta basada en cèl·lules T protectores. *M. tuberculosis* és un bacil ric en antigens que indueixen aquest tipus de resposta que poden estar presents en paret cel·lular purificada, fraccions citosòliques i en filtrats de cultius. Existeix una immunitat protectora clara davant la infecció en alguns antigens provinents dels filtrats de cultius en models animals (135,136).

3.4.1 Esat6/CFP-10 (Rv3875, Rv3874)

Aquestes petites molècules són proteïnes secretades del CFP de *M. tuberculosis*. Es localitzen a la regió RD1 molt relacionada amb la virulència (137,138) i són reconeguts en els sèrums de pacients tuberculosos (139).

3.4.2 *fbpA*, *fbpB*, *fbpC* (Rv3804c, Rv1886c, Rv0129c)

Es tracta de tres micolil-transferases. Es coneixen clàssicament com antigen 85A, 85B i 85C i pertanyen al CFP de *M. tuberculosis*. La seva funció és transferir les cadenes llargues dels àcids micòlics a derivats de trehalosa, a més a més, són capaces d'unir-se a la matriu cel·lular gràcies a la fibronectina. Aquestes proteïnes són antigens immunodominants i per això es va dissenyar una vacuna viva introduint el gen *fbpB* de *M. tuberculosis* en *M. bovis* BCG que va mostrar més protecció que la BCG en el model de conill-porquí.

3.4.3 *hspX* (Rv031c)

Va ser inicialment identificada com un antigen de 14 kD (140). Posteriorment, es va veure mitjançant anàlisi de seqüència que aquesta proteïna era homòloga a la *heat shock protein alpha crystallin Acr* (141). Aquesta proteïna és induïda en la fase estacionària (142), al model de Wayne en estats de hipòxia (143,144,145), davant de la presència de RNIs (146) i dins dels macròfags (147). Segons aquests resultats, sembla ser que aquesta proteïna és un element important en el control de

la latència o de la persistència. A més, la supervivència en macròfags del mutant per a aquest gen és molt baixa (144).

3.4.4 *erp* (Rv3810)

Aquesta proteïna no es troba en la superfície de la paret de micobactèries no patògenes. La inactivació d'aquest gen crea una soca atenuada encara amb un creixement molt lent. La seva funció és desconeguda. (148)

3.4.5 *fadD26* i *fadD28* (Rv2930, Rv2941)

La funció del primer és controvertida, però sembla estar relacionada amb la degradació d'àcids grassos encara que recents estudis li atorguen una funció de síntesi. Amb la seva inactivació s'obté una soca atenuada (103,149). L'altre gen és molt semblant al primer i encara calen més estudis per a la seva caracterització.

3.4.6 *ino1* (Rv0046c)

És vital en la generació d'inositol necessari per al bacil ja que és component bàsic dels lipoglicans (150). La seva inactivació provoca atenuació en un model *in vivo* i *in vitro* estant involucrat en la resposta a H₂O₂ i àcid palmític (151)

3.4.7 *ompA* (Rv0899)

La proteïna OmpA pertany a la família de les porines i és altament induïda a pHs àcids i quan hi ha creixement a macròfags. La seva inactivació va provocar l'atenuació en un model murí i en macròfags murins (153).

3.4.8 *lpqH* (Rv3763)

La proteïna de 19kDa és un antigen immunodominant molt important i és una glicoproteïna de superfície. Se li atribueix la capacitat de modular la resposta de l'hoste mitjançant la interacció amb el TLR2 (152).

Actualment, no hi ha ni suficient informació ni tècniques per poder determinar la gran majoria de gens relacionats amb la virulència. En canvi, podem recolzar-nos en extrapolacions amb altres microorganismes i en tècniques d'última generació per poder definir els gens que principalment controlen el creixement de *M. tuberculosis* en ambients hostils que pot portar a desenvolupar una malaltia.

Malgrat això, cal afegir que segurament la virulència de *M. tuberculosis* no dependrà només d'un gen i cal buscar tècniques que permetin una búsqueda per zones d'activació del genoma. Les tècniques *in silico*, que ja han començat a publicar-se, ens permetran identificar aquestes regions i els gens que s'activen o es reprimeixen.

3.5 Factors sigma

El control transcripcional és la forma més comuna de regular l'expressió genètica en els procariotes. El control de la expressió gènica és molt important i més encara en un bacteri que ha d'adaptar-se a condicions molt adverses contínuament, com és el cas de *M. tuberculosis*.

Els elements principals de control són les RNA polimerases. La RNA polimerasa procariota consta de 4 subunitats (β , β' , ω , i un dímer α). Una cinquena subunitat, la σ , s'uneix reversiblement a la RNA polimerasa i li permet reconèixer les seqüències promotores específicament i iniciar així la transcripció. Com hem comentat anteriorment, *M. tuberculosis* té 13 factors sigma diferents, nombre no molt elevat si ho comparem amb el de *S. coelicolor* que en té 65. L'habilitat de intercanviar temporalment aquests factors sigma és el que permet a la micobactèria modular la seva expressió genètica i adaptar-se perfectament als canvis ambientals produint una infecció més fructífera.



Estructura de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis*

3.5.1 Classificació dels factors sigma

Els diferents factors sigma es poden classificar filogenèticament en dos grups (154): aquells associats amb el factor σ^{70} i amb el factor σ^{54} (les micobactèries no presenten aquests últims factors sigma). Existeixen tres grups diferents de factors σ^{70} , factors sigma primaris, factors sigma primaris no essencials, factors sigma alternatius. El representant del primer grup en *M. tuberculosis* és el factor sigma A; són factors primordials per les micobactèries i principalment permeten la transcripció de gens constitutius. El segon grup inclou factors relacionats amb la fase estacionària i metabolismes alternatius com el factor sigma B en *M. tuberculosis*. Finalment, el tercer grup de factors sigma és el més heterogeni i inclou tots els altres factors no inclosos en els altres grups. Els factors sigma *extracytoplasmic function* (ECF) estan inclosos en aquest grup i en podem destacar el factor sigma E.

Alternativament, que els factors sigma de *M. tuberculosis* puguin portar a terme la seva funció depèn de controls transcripcionals i també de la presència d'anti-factors sigma que inhibeixen la seva activitat així com de anti-anti-factors sigma que la promourien (155). A continuació, s'exposa un petit resum de les característiques dels factors sigma més importants:

3.5.2 Factor sigma A (Rv2703)

Es tracta del principal factor sigma i no ha estat possible la seva inactivació en *M. tuberculosis*. Recentment, s'ha creat una soca de *M. bovis* atenuada mitjançant un canvi d'aminoàcids a la posició 515 d'aquest gen que ha estat capaç de créixer *in vitro* però que no sembla capaç de promoure la virulència que porta associada l'expressió d'aquest factor (156,157). Els nivells d'expressió de *sigA* es mantenen constants en fase exponencial i davant de diversos canvis ambientals (158) encara que en la fase estacionària de *M. smegmatis* decauen (159). Recentment, un estudi ha corroborat la importància d'aquest factor en la virulència d'aïllats tuberculosos (160).

3.5.3 Factor sigma B (Rv2710)

És prescindible pel creixement del bacil tuberculós encara que la inactivació d'aquest gen suposa una major sensibilitat a l'estrès oxidatiu, per calor o per detergents quan es sotmet a un sistema *in vitro*. A més, la seva delecció no afecta al creixement *in vivo* (158). El control transcripcional d'aquest factor sigma es fa via els productes de *sigE* i *sigH*.

3.5.4 Factor sigma E (Rv1221)

La inactivació d'aquest gen suposa una sensibilitat major a l'estrès oxidatiu i per calor, per presència de detergent en un model *in vitro*, així com un menor creixement en infectar macròfags. Sembla presentar un control autoregulat de la seva transcripció i controla gens de diferent índole com ara gens encarregats de controlar la transcripció, síntesi d'àcids micòlics, transport d'electrons i resposta a l'estrès oxidatiu durant el creixement exponencial de *M. tuberculosis* (161,162). Globalment, sembla indicar que aquest factor sigma estaria molt relacionat amb la fisiologia i estructura de la paret micobacteriana (151). Sorprenentment, aquest factor sigma no va ser induït en el model de Wayne en un DNA *microarray* (163). L'any 2003, el grup de Bishai va constatar que ratolins infectats per aerosol amb mutants per aquest gen, no experimentaven cap disminució en quant a la concentració en els teixits, però alhora necessitava més temps per provocar la mort de l'hostatger (164). Complementàriament, el grup de Manganeli ha confirmat l'atenuació d'aquesta soca en un model intravenós en ratolins immunocompetents i immunodeficients (165).

3.5.5 Factor sigma F (Rv3286c)

Aquest gen ha estat fortament relacionat amb la latència tuberculosa ja que la seva seqüència és molt semblant a factors sigma F de *S. coelicolor* i *B. subtilis* que controlen l' esporulació i al factor sigma B de *B. subtilis* necessari per canvis ambientals (166). Cal dir que aquest factor sigma presenta una regulació diferent en *M. bovis* i *M. smegmatis* respecte a *M. tuberculosis*. SigF no es troba en altes concentracions davant de l'estrès produït per ROIs, hipòxia, temperatura o entrada en fase estacionària com passaria en els altres microorganismes (167,168,169,158). Com els anteriors, també és regulat post-transcripcionalment per un anti-factor sigma, el UsfX (170) La inactivació d'aquest gen provoca una resposta idèntica davant dels factors d'estrès abans indicats. En canvi, es comporta com atenuada en un model murí (171). Recentment, s'ha estudiat el mutant *sigF* en un model murí per aerosol amb més detall i s'ha trobat que durant les 12 primeres setmanes no hi ha diferències significatives amb el control, però que a partir d'aquell moment, es trobem menys afectacions histopatològiques en els ratolins infectats amb el bacil alterat genèticament. Afegir també que els gens controlats per aquest factor sigma pertanyen a sistemes de regulació i a síntesi de paret micobacteriana (172).

3.5.6 Factor sigma G (Rv0182c)

Aquest factor sigma estaria relacionat amb la resposta a xocs freds de temperatura moderats, però la seva expressió seria realment baixa i no ha estat molt estudiat (158)

3.5.7 Factor sigma H (Rv3223c)

El seu sistema de control transcripcional és autoregulat i respon a estrès per altes temperatures (173), presència de diamida i infecció de macròfags (174). La inactivació d'aquest gen provoca una major sensibilitat davant dels agents abans mencionats, en canvi en el model murí obtenim una menor reacció inflamatòria generant pocs granulomes (175). A més, el factor sigma R de *S. coelicolor*, necessari per la destrucció de ponts disulfur, presenta molta homologia (68%) amb el sigma H de *M. tuberculosis* induït davant de l'estrès creat per altes temperatures, tractament amb SDS i en la infecció del macròfag. Els gens que controlaria aquest factor sigma estarien relacionats amb el metabolisme dels tiols, cisteïnes i molibdopterina a més, de controlar la transcripció de *sigB* i *sigE* (176).

3.5.8 Factor sigma M (Rv3911)

Igualment, aquest factor no ha estat massa caracteritzat. Els estudis de Manganelli *et al* caracteritzen el seu comportament responent a l'estrès causat per SDS. El grup de Arraiz que treballa en *M. smegmatis* i en *M. bovis* BCG ha definit una resposta positiva en fase estacionària i davant d'altres temperatures (177).

3.5.9 Altres factors sigma

Potser caldria afegir un últim estudi fet al voltant del factor sigma C publicat recentment (178). En aquest treball destaca la inactivació d'aquest gen en una soca de *M. tuberculosis* convertint-se en una atenuada que no és capaç de matar al seu hostatger i el control d'aquest gen sobre altres com ara el *hspX*, *senX3* i *mtrA*.

En referència als promotors micobacterians, podem dir que dels estudiats fins ara existeix una similitud molt important amb els presents a *Escherichia coli* (179). Els reguladors transcripcionals modulen la interacció entre les RNA polimerases i els promotors i existeixen potencialment més de 100 (81).

Actualment, es pot concloure que la majoria de sistemes genètics d'expressió i regulació existents a *M. tuberculosis* són similars en funcionament als trobats a altres bacteris. Realment, el punt més important de l'expressió genètica del bacil resideix en la caracterització genètica de *M. tuberculosis* dins del macròfag ja que afecta dramàticament a la patogènia i la immunogenicitat de l'organisme.

3.6 Factors anti-sigma

L'activitat dels factors sigma alternatius és sovint regulada post-transcripcionalment per una família de proteïnes, els factors anti-sigma, que segresten aquest en absència de l'estímul (180). Un dels factor anti-sigma del *sigE* és molt semblant al del factor sigma R de *S. coelicolor*; *rsrA* (181). Encara que també és regulat per *htrA*, i *tatB* (158,162,182,183).

També és interessant afegir que s'ha descrit un control post-translacional pel *sigF* per unió a un factor anti-sigma com succeeix a *B. subtilis*. Encara més, aquesta unió queda modificada per la unió a diferents anti-anti-factors sigma que permetrien el funcionament del regulador transcripcional (170,171,184). Per últim, afegir que *sigH* i *sigL* també són regulats per factors anti-sigma (181).

3.7 Resposta a l'estrès ambiental

3.7.1 Resposta *heat shock*

La *heat shock response* és el sistema més ben estudiat i caracteritzat i actua en resposta a una exposició a temperatures elevades. Representa una resposta cel·lular protectora davant el dany que pot produir el calor a les proteïnes. El producte d'aquesta resposta a nivell molecular són proteïnes que actuen com a xaperones o com a proteases específiques evitant la proteòlisi i la denaturalització d'altres proteïnes (185,186). Les xaperones es defineixen com proteïnes que uneixen i estableixen conformacions inestables d'altres proteïnes facilitant el seu correcte destí final *in vivo* (plegament, oligomerització, transport a un compartiment o degradació). No determinen l'estructura terciària d'una proteïna sinó que ajuden a que aquesta trobi la seva conformació definitiva de forma més eficient. Són proteïnes ubiques i altament conservades, imprescindibles pel funcionament normal de la maquinària cel·lular i imprescindibles quan el bacil pateix algun tipus d'agressió ambiental o d'estrès (187).

La regulació d'aquesta resposta es dona principalment a nivell transcripcional per factors sigma (E, H i M) i l'acció de repressors, encara que també existeix un control post-transcripcional per part de xaperones (188). Es tracta d'un sistema molt conservat i que pot respondre davant d'altres estímuls com ara una manca de nutrients, exposició a oxidants, ...etc. (189,190).

Aquestes proteïnes estan considerades com a factors de virulència i juguen un paper clau en la patogènia de la tuberculosi i en les relacions de l'hostatger amb el paràsit. Aquesta resposta suposa canvis a nivell genòmic que recentment han estat identificats mitjançant DNA *microarrays*. Aquest grup ha trobat dos regulons, HspR i HrcA, que actuarien com a repressors transcripcionals

de Hsp70 (*dnaK*) i del Hsp60 (*groE*), respectivament (191). Cal afegir la importància de la família de les α -*crystallin* com una de les més importants i nombroses dins de les *heat shock proteins*, en particular els resultats de la proteïna de 16kDa, coneguda com Acr (141).

3.7.2 La regulació del ferro

El metabolisme del ferro sembla ser una peça clau en el creixement de *M. tuberculosis in vitro* però no en macròfag o en un model animal. La captació de ferro es facilitada per sideròfors, que són agents quelants amb una afinitat molt alta pel ferro, com ara les exoquelines i les micobactines (192). Mantenir les condicions de ferro limitant sembla ser una estratègia de defensa de l'hostatger davant les necessitats del paràsit (193,194)

Principalment, tot el ferro extracel·lular està quelat amb proteïnes del sèrum i de mucoses, la transferrina i la lactoferrina amb la característica afegida que davant les infeccions, aquest ferro es trasllada al sistema reticuloendotelial dels macròfags. Això obliga a *M. tuberculosis* a obtenir el metall intracel·lularment. Segons estudis recents, aquesta entrada necessària es pot donar també des de l'espai extracel·lular i endògenament (195,196)

Cal afegir que el gen *ideR* és un regulador metall dependent tot controlant gens relacionats amb transportadors, síntesi de sideròfors i emmagatzematge de ferro principalment, encara que també controla altres reguladors transcripcionals i alguns enzims del metabolisme dels lípids. També existeix un sistema de transport de cations divalents dependent del pH molt semblant (21-24% homologia) al de cèl·lules eucariotes anomenat Mramp (197,198). La seva inactivació no afecta al creixement en una infecció de macròfags i *in vivo* en un model murí, però sí a un creixement extracel·lular.

Finalment, s'ha publicat un estudi que intenta definir com el bacil tuberculós capta el ferro en un model *in vitro* en funció de la lactoferrina, transferrina i alguns quelats (199)

3.7.3 Resposta davant dels ROIs

Recordem que *M. tuberculosis* és un aeròbic obligat i que per tant està exposat a aquests agents oxidants. La respiració aeròbica produeix anions superòxids (O_2^-) i peròxid d'hidrogen (H_2O_2) que poden donar lloc a ROIs potencialment perjudicials pel bacteri i fins i tot per a la pròpia cèl·lula. La resposta bacteriana davant d'aquesta amenaça es basa en la presència de glicolípids fenòlics i àcids micòlics ciclopropanats a la paret cel·lular (200,201,202), i en la producció de superòxid dismutases (com *sodA*), catalases (com *katG*) i peroxidases (com *ahpC*).

En canvi, és necessari destacar que existeixen molts estudis que demostrarien la relativa importància d'aquest mecanisme com a tuberculocida (203,204). Posteriorment, s'ha trobat que la

resposta a ROIs en *M. tuberculosis* està desactivada degut a que el sistema regulador és un pseudogen (*oxyR*) i està inactivat per diferents lesions (91,205,206,207). Caldria afegir que s'ha postulat que podria existir una resposta constitutiva a l'estrès oxidatiu per part del grup de Deretic (91). Per tant, la importància d'aquesta resposta resta limitada a posteriors estudis.

3.7.4 Resposta davant dels RNIs

Aquestes molècules semblen jugar un paper crucial en el control de la infecció en el model murí (208,209,210,211), encara que existeix molta controvèrsia sobre la seva utilitat en humans (212,213,214) ja que hi ha un estudi que així ho demostra (215). Però fins i tot amb la importància que tenen aquests mecanismes de defensa davant l'acció de *M. tuberculosis*, aquest és capaç de contrarestar-los.

S'han identificat diferents estratègies del bacil per a evitar l'acció d'aquests radicals encara que no es coneix exactament el mecanisme d'acció. Podem destacar el sistema de *noxR1* en *M. smegmatis* i *noxR3* en altres microorganismes com *Salmonella enteric serovar Typhimurium* (216,217).

Cal afegir la importància del gen *msrA* en *M. tuberculosis* que estaria relacionat amb la resistència a nitrits i GSNO (218,219) i els gens *glbN* i *glbO* que són futurs candidats per a estar implicats en la resposta davant els RNIs (220,221)

Dins d'aquest apartat cal destacar una proteïna semblant a una hemoglobina anomenada HbN que podria estar relacionat amb el metabolisme anaeròbic ja que seria l'encarregada de processar el NO present en ambients hostils i permetre així una millor persistència del bacil (169,222).

Finalment, un estudi recent afirma que la presència de iNOS al macròfag no és aleatòria i que es colocalitza amb el fagosoma en una infecció intracel·lular. Aquest grup ha demostrat que en el fagosoma de *M. tuberculosis* això no succeeix i ho ha relacionat amb una infecció persistent (223).

3.7.5 La resposta SOS

Anomenada així perquè afecta al DNA i les conseqüències que pot portar, va ser identificada inicialment en *E. coli*. Aquesta resposta apareix davant d'un dany en el DNA i es basa principalment en l'expressió de gens relacionats amb la síntesi i reparació de DNA, divisió cel·lular i recombinació. El sistema de regulació està controlat per dos gens, *recA* i *lexA* (224).

Existeixen les SOS *box* situades a les regions promotores dels gens induïts per la resposta SOS on LexA s'uneix reprimint l'expressió dels gens relacionats amb aquesta resposta (225). L'any 2002, es van definir alguns dels gens que poden caure sota la regulació d'aquest sistema i que

principalment estan relacionats amb la DNA polimerasa, amb hidrolases i amb elements mòbils (226).

Cal afegir, però, que no tots els sistemes SOS depenen d'aquests reguladors. Aquest mateix grup van descriure un altre reguló, el Rv2719c, independent de LexA que més tard seria comprovat amb la inactivació d'aquest i que és capaç de regular també alguns dels gens amb SOS *box* (227,228). En realitat, hi ha un grup que ha demostrat que el recA no semblaria important en la resposta SOS en *M. tuberculosis* (229)

3.7.6 Resposta astringent davant la deprivació de nutrients

Existeixen evidències indirectes en funció de la permeabilitat de la membrana (230) que indiquen que els bacils pateixen deficiències de nutrients quan estan infectant a l'hostatger que els pot provocar canvis en la morfologia i en les propietats de tinció (231). També s'ha intentat estudiar quines necessitats metabòliques podia tenir el bacil durant el procés d'infecció (232) i quines conseqüències pot tenir sobre el comportament del bacil: poca o cap replicació, poca respiració, però amb un manteniment de la viabilitat.

Recentment i mitjançant DNA *microarray* s'ha estudiat quins són específicament els gens que responen a aquesta deprivació. Concretament, existeix una disminució en l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme d'aminoàcids, cofactors, síntesi de DNA, recombinació, biosíntesi lipídica, i controls transcripcionals. Per una altra part, hi ha un augment en els gens relacionats amb condicions anaeròbiques com el de la fumarat reductasa *frdA* que poden portar a una supervivència durant llarg temps (233). Diversos factors sigma (*sigB*, *sigD*, *sigE*, *sigF* i *rsbW*, un anti-*sigF*) van ser induïts mentre que el gen *rpoA* va ser reprimat.

L'entrada en aquesta resposta astringent sembla estar relacionada amb el control de l'expressió bacteriana per part del producte del gen *rel_{Mtb}*, la guanina hiperfosforilada [(p)ppGpp]. L'any 2000 es va crear el mutant per aquest gen obtenint una supervivència menor en fase estacionària en un model *in vitro* on a més era incapaç de sobreviure en condicions anaeròbiques (234). Posteriorment, un grup americà va fer servir el model murí per aerosol per caracteritzar més encara aquest mutant mostrant els problemes que tenia aquesta soca per a mantenir una infecció crònica. Els gens que veien alterada la seva expressió estaven relacionats amb la transcripció, factors de virulència, síntesi de components de la paret i *heat shock proteins*

Per una altra banda, s'ha constatat que alguns soques de *M. tuberculosis* auxotròfiques per algun aminoàcid com leucina, triptòfan o arginina es converteixen en atenuades quan infecten macròfags o simplement no sobreviuen (235,236,237) pressuposant que allà on estan arrestades no poden adquirir el aminoàcid requerit. Posteriorment, estudis de Parish *et al* han confirmat que les tres soques auxotròfiques anteriors van ser capaces de sobreviure a una carència de nutrients total en un model *in vitro* (238).

3.7.7 Resposta a la hipòxia

Com ja hem comentat anteriorment, *M. tuberculosis* es considera un bacil aeròbic estricte. De totes formes, en un teixit no lesionat es troben uns ambients molt pobres en oxigen, gairebé anaeròbics. Aquesta és una de les raons per les que semblaria que l'oxigen no tindria molta importància en la inducció d'un estat de latència, encara que hi ha estudis que ho defensen. Per una altra banda, s'ha demostrat que el creixement bacil·lar és més important en un ambient amb concentracions d'oxigen elevades (239,240).

En aquest sentit s'han desenvolupat diversos estudis *in vitro* d'on destaquen els de Wayne *et al* (241,242,243,244) partint de la base que als granulomes es desenvolupa una necrosi amb condicions d'hipòxia. Posteriorment es comenten més a fons, però ho podríem resumir com un model on la concentració d'oxigen va disminuint paulatinament observant-se dos estats, un microaerofilic i un altre anaeròbic. Els dos estats es caracteritzen per formes fenotípicament resistents als antibiòtics i per presentar parets cel·lulars més gruixudes (143). A més, aquests bacils eren susceptibles a l'acció del metronidazol, efectiu en el tractament d'infeccions per bacteris anaerobis.

Recentment, s'ha desenvolupat un DNA *microarray* d'on s'ha després que més de 100 gens veuen augmentada la seva expressió davant la hipòxia com ara: Acr, gens relacionats amb el metabolisme de nitrats (*narX*, *narK2*), metabolisme del ferro, i altres. En canvi, van veure disminuïda la seva expressió altres gens relacionats amb la síntesi de lípids, proteïnes, DNA i aminoàcids i metabolisme aeròbic (245). A més, s'ha trobat que la resposta a aquest situació de baixa concentració d'oxigen i la resposta basada en Acr vindria controlada pel sistema de dos components DevR/DevS (Rv3133c/DosR) (246,247).

3.7.8 Canvis de pH

La resposta a la presència de l'ió H⁺ (pH) o de àcids febles en *M. tuberculosis* ha estat relativament poc estudiada en anys anteriors. S'han prioritzat altres estratègies de defensa, com ara els ROIs o els RNIs, i potser no se li ha donat tota la importància que pot tenir. Des de fa 4 anys,

ha passat a ser un dels mecanismes més estudiats i treballs molt interessants estan apareixent sobre aquest sistema. Els mecanismes reguladors d'adaptació a canvis de pH inclouen factors sigma alternatius i sistemes específics que són capaços de respondre a ambients acidificats.

L'acidificació del fagosoma és un mecanisme clàssic de destrucció intracel·lular del que alguns bacteris com *Salmonella enteric serovar* Typhimurium o *Listeria monocytogenes*, són capaços d'escapar en haver desenvolupat diferents estratègies evolutives (248,249). El cas de *M. tuberculosis* és encara tema de debat i no existeix un consens definitiu sobre l'estratègia que segueix per evitar aquest mecanisme de defensa de l'hostatger.

Foster *et al* van establir un sistema ATR de resposta a l'àcid per part de *Salmonella enteric serovar* Typhimurium basada en una complexa xarxa dependent de RpoS i de FurA que no s'ha pogut demostrar en cap micobactèria actualment (250).

Alternativament, l'any 2000 es va relacionar un gen present a *Salmonella enteric serovar* Typhimurium amb la supervivència dins del fagosoma per part de *M. tuberculosis*. Aquest gen, *mgcC*, formaria part d'una estratègia per a captar Mg^{2+} dins del fagosoma on la seva concentració és molt limitada. Cal afegir que aquests microorganismes no estan directament relacionats filogenèticament i que aquest factor de virulència pot haver estat adquirit horitzontalment com també pot haver passat en altres microorganismes com *B. melitensis* i *Y. pestis* també capaços de créixer intracel·lularment (251).

Realment, l'estudi més complet sobre la resposta a l'àcid per part del bacil de Koch va ser portada a terme pel grup de Shinnick l'any 2002. Es tracta d'un microarray en resposta a un model *in vitro* de *shock* àcid on els resultats indiquen que molts dels gens amb una expressió augmentada es relacionen amb el metabolisme de lípids (com ara el *id*) i de NRPS/PKS.

Recentment, un estudi d'un grup americà ha destacat els gens *lipF* (una possible lipasa) i *Rv0834c* (un gen PE-PGRS) com a gens de resposta a pHs àcids en un model *in vitro*. Aquest grup ha demostrat també la independència d'aquesta expressió de la regulació per part de *sigF*. Finalment, en un model d'infecció de macròfag murí han estat incapaços de trobar l'expressió d'aquests gens (102), fet que podria significar la no acidificació d'aquests [...].

Una proteïna molt semblant a l'OmpA en *E. coli* ha estat descrita en *M. tuberculosis*. Les funcions de OmpATb es poden desenvolupar a pHs àcids i podria estar relacionada amb la supervivència en medis àcids ja que permetria al bacil la incorporació de petites molècules hidrofíliques i posant en marxa un sistema de defensa davant la presència de protons H^+ (104). Fins ara, en el bacil de Koch s'hi ha descrit 2 porines (252,253) i OmpA no ha estat catalogada com a tal degut a un problema en la tècnica d'inactivació (254). El que sí quedaria clar és el seu

paper en la resposta a l'àcid posteriorment a l'activació del macròfag. En aquesta mateixa línia, el grup de Bloom va establir que potser una de les raons per la qual *M. tuberculosis* era capaç de sobreviure dins dels fagosomes incomplets i ser capaç de captar nutrients seria perquè la seva presència permeabilitza les membranes dels fagosomes. Cal afegir a favor d'aquesta estratègia que d'aquesta forma el macròfag pot presentar via MHC-I proteïnes solubles que es trobin dins del fagosoma (255).

L'any 2003 el grup de Zhang va establir que la susceptibilitat de *M. tuberculosis* a àcids febles en comparació amb la de *M. smegmatis* era molt important. També van comprovar el pH intracel·lular de la bactèria obtenint que *M. tuberculosis* no era capaç de respondre a pHs extracel·lulars molt àcids pel seu lent metabolisme energètic (256).

Recentment, s'ha realitzat una anàlisi de l'expressió bacteriana en dos models murins (BALB/c i SCID) i comparat amb un model in vitro en 7H9 on cap gen relacionat amb la resposta a l'àcid ha estat caracteritzat (257).

Finalment, un treball del grup de Shoolnik ha definit i quantificat tota l'expressió micobacteriana present dins del macròfag remarcant que una de les habilitats que ha de presentar el patogen dins del fagosoma és regular l'activitat d'aquest, la fusió amb el lisosoma i l'acidificació (151).

Per una altra banda, uns estudis de l'any 2002 ens relacionen el *locus Nramp1* amb l'acidificació del fagosoma i posterior inhibició del creixement bacterià encara que no s'han establert els efectors de la modulació del fagosoma (258). Existeix molta controvèrsia sobre aquest tema ja que en un model murí amb la soca mutant per *Nramp1*^{-/-} no es troba cap diferència en quant a la supervivència. A més, cal afegir que els ratolins resistents C57BL/6 no presenten un fenotip funcional per aquest gen i l'acidificació dels seus fagosomes és més reduïda. Calen més estudis per a demostrar la funció real d'aquest gen si és que realment està relacionada amb la susceptibilitat a la tuberculosi.

Molt recentment s'ha confirmat que tampoc existeix acidificació als fagolisosomes humans com es va demostrar anteriorment en ratolí, afegint un element més en comú (259).

IV. FISIOLOGIA DE *M. tuberculosis*:
El Fagosoma Micobacterià

1. Fagocitosi de *M. tuberculosis*

El macròfag alveolar és una de les primeres cèl·lules relacionades amb la fagocitosi del bacil, encara que segur que els macròfags no residents i les cèl·lules dendrítiques també prenen part en aquest procés (260).

La fagocitosi del bacil pot fer-se per diferents receptors mitjançant opsonització o no. Si existeix opsonització, el factor de complement C3 sembla molt important en el reconeixement per part dels CR1, 3 i 4 ja que la absència del primer provoca una caiguda en la fagocitosi de més d'un 60% (261,262,263). A més, cal afegir que és el mecanisme d'opsonització majoritari en pulmó (264). També és possible un reconeixement directe a CR3 (265) i CR4 (266), i sobretot a un MR (262,263). Existeixen altres receptors de menys importància d'entre els que destaca el SR (*scavenger receptor*) (267) i molècules que afavoririen l'entrada del bacil al macròfag com serien els surfactants SpA (268), MBL (factor plasmàtic)(269).

En funció del receptor pel qual *M. tuberculosis* entra en la cèl·lula fagocítica, pot variar el senyal de comunicació utilitzat, l'activació immunològica i evidentment el destí intracel·lular del bacil. Un exemple seria que l'entrada del bacil pel CR1 suposa una major supervivència bacil·lar en comparació amb el CR3 i 4 (270). També, s'ha demostrat que les soques virulentes són fagocitades via MR i les atenuades, no (262). Tots aquests resultats són en models *in vitro* i cal esperar la confirmació en un model *in vivo*.

Per un altre costat, l'existència dels TLRs és cabdal per al desenvolupament d'una resposta immune innata ja que són mediadors presents a macròfags i cèl·lules dendrítiques essencials per al reconeixement microbià (271). Fins i tot s'ha arribat a especular que sense la presència dels TLRs, no hi hauria un reconeixement i no es desenvoluparia una resposta immune (272). Caldria posar de rellevància la dependència dels efectes supressors de la lipoproteïna de 19-kD respecte a TLR2. S'ha arribat a hipotetitzar que la interacció entre les dues molècules anteriors suposaria un augment de la intensitat de la resposta innata aportant al bacil tuberculós un ambient ideal per a la persistència i evitant a la vegada una interacció amb les cèl·lules T CD4 per inhibició del processament i presentació via MHC-II (273,274,275)

Un paper semblant, però en principi menys important, jugaria el LAM però permetent el reconeixement del patogen com faria el LPS en un gram negatiu en relació amb el CD14 (276)

Després d'aquesta entrada, el bacil s'allotja en una vacuola endocítica anomenada fagosoma. L'estudi de la formació d'aquesta vacuola i les interaccions amb patògens va començar

amb els treballs clàssics de Philip D'Arcy Hart als anys 1970 que ja va observar que no hi havia fusió entre fagosoma i lisosoma (277).

2. El fagosoma de *M. tuberculosis*

El fagosoma que s'ha descrit anteriorment ha de madurar, és a dir s'ha de formar el fagolisosoma. Això implica una progressiva acidificació i diferents accions com el transport intracel·lular, intercanvi de proteïnes de membrana i solubles mitjançant fusions membranals (278,279), fusions amb vacuoles derivades de l'aparell de Golgi (280), adquisició de bombes ATPases (281) i una gran varietat d'hidrolases (282) que finalment el permetrà unir-se al lisosoma. (283,284,285).

Aquesta actuació inicial del fagosoma va ser hipotetitzada l'any 1995 per Desjardins. L'estratègia va ser anomenada *kiss and run* i descriu com es fusionen i es fisionen ràpidament els diferents endosomes amb el fagosoma aportant-li material necessari per a la seva maduració (286). Tot aquest procés és controlat per unes proteïnes, les Rab GTPases, principalment Rab5 i Rab7, i les proteïnes SNARE (287,288). L'any 2000 es van descriure altres proteïnes Rab i les seves implicacions en la formació temprana del endosoma i del lisosoma mateix (289). I més recentment, s'ha caracteritzat una proteïna SNARE, la syntaxina 6, que podria relacionar-se amb la xarxa de l'aparell de Golgi. Aquestes últimes accions vindrien dirigides pel LAM del bacil que s'encarregaria d'inhibir la fusió fagosoma-lisosoma. (290,291,292,293)

Les soques virulentes de *M. tuberculosis* són capaces de sobreviure i créixer dins de macròfags murins no activats superant les adversitats presents dins del macròfag i la resposta innata, però no així en un macròfag activat on sí es crearia el fagolisosoma (294,295,296).

Sembla àmpliament acceptat que els fagosomes amb *M. tuberculosis* viables no arriben a fusionar-se amb els lisosomes (230,297,298,299,300) i que per tant es pot extrapolar que aquest procés és controlat per la micobactèria viable. En canvi, sí que hi ha fusió, encara que selectiva, amb els endosomes residents dins del macròfag que aporten al fagosoma fragments de membrana, la proteïna Rab 5, el receptor de la transferrina i el gangliòsid GM1 (301), però com queda demostrat pels nivells baixos de CD63, LAMP-1 i LAMP-2 i Rab7 (285,302), no assimila la bomba de protons ATPasa necessària per l'acidificació del fagolisosoma (303) i la presència d'una forma inactiva de la proteïna catepsina D, una hidrolasa, és molt baixa (304).

El grup de Fratti ha demostrat que el bacil seria capaç d'alterar la maquinària de procés de l'endosoma (298) inhibint l'assimilació de la molècula EEA1 i de hVPS34, relacionada amb la formació i maduració del fagosoma. Això es portaria a terme per l'acció del ManLAM que inhibiria

la capacitat de la quinasa 3-OH fosfatidilinositol d'associar-se amb aquelles proteïnes (305). També s'ha trobat que la proteïna cellubrevina, una proteïna SNARE, involucrada en la maduració de la vacuola fagocítica presentaria una forma aberrant en els fagosomes de *M. tuberculosis* evitant la posterior fusió amb el lisosoma (306).

La importància del Ca^{2+} queda demostrada en un estudi de l'any 2000 on es demostra la seva inhibició com a mecanisme de comunicació en macròfags infectats amb *M. tuberculosis* viables ja que està relacionat amb la formació del fagolisosoma (307). Posteriorment, aquest mateix grup ha confirmat la gran relació que existeix entre aquest catió divalent, la inhibició de la fusió fagosoma-lisosoma i la inhibició d'una esfingosina quinasa (308,309,310)

Altres treballs asseguren que la base molecular d'aquesta inhibició podria tenir a veure amb una proteïna anomenada TACO relacionada amb la inhibició de la maduració del fagosoma que està present només en fagosomes amb *M. tuberculosis* (311); a més, presenta homologia amb una proteïna de *Dictyostelium* que protegeix les vesícules de l'acidificació i de la degradació (312). Realment, aquesta última idea s'ha posat en evidència per estudis posteriors (313) ja que aquests fagosomes no contenen bacils viables.

També s'ha proposat recentment la importància del ferro en aquest mecanisme en un model *ex vivo* d'infecció de macròfags (314).

Altres idees relacionades amb la composició de la paret bacil·lar han servit d'argument per a altres estudis com els de Thilo i de Chastelier on relacionen la naturalesa hidrofòbica de la superfície amb aquest potencial (1998). Fins i tot, les primeres hipòtesis de D'Arcy Hart van suggerir que la producció d'amoní era la causa de la falta d'acidificació (315,316).

Per finalitzar i molt recentment, s'ha confirmat la inhibició de la unió fagosoma-lisosoma en macròfags de pacients humans infectats amb tuberculosi i HIV (259).

En resum, i com ja s'ha comentat abans, un macròfag no activat no podria destruir la micobactèria i permetria el seu creixement i supervivència dins del fagosoma afavorit més encara pel menor nombre de molècules MHC-II en la membrana i en conseqüència una menor presentació antigènica (273). En canvi, el macròfag en ser activat es converteix de mica en mica (317,318) en una màquina efectiva de destrucció que comporta l'acidificació del fagosoma, condicions reductores, hidrolases i efectes potencials de ROIs i RNIs, encara que possiblement no tots els bacils seran destruïts i haurem de parlar d'uns bacils latents. Aquesta condició podria representar la latència *per se*, que es podria veure interrompuda per una reactivació del creixement en determinades condicions (243).

3. Resposta micobacteriana a la fagocitosi

En aquests últims anys, i mitjançant diferents tècniques aproximatives, s'ha volgut identificar els gens amb una expressió alterada durant la infecció de macròfags per a poder caracteritzar millor les condicions de l'ambient on es troben, per a dissenyar nous objectius pel diagnòstic i implantar millores en el tractament.

Un dels primers estudis va ser portat a terme en macròfags humans mitjançant la tecnologia d'expressió *in vivo* (IVET). Anteriorment, s'havia aplicat aquesta tècnica a altres microorganismes com *Salmonella enteric serovar* Typhimurium. Els resultats obtinguts van mostrar que un gran nombre de gens amb l'expressió alterada estaven relacionats amb el metabolisme d'àcids grassos, altres amb el transport intermembranal, i altres tenen funció encara no coneguda. Concretament, *fadA4*, *echA19* i *icl* són gens del metabolisme d'àcids grassos involucrats en el cicle de Krebs junt amb altres gens no tan ben caracteritzats com ara *pckA*, *ephF*, Rv0610c i Rv1144. També seria interessant destacar la hipòtesi de remodelació contínua de la paret en infectar el macròfag relacionat amb el gen Rv3717, el producte del qual és la amidasa N-acetil muramil L-alanina (96)

Més recentment, s'ha pogut analitzar el transcriptoma intrafagosomal tuberculós en macròfags murins control i deficients en la síntesi de NOS2 abans i després de l'activació per IFN- γ . Aquests resultats van ser comparats amb els obtinguts en un model *in vitro* exposat a 10 diferents nivells d'estrès on s'inclouen el pH, ROIs, RNIs, temperatura, *starvation*, ...etc. fent servir la mateixa tecnologia. D'aquesta forma, van ser capaços de caracteritzar l'ambient que envolta a la micobactèria en funció de la resposta que aquesta en fa (151) i correlacionar-ho amb el comportament bacil·lar en el model murí per infecció intravenosa.

Concretament, caracteritzen el fagosoma d'un macròfag no activat com una font d'àcids grassos que la micobactèria faria servir com a font d'energia (*fadD3*, *fadD9*, *fadD10*, *fadD19* i *echA19*) i on l'ambient pot ser perjudicial per a la seva paret i àcids nucleics, i on a més a més, la disponibilitat de ferro i de carbohidrats seria baixa. En resposta a això, *M. tuberculosis* remodelaria la seva superfície (*adD26* i *umaA*), produiria enzims per a protegir el DNA (productes de *alkA*, *recX*, *recG*, *dinF*, i *radA*) i secretaria sideròfors (*mbt*) per a captar tot el ferro possible. En canvi, el fagosoma present en un macròfag activat seria oxidatiu, nitrosatiu, anaeròbic però facilitaria l'accés al ferro. La seva adaptació transcripcional vindria donada per un canvi de respiració aeròbica a anaeròbica en funció de diferents gens (com ara *narX*, *frdA* i *ndh*) i a causa de la presència de NO directament induït per l'estímul de la NO sintasa regulada positivament pel IFN- γ . Igualment, existiria una remodelació constant de la paret cel·lular dependent de l'acció del control de *sigE*.

Interessantment, i confirmant hipòtesis anteriors, s'indueix també un reguló relacionat amb la latència que respondria a l'absència d'O₂ per part de l'hostatger. La micobactèria controlaria aquesta resposta mitjançant la concentració de NO promovent una resposta latent o no en funció de la resposta immune de l'hostatger (319).

En contra d'aquest article, caldria destacar el factor de normalització emprat per a l'obtenció de l'expressió per *Real Time* PCR. Concretament, s'ha fet servir el creixement *in vitro* en fase logarítmica com a factor normalitzant en els resultats de macròfags i ratolins. Aquesta extrapolació caldria no acceptar-la tant a la lleugera i ser una mica crítica. A més, l'ús dels ratolins no queda massa clar en cap moment ja que fan servir només 6 ratolins en total per comparar l'expressió del bacil en el model de macròfag amb el model murí on troben l'expressió a nivell de lòbul de pulmó. A més, el sistema d'extracció no s'explica clarament i no concreten la tecnologia feta servir. Per tant, caldria valorar aquests resultats concrets amb molt de compte.

Finalment, cal descriure el treball del grup de Taalat on han aplicat la tècnica aplicada a *Vibrio cholerae* (320) a un model *in vitro* i a un model murí en hostatger competent i immunodeficient d'infecció per *M. tuberculosis*. De la mateixa forma que abans, analitzen l'expressió bacteriana durant els primers 28 dies d'infecció per a poder valorar la resposta transcripcional del bacil davant la resposta innata i l'establiment de la resposta específica posteriorment.

Cal criticar que en fer el *microarray* de tot el lòbul pulmonar estan estudiant poblacions bacil·lars en diferents localitzacions i estats metabòlics, ja que no totes es localitzarien intracel·lularment com passava en l'estudi prèviament descrit de la infecció a macròfags. Tot i així, els resultats obtinguts poden aportar molt sobre la caracterització de la infecció. A més, cal afegir que el model intranasal no reproduïx fidelment la patologia tuberculosa i menys encara si una setmana després de la infecció s'inocula 10⁵ bacils viables per a poder extreure material genètic pel *microarray*. També és dubtosa la seva metodologia ja que la normalització de l'expressió en funció de la quantitat de DNA, ja que segons una publicació del mateix grup, afirmarien que la quantitat de DNA és el millor marcador d'estabilitat i ho fan servir com a estàndard per comparar les diferents expressions bacil·lars (257).

Fan un paral·lelisme entre els resultats obtinguts en el model SCID i *in vitro*, afirmant que els patrons de resposta són semblants entre ells i amb una expressió definida diferent respecte a l'hostatger immunocompetent. Els gens principals que veuen alterada la seva expressió en el model *in vivo* immunocompetent i immunodeficient són *rubB*, *dinF*, i *fdxA*. Aquests gens han estat relacionats en la resposta a un pH baix i també van ser importants en el model de macròfag activat en l'estudi descrit al 2003. En aquest mateix sentit, els gens *atpE*, *atpF* i *atpH* relacionats amb l'ATP

sintasa, augmenten la seva expressió en el macròfag activat del ratolí immunocompetent i no en el SCID així com altres relacionats amb l'assimilació de ferro (*fdxA* i *mbtD*). És important comentar també l'activació d'uns gens només en l'hostatger immunocompetent com són els reguladors transcripcionals *sigE* i *sigK* i el *icl*. Per altra banda, els gens *sigI* i *sigJ* van activar-se en el model immunodeficient i *in vitro*. Afegir també la caracterització d'una zona anomenada iVEGI on s'han trobat gens relacionats amb la síntesi de paret, catabolisme de lípids, factors de virulència potencials i dos gens relacionats amb la persistència del bacil, *mprA* i *mprB* (321) que veu alterada la seva activitat en infectar el ratolí competent

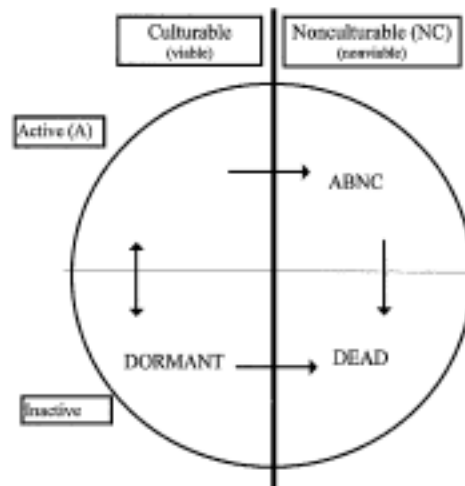
V. LATÈNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*

1. Descripció de la latència

Segons Kaprelyants, hem de començar parlant dels termes viabilitat i culturabilitat per poder entendre bé l'estat de latència. La viabilitat es mesura com el nombre d'organismes en una mostra que poden créixer fins a un nivell detectable (per exemple, formar colònies en una placa d'agar). D'aquesta forma, podem calcular les UFCs ja que s'aproximen molt al nombre de cèl·lules viables. És lògic extrapolar que si un bacil no és cultivable hauria de considerar-se no viable o mort. Però realment, ens trobem davant d'un problema. Ha estat capaç l'organisme de créixer en el temps d'incubació i les condicions que l'hem ofert? Es tracta d'una definició operacional, però que pot ser inadequada ja que hi ha exemples en els que bacteris que no es podien cultivar fins a cert moment, han estat cultivables més tard. Alguns d'aquests exemples poden ser els estats de dormància (322) o de latència (241) que adopten bacils que no presenten cap signe de vida, però que són capaços de tornar a un estat fisiològic actiu posteriorment.

Per tant, ens trobem en una discrepància entre viabilitat i culturabilitat que cal resoldre amb la introducció d'un silogisme nou. Sota algunes circumstàncies, bacils que són normalment cultivables passen a ser no cultivables però mantenen la seva viabilitat.

Aquest autor va definir la culturabilitat des de dos punts de vista: immediatament cultivable fent servir un mètode senzill basat en medis convencionals; i no cultivable sinó és sota condicions especials requerint protocols alternatius als mètodes clàssics.



Estats fisiològics i les seves relacions segons Kaprelyants *et al* (419).
ABNC: actiu, però no cultivable

Aquest grup parla de definicions funcionals i finalment equipara la viabilitat a la culturabilitat i la no viabilitat a la no culturabilitat i podem observar que no accepten la possibilitat

de pas de no viables a viable. A més, defineixen l'estat de ABNC com l'estat en que es troben els microorganismes que no creixen en unes condicions estàndards de cultiu.

Defineixen la dormància com un estat en que els bacils estan metabòlicament inactius però capaços de fer la transició cap a un estat de creixement actiu. Conclouen afirmant que actualment no hi ha manera de caracteritzar les fases de no creixement proposades i que ara per ara, la viabilitat en aquestes fases queda indefinida.

2. Definicions de latència, dormància, persistència

Realment existeix molta confusió entre aquests termes. És per això que cal una revisió sobre aquests conceptes clàssics en boca de tots.

La dormància és l'estat metabòlic molt baix induït per la manca de nutrients, la baixa temperatura o la manca d'oxigen, que pot revertir, així quan parlem de *bacil dorment* ens referim a un bacil viable que roman en un estat metabòlic baix que pot *ressuscitar* sota les condicions apropiades (323). Però principalment, ens trobem davant d'un terme relacionat amb els estudis *in vitro*, i concretament amb aquells desenvolupats per Kaprelyants (324) i per Wayne (242).

Respecte al concepte de persistència ens hem de remuntar als anys 1950 quan McCune la va definir com el fenomen pel qual un microorganisme susceptible a fàrmacs té la capacitat de sobreviure indefinidament en teixits encara que estigui exposat contínuament al fàrmac apropiat. (325). Posteriorment aquest terme s'ha equiparat al de bacil latent.

La latència és refereix a una situació d'equilibri a la que arriben l'hostatger i el bacil sense causar símptomes aparents. Cal tenir en compte, però, que en el model del ratolí no tenim bacils latents probablement com hi serien a l'humà. El ratolí és un hostatger molt tolerant amb *M. tuberculosis* i deixa que reactivi constantment sempre i quan no traspassi cert llindar. En aquest sentit, el model del ratolí seguiria una dinàmica de reactivació-destrucció constant amb la presència de bacils en estat latent (326,327).

3. La latència en *M. tuberculosis*

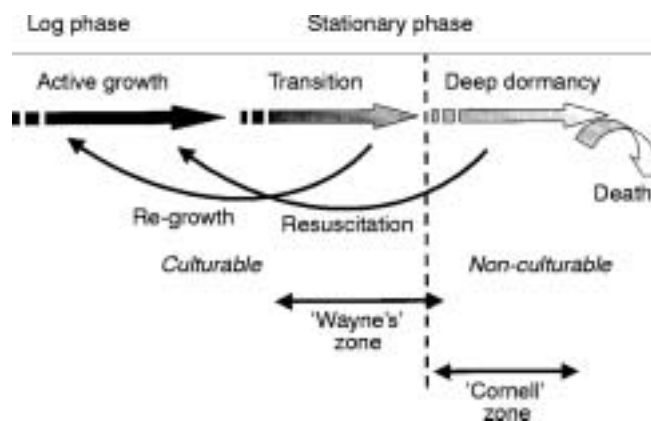
Una infecció natural per *M. tuberculosis* pot convertir-se en latent sense cap símptoma i pot durar des de poques setmanes a anys. El bacil tuberculós resideix en les lesions de forma latent fins que troba l'oportunitat de reactivar-se en l'hostatger immunodeprimit. Aquesta estratègia no és única d'aquest bacil, existeixen altres microorganismes que adopten mecanismes semblants de persistència com en infeccions per *Helicobacter pylori* o per *Treponema pallidum* (328). En realitat, aquest terme de latència ha estat adoptat de la virologia, i hem de dir que no es tracta d'una latència estricta com ho seria la d'un virus com el Herpes simplex virus, capaç d'integrar el seu material

genètic al interior de l'hostatger, ni *M. tuberculosis* és capaç de desenvolupar espores amb una enorme capacitat de persistència com *B. subtilis*.

El interès en la latència micobacteriana ha anat creixent al llarg del temps degut al fracàs dels fàrmacs antituberculosos de destruir aquests bacils latents que ha portat a una quimioteràpia de llarga duració.

El model *in vitro* de Wayne es basa en la formació de bacteris no replicatius durant l'adaptació a condicions anaeròbiques (243). Segons Kaprelyants, aquests bacils romanen metabòlicament actius i no poden ser considerats com a una població dorment basant-se en el temps per a induir aquesta persistència (dies pels estudis de Wayne). Es tractaria d'un pas anterior a l'establiment de la dormància.

En canvi, el model de Cornell hauria provocat una població en fase de dormància profunda que no seria cultivable fins a la reactivació posterior.



Model de latència segons Shleevea *et al.* (357)

El comportament del bacil en fase logarítmica està molt ben caracteritzat, però poc se sap de com el bacil es comporta durant aquesta fase estacionària del cicle micobacterià. El cicle de qualsevol microorganisme presenta aquestes 4 fases: interfase, fase exponencial, fase estacionària, fase de mort (329).

Si transferim un inòcul micobactèria a un medi nou, no creix immediatament, sinó que hi ha una fase d'adaptació per a posteriorment començar a créixer exponencialment. A continuació, s'estabilitza el sistema a una fase estacionària o el creixement s'atura per falta de nutrients i acumulació de productes tòxics. Allargant la fase estacionària hi ha una mort bacil·lar per causes no definides: mort programada, falta de nutrients, toxicitat, ...etc. (330).

Aquesta fase es caracteritza per presentar poblacions bacil·lars heterogènies en morfologia i estats metabòlics (331,332). El grup de Sun (333) va trobar molècules que eren capaces de ressuscitar el bacil i semblaria que ajudarien a mantenir la viabilitat. Aquestes molècules es van trobar abans en cultius de *Micrococcus luteus* (334). Existeix un fort debat sobre la possibilitat de que existeixi un control genètic d'aquesta transformació com podria existir en *Vibrio cholerae* (335).

Estudis histològics han demostrat la presència del bacil tuberculós en les lesions amb formes cocals, ovoides o granulars (336). D'aquestes ferides, s'han obtingut bacils i aquests han trigat fins a 12 setmanes en créixer (337) encara que altres estudis afirmen que bacils trobats de la mateixa forma no havien estat capaços de ressuscitar posteriorment en un medi de cultiu (338).

No està clar si aquests bacils romanen inactius per després poder ressuscitar o si realment estan morts. Fins i tot s'han descrit formes filtrables ultra-fines (339) o sense propietats *acid-fast* (340) que curiosament eren més immunogèniques i permetien una persistència a més llarg termini sense intervenció de la resposta immune. Potser la idea de formes pleomòrfiques de bacils cal que sigui revisada i relacionada amb la latència tuberculosa (341)

També s'ha arribat a especular amb la possibilitat d'una localització fora del macròfag per a aquests bacils latents que el grup de Hernández-Pando va intentar demostrar mitjançant una PCR *in situ* tot confirmant que hi havia bacils a pneumòcits de tipus II, cèl·lules endotelials i fibroblasts (342). El mateix es va fer en el model de Cornell (343). Aquests resultats cal tractar-los amb precaució donat que no poden assegurar que el DNA amplificat era de un bacil viable o no. En canvi, estudis posteriors han confirmat mitjançant retrotranscripció i posterior amplificació que els bacils del model de Cornell tenien encara activitat metabòlica (344).

4. Models de latència

S'han proposat clàssicament diferents models per a l'estudi de la latència. Es poden classificar en models *in vivo* i *in vitro*.

Anteriorment, ja es tenia idea de que el bacil de la tuberculosi era capaç de romandre en teixit durant llarg temps encara que mai havia estat demostrat. La primera confirmació *in vivo* va ser amb el famós i nombrat model de Cornell descrit per McCune i col·laboradors als anys 50-60 (345,346). Els ratolins eren infectats intravenosament i es deixava desenvolupar la malaltia durant 2 setmanes, moment en el qual se subministrava un tractament d'INH i PZA durant 3 mesos. En aquell instant, els cultius eren tots negatius. En canvi, passats 3 mesos, un terç dels animals reactivaven presentant cultiu positiu per tuberculosi. Per primera vegada s'havia demostrat que el

bacil latent persistia en el teixit i que havia estat refractari al tractament, encara que en el cultiu *in vitro* eren susceptibles. Hi ha diferents variacions d'aquest model variant la ruta d'infecció i les combinacions de fàrmacs, i tots porten cap a la reactivació de la malaltia (347,348,349).

Cal dir que aquest model pot ser criticat pel poc temps de desenvolupament de la malaltia: en dues setmanes, pocs granulomes es podien establir. Aquest fet no està en relació amb el temps que necessita l'hostatger per a muntar una resposta específica eficient i una estructura de contenció capaç de limitar el creixement del bacil. A més, el fet d'utilitzar els antibiòtics per a induir aquesta latència no respon a un fenomen fisiològic afectant al granuloma que desapareix junt amb la pressió selectiva pel bacil (327).

Com a model per l'estudi de la tuberculosi latent, podem fer servir el model murí per aerosol, o altres (350) amb els ratolins C57BL/6. En les 3-4 primeres setmanes s'estableix una resposta immune i un control del creixement bacil·lar, però no una eliminació. La micobactèria persisteix als pulmons, melsa i fetge en un nombre alt entrant en estat latent on alguns d'aquests bacils surten del granuloma en ser fagocitats per nous macròfags que no els reconeixen com a virulents i que en transformar-se en macròfags escumosos fagocitant altres productes de necrosi els extreuen. Una altra possibilitat és que els macròfags on hi ha hagut creixement, que posteriorment s'activen, destrueixen la majoria dels bacils però un petit percentatge s'adapta a l'estrès i es converteix en latent. Quan el macròfag esdevé escumós, surt del granuloma amb el bacil latent. En el model de latència seria una manera d'eludir la resposta immune per poder reactivar posteriorment (351).

Molt recentment, s'ha descrit un model de ratolí amb càrrega bacil·lar baixa a causa d'una vacunació amb BCG prèvia a la infecció per aerosol i ha estat proposat com a model per a l'estudi de la latència i de nous fàrmacs per l'erradicació del bacil (352).

S'ha proposat també el model d'infecció en macaco com adequat per l'estudi de la latència. Es disposa de reactius i es coneix molt bé la patogènesi i la immunologia d'aquests primats no humans. Segons estudis portats a terme la dècada passada, aquests desenvoluparien una infecció latent amb reactivacions espontànies encara que calen més estudis en aquest sentit (353,354). Recentment, s'ha comprovat en un estudi amb la soca de referència H37Rv i una infecció a dosi baixa que el mico cursa la malaltia de forma asimptomàtica (355,356).

El paradigma de model *in vitro* és el model de bacil dorment de Wayne. La hipòtesi inicial és que l'ambient hostil que hi ha dins dels macròfags, als granulomes i a les lesions caseoses és molt

baix en oxigen. Realment, aquesta hipòtesi s'ha comprovat recentment (96) en els estudis amb microarrays i altres novedoses tecnologies descrits anteriorment (151,257). Aquest model consisteix en la restricció gradual dels nivells d'oxigen mimetitzant les condicions in vivo durant 10-14 dies tot establint dues fases denominades de persistència no replicativa, NRP1 i NRP2. El nivell NRP1 (1% de saturació d'oxigen) correspon a condicions de microaerofília i es caracteritza per una producció de glicina deshidrogenasa i isocitrat liasa i una generació d'ATP mantinguda. La segona fase NRP2 correspon a condicions d'anaerobiosi (0,06% de saturació d'oxigen) on la producció de glicina deshidrogenasa cau en picat per deixar pas a la producció de nitrats. En aquest estat d'hipòxia no hi ha síntesi de proteïnes i els bacils es mantenen viables (241,242). En un estudi de les condicions d'hipòxia mitjançant microarray, es va desprendre que més de 100 gens van veure augmentada la seva expressió com ara: Acr, metabolisme de nitrats (*narX*, *narK2*), metabolisme del ferro, *ctpF* (ATPase), *ahpC* i altres. En canvi, van veure disminuïda la seva transcripció altres gens relacionats amb síntesi de lípids, proteïnes, DNA i aminoàcids, i metabolisme aeròbic (245).

Com a crítica a aquest model, es pot afegir que l'adaptació a les condicions d'hipòxia van durar molt poc temps i és per això que tots els bacils recuperats van ser viables amb nombres de 10^8 UFCs/mL. Posteriorment, un altre grup va desenvolupar la mateixa estratègia, però mantenint la hipòxia durant més temps recuperant 10^5 bacils en medi de Sauton (357).

Un altre model (358) desenvolupat més recentment fa servir com a mecanisme inductor de latència altes dosis de rifampicina. Es tracta de sotmetre un cultiu estacionari de 100 dies a un règim de 5 dies de rifampicina a una concentració de 100 µg/ml. El comportament micobactèria respon al de una població latent que va augmentar la producció de *sigB*, *rpoB* i *hspX*. Aquest model es va millorar afegint pirazinamida al règim de fàrmac plantejat establint una població homogènia i latent. Els bacils eren encara viables ja que tenien activitat transcripcional

Fa 4 anys es va desenvolupar el model de ressuscitació dit així perquè d'un cultiu en fase estacionària temprana recuperaven el sobrenedant i ho inoculaven en cultius que portaven mesos sense agitació que eren capaços d'abandonar la latència i créixer en medi sòlid. A més, van establir una tècnica ràpida per detectar la ressuscitació en lloc d'esperar el lent creixement del bacil basada en una doble tinció (359,360)

5. Mecanismes de latència

En efecte, és molt probable que *M. tuberculosis* pugui modificar els mecanismes de defensa de l'hostatger al seu favor per a poder persistir mitjançant la secreció de molècules o per canvis a la

seva superfície. Aquestes estratègies són molt poc conegudes i calen més estudis em models vàlids de latència per caracteritzar-los. Alguns dels factors relacionats amb la latència poden ser el factor sigma F, B o J (167,169) com s'ha comentat anteriorment. També podem parlar del *icl* s'ha mantingut com un gen molt important en relació a la persistència ja que és essencial pel metabolisme dels àcids grassos i en el cicle de Krebs.

Alternativament, el *pcaA* ha estat involucrat en la persistència en ratolins. El *pcaA* KO va créixer normalment *in vitro*, i inicialment *in vivo* on posteriorment no va poder persistir. La seva funció és la modificació dels àcids micòlics de la paret micobacteriana per acció d'una metil transferasa (361). En un altre sentit, la *gycB* (glicina deshidrogenasa) estava present en el model de Wayne, en la fase NRP1 (362). Encara no s'ha pogut demostrar la seva actuació en el model murí amb *M. tuberculosis*, però sí amb altres microorganismes (363). En referència a les adaptacions metabòliques en latència, el metabolisme anaeròbic fent servir nitrats (*narX*, *narK2* i *narG*) ha demostrat la seva utilitat com a marcador de persistència fins i tot en el model de Wayne. A més, *M. bovis* BCG no va persistir en pulmons, fetge o ronyons de ratolí perquè no té aquestes nitrats reductases (364,365).

Ja s'ha esmentat abans que la proteïna Acr semblaria jugar un paper en la persistència gràcies a la seva col·laboració en l'estabilització de estructures cel·lulars amb baixes condicions d'oxigen (143). També el gen *relA* és activat en una resposta astringent i la seva mutació no permet sobreviure al bacil durant llarg temps *in vitro* (366) i sota condicions d'anaerobiosi i que la seva persistència es veu afectada en un model murí. El seu control transcripcional demostra que RelA juga un paper important en la persistència *in vivo* (367).

6. Mecanismes de sortida de la latència

Una de les perspectives més interessants és esbrinar si un bacil latent és capaç de reactivar. Aquest dubte s'ha intentat resoldre a partir del model *in vitro* del bacil dorment, així que s'han descrit diferents estratègies per sortir l'estat de latència ja que segueix sent un dels grans enigmes de la patogènia d'aquest bacil. El Rpf, *resuscitation promoting factor*, de *Micrococcus luteus* ha estat capaç de revertir la latència en cultius de *M. tuberculosis* i en el model murí per aerosol. També s'han descrit 5 gens semblants al *rpf* de *M. luteus* en el bacil tuberculós els quals estarien relacionats amb el creixement del bacil (368). A més, no sembla un gen essencial per la viabilitat; és necessari desenvolupar més treballs en aquest sentit (369)

Per un altre cantó, actualment és difícil poder extrapolar aquests mecanismes al model *in vivo* degut a la dinàmica de poblacions que existeix en teixit (349).

7. El tractament de la malaltia tuberculosa i la latència

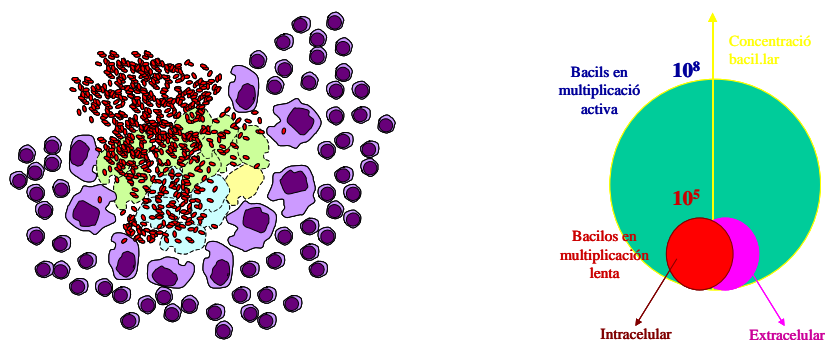
Normalment, els antibiòtics són actius contra bacteris en creixement. Existeixen diferents estudis que així ho demostren amb *M. tuberculosis* (370).

El tractament actual de curta durada de la tuberculosi es basa en una hipòtesi sobre la dinàmica de poblacions bacil·lars segons Mitchinson (371) que es fonamenta en l'experiència obtinguda d'estudis amb tractament empíric.

Una primera població present en un gran nombre (10^8 bacils) a pH neutre de 6,5-7 que està creixent exponencialment i és susceptible a l'acció de la isoniazida i a les altres drogues. En pocs dies, aquesta població (potencialment la més perillosa a curt termini per la presència de mutacions naturals) és controlada. Aquesta població se situa al *caseum* líquüefectat de la caverna de malalts tuberculosos.

Les següents poblacions tenen un metabolisme enlentit i caldria tenir en compte una població de 10^4 - 10^5 bacils formada per bacils que estan en un ambient a pH àcid en les zones inflammatòries i als fagosomes dels macròfags i una tercera població amb la mateixa càrrega bacil·lar que roman a pH neutre a les zones on hi ha necrosi i als fagosomes dels macròfags poc activats. Aquestes poblacions són susceptibles a l'acció de la pirazinamida i de la rifampicina. Segons aquesta hipòtesi, aquests bacils estan en semi-latència.

Igualment, caldria considerar aquestes mateixes poblacions en les lesions no líquüefectades. La diferència estaria en que no hi hauria una gran població en creixement exponencial donat que no hi ha *caseum* líquüefectat. Tanmateix aquesta població de bacils en creixement actiu (primera població) seria més petita (10^4) i estaria situada al interior dels macròfags.



Esquema representatiu de les poblacions bacil·lars segons Mitchinson *et al* (371). Adaptació del Dr. PJ Cardona

8. Estratègies de combat al bacil latent

Actualment, la millor aproximació al control d'aquest bacil és el tractament quimioteràpic i sabem del cert que no és totalment efectiu. És per això que calen noves estratègies de lluita que permetin la destrucció del bacil latent i estimulin al sistema immune cap a un control més efectiu de la malaltia.

S'estan desenvolupant nous fàrmacs entre els que destaquen l'àcid pirazinoic (372,373). I el disseny de noves molècules hauria de tenir com a diana les molècules involucrades en la persistència com a resposta a l'estrès, resposta astringent, i altres factors de resposta. Cal dir que l'estructura cristal·lina de Icl (374) i de PcaA (375) ja estan disponibles. També és possible altre aproximació mitjançant els descrits recentment factors de ressuscitació que podrien fer créixer als bacils i ser així susceptibles a la infecció (376). La implantació de nous règims de tractament també seria recomanable degut a la toxicitat i al problema del seguiment en un tractament tan llarg.

Una camí diferent per la destrucció micobacteriana seria la d'estimular el sistema immune mitjançant immunoteràpia. Aquesta estratègia no ha estat molt estudiada degut al temor existent que pot representar una vacunació amb DNA o altres materials immunogènics en un individu que ja hagi estat exposat a la infecció tuberculosa. Una de les primeres línies estudiades en immunoteràpia va ser desenvolupada per Stanford *et al* i la vacunació amb *M. vaccae* amb resultats controvertits que calen ser comprovats en poblacions més grans i heterogènies (377). Posteriorment, hi ha hagut diferents treballs on la vacunació es realitzava amb DNA de *heat shock proteins*, antígens secretats, de paret, ...etc. Els seus resultats no han estat molt superiors als de la vacuna BCG quan no han tingut efectes adversos (378,379,380). Últimament, un grup xinès ha desenvolupat una vacuna dual basada en el antígens 85B i MPT64 obtenint molt bona protecció basada en una resposta de tipus Th1 i una reducció molt notable en la càrrega bacil·lar; a més, no han trobat cap mena d'efecte secundari (381) Com a novedós candidat a molècules immunogèniques cal destacar l'aportació del grup de Cardona *et al* amb la vacuna immunoterapèutica anomenada RUTI. Aquesta estratègia es basa en l'estimulació de la resposta immune amb antígens de la paret de *M. tuberculosis* sotmès anteriorment a condicions d'estrès simulant el que podria ser el comportament dins del fagosoma o en condicions d'hipòxia. Els primers resultats en ratolí confirmen una estimulació de la resposta immune de tipus Th1 i una bona resposta humoral (382).

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

I. HIPÒTESIS

La tuberculosi és encara la causa més important de mort per un agent infecció. El seu control és realment complicat degut a l'epidèmia de HIV i l'aparició de soques resistents. No obstant, la raó principal per a no aconseguir l'eradicació de la tuberculosi són les propietats biològiques de l'organisme infecció d'entre les quals ressalten la seva habilitat per a persistir en un estat latent al seu hoste durant anys, tot esperant el moment de reactivar i l'oportunitat de disseminar-se arribant a nous hostes susceptibles.

A. L'home és un hostatger resistent a la infecció per M. tuberculosis i per això caldria trobar un model animal que es comporti de forma semblant. En aquest sentit, les soques resistents a la infecció tuberculosa podrien reproduir aquesta situació i ens permetrien estudiar el comportament del bacil en unes condicions semblants a les humanes.

Els estudis previs de Medina i North on classifiquen diferents soques de ratolí en funció de la seva susceptibilitat a la infecció ens pot servir de punt de partida per a triar el model adient per a l'estudi de la latència. Els ratolins C57BL/6 serien més resistents a la infecció que els DBA/2 degut a que evitarien una disseminació broncògena dels bacils evitant la formació de nous focus infectius escampats pel pulmó. Els seu estudi podria significar la caracterització d'un model molt aproximat al que realment passa en humans.

Aquest model presenta un creixement exponencial en els primers estadis de la infecció fins que la immunitat controla el creixement bacterià. Posteriorment, s'estableix una cronicitat de la infecció amb una càrrega bacil·lar alta durant llarg temps. Encara que aquest model sigui resistent a la infecció, podem dir que es tracta d'un comportament tolerant ja que el ratolí permet que la infecció progressi i es cronifiqui per finalment ocupar molt espai pulmonar i acabar amb la seva vida.

B. L'acidificació parcial del fagosoma no és suficient per a la destrucció bacil·lar en macròfags no activats i M. tuberculosis és capaç de sobreviure.

Un macròfag inactivat no pot destruir *M. tuberculosis* i permet el seu creixement i supervivència dins del fagosoma afavorit per mecanismes de depressió immunològica. En canvi, en ser activat el macròfag, es converteix paulatinament en una màquina efectiva de

destrucció que comporta l'acidificació del fagosoma, condicions reductores, hidrolases i efectes potencials de ROIs i RNIs. Aquests mecanismes potencialment destructors no semblen ser definitivament efectius davant la infecció i així parlem ocasionalment de bacils latents. Aquests bacils han de romandre durant un temps perllongat en aquestes condicions passant desapercebuts als mecanismes immunològics i suposant un dels principals problemes de la tuberculosi, la latència. És evident que la caracterització d'aquests bacils des de diferents punts de vista pot servir com a punt de sortida per a nous mecanismes de diagnòstic i principalment per a monitoritzar el desenvolupament de noves teràpies amb estratègies capaces de trobar aquests bacils i destruir-los. A més, ha de servir pel disseny de vacunes dirigides clarament cap a aquest bacil inactiu però viable, que sota condicions concretes pot reactivar i donar lloc a la malaltia tuberculosa.

*C. En canvi, l'acidificació del fagosoma en un macròfag activat podria ser el mecanisme principal de destrucció bacil·lar degut a l'extrema sensibilitat de *M. tuberculosis* davant el baix pH.*

Existeix un reservori epidemiològic fabulós que abarca actualment a un terç de la població mundial (1.800.000.000 de persones) i en conseqüència ha de ser estudiat més a fons per a poder aconseguir la seva eradicació. En els nostres dies, hi ha un enfocament clar de la comunitat científica cap a un estudi de la resposta específica de l'hoste en funció de la producció de RNIs. S'ha demostrat clarament la seva importància i actuació com a mecanisme bacteriostàtic o bactericida en funció de l'estudi referenciat. Per una altra banda, els estudis recents sobre la caracterització del transcriptoma intrafagosomal no semblen atribuir gaire importància al mecanisme principal de destrucció en altres microorganismes, aquells relacionats amb el baix pH. Cal recordar que quan el macròfag està activat, el fagolisosoma es forma i l'acidificació del mateix pot suposar un dels majors mecanismes microbicides encara que la relació amb *M. tuberculosis* no s'hagi aclarit definitivament. En canvi, i molt recentment, s'ha trobat que gens anteriorment relacionats amb l'acidesa es veien notablement alterats en el model del macròfag i també en model murí intranasal. A més, altres gens relacionats també amb la resposta a l'àcid han vist alterada la seva expressió en un model murí immunocompetent, però no en el immunodeficient. Semblaria llavors que el punt de vista del pH estaria agafant forma com a mecanisme de destrucció bacil·lar en el macròfag activat.

A més, segons les hipòtesis actuals de la dinàmica de poblacions als granulomes que fonamenten el tractament de la tuberculosi, existirien poblacions semi-latents a les ferides granulomatoses que romandrien extracel·lularment i a un pH àcid ($\text{pH} \leq 5,5$). Aquesta població seria una de les causants del fracàs del tractament junt amb la població latent.

És per això que l'estudi de la susceptibilitat a l'àcid en un model *in vitro* ens pot permetre conèixer una mica més el comportament del bacil davant aquest mecanisme d'estrès. Existeixen ja altres estudis semblants amb *M. smegmatis* i fins i tot amb *M. tuberculosis*, però tots han basat la seva metodologia en *shocks* àcids, és a dir, adaptació ràpida a aquesta condició o com a molt han mantingut el bacil durant varies hores. Realment, no sembla que sigui aquesta l'estratègia real que adopta el macròfag davant la infecció tuberculosa, ja que tot el procés descrit anteriorment per la caracterització del fagosoma i la posterior maduració a fagolisosoma porta un temps relativament curt, però *M. tuberculosis* roman més temps i cal un estudi tenint en compte aquesta variació de temps. A més, la destrucció del bacil per mecanismes clàssics del fagolisosoma no és immediata i pot no portar a una degradació total. De la mateixa forma, l'estudi en el model murí per aerosol de l'adaptació metabòlica de *M. tuberculosis* ens ha de servir per a corroborar els resultats obtinguts *in vitro*.

D. El comportament davant d'un xoc àcid d'un cultiu exponencial podria reproduir parcialment el perfil de creixement del bacil les primeres setmanes d'infecció en un model in vivo. La inducció d'un xoc àcid en cultiu en fase estacionària recrearia el comportament dels bacils en fase crònica sotmesos a una nova agressió per part d'un macròfag que els ha fagocitat és que és capaç d'activar-se.

Com es descriu anteriorment, existeixen diferents models per l'estudi de la latència, entre els quals hi ha un model *in vitro* relacionat amb la hipòxia. En un model *in vivo*, existeix un creixement exponencial fins a la setmana 3, moment que es desenvolupa la resposta immune específica i la càrrega bacil·lar cau bruscament. Aquest mateix perfil, podríem veure-ho en un cultiu en creixement exponencial que és sotmès a un estrès per àcid en un moment determinat i es manté en aquestes condicions durant un temps concret. Per una altra banda, un cultiu en fase estacionària semblaria comportar-se com els bacils que romanen crònicament en un model *in vivo*. Els bacils en fase estacionària estan sotmesos a unes condicions d'estrès que no els permet créixer òptimament. Podem suposar que aquests bacils tindran una adaptació més important a l'acidificació i poden sobreviure

durant llarg temps. Alternativament, la identificació d'algun gen expressat sota condicions de latència en un ambient àcid pot aportar informació dels mecanismes de supervivència a llarg termini. Establir un conjunt de gens que s'expressen en condicions de pH àcid en un ampli rang ens pot suposar un coneixement més profund de l'estat metabòlic en que es troba el bacil i per tant dels bacils latents. Aquests gens haurien d'expressar-se també en bacils latents de ferides granulomatoses.

II. OBJECTIUS

1. Comprovar efectivament que els ratolins C57BL/6 són més susceptibles a la infecció tuberculosa que els DBA/2 i caracteritzar la seva resposta immune mitjançant *Real-Time* PCR així com l'evolució de la infecció en aquests models en termes d'histologia i càrrega bacil·lar.
2. Caracteritzar la susceptibilitat de *M. tuberculosis* a la presència de baix pH en dues fases de creixement, fase exponencial i fase estacionària. Estudi de la supervivència del bacil i determinació de la expressió genètica davant d'aquest factor d'estrès en funció de 54 gens relacionats amb el metabolisme, formació de la paret, factors sigma i altres.
3. Determinació de la resposta genètica del bacil en un model murí durant 22 setmanes d'infecció mitjançant *Real-Time* PCR. D'aquesta forma, podrem comparar-ho amb els cultius en fase exponencial i estacionària i esbrinar a quines condicions s'emfronten principalment en els teixits i comparar-ho amb la resposta a l'àcid *in vitro*.
4. Desenvolupament d'una tècnica per la determinació de l'expressió bacteriana *in vivo* mitjançant *Real-Time* PCR.
5. Comparar el comportament bacil·lar en ratolins WT amb aquells presents a ratolins KO per IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}), iNOS2 (NOS2^{-/-}), cadena TCR- α (TCR- α/β ^{-/-}), TNF (TNF^{-/-}). Aquest fet ens pot ajudar a interpretar els resultats obtinguts ja que les condicions de creixement en aquests ratolins KOs són molt diferents.

MATERIAL I MÈTODES

I. ESTUDI DE SUSCEPTIBILITAT A LA INFECCIÓ

1. Model d'infecció

La infecció per aerosol es realitza en un *Inhalation Exposure System* (IES) (Glas-col Inc., Terre Haute, Indiana, USA) on els ratolins queden exposats als aerosols de *M. tuberculosis*. El compartiment de nebulització s'omplí amb 10mL d'una suspensió de *M. tuberculosis* a una concentració coneguda d'aproximadament 10^6 UFCs/mL per poder inocular fins a 20 bacils viables als pulmons durant una exposició de 80 minuts.

Van ser sacrificats 4 ratolins a les setmanes 0, 3, 9, 18 i 22 per estudiar l'evolució de la infecció. El nombre de bacteris viables a homogeneïtzats del pulmó i a la melsa van ser sembrats en agar *Middlebrook* 7H11 on les UFCs van ser comptabilitzades després de 21 dies de incubació a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂.



2. Soques de ratolí infectades

S'utilitzaren ratolins femella *spf* per la infecció amb *M. tuberculosis*. Els animals de la soca C57Bl/6 (H-2^b) i DBA/2 (H-2^d) van ser subministrats per IFFA CREDO (Bagneux Cedex, France) que van ser transportats en les condicions adients i certificats per un veterinari. La seva estabulació va venir precedida d'una setmana de quarantena passiva en unes dependències aïllades de l'habitació normal on normalment romanen. Aquests animals van venir acompanyats del corresponent *Health Report* on s'indiquen les proves sanitàries que portades a

terme anteriorment al seu trasllat. Tots els animals eren pesats un cop a la setmana per monitoritzar el seu creixement i bon estat de salut.

Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i supervisats pel Departament de Ramaderia, Agricultura i Pesca de la Generalitat de Catalunya d'acord i les lleis europees que regulen la experimentació animal, comentades anteriorment a la introducció.

Van ser establats al Estabulari d'Alta Seguretat, dependències de la Unitat de Tuberculosi Experimental que assegurin unes condicions P3. Van ser introduïts a gàbies de tipus S2 (IFFA CREDO) amb pinso (IFFA CREDO) i aigua autoclavada *ad libitum* en condicions controlades de temperatura (20°C +/- 2), humitat (50% +/- 10) i cicles de llum i fosc adients.

El sacrifici dels animals, mitjançant sobredosi d'halotà (Zeneca Farma, Pontevedra, Espanya) es portà a terme evitant en tot moment el patiment innecessari de l'animal. S'establí un protocol de punt final per ser emprat en el cas d'un patiment evident. Els animals eren supervisats cada dia per la mateixa persona sota unes directrius de pèrdua de pes, bona salut aparent (cabell eriçat i/o pell amb ferides) i comportament (agressivitat i aïllament). En funció d'això eren eutanasiats amb sobredosi d'halotà per evitar qualsevol patiment. Van ser emprats 4 animals sentinella per comprovar les condicions *spf* en les instal·lacions on es realitzaren els anàlisi pertinents de seguiment.

3. Obtenció de les soques de *M. tuberculosis*

La soca de *M. tuberculosis* emprada va ser la H37Rv (NC007416) obtinguda en la *National Collection of Type Cultures* (London, UK). També es van fer servir els aïllats UTE0335R i el UTE0423R. Aquests aïllats formen part de casos atesos entre juliol de 1995 i juny de 1997 en els hospitals que pertanyen al programa per al control de la tuberculosi multirresistent finançat pel *Fondo de Investigaciones Científicas* (FIS) i la Unitat per la Investigació de Tuberculosi en Barcelona (UITB). Es van aïllar 132 soques INH^R en l'àrea de Barcelona (383). El perfil de RFLP per IS6110 i l'spoligotyping va ser portat a terme segons mètodes estàndards. Per comprovar la susceptibilitat als diferents fàrmacs es va utilitzar el mètode radiomètric del

Material i Mètodes

Bactec (Becton-Dickinson, USA) per la INH, etambutol, rifampicina, estreptomcina i pirazinamida. Es va considerar la resistència quan més d'un 1% de la població bacteriana va créixer a una concentració específica d'antibiòtic. Les soques es van considerar resistents quan el nombre de colònies crescudes en les plaques va ser més gran o igual que el màxim percentatge establert per Canetti (384).

El gen *katG*, *oxyR-ahpC* i *inhA* relacionats a la resistència a la INH van ser amplificats fent servir *primers* específics (385). La seqüenciació del DNA va ser feta amb el *fmol DNA Cycle System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) amb el *ALF Express II* (Amersham, Arlington Heights, CA, USA). Totes aquestes dades han estat facilitades amablement pels següents membres del Grup de Investigació Micobacteriana de Barcelona: M. E. Verdú, F. March, P. Cortés, F. Alcaide, M. Espasa, J. González, M. Salvadó and P. Coll de l'Hospital Clínic, Hospital de la Sant Creu i Sant Pau, Hospital del Mar i Hospital de Bellvitge.

| SOCA | SEXE | EDAT | MALALIA | ALTRES R's | CATALASA EN mm | PEROXIDASA | ISONIACIDA CMI | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>ahpC</i> | AGRUPAMENT |
|---------|------|------|----------|------------|----------------|------------|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| UTE0335 | M | 37 | PULMONAR | CIP | <1 | + | 8 | 315 AGC_ACC | S | S | NO |
| UTE0423 | F | 31 | PULMONAR | - | 3 | 0 | 8 | 315 AGC_ACC | S | S | I |

Aquestes soques van créixer en el medi mínim de *Proskauer-Beck* amb un 0,05% de Tween 80 fins a una fase semi-logarítmica i finalment disposada en vials de 2mL per a la seva congelació a -70°C fins al seu ús.

El *Proskauer-Beck* és un medi pobre basat en un protocol modificat dels autors Youmans i Karlson. Afegiu un a un cada componen en continua agitació i en l'ordre llistat a continuació assegurant-se que cada producte està totalment dissolt abans d'introduir el següent: KH_2PO_4 5,0 g; *Asparigine* 5,0 g; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g; Citrat de Magnesi 2,5 g; Glicerol 20mL; Tween 80 0,5mL; aigua destil·lada 1 L.

Posteriorment, ajustar el pH a 7,8 afegint aproximadament 8mL de NaOH al 40%. Llavors, cal esterilitzar a 121°C durant 20 min. El pH resultant hauria de ser de 7,4.

En aquests moments, es deixar refredar durant 2 hores a temperatura ambient. Filtrar el medi amb paper de filtre i recollir el filtrat en ampolles més petites on es realitzaren els cultius. Finalment, esterilitzar a 121°C durant 20 minuts i deixar refredar fins al seu ús.

4. Estudi de l'expressió de mRNA

4.1 Extracció de RNA total

L'extracció de RNA total es va realitzar del lòbul mig del pulmó dret. Després de l'obtenció del teixit fresc del ratolí sacrificat, aquest és congelat íntegrament dins un criotub en nitrogen líquid fins al seu ús.

Posteriorment, es procedeix a l'extracció del RNA total seguint un mètode de fenol-cloroform (386). Afegim 900µL de TRIzol (GibcoBRL, G. Island, NY. USA) a tubs amb una matriu anomenats, *Lysing Matrix B tubes* (Qbiogene Inc, Carlsbad, CA. USA), que contenen petites boletes de 0,1mm de diàmetre capaces de destruir la paret cel·lular si són agitades violentament. A continuació, traslladem la mostra congelada al tub amb TRIzol. Trinxem les mostres amb el *FastPrep™ Instrument* (Qbiogene Inc, Carlsbad, CA. USA) de 12 en 12 en 1 cicle de 45 segons i un altre de 20 segons a la màxima intensitat (6,5) posant les mostres en gel entre els dos polsos. Aquesta màquina és capaç de sacsejar violentament la matriu de boletes de l'interior del tub permetent una alliberació del material nucleic en un medi adient per a la seva conservació.

Les mostres es mantenen 5 minuts a temperatura ambient per dissoldre els complexos nucleoproteics i afegim 0,2mL de cloroform (Sigma, St Louis, MI. USA) a cada mostra i agitem per inversió 15 vegades enèrgicament, deixant-lo reposar durant 3 minuts a temperatura ambient.

Es procedeix a centrifugar a 12000g durant 15´a 4°C. Podem observar llavors dues fases de volum similar. El punt següent és crític ja que cal recuperar només la fase superior. A la part superior es troba l'RNA, a la interfase el DNA i a la fase inferior, les proteïnes i detritus cel·lulars. Aquest tub es pot guardar per a una posterior extracció de DNA i de proteïnes si ho congelem a -20°C. De l'eficiència d'aquest pas dependrà la qualitat de l'extracció.

El volum recollit (400µL aproximadament) és dipositat en un eppendorf nou al qual afegirem 0,5mL d'isopropanol (Sigma, St Louis, MI. USA) a temperatura ambient. Cal agitar-ho suaument 10 vegades per inversió i deixar reposar 10 minuts a temperatura ambient.

Posteriorment, se centrifuga a 12000g durant 10 minuts a 4°C obtenint un *pellet* més o menys visible.

Decanem llavors el contingut de l'ependorf i afegim 1mL de alcohol 70°C (Sigma, St Louis, MI. USA) a temperatura ambient, vortegem per resuspendre el *pellet* i centrifuguem a 7500g durant 5´ a 4°C.

En acabar, decanem el contingut sobre un paper de filtre intentant no perdre el *pellet* per a continuació deixar assecar durant uns minuts a temperatura ambient i resuspendre en 50µL d'aigua ultrapura (Sigma, St Louis, MI. USA).

4.2 Quantificació i verificació de la integritat del RNA

Es determina la quantitat d'àcid nucleic present a la mostra per absorbància a $\lambda=260$ (Ultraspec 1100pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) i es realitzen alíquotes de concentracions determinades per a poder treballar amb quantitats de RNA conegudes. Alternativament, per observar la integritat del RNA es fa córrer en un gel d'agarosa al 1% amb bromur d'etidi al 5% comprovant la presència de les bandes de rRNA específiques de cada organisme eucariota o procariota.

4.3 Eliminació de restes de DNA

El procés de la DNasa es realitza amb el kit *DNA-free* (Ambion, Woodward Austin, TX. USA) seguint les especificacions del subministrador.

Resumidament, afegirem 2µL de *Dnase Buffer* i 2µL (2unitats/µL) de *Dnase I* (Ambion, Woodward Austin, TX. USA) a 20µL de RNA total (1µg/µL) i escalfarem aquesta barreja a 37°C durant 30 minuts en un termobloc. Posteriorment, afegirem 2µL de *Dnase Inactivation Buffer* (Ambion, Woodward Austin, TX. USA) i deixarem reposar durant 2 minuts a temperatura ambient vortejant 1 vegada en la incubació. Finalment, centrifugarem a 10000g durant 1 minut per recuperar el RNA intacte.

Cal fer constar en aquest moment que aquest pas és crític i que anteriorment s'han provat moltes altres DNases amb resultats inconsistents. És necessari dir també que hi ha un excés clar d'enzim en aquest procés per a assegurar-nos una eliminació eficient de tot el DNA bacterià i eucariota.

4.4 Transcriptasa reversa

Cal primer preparar una barreja amb 1 μ L de *OligodT* (500 μ g/mL) (GibcoBRL, G. Island, NY.USA) i 1 μ L de 10mM dNTPmix (Amersham, Arlington Height, IL. USA) per cada 10 μ L de mostra.

A continuació se sotmet la mostra a una temperatura de 65°C durant 5 minuts i es desa en gel ràpidament. Amb aquest pas aconseguirem denaturalitzar el RNA i desfer estructures secundàries.

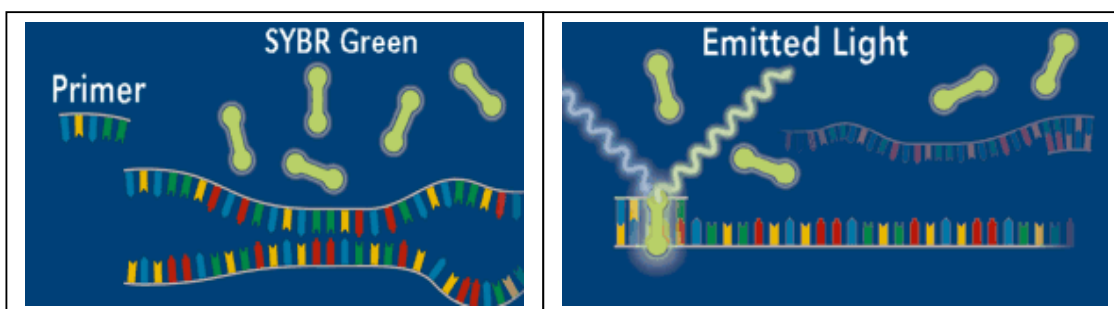
Posteriorment, es prepara per cada mostra una altra barreja de 4 μ L de *5x First Strand Buffer* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA), 2 μ L de 0,1M DTT (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA) i de 1 μ L RNAsin (40u/ μ L) (GibcoBRL,G. Island, NY.USA).

Cal incubar a 37°C durant 2 minuts i finalment afegir 1 μ L de M-MLV RT (GibcoBRL, G. Island, NY.USA) tot incubant a 37°C durant 50 minuts. Finalment, s'escalfa a 70°C durant 15 minuts i s'atura la reacció refredant la mostra a 4°C.

4.5 Amplificació *Real Time PCR* amb *LightCycler*

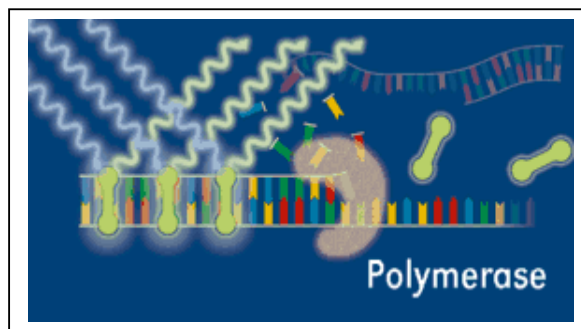
Fem servir una de les aplicacions d'aquesta tecnologia en funció del *SybrGreen* que al igual que el bromur d'etidi, s'uneix preferentment al DNA de doble cadena i incrementa la seva fluorescència.

En unir-se al DNA produït en cada cicle, aquest reactiu emet fluorescència proporcional a la concentració de DNA. Aquest senyal pot ser monitoritzat contínuament o a cada cicle.



D'aquesta manera, en cada ronda d'amplificació, el producte es pot visualitzar contínuament. El senyal apareixerà clarament a partir d'un nombre determinat de cicles dependent de la concentració inicial.

Fent servir estàndards externs de concentració coneguda, es determina la concentració i l'especificitat de la mostra mitjançant la comparació de les corbes de fluorescència. La temperatura de fusió d'un fragment específic depèn de la seva longitud i el seu contingut en GC.



Per l'amplificació amb el sistema *LightCycler* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA) cal preparar la següent barreja per cada mostra: 0,5µL de *primer sense* a 10µM, 0,5µL de *primer antisense* a 10µM, 0,8µL de MgCl₂ (2mM), 1µL de *Hot Start Mix*, 6,2µL d'aigua suministrada amb el sistema *LightCycler*. Anteriorment, cal preparar la *Hot Start Mix* barrejant l'enzim *FastStart* i el *SYBRgreen* en les proporcions recomanades pel fabricant.

Cal treballar de forma molt curosa i sempre a 4°C. Posteriorment, s'afegeix 1 µL de mostra i se sotmet als següents cicles al sistema *LightCycler*:

1. Denaturalització: 95°C durant 600 segons; pendent 20°C/s
2. Amplificació: (5 cicles més que a PCR convencional)
 - Denaturalització: 95°C durant 10 segons; pendent 20°C/s.
 - Anellatge: 5°C menys que en convencional, considerant $T_m = 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C})$ durant 10s; pendent 20°C/s.
 - Elongació: 72°C durant $t = (\text{pbs}/25)$ s; pendent 20°C/s (cas que la temperatura d'anellatge és <55°C, la pendent cal reduir-la a 2-5°C).

Material i Mètodes

| | |
|----------------|--|
| Corba de fusió | 95°C durant 0 s; pendent 20°C/s 10°C més que la temperatura d'anellatge; 15 s; pendent 20°C/s. 95°C durant 0 s; pendent 0,1°C/s. |
|----------------|--|

4.6 Disseny de *primers*

Tots els *primers* van ser subministrats per Roche Biochemicals i fabricats per Tib Biomol (Munich, Alemanya) en forma liofilitzada. Els *primers* són purificats *Salt free* i s'entreguen en forma de 0,2 µmol. Aquests eren resuspesos a una concentració de 100µM amb aigua de grau de biologia molecular i al·lquotats a una concentració de 10µM a -20°C, desant la resta a -80°C. Els *primers* UTE, tant per la PCR com per la RT, han estat dissenyats fent servir el software *LighCycler Probe Design*TM (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA) i el *Primer Premiere* (Premier Biosoft International, CA. USA). Aquesta és la relació de *primers* dissenyats i fets servir.

Material i Mètodes

| Nom | Seqüència 5'-3' | Pbs | Tª LC | Origen |
|-------------------------------|---|-----|-------|--------|
| GM-CSF s GM-CSF as | AGATATTCGAGCAGGGT AATCCGCATAGGTGGTA | 139 | 60 | UTE |
| HPRT s HPRT as | GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC | 163 | 62 | UTE |
| ICAM-1 s ICAM-1 as | GCCATAAACTCAAGGGAC GGCTACAAGTGTGCATC | 186 | 60 | UTE |
| IFN-g s IFN-g as | AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG | 244 | 62 | UTE |
| IL-1a s IL-1a as | GTATGCCTACTCGTCGG CATAGAGGGCAGTCCC | 281 | 60 | UTE |
| IL-2 s IL-2 as | CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA TCCAGAACATGCCGCAGAG | 141 | 60 | UTE |
| IL-4 s IL-4 as | CTAGTTGTCATCCTGCTCTTCTTT CTTAGGCTTTCCAGGAAGTCTTT | 378 | 60 | UTE |
| IL-6 s IL-6 as | CCACGGCCTTCCCTAC AAGTGCATCATCGTTGT | 186 | 60 | UTE |
| IL-8r s IL-8r as | GGGTCTGACTGCGTAT GTCAATGTCATCGCGG | 257 | 60 | UTE |
| IL-10 s IL-10 as | TTTGAATTCCTGGGTGAGAA ACAGGGGAGAAATCGATGACA | 73 | 62 | UTE |
| IL-12p40 s IL-12p40 as | AGCACCAGCTTCTTCATCAGG CCTTTCTGGTTACACCCCTCC | 212 | 62 | UTE |
| INOS s INOS as | CAGCTGGGCTGTACAAACCTT CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG | 95 | 60 | UTE |
| IP-10 s IP-10 as | GCCGTCATTTTCTGCCTCAT GCTTCCCTATGGCCCTATT | 245 | 60 | UTE |
| LTa s LTa as | CTGTGTATCCGGGACT CCCTTGAAACAACGGT | 218 | 58 | UTE |
| MCP-1 s MCP-1 as | AGAGAGCCAGACGGAGGAAG GTCACACTGGTCACTCCTAC | 165 | 59 | UTE |
| MCP-3 s MCP-3 as | AGGGCATGGAAGTCTG TTCCTTAGGCGTGACC | 244 | 58 | UTE |
| MIP-1a s MIP-1a as | GTAGCCACATCGAGGG TGAGGAACGTGTCCTG | 144 | 58 | UTE |
| MIP-1b s MIP-1b as | CCAATGGGCTCTGACCCTCCC CATGTACTCAGTGACCCAGGGC | 186 | 62 | UTE |
| MIP-2 s MIP-2 as | GCCCCTCCACCTGCCGGCTGC CTGAACCAGGGGGGCTCAGGG | 132 | 59 | UTE |
| MIP-3a s MIP-3a as | GACTGTTGCCTCTCGT TGACTCTTAGGCTGAGGA | 191 | 59 | UTE |
| MIP-3b rec s MIP-3b rec as | TGTATGCCTTCATCGGC GCAGTTTCTTAGGTCCT | 309 | 62 | UTE |
| RANTES s RANTES as | GAAGGAACCGCCAAGT AGAGCAAGCGATGACAG | 134 | 62 | UTE |
| TGF-b s TGF-b as | GCAACATGTGGAACCTACCAGAA GACGTCAAAGACAGCCACTCA | 106 | 62 | UTE |
| TNF-a s TNF-a as | CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC | 176 | 60 | UTE |
| VCAM-1 s VCAM-1 as | TACACCATCCGCCAGG AGGAGTTCGGGCGAAA | 144 | 60 | UTE |

4.7 Preparació dels estàndards

Per l'obtenció dels estàndards cal primer realitzar una PCR convencional en un termociclador estàndard (Perkin Elmer 2600, Applied Biosystems, AR. USA) per intentar optimitzar les condicions i obtenir un únic producte per cada gen amb els mateixos *primers* que es faran servir al sistema *LightCycler*.

Per portar a terme la PCR cal preparar la següent barreja per cada mostra: 4µL de dNTP 10mM mix (Amersham, Arlington Height, IL. USA), 5µL de *buffer* PCR (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA), 1+1 µL de *primers* 100µM, 36,8µl de aigua de grau molecular (Sigma, St Louis, MI. USA) i 0,2µL de *Taq Polymerase* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA).

Sotmetem aquesta barreja als següents cicles en un termociclador:

- 1.- Denaturalització a 95°C durant 3minuts
- 2.- Repetir

| |
|---------------------------------------|
| Denaturalització a 94°C durant 1minut |
| Temperatura durant 1minut (*) |
| Extensió a 72°C durant 2minuts |
- 3.- Extensió a 72°C durant 7minuts
- 4.- Sostenir a 4°C amb temps infinit

* T és la temperatura a la qual el 50% dels *primers* s'enganxa al fragment de cadena específica

El producte d'aquesta PCR es visualitza en un gel d'agarosa per comprovar que la banda obtinguda sigui la prevista i que només hi hagi una banda; en conseqüència, obtenim un rendiment òptim, és a dir, sense presència de subproductes inespecífics. Per purificar el producte i obtenir així els estàndards es va fer servir en un principi un kit de purificació des del gel d'agarosa (Amersham, Arlington Heights. USA) bo i aïllant inicialment la banda amplificada. El rendiment era molt baix i es va optar per la purificació directa des de la solució on hi havia l'amplificat de PCR. Aquesta tecnologia es basa en columnes de *membrane silica* (Quiagen Purification Kit, Palo Alto. USA) obtenint-se unes recuperacions de fins el 90%.

El següent pas consisteix en la quantificació del producte obtingut mitjançant densitometria i comparant-lo amb un marcador de tamany. El software fet servir per quantificar és el *Sigma Scan Pro* (SPSS Software, San Rafael, CA. USA).

Primerament es visualitzen els productes amplificats i els marcadors de quantitat i de pes molecular al gel d'agarosa. S'estableix una relació entre la intensitat mitjana de cada banda i la quantitat de parells de bases del marcador que ens servirà com a corba patró per extrapolat els valors de les bandes problema. Amb aquestes dades, es quantifica la intensitat mitjana de les bandes problema amb el software *Sigma Scan Pro* i es fa una regressió exponencial. Els valors de intensitat mitjana del marcador es correspon a una quantitat de material genètic en parells de bases.

Numèricament s'interpreta de la següent manera: es carreguen 6 μ L del marcador de quantitat ϕ X174 RF DNA/Hae III Fragments (GibcoBRL, G. Island, NY. USA), en el carril del gel que són 60ng (10ng/ μ L) on hi ha 5386pb totals. Es visualitza amb la intensitat presentada abans al gel. El valor de intensitat extrapolat, equivaldrà a una quantitat determinada de ng/ μ L. Si es carreguen 8 μ L de cada mostra, s'obté la quantitat de mostra en ng.

A continuació, i sabent que 1ng equival a $1,8 \times 10^{12}$ pbs, es coneix quants parells de bases totals s'obtenen. Aquest nombre cal dividir-ho pel tamany de l'amplicó, obtenint el nombre de còpies existents. S'acostuma a obtenir un nombre molt alt de còpies (de l'ordre de 10^{10}). Cal fer una bateria de dilucions amb la que es genera una corba estàndard per cada gen.

Per la generació d'una corba estàndard es grafica el Cp amb el logaritme del nombre de còpies per cada estàndard preparat. El *LightCycler Software 3.5* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA) s'encarrega de calcular una regressió lineal amb aquests punts i poder així extrapolat les diferents mostres obtenint el seu nombre de còpies.

4.8 Normalització de l'expressió

L'expressió de mRNA pel gen constitutiu *hypoxantine phosphoribosyltransferase* (HPRT) va ser analitzada per cada mostra per normalitzar els valors de les expressions de les diferents

citocines i les eficiències en la síntesi de cDNA per part de l'enzim RT per l'anàlisi de la resposta immune. El nombre de còpies de cada mostra per cada citocina es divideix pel nombre de còpies del gen HPRT de cada mostra tot obtenint un ratio que ens indica la importància relativa de l'expressió trobada. Es va triar aquest gen perquè el grup d'Orme de la Colorado State University el fa servir en totes les seves publicacions (387) i perquè segons estudis fets per Vandesompele i Thellin (388) sembla ser un dels gens constitutius més estables.

5. Histologia, histometria i immunohistoquímia

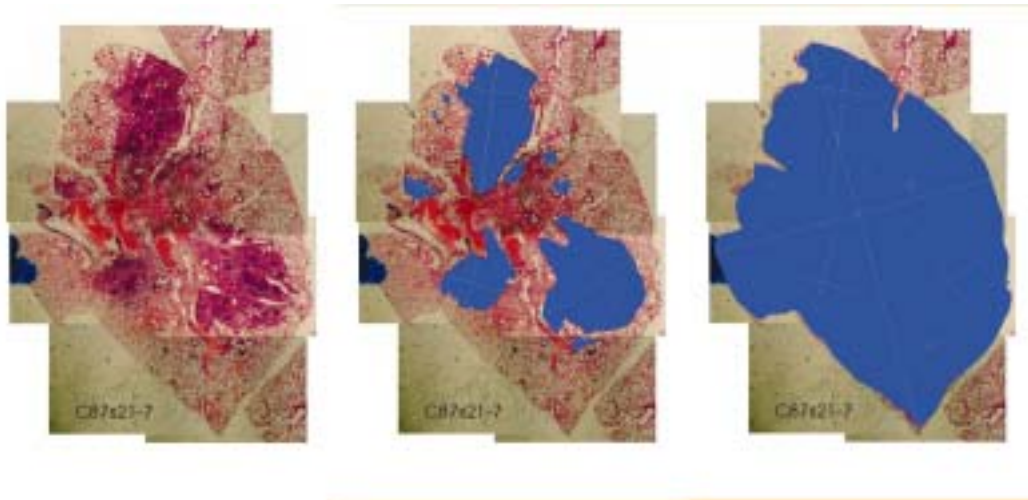
Dos lòbuls drets de cada ratolí van ser fixats en formalin (30% de formol en PBS) i inclosos en parafina. Cada mostra va ser tenyida amb hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen i Tricròmic de Masson.

Per la determinació de la histometria, seccions de 5µm de gruix de cada animal es va tenyir amb hematoxilina-eosina i va ser fotografiada a 50 augments fent servir un binocular Eclipse E400 i una càmera digital Nikon Coolpix 990 (Nikon, Tokyo, Japan). Es van determinar les seccions de 8 lòbuls pulmonars en cada cas. Mitjançant el software *Sigma Scan Pro* (SPSS Software, San Rafael, CA. USA), les àrees de cada lesió i la del teixit total van ser determinades a cada *time-point* de la infecció.

Per la immunohistoquímia, seccions desparafinades es van incubar amb 0,1µg de *affinity-purified monospecific rabbit immunoglobulin* contra iNOS i NOS2 de ratolí (BD Transduction Laboratories, FranklinLakes, NJ. USA) com a anticòs primari. Igualment, es va fer servir un anticòs policlonal contra la proteïna de 38kDa de la paret cel·lular de *M. tuberculosis* (Novocastra Laboratories, New-castle. UK)

Com a reactiu secundari es va fer servir *biotinylated goat Ig against rabbit Ig* que després d'uns rentats, es va incubar amb *avidin-coupled biotinylated horseradish peroxidase* (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). El cromogen fet servir va ser la diaminobenzidina (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, Calif.).

Les microfotografies es van realitzar amb un microscopi Eclipse E400 i la càmera digital Coolpix 990. Com a control negatiu, es va fer servir PBS amb sèrum boví a l'1% de les mateixes espècies que l'anticòs primari; i com a control d'especificitat es van incloure aleatòriament seccions de ratolins no infectats.



6. Anàlisi estadístic

Es va fer servir el programa *Sigma Stat* (SPSS Software) per a comparar les diferències de UFCs/mL i de resposta immune entre els dos grups de ratolins fent servir el test de *t Student* o ANOVA per comparar diferents mitjanes i desviacions considerant que la diferència entre els valors era significant quan $p < 0.05$.

II. ESTUDI DE LA LATÈNCIA *IN VITRO*

Aquest model consisteix en comparar el comportament de la soca H37Rv en fase exponencial i sotmesa a un estrès per àcid amb la mateixa soca en fase estacionària i sotmesa al mateix estrès per àcid durant 15 dies.

1. Obtenció de les soques de *M. tuberculosis*

Es va fer servir la mateixa soca per a desenvolupar el model *in vitro*, la H37Rv (cedida per Institut Pasteur) que es va fer créixer en Proskauer-Beck amb un 0,05% de Tween 80 (Sigma, St Louis, MI. USA) en un agitador orbital rotatori (150rpm) a 37°C fins a una fase semi-logarítmica ($OD_{595} = 0,6-0,8$) i congelada a -70°C fins al seu ús. Per portar a terme el model es va fer créixer anàlogament la soca esmentada anteriorment en medi 7H9 fins a una fase semi-logarítmica i es va disposar en vials de 2mL per a la seva congelació a -70°C fins al seu ús.

Per a determinar l'evolució del creixement bacterià es van realitzar dilucions seriades de tots els cultius realitzats als dies 0, 1, 4, 7, 10 i 15 i van ser sembrats en agar *Middlebrook* 7H11 on les UFCs van ser comptabilitzades després de 30 dies de incubació a 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂.

2. Preparació dels medis fets servir

El medi 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI. USA.) va ser preparat seguint les especificacions del fabricant i suplementat amb 2mL glicerol (Sigma, St Louis, MI. USA) i 0,5mL Tween 80 (Sigma, St Louis, MI. USA).

Aquest mateix medi es va fer servir per congelar la soca crescuda en fase semi-logarítmica i també pels estudis posteriors. Simultàniament es van preparar 5 flascons amb medi 7H9 *fresh* i es van acidificar amb HCl segons es descriu en l'apartat següent. Després, es van autoclavar a 121°C durant 20 minuts i finalment es van afegir estèrilment 5mL de oleic *acid-dextrose complex*, OADC (Difco Laboratories, Detroit, MI. USA). Posteriorment, es tornà a controlar el pH i s'observa si existeix alguna variació

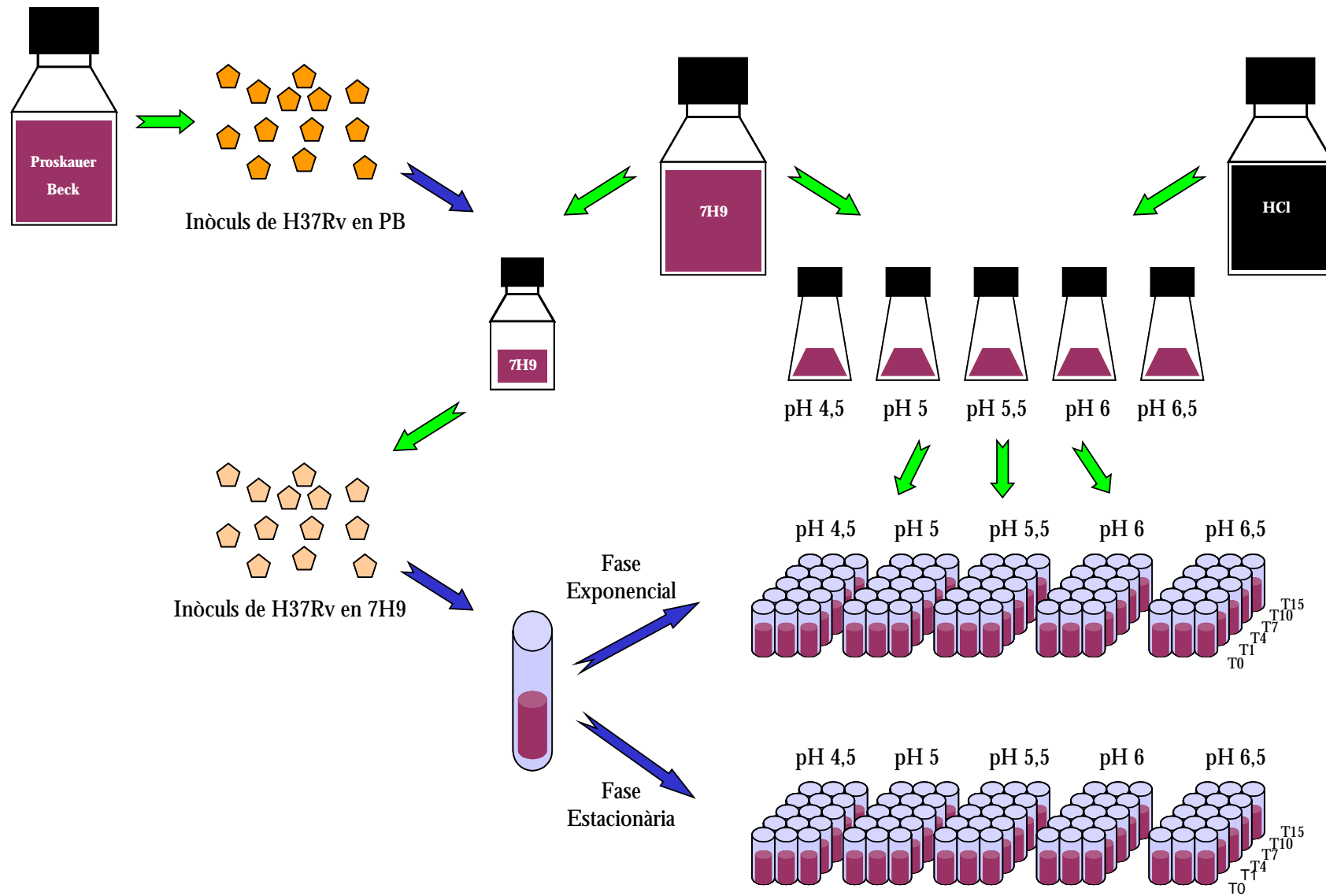
Per últim, es van fer alíquotes de 0,5mL en tubs de 5mL per triplicat. D'aquesta forma, s'obtenien tres mostres independents i repetibles per a cada *time-point*.

Resumidament, la soca congelada en *Proskauer-Beck* es va inocular en medi 7H9 i es va deixar créixer semi-logarítmicament. Llavors es va congelar a -70°C. Passats uns dies, es va

Material i Mètodes

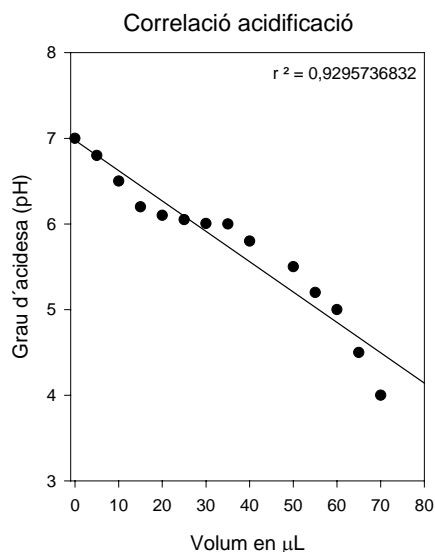
inocular en un tub amb 10mL de medi 7H9 i es va incubar sense agitació. Després de 7 dies va arribar a la fase logarítmica ($OD_{595} = 0,3-0,5$) i ja en fase exponencial es va aliquotar el cultiu en tubs amb medi 7H9 acidificat a 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 per triplicat. Anàlogament, es va repetir l'operació quan el primer cultiu estigué en fase estacionària temprana als 15 dies ($OD_{595} = 0,9-1$). Aquests cultius tampoc van créixer en agitació.

Les mostres recuperades de les dues fases van ser per la determinació de les UFCs/mL i per l'estudi de l'expressió micobacteriana a diferents temps: just abans d'inocular els tubs acidificats, just després d'inocular els tubs acidificats (temps 0) i passats 1, 4, 7, 10 i 15 dies.



3. Acidificació dels medis

Per a la determinació dels pHs en els cultius es va fer servir el pHmetre HI9024C de *HANNA Instruments* (Sigma, St Louis, MI. USA) amb sonda i sempre a la mateixa temperatura, 25°C. Prèviament a la realització dels models, es va estudiar l'acidificació del medi (1mL) obtenint una relació entre el volum afegit de HCl i el pH resultant.



L'acidificació dels medis es realitza afegint les següents quantitats d'àcid als medis descrits i fent un seguiment del seu grau d'acidificació:

| <i>Exponencial</i> | pH esperat | pH obtingut | Desviació mitjana |
|--------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Dia 0 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,89 / 5,13 / 5,68 / 6,21 / 6,65 | 0,212 ± 0,0434 |
| Dia 1 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,78 / 5,23 / 5,54 / 6,18 / 6,54 | 0,124 ± 0,012 |
| Dia 4 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,77 / 5,22 / 5,35 / 6,12 / 6,43 | 0,143 ± 0,043 |
| Dia 7 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,81 / 5,24 / 5,45 / 6,19 / 6,52 | 0,165 ± 0,021 |
| Dia 10 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,71 / 5,19 / 5,52 / 6,11 / 6,51 | 0,142 ± 0,037 |
| Dia 15 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,68 / 5,11 / 5,51 / 6,01 / 6,53 | 0,119 ± 0,024 |

Material i Mètodes

| <i>Estacionari</i> | pH esperat | pH obtingut | Desviació mitjana |
|--------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Dia 0 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,56 / 5,07 / 5,56 / 6,12 / 6,54 | 0,072 ± 0,011 |
| Dia 1 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,61 / 5,12 / 5,58 / 6,13 / 6,54 | 0,092 ± 0,012 |
| Dia 4 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,58 / 5,14 / 5,57 / 6,17 / 6,56 | 0,089 ± 0,045 |
| Dia 7 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,51 / 5,04 / 5,53 / 6,12 / 6,59 | 0,084 ± 0,024 |
| Dia 10 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,52 / 5,03 / 5,56 / 6,09 / 6,58 | 0,082 ± 0,019 |
| Dia 15 | 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5 | 4,54 / 5,09 / 5,59 / 6,08 / 6,59 | 0,074 ± 0,023 |

El procés d'acidificació es va realitzar amb HCl 2N (Sigma, St Louis, MI. USA) en totes les condicions portades a terme. Per exemple, abans i després d'afegir OADC, abans i després d'afegir l'inòcul, ...etc.

4. Estudi de l'expressió de mRNA

4.1 Transcriptasa reversa

Per a l'obtenció del cDNA micobacterià des de cultiu seguirem aquesta estratègia.

Cal primer preparar una barreja amb 1µL de *Random Hexamer* (50ng/µL) (GibcoBRL, G. Island, NY.USA) i 1µL de 10mM dNTPmix (Amersham, Arlington Height, IL. USA) per cada 10µL de mostra.

A continuació se sotmet la mostra a una temperatura de 65°C durant 5 minuts i es desa en gel ràpidament. Amb aquest pas aconseguirem denaturalitzar el RNA i desfer estructures secundàries.

Posteriorment, es prepara per cada mostra una altra barreja de 4µL de *5x First Strand Buffer* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA), 2µL de 0,1M DTT (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA) i de 1µL RNAsin (40u/µL) (GibcoBRL, G. Island, NY.USA).

Cal incubar a 25°C durant 10 minuts i finalment afegir 1µL de M-MLV RT (GibcoBRL, G. Island, NY.USA) tot incubant a 37°C durant 50 minuts. Finalment, s'escalfa a 70°C durant 15 minuts i s'atura la reacció refredant la mostra a 4°C.

4.2 Disseny de primers

Aquests són els primers fets servir per a la determinació de la resposta bacteriana.

Material i Mètodes

| Nom | Seqüència 5'-3' | T ^o LC | Origen |
|-----------------------------------|--|-------------------|--------|
| <i>16S rRNA</i> (<i>rrs</i>) | GCTTTAGCGGTGTGGGATGAGCC CGCACGCTCACAGTTAAGCCGTG | 68 | UTE |
| <i>acr</i> (Rv2031c) | GAAGACGAGATGAAAGAGGGG GTAAGAATGCCCTTGTCGTAGG | 62 | UTE |
| <i>fbpB</i> (Rv1886c) | GAGCGGTGGAACAACACTCA ACCGGCATGACTATCGACAGT | 60 | UTE |
| <i>sigA</i> (Rv2703) | GAGATCGGCCAGGTCTACGGCGTG CTGACATGGGGGCCCTACGTTG | 60 | UTE |
| <i>sigB</i> (Rv2710) | CGCCGCCGTTGAAGTCGAA CAGGTCGCGTTTTTCGGTTCT | 60 | UTE |
| <i>sigE</i> (Rv1221) | GTTGCCGACGGTGACGACTTG CGCGGACCTGTTGGGGATGAG | 65 | UTE |
| <i>sigF</i> (Rv23286c) | GCGGGTCGGGCTGGTCAAC CCTCGCCCATGATGGTAGGAAC | 67 | UTE |
| <i>sigG</i> (Rv0182c) | CTGCGTAGGCTCATTGACGTG CGGTGTGGGCGGAGAAGTC | 65 | UTE |
| <i>sigH</i> (Rv3222c) | CGCTGTTTCTTGCGATAG AGGACTTGCTCCAGGA | 60 | UTE |
| <i>sigM</i> (Rv3911) | ACCGCGCAGGTGAGACC GGGTGTCGGCGATCGAATAG | 60 | UTE |
| <i>ureA</i> (Rv1848) | TGCTGTTGTCCTACGC CTCCACCTGTACCTCG | 62 | UTE |
| <i>ureB</i> (Rv1849) | TACGGCAGTGGTGATAT CGGATTAGCGTCAGAC | 61 | UTE |
| <i>ureC</i> (Rv1850) | CACTTGATCTGTCCGC CGTGGAGTTTGAAACCC | 60 | UTE |
| <i>ureD</i> (Rv1853) | ATGCTCACTGGGAGAT AGCTCGCTGATAGTGG | 65 | UTE |
| <i>ureF</i> (Rv1851) | CGTCTACATACAATGAC CAGCGGATCAGACAAG | 67 | UTE |
| <i>ureG</i> (Rv1852) | GGTGACCTATTCGGATTG AGTTGACTACGAACCCAG | 67 | UTE |
| <i>ideR</i> (Rv2711) | CCGAGATGTACCTGCG GGCCTTTTTCGGTGAG | 60 | UTE |
| <i>furA</i> (Rv1909c) | CCAGTAGATGACCTCCG GGAAGCAGTGAATGCG | 60 | UTE |
| <i>nirA</i> (Rv2391) | GAAGGAGAACCCCAAT CCTTCTTCAGCTCTTCGT | 62 | UTE |
| <i>nirB</i> (Rv0252) | AAGAGACGCTCATCCG CGAAGGAAACGAACCG | 62 | UTE |
| <i>nirD</i> (Rv0253) | GTGTCGGGGTGTFACT GCGAAAGCCTGCTCA | 64 | UTE |
| <i>narG</i> (Rv1161) | ACAAGCTGAAGCTCTCG ACTGTACGTTGGAGTCG | 65 | UTE |
| <i>narH</i> (Rv1162) | ACTACTACGAGCCGTG GTCGTCCCAGTTGGAT | 67 | UTE |
| <i>narI</i> (Rv1164) | TGGTACCACTCGGAA CAATCGGGTAAACGGC | 66 | UTE |
| <i>narJ</i> (Rv1163) | CCGATCCACGATGTATCTG ACTCATAGGGTGACTTGGC | 60 | UTE |
| <i>narX</i> (Rv1736c) | GTGATATGCGCCCTCG GTGCAATGCCCTGACC | 60 | UTE |
| <i>cysH</i> (Rv2392) | CAACATGGCTGATGCG GCGAACAAGTCCTTGC | 61 | UTE |

Material i Mètodes

| Nom | Seqüència 5'-3' | T°LC | Origen |
|--------------------------|---|------|--------|
| -- | TCGTAGGTGAGGCGGTTTC | | |
| Rv3133c | CGGCGATCTGCTTGTGGT | 60 | UTE |
| -- | GGCAGCCGTTCCACATTG | | |
| Rv2623 | GGCTGATCGGCACCACCAC | 64 | UTE |
| -- | CCACCGCACGCGACATCAT | | |
| Rv2626c | CGGAACACGGCGGACCTG | 63 | UTE |
| <i>rpoA</i> (Rv3457c) | AATTCCTGGTCTCCACG GCTGAACGATAAAGGCA | 62 | UTE |
| <i>rpoB</i> (Rv0667) | TCGCCGCGATCAAGGAGT ACCTCCAGGCGCTGCACGTG | 64 | UTE |
| <i>frdA</i> (Rv1552) | CAACAAAGGAAGGACGG CACCCATCATGTAGTGC | 60 | UTE |
| <i>frdB</i> (Rv1553) | GCAGTAGTGGTATGACGA GTAGCACAACATGCAGT | 65 | UTE |
| <i>frdC</i> (Rv1554) | GTTGCATCTTCGTGGC GCAGGAAACTCAACGC | 64 | UTE |
| <i>frdD</i> (Rv1555) | CCTCGACATCGGATGC CCATCGCCAGTAGGTG | 60 | UTE |
| <i>fdhD</i> (Rv2899c) | GACCAACAACACCGAG CGGAGTCTGTGGTAAGG | 63 | UTE |
| <i>fdhF</i> (Rv2900c) | GTCGAGACTTGCACAG CCAACGTACAAGGGGA | 62 | UTE |
| <i>glnN</i> (Rv1542c) | GTGCATGGTAATCCGC GGACTACTGTCACGCTT | 61 | UTE |
| <i>glnO</i> (Rv2470) | ACGAACCTACTCGGAGC ACGGGGAGTTGACCAG | 60 | UTE |
| <i>icl</i> (Rv0467) | GCGGAGCAGATCCAGCAGGT GCGGCGGGCCAGCGTGTGCTC | 64 | UTE |
| <i>gphA</i> (Rv3323c) | GCGAACTCCTTCTTCCA CCAAGTTGTAACGAGGC | 62 | UTE |
| <i>glcB</i> (Rv1837c) | AGTCATCAGGTTCCGG CCAAGCTCTGTTGAACG | 66 | UTE |
| <i>glnE</i> (Rv2221c) | CAGTGTGACCTTGCCC CGGAGAATCCAGACACC | 63 | UTE |
| <i>lipF</i> (Rv3487c) | TAGATAGGCGACTGCCAA CCGACACTTATTCACGTT | 64 | UTE |
| <i>murA</i> (Rv1315) | CAGTTGGAGTTCCCCT CGATACGGTCTCCGAT | 63 | UTE |
| <i>fabG3</i> (Rv2002) | CCTCGCTGCCAGAAAGGGA ATCCCCGGTTTCCTCCGGT | 62 | UTE |
| <i>hmp</i> (Rv3571) | TCACGGTCAAACGAACCGCC GGGTTGTGGGACGAAGTTG | 61 | UTE |
| <i>cspA</i> (Rv3648c) | GAGAAGGGGTTTCGGTTTAT CTGGTTTTCTTCAAGGGTGC | 60 | UTE |
| <i>recA</i> (Rv2737c) | AGGCGCTGCGGAAAATGA CACCGACGCGTAGAACTT | 66 | UTE |
| <i>katG</i> (Rv1908c) | GTTGTCCCATTTTCGTGGGG GAAACAGCGGCGCTGATCGT | 67 | UTE |
| <i>ftsZ</i> (Rv2150c) | GAACAAGCCAAAGTCG ATGGATGCTTTCCGTAG | 65 | UTE |
| <i>msrA</i> (Rv0137c) | GCAGTGCAGATTCGGC CGATGTCGAGGCATCC | 60 | UTE |
| <i>phoP</i> (Rv0757) | AGTTTGGAGGAGGTCG GCCTTCCACACTTCGT | 61 | UTE |
| PE_PGRS Rv0384c | GAGGACAGCAATGCCC GGCTGATCTTTGCC | 62 | UTE |
| <i>relA</i> (Rv2583c) | CAACTCCACTTGACG GGCGAGACTATTGCA | 62 | UTE |

Material i Mètodes

L'extracció del RNA total, la quantificació i verificació de la integritat del RNA, l'eliminació de restes de DNA, l'amplificació per *Real-Time* PCR, la preparació dels estàndards i la normalització de l'expressió es van realitzar de la mateixa forma que en el l'estudi de la susceptibilitat a la infecció comentat anteriorment.

III. ESTUDI DE LA LATÈNCIA *IN VIVO*

1. Model d'infecció

El procés és anàleg al realitzat per determinar la susceptibilitat murina. En aquest cas concret, es van sacrificar 5 animals a les setmanes 0, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 18 i 22 per estudiar l'evolució de la infecció amb més detall. Pels animals KOs es va estudiar la supervivència també i es van sacrificar seguint el protocol de punt final per obtenir mostres ja que no tots van sobreviure durant totes les setmanes especificades. Les condicions de treball són les mateixes que s'han descrit anteriorment.

2. Soques de ratolí infectades

Els animals de la soca C57Bl/6 (H-2^b) van ser subministrats per IFFA CREDO (Lyon, France) mentre que els ratolins KOs amb base C57Bl/6 i mutants per IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}), iNOS2 (NOS2^{-/-}), cadena TCR- α (TCR- α/β ^{-/-}) i TNF (TNF^{-/-}) van ser subministrats pels *The Jackson Laboratory*. Les característiques de l'estudi són idèntiques a les descrites en l'apartat anterior.

3. Obtenció de les soques de *M. tuberculosis*

La soca de *M. tuberculosis* emprada va ser la H37Rv Pasteur degut a la seva capacitat per a generar espontàniament necrosi intragranulomatosa. De la mateixa forma, es va treballar de forma anàloga a la descrita abans.

4. Estudi de l'expressió de mRNA

4.1 Extracció de RNA total

Cal recordar que aquest procés d'extracció és vàlid per a obtenir l'expressió bacteriana i per la determinació de la resposta immune en ratolí. Es tracta llavors d'un procés comú a les dues tècniques. L'extracció de RNA total de teixit es va realitzar del lòbul inferior del pulmó dret associat a uns nivells més baixos d'oxigen i un major tamany i a on més probabilitat podria existir un bacil latent.

L'extracció en teixit va ser la mateixa que s'ha comentat anteriorment. En cultiu, recuperarem 500 μ L de cultiu ho congelarem en nitrogen líquid immediatament i seguirem el procediment.

4.2 Transcripció reversa

Hem fet servir dues tècniques de transcriptasa reversa obtenint els resultats esperats en cada una d'elles. La primera ens permet obtenir la resposta immune del ratolí en el model per aerosol en funció de la cua *poly-A* dels mRNAs obtenint cDNA d'origen murí i. La segona estratègia ens permet quantificar l'expressió bacteriana en teixit mitjançant una transcripció reversa fent servir un primer específic per a cada gen a estudiar, degut a la falta de poliadenilació a les cues dels mRNAs micobacterians.

En l'obtenció del cDNA d'origen murí seguirem l'estratègia comentada en l'apartat anterior. En l'obtenció del cDNA d'origen bacterià seguirem la següent estratègia.

La nostra RT específica es realitza gràcies a l'enzim *ThermoScript Rnase H Reverse Transcriptase* i degut al *buffer* que fem servir, podem treballar amb mostres riques en contingut G+C. Aquest protocol és una adaptació del kit *Transcriptor Reverse Transcriptase* (Roche Biochemicals, Idaho Falls, ID. USA).

Prepararem una barreja de 6 μ L de *primer* específic de RT a 100 μ M per cada gen d'interès, i 3 μ L de mostra de RNA (que corresponen sempre a la mateixa quantitat de 3 μ g de material nucleic) on ja s'ha eliminat el DNA i 3 μ L d'aigua de grau molecular. Aquesta barreja s'incuba a 65°C durant 5 minuts i es manté a 4°C fins al seu ús. En aquest procés, s'inclou sempre una mostra negativa per a validar el procés de la DNAsa.

Alternativament es prepara una barreja per cada mostra de 4 μ L de *TRT Buffer 5x*, 0,5 μ L de *RnaseOut* (GibcoBRL, G. Island, NY.USA), 2 μ L de dNTPs mix 10mM i 0,5 μ L de *Transcriptor Reverse Transcriptase*.

Finalment, es barregen els continguts dels tubs i s'incuben a una temperatura entre 50-65°C en funció de la temperatura de *melting* del primer específic de la RT durant 30 minuts, s'escalfa a 85°C durant 5 minuts i es manté a 4°C fins al seu ús.

La quantificació i verificació de la integritat del RNA, l'eliminació de restes de DNA, l'amplificació per *Real-Time* PCR amb i la preparació dels estàndards va ser fet anàlogament a la forma descrita anteriorment.

4.3 Disseny de primers

Els primers van ser subministrats en iguals condicions que descrit anteriorment. Aquesta és la relació de primers dissenyats i fets servir. En aquest punt, cal dir que no es va estudiar tota la resposta immune sinó que es va limitar a la més representativa i útil de cara a l'estudi de la latència. Així que es van fer servir només els primers per l'IFN- γ , RANTES, iNOS i TNF- α amb el ratio per HPRT mostrats en l'apartat de susceptibilitat murina

| Nom | Primer RT | Tª RT | Origen |
|--------------------|-------------------------|-------|--------|
| 16srRNA (rrs) | GCCCGCACGCTCACAGTTAAG | 62 | UTE |
| fbpB (Rv1886c) | GAAGTCTGGGGGTGGTAGG | 58 | UTE |
| acr (Rv2031c) | GGCTCCCTCCGAAA | 60 | UTE |
| icl (Rv0467) | CGCACCTGCTGGACGGCCA | 62 | UTE |
| sigA (Rv2703) | CTGACATGGGGGCCGCTACGTTG | 57 | UTE |
| sigB (Rv2710) | CAGGTCGCGTTTTTCGGTCT | 57 | UTE |
| sigE (Rv1221) | GTCGAATACGGCGGTG | 59 | UTE |
| sigF (Rv23286c) | CGAGCTAACGAATACGC | 60 | UTE |
| sigG (Rv0182c) | CCGGGTGGTAGTCATT | 60 | UTE |
| sigH (Rv3222c) | GCCGTCTGAGGAGACA | 63 | UTE |
| sigM (Rv3911) | GGGTGTCGGCGATCGAATAG | 60 | UTE |

Relació de primers fets servir a la transcriptasa reversa per a la determinació de la resposta bacteriana

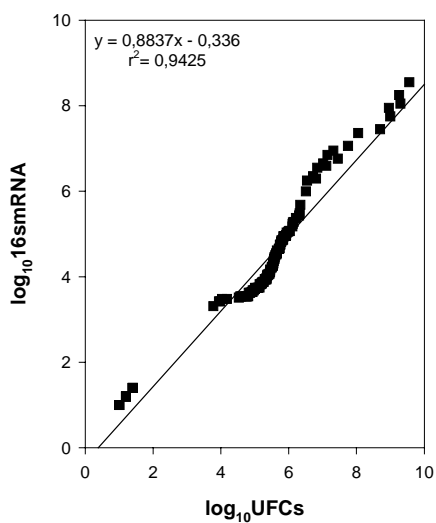
5. Normalització de l'expressió

L'expressió de mRNA pel gen constitutiu *hypoxantine phosphoribosyltransferase* (HPRT) va ser analitzada per cada mostra per normalitzar els valors de les expressions de les diferents citocines com s'ha explicat anteriorment.

En el cas de l'expressió bacteriana calia buscar un gen amb una expressió estable durant tot el procés d'infecció i que es correlacionés amb el nombre de bacils presents als pulmons.

Segons la bibliografia existeixen tres candidats clars, el 16SrRNA, el *sigA* i la quantitat de DNA de la mostra (96,389).

La nostra elecció va ser els valors de cada mostra pel gen 16SrRNA. A la bibliografia és el més utilitzat i a més, existeix una correlació molt bona amb les UFCs/mL que trobem en els pulmons ($r^2 = 0,9425$). Aquest fet ens garanteix que el ratio obtingut sigui representatiu de la quantitat de bacils a cada mostra.



Correlació entre les UFCs/mL i l'expressió de 16SrRNA

RESULTATS

I. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT MURINA

1. Evolució de les UFCs durant la infecció

La monitorització de les UFCs es va realitzar a les setmanes 0, 3, 9, 18 i 22. A continuació es representen les gràfiques on podem veure l'evolució del nombre de UFCs en el temps. Es presenten els resultats dels dos aïllats UTE0335R i UTE0423R de *M. tuberculosis* i la soca control H37Rv en el pulmó, melsa i BAL de les dues soques de ratolí C57BL/6 i DBA/2.

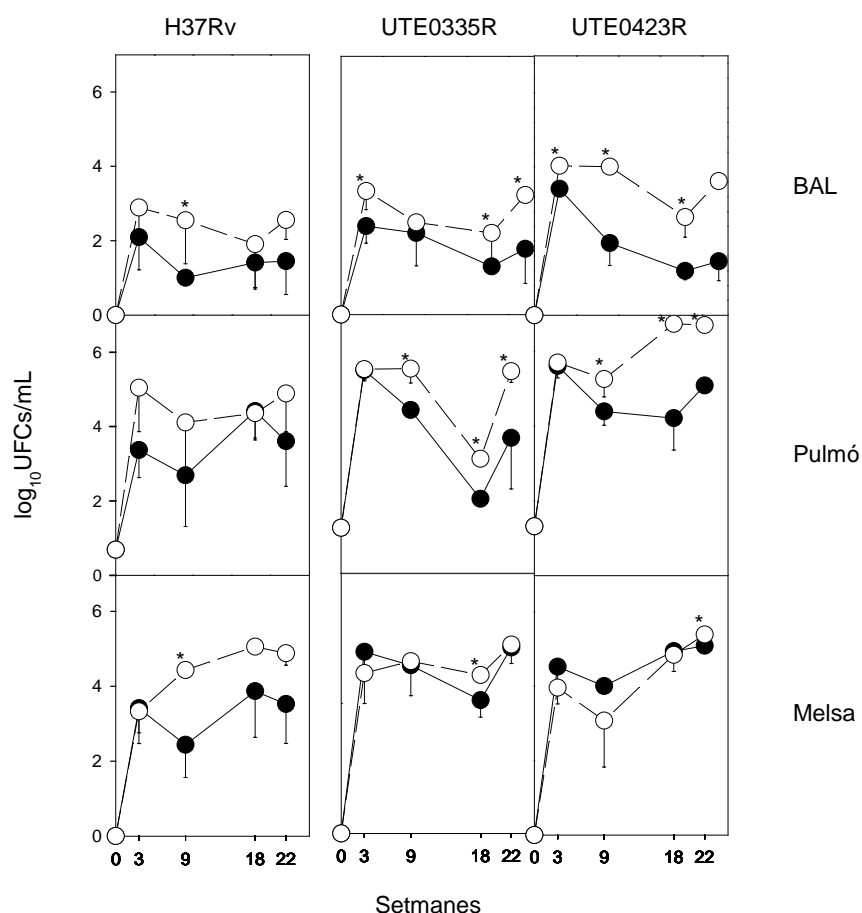


Figura 1. UFCs/mL dels ratolins C57BL/6 (●) i DBA/2 (◊) a pulmó, melsa i BAL. Marcat amb * quan els valors van ser significativament diferents

El perfil de UFCs/mL va ser el clàssic i descrit anteriorment resultant en uns valors més alts pels ratolins DBA/2. Existeix un creixement logarítmic fins a la setmana 3 on s'estableix la resposta immune i una aturada clara del creixement. Existeix una fase posterior on la infecció es cronifica. Aquests valors es van reproduir en els tres experiments encara que no sempre van existir diferències significatives. Les concentracions de UFCs/mL a la melsa no van ser massa diferents entre els dos animals, no així en pulmó i BAL.

2. Monitorització de la resposta immune durant la infecció

A continuació, podem observar l'expressió de mRNA en pulmó de diferents quimiocines i citocines de les soques de ratolí C57BL/6 i DBA/2 en funció del aïllat tuberculós i la soca control amb les que han estat infectats. Es va estudiar l'expressió de les següents citocines quantificant els seus valors a les setmanes 0, 3, 9, 18 i 22: IFN- γ , TNF, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8r, IL-10, IL-12p40, TGF- β , iNOS, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, MIP-3 α , MIP-3 β r, LT- α , MCP-1, MCP-3, ICAM-1, RANTES, IP-10, VCAM-1, GM-CSF. No es van detectar nivells de les següents citocines: IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, VCAM-1.

Realment, només es mostren les representacions gràfiques de les citocines on va existir una diferència notable entre les dues soques de ratolí que pot ajudar a explicar els dos models que són: ICAM-1, MCP-3, MIP-2, RANTES, IFN- γ i iNOS.

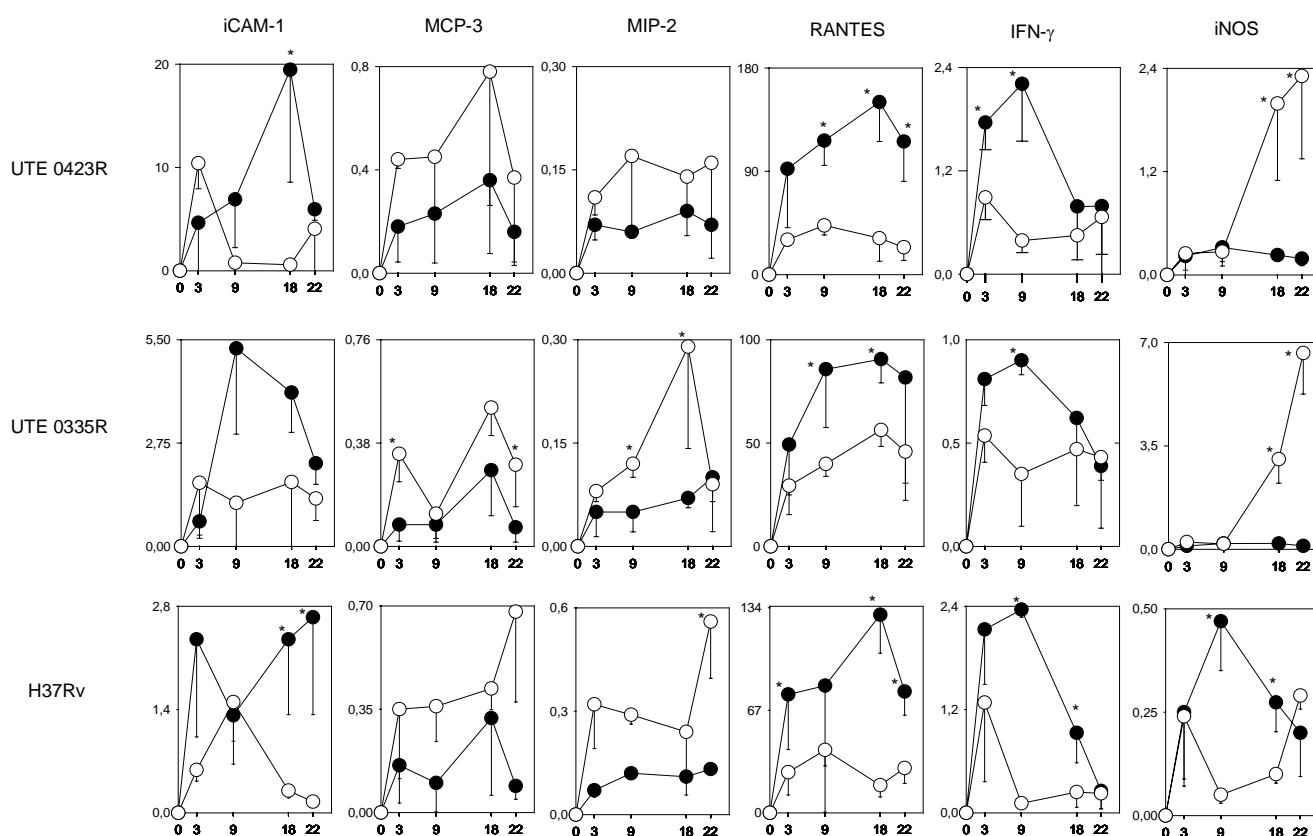


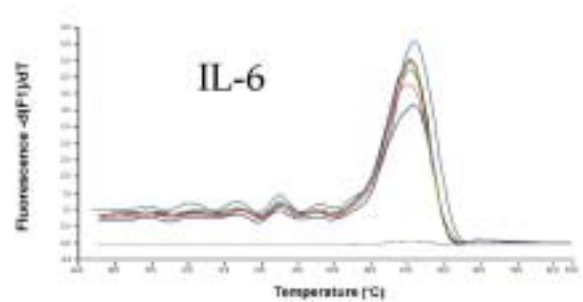
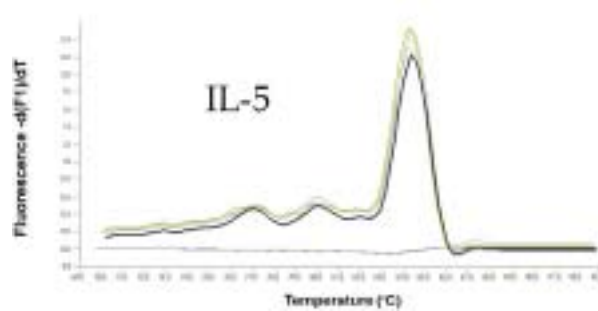
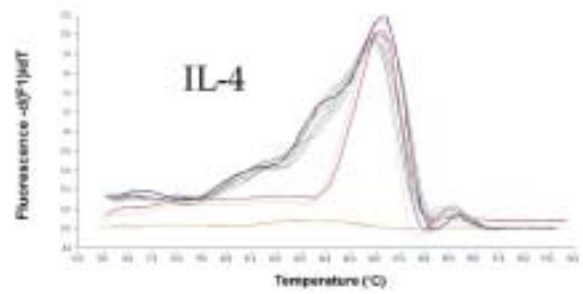
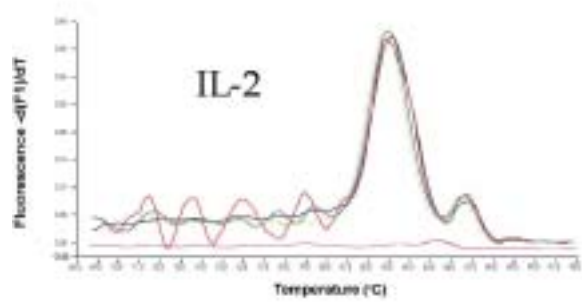
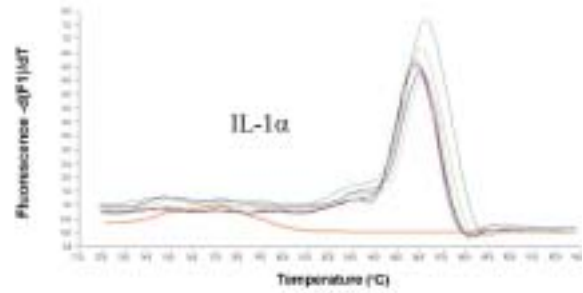
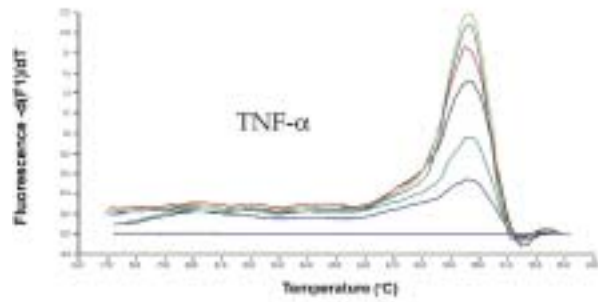
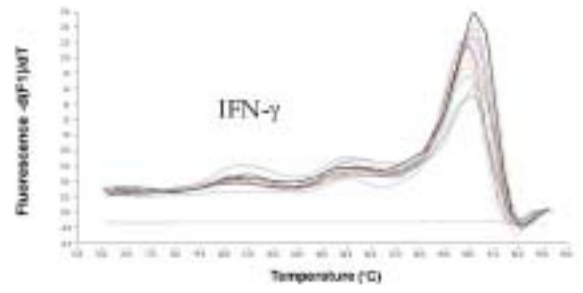
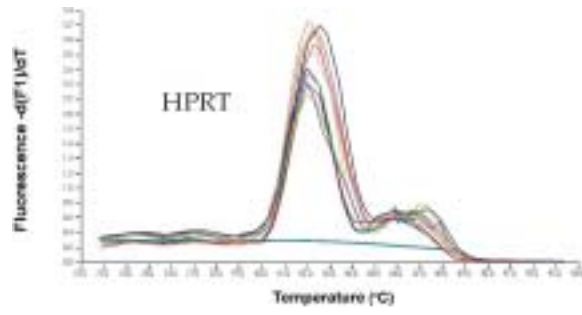
Figura 2. Resposta immune dels ratolins C57BL/6 (●) i DBA/2 (◇) a pulmó. Es mostra el ratio de cada valor amb el factor normalitzador HPRT. Marcat amb * quan els valors van ser significativament diferents

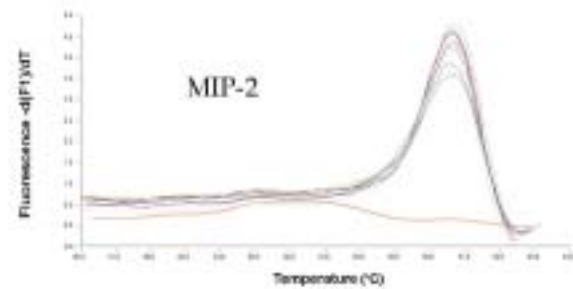
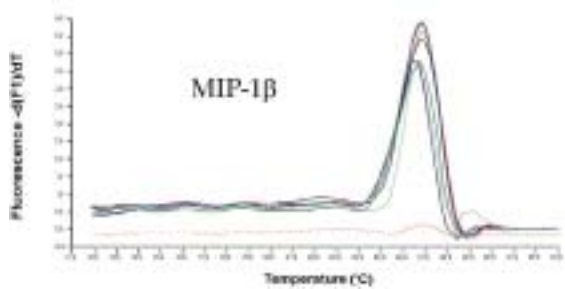
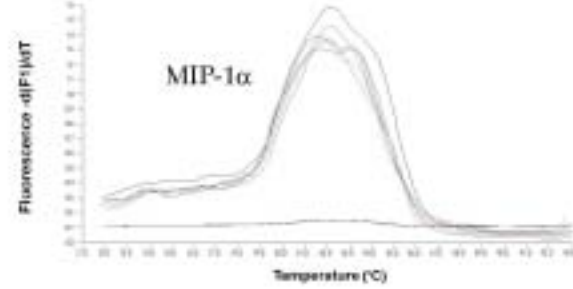
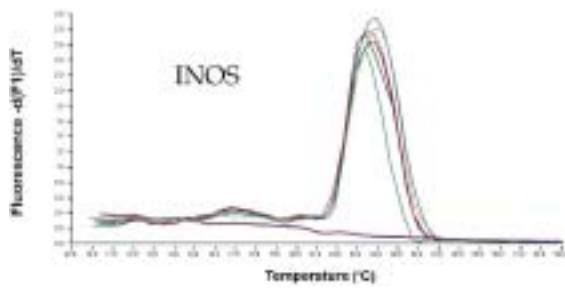
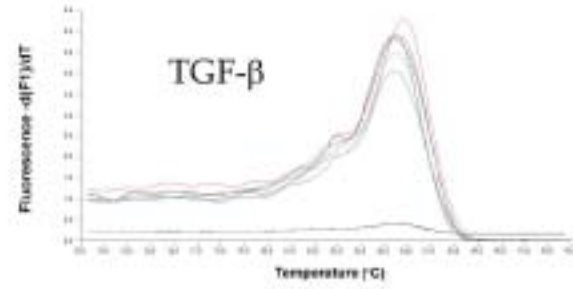
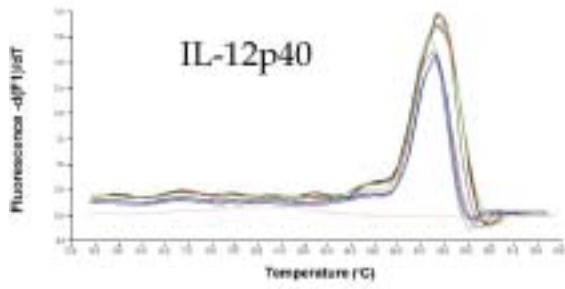
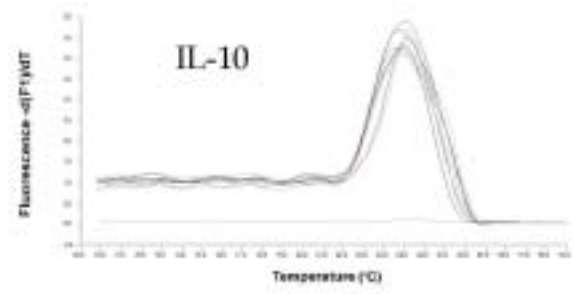
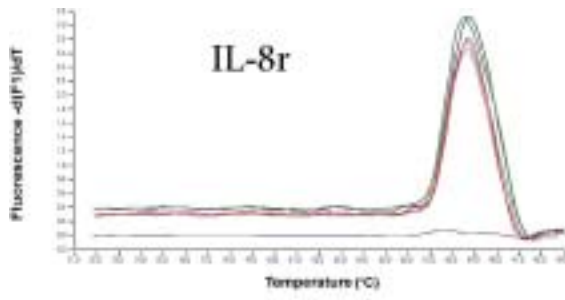
L'expressió de ICAM-1 va ser més important en ratolins C57BL/6 permetent una major entrada de limfòcits T als teixits. Cal també destacar la inflamació produïda per l'arribada de neutròfils i macròfags provocats per l'expressió de MIP-2 i MCP-3. Per una altra part, l'expressió de RANTES va ser quantitativament la més important. Se sap que està relacionada amb la producció d'una resposta de tipus Th1 i va ser molt més important en ratolins C57BL/6 que no pas en DBA/2. Notablement, l'expressió de IFN- γ va determinar el destí de la infecció mitjançant un pic molt important a la setmana 3 que permet controlar la infecció. Interessantment, cal destacar els nivells realment alts de iNOS als ratolins DBA/2 a la setmana 18 i 22 independents de la producció de IFN- γ . Aquesta sobtada producció de iNOS prové dels macròfags escumosos al voltant del granuloma com ha quedat demostrat a la immunohistoquímica.

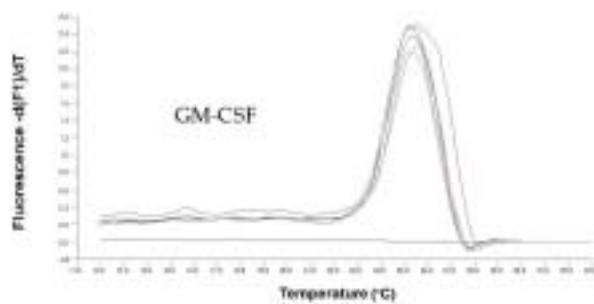
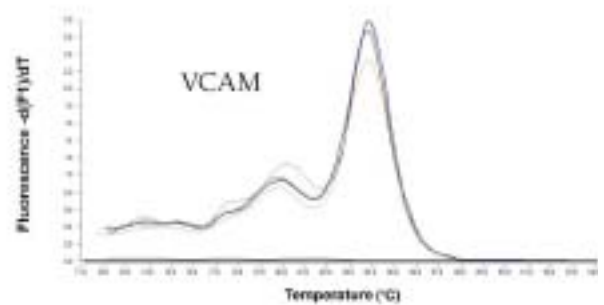
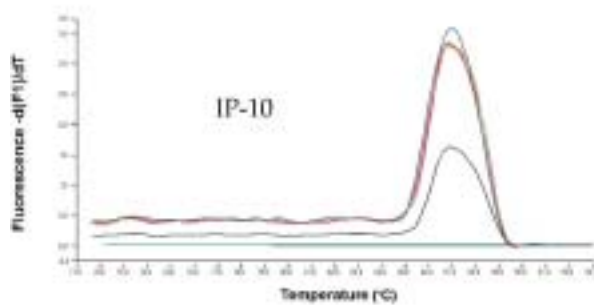
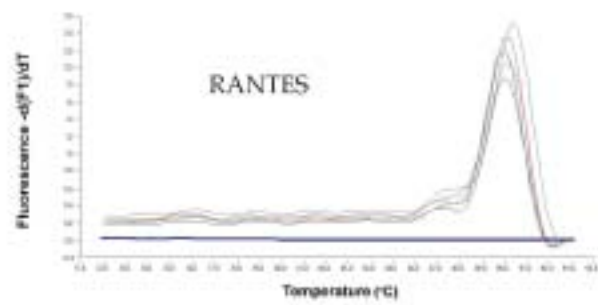
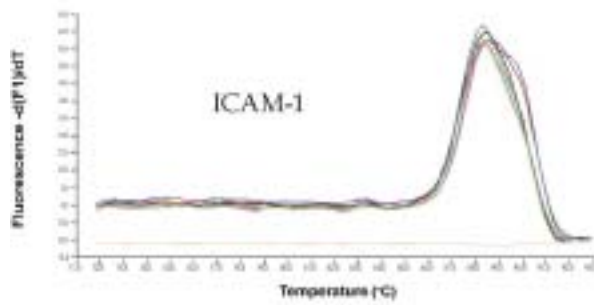
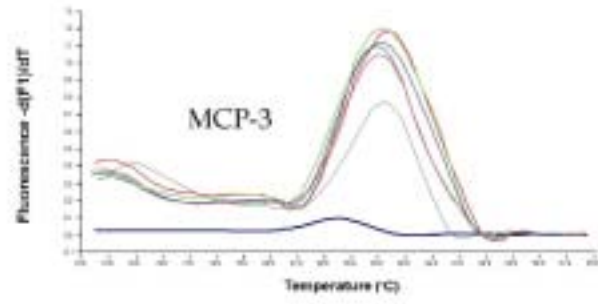
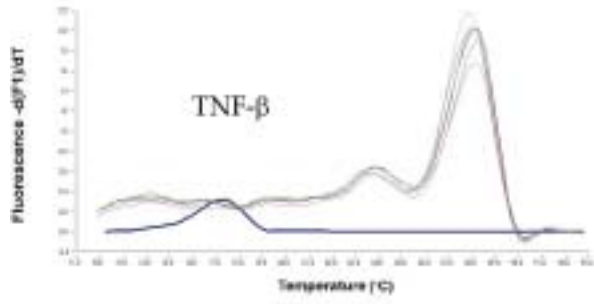
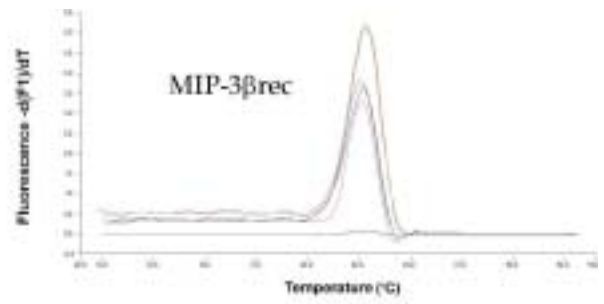
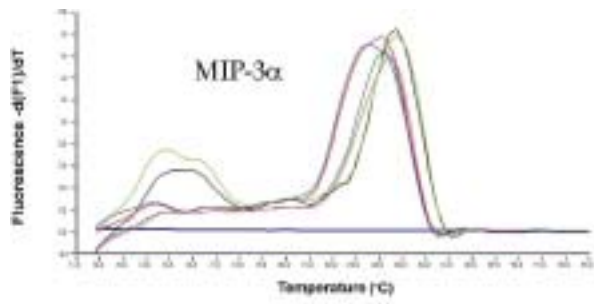
2.1 Corbes de *melting*

Finalment, es presenten les corbes de *melting* de totes les citocines mencionades anteriorment. Tots els productes obtinguts van ser electroforitzats i visualitzats en gels d'agarosa per a determinar la singularitat de la banda i corroborar així la correspondència amb un pic mostrat al software del *LightCycler*. Aquestes fotos no es mostren en aquest compendi.

Resultats







3. Evolució histològica de les soques de ratolí

A títol representatiu, es mostra només l'evolució histològica dels dos ratolins infectats amb la soca UTE0423R durant les 22 setmanes.

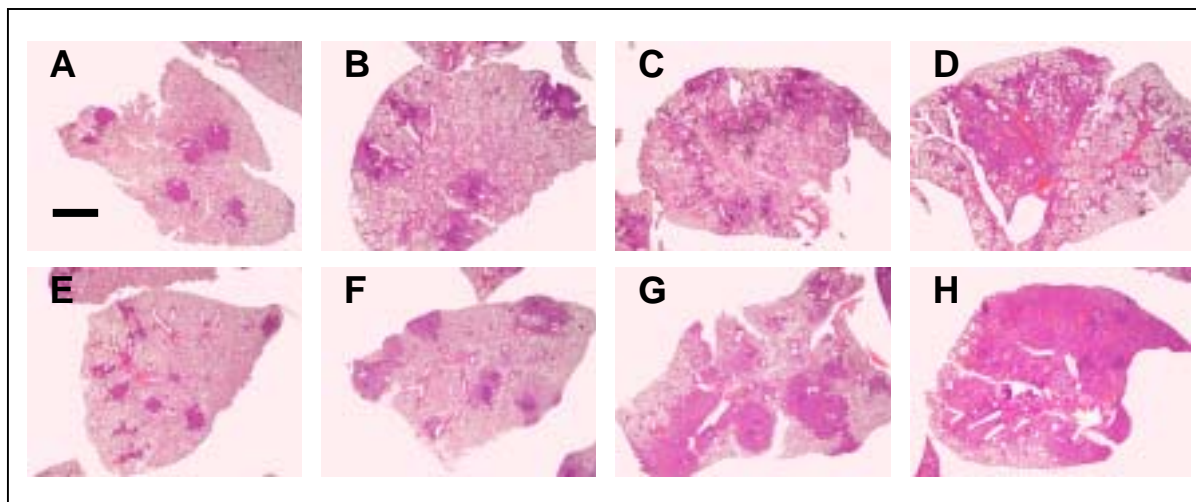


Figura 3. Les fotos de la primera fila (A fins D) corresponen al ratolí C57BL/6 mentre que la fila inferior (E fins H) són ratolins DBA/2 a les setmanes 3 (A i E), 9 (B i F), 18 (C i G), i 22 (D i H) post-infecció. Les fotos es van fer a un augment de 10x i la barra correspon a 500 μ m.

L'evolució histològica trobada ja va ser descrita anteriorment (14,390) als dos ratolins. Inicialment, existeix una acumulació de neutròfils, macròfags i limfòcits donant lloc a una estructura primordial de granuloma durant les primeres setmanes post-infecció. Posteriorment, els granulomes s'estructuren i cap a la setmana 9 les cèl·lules abans esmentades es veuen envoltades de un mantell de limfòcits. A la vegada, alguns macròfags propers i exteriors al granuloma es veuen envoltats també de limfòcits formant petites lesions. De mica en mica, els macròfags escumosos van ocupant els espais entre aquests granulomes dispersos i cap a la setmana 18 existeix una unió compacta de totes aquestes lesions. Cal afegir que els ratolins DBA/2 van mostrar una presència de neutròfils molt més important.

Ara en detall, podem observar l'aspecte dels granulomes dels ratolins C57BL/6 i DBA/2 infectats amb la soca UTE0423R de forma representativa de les altres infeccions.

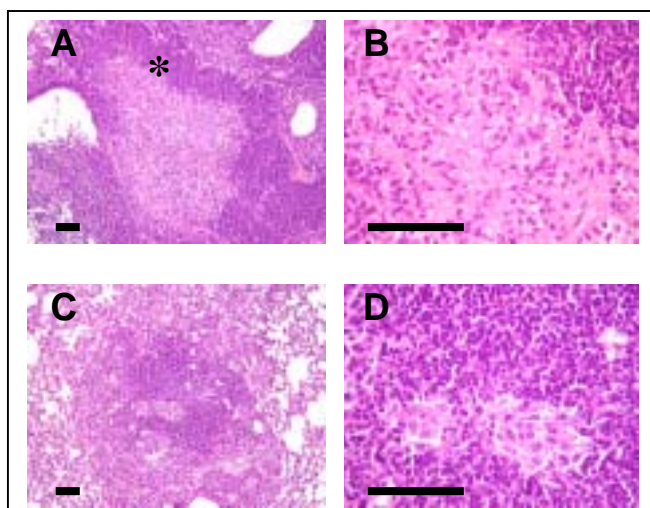


Figura 4. Els pulmons infectats de ratolins C57BL/6 (A i B) i DBA/2 (C i D) a les setmanes 9 post-infecció. Són granulomes primaris amb el centre ple de macròfags infectats i un envolcall de limfòcits. Les fotos B i D són de major augment i mostren necrosi intragranulomatosa (400x). L'asterisc representa la zona amplificada. La barra equival a 100µm.

Cal afegir la importància que té el desenvolupament de la necrosi intragranulomatosa espontània en el ratolí C57BL/6 per part dels aïllats tuberculosos UTE0423R i UTE0335R i amb H37Rv encara que en menor grau en la patogènia tuberculosa. A més, representa un dels factors més grans de similitud amb la histopatologia humana.

4. Evolució histomètrica de les soques de ratolí

A continuació, es mostra l'evolució histomètrica representativa del nivell d'infiltració durant la infecció en els dos ratolins i amb les 3 soques infectades.

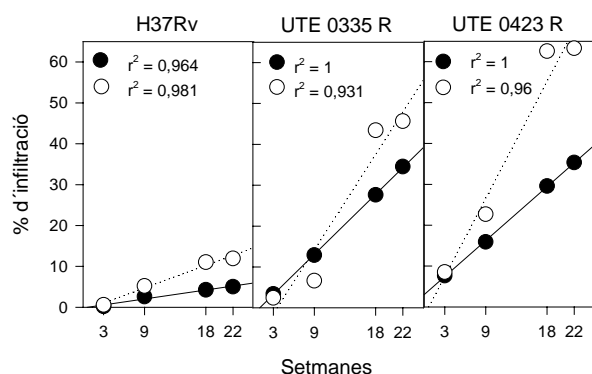


Figura 5. Les dades representades són percentatges calculats dividint l'àrea que representen tots els granulomes per l'àrea total del lòbul i multiplicat per 100. Es van analitzar 2 lòbuls pulmonars per cada ratolí. Els ratolins C57BL/6 venen representats pels cercles negres i els DBA/2 pels blancs.

Aquesta va ser la diferència més notable entre les dues soques de ratolí. La progressió logarítmica de la infiltració pulmonar va ser molt més important en ratolins DBA/2 infectats amb els aïllats tuberculosos que no amb la soca de referència.

5. Estudi immunohistoquímic de les soques de ratolí

Finalment, es mostra l'estudi immunohistoquímic on observem la presència de iNOS i de l'antigen de 38kDa de *M. tuberculosis* en pulmons de ratolins C57BL/6 i DBA/2 infectats amb la soca representativa UTE0423R a la setmana 22.

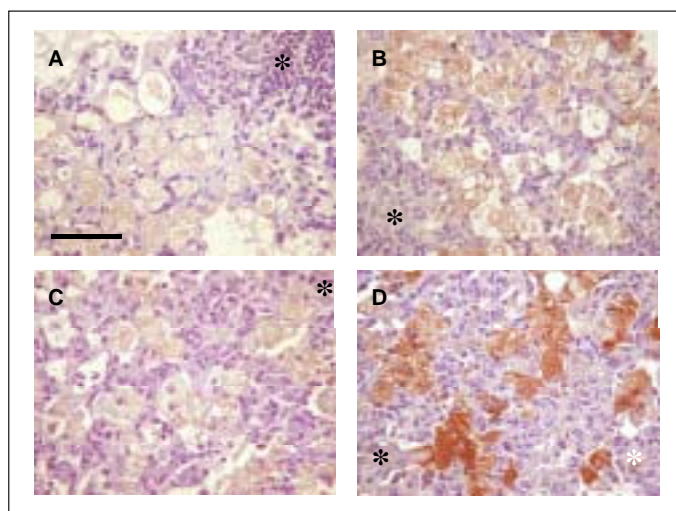
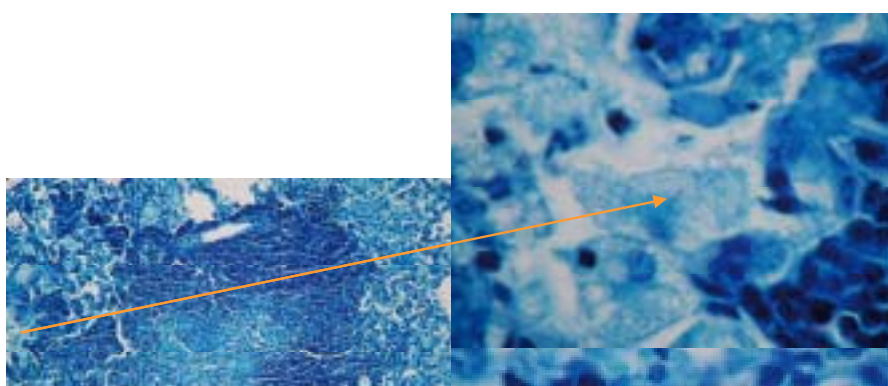


Figura 6. La primera fila correspon a ratolins C57BL/6 (A i B) i la segona fila a DBA/2 (C i D). Podem observar la presència important de iNOS (A i C) i la de 38-kDa *M. tuberculosis cell wall antigen* (B i D). Les fotos es van fer a 400 augments i les barres corresponen a 50µm. Els asteriscs marquen el centre del granuloma

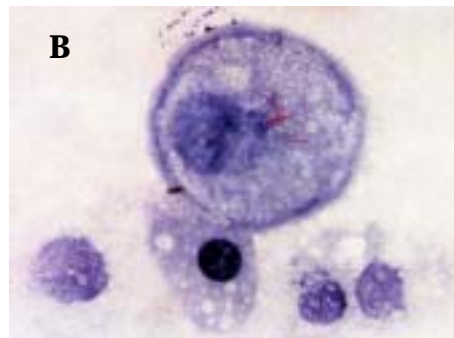
Els resultats mostren una clara localització de la producció de iNOS dins dels macròfags escumosos a la setmana 22. Aquesta és molt més important en ratolins DBA/2 al igual que la presència d'Ag38kDa que podria ser la causa de la producció majoritària de iNOS en macròfags procedents d'aquests ratolins.

A més, podem observar a continuació un exemple de localització externa al granuloma de bacils que han aconseguit escapar-se de l'envolcall que defineix la lesió gràcies al transport dins d'un macròfag alveolar. Aquest fet es va veure molt més sovint a ratolins DBA/2 que en C57BL/6.



A

Figura 7. Aspecte de l'exterior d'un granuloma on podem localitzar bacils dins de macròfags escumosos (A)
Detall d'un macròfag ple de bacils en el BAL d'un ratolí (B)



Igualment, també es poden observar macròfags amb bacils al seu interior en el BAL de ratolins DBA/2 a les setmanes 18 i 22 post-infecció. Aquest fet podria estar relacionat amb el fet que aquests ratolins permetin una disseminació broncògena més important que els ratolins C57BL/6 gràcies als macròfags escumosos infectats

II. ESTUDI DE LA LATÈNCIA *in vitro*

1. Estudi de la supervivència i activitat bacil·lar

Tot seguit podem observar els valors de les UFCs/mL, de l'expressió de 16SrRNA i del marcador d'activitat *fbpB* (corresponent a l'antigen 85B) dels dos experiments paral·lels portats a terme.

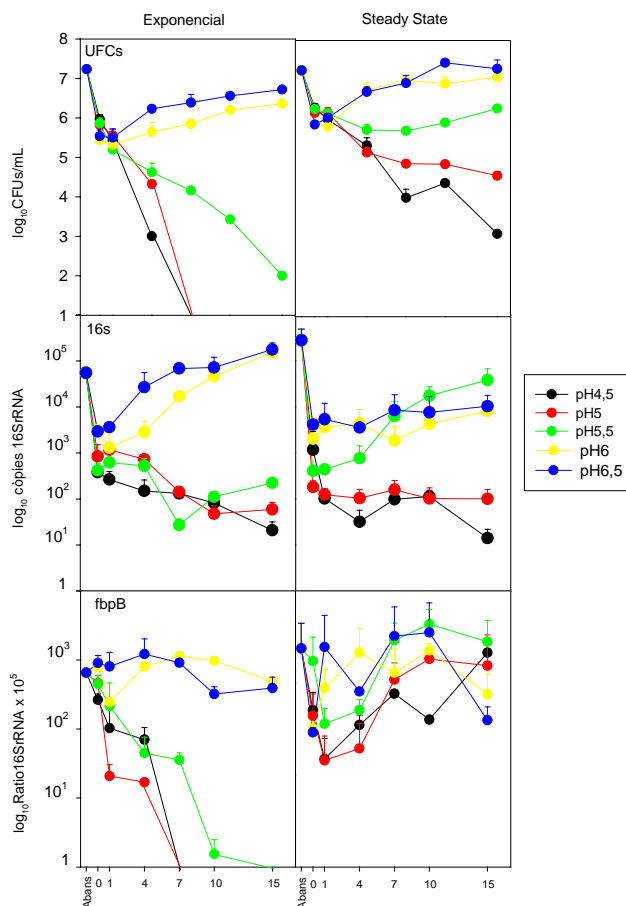


Figura 8. Es mostra la supervivència dels bacils en fase exponencial i estacionària durant l'estudi junt amb l'expressió de 16SrRNA i del gen *fbpB*.

L'activitat del bacil representada per l'expressió de *fbpB* es correspon amb la presència de UFCs/mL. El 16SrRNA marca el perfil del cultiu encara que sembla que hi hagi una variació important quan el cultiu es negativitza que necessita d'una interpretació. Tal com ja s'ha descrit, els cultius sotmesos a pHs més extrems en fase estacionària són capaços de suportar millor aquest factor d'estrès, així com presentar una major activitat. També notem que existeix una diferència molt important entre cultius sotmesos a pH 5,5 i 6 on semblaria que hi hagués un canvi radical d'estratègia de supervivència en fase exponencial.

3. La fase estacionària

En fase exponencial, semblaria que els factors sigma E, F, G i H serien els encarregats de regular l'expressió d'alguns gens necessaris per a la seva supervivència. Aquest perfil es repeteix en la fase estacionària.

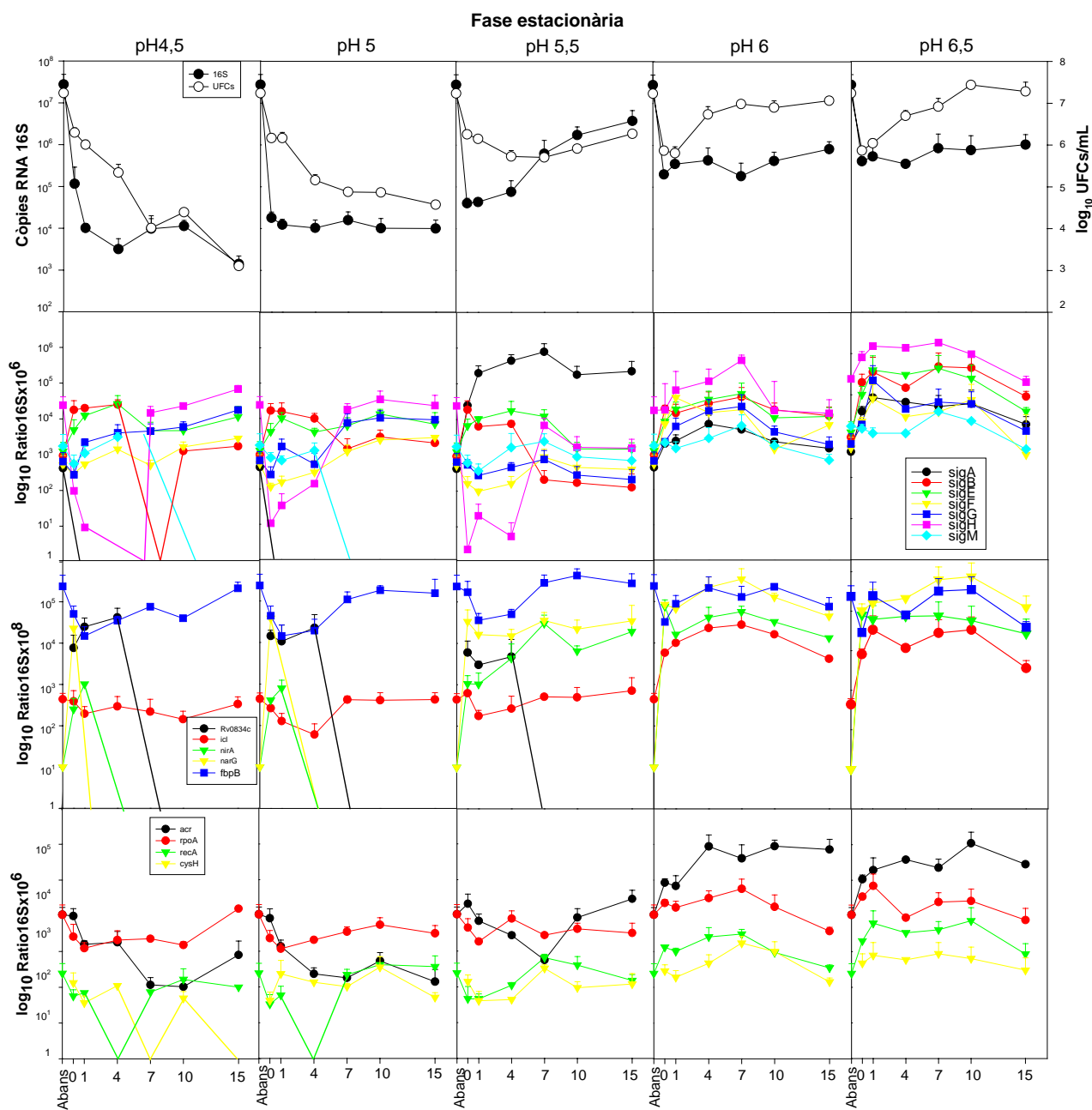


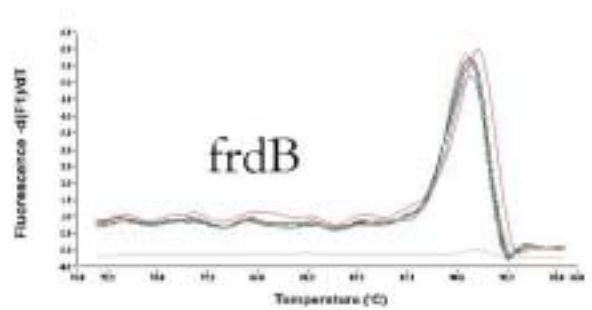
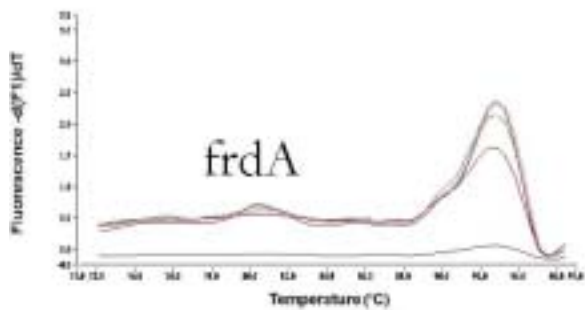
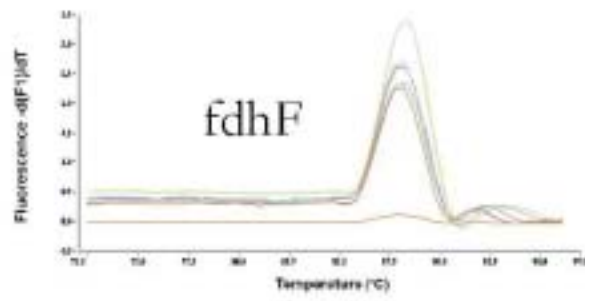
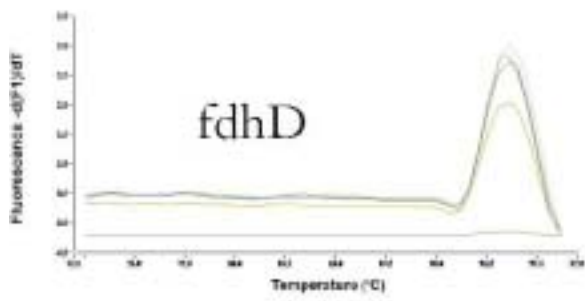
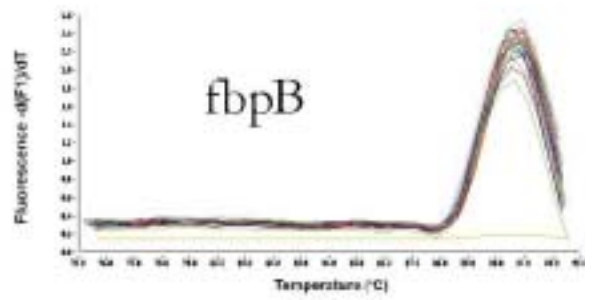
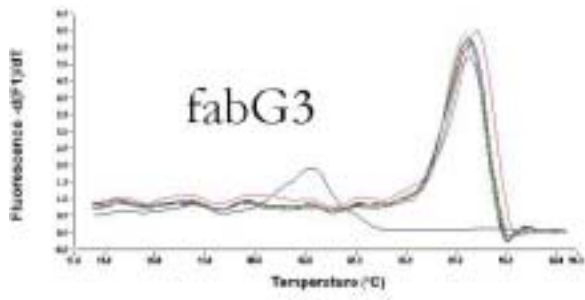
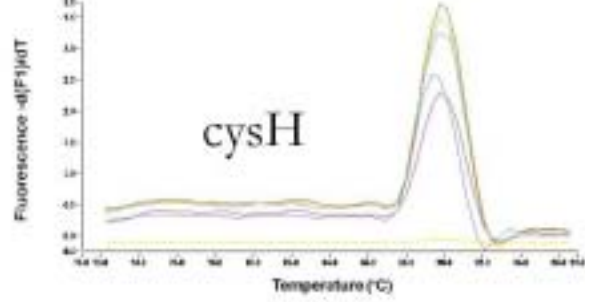
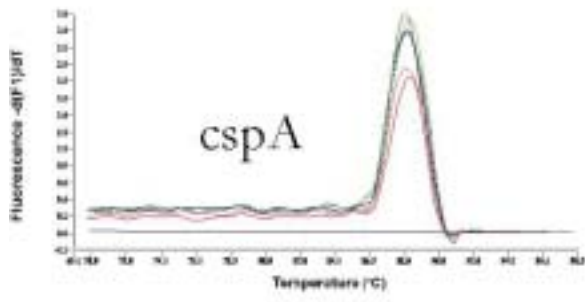
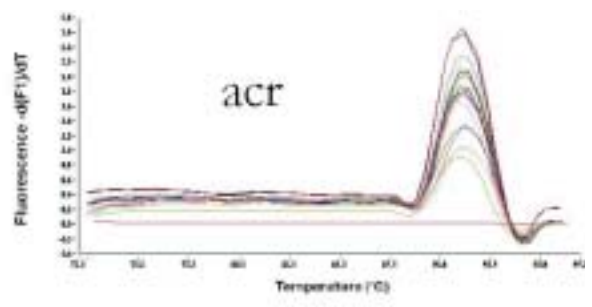
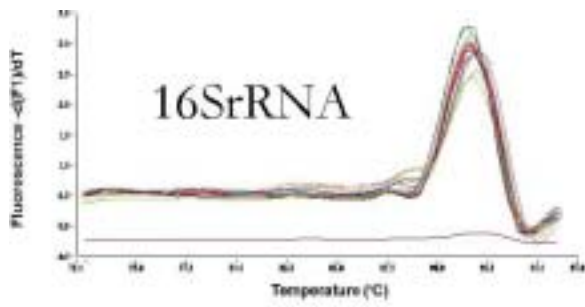
Figura 10. Expressió global dels bacils en cultiu en fase estacionària

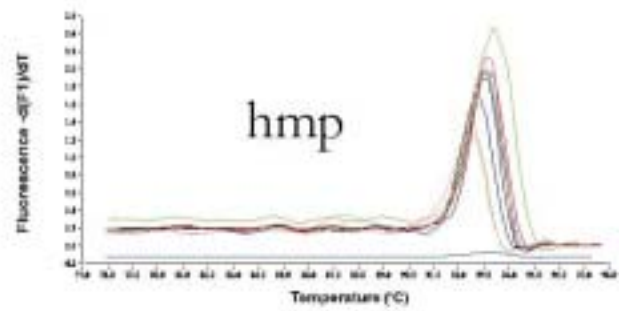
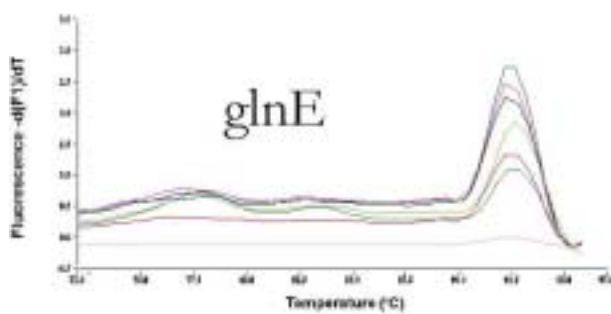
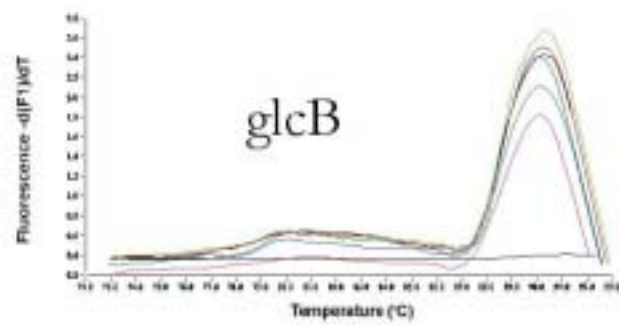
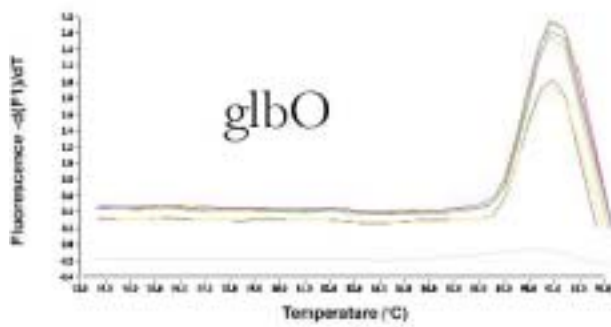
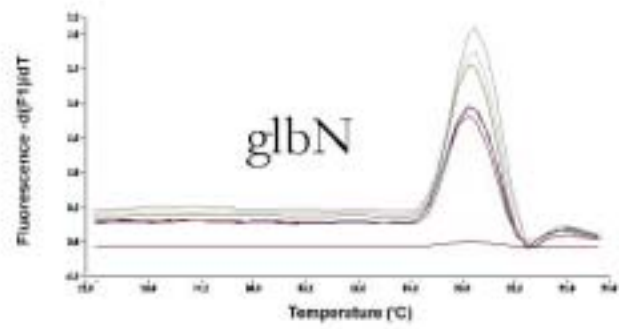
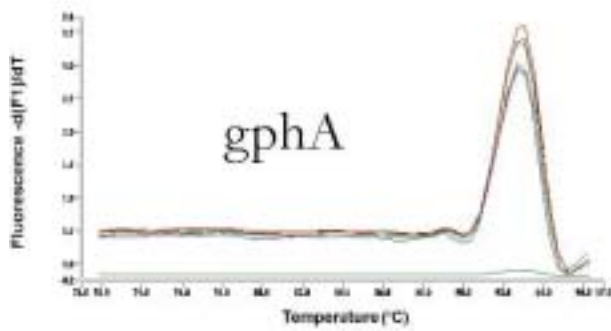
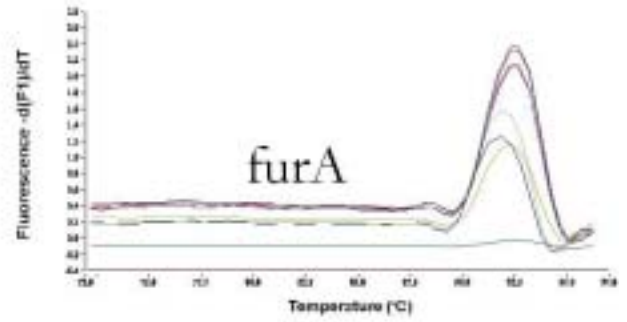
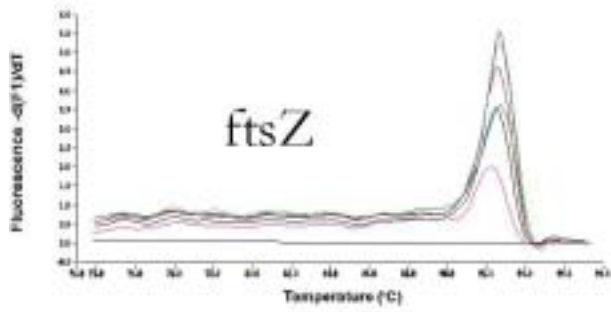
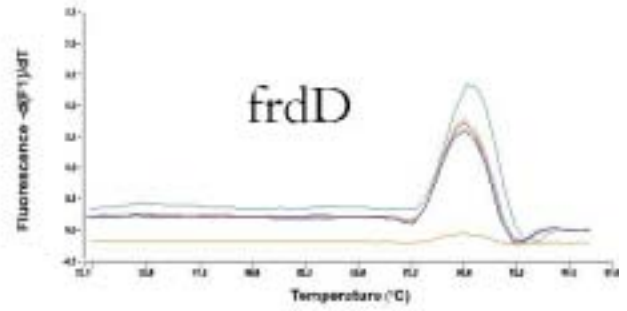
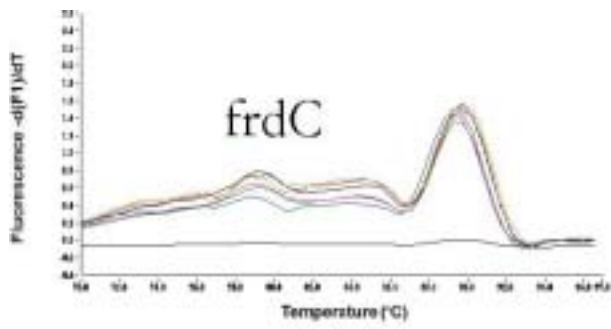
No existeix una resposta a l'àcid per part d'aquests bacils en funció de l'expressió Rv0834c, relacionat amb l'acidificació dels fagosomes. Semblarien incapaçs també de posar en marxa un altre tipus de metabolisme energètic diferents del aeròbic en condicions d'estrès per àcid i finalment cal afegir que la presència de Acr no és gens important en els cultius sotmesos a pHs més baixos, al contrari que passaria en fase estacionària en els mateixos cultiu. El més remarcable de tots aquests marcadors és la persistència dels factors sigma a partir del pH 5,5 quan les UFCs/mL i altres marcadors es negativitzen. També és important la presència de 16SrRNA. Sembla existir un mateix perfil de factors sigma que en fase exponencial per a respondre a l'acidesa. En aquest cas, semblaria que la protecció seria millor ja que es veu involucrat un dels gens més importants en la resposta al xoc àcid, el Rv0834c. Els nivells de *acr* són importants per la supervivència a pHs baixos ja que la seva expressió és important. També podem destacar que l'activitat bacil·lar és molt més important, fet que es demostra per la presència de majors nivells de *fbpB* i la persistència de les UFCs/mL.

4. Corbes de *melting*

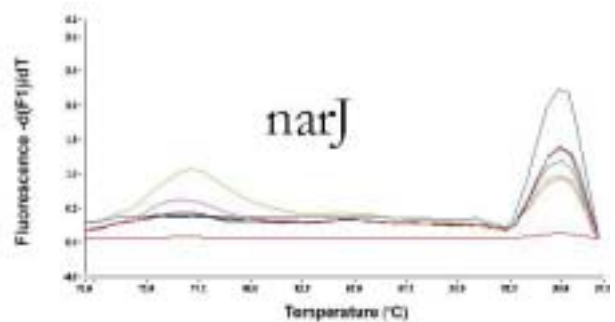
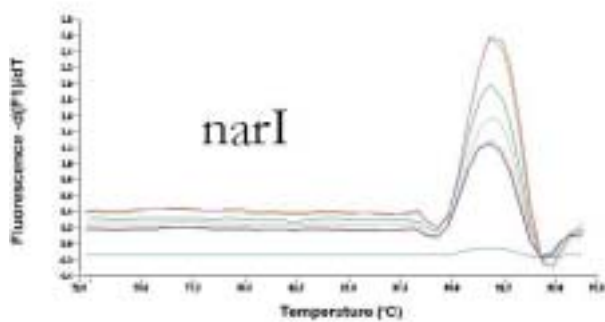
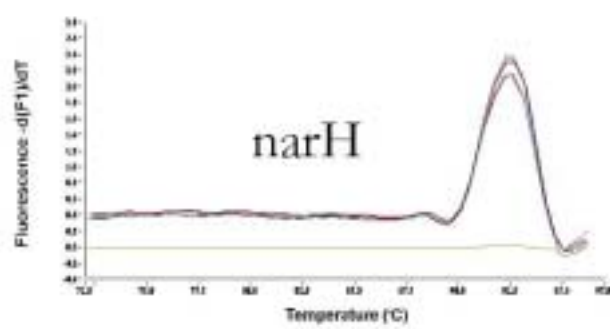
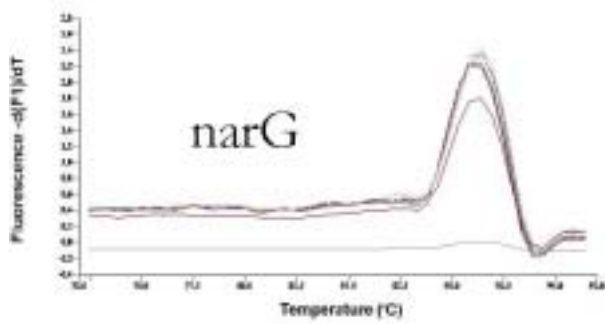
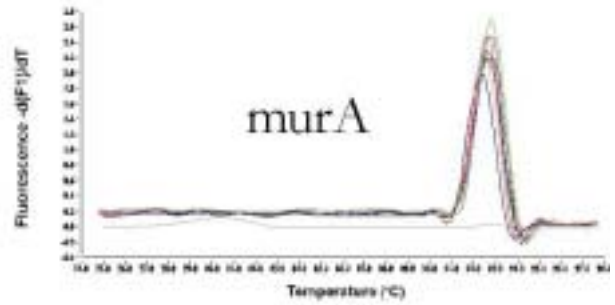
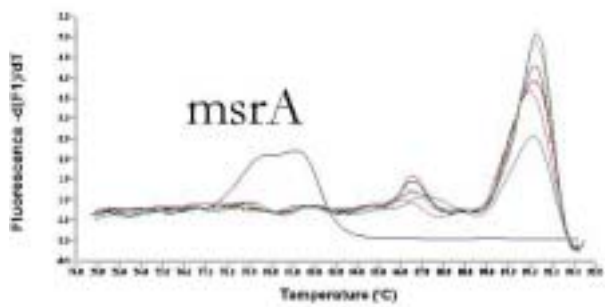
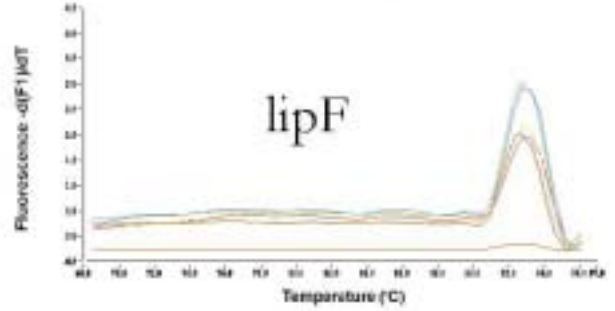
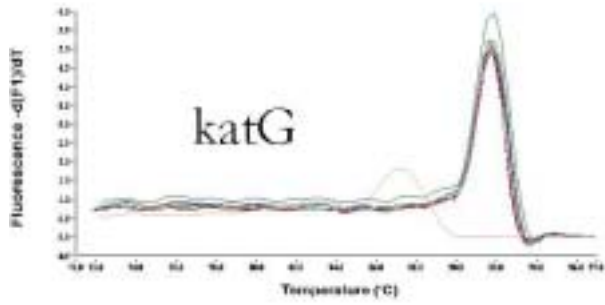
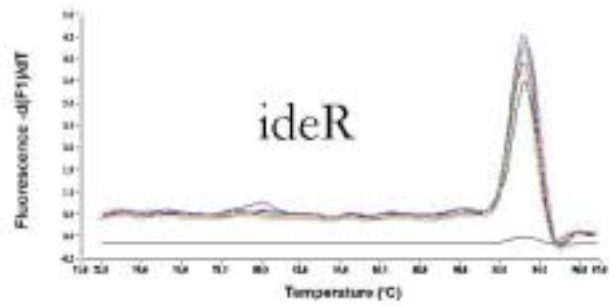
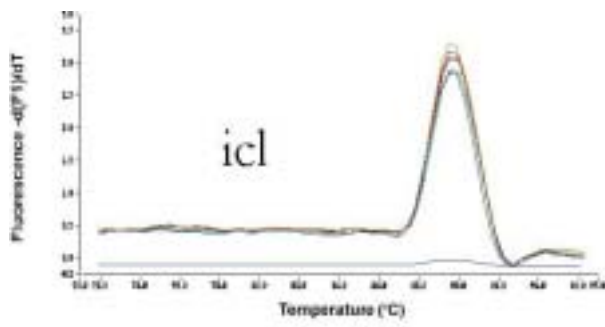
Per acabar amb aquest apartat, es presenten les diferents corbes de *melting* dels gens de *M. tuberculosis* estudiats tant en el model *in vivo* com *in vitro*.

Resultats

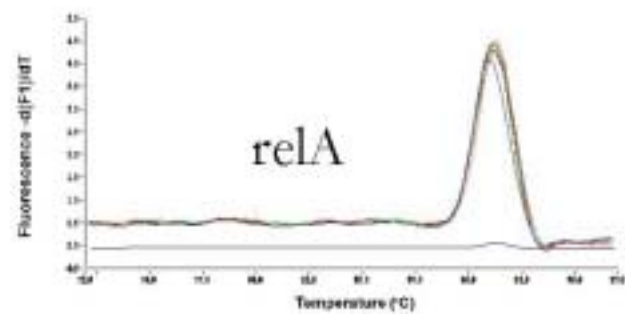
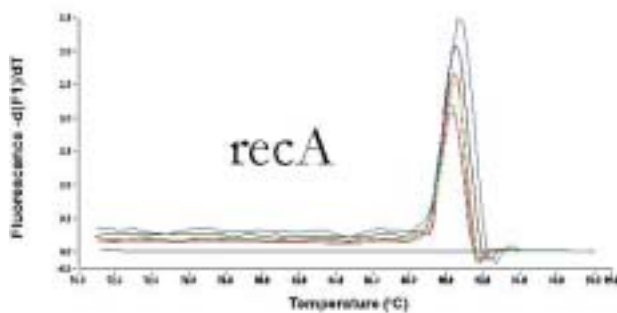
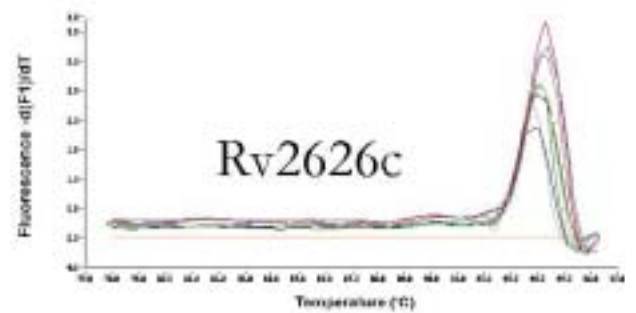
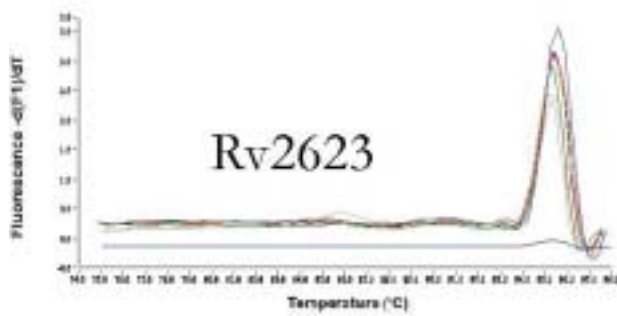
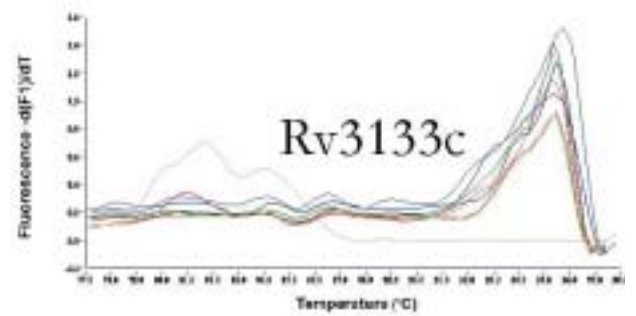
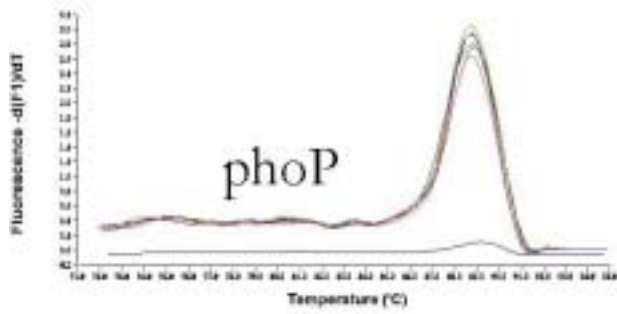
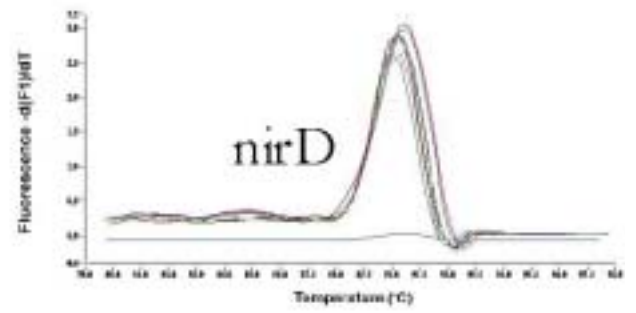
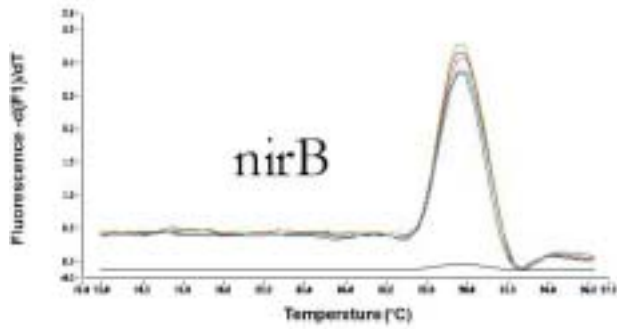
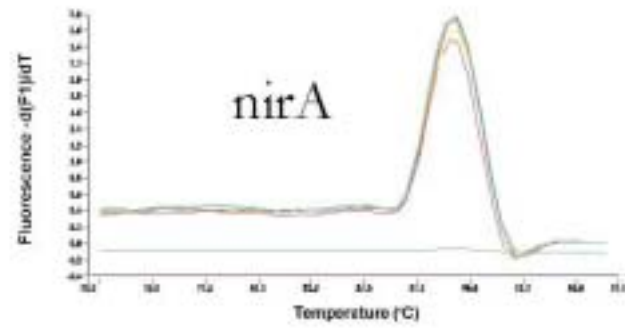
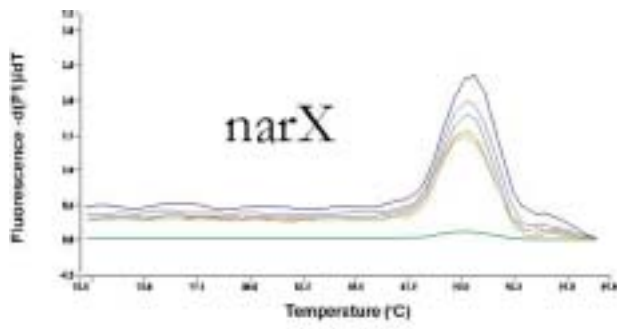


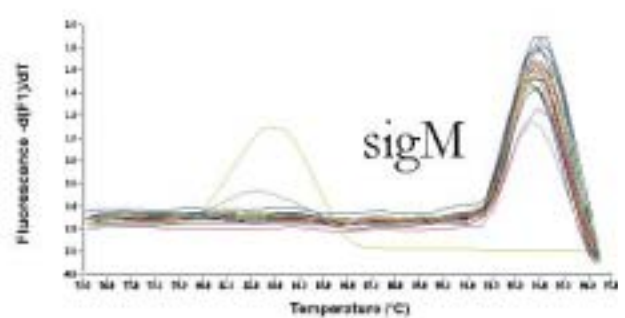
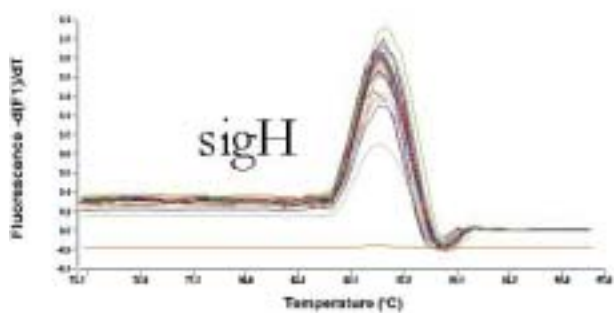
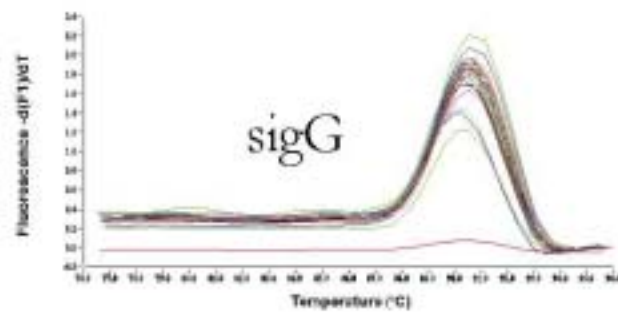
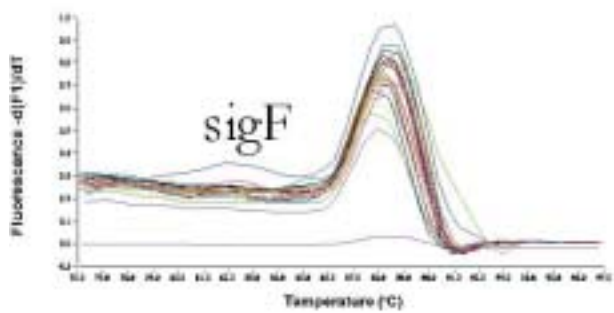
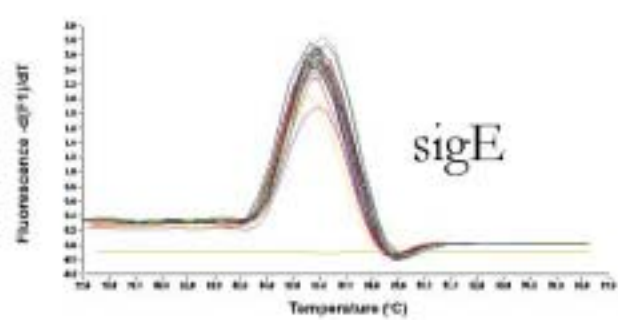
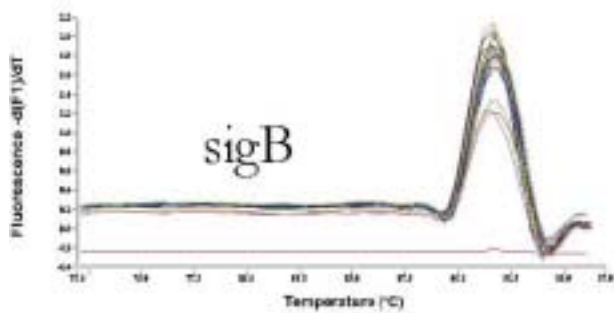
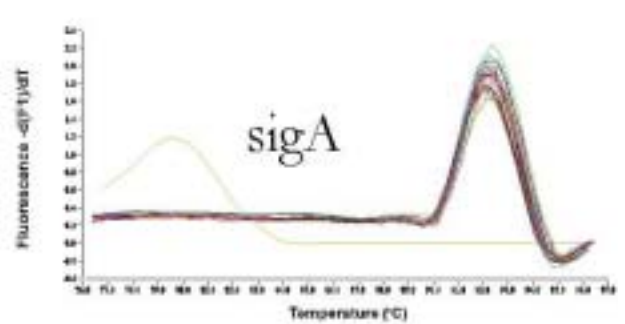
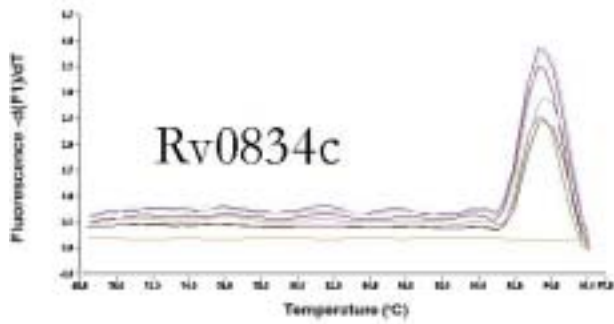
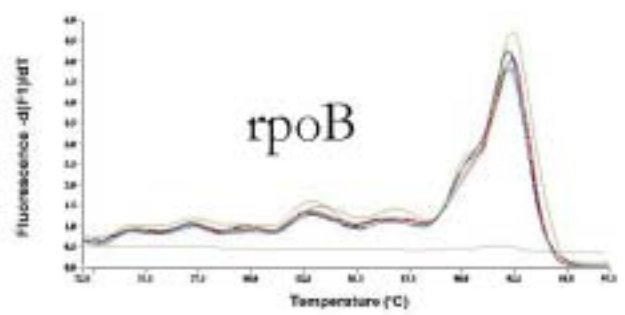
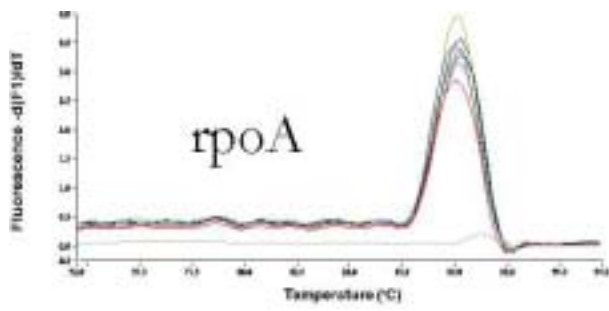


Resultats

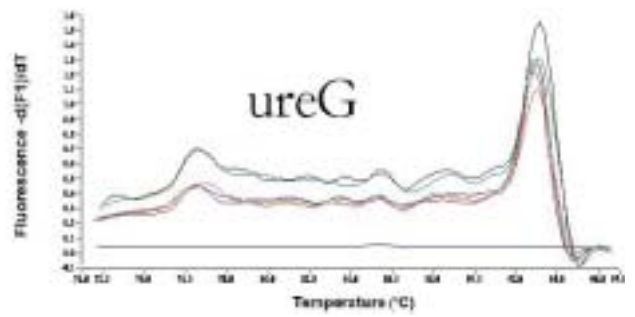
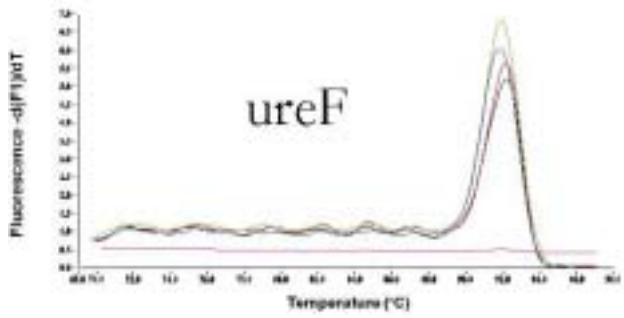
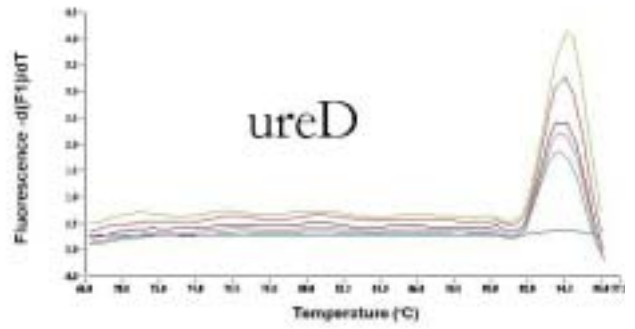
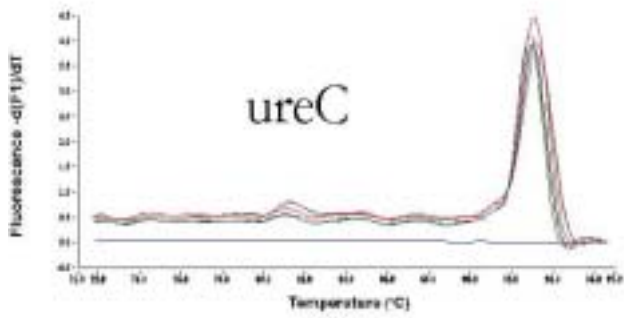
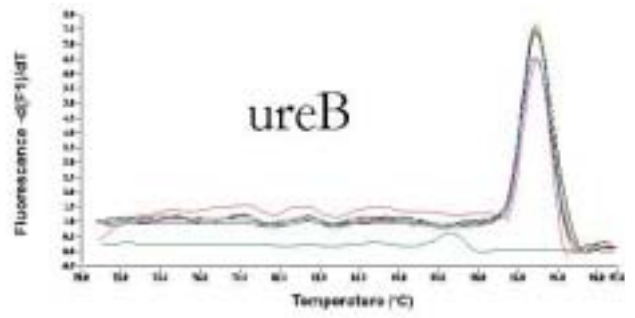
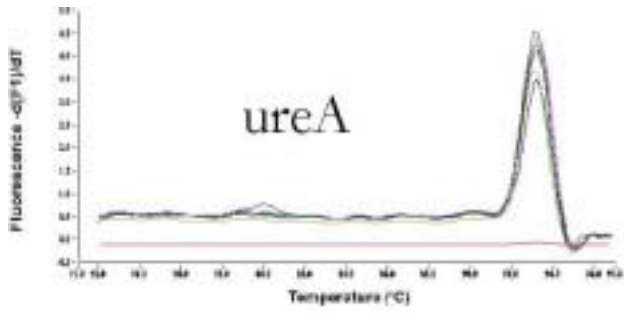


Resultats





Resultats



III. ESTUDI DE LA LATÈNCIA *IN VIVO*

1. La resposta immune i la supervivència bacil·lar

A la següent figura es presenten els valors de les UFCs/mL en pulmó i melsa dels ratolins C57BL/6 durant el procés d'infecció de 22 setmanes.

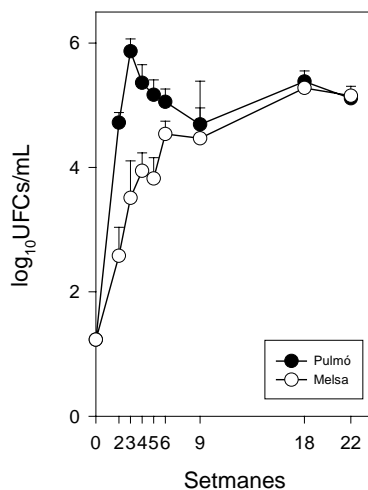


Figura 11. Representació de la supervivència dels bacils durant la infecció en pulmó i melsa

Observem una evolució normal en el procés d'infecció establint-se un pic en càrrega bacil·lar cap a la setmana 3 que és ràpidament controlat per a cronificar-se posteriorment. També ens podem fixar en la bona correlació amb el perfil de l'expressió de 16SrRNA. Posteriorment, podem veure la representació gràfica de la resposta immune on només es presenten els valors més destacats per IFN- γ , RANTES, TNF, i iNOS.

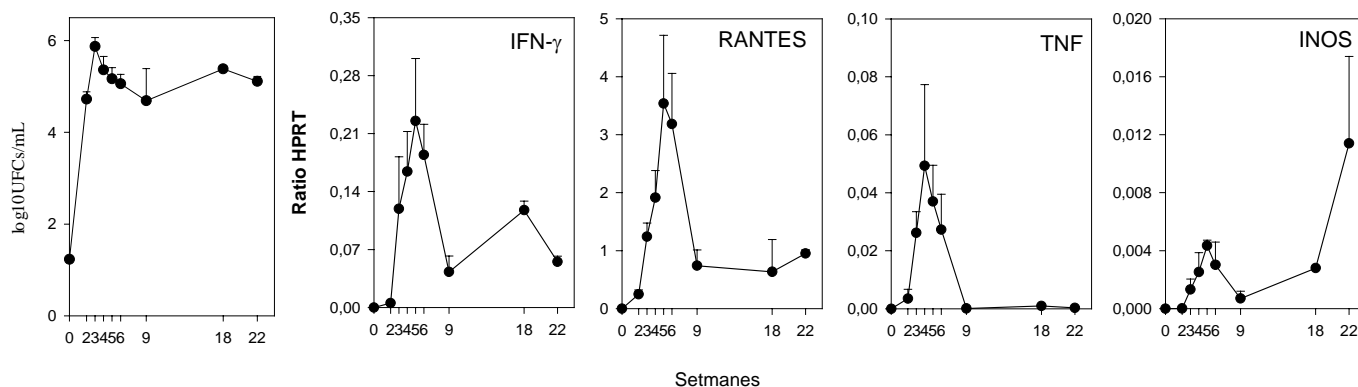


Figura 12. Resposta immune dels ratolins C57Bl/6 durant les 22 setmanes d'infecció. Paral·lelisme amb les UFCs/mL en pulmó

La producció de IFN- γ , RANTES i de TNF segueixen pràcticament la mateixa evolució. De totes maneres, la síntesi de IFN- γ és més sensible al increment de les UFCs/mL.

2. L'expressió bacteriana en el ratolí

Finalment els nivells de mRNA bacteriana obtinguts en teixit per als gens del *fbpB*, *acr*, *icl*, *sigA*, *sigB*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *sigH* i *sigM* durant el període d'infecció.

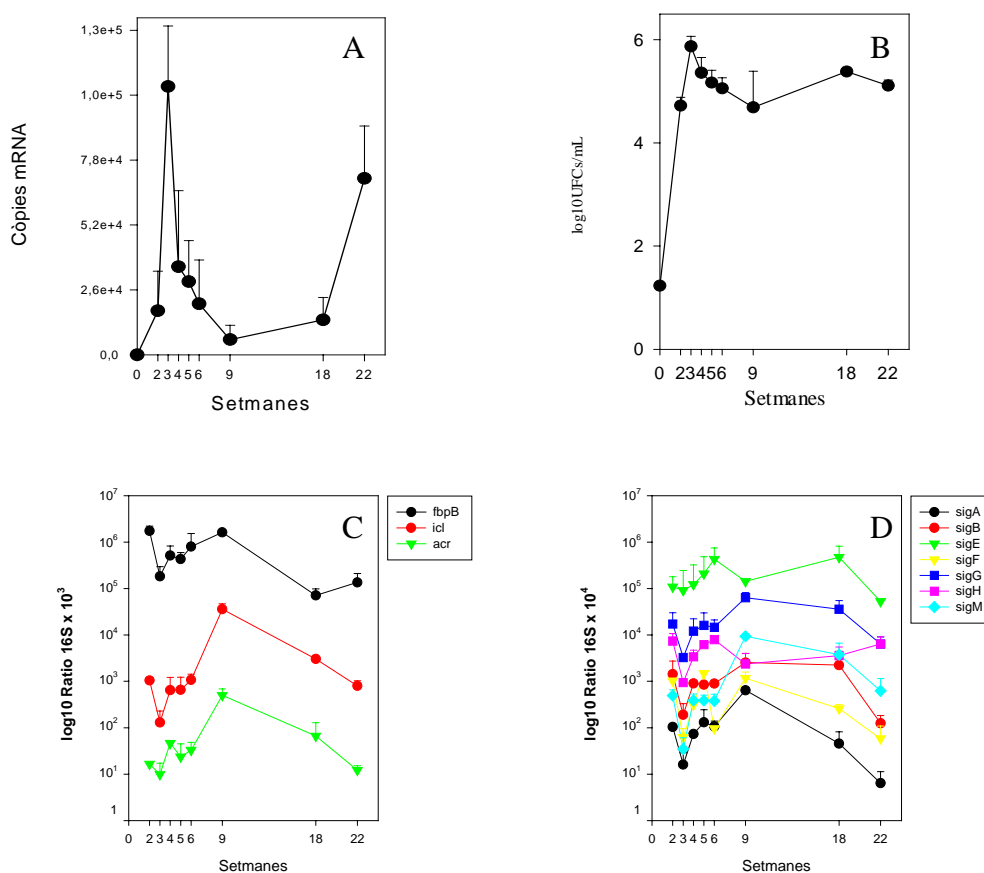


Figura 13. Gràficació de l'expressió del 16SrRNA durant les 22 setmanes (A). Supervivència dels bacils al pulmó durant el procés d'infecció (B). Expressió bacteriana dels marcadors de metabolisme (C) i dels factors sigma (D) durant el procés d'infecció en els teixits dels ratolins

Aquesta gràfica ens presenta un perfil semblant per a tots tres gens. El patró d'expressió del gen *fbpB* respon a una menor activitat per l'establiment de la resposta immune a la setmana 3 i una posterior expressió més o menys crònica fins a la setmana 22. Però ens trobem amb uns valors constantment alts amb una variació dins del rang d'un logaritme. En el cas de *icl*, podem dir que hi ha un pic molt important a la setmana 9 quan

la concentració bacil·lar és la més baixa i el granuloma està perfectament format. Les condicions d'estrès i hipòxia promouen la regulació positiva d'aquest gen necessari en el cicle de Krebs. La regulació de *acr* cauria sota un mateix patró de resposta que *icl* incrementant en fase estacionària. Els factors sigma tenen un comportament molt semblant entre ells i on caldria destacar el *sigH* que seria capaç de mantenir els seus nivells a la setmana 22 a diferència dels altres. Afegir també que *sigE* i *sigG* tenen poques variacions en la seva expressió, mentre que *sigF* i *sigA* experimenten diverses modificacions de la seva expressió.

La supervivència dels ratolins IFN- $\gamma^{-/-}$ va ser de 4 setmanes, la dels ratolins NOS2 $^{-/-}$ va ser de 5 setmanes al igual que la dels ratolins TNF $^{-/-}$; els ratolins TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$ van sobreviure 6 setmanes. Cal recordar que apliquem el protocol de punt final quan els paràmetres determinats a Material i Mètodes, ens indiquen que aquell animal està patint.

Així doncs, l'estudi de les UFCs, determinació de la resposta immune i estudi de la latència dels bacils infectants (*fbpB*, *acr*, *icl*, *sigE*, *sigF* i *sigH*) en aquests animals es va realitzar en un estadi terminal de la seva infecció. En la taula següent es resumeixen tots els valors obtinguts.

Cal destacar la no expressió de *icl* a la setmana 4 i 6 en ratolins IFN- $\gamma^{-/-}$ i TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$, respectivament. Igualment, la regulació negativa de *acr* en tots els ratolins KOs és un fet esperable, excepte en el ratolí IFN- $\gamma^{-/-}$. Curiosament, l'expressió de *sigF* en els ratolins KOs també està reprimida. Cal afegir que el perfil de resposta de *icl* és molt semblant al de *sigF* ja que els seus valors als ratolins TNF $^{-/-}$ i NOS2 $^{-/-}$ són significativament més baixos.

| Resposta Immune de ls ratolins KO i de l WT | | | | | UFCs dels ratolins KO i del WT | | |
|---|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | IFN- γ | RANTES | iNOS | TNF- α | UFCs Pulmó | UFCs Melsa |
| a4 | WT | 4,22 \pm 3,69 | 5,28 \pm 4,67 | 2,40 \pm 2,13 | 3,69 \pm 3,45 | 5,73 \pm 4,47 | 5,60 \pm 4,46 |
| | IFN- γ ^{-/-} | 0 | 4,70 \pm 3,99 | 1,11 \pm 0,83 | 2,28 \pm 2,11 | 5,89 \pm 4,60 | 5,86 \pm 4,48 |
| a5 | WT | 4,35 \pm 3,88 | 5,55 \pm 5,07 | 2,64 \pm 1,59 | 3,57 \pm 3,10 | 5,71 \pm 4,38 | 5,58 \pm 4,53 |
| | TNF- α ^{-/-} | 4,04 \pm 3,58 | 4,39 \pm 4,33 | 4,10 \pm 4,24 | 0 | 5,88 \pm 4,49 | 5,71 \pm 4,13 |
| | iNOS ^{-/-} | 4,85 \pm 4,84 | 5,88 \pm 5,81 | 0 | 4,51 \pm 4,39 | 5,85 \pm 4,46 | 5,85 \pm 4,11 |
| a6 | WT | 4,27 \pm 3,57 | 5,50 \pm 4,94 | 2,48 \pm 2,20 | 3,44 \pm 3,09 | 5,70 \pm 4,32 | 5,66 \pm 4,31 |
| | TCR- α/β ^{-/-} | 2,34 \pm 2,26 | 4,96 \pm 4,85 | 2,38 \pm 2,0 | 2,78 \pm 2,41 | 5,85 \pm 4,07 | 5,83 \pm 3,91 |

| Ratio de l'expressió de mRNA respecte a 16S en ratolins WT i KO | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | | <i>fhpB</i> | <i>icl</i> | <i>acr</i> | <i>sigE</i> | <i>sigF</i> | <i>sigH</i> |
| a4 | WT | 7,71 \pm 7,49 | 4,81 \pm 4,75* | 3,67 \pm 2,74 * | 6,09 \pm 6,30 | 3,49 \pm 2,55* | 4,53 \pm 4,12 |
| | IFN- γ ^{-/-} | 3,22 \pm 3,26 | 0 | 0 | 1,44 \pm 0,94 | 0 | 2,52 \pm 2,00 |
| a5 | WT | 7,63 \pm 7,22 | 4,82 \pm 4,75** | 3,38 \pm 3,33 ** | 6,32 \pm 6,44** | 4,17 \pm 3,30** | 4,79 \pm 3,90 |
| | TNF- α ^{-/-} | 2,32 \pm 2,15 | 0,64 \pm 0,63 | 0 | 0,86 \pm 0,95 | 0 | 2,11 \pm 2,08 |
| | iNOS ^{-/-} | 3,01 \pm 1,60 | 1,57 \pm 1,50 | 0 | 1,87 \pm 1,59 | 0 | 2,95 \pm 2,67 |
| a6 | WT | 7,90 \pm 7,86 | 5,03 \pm 4,54* | 3,52 \pm 3,19 * | 6,63 \pm 6,50* | 2,98 \pm 1,52* | 4,90 \pm 4,10 |
| | TCR- α/β ^{-/-} | 2,08 \pm 1,90 | 0 | 0 | 1,11 \pm 1,05 | 0 | 2,20 \pm 2,11 |

Figura 14. Valors de la resposta immune, supervivencia i expressió bacteriana dels ratolins KO junt amb el control. Es representa el logaritme del valor multiplicat per 10⁵.

DISCUSSIÓ

1. Preàmbul

Aquesta discussió està estructurada en tres parts ben diferenciades. La primera ha de servir per a establir les diferències de susceptibilitat entre dues soques de ratolins. Una primera conclusió ens permetrà triar el model murí adient per al posterior estudi de la latència. A continuació, l'enfoc de l'estudi canvia radicalment per a poder explicar la resposta i adaptació de *M. tuberculosis* en un model *in vitro* sotmès a condicions de pH àcid i posterior estudi en un model murí que pugui reproduir el que succeeix en humans.

2. Estudi de la susceptibilitat de les soques de ratolí davant la infecció per *M. tuberculosis*

Els resultats obtinguts confirmen els treballs anteriors realitzats per altres autors (49,59), la soca DBA/2 és més susceptible a la infecció tuberculosa. La raó pot estar relacionada amb una major disseminació broncògena de bacils transportats per macròfags escumosos.

2.1 Supervivència bacil·lar

A la llum dels resultats, podem fer notar que la major càrrega bacil·lar dels ratolins DBA/2 en pulmons i BAL (Figura 1) correspon a una menor contenció de la infecció en els primers moments, com així ho confirma l'estudi histològic (Figura 3 i 4).

El paper que jugarien els macròfags escumosos en la cronicitat de la infecció semblaria molt més important a l'atribuït en altres estudis. La seva funció seria fagocitar restes cel·lulars conseqüència de la inflamació i treure-les fora de l'estructura del granuloma. Aquests macròfags arribarien als espais alveolars i serien transportats per l'arbre bronquial cap un altre emplaçament. La possibilitat de que aquests macròfags estiguin infectats per algun bacil ja ha estat demostrada prèviament (390)

2.2 Resposta immune

2.2.1 Caracterització de l'expressió de IFN- γ , de RANTES i de ICAM-1.

Una primera hipòtesi per a poder explicar a aquesta situació seria que els bacils són capaços de sobreviure a una activació del macròfag insuficient per IFN- γ o que són resultat de l'alliberació d'un macròfag destruït (Figura 2). A més, superada una activació inicial, la resposta immune sembla relaxar-se degut a la baixada de la càrrega bacil·lar. El problema és que existeixen bacils que han estat capaços de sobreviure a les condicions d'estrès adquirint un estat de latència i no serien reconeguts per la resposta immune ja que aquests no estarien en un creixement actiu no produint antigens secretats i on a més, la composició de la paret pot haver canviat per l'acumulació de la proteïna de 16kDa a la paret cel·lular (143).

Aquesta disseminació cap a espais alveolars, superant la càpsula fibrosa de contenció, porta al bacil a un nou escenari on la resposta immune no és tan eficient i on potser no té cap actuació encara. Això faria que el bacil tornés a créixer i fos capaç de desenvolupar una nova lesió i un nou focus infectiu. Aquest fet ve reforçat per la demostració del creixement bacil·lar al interior de macròfags escumosos als espais

intraalveolars que envolten els granulomes i pel increment constant de la infiltració en el temps.

Aquest procés és molt més important en ratolins DBA/2 on la baixa producció de IFN- γ podria portar a una activació insuficient dels macròfags on a més s'afegeixen altres factors notables com les baixes expressions de RANTES i ICAM-1. IFN- γ és produït pels limfòcits T i cèl·lules NK. Principalment, és l'activador dels macròfags i nivells elevats de IFN- γ es relacionen amb una resposta efectiva contra patògens intracel·lulars (391). Els nivells de IFN- γ en ratolins C57BL/6 són més alts durant tot el procés d'infecció. Estudis anteriors conflueixen en la importància d'aquesta citocina com a l'eix principal de la resposta efectiva contra *M. tuberculosis*. Aquest fet està en concordança amb els nivells de UFCs trobats que ens indiquen que el ratolí C57BL/6 és capaç de controlar millor la infecció mantenint uns nivells més baixos de UFCs.

Per una altra part, RANTES és primordial per l'atracció dels primers limfòcits capaços de muntar una resposta específica de tipus Th1 i per la formació inicial dels granulomes (45). RANTES és una quimiocina atractora i activadora de monocits, cèl·lules T, basòfils, eosinòfils, cèl·lules dendrítiques en resposta a processos inflamatoris. L'expressió de RANTES ve estimulada per la presència de IFN- γ , LAM, IL-1 i peròxid de hidrogen. Aquest patró de resposta és bàsic pel tipus d'ambient Th1 presentat en ratolins C57BL/6. És normal trobar uns nivells molt més alts d'aquesta quimiocina ja que és una peça clau per la destrucció del bacil.

Complementàriament, la producció de ICAM-1 està relacionada amb la localització de limfòcits als focus d'inflamació i infecció. Recentment, un estudi de Turner *et al* ha demostrat la seva importància per al control de la reactivació de la infecció crònica (59).

Aquesta molècula d'adhesió intercel·lular s'uneix a la integrina LFA-1 de la cèl·lula T. S'expressa en cèl·lules endotelials i en APCs. Així doncs la seva funció principal seria la de facilitar l'atracció dels limfòcits T al fons infectiu. A més, permet la unió de les APCs amb els limfòcits, sobretot T *naïve*, permetent la presentació d'antigen. Cal destacar uns nivells més sostinguts i importants en els ratolins C57BL/6 que no pas en DBA/2.

2.2.2 Caracterització de l'expressió de quimiocines

En un altre sentit, es va trobar una major expressió de MCP-3 i de MIP-2 als ratolins DBA/2 que possiblement estiguin relacionades amb l'arribada més important al focus infectiu de monocits i neutròfils, respectivament, provocant un augment de l'àrea infiltrada i la disseminació broncògena del bacil. MCP-3 és important en l'atracció de

monocits, cèl·lules T activades, NK i dendrítiques produïda pels monocits en resposta al LAM i a la producció de IFN- γ i de TNF, mentre que MIP-2 és bàsicament un potent atractor de neutròfils mediat per cèl·lules T. Això explicaria una infiltració major de neutròfils degut a una més important càrrega bacil·lar. Posteriorment, i a mesura que avança la infecció en aquests ratolins, tornem a observar un augment cap a les setmanes 18 i 22 per l'augment de l'espai ocupat que finalment serà la causa de la seva mort.

2.2.3 Caracterització de l'expressió de iNOS

En el ratolí C57BL/6 hi ha inicialment una major acumulació de macròfags a les lesions primàries, que probablement suposa una major contenció inicial de la infecció (Figura 5). Una de les explicacions per les que els ratolins DBA/2 són més susceptibles és que podrien fallar a l'hora de controlar la càrrega bacil·lar, seria que aquests macròfags escumosos al voltant i dins de la lesió produirien una gran quantitat de NO. S'ha demostrat que aquesta molècula és capaç de inhibir la resposta a la presentació d'antigen influïent en la desfosforil·lació de les quinases de les cèl·lules T (392). A més, la producció significativament més important de iNOS a les setmanes 18 i 22 per part dels ratolins DBA/2 que pot venir estimulada per la presència de IFN- γ , TNF, LAM o la lipoproteïna de 19kDa (393), on no sembla que la producció de IFN- γ i de TNF sigui la causa d'aquest augment, ja que no existeixen diferències significatives entre les dues soques de ratolí en aquelles setmanes.

Així que l'explicació més evident per a aquest increment significatiu a les setmanes 18 i 22 en ratolins DBA/2 és la ingesta de components cel·lulars o de bacils sencers per part dels macròfags, que posteriorment esdevenen escumosos a l'exterior del granuloma (Figura 6 i 7). Això podria suposar un gran avantatge pel ratolí DBA/2 en relació a la destrucció bacil·lar ja que el NO sembla ser un dels principals agents de destrucció intrafagosomal. Res més lluny de la veritat, ja que sembla causar només un efecte bacteriostàtic (394).

2.2.4 Caracterització de l'expressió de TNF

El TNF es produït principalment pels macròfags en resposta a diferents estímuls d'inflamació. A més, s'encarrega de la modulació del creixement cel·lular i la regulació de la resposta immune. Els nivells de TNF són equiparables en les dues soques i no trobem cap diferència significativa. És important destacar que els nivells es mantenen, fet que fa pensar en una resposta adient més o menys intensa en tots dos tipus de ratolins. Aquesta citocina

afavoreix la formació del granuloma i fa sinèrgia cap a una resposta de tipus Th1 amb el IFN- γ .

2.2.5 Desenvolupament de necrosi intragranulomatosa

Remarcadament, cal destacar el desenvolupament de necrosi intragranulomatosa en els ratolins C57BL/6 infectats amb les soques UTE0335R i UTE0423R. En ratolins DBA/2 no va existir aquesta necrosi en cap cas. Cal recordar que no s'ha descrit que el ratolí desenvolupi necrosi intragranulomatosa i que és una de les limitacions potencials d'aquest model. El nostre grup va desenvolupar un model basat en la reacció de Schwartzman i on els components de la paret cel·lular bacil·lar, com el LAM, serien la causa d'aquesta necrosi intragranulomatosa relacionada amb la resposta innata (395).

2.2.6 Interpretació de la susceptibilitat i la latència

Reunint tots els resultats obtinguts en una idea, podem dir que una resposta protectora específica basada en la producció de IFN- γ per part de cèl·lules T capaces d'activar als macròfags és la base per al control de la infecció. A més, la presència important de RANTES i ICAM-1 recolzaria aquesta resposta de tipus Th1, resultant en concentracions més baixes als pulmons als ratolins C57BL/6. En canvi, els ratolins DBA/2, amb una resposta de tipus Th1 clarament menor, presenten una concentració bacil·lar més important amb una estructura granulomatosa no tan ben definida i sense un control clar de la patologia pulmonar que sembla que s'escampi sense límit per tot l'espai pulmonar.

A la llum d'aquests resultats i idees, és evident que la soca de ratolí C57BL/6 és la més adequada per a l'estudi de la latència ja que és potser la que millor reproduceix les condicions d'infecció humanes. Com a fet molt important, cal dir que ha estat l'única soca de ratolí que ha desenvolupat necrosi intragranulomatosa a les seves lesions com succeeix en els granulomes humans de forma espontània. A més, cal afegir que la soca H37Rv Pasteur ha estat la soca triada per a desenvolupar l'estudi de latència *in vivo* perquè també provoca necrosi intragranulomatosa. En aquest cas ens trobem davant d'una molt bona aproximació a les condicions humanes, encara que no existeixi cavitació i que l'animal finalment mori per ocupació de l'espai pulmonar.

El model per aerosol amb dosi baixa (20-50 bacils) fet servir en aquest estudi és potser el millor que mimetitzava les condicions que es desenvolupen en humans. La dosi

infectiva és totalment reproduïble i és molt més realista que no en el model intravenós. Una infecció inicial és continguda per la resposta immune específica permetent a una població bacil·lar gran romandre als pulmons d'una forma persistent. Aquesta població és important ($\approx 10^5$ - 10^6 bacils) s'estableix d'una forma crònica durant molts mesos als pulmons. Potser caldria remarcar que als humans el nivell de tolerància a la infecció és molt menor desenvolupant menors respostes inflamatòries i generant més bacils latents que en el cas del ratolí, on en realitat es desenvolupa una infecció crònica amb cicles constants de control i reactivació bacil·lar (326,396).

Representa un bon model ja que el ratolí és capaç de reproduir la contenció inicial d'una infecció, però no eliminar-la definitivament permetent a una població en estat de *plateau* romandre a les lesions granulomatoses (211,397,398,399,400).

3. Estudi de la latència

En aquest apartat tractarem primerament el model *in vitro* i després el model *in vivo*.

3.1 Estudi de l'acidificació en el model *in vitro*

La raó d'aquest model *in vitro* radica en l'estudi de *M. tuberculosis* exposat a diferents graus de pH àcids en diferents estats de creixement. Així que vam fer créixer el mateix cultiu fins a fase exponencial i fins a fase estacionària sotmetent-los a pHs àcids i estudiant la seva supervivència, resposta i adaptació al nou medi àcid. Aquest model podria correspondre a diferents fases d'infecció *in vivo* com serien les de una fase inicial on encara no s'ha establert una resposta immune específica (fase exponencial) i una fase crònica on el bacil persisteix en els teixits de forma invisible a la resposta immune, però en condicions d'estrès (fase estacionària).

3.1.1 Comportament de *M. tuberculosis* davant del pH àcid

En un medi amb pH àcid, les micobactèries s'exposen a un excés de H^+ però també a un excés o una falta de ions com ara el Fe^{2+} , Al^{3+} o Ca^{2+} . Potser cal recordar que el pH és la forma de descriure la concentració de H^+ i que cada unitat de pH representa un logaritme en la concentració de H^+ . També és interessant parlar d'una característica present a alguns procariotes com *Salmonella enteric serovar* Typhimurium, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, l'habitució a l'àcid o com més es coneix, *adaptive acid tolerance response*, (401). Bàsicament, parlem d'ATR quan uns bacteris que creixen o són exposats durant curt temps a medi moderadament àcid desenvolupen una resistència al pH àcid més extrem. Aquest fet es repeteix quan bacteris en fase estacionària són sotmesos a un pH àcid, fet que s'ha observat en els nostres estudis. Fins i tot, s'han descrit dos sistemes ATR en *Salmonella enteric serovar* Typhimurium, un efectiu en fase exponencial i un altre per la fase estacionària (402,403). Aquest tipus d'adaptació no s'ha pogut demostrar en *M. smegmatis* en una estratègia semblant a la del treball de Foster *et al* segurament degut a la gran facilitat que té aquesta micobactèria de créixer en un rang ampli de pH, des de 3,5 i 9,5 (404).

Resumidament, la importància del pH àcid com a agent d'estrès és gran i la seva importància en la destrucció bacil·lar cal tenir-la molt en compte (405). Després de l'acció dels RNIs, el pH és el següent factor d'estrès en importància. Encara que s'hagi demostrat que aquest bacil és capaç d'inhibir la fusió del fagosoma i del lisosoma i altres estratègies per afrontar l'acidesa, existeix una acidificació parcial del fagosoma (230) entre 6,1 i 6,5

davant de la qual el bacil haurà de respondre i suportar durant llarg temps. El que està clar és que l'actuació directa per part del bacil viable és necessària per a aquesta defensa davant del mecanisme microbicida i que aquesta estratègia afavoreix un estat de persistència. No cal oblidar que aquest procés és dinàmic ja que el macròfag té una vida mitjana de 120 dies aproximadament.

Existeix molta divergència d'opinió sobre aquest tema degut a que el pH és realment molt àcid (<5,5), hi ha una baixa disponibilitat d'oxigen i per la presència d'àcids grassos tòxics per la micobactèria. Aquest estudi intenta respondre a la situació en la que trobem al bacil davant de les condicions abans esmentades. Recentment, un estudi ha demostrat que el pH dins del fagosoma d'un macròfag activat és de 4,5. Aquest valor és realment baix i s'ajusta al nostre estudi. Això podria significar que la destrucció bacil·lar per mecanismes relacionats amb l'acidificació són molt més importants del que es pensava (31).

3.1.2 Susceptibilitat de *M. tuberculosis* davant del pH àcid

Sembla clar que *M. tuberculosis* té una susceptibilitat al pH baix, fins i tot amb àcids febles (256) realment important quan la comparem amb altres micobactèries, normalment de creixement ràpid. Això s'ha associat a una incapacitat de mantenir la homeostasi al interior de la micobactèria probablement relacionada amb la permeabilitat de la paret cel·lular. Cal dir que s'ha arribat a descriure inhibició del creixement en condicions de pH 6 en medi de Sauton (406) que per una altra banda es recuperava si el medi era suplementat amb una concentració de 100µM de Ca²⁺, d'aquí la importància esmentada abans de la influència d'alguns ions a pHs àcids. La concentració de Ca²⁺ dins del fagosoma seria realment baixa i contribuiria a la inhibició del creixement a un pH moderadament àcid (407).

El pH al qual s'ha d'afrontar el bacil tuberculós dins d'un macròfag varia ràpidament en funció de l'activació d'aquest per part de les citocines corresponents. El pH d'un fagosoma en repòs està al voltant de 7. Quan aquest és infectat, el pH cau una mica per sota de 6 en 30 minuts. Si no és activat amb citocines, es manté aquesta acidesa en el temps fins i tot pujant a 6,5. Si existeix una activació del macròfag, el pH cau lleugerament per sota de 6 els primers 120 minuts, per posteriorment caure a valors pròxims a 5. Cal dir que si el bacil no és viable, el pH cau ràpidament per sota de 5,5 o més (258,303,408).

Existeixen uns estudis ja clàssics on s'estudia la resposta i supervivència de diferents soques micobacterianes a diferents graus de pH en medis complexos. L'estudi de Portaels

l'any 1982 va definir la susceptibilitat de 16 espècies micobacterianes al creixement en medi àcid. La seva conclusió és que les micobactèries de creixement lent limiten la seva supervivència a pHs de 5,8 i 6,4. En canvi, les de creixement ràpid són capaces de créixer sota un ventall ampli de pH de 2 unitats. *M. tuberculosis* és capaç de créixer òptimament fins a un pH de 5,8 en medi Dubos. En aquesta mateixa línia, no cal oblidar els treballs de Chapman i Bernard que van classificar més de 56 aïllats micobacterians en funció de la seva tolerància al pH en medi Dubos. A diferència de l'estudi descrit anteriorment, *M. tuberculosis* sembla créixer òptimament entre 6,2 i 7,3 amb un límit de creixement per pH àcid a 5 (404).

3.1.3 La fase exponencial

En el nostre estudi, observem unes diferències molt importants de comportament i de supervivència no només en funció del pH, sinó també en funció de la fase en la que es trobava el cultiu quan el vam inocular en el medi acidificat.

En referència als cultius provinents de fase exponencial (Figura 8), podem dir que van tenir un creixement òptim al voltant de 6 i que no van ser capaços de superar el setè dia a pH 4,5 i pH 5. Cal destacar la davallada de més de dos logaritmes en els pHs 4,5/5/5,5 en sotmetre'ls al medi acidificat. Realment, s'observa una mala adaptació al pH baix encara que el bacil tuberculós és capaç de sobreviure durant 4 dies per sota de pH 5, acceptat majoritàriament com el límit de creixement per a aquest bacil. En tot cas, és molt notable adonar-se'n del canvi de comportament que existeix entre el valor de pH de 5,5 i de 6, on sembla que es trobi el valor mínim de creixement òptim per *M. tuberculosis* tal i com ho descriuen altres estudis (404). En un estudi comparable al present en quant a disseny, Rhoades *et al* monitoritza la supervivència de diferents aïllats en medis amb pH àcid i en presència de RNIs. Si observem el seu control, el qual no conté RNIs i és sotmès a pH àcid de 4,5/5,5/6,5, notem que obté el mateix resultat que el nostre cultiu provinent de fase exponencial a pH 4,5, és a dir, no es detecten més UFCs/mL després de 7 dies.

3.1.4 La fase estacionària

Si ens fixem en els cultius amb origen en fase estacionària (Figura 8), observem una adaptació clara a les condicions d'estrès generades pel pH des del valor més extrem. Això podria correspondre a una situació d'ATR encara que caldria realitzar la mateixa estratègia que en els estudis amb *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. Les UFCs/mL són més sostingudes arribant a una fase de creixement en *plateau* molt abans que aquells en fase

exponencial. És interessant fer notar que la caiguda de UFCs/mL en el moment del canvi de medi és menys important que en fase exponencial quan el inòcul en les dues fases van ser comparables (el inòcul va ser de $1,73 \times 10^7 \pm 2,47 \times 10^6$ pel cultiu exponencial i de $4,63 \times 10^7 \pm 5,30 \times 10^6$ pel cultiu estacionari). Com en l'altre cas, els bacils són capaços de sobreviure a pH 4,5 durant un cert temps encara que hi ha una clara destrucció bacil·lar fins al dia 15. Fins i tot, el grup de Smeulders va sotmetre a un cultiu exponencial i a un altre estacionari a condicions de pH extrem de 2, observant una supervivència del 3% a les 8 hores en cultius exponencials i del 50% en cultius estacionaris (331).

3.1.5 Normalització de l'expressió genètica

En aquests moments és necessari explicar el comportament del 16SrRNA fet servir com a factor normalitzador en aquest model *in vitro* per a la determinació de l'expressió bacteriana i que també s'ha fet servir com a marcador de viabilitat bacil·lar, encara que comporta certs problemes explicats més endavant. En fase exponencial, existeix una correlació clara entre el nombre de UFCs/mL i el nombre de còpies de mRNA fins que el cultiu es negativitza. Les raons per a aquesta pèrdua de correlació poden ser vàries. Existeixen molts treballs que fan servir el 16SrRNA com a factor normalitzador i per tant la seva utilitat està fora de tot dubte (98,409,410). Podem estar davant d'un problema de sensibilitat del cultiu davant una RT-PCR que en teoria és capaç d'amplificar una còpia d'aquest rRNA. Potser aquest cultiu ha estat donat com a negatiu després de 30 dies d'incubació quan caldria haver esperat més temps (242,358,359,360). També pot ser acceptat com a possibilitat el fet que es tracti d'una saturació de la PCR com descriuen el grup de Hellyer *et al* a causa del gran nombre de còpies per cada bacil o fins i tot que l'expressió de 16SrRNA tingui una gran inèrcia ja que la seva vida mitjana no és tan curta com la d'un mRNA i és més semblant a la del DNA (411,412). Independentment, altres estudis fan servir el nombre de còpies de *sigA* com a factor normalitzador ja que obtenen una expressió constant durant tot el procés d'infecció (158,178). En el nostre cas, s'ha provat de fer el *ratio* amb el valor d'expressió de *sigA* i els resultats no són reproduïbles ja que la seva expressió no és constant com es pot veure a la Figura 9 i 10.

3.1.6 L'expressió del gen *fbpB* en fase exponencial i estacionària

Tenint aquests valors en compte, la interpretació de l'expressió del gen *fbpB* sembla clarificadora. El seu producte és conegut com a antigen 85B i va ser descrit l'any 1997 per grup de Belisle *et al* (413). Està involucrat en la formació de la paret cel·lular, és una

proteïna que se secreta en grans quantitats (414) en creixement, és molt immunogènica i ha estat candidata per al disseny de vacunes (415). Una funció no massa coneguda que se li ha atribuït últimament consisteix en la inhibició de la formació del MHC-II en la que ell està involucrat (416). Aquest producte és el candidat perfecte per a diferenciar bacils viables, bacils latents o bacils morts ja que a més, la seva expressió augmenta en condicions d'estrès (417,418). En canvi, segons els últims estudis del grup de North (410) on estudien l'expressió d'aquest gen en un model murí per aerosol amb *Real-Time* PCR troben una disminució de l'expressió a partir del moment en que s'estableix la resposta immune (18 dies). Aquest fet ho relacionen amb la destrucció bacil·lar o l'arrest del creixement per part de la resposta immune.

Amb aquestes premisses, els resultats del nostre estudi donen lloc a una interpretació clara a la llum de la Figura 9. En cultiu en fase exponencial, les UFCs/mL es negativitzen al dia 7 en cultius sotmesos a pH 4,5 i 5, mentre que cauen exponencialment pel pH 5,5. L'expressió de *fbpB* desapareix al setè dia en aquests dos primers cultius i a quinzè dia pel cultiu de pH 5,5 coincidint amb la desaparició de les UFCs/mL. Per una part, això ens diu aquests bacils es troben en un estat on no són capaços de créixer i que han aturat per complet la seva replicació. A més, no responen a un perfil de antigen 85B alt que correspondria a una resposta a l'estrès, tot el contrari, desapareixen seguint el patró definit per la corba de les UFS/mL, encara que això es podria interpretar com que hi ha hagut una destrucció bacil·lar important i els bacils no són capaços de secretar antigen 85B com ha interpretat el grup de *Shi et al* en un model *in vivo* (98).

Altrament, els cultius en fase estacionària trobem una resposta totalment diferent. Els cultius sotmesos a pH 4,5/5/5,5 presenten un punt d'inflexió en les UFCs/mL al dia 4 obtenint-se matisos diferents. El de pH més extrem, baixa moderadament la càrrega bacil·lar, el de pH 5 la manté i el de pH 5,5 és capaç de recuperar-se passats els 15 dies. En quant a la interpretació de l'expressió de *fbpB*, podem dir que existeix un colze clar al dia 4 en els tres cultius però que augmenta de forma notable (més d'un logaritme) fins al dia 15. Aquests bacils semblarien respondre de forma adient a la fase d'estrès produint gran quantitat d'antigen 85B (419). Aquest resultat és una confirmació de la validesa de l'antigen 85B com un marcador de viabilitat molt precís en comparació amb els mètodes fets servir a diagnòstic com el 16SrRNA o el DNA. Com veurem més endavant, aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts en el model *in vivo*. Cal afegir com a fet notable que l'expressió inicial d'aquest gen va ser més alta en el cultiu en fase estacionària abans de

sotmetre'l a pH àcid on ja haurien de estar exposats a un estrès previ, fet que no passava en fase exponencial.

3.1.7 L'expressió dels factors sigma en fase exponencial i estacionària

L'estudi dels factors sigma en aquests cultius ha resultat més complex del que inicialment se suposava havent revisat la bibliografia. El SigA és el principal factor sigma de *M. tuberculosis*. L'expressió de *sigA* depèn del creixement i no respon a estímuls externs d'estrès. A més, la vida mitjana del seu mRNA és de gairebé 40 minuts, fet que concorda amb la seva funció de regular gens *housekeeping*. Està molt relacionat amb la virulència del bacil segons estudis fets en cobai i en ratolí (156,409). Els nostres resultats no concorden amb aquestes idees sinó que mostren un perfil totalment diferent (Figura 9). En fase exponencial, no detectem nivells al quart dia en pHs 4,5/5 i 5,5 i al setè dia en pHs 6 i 6,5. Mentre que en fase estacionària a pHs 4,5 i 5 cau en picat de seguida la seva expressió i a pHs de 5,5/6 i 6,5 es manté durant els 15 dies. En un principi, en la fase exponencial semblaria que el creixement evolucionaria paral·lelament a l'expressió de *sigA*. El problema d'interpretació ve quan el creixement es recupera, però no així els nivells de *sigA*. En fase estacionària, hi ha correlació amb el creixement només a pHs de 5,5/6 i 6,5. Potser ens trobem davant d'un problema de tecnicació o d'un artefacte. També cal dir que aquest experiment està fet amb la soca H37Rv i com el grup d'Orme especula en el seu últim treball (409), la capacitat d'augmentar l'expressió de *sigA* es pot haver perdut en el transcurs de dècades i dècades de propagació per laboratoris.

Sorprenentment, trobem expressió dels factors sigma quan ja no hi ha nivells detectables de UFCs/mL en els cultius de fase exponencial (Figura 9). Aquest fet es pot explicar com la resposta transcripcional a una forma de subsistència en condicions extremes de pH regulant l'expressió de gens que permetin a la micobactèria adaptar-se a aquest estat no replicatiu, un estat de latència profund (420). En aquest mecanisme estarien involucrats els factors sigma E, F, G i H i el SigB en menor importància ja que són els que s'expressen més enllà de la negativització del cultiu en fase exponencial. El mateix perfil es repetiria en la fase estacionària, els factors sigma B, E, F, G, i H permetrien als bacils suportar aquests nivells d'acidesa mitjançant la regulació transcripcional de gens involucrats en la resposta a pH baix. Els bacils de la fase exponencial no serien capaços de replicar ni de multiplicar-se, però en canvi, si serien capaços de persistir en aquesta situació.

La situació hagués resultat més clara si s'haguessin fet incubacions de molt més temps en condicions especials i posant més èmfasi en la ressuscitació dels dos models, fet que s'està portant a terme actualment.

El factor sigma B sembla intervenir en part afavorint l'adaptació a l'àcid dels cultius en fase exponencial. La seva expressió en cultius a pH 4,5 i 5 es correspon amb un perfil de detecció de bacils i podria estar implicat en el control d'algun gen involucrat en la inducció de la latència.

El perfil dels factors sigma E, F, G i H responen clarament a la presència de l'àcid en els cultius de fase exponencial. D'aquests, el *sigH* sembla tenir més importància en aquesta adaptació ja que la seva expressió és la que més augmenta a pH 4,5 (fins a 1 logaritme), juntament amb la de *sigG*, durant els 15 dies. El factor sigma G no ha estat molt estudiat i aquesta resposta podria representar una de les seves funcions principals. Alternativament, el factor sigma H està clarament relacionat amb la resposta a l'estrès i concretament a la generada per la fagocitosi per part d'un macròfag. Podríem hipotetitzar un paral·lisme entre aquests dos fets ja que l'acidificació del fagosoma pot suposar un factor d'estrès important per la micobactèria a la qual respondria modulant l'expressió de gens involucrats en patogènia i concretament en la síntesi de paret i proteïnes secretades.

Un 30% dels gens que controla aquest factor sigma són de funció desconeguda (175). De totes formes, cal recordar que s'han descrit factors anti-sigma H que no hem estudiat en aquest treball (181). L'expressió de *sigM* no sembla estar relacionada amb la resposta adaptativa a l'àcid, però cal destacar que a pH 6 recupera una expressió constant en el temps. Finalment, a pHs 6 i 6,5 en fase exponencial, trobem un perfil gairebé idèntic de tots els factors sigma alternatius.

En aquest mateix sentit, l'expressió de *sigB*, *sigE* i *sigH*, augmenta des del moment en que el cultiu és sotmès a un pH àcid des de fase exponencial, fet que es podria interpretar com una inducció per a regular gens relacionats amb la resposta a l'àcid. Cal dir que el temps transcorregut des de la inoculació al medi de cultiu acidificat fins a la recollida (temps 0), va ser de 10 minuts.

Altrament, els cultius en fase estacionària tenen un comportament lleugerament diferent, però també basat en el perfil dels factors sigma B, E, G i H. En aquest cas, l'expressió de *sigE*, *sigF*, *sigG* es manté constant durant els 15 dies d'acidificació, fet que demostra la seva importància en l'adaptació a aquesta situació. Per una altra banda,

l'expressió de *sigH* a pH 4,5 disminueix gradualment per desaparèixer al dia 4 per augmentar després més de 4 logaritmes al dia 7. Aquest fet coincideix amb el final de la davallada dels UFCs/mL i amb una fase d'equilibri. L'expressió de *sigB* es comporta de forma semblant, però desapareixent al dia 7 i tornant a aparèixer a uns nivells 1000 vegades més alts al dia 10. Aquest perfil de *sigB* podria caure sota la regulació de *sigH* confirmant la seva relació amb l'acidesa.

A pH 5 aquest patró d'expressió sembla repetir-se encara que amb menys importància (3 logaritmes), ja que els valors de *sigH* no desapareixen. Cal dir també, que les UFCs/mL tenen un comportament més estable i es recuperen abans que els cultius amb pH de 4,5.

Quan els cultius són sotmesos a l'àcid, existeix una inducció immediata dels factors sigma B i E a pHs 4,5/5 i 5,5, a diferència de la fase exponencial que necessitava més maquinària genètica per a respondre a aquesta situació. En aquesta fase estacionària, SigM no sembla tampoc jugar un paper molt important.

No s'han trobat diferències evidents entre les dues fases de creixement en quant a l'expressió de factors sigma. De totes formes, cal recordar que cada un d'aquests factors regulen o modulen l'acció de una gran varietat de gens i que, encara que en les dues fases estiguin presents, això no vol dir que estiguin regulant els mateixos gens. Realment, podríem estar davant d'una resposta massiva de molts gens necessaris per a l'adaptació a aquesta situació extrema. A més, cal valorar l'existència de reguladors d'aquests moduladors i reguladors transcripcionals com són els factors anti-sigma i els anti-anti factors sigma. De forma contrària, un estudi de Manganeli *et al* afirma que l'àcid no influeix en el creixement en una soca de *M. tuberculosis* amb el *sigE* inactivat (162). En canvi, un altre estudi en *M. smegmatis* amb aquest gen inactivat (420) confirma que sí influeix. Aquest fet és curiós ja que segons estudis clàssics (404), *M. smegmatis* seria capaç de créixer davant d'un ventall més ampli de pHs, i *M. tuberculosis* restringiria el seu creixement a un interval molt estret.

Com a fet notable, cal dir que la gran majoria d'estudis realitzats i consultats segueixen una estratègia per a l'estudi de la latència diferent al seguit per nosaltres i que pot ser l'explicació a uns resultats diferents. Aquests estudis sotmeten el bacil a un factor d'estrès a un grau i temps determinat per posteriorment cultivar-ho en un medi estàndard. El nostre model *in vitro* respon a una monitorització constant del cultiu sotmès a un factor d'estrès. El bacil està creixent en condicions d'estrès i intenta adaptar-se a aquestes

constantment. Pensem que aquesta estratègia reproduïx millor l'adaptació que ha de fer el bacil quan les condicions són *in vivo*.

3.1.8 L'expressió Rv0834c en fase exponencial i estacionària

L'expressió de Rv0834c és molt interessant. Es tracta d'un gen PE-PGRS possiblement relacionat amb la paret cel·lular i involucrat en la supervivència del bacil en condicions d'estrès (421). També cal dir que se li atribueixen funcions immunomoduladores (422) o com a proteïnes variables de superfície. (423). Doncs, com podem observar a la Figura 9 i a la Figura 10, hi ha una diferència molt important en l'expressió d'aquest gen entre les dues fases de creixement. En fase exponencial, aquest gen no està induït, al contrari que en la fase estacionària a pHs 4,5/5 i 5,5. S'ha descrit l'expressió d'aquest gen en cultius en fase semi-logarítmica sotmesos a pHs de 4,5 amb una gran expressió a les 22 hores després de l'acidificació (102), però no en un altre on el pH estudiat és de 5,5 i la tècnica feta servir és un *microarray* (424).

Cal dir que no vam trobar expressió d'aquest gen ni al cultiu en fase estacionària ni exponencial abans de la inoculació en medi àcid. Potser es tracta d'una de les diferències més clares entre els dos cultius. Semblaria llavors que els bacils en fase estacionària serien capaços de induir l'expressió d'aquest gen i adaptar-se millor a les condicions de pH. Curiosament, la seva expressió disminueix al dia 7 a pH 4,5 quan les UFCs/mL s'estabilitzen al igual que passaria a pHs 5 i 5,5. També cal remarcar que a pH 6 ni 6,5 no es troba expressió d'aquest gen, encara que la seva expressió resulti ser semi-constitutiva.

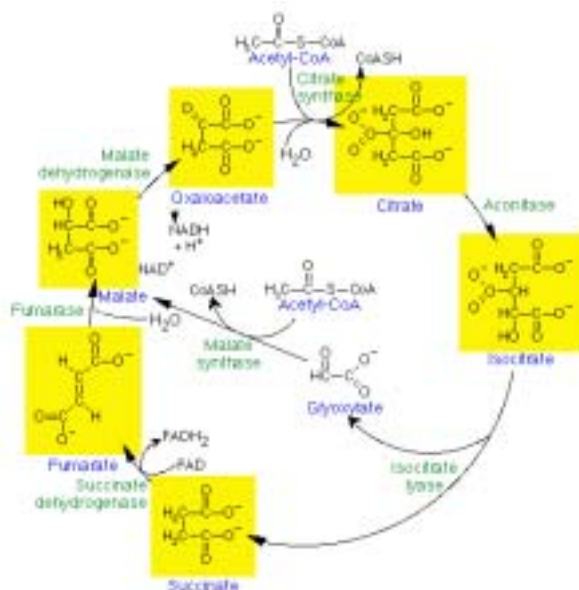
Per una altra part, la importància d'aquest gen en un model *ex vivo* és relativa, ja que no es troba expressió després d'una infecció de macròfags a les 72 hores. En defensa d'això, cal dir que segurament la inhibició de la maduració i posterior acidificació del fagosoma no permet baixar el pH fins a nivells on s'indueixi l'expressió d'aquest gen.

De nou, sembla haver-hi un punt d'inflexió entre el pH de 5,5 i 6 ja que canvia totalment el perfil de resposta a l'àcid. Aquest valor coincidiria amb els descrits fa més de 30 anys pels estudis de Portaels.

3.1.9 L'expressió de *icl* en fase exponencial i estacionària

En un altre ordre de coses, tractem ara l'expressió d'un gen molt important relacionat amb el metabolisme energètic, la isocitrat liasa (*icl*). Com s'ha comentat abans, aquest enzim permet l'aprofitament de l'acetat mitjançant el *glyoxylat shunt* al cicle de Krebs fent servir com a font de carboni els àcids grassos. Aquesta estratègia ha estat demostrada

prèviament en *M. tuberculosis* (86) i podria correspondre a la forma d'obtenció d'energia en estats de latència.



Esquema del cicle de Krebs amb el shunt del glioxilat detallat

Els seus nivells s'incrementen en la fase estacionària en el model *in vitro* de Wayne i en un model *ex vivo* de macròfags (96,163). A més, s'ha descrit que la seva inactivació no permet establir una infecció persistent en un model murí en el qual a més a més s'ha identificat que la seva expressió augmenta amb el pas del temps (97). Per una altra banda, un estudi recent ha confirmat la seva expressió en el model de macròfag, però no ha descrit un augment de la seva expressió en macròfag activat. Aquest fet contrastaria amb la idea d'una inducció més important d'aquest tipus de metabolisme davant de situacions d'estrès incrementades (151). En un altre estudi es confirmaria aquesta idea ja que la seva expressió seria important en un model *in vitro*, en un model murí immunocompetent i en un immunodeficient (356). El que queda clar que aquest metabolisme és bàsic per la micobactèria i la seva adaptació a la persistència.

La raó per la qual estudiem l'expressió de *icl* en el nostre model d'àcid és que d'alguna forma *M. tuberculosis* és capaç de detectar un baix pH i que suposaria l'entrada en el fagosoma on hauria de expressar uns gens necessaris per a la persistència a llarg termini (425). En el nostre estudi l'expressió de *icl* també demostra tenir molta importància en les dues fases de creixement encara que és evident que responen a unes condicions diferents (Figura 9 i 10).

En fase exponencial, la seva expressió a pHs 4,5/5 i 5,5 disminueix fins a desaparèixer el dia 7 coincidint amb la negativització del cultiu. Aquest fet podria fer pensar

que els bacils són capaços de respondre ràpidament a aquest estrès àcid en una primera fase d'adaptació per posteriorment entrar en una estat on no serien cultivables. El model de Wayne que correspondria a una fase de transició entre la fase estacionària i la fase de latència profunda ha descrit l'expressió d'aquest gen i la seva activitat en l'obtenció d'energia. Posteriorment, en un estat de latència més profund, aquest gen no semblaria estar involucrat en el manteniment del metabolisme energètic. Curiosament en arribar a pH 6 i posteriorment a 6,5, es recupera ràpidament el perfil d'expressió d'aquest gen al igual que les UFCs. A aquest pH, el bacil torna a experimentar un canvi sobtat de comportament en la seva corba de creixement. Cal recordar que un fagosoma parcialment acidificat es troba a un pH de 6,1-6,5 (230).

En fase estacionària, aquest gen semblaria clau per la supervivència del bacil fet que es demostra pel manteniment de les UFCs i per una expressió constant durant els 15 dies en els cultius a pH 4,5/5 i 5,5. A més, en cultius 6 i 6,5, aquest gen és induït de forma important a uns nivells més alts que a pHs més baixos, fet segurament relacionat amb les condicions d'acidificació parcial del fagosoma.

Curiosament, aquest gen ha estat descrit com un pseudogen en la soca H37Rv (feta servir en aquest estudi) i per tant semblaria que el seu producte no seria funcional. Realment s'ha demostrat que no era així, sinó que és capaç de respondre a una concentració mínima del seu substrat, el isocitrat. Per tant, en condicions normals, l'activitat d'aquest gen no és important (100,426).

3.1.10 El metabolisme del nitrogen en fase exponencial i estacionària

El metabolisme del nitrogen en *M. tuberculosis* es basa principalment en tres operons, *narGHJI*, *narK2X* i *nirABD*. Aquest sistema podria permetre a *M. tuberculosis* obtenir energia en condicions anaeròbiques, encara que cal qüestionar-se la seva utilitat.

El bacil és capaç de reduir NO_3^- a NO_2^- amb una nitrat reductasa, producte de *narGHJI* en condicions de cultiu normals. En canvi, sota condicions d'anaerobiosi o en fase estacionària, aquest operó no és actiu i la reducció de nitrat ve regulada per *narK2*, un transportador de nitrats i de nitrits (427). És destacable que aquests dos operons no regulen la seva activitat per substrat i no responen a les concentracions de nitrat i nitrit, sinó que ho faria el gen Rv0844c (428). A més, és molt interessant fer notar que realment no existeix una gran inducció de nitrat reductasa en entrar en fase de latència sinó que el bacil prefereix deixar de replicar-se i fer davallar molt la seva activitat metabòlica. Com no creix sota aquestes condicions, no cal fer servir aquesta maquinària per obtenir energia en aquest

estat, però sí per arribar-hi. Finalment, *narX* havia estat associat amb una hipotètica nitrat reductasa però la seva funció és encara desconeguda ja que és induïda clarament en situacions d'hipòxia, entre d'altres condicions d'estrès (319,429,430).

M. tuberculosis, al igual que *M. bovis*, són incapaços de reduir nitrits (431,432) encara que sembla tenir la maquinària genètica per fer-ho, i encara que no obtingui energia en el procés (433). Curiosament, l'operó *nirABD* ha estat catalogat com una possible nitrit reductasa, fet que s'ha descartat recentment en *M. tuberculosis* (434); per tant la seva funció estaria relacionada amb una sulfat reductasa que era l'altre hipòtesi funcional per homologia. Per una altra part, en un model *ex vivo*, s'ha trobat una inhibició de l'expressió d'aquest gen, encara que aquest grup no justifica el perquè han fet servir aquest gen i ho associen a un fals positiu de la tècnica (96).

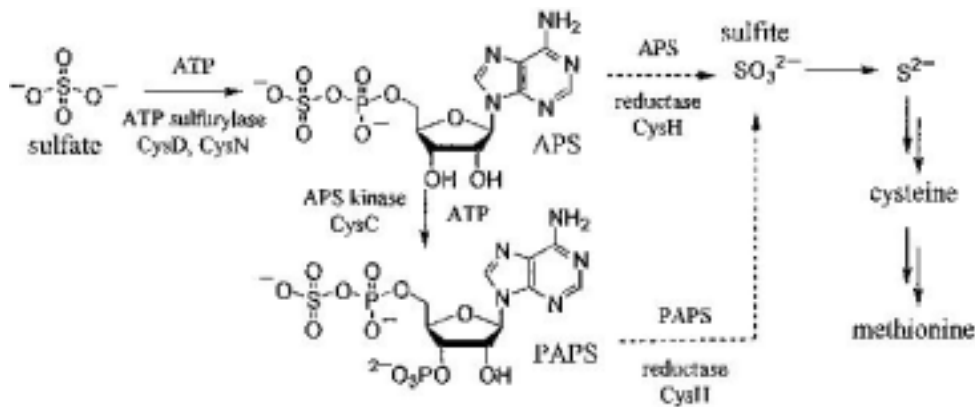
En un model murí, s'ha demostrat la importància de *narG* en *M. bovis* i de la seva relació amb la persistència (435). Recentment, s'han trobat diferències basades en quatre nucleòtids en l'operó *narGHJI* entre *M. bovis* i *M. tuberculosis* (436) que augmentaria l'activitat reductasa d'aquest últim suposant un avantatge selectiu per persistir donada la gran disponibilitat de nitrats que hi ha en els teixits d'un hostatger infectat crònicament (437).

En el nostre estudi, hem estudiat l'expressió de *narG* i *nirA*, obtenint resultats molt semblants i aparentment sense gaire interès. En fase exponencial, i seguint el mateix perfil que la isocitrat liasa a pHs 4,5/5 i 5,5, els seus nivells desapareixen al dia 7. Potser estan també relacionats amb l'arribada a aquest estat de dormància profunda, encara que la seva funció sigui molt discutida. De nou observem una recuperació a pH 6 de *narG* i de les dues reductases a pH 6,5. En fase estacionària, trobem un perfil lleugerament diferent i podem extrapolat que influeixen poc en el manteniment de la viabilitat a pHs de 4,5 i 5 ja que els seus nivells desapareixen al dia 4. En canvi, a pH 5,5 recuperen els seus nivells per a augmentar-los notablement a pH 6 i 6,5. Recordem que tots els cultius es van incubar sense agitació i per tant la presència d'oxigen seria reduïda. La hipòtesi inicial d'un metabolisme alternatiu basat en el metabolisme del nitrogen necessita de més estudis.

3.1.11 L'expressió de *cysH* en fase exponencial i estacionària

El producte del gen *cysH* és una APS reductasa i és clau en l'assimilació de sulfat del medi. La micobactèria fa servir aquest sulfat principalment per a la formació d'aminoàcids com la cisteïna i la metionina i de molècules com la SL-I, factor de virulència molt estudiat. El SL-I està involucrat en la virulència de *M. tuberculosis* augmentant la toxicitat del CF (438). A més, s'ha vist que aquest sulfolípid seria capaç d'afectar directament a les cèl·lules

fagocítiques augmentant prematura i desmesuradament la producció de ROIs (439) i fins i tot estaria involucrat en la inhibició de la fusió fagosoma-lisosoma (440).



Rutes d'assimilació de sulfat en bacteris

Estudis previs han demostrat la inducció d'aquest gen davant de determinades condicions d'estrès com la presència de SDS en una soca *wild-type* i en un mutant de *sigE* (162). No s'ha trobat la inducció d'aquest gen en cap altre estudi relacionat amb situacions d'estrès per hipòxia, àcid, o altres.

En els cultius en fase estacionària, sembla que l'expressió de *cysH* va ser induïda per la presència del pH baix, ja que abans d'acidificar els medis, no existia senyal per a aquest gen. En resposta a aquest factor d'estrès, els cultius en fase exponencial a pHs de 4,5/5 i 5,5 van produir molt pobrament aquest enzim i la seva expressió va caure ràpidament, fet que podríem relacionar amb la incapacitat de produir SL-I encara que aquest últim punt, caldria estudiar-ho amb més profunditat. De tota manera, és una interpretació que ve reforçada pel fet que els bacils en fase estacionària sí serien capaços de respondre des del primer moment a l'acidificació a pH4,5.

Podríem interpretar l'expressió d'aquest gen com una resposta a la fagocitosi per part del macròfag que pot portar a la formació del fagolisosoma. El bacil inhibiria aquesta fusió fent una molècula que necessita de sulfat, el factor de virulència SL-I. De nou, observem en els cultius de fase exponencial un canvi radical d'expressió en el moment que el pH és 6.

3.1.12 L'expressió de *recA* en fase exponencial i estacionària

El gen *recA* està involucrat en un tipus de resposta anomenat *SOS response* en la majoria de gram negatius, com *E. coli*. És un sistema controlat per un repressor, el *lexA*. A diferència d'aquests microorganismes, *M. tuberculosis* té 2 promotors per *recA*. Recentment, s'ha descrit que existeix un altre sistema de resposta al dany cel·lular independent d'aquest *SOS response*, de *recA* i de *lexA* que, en un principi podria controlar alguns gens (226). Posteriorment, s'ha vist que la majoria de gens involucrats en aquest tipus de resposta són independents de *recA* i de *lexA* (227). La regulació dels altres sistemes de control del dany cel·lular poden ser per part de *sigE*, *sigG* i *sigH* (sobretot *sigG*) ja que veuen induïda la seva expressió davant de dany al DNA. Independentment, van descriure 21 gens que només eren regulats pel sistema RecA/LexA que bàsicament eren sistemes de resposta al dany del DNA com *ssb*, *lexA*, *dnaE2*, *ruvA*, *ruvB* i altres amb funció no caracteritzada.

En fase exponencial, l'expressió d'aquest gen va anar disminuint en els pHs 4,5/5 i 5,5 de forma semblant. Aquest fet recolza la idea que aquests bacils no van ser capaços d'expressar a temps un sistema que els permetés resoldre els danys al DNA provocats per l'àcid. En canvi, a pH6 i com en altres punts clau comentats, la resposta va ser efectiva i va permetre el creixement bacil·lar. En la fase estacionària, va existir una resposta efectiva al dany cel·lular des del primer moment de l'acidificació, des de pH 4,5 fins a 6,5. Això estaria d'acord amb la capacitat d'aquests bacils a estar millor adaptats a les condicions adverses.

Per què aquest bacil té diverses maneres de respondre al dany al DNA? La resposta més evident seria que té la capacitat de respondre més específicament a cada tipus de dany cel·lular mitjançant un grup de gens determinats (227). Potser caldria afegir que es tracta del paradigma de bacil intracel·lular, i és capaç de persistir durant molt de temps a l'hostatger i per això ha de solucionar diversos problemes associats al dany al DNA.

Per una altra banda, la inducció de gens de resposta a l'àcid en altres microorganismes com *H. pylori*, *S. mutans* i *E. coli* (441,442,443) sembla dependre de *recA*, fet que encara cal comprovar en *M. tuberculosis*.

3.1.13 L'expressió de *rpoA* en fase exponencial i estacionària

Com hem comentat anteriorment, la RNA polimerasa està formada per 4 subunitats (444). Els gens encarregats de les diferents subunitats són *rpoA* (subunitat α), *rpoB* (subunitat β), *rpoC* (subunitat β'), *rpoZ* (subunitat ω). La subunitat α és l'encarregada

de assemblar l'enzim i interaccionar amb proteïnes reguladores, encara que també està relacionat amb la catàlisi (445,446,447,448).

L'expressió de *rpoA* en cultius de fase exponencial va ser baixa en els cultius de pH 4,5/5 i 5,5 fins a arribar a nivells indetectables el dia 10. Això podria significar que els nivells de transcripció de la RNA polimerasa són poc importants i representaria una progressió cap a una activitat bacil·lar molt baixa. Aquest perfil coincidiria amb el descrit en un model de *starvation* on també es reprimeix la seva transcripció proposant una activitat metabòlica baixa per als bacils en aquell estat (233). Igualment, a pH 6 es recupera aquest perfil de transcripció activa mostrant uns nivells molt alts. Al contrari, en la fase estacionària es mostren uns nivells constants de *rpoA* des del pH a 4,5 fins a 6,5. Això representaria que aquests bacils mantindrien una transcripció inalterada durant tot el interval àcid. Aquest fet concorda amb les UFCs trobades i amb l'estat metabòlic actiu d'aquesta població en creixement estacionari.

3.1.14 L'expressió de *acr* en fase exponencial i estacionària

Un dels antigens més reconeguts i immunogènics (449) junt amb l'antigen 85B és el Acr o proteïna de 16kDa o proteïna α -*crystallin* (142). El seu gen, *acr*, és induït en situacions d'hipòxia (242,243) i controlat pel sistema Rv3133c /Rv3132c (245) i també es veu incrementada la seva expressió en la fagocitosi per part del macròfag (142,144). La seva relació amb el macròfag és molt important ja que s'ha descrit que una soca amb aquest gen inactivat és incapaç de créixer dins del macròfag on a més s'ha demostrat que la seva hiperexpressió inhibeix el creixement del bacil. A més, l'activació del macròfag promou una inducció dels nivells de *acr* a les 24 hores igual que en un model murí als 21 dies (151).

En els bacils en fase exponencial sotmesos a condicions d'àcid del nostre estudi, observem una progressiva davallada dels nivells de transcripció fins al dia 15 en pHs 4,5/5 i 5,5. Aquesta situació concordaria amb la descrita pel grup de Desjardin (389) on troben que existeix una expressió important de *acr* durant la fase NRP-1 per a aturar-se abruptament en arribar a la situació de hipòxia molt més estricta (NRP-2). En el nostre cas trobem un perfil molt semblant a pHs extrems, però no en pHs de 6 i 6,5 on trobaríem el creixement més afavorit de *M. tuberculosis*, on igualment hi ha una expressió sostinguda en resposta a una acidificació lleu. Per una altra banda, els nivells d'expressió de *acr* abans del moment d'acidificació són alts; fet que es relacionaria amb les condicions de no agitació del creixement de tots els cultius on es pogué desenvolupar una hipòxia parcial. Aquests resultats no concorden amb els trobats per altres grups (161) que descriuen uns nivells

màxims d'expressió en fase logarítmica per després davallar en fase estacionària on a més no troben concordança amb la producció de la proteïna Acr. Això es pot explicar perquè els cultius analitzats no s'han realitzat en les mateixes condicions ni intervals de temps (145).

Aquestes dades coincidirien amb l'expressió d'aquest gen dins del macròfag on es veuria sotmès a unes condicions d'estrès molt variades entre les que trobaríem segur el pH i la hipòxia. S'ha hipotetitzat que la seva funció estaria relacionada amb la persistència ja que homòlegs d'aquesta proteïna estan involucrats en l'esperulació de *B. subtilis* i en la resposta a l'estrès de diferents microorganismes (450,451). A més, en els cultius de fase estacionària hi trobem una expressió realment important a tots els pHs estudiats. L'explicació cau sota una interpretació de control de la taxa de creixement i una baixada de l'activitat degut a una possible falta de nutrients o altres condicions que poden relacionar-se amb la latència en un model *in vivo* (142,143).

La interpretació del comportament d'aquesta proteïna podria ser la d'un marcador de resposta ràpida per provocar una sortida o entrada en estat de latència quan les condicions siguin les adients. Ens trobem davant d'una molècula que no sembla expressar-se en fase exponencial, que en principi serien condicions favorables de creixement, i que s'expressa en arribar a la fase estacionària per aturar el creixement i controlar que els bacils no morin per falta de nutrients, per exemple. Però la seva activitat no acaba aquí, també seria el responsable d'induir una adaptació a la latència i el responsable d'estimular la sortida d'aquest estat quan les condicions siguin favorables.

Cal recordar que el control de l'expressió de Acr és transcripcional i es dona a nivell del sistema de resposta de dos components, DosR/DosS/DosT que recentment s'ha catalogat com el *dormancy regulon* (172,319,452,453)

A la llum d'aquests resultats, podem interpretar que el cultiu en fase exponencial sotmès a un pH àcid pot reproduir la fase inicial de la infecció en el model murí. A partir del moment de la infecció, hi ha un creixement exponencial fins al desenvolupament de la resposta immune específica. En aquest moment, la gran majoria dels macròfags s'activen i destrueixen els bacils per mecanismes segurament relacionats amb l'àcidificació del fagosoma que produeix una gran davallada de la càrrega bacil·lar.

Alguns d'aquests macròfags no són totalment activats i no destrueixen els bacils al seu interior. Aquests bacils són capaços d'acostumar-se a l'estrès i la seva destrucció resulta

molt difícil. Aquesta població es podria correspondre amb el cultiu en fase estacionària ja que aquest és capaç de suportar millor l'acidificació.

3.1.15 Limitacions de l'estudi *in vitro*

Una limitació del nostre estudi, i d'altres referenciats (102,424) ha estat el xoc àcid al que han estat sotmesos aquests cultius. Evidentment, en el moment del desenvolupament de la resposta immune específica, hi ha una activació del macròfag que comporta una davallada en el pH. Això comporta un temps aproximat de 6 hores fins a pH 4,5. Aquest fet no es reproduïx en el nostre model, ja que no hi ha una baixada progressiva sinó brusca del pH. Per tant, podem suposar que al bacil no li dóna tant de temps a adaptar-se a les noves condicions i podria respondre de forma diferent.

En un *Science* de l'any passat (31), es descriu la davallada de pH que existeix després de l'activació del macròfag i el temps que triga en aconseguir-ho. En la següent gràfica veiem que el pH baixa gairebé per sota de 4,5 en els macròfags activats en aproximadament 6 hores. Aquest fet ens fa pensar que la destrucció bacil·lar per l'acidificació del fagosoma es pot convertir en el principal mecanisme efector davant infeccions intracel·lulars com la de *M. tuberculosis*.

3.2 Estudi de *M. tuberculosis* en el model *in vivo* en ratolins *wild-type*

3.2.1 Evolució de la infecció tuberculosa

El patró de les UFCs/mL és (Figura 11) el clàssic descrit per altres estudis i coincideix amb el trobat en la primera fase d'aquest estudi. En aquest cas, ens centrem en els primers dies d'infecció (setmanes 2, 3, 4, 5, 6) per posteriorment caracteritzar la setmana 9, 18 i 22 en pulmó i melsa. Breument, la càrrega bacil·lar augmenta exponencialment fins a la setmana 3 on s'estableix una resposta immune específica i es controla la infecció. A partir d'aquell moment, les UFCs/mL disminueixen significativament fins a la setmana 9, per tornar a pujar suaument a les 18 i 22 setmanes descrivint un perfil de cronicitat. Aquests events succeeixen en pulmó amb un major nombre de bacils i a la melsa en menor grau.

Com s'ha descrit en l'apartat de material i mètodes, existeix una correlació ($r^2=0,9524$) entre les UFCs/mL i l'expressió del 16SrRNA que ens serveix per a poder normalitzar l'expressió bacteriana en els pulmons dels ratolins. Per a l'estudi de la resposta immune, es fa servir el gen constitutiu HPRT.

3.2.2 Estudi de la evolució de la infecció

La producció de IFN- γ , RANTES, TNF, i iNOS també segueix un comportament normal (Figura 12). El IFN- γ és clau en el control de la progressió bacil·lar ja que augmenta exponencialment fins a la setmana 5 on fa un pic d'inflexió encara que manté uns nivells alts fins a la setmana 6. Això comporta un control efectiu de la càrrega bacil·lar inicial. Aquest fet es veu reforçat per la producció de RANTES que es comporta de forma idèntica. A la setmana 9, 18 i 22 els nivells pugen i baixen controlant en tot moment que la quantitat de bacils no augmenti en cap moment.

Igualment, els nivells de mRNA de TNF són molt importants en el control de la infecció i la formació del granuloma inicialment per a mantenir uns nivells baixos cap al final de l'estudi. Per una altra part, la producció de iNOS respon clarament a la inducció per IFN- γ al principi de la infecció i segurament sent un dels factors més importants en la destrucció bacil·lar. En canvi, cap a la setmana 18 i 22 experimenta un augment considerable segurament relacionat amb la inducció de NO per part de components de la paret bacteriana com queda explicat en la primera part de la discussió.

3.2.3 Estudi de l'expressió de *fbpB* en teixit

L'expressió de l'antigen 85B és alta quan la comparem amb altres gens estudiats indicant que la seva transcripció és molt important. El seu perfil ens indica una expressió molt elevada just abans de l'establiment de la immunitat específica responnent a una situació de replicació activa. Llavors el nombre de bacils comença a caure notablement, però l'expressió de *fbpB* va augmentant. La raó d'això podria ser que existeix una lluita constant per la creació de nous bacils (replicació activa i formació de paret cel·lular) i la destrucció progressiva per part del sistema immune representada per una producció de IFN- γ que va més enllà de la setmana 3 arribant a fer un pic a la setmana 5. Fins a la setmana 9, semblaria que la destrucció bacil·lar seria més important que no pas la replicació bacil·lar. Posteriorment a la setmana 9, la resposta immune semblaria relaxar-se i permetre la supervivència d'uns bacils que passarien totalment desapercebuts. En aquests moments, podem dir que *M. tuberculosis* és capaç de persistir als pulmons dels ratolins i els nivells de *fbpB* són baixos ja que en aquesta fase hi ha poc creixement. El perfil cap a la setmana 18 i 22 on les UFCs augmenten paulatinament, es correspon amb una expressió de *fbpB* que es recupera cap al final de l'estudi de la infecció. Si ens fixem en la setmana 22, la producció de IFN- γ torna a baixar i puja l'expressió de l'antigen 85B.

Ens trobaríem davant d'un delicat i constant equilibri de formació i destrucció de bacils a partir del moment en que s'estableix la resposta immune. Això concorda amb la idea de dinamisme de les poblacions que es troben en fase de latència. A més, la resposta obtinguda al nostre estudi es correspon perfectament amb la trobada en un estudi molt semblant realitzat l'any 2003 (98). La seva interpretació és lleugerament diferent ja que el seu estudi no va més enllà dels 50 dies i no poden observar aquest dinamisme descrit aquí i només expliquen que existeix una destrucció bacil·lar per la resposta immune.

Es confirmaria llavors la importància de l'expressió d'aquest gen com a marcador de creixement, encara que caldria un altre marcador que ens determinés en quina fase de l'equilibri ens trobem.

3.2.4 Estudi de l'expressió de *icl* en teixit

L'expressió del gen de la isocitrat liasa també es va monitoritzar en aquest estudi per la seva implicació en l'obtenció d'energia en fases de latència. L'expressió de *icl* va ser baixa i constant durant les 6 primeres setmanes d'infecció i només es va veure afectada a la setmana 3 quan la càrrega bacil·lar va caure radicalment. En canvi, els seus nivells a la setmana 9 van pujar significativament més d'un logaritme. Aquesta pujada coincidiria amb

l'entrada en fase de latència del bacil que ve acompanyada per uns nivells de UFCs/mL molt baixos i constants a partir d'aquell moment. Cal recordar de totes formes que es tracta d'un equilibri i que per això es pot explicar la davallada important dels nivells de *icl* a la setmana 18 i 22 arribant a la mateixa expressió que al inici de la infecció. Semblaria llavors que el metabolisme dels àcids grassos seria cabdal en l'obtenció d'energia en fase de latència en el model murí per aerosol. Realment, aquesta situació es va descriure anteriorment un una publicació de l'any 2000 (97). En aquest treball es descriu que *Icl* no té cap importància en la fase aguda de la infecció, però que és una peça clau en la persistència del bacil als teixits dels ratolins i que la seva expressió ve modulada en part per la resposta immune. Això suposa que hi ha un canvi a l'ambient que envolta a la micobactèria i fa alterar el seu metabolisme cap a la degradació dels lípids. El fet que les primeres setmanes no hi hagi cap alteració de l'expressió de *icl* suporta la idea que és necessari l'establiment de la resposta immune i l'activació del macròfag per a que es desenvolupi la latència i aquesta adaptació al nou metabolisme.

3.2.5 Estudi de l'expressió de *acr* en teixit

Per un altre costat, l'expressió de *acr* en les primeres setmanes d'infecció va experimentar petits canvis. El més notable va ser des de la setmana 3 a la 4, és a dir quan va començar a disminuir la càrrega bacil·lar. Aquest canvi sobtat de nivell de transcripció es pot interpretar per un augment de les condicions d'estrès presents a macròfags activats per la resposta immune a les quals *Acr* respon (151). Posteriorment, s'observa un pic d'expressió a la setmana 9 per a començar una davallada fins a la setmana 22. Aquesta dinàmica es pot explicar dins del context de marcador ràpid d'inductor de latència ja que, com passaria en el model *in vitro*, hi ha una inducció de la seva expressió fins a arribar a un estat de latència profund on la seva expressió baixa. Aquests resultats tornen a concordar amb els trobats en el treball de Shi *et al* (98) on se li atribueix una funció de protecció de la integritat de *M. tuberculosis*. De nou, la perspectiva d'aquest treball es limita a l'estudi de les 9 primeres setmanes. Alternativament, en un estudi amb DNA *microarray* del bacil en un model *in vivo* durant 28 dies d'infecció, no resulta una inducció significativa d'aquest gen i no li otorguen més importància (356). En canvi en un estudi molt semblant i fet amb la mateixa tecnologia, troben que l'expressió d'aquest gen és molt important en el model murí i la relacionen amb l'activació del macròfag on la seva expressió augmenta unes 200 vegades (151).

3.2.6 Estudi de l'expressió dels factors sigma en teixit

En referència a l'expressió de factors sigma en el model murí, cal dir que el perfil d'expressió va ser més o menys el mateix entre tots no observant-se gairebé cap diferència. No existeixen molts estudis on es determini l'activitat transcripcional d'aquestes molècules en un model *in vivo*. Recentment, en un DNA *microarray* de l'expressió bacteriana en un model murí immunocompetent, es va trobar induïda l'expressió de *sigE* i *sigK* (356).

En canvi, sí que s'han realitzat estudis fent servir bacils amb algun factor sigma inactivat. El factor sigma A ha estat relacionat amb un creixement intracel·lular més important en un model murí en funció de l'expressió de *sigA*. La seva conclusió és que la funció moduladora de SigA influeix en la virulència augmentant la resistència a ROIs i estimulant el creixement (409).

Per un altre part, l'estudi del SigC ha portat a resultats molt importants, ja que en un model murí, el bacteri amb aquest gen inactivat és capaç de persistir en teixit al igual que la soca control, però no és capaç de matar al seu hostatger. Per un altre part, en el mateix estudi es va realitzar un DNA *microarray*, i cal dir que l'expressió de *acr* cau sota l'acció d'aquest factor sigma (178).

En un bacil mutant per *sigE* es va observar un comportament semblant al descrit anteriorment pel mutant *sigC*. Va persistir llarg temps en teixit amb la mateixa presència quantitativa que la soca control, i al final va matar al seu hostatger, encara que molt més tard. (164,165). Les raons per aquesta diferència encara estan per descriure ja que no es coneix del tot els gens que cauen sota el control de *sigE*, però ho associen a una incapacitat d'adaptar-se a l'ambient i de respondre a l'actuació del sistema immune.

El mateix tipus d'estudi s'ha portat a terme en un mutant *sigF* i els resultats obtinguts afirmen que aquest persisteix al teixit igual temps que la soca control però amb menor càrrega bacil·lar i produint menys patologia al teixit. Com en el cas de *sigC*, s'ha desenvolupat un DNA *microarray* on s'han identificat algun dels gens regulats per *sigF* que principalment afecten a la síntesi de paret cel·lular i a la producció de sulfolípid (172).

Finalment, aquesta mateixa experiència s'ha repetit en un mutant *sigH* otorgant la capacitat a aquest factor sigma de regular la patologia al teixit i la capacitat de matar a l'hostatger, encara que realment s'ha identificat com a un factor dispensable pel creixement i la supervivència (175). Aquest factor sigma està segurament relacionat amb una resposta a l'estrès, però més d'un 30% dels gens que cauen sota el seu control no tenen funció associada. Una de les suposicions d'aquesta disfunció en el desenvolupament de patologia pulmonar pot estar relacionada amb la falta d'un cicle *redox*.

Així doncs, l'expressió de factors sigma en el nostre estudi és en part incompleta ja que cada factor és capaç de regular l'acció de més de 200 gens i per tant podem suposar que en algun moment o altre, la seva transcripció serà induïda encara que no sabrem perquè. Només podem dir que fins a la setmana 6, tots els factors es van comportar de forma idèntica. En canvi, a partir d'aquesta setmana els valors de *sigA*, *sigB*, *sigF*, *sigG* i *sigM* van augmentar fins a la setmana 9 i els de *sigE* i *sigH* van disminuir. Posteriorment a aquesta setmana, tots els factors sigma van anar minvant la seva expressió excepte el *sigH* que va mantenir els seus nivells fins a la setmana 22.

3.3 Estudi de *M. tuberculosis* en el model murí amb ratolins *knockouts*

3.3.1 Determinació de la càrrega bacil·lar

Respecte a les UFCs dels ratolins KO $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$, $\text{TCR-}\alpha/\beta^{-/-}$, $\text{TNF}^{-/-}$ i $\text{NOS2}^{-/-}$ podem dir que esperàvem que la càrrega bacil·lar fos molt més important que en els animals control de la que hem trobat (Figura 14). Creiem que la raó d'això està relacionada amb la extrema virulència de la soca emprada pel control; això ha provocat un desenvolupament de la infecció molt pronunciat que a més ha estat capaç de desenvolupar necrosi intragranulomatosa.

No va haver-hi cap diferència significativa respecte a les UFCs entre les diferents soques de ratolí independentment de les setmanes. Aquests resultats es van reproduir en les determinacions de la melsa i venen recolzats per l'estudi de la resposta immune.

3.3.2 Determinació de la resposta immune

Respecte a l'expressió de $\text{IFN-}\gamma$ cal destacar la diferència important, però no significativa entre el grup control i el ratolí KO per $\text{TCR-}\alpha/\beta^{-/-}$. En general, no va haver-hi grans diferències entre els grups independentment de la setmana monitoritzada. De nou, creiem que la causa d'això és la gran virulència de la soca control feta servir.

L'expressió de RANTES no va mostrar cap canvi destacable entre els diferents ratolins i setmanes. Potser cal fer notar que l'expressió d'aquesta quimiocina en els ratolins $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ a la setmana 4 va ser alta si pensem que el principal inductor de l'expressió del RANTES és el $\text{IFN-}\gamma$, podem interpretar-ho com un contrabanç per part dels altres inductors de l'expressió com $\text{IL-1-}\alpha$, TNF i el LAM.

L'expressió de iNOS ve modulada per l'acció del $\text{IFN-}\gamma$ en el macròfag i així queda de manifest en els nivells més baixos del ratolí $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$. Notablement, cal destacar uns

nivells més alts d'aquesta molècula en ratolins TNF^{-/-} que podria estar relacionat amb la capacitat de la formació del granuloma. Si aquest no es forma correctament, no hi ha una contenció física de la infecció i és possible que es necessiti més mecanismes bactericides combinat amb una major inducció de IFN- γ .

Finalment, respecte a l'expressió de TNF, observem uns nivells més alts en els ratolins NOS2^{-/-}. Això es podria explicar per una necessitat de contenció i de formació d'estructures capaces d'evitar la disseminació del bacil i que facin sinèrgia amb el IFN- γ en l'activació dels macròfags ja que un dels mecanismes principals per la destrucció del bacil està inactivat.

3.3.3 Determinació de l'expressió genètica de *M. tuberculosis*

Pel que fa a l'estudi de l'expressió bacteriana de l'antigen 85B cal destacar els nivells més baixos dels ratolins KOs en general. En un principi, aquests ratolins no són capaços d'aturar el creixement del bacil i sucumbeixen ràpidament a la infecció. En el mateix sentit, és lògic interpretar que si el bacil té facilitats per créixer, l'expressió d'un marcador d'activitat, de replicació i de biogènesi de la paret hauria de ser més elevada en aquests animals. Cal tenir en compte la limitació de tenir només una mesura de la seva activitat i no una evolució en el temps.

De totes formes, els ratolins IFN- γ ^{-/-}, TNF^{-/-}, TCR- α/β ^{-/-}, NOS2^{-/-} són incapaçs de fer una resposta de tipus Th1 de forma completa i per tant, el creixement bacil·lar en aquests animals inicialment va ser més important que en els ratolins control, tot i recordant la virulència associada a la soca control. La interpretació més lògica cau sota la idea de que aquests bacils han arribat a un màxim de creixement dins de l'hostatger i aquest està a punt de morir. En aquest moment, el bacil ha consumit la majoria de recursos del ratolí i la seva capacitat de creixement es veu limitada. Aquest fet succeeix a setmana 4, 5 i 6, respectivament, en funció de la capacitat de resposta immune.

Respecte a l'expressió de la isocitrat liasa, observem diferències molt interessants en els ratolins KOs. Per exemple, els nivells de *icl* als ratolins IFN- γ ^{-/-} són inexistents. Aquests bacils estan creixent en un ambient favorable i en cap moment han d'establir un metabolisme alternatiu al aeròbic ja que no existeix una necessitat de fer-ho. Aquest fet coincidiria amb l'evolució trobada als ratolins control amb uns nivells baixos a l'inici de la infecció on el creixement és gairebé exponencial per a augmentar notablement quan el

creixement s'alenteix. Això mateix passa en els ratolins TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$ i en menor grau, encara que significatiu, en els ratolins TNF $^{-/-}$ i NOS2 $^{-/-}$.

L'expressió de *acr* és 0 en tots els ratolins KOs. Cal dir que en els ratolins IFN- $\gamma^{-/-}$, TNF $^{-/-}$, TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$, NOS2 $^{-/-}$ el creixement del bacil és més o menys incontrolat i que el seu creixement és molt important. Aquests bacils no tenen cap necessitat d'induir una entrada en fase de latència ja que les condicions són favorables pel seu creixement i per tant, el Acr no és necessari en cap moment.

L'expressió de *sigE* és molt baixa en els ratolins IFN- $\gamma^{-/-}$, TNF $^{-/-}$, TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$, NOS2 $^{-/-}$. En part, aquest factor sigma està involucrat en la resposta a determinats factors d'estrès com ara el calor, els ROIs, per presència de detergents. En un principi, podem pensar que en aquesta ratolins l'ambient de creixement és favorable i els nivells d'estrès per la micobactèria no són molt importants. A més, sembla que la seva relació amb la virulència es veuria limitada a la fisiologia i estructura de la paret micobacteriana (151).

De forma anàloga, no detectem expressió de *sigF* en els bacils que infecten als ratolins IFN- $\gamma^{-/-}$, TNF $^{-/-}$, TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$, NOS2 $^{-/-}$. Aquest factor sigma sembla estar molt relacionat amb la fase de latència i potser aquesta és la raó per la qual en aquests ratolins no trobem cap expressió. Com ja hem comentat anteriorment, en aquests ratolins les condicions de creixement són molt favorables i no hi ha necessitat d'entrar en fase de latència.

Per últim, observem uns nivells baixos de *sigH* respecte al control en els ratolins IFN- $\gamma^{-/-}$, TNF $^{-/-}$, TCR- $\alpha/\beta^{-/-}$, NOS2 $^{-/-}$. Aquest factor s'ha identificat com dispensable pel creixement i la supervivència (175) però més d'un 30% dels gens que cauen sota el seu control no tenen funció associada. A més, està involucrat en la modulació d'altres factors sigma.

CONCLUSIONS

Conclusions referents a l'estudi de la susceptibilitat murina a la infecció per *M. tuberculosis* en un model per aerosol

1. La susceptibilitat a la infecció de la soca de ratolí DBA/2 és més important que no pas la dels ratolins C57BL/6 degut a que permetrien una major disseminació broncògena a través dels macròfags escumosos infectats.
2. L'expressió important de IFN- γ , RANTES i ICAM-1 recolzaria la resposta de tipus Th1, fet que explica les concentracions bacil·lars més baixes als pulmons de ratolins C57BL/6.
3. Els ratolins DBA/2, amb una resposta de tipus Th1 menor, presenten una concentració bacil·lar més important amb una estructura granulomatosa no tan ben definida i sense un control clar de la patologia pulmonar.
4. La soca de ratolí C57Bl/6 seria la més adequada per a l'estudi de la latència ja que reproduïx millor les condicions d'infecció humanes encara que no existeixi cavitació i que l'animal finalment mori per ocupació de l'espai pulmonar.

Conclusions referents a l'estudi de la resposta d'un cultiu en fase exponencial i estacionària a un xoc àcid.

1. En els cultius de *M. tuberculosis* en creixement exponencial sotmesos a l'acidificació, els factors sigma podrien jugar un paper molt important en el desenvolupament de bacils latents que no serien detectables en condicions normals de cultiu.
2. En els cultius de *M. tuberculosis* en fase estacionària, predominarien els bacils adaptats a l'estrès on l'expressió de *acr*, *fbpB* i de *id* hi jugaria un paper important.
3. L'expressió de Rv0834c només va estar present en cultius en fase estacionària, fet que es relaciona amb una millor resposta a les condicions de pH.

4. El metabolisme del nitrogen no sembla estar involucrat en l'obtenció d'energia en cap fase de creixement de *M. tuberculosis*, donada la manca l'expressió de *nirA* i *narG*.

Conclusions referents a l'estudi de l'expressió bacteriana en diversos models murins

1. En la fase crònica de la infecció, l'expressió d'*acr*, *fbpB*, i *icl* s'incrementa en les fases on la resposta immune genera molta destrucció bacil·lar. Aquest fet es podria relacionar amb una adaptació a l'estrès.
2. Quan la resposta immune cedeix i la concentració bacil·lar augmenta, l'expressió d'aquests gens també disminueix, fet que recolza la seva relació amb l'estrès.
3. Dins d'aquests factors, el que és més sensible a aquesta dinàmica és *icl*, i *acr*.
4. L'expressió de *fbpB* també reflexa aquesta dinàmica, i a més a més és el que genera uns nivells d'expressió més alts.
5. Els factors sigma A, M i G tenen un comportament similar.
6. La manca d'expressió de *acr*, *icl* i en els ratolins TNF, IFN- γ i iNOS KO recolzen el paper primordial d'aquests gens en la supervivència dels bacils en condicions d'estrès.

Conclusions finals

1. Els gens *icl*, *acr*, podrien ser uns bons marcadors de latència en el model de tuberculosi en ratolins. El paper de l'expressió dels factors sigma com a marcadors és incert i calen nous estudis per esbrinar-lo.

BIBLIOGRAFIA

1. The World Health Organization Global Tuberculosis Program. <http://www.who.int/gtb/> (ultimo accés 6/03)
2. Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 163:1009-21.
3. Koch R. 1891. Weitere Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberculose. *Dtsch Med Wochenschr*; 171: 101-102
4. Amberson, J. 1938. The significance of latent forms of tuberculosis. *N Engl J Med* 219:572-6.
5. Báguena-Cervellera MJ. 1992. La tuberculosi i la seva història. Col·lecció Històrica de Ciències de la Salut. Barcelona: Fundació Uriach 1838
6. Bhatt, K., S. P. Hickman, and P. Salgame. 2004. Cutting edge: A new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol* 172:2748-51.
7. Orme, I. M., and F. M. Collins. 1983. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. *J Exp Med* 158:74-83.
8. Armstrong, J. A., and P. D. Hart. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142:1-16.
9. Pearlman, E., J. W. Kazura, F. E. Hazlett, Jr., and W. H. Boom. 1993. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. *J Immunol* 151:4857-64.
10. Middlebrook G., Dubos RJ., Pierce CH. 1947. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J Exp Med*; 86: 175-184
11. Dannenberg Jr AM., Tomaszefski JF Jr. 1988. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. In Pishman AP (ed): *Pulmonary diseases and disorders*. 2nd edition. Mc Graw – Hill. New York. 1821-1842
12. Lurie MB. 1932. The correlation between the histopathological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. *J Exp Med*; 55: 31-58
13. Lurie MB. 1939. Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis: the role of extracellular factors and local immunity in the fixation and inhibition of growth of tubercle bacilli. *J Exp Med*; 69: 555-578
14. Cardona, P. J., R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, I. Ojanguren, A. Ariza, and V. Ausina. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 52:156-63.

15. Orme, I. M., A. D. Roberts, J. P. Griffin, and J. S. Abrams. 1993. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 151:518-25.
16. D'Souza, C. D., A. M. Cooper, A. A. Frank, R. J. Mazzaccaro, B. R. Bloom, and I. M. Orme. 1997. An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 158:1217-21.
17. Lin, Y., J. Gong, M. Zhang, W. Xue, and P. F. Barnes. 1998. Production of monocyte chemoattractant protein 1 in tuberculosis patients. *Infect Immun* 66:2319-22.
18. Bloom, B. R., J. Flynn, K. McDonough, Y. Kress, and J. Chan. 1994. Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in *M. tuberculosis* infection. *Immunobiology* 191:526-36.
19. Carding, S. R. 1998. Role of gamma delta T cells in immunity to infectious diseases and the regulation of hematolymphoid cell development. *Immunol Res* 17:13-22.
20. Mogue, T., M. E. Goodrich, L. Ryan, R. LaCourse, and R. J. North. 2001. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med* 193:271-80.
21. Flynn, J. L., and J. D. Ernst. 2000. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol* 12:432-6.
22. Serbina, N. V., and J. L. Flynn. 1999. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 67:3980-8.
23. Vermaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht, and R. A. Pauwels. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193:51-60.
24. Gonzalez-Juarrero, M., and I. M. Orme. 2001. Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69:1127-33.
25. Hickman, S. P., J. Chan, and P. Salgame. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol* 168:4636-42.
26. Detanico, T., L. Rodrigues, A. C. Sabritto, M. Keisermann, M. E. Bauer, H. Zwickey, and C. Bonorino. 2004. *Mycobacterial* heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin Exp Immunol* 135:336-42
27. Cooper, A. M., A. D. Roberts, E. R. Rhoades, J. E. Callahan, D. M. Getzy, and I. M. Orme. 1995. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 84:423-32.

28. Ehrt, S., D. Schnappinger, S. Bekiranov, J. Drenkow, S. Shi, T. R. Gingeras, T. Gaasterland, G. Schoolnik, and C. Nathan. 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* 194:1123-40
29. Kincaid, E. Z., and J. D. Ernst. 2003. Mycobacterium tuberculosis exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN-gamma without inhibiting STAT1 function. *J Immunol* 171:2042-9
30. Qiao, Y., S. Prabhakar, A. Canova, Y. Hoshino, M. Weiden, and R. Pine. 2004. Posttranscriptional inhibition of gene expression by Mycobacterium tuberculosis offsets transcriptional synergism with IFN-gamma and posttranscriptional up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol* 172:2935-43.
31. MacMicking, J. D., G. A. Taylor, and J. D. McKinney. 2003. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302:654-9
32. Kindler, V., A. P. Sappino, G. E. Grau, P. F. Piguet, and P. Vassalli. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56:731-40.
33. Wallis, R. S., M. Amir-Tahmasseb, and J. J. Ellner. 1990. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte western blot. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3348-52.
34. Plataniias, L. C., and N. J. Vogelzang. 1990. Interleukin-1: biology, pathophysiology, and clinical prospects. *Am J Med* 89:621-9.
35. Barnes, P. F., D. Chatterjee, J. S. Abrams, S. Lu, E. Wang, M. Yamamura, P. J. Brennan, and R. L. Modlin. 1992. Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J Immunol* 149:541-7.
36. Zhang, Y., M. Doerfler, T. C. Lee, B. Guillemin, and W. N. Rom. 1993. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by Mycobacterium tuberculosis components. *J Clin Invest* 91:2076-83.
37. Rhoades, E. R., A. M. Cooper, and I. M. Orme. 1995. Chemokine response in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 63:3871-7.
38. Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel, and M. M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345:1098-104
39. Zganiacz, A., M. Santosuosso, J. Wang, T. Yang, L. Chen, M. Anzulovic, S. Alexander, B. Gicquel, Y. Wan, J. Bramson, M. Inman, and Z. Xing. 2004. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 113:401-13

40. Cardona, P. J., S. Gordillo, J. Diaz, G. Tapia, I. Amat, A. Pallares, C. Vilaplana, A. Ariza, and V. Ausina. 2003. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71:5845-54
41. Florido, M., R. Appelberg, I. M. Orme, and A. M. Cooper. 1997. Evidence for a reduced chemokine response in the lungs of beige mice infected with *Mycobacterium avium*. *Immunology* 90:600-6.
42. Leonard, E. J., and T. Yoshimura. 1990. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11:97-101.
43. Appelberg, R. 1992. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J Leukoc Biol* 51:472-7.
44. Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik, and C. Caux. 2000. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 192:705-18.
45. Chensue, S. W., K. S. Warmington, E. J. Allenspach, B. Lu, C. Gerard, S. L. Kunkel, and N. W. Lukacs. 1999. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* 163:165-73.
46. Taub, D. D., S. M. Turcovski-Corrales, M. L. Key, D. L. Longo, and W. J. Murphy. 1996. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol* 156:2095-2103.
47. Lurie MB and Dannenberg Jr. AM. 1965. Macrophage function in infectious disease with inbred rabbits. *Bacteriol Rev.* 466-476
48. Pierce C. Dubos RJ. Middlebrook G. 1947. Infection of mice with mammalian tubercle bacilli grown in tween-albuminum liquid medium. *J. Exp. Med;* 86: 159-174
49. Medina, E. and R. J. North. 1998. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp1* genotype. *Immunology* 93(2): 270-4.
50. Medina, E. and R. J. North. 1996. Evidence inconsistent with a role for the *Bcg* gene (*Nramp1*) in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 183(3): 1045-51.
51. Medina, E. and R. J. North. 1999. Genetically susceptible mice remain proportionally more susceptible to tuberculosis after vaccination. *Immunology* 96(1): 16-21.
52. Kida, K., Y. Fujino, and W. M. Thurlbeck. 1989. A comparison of lung structure in male DBA and C57 black mice and their F1 offspring. *Am Rev Respir Dis* 139:1238-43.

53. Mitsos, L. M., L. R. Cardon, A. Fortin, L. Ryan, R. LaCourse, R. J. North, and P. Gros. 2000. Genetic control of susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Genes Immun* 1:467-77.
54. Mitsos, L. M., L. R. Cardon, L. Ryan, R. LaCourse, R. J. North, and P. Gros. 2003. Susceptibility to tuberculosis: a locus on mouse chromosome 19 (Tr1-4) regulates *Mycobacterium tuberculosis* replication in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6610-5.
55. Kramnik, I., P. Demant, and B. B. Bloom. 1998. Susceptibility to tuberculosis as a complex genetic trait: analysis using recombinant congenic strains of mice. *Novartis Found Symp* 217:120-31; discussion 132-7.
56. Kramnik, I., W. F. Dietrich, P. Demant, and B. R. Bloom. 2000. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8560-5.
57. Kelley, C. L., and F. M. Collins. 1999. Growth of a highly virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* in mice of differing susceptibility to tuberculous challenge. *Tuber Lung Dis* 79:367-70.
58. Lopez, B., D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, and D. van Soolingen. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 133:30-7.
59. Turner, J., M. Gonzalez-Juarrero, B. M. Saunders, J. V. Brooks, P. Marietta, D. L. Ellis, A. A. Frank, A. M. Cooper, and I. M. Orme. 2001. Immunological basis for reactivation of tuberculosis in mice. *Infect Immun* 69:3264-70.
60. Lyadova, I. V., E. B. Eruslanov, S. V. Khaidukov, V. V. Yermeev, K. B. Majorov, A. V. Pichugin, B. V. Nikonenko, T. K. Kondratieva, and A. S. Apt. 2000. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to *Mycobacterium tuberculosis*-triggered disease. *J Immunol* 165:5921-31.
61. Orme, I. M. 2003. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 83:112-5
62. Eruslanov, E. B., K. B. Majorov, M. O. Orlova, V. V. Mischenko, T. K. Kondratieva, A. S. Apt, and I. V. Lyadova. 2004. Lung cell responses to *M. tuberculosis* in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge. *Clin Exp Immunol* 135:19-28.
63. Chackerian, A. A., T. V. Perera, and S. M. Behar. 2001. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69:2666-74.
64. Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14459-63.

65. Peters, W., H. M. Scott, H. F. Chambers, J. L. Flynn, I. F. Charo, and J. D. Ernst. 2001. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7958-63.
66. Drennan, M. B., D. Nicolle, V. J. Quesniaux, M. Jacobs, N. Allie, J. Mpagi, C. Fremond, H. Wagner, C. Kirschning, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol* 164:49-57.
67. Shim, T. S., O. C. Turner, and I. M. Orme. 2003. Toll-like receptor 4 plays no role in susceptibility of mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)* 83:367-71.
68. Takeda, K., O. Takeuchi, and S. Akira. 2002. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 8:459-63.
69. Sánchez González MA. 1990. Experimentación y derechos de los animales: su historia y fundamentos éticos. *med Clin (Barc.)* 95:217-220
70. Council of Europe. 1986. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European reaty Seies. N° 123. Council of Europe. Strasbourg* 1-51
71. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Real Decreto 223/1988. 14 de Marzo 1988. *BOE N67 18-3-1988*
72. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Orden de 13 de Octubre de 1989 *BOE N250 18-10-1989*
73. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo. *BOE N256 25-10-1990*
74. Zutphen L F M van. 1986. Genetics of laboratory animals. In : Ruitenberg J, Peteres P, eds. *World animals science. Amsterdam: Elsevier Science Publishers:47-84*
75. Middlebrook G. 1952. An apparatus for airborne infection in mice. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1952; 80:105-110
76. Lurie MB, Zappasodi P and Tickner C. 1955. On the nature of genetic resistance to tuberculosis in the light of the host-parasite relationships in natively resistant and susceptible rabbits. *Am Rev Tuberc*; 72:297-321
77. Shier DR., Long MW. 1971. The relation between infection dosage and median survival in tuberculous guinea pigs. *A Rev Respri dis*; 104: 206-214.
78. Foster, HL. *The mouse in Biomedical research, Vol I. Ac. Press, NY. 1981*
79. Morse HC III (ed). *Origins of Inbred Mice. Academic Press, NY. 1978.*
80. Philipp, W. J., S. Poulet, K. Eiglmeier, L. Pascopella, V. Balasubramanian, B. Heym, S. Bergh, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr., and S. T. Cole. 1996. An integrated map of the

- genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3132-7.
81. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, and et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-44.
 82. Flores, J., and C. Espitia. 2003. Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Gene* 318:75-81.
 83. Brennan, M. J., G. Delogu, Y. Chen, S. Bardarov, J. Kriakov, M. Alavi, and W. R. Jacobs, Jr. 2001. Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun* 69:7326-33.
 84. Karlin, S., A. M. Campbell, and J. Mrazek. 1998. Comparative DNA analysis across diverse genomes. *Annu Rev Genet* 32:185-225.
 85. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573-80.
 86. Barclay, R., and P. R. Wheeler. 1989. Metabolism of mycobacteria in tissues, p. 37–106. In C. Ratledge, J. Stanford, and J. M. Grange (ed.), *Clinical aspects of mycobacterial disease*. Academic Press, London, United Kingdom.
 87. Ratledge C and Stanford J (eds) 1982 *The biology of mycobacteria vol. 1* (London, New York: Academic Press)
 88. Stahl, D. A., and J. W. Urbance. 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172:116-124
 89. Sander, P., A. Meier, and E. C. Bottger. 1996. Ribosomal drug resistance in mycobacteria. *Res Microbiol* 147:59-67.
 90. Gonzalez-y-Merchand, A, Colston, MJ, and R. A. Cox. Roles of Multiple Promoters in Transcription of Ribosomal DNA: Effects of Growth Conditions on Precursor rRNA Synthesis in *Mycobacteria*. *JB*, 180:5756-5761
 91. Deretic, V., L. E. Via, R. A. Fratti, and D. Deretic. 1997. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis* 18:2542-7.
 92. Yuan, Y., R. E. Lee, G. S. Besra, J. T. Belisle, and C. E. Barry, 3rd. 1995. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6630-4.
 93. Senaldi, G., S. Yin, C. L. Shaklee, P. F. Piguet, T. W. Mak, and T. R. Ulich. 1996. *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced

- granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J Immunol* 157:5022-6.
94. Balcewicz-Sablinska, M. K., J. Keane, H. Kornfeld, and H. G. Remold. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 161:2636-41.
 95. Wayne, L. G., and K. Y. Lin. 1982. Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun* 37:1042-9.
 96. Dubnau, E., P. Fontan, R. Manganelli, S. Soares-Appel, and I. Smith. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages. *Infect Immun* 70:2787-95.
 97. McKinney, J. D., K. Honer zu Bentrup, E. J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W. T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchetti, W. R. Jacobs, Jr., and D. G. Russell. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406:735-8.
 98. Shi, L., Y. J. Jung, S. Tyagi, M. L. Gennaro, and R. J. North. 2003. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:241-6.
 99. Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11554-9.
 100. Honer Zu Bentrup, K., A. Miczak, D. L. Swenson, and D. G. Russell. 1999. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 181:7161-7.
 101. Fenhalls, G., L. Stevens, L. Moses, J. Bezuidenhout, J. C. Betts, P. Helden Pv, P. T. Lukey, and K. Duncan. 2002. In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infect Immun* 70:6330-8.
 102. Saviola, B., S. C. Woolwine, and W. R. Bishai. 2003. Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based in vivo expression technology. *Infect Immun* 71:1379-88.
 103. Camacho, L. R., D. Ensergueix, E. Perez, B. Gicquel, and C. Guilhot. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34:257-67.
 104. Raynaud, C., C. Guilhot, J. Rauzier, Y. Bordat, V. Pelicic, R. Manganelli, I. Smith, B. Gicquel, and M. Jackson. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 45:203-17.

105. Hondalus, M. K., S. Bardarov, R. Russell, J. Chan, W. R. Jacobs, Jr., and B. R. Bloom. 2000. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 68:2888-98.
106. Smith, D. A., T. Parish, N. G. Stoker, and G. J. Bancroft. 2001. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 69:1142-50.
107. Jackson, M., S. W. Phalen, M. Lagranderie, D. Ensergueix, P. Chavarot, G. Marchal, D. N. McMurray, B. Gicquel, and C. Guilhot. 1999. Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect Immun* 67:2867-73.
108. Smith, R. L., and M. E. Maguire. 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol Microbiol* 28:217-26.
109. Buchmeier, N., A. Blanc-Potard, S. Ehrt, D. Piddington, L. Riley, and E. A. Groisman. 2000. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 35:1375-82.
110. Gold, B., G. M. Rodriguez, S. A. Marras, M. Pentecost, and I. Smith. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 42:851-65.
111. Lounis, N., C. Truffot-Pernot, J. Grosset, V. R. Gordeuk, and J. R. Boelaert. 2001. Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Virol* 20:123-6.
112. Manabe, Y. C., B. J. Saviola, L. Sun, J. R. Murphy, and W. R. Bishai. 1999. Attenuation of virulence in *Mycobacterium tuberculosis* expressing a constitutively active iron repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12844-8.
113. Rodriguez, G. M., M. I. Voskuil, B. Gold, G. K. Schoolnik, and I. Smith. 2002. ideR, An essential gene in *mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun* 70:3371-81.
114. Fritz, C., S. Maass, A. Kreft, and F. C. Bange. 2002. Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infect Immun* 70:286-91.
115. Heym, B., E. Stavropoulos, N. Honore, P. Domenech, B. Saint-Joanis, T. M. Wilson, D. M. Collins, M. J. Colston, and S. T. Cole. 1997. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 65:1395-401.
116. Marcinkeviciene, J. A., R. S. Magliozzo, and J. S. Blanchard. 1995. Purification and characterization of the *Mycobacterium smegmatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. *J Biol Chem* 270:22290-5.

117. Cardona, P. J., S. Gordillo, I. Amat, J. Diaz, J. Lonca, C. Vilaplana, A. Pallares, R. Llatjos, A. Ariza, and V. Ausina. 2003. Catalase-peroxidase activity has no influence on virulence in a murine model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 83:351-9.
118. Dussurget, O., G. Stewart, O. Neyrolles, P. Pescher, D. Young, and G. Marchal. 2001. Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxide dismutase. *Infect Immun* 69:529-33.
119. Perez, E., S. Samper, Y. Bordas, C. Guilhot, B. Gicquel, and C. Martin. 2001. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 41:179-87.
120. Groisman, E. A. 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183:1835-42.
121. Soto, C. Y., M. C. Menendez, E. Perez, S. Samper, A. B. Gomez, M. J. Garcia, and C. Martin. 2004. IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 42:212-9.
122. Dasgupta, N., V. Kapur, K. K. Singh, T. K. Das, S. Sachdeva, K. Jyothisri, and J. S. Tyagi. 2000. Characterization of a two-component system, *devR-devS*, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 80:141-59.
123. Sherman, D. R., M. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M. I. Harrell, and G. K. Schoolnik. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7534-9.
124. Parish, T., D. A. Smith, S. Kendall, N. Casali, G. J. Bancroft, and N. G. Stoker. 2003. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71:1134-40.
125. O'Toole, R., M. J. Smeulders, M. C. Blokpoel, E. J. Kay, K. Lougheed, and H. D. Williams. 2003. A two-component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 185:1543-54.
126. Mayuri, G. Bagchi, T. K. Das, and J. S. Tyagi. 2002. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. *FEMS Microbiol Lett* 211:231-7.
127. Zahrt, T. C., and V. Deretic. 2000. An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 182:3832-8.
128. Wernisch, L., S. L. Kendall, S. Soneji, A. Wietzorrek, T. Parish, J. Hinds, P. D. Butcher, and N. G. Stoker. 2003. Analysis of whole-genome microarray replicates using mixed models. *Bioinformatics* 19:53-61.
129. Malhotra, V., D. Sharma, V. D. Ramanathan, H. Shakila, D. K. Saini, S. Chakravorty, T. K. Das, Q. Li, R. F. Silver, P. R. Narayanan, and J. S. Tyagi. 2004.

- Disruption of response regulator gene, *devR*, leads to attenuation in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 231:237-45.
130. Stewart, G. R., V. A. Snewin, G. Walzl, T. Hussell, P. Tormay, P. O'Gaora, M. Goyal, J. Betts, I. N. Brown, and D. B. Young. 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med* 7:732-7.
 131. Avarbock, D., J. Salem, L. S. Li, Z. M. Wang, and H. Rubin. 1999. Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 233:261-9.
 132. Primm, T. P., S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, and C. E. Barry, 3rd. 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* 182:4889-98.
 133. Dahl, J. L., C. N. Kraus, H. I. Boshoff, B. Doan, K. Foley, D. Avarbock, G. Kaplan, V. Mizrahi, H. Rubin, and C. E. Barry, 3rd. 2003. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10026-31.
 134. Andersen, P., D. Askgaard, L. Ljungqvist, J. Bennedsen, and I. Heron. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 59:1905-10.
 135. Andersen, P. 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 62:2536-44.
 136. Roberts, A. D., M. G. Sonnenberg, D. J. Ordway, S. K. Furney, P. J. Brennan, J. T. Belisle, and I. M. Orme. 1995. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 85:502-8.
 137. Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh, and C. K. Stover. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178:1274-82.
 138. Wards, B. J., G. W. de Lisle, and D. M. Collins. 2000. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tuber Lung Dis* 80:185-9.
 139. Skjot, R. L., T. Oettinger, I. Rosenkrands, P. Ravn, I. Brock, S. Jacobsen, and P. Andersen. 2000. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun* 68:214-20.
 140. Young, R. A., B. R. Bloom, C. M. Grosskinsky, J. Ivanyi, D. Thomas, and R. W. Davis. 1985. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2583-7.

141. Verbon, A., R. A. Hartskeerl, A. Schuitema, A. H. Kolk, D. B. Young, and R. Lathigra. 1992. The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. *J Bacteriol* 174:1352-9.
142. Yuan, Y., D. D. Crane, and C. E. Barry, 3rd. 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 178:4484-92.
143. Cunningham, A. F., and C. L. Spreadbury. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 180:801-8.
144. Yuan, Y., D. D. Crane, R. M. Simpson, Y. Q. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman, and C. E. Barry, 3rd. 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9578-83.
145. Desjardin, L. E., L. G. Hayes, C. D. Sohaskey, L. G. Wayne, and K. D. Eisenach. 2001. Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 183:5311-6.
146. Garbe, T. R., N. S. Hibler, and V. Deretic. 1999. Response to reactive nitrogen intermediates in *Mycobacterium tuberculosis*: induction of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors. *Infect Immun* 67:460-5.
147. Monahan, I. M., J. Betts, D. K. Banerjee, and P. D. Butcher. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* 147:459-71.
148. Berthet, F. X., M. Lagranderie, P. Gounon, C. Laurent-Winter, D. Ensergueix, P. Chavarot, F. Thouron, E. Maranghi, V. Pelicic, D. Portnoi, G. Marchal, and B. Gicquel. 1998. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science* 282:759-62.
149. Cox, J. S., B. Chen, M. McNeil, and W. R. Jacobs, Jr. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402:79-83.
150. Movahedzadeh, F., D. A. Smith, R. A. Norman, P. Dinadayala, J. Murray-Rust, D. G. Russell, S. L. Kendall, S. C. Rison, M. S. McAlister, G. J. Bancroft, N. Q. McDonald, M. Daffe, Y. Av-Gay, and N. G. Stoker. 2004. The *Mycobacterium tuberculosis* *ino1* gene is essential for growth and virulence. *Mol Microbiol* 51:1003-14.
151. Schnappinger, D., S. Ehrt, M. I. Voskuil, Y. Liu, J. A. Mangan, I. M. Monahan, G. Dolganov, B. Efron, P. D. Butcher, C. Nathan, and G. K. Schoolnik. 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* 198:693-704.
152. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V.

- Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-7.
153. Soulas, C., T. Baussant, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Barillat, G. Caron, T. Renno, J. Y. Bonnefoy, and P. Jeannin. 2000. Outer membrane protein A (OmpA) binds to and activates human macrophages. *J Immunol* 165:2335-40.
154. Doukhan, L., M. Predich, G. Nair, O. Dussurget, I. Mandic-Mulec, S. T. Cole, D. R. Smith, and I. Smith. 1995. Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene* 165:67-70.
155. Hughes, K. T., and K. Mathee. 1998. The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 52:231-86.
156. Collins, D. M., R. P. Kawakami, G. W. de Lisle, L. Pascopella, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1995. Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8036-40.
157. Dove, S. L., S. A. Darst, and A. Hochschild. 2003. Region 4 of sigma as a target for transcription regulation. *Mol Microbiol* 48:863-74.
158. Manganelli, R., E. Dubnau, S. Tyagi, F. R. Kramer, and I. Smith. 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 31:715-24.
159. Gomez, M., L. Doukhan, G. Nair, and I. Smith. 1998. sigA is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 29:617-28.
160. Wu, S., S. T. Howard, D. L. Lakey, A. Kipnis, B. Samten, H. Safi, V. Gruppo, B. Wizel, H. Shams, R. J. Basaraba, I. M. Orme, and P. F. Barnes. 2004. The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Mol Microbiol* 51:1551-62.
161. Hu, Y., and A. R. Coates. 1999. Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 181:469-76.
162. Manganelli, R., M. I. Voskuil, G. K. Schoolnik, and I. Smith. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 41:423-37.
163. Wayne, L. G., and C. D. Sohaskey. 2001. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 55:139-63.
164. Ando, M., T. Yoshimatsu, C. Ko, P. J. Converse, and W. R. Bishai. 2003. Deletion of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor E results in delayed time to death with bacterial persistence in the lungs of aerosol-infected mice. *Infect Immun* 71:7170-2.

165. Manganelli, R., L. Fattorini, D. Tan, E. Iona, G. Orefici, G. Altavilla, P. Cusatelli, and I. Smith. 2004. The extra cytoplasmic function sigma factor sigma(E) is essential for *Mycobacterium tuberculosis* virulence in mice. *Infect Immun* 72:3038-41.
166. Haldenwang, W. G. 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 59:1-30.
167. DeMaio, J., Y. Zhang, C. Ko, D. B. Young, and W. R. Bishai. 1996. A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2790-4.
168. Michele, T. M., C. Ko, and W. R. Bishai. 1999. Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis* sigF gene: implications for chemotherapy against mycobacterial persisters. *Antimicrob Agents Chemother* 43:218-25.
169. Hu, Y., and A. R. Coates. 2001. Increased levels of sigJ mRNA in late stationary phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis* detected by DNA array hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* 202:59-65.
170. DeMaio, J., Y. Zhang, C. Ko, and W. R. Bishai. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* sigF is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis* sigF and sigB operons. *Tuber Lung Dis* 78:3-12.
171. Chen, P., R. E. Ruiz, Q. Li, R. F. Silver, and W. R. Bishai. 2000. Construction and characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF. *Infect Immun* 68:5575-80.
172. Geiman, D. E., D. Kaushal, C. Ko, S. Tyagi, Y. C. Manabe, B. G. Schroeder, R. D. Fleischmann, N. E. Morrison, P. J. Converse, P. Chen, and W. R. Bishai. 2004. Attenuation of late-stage disease in mice infected by the *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis. *Infect Immun* 72:1733-45.
173. Manganelli, R., M. I. Voskuil, G. K. Schoolnik, E. Dubnau, M. Gomez, and I. Smith. 2002. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol* 45:365-74.
174. Raman, S., T. Song, X. Puyang, S. Bardarov, W. R. Jacobs, Jr., and R. N. Husson. 2001. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 183:6119-25.
175. Kaushal, D., B. G. Schroeder, S. Tyagi, T. Yoshimatsu, C. Scott, C. Ko, L. Carpenter, J. Mehrotra, Y. C. Manabe, R. D. Fleischmann, and W. R. Bishai. 2002. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8330-5.
176. Nagy, I., and R. De Mot. 1999. Sequence analysis of the oxidase/reductase genes upstream of the *Rhodococcus erythropolis* aldehyde dehydrogenase gene thcA reveals a gene organisation different from *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA Seq* 10:61-6.

177. Arraiz, N., L. Salazar, G. Lopez, R. Rodriguez, Y. Casart, and H. Takiff. 2001. [Characterization of the expression and function of SigM an ECF sigma factor in mycobacteria]. *Acta Cient Venez* 52 Suppl 1:40-1.
178. Sun, R., P. J. Converse, C. Ko, S. Tyagi, N. E. Morrison, and W. R. Bishai. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol Microbiol* 52:25-38.
179. Al-Zarouni, M., and J. W. Dale. 2002. Expression of foreign genes in *Mycobacterium bovis* BCG strains using different promoters reveals instability of the hsp60 promoter for expression of foreign genes in *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Tuberculosis (Edinb)* 82:283-91.
180. Missiakas, D., and S. Raina. 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* 28:1059-66.
181. Kang, J. G., M. S. Paget, Y. J. Seok, M. Y. Hahn, J. B. Bae, J. S. Hahn, C. Kleanthous, M. J. Buttner, and J. H. Roe. 1999. RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *Embo J* 18:4292-8.
182. Jensen-Cain, D. M., and F. D. Quinn. 2001. Differential expression of sigE by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. *Microb Pathog* 30:271-8.
183. Raivio, T. L., and T. J. Silhavy. 2001. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 55:591-624.
184. Beaucher, J., S. Rodrigue, P. E. Jacques, I. Smith, R. Brzezinski, and L. Gaudreau. 2002. Novel *Mycobacterium tuberculosis* anti-sigma factor antagonists control sigmaF activity by distinct mechanisms. *Mol Microbiol* 45:1527-40.
185. Young, D. B., A. Mehlert, V. Bal, P. Mendez-Samperio, J. Ivanyi, and J. R. Lamb. 1988. Stress proteins and the immune response to mycobacteria--antigens as virulence factors? *Antonie Van Leeuwenhoek* 54:431-9.
186. Lindquist, S., and E. A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-77.
187. Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-9.
188. Young, D. B., and T. R. Garbe. 1991. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 59:3086-93.
189. Fernandes, N. D., Q. L. Wu, D. Kong, X. Puyang, S. Garg, and R. N. Husson. 1999. A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress. *J Bacteriol* 181:4266-74.
190. Fu, X., and Z. Chang. 2004. Temperature-dependent subunit exchange and chaperone-like activities of Hsp16.3, a small heat shock protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* 316:291-9.

191. Stewart, G. R., L. Wernisch, R. Stabler, J. A. Mangan, J. Hinds, K. G. Laing, D. B. Young, and P. D. Butcher. 2002. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* 148:3129-38.
192. De Voss, J. J., K. Rutter, B. G. Schroeder, and C. E. Barry, 3rd. 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J Bacteriol* 181:4443-51.
193. Finkelstein, R. A., C. V. Sciortino, and M. A. McIntosh. 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev Infect Dis* 5 Suppl 4:S759-77.
194. Jurado, R. L. 1997. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis* 25:888-95..
195. Olakanmi, O., B. E. Britigan, and L. S. Schlesinger. 2000. Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. *Infect Immun* 68:5619-27.
196. Olakanmi, O., L. S. Schlesinger, A. Ahmed, and B. E. Britigan. 2002. Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. *J Biol Chem* 277:49727-34.
197. Boechat, N., B. Lagier-Roger, S. Petit, Y. Bordat, J. Rauzier, A. J. Hance, B. Gicquel, and J. M. Reyat. 2002. Disruption of the gene homologous to mammalian Nramp1 in *Mycobacterium tuberculosis* does not affect virulence in mice. *Infect Immun* 70:4124-31.
198. Domenech, P., A. S. Pym, M. Cellier, C. E. Barry, 3rd, and S. T. Cole. 2002. Inactivation of the *Mycobacterium tuberculosis* Nramp orthologue (mntH) does not affect virulence in a mouse model of tuberculosis. *FEMS Microbiol Lett* 207:81-6.
199. Olakanmi, O., L. S. Schlesinger, A. Ahmed, and B. E. Britigan. 2004. The nature of extracellular iron influences iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis* residing within human macrophages. *Infect Immun* 72:2022-8.
200. Dumarey, C. H., V. Labrousse, N. Rastogi, B. B. Vargaftig, and M. Bachelet. 1994. Selective *Mycobacterium avium*-induced production of nitric oxide by human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 56:36-40.
201. Zhang, Y., M. J. Garcia, R. Lathigra, B. Allen, C. Moreno, J. D. van Embden, and D. Young. 1992. Alterations in the superoxide dismutase gene of an isoniazid-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 60:2160-5.
202. Doyle, A. G., G. Herbein, L. J. Montaner, A. J. Minty, D. Caput, P. Ferrara, and S. Gordon. 1994. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* 24:1441-5.
203. Wright, S. D., and S. C. Silverstein. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* 158:2016-23.

204. Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175:1111-22.
205. Deretic, V., W. Philipp, S. Dhandayuthapani, M. H. Mudd, R. Curcic, T. Garbe, B. Heym, L. E. Via, and S. T. Cole. 1995. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol* 17:889-900.
206. Dhandayuthapani, S., Y. Zhang, M. H. Mudd, and V. Deretic. 1996. Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of *ahpC* by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. *J Bacteriol* 178:3641-9.
207. Sherman, D. R., P. J. Sabo, M. J. Hickey, T. M. Arain, G. G. Mahairas, Y. Yuan, C. E. Barry, 3rd, and C. K. Stover. 1995. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6625-9.
208. MacMicking, J. D., R. J. North, R. LaCourse, J. S. Mudgett, S. K. Shah, and C. F. Nathan. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5243-8.
209. Scanga, C. A., V. P. Mohan, K. Tanaka, D. Alland, J. L. Flynn, and J. Chan. 2001. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun* 69:7711-7.
210. Chan, J., K. Tanaka, D. Carroll, J. Flynn, and B. R. Bloom. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63:736-40.
211. Flynn, J. L., C. A. Scanga, K. E. Tanaka, and J. Chan. 1998. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol* 160:1796-803.
212. Ottenhoff, T. H., D. Kumararatne, and J. L. Casanova. 1998. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 19:491-4.
213. Rockett, K. A., R. Brookes, I. Udalova, V. Vidal, A. V. Hill, and D. Kwiatkowski. 1998. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun* 66:5314-21.
214. Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, M. Thursz, H. C. Whittle, and A. V. Hill. 1999. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179:721-4.
215. Bose, M., P. Farnia, S. Sharma, D. Chattopadhyaya, and K. Saha. 1999. Nitric oxide dependent killing of mycobacterium tuberculosis by human mononuclear phagocytes from patients with active tuberculosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 12:69-79.

216. Ehrt, S., M. U. Shiloh, J. Ruan, M. Choi, S. Gunzburg, C. Nathan, Q. Xie, and L. W. Riley. 1997. A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186:1885-96.
217. Ruan, J., G. St John, S. Ehrt, L. Riley, and C. Nathan. 1999. noxR3, a novel gene from *Mycobacterium tuberculosis*, protects *Salmonella typhimurium* from nitrosative and oxidative stress. *Infect Immun* 67:3276-83.
218. Moskovitz, J., B. S. Berlett, J. M. Poston, and E. R. Stadtman. 1997. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9585-9.
219. Moskovitz, J., M. A. Rahman, J. Strassman, S. O. Yancey, S. R. Kushner, N. Brot, and H. Weissbach. 1995. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol* 177:502-7.
220. Ouellet, H., Y. Ouellet, C. Richard, M. Labarre, B. Wittenberg, J. Wittenberg, and M. Guertin. 2002. Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5902-7.
221. Ohno, H., G. Zhu, V. P. Mohan, D. Chu, S. Kohno, W. R. Jacobs, Jr., and J. Chan. 2003. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 5:637-48.
222. Pathania, R., N. K. Navani, A. M. Gardner, P. R. Gardner, and K. L. Dikshit. 2002. Nitric oxide scavenging and detoxification by the *Mycobacterium tuberculosis* haemoglobin, HbN in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45:1303-14.
223. Miller, B. H., R. A. Fratti, J. F. Poschet, G. S. Timmins, S. S. Master, M. Burgos, M. A. Marletta, and V. Deretic. 2004. *Mycobacteria* inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect Immun* 72:2872-8.
224. Durbach, S. I., S. J. Andersen, and V. Mizrahi. 1997. SOS induction in mycobacteria: analysis of the DNA-binding activity of a LexA-like repressor and its role in DNA damage induction of the *recA* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 26:643-53.
225. Movahedzadeh, F., M. J. Colston, and E. O. Davis. 1997. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (Bacillus-type SOS) box. *Microbiology* 143 (Pt 3):929-36.
226. Davis, E. O., E. M. Dullaghan, and L. Rand. 2002. Definition of the mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 184:3287-95.
227. Rand, L., J. Hinds, B. Springer, P. Sander, R. S. Buxton, and E. O. Davis. 2003. The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. *Mol Microbiol* 50:1031-42.

228. Dullaghan, E. M., P. C. Brooks, and E. O. Davis. 2002. The role of multiple SOS boxes upstream of the *Mycobacterium tuberculosis* *lexA* gene--identification of a novel DNA-damage-inducible gene. *Microbiology* 148:3609-15.
229. Ganesh, N., and K. Muniyappa. 2003. Characterization of DNA strand transfer promoted by *Mycobacterium smegmatis* RecA reveals functional diversity with *Mycobacterium tuberculosis* RecA. *Biochemistry* 42:7216-25.
230. Deretic, V., and R. A. Fratti. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* 31:1603-9.
231. Nyka, W. 1974. Studies on the effect of starvation on mycobacteria. *Infect Immun* 9:843-50.
232. Loebel, R. O., Shorr, E. & Richardson, H. B. 1933. *J. Bacteriol.* 26, 167-200.
233. Betts, J. C., P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam, and K. Duncan. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 43:717-31.
234. Primm, T. P., S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, and C. E. Barry, 3rd. 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* 182:4889-98.
235. Smith, D. A., T. Parish, N. G. Stoker, and G. J. Bancroft. 2001. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 69:1142-50.
236. Gordhan, B. G., D. A. Smith, H. Alderton, R. A. McAdam, G. J. Bancroft, and V. Mizrahi. 2002. Construction and phenotypic characterization of an auxotrophic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* defective in L-arginine biosynthesis. *Infect Immun* 70:3080-4.
237. Hondalus, M. K., S. Bardarov, R. Russell, J. Chan, W. R. Jacobs, Jr., and B. R. Bloom. 2000. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 68:2888-98.
238. Parish, T. 2003. Starvation survival response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 185:6702-6.
239. Canetti, G. 1955. *The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man*. Springer Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
240. Yeager, V. L. 1996. Learning gross anatomy: dissection and prosection. *Clin Anat* 9:57-9.
241. Wayne, L. G. 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:908-14.

242. Wayne, L. G., and L. G. Hayes. 1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 64:2062-9.
243. Wayne, L. G., and K. Y. Lin. 1982. Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun* 37:1042-9.
244. Wayne, L. G. 1977. Synchronized replication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 17:528-30.
245. Florczyk, M. A., L. A. McCue, A. Purkayastha, E. Currenti, M. J. Wolin, and K. A. McDonough. 2003. A family of *acr*-coregulated *Mycobacterium tuberculosis* genes shares a common DNA motif and requires Rv3133c (*dosR* or *devR*) for expression. *Infect Immun* 71:5332-43.
246. Park, H. D., K. M. Guinn, M. I. Harrell, R. Liao, M. I. Voskuil, M. Tompa, G. K. Schoolnik, and D. R. Sherman. 2003. Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 48:833-43.
247. Saini, D. K., V. Malhotra, D. Dey, N. Pant, T. K. Das, and J. S. Tyagi. 2004. DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR. *Microbiology* 150:865-75.
248. Foster, J. W., and H. K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 172:771-8.
249. O'Driscoll, B., C. G. Gahan, and C. Hill. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl Environ Microbiol* 62:1693-8.
250. Lee, I. S., J. Lin, H. K. Hall, B. Bearson, and J. W. Foster. 1995. The stationary-phase sigma factor sigma S (*RpoS*) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 17:155-67.
251. Blanc-Potard, A. B., and B. Lafay. 2003. MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol* 57:479-86.
252. Senaratne, R. H., H. Mobasheri, K. G. Papavinasundaram, P. Jenner, E. J. Lea, and P. Draper. 1998. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 180:3541-7.
253. Kartmann, B., S. Stenger, M. Niederweis, and S. Stengler. 1999. Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 181:6543-6.
254. Braunstein, G. M., R. M. Roman, J. P. Clancy, B. A. Kudlow, A. L. Taylor, V. G. Shylonsky, B. Jovov, K. Peter, T. Jilling, Ismailov, II, D. J. Benos, L. M. Schwiebert, J. G. Fitz, and E. M. Schwiebert. 2001. Cystic fibrosis transmembrane conductance

- regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem* 276:6621-30.
255. Teitelbaum, R., M. Cammer, M. L. Maitland, N. E. Freitag, J. Condeelis, and B. R. Bloom. 1999. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15190-5.
256. Zhang, Y., H. Zhang, and Z. Sun. 2003. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to weak acids. *J Antimicrob Chemother* 52:56-60.
257. Talaat, A. M., R. Lyons, S. T. Howard, and S. A. Johnston. 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4602-7.
258. Hackam, D. J., O. D. Rotstein, W. Zhang, S. Gruenheid, P. Gros, and S. Grinstein. 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 188:351-64.
259. Mwandumba, H. C., D. G. Russell, M. H. Nyirenda, J. Anderson, S. A. White, M. E. Molyneux, and S. B. Squire. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* resides in nonacidified vacuoles in endocytically competent alveolar macrophages from patients with tuberculosis and HIV infection. *J Immunol* 172:4592-8.
260. Henderson, R. A., S. C. Watkins, and J. L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159:635-43.
261. Aderem, A., and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
262. Schlesinger, L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150:2920-30.
263. Schlesinger, L. S., T. M. Kaufman, S. Iyer, S. R. Hull, and L. K. Marchiando. 1996. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol* 157:4568-75.
264. Schorey, J. S., M. C. Carroll, and E. J. Brown. 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277:1091-3.
265. Cywes, C., H. C. Hoppe, M. Daffe, and M. R. Ehlers. 1997. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* 65:4258-66.
266. Zaffran, Y., and J. J. Ellner. 1997. A coat of many complements. *Nat Med* 3:1078-9.

267. Zimmerli, S., S. Edwards, and J. D. Ernst. 1996. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:760-70.
268. Pasula, R., J. R. Wright, D. L. Kachel, and W. J. Martin, 2nd. 1999. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 103:483-90.
269. Turner, M. W. 1996. The lectin pathway of complement activation. *Res Immunol* 147:110-5.
270. Da Silva, R. P., B. F. Hall, K. A. Joiner, and D. L. Sacks. 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 143:617-22.
271. Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166:249-55.
272. Fortune, S. M., A. Solache, A. Jaeger, P. J. Hill, J. T. Belisle, B. R. Bloom, E. J. Rubin, and J. D. Ernst. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 172:6272-80.
273. Noss, E. H., R. K. Pai, T. J. Sellati, J. D. Radolf, J. Belisle, D. T. Golenbock, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 167:910-8.
274. Pancholi, P., A. Mirza, N. Bhardwaj, and R. M. Steinman. 1993. Sequestration from immune CD4+ T cells of mycobacteria growing in human macrophages. *Science* 260:984-6.
275. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-5.
276. Fenton, M. J., and D. T. Golenbock. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 64:25-32.
277. Hart, P. D., J. A. Armstrong, C. A. Brown, and P. Draper. 1972. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infect Immun* 5:803-7.
278. Desjardins, M., N. N. Nzala, R. Corsini, and C. Rondeau. 1997. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* 110 (Pt 18):2303-14.
279. Jahraus, A., T. E. Tjelle, T. Berg, A. Habermann, B. Storrie, O. Ullrich, and G. Griffiths. 1998. In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J Biol Chem* 273:30379-90.

280. Weidman, P. J. 1995. Anterograde transport through the Golgi complex: do Golgi tubules hold the key? *Trends Cell Biol* 5:302-5.
281. Mellman, I. 1992. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol* 172:39-45.
282. Claus, V., A. Jahraus, T. Tjelle, T. Berg, H. Kirschke, H. Faulstich, and G. Griffiths. 1998. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* 273:9842-51.
283. Beron, W., C. Alvarez-Dominguez, L. Mayorga, and P. D. Stahl. 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* 5:100-4.
284. Robinson, M. S., C. Watts, and M. Zerial. 1996. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* 84:13-21.
285. Via, L. E., D. Deretic, R. J. Ulmer, N. S. Hibler, L. A. Huber, and V. Deretic. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 272:13326-31.
286. Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 5:183-6.
287. Clague, M. J. 1999. Membrane transport: Take your fusion partners. *Curr Biol* 9:R258-60.
288. Mullock, B. M., N. A. Bright, C. W. Fearon, S. R. Gray, and J. P. Luzio. 1998. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 140:591-601.
289. Mullock, B. M., N. A. Bright, C. W. Fearon, S. R. Gray, and J. P. Luzio. 1998. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 140:591-601.
290. Fratti, R. A., J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic. 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5437-42.
291. Hmama, Z., K. Sendide, A. Talal, R. Garcia, K. Dobos, and N. E. Reiner. 2004. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Cell Sci* 117:2131-2140.
292. Heikinheimo, P., R. Helland, H. K. Leiros, I. Leiros, S. Karlsen, G. Evjen, R. Ravelli, G. Schoehn, R. Ruigrok, O. K. Tollersrud, S. McSweeney, and E. Hough. 2003. The structure of bovine lysosomal alpha-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *J Mol Biol* 327:631-44.

293. Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. Van Kooyk. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197:7-17
294. Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, P. H. Schlesinger, and D. G. Russell. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 160:1290-6.
295. Denis, M. 1991. Growth of Mycobacterium avium in human monocytes: identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth. *Eur J Immunol* 21:391-5.
296. Flesch, I. E., and S. H. Kaufmann. 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 58:2675-7.
297. Clemens, D. L. 1996. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome. *Trends Microbiol* 4:113-8.
298. Fratti, R. A., J. M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera, and V. Deretic. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154:631-44.
299. Crowle, A. J., R. Dahl, E. Ross, and M. H. May. 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent Mycobacterium tuberculosis or Mycobacterium avium in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* 59:1823-31.
300. Frehel, C., C. de Chastellier, T. Lang, and N. Rastogi. 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic Mycobacterium avium. *Infect Immun* 52:252-62.
301. Russell, D. G., J. Dant, and S. Sturgill-Koszycki. 1996. Mycobacterium avium- and Mycobacterium tuberculosis-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* 156:4764-73.
302. Xu, S., A. Cooper, S. Sturgill-Koszycki, T. van Heyningen, D. Chatterjee, I. Orme, P. Allen, and D. G. Russell. 1994. Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages. *J Immunol* 153:2568-78.
303. Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser, and D. G. Russell. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-81.
304. Sturgill-Koszycki, S., U. E. Schaible, and D. G. Russell. 1996. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *Embo J* 15:6960-8.

305. Fratti, R. A., I. Vergne, J. Chua, J. Skidmore, and V. Deretic. 2000. Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block. *Electrophoresis* 21:3378-85.
306. Fratti, R. A., J. Chua, and V. Deretic. 2002. Cellubrevin alterations and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. *J Biol Chem* 277:17320-6.
307. Malik, Z. A., G. M. Denning, and D. J. Kusner. 2000. Inhibition of Ca(2+) signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med* 191:287-302.
308. Kusner, D. J., and J. A. Barton. 2001. ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent Mycobacterium tuberculosis via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 167:3308-15.
309. Malik, Z. A., S. S. Iyer, and D. J. Kusner. 2001. Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol* 166:3392-401.
310. Malik, Z. A., C. R. Thompson, S. Hashimi, B. Porter, S. S. Iyer, and D. J. Kusner. 2003. Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol* 170:2811-5.
311. Ferrari, G., H. Langen, M. Naito, and J. Pieters. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97:435-47.
312. Rauchenberger, R., U. Hacker, J. Murphy, J. Niewohner, and M. Maniak. 1997. Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in Dictyostelium. *Curr Biol* 7:215-8.
313. Schuller, S., J. Neefjes, T. Ottenhoff, J. Thole, and D. Young. 2001. Coronin is involved in uptake of Mycobacterium bovis BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol* 3:785-93.
314. Kelley, V. A., and J. S. Schorey. 2003. Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron. *Mol Biol Cell* 14:3366-77.
315. Gordon, A. H., P. D. Hart, and M. R. Young. 1980. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286:79-80.
316. Harth, G., P. C. Zamecnik, J. Y. Tang, D. Tabatadze, and M. A. Horwitz. 2000. Treatment of Mycobacterium tuberculosis with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:418-23.

317. Hostetter, J., E. Steadham, J. Haynes, T. Bailey, and N. Cheville. 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26:269-83.
318. O'Brien, L., B. Roberts, and P. W. Andrew. 1996. In vitro interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages: activation of anti-mycobacterial activity of macrophages and mechanisms of anti-mycobacterial activity. *Curr Top Microbiol Immunol* 215:97-130.
319. Voskuil, M. I., D. Schnappinger, K. C. Visconti, M. I. Harrell, G. M. Dolganov, D. R. Sherman, and G. K. Schoolnik. 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* 198:705-13.
320. Xu, Q., M. Dziejman, and J. J. Mekalanos. 2003. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1286-91.
321. Zahrt, T. C., C. Wozniak, D. Jones, and A. Trevett. 2003. Functional analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* MprAB two-component signal transduction system. *Infect Immun* 71:6962-70.
322. Kaprelyants, A. S., J. C. Gottschal, and D. B. Kell. 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 10:271-85.
323. Barer, M. R., and C. R. Harwood. 1999. Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol* 41:93-137.
324. Kell, D. B., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood, and M. R. Barer. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-87.
325. Mc, C. R., S. H. Lee, K. Deuschle, and D. W. Mc. 1957. Ineffectiveness of isoniazid in modifying the phenomenon of microbial persistence. *Am Rev Tuberc* 76:1106-9.
326. Orme, M. 2001. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int J Tuberc Lung Dis* 5:589-93.
327. Cardona, PJ and Ruiz, J. On the nature of latent bacilli. *Eur J Immunol*. In press
328. Rhen, M., S. Eriksson, M. Clements, S. Bergstrom, and S. J. Normark. 2003. The basis of persistent bacterial infections. *Trends Microbiol* 11:80-6.
329. Kolter, R., D. A. Siegele, and A. Tormo. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 47:855-74.
330. Nystrom, T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol* 176:159-64.
331. Smeulders, M. J., J. Keer, R. A. Speight, and H. D. Williams. 1999. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J Bacteriol* 181:270-83.

332. Garton, N. J., H. Christensen, D. E. Minnikin, R. A. Adegbola, and M. R. Barer. 2002. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum. *Microbiology* 148:2951-8.
333. Sun, Z., and Y. Zhang. 1999. Spent culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra improves viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth. *J Bacteriol* 181:7626-8.
334. Mukamolova, G. V., A. S. Kaprelyants, D. I. Young, M. Young, and D. B. Kell. 1998. A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8916-21.
335. Roszak, D. B., and R. R. Colwell. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl Environ Microbiol* 53:2889-93.
336. Canetti, G, *The Tubercle Bacillus in the Pulmonary Lesion of Man*. Springer Publishing Company, New York (1955)).
337. Hobby, G. L., O. Auerbach, T. F. Lenert, M. J. Small, and J. V. Comer. 1954. The late emergence of *M. tuberculosis* in liquid cultures of pulmonary lesions resected from humans. *Am Rev Tuberc* 70:191-218.
338. Wayne, L. G. 1960. The bacteriology of respected tuberculous pulmonary lesions. 2. Observations on bacilli which are stainable but which cannot be cultured. *Am Rev Respir Dis* 82:370-7.
339. Much, H. 1908. Die nach Ziel nicht darstellbaren Formen des Tuberkelbacillus. *Berlin Klin. Wochenschr.* 45, 691-694.
340. Ratnam, S., and S. Chandrasekhar. 1976. The pathogenicity of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 114:549-54.
341. Richardson, Ruth D. and Mellon, R. R.: Experiments on the filtrability of the Rosenow streptococcus of anterior poliomyelitis. *Proc. Soc. Exper. Biol. And Med.* 29: 451-454 (Jan.) 1932
342. Hernandez-Pando, R., M. Jeyanathan, D. Aguilar, H. Orozco, M. Harboe, G. A. Rook, and G. Bjune. 2000. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 356:2133-8.
343. de Wit, D., M. Wootton, J. Dhillon, and D. A. Mitchison. 1995. The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 76:555-62.
344. Pai, S. R., J. K. Actor, E. Sepulveda, R. L. Hunter, Jr., and C. Jagannath. 2000. Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. *Microb Pathog* 28:335-42.
345. McCune, R. M., Jr., W. McDermott, and R. Tompsett. 1956. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* 104:763-802.

346. McCune, R. M., F. M. Feldmann, H. P. Lambert, and W. McDermott. 1966. Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J Exp Med* 123:445-68.
347. Scanga, C. A., V. P. Mohan, H. Joseph, K. Yu, J. Chan, and J. L. Flynn. 1999. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infect Immun* 67:4531-8.
348. Grosset, J., C. Truffot-Pernot, C. Lacroix, and B. Ji. 1992. Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide-rifampin against tuberculosis infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36:548-51.
349. Grosset, J., C. Truffot-Pernot, H. Lecoœur, and C. C. Guelpa-Lauras. 1983. [Activity of rifampicin administered daily and intermittently on experimental tuberculosis in mice]. *Pathol Biol (Paris)* 31:446-50.
350. Phyu, S., T. Mustafa, T. Hofstad, R. Nilsen, R. Fosse, and G. Bjune. 1998. A mouse model for latent tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 30:59-68.
351. Cardona, P. J., A. Cooper, M. Luquin, A. Ariza, F. Filipino, I. M. Orme, and V. Ausina. 1999. 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* 49:362-6.
352. Nuermberger, E. L., T. Yoshimatsu, S. Tyagi, W. R. Bishai, and J. H. Grosset. 2004. Paucibacillary tuberculosis in mice after prior aerosol immunization with *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 72:1065-71.
353. Walsh, G. P., E. V. Tan, E. C. dela Cruz, R. M. Abalos, L. G. Villahermosa, L. J. Young, R. V. Cellona, J. B. Nazareno, and M. A. Horwitz. 1996. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 2:430-6.
354. Langermans, J. A., P. Andersen, D. van Soolingen, R. A. Vervenne, P. A. Frost, T. van der Laan, L. A. van Pinxteren, J. van den Hombergh, S. Kroon, I. Peekel, S. Florquin, and A. W. Thomas. 2001. Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on *Mycobacterium tuberculosis* infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11497-502.
355. Gormus, B. J., J. L. Blanchard, X. H. Alvarez, and P. J. Didier. 2004. Evidence for a rhesus monkey model of asymptomatic tuberculosis. *J Med Primatol* 33:134-45.
356. Deinard, A. S., N. W. Lerche, and D. G. Smith. 2002. Polymorphism in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) NRAMP1 gene: lack of an allelic association to tuberculosis susceptibility. *J Med Primatol* 31:8-16.
357. Shleeva, M. O., K. Bagramyan, M. V. Telkov, G. V. Mukamolova, M. Young, D. B. Kell, and A. S. Kaprelyants. 2002. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells

- of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology* 148:1581-91.
358. Hu, Y., J. A. Mangan, J. Dhillon, K. M. Sole, D. A. Mitchison, P. D. Butcher, and A. R. Coates. 2000. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. *J Bacteriol* 182:6358-65.
359. Sun, Z., and Y. Zhang. 1999. Spent culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra improves viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth. *J Bacteriol* 181:7626-8.
360. Zhang, Y., Y. Yang, A. Woods, R. J. Cotter, and Z. Sun. 2001. Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 284:542-7.
361. Glickman, M. S., J. S. Cox, and W. R. Jacobs, Jr. 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* 5:717-27.
362. Lim, A., M. Eleuterio, B. Hutter, B. Murugasu-Oei, and T. Dick. 1999. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* 181:2252-6.
363. Hong, P. C., R. M. Tsois, and T. A. Ficht. 2000. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 68:4102-7.
364. Hutter, B., and T. Dick. 1999. Up-regulation of *narX*, encoding a putative 'fused nitrate reductase' in anaerobic dormant *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol Lett* 178:63-9.
365. Fritz, C., S. Maass, A. Kreft, and F. C. Bange. 2002. Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infect Immun* 70:286-91.
366. Primm, T. P., S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, and C. E. Barry, 3rd. 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* 182:4889-98.
367. Dahl, J. L., C. N. Kraus, H. I. Boshoff, B. Doan, K. Foley, D. Avarbock, G. Kaplan, V. Mizrahi, H. Rubin, and C. E. Barry, 3rd. 2003. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10026-31.
368. Zhu, W., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick. 2003. Resuscitation factors from mycobacteria: homologs of *Micrococcus luteus* proteins. *Tuberculosis* 83:261-9.
369. Tufariello, J. M., W. R. Jacobs, Jr., and J. Chan. 2004. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun* 72:515-26.

370. Kondo, E., and K. Kanai. 1977. [Studies on the relationship between the proliferation rate of infecting tubercle bacilli and the effectiveness of chemotherapy. I. Observations in a mouse experimental model using a streptomycin-dependent strain (author's transl)]. *Kekkaku* 52:411-5.
371. Mitchison, D. A. 1979. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 76:771-81.
372. Zhang, Y., A. Scorpio, H. Nikaido, and Z. Sun. 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol* 181:2044-9.
373. Mitchison, D. A. 2004. The search for new sterilizing anti-tuberculosis drugs. *Front Biosci* 9:1059-72.
374. Sharma, V., S. Sharma, K. Hoener zu Bentrup, J. D. McKinney, D. G. Russell, W. R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini. 2000. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Struct Biol* 7:663-8.
375. Huang, C. C., C. V. Smith, M. S. Glickman, W. R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini. 2002. Crystal structures of mycolic acid cyclopropane synthases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 277:11559-69.
376. Zhang, Y., and L. M. Amzel. 2002. Tuberculosis drug targets. *Curr Drug Targets* 3:131-54.
377. Stanford, J., C. Stanford, and J. Grange. 2004. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of tuberculosis. *Front Biosci* 9:1701-19
378. Lowrie, D. B., R. E. Tascon, V. L. Bonato, V. M. Lima, L. H. Faccioli, E. Stavropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling, and C. L. Silva. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400:269-71.
379. Repique, C. J., A. Li, F. M. Collins, and S. L. Morris. 2002. DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge. *Infect Immun* 70:3318-23.
380. Taylor, J. L., O. C. Turner, R. J. Basaraba, J. T. Belisle, K. Huygen, and I. M. Orme. 2003. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun* 71:2192-8.
381. Tian, X., H. Cai, and Y. X. Zhu. 2004. Protection of Mice with a Divalent Tuberculosis DNA Vaccine Encoding Antigens Ag85B and MPT64. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 36:269-76.
382. Cardona, P.J. Amat, I. and Gordillo S. 2004. RUTI, a new immunotherapeutic treatment for the M. tuberculosis infection. *Vaccine*. In press.
383. Martin-Casabona, N., F. Alcaide, P. Coll, J. Gonzalez, J. M. Manterola, M. Salvado, and J. A. Cayla. 2000. [Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. A multicenter study of the Barcelona area. Grupo de Trabajo sobre Resistencias en Tuberculosis]. *Med Clin (Barc)* 115:493-8.

384. Canetti, G., W. Fox, A. Khomenko, H. T. Mahler, N. K. Menon, D. A. Mitchison, N. Rist, and N. A. Smelev. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 41:21-43.
385. Cingolani, A., A. Antinori, M. Sanguinetti, L. Gillini, A. De Luca, B. Posteraro, F. Ardito, G. Fadda, and L. Ortona. 1999. Application of molecular methods for detection and transmission analysis of mycobacterium tuberculosis drug resistance in patients attending a reference hospital in Italy. *J Infect Dis* 179:1025-9.
386. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
387. Cooper, A. M., B. H. Segal, A. A. Frank, S. M. Holland, and I. M. Orme. 2000. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox^{-/-}) mice. *Infect Immun* 68:1231-4.
388. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
389. Desjardin, L. E., M. D. Perkins, K. Wolski, S. Haun, L. Teixeira, Y. Chen, J. L. Johnson, J. J. Ellner, R. Dietze, J. Bates, M. D. Cave, and K. D. Eisenach. 1999. Measurement of sputum Mycobacterium tuberculosis messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med* 160:203-10.
390. North, R. J., and A. A. Izzo. 1993. Granuloma formation in severe combined immunodeficient (SCID) mice in response to progressive BCG infection. Tendency not to form granulomas in the lung is associated with faster bacterial growth in this organ. *Am J Pathol* 142:1959-66.
391. Young, H. A., and K. J. Hardy. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 58:373-81.
392. Bilyk, N., and P. G. Holt. 1995. Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations. *Immunology* 86:231-7.
393. Chan, E. D., K. R. Morris, J. T. Belisle, P. Hill, L. K. Remigio, P. J. Brennan, and D. W. Riches. 2001. Induction of inducible nitric oxide synthase-NO* by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis is mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF-kappaB signaling pathways. *Infect Immun* 69:2001-10.
394. Rhoades, E. R., and I. M. Orme. 1997. Susceptibility of a panel of virulent strains of Mycobacterium tuberculosis to reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 65:1189-95.
395. Cardona, P. J., R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, B. Vinado, A. Ariza, and V. Ausina. 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.
396. Orme, I. M. 1988. A mouse model of the recrudescence of latent tuberculosis in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 137:716-8.
397. Adams, L. B., C. M. Mason, J. K. Kolls, D. Scollard, J. L. Krahenbuhl, and S. Nelson. 1995. Exacerbation of acute and chronic murine tuberculosis by administration of a tumor necrosis factor receptor-expressing adenovirus. *J Infect Dis* 171:400-5.
398. Mohan, V. P., C. A. Scanga, K. Yu, H. M. Scott, K. E. Tanaka, E. Tsang, M. M. Tsai, J. L. Flynn, and J. Chan. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 69:1847-55.
399. Turner, J., A. A. Frank, J. V. Brooks, P. M. Marietta, B. Vesosky, and I. M. Orme. 2001. Tuberculosis in aged gammadelta T cell gene disrupted mice. *Exp Gerontol* 36:245-54.
400. Scanga, C. A., V. P. Mohan, K. Yu, H. Joseph, K. Tanaka, J. Chan, and J. L. Flynn. 2000. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med* 192:347-58.
401. Lee, I. S., J. Lin, H. K. Hall, B. Bearson, and J. W. Foster. 1995. The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 17:155-67.
402. Foster, J. W. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol* 175:1981-7.
403. Lee, I. S., J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176:1422-6.
404. Chapman, J. S., and J. S. Bernard. 1962. The tolerances of unclassified mycobacteria. I. Limits of pH tolerance. *Am Rev Respir Dis* 86:582-3.
405. Booth, I.R. 1999 The regulation of intracellular pH in bacteria. *Novartis Found. Symp.* 122:19-28
406. Piddington, D. L., A. Kashkouli, and N. A. Buchmeier. 2000. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg(2+) levels. *Infect Immun* 68:4518-22.
407. Garcia-del Portillo, F., J. W. Foster, M. E. Maguire, and B. B. Finlay. 1992. Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol* 6:3289-97.
408. Oh, Y. K., and R. M. Straubinger. 1996. Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability

- and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infect Immun* 64:319-25.
409. Turner, J., and I. M. Orme. 2004. The expression of early resistance to an infection with *Mycobacterium tuberculosis* by old mice is dependent on IFN type II (IFN- γ) but not IFN type I. *Mech Ageing Dev* 125:1-9.
410. Shi, L., R. North, and M. L. Gennaro. 2004. Effect of growth state on transcription levels of genes encoding major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in the mouse lung. *Infect Immun* 72:2420-4.
411. Belasco, J. G., G. Nilsson, A. von Gabain, and S. N. Cohen. 1986. The stability of *E. coli* gene transcripts is dependent on determinants localized to specific mRNA segments. *Cell* 46:245-51.
412. Von Gabain, J., G. Belasco, J. L. Schottel, A. C. Y. Chang, and S. N. Cohen. 1983. Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:653-657
413. Belisle, J. T., V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan, and G. S. Besra. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276:1420-2.
414. Wiker, H. G., M. Harboe, and T. E. Lea. 1986. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogeneous BCG85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 81:298-306.
415. Olsen, A. W., P. R. Hansen, A. Holm, and P. Andersen. 2000. Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen. *Eur J Immunol* 30:1724-32.
416. Ramachandra, L., E. Noss, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med* 194:1421-32.
417. Hellyer, T. J., L. E. DesJardin, G. L. Hehman, M. D. Cave, and K. D. Eisenach. 1999. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 37:290-5.
418. Garbe, T. R., N. S. Hibler, and V. Deretic. 1996. Response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Mol Med* 2:134-42.
419. Wilkinson, R. J., L. E. DesJardin, N. Islam, B. M. Gibson, R. A. Kanost, K. A. Wilkinson, D. Poelman, K. D. Eisenach, and Z. Toossi. 2001. An increase in expression of a *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl transferase gene (*fbpB*) occurs early after infection of human monocytes. *Mol Microbiol* 39:813-21.
420. Mukamolova, G. V., A. S. Kaprelyants, D. B. Kell, and M. Young. 2003. Adoption of the transiently non-culturable state--a bacterial survival strategy? *Adv Microb Physiol* 47:65-129.

421. Delogu, G., C. Pusceddu, A. Bua, G. Fadda, M. J. Brennan, and S. Zanetti. 2004. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol* 52:725-33.
422. Ramakrishnan, L., N. A. Federspiel, and S. Falkow. 2000. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* 288:1436-9.
423. Banu, S., N. Honore, B. Saint-Joanis, D. Philpott, M. C. Prevost, and S. T. Cole. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol* 44:9-19.
424. Fisher, M. A., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick. 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* 184:4025-32.
425. Li, Y. J., M. Petrofsky, and L. E. Bermudez. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* uptake by recipient host macrophages is influenced by environmental conditions in the granuloma of the infectious individual and is associated with impaired production of interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 70:6223-30.
426. Samokhvalov, V., V. Ignatov, and M. Kondrashova. 2004. Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation. *Biochimie* 86:39-46.
427. Sohaskey, C. D., and L. G. Wayne. 2003. Role of narK2X and narGHJI in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 185:7247-56.
428. Tyson, K. L., A. I. Bell, J. A. Cole, and S. J. Busby. 1993. Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli* nirB promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol Microbiol* 7:151-7.
429. Appleman, J. A., and V. Stewart. 2003. Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J Bacteriol* 185:89-97.
430. Stewart, V., L. L. Chen, and H. C. Wu. 2003. Response to culture aeration mediated by the nitrate and nitrite sensor NarQ of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 50:1391-9.
431. Virtanen, S. 1960. A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. *Acta Tuberc Scand Suppl* 48:1-119.
432. Wayne, L. G., and J. R. Doubek. 1965. Classification and Identification of *Mycobacteria*. II. Tests Employing Nitrate and Nitrite as Substrate. *Am Rev Respir Dis* 91:738-45.

433. Mortlock, R. P. 1976. Catabolism of unnatural carbohydrates by micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 13:1-53.
434. Torsten Jäger 2003 Die Nitrat- und Nitritreduktion bei Mykobakterien Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 2003
435. Weber, I., C. Fritz, S. Ruttkowski, A. Kreft, and F. C. Bange. 2000. Anaerobic nitrate reductase (narGHJ) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* 35:1017-25.
436. Stermann, M., L. Sedlacek, S. Maass, and F. C. Bange. 2004. A promoter mutation causes differential nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 186:2856-61.
437. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-16.
438. Goren, M. B., O. Brokl, and W. B. Schaefer. 1974. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. *Infect Immun* 9:142-9.
439. Zhang, L., M. B. Goren, T. J. Holzer, and B. R. Andersen. 1988. Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect Immun* 56:2876-83.
440. Goren, M. B., P. D'Arcy Hart, M. R. Young, and J. A. Armstrong. 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2510-4.
441. Thompson, S. A., and M. J. Blaser. 1995. Isolation of the *Helicobacter pylori* recA gene and involvement of the recA region in resistance to low pH. *Infect Immun* 63:2185-93.
442. Dukan, S., and D. Touati. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 178:6145-50.
443. Hahn, K., R. C. Faustoferri, and R. G. Quivey, Jr. 1999. Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Mol Microbiol* 31:1489-98.
444. Minakhin, L., S. Bhagat, A. Brunning, E. A. Campbell, S. A. Darst, R. H. Ebright, and K. Severinov. 2001. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:892-7.
445. Zhang, G., E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98:811-24.

446. Liu, K., Y. Zhang, K. Severinov, A. Das, and M. M. Hanna. 1996. Role of *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA. *Embo J* 15:150-61.
447. Blatter, E. E., W. Ross, H. Tang, R. L. Gourse, and R. H. Ebricht. 1994. Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* 78:889-96.
448. Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, and R. L. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262:1407-13.
449. Wilkinson, R. J., K. A. Wilkinson, K. A. De Smet, K. Haslov, G. Pasvol, M. Singh, I. Svarcova, and J. Ivanyi. 1998. Human T- and B-cell reactivity to the 16kDa alpha-crystallin protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 48:403-9.
450. Henriques, A. O., B. W. Beall, and C. P. Moran, Jr. 1997. CotM of *Bacillus subtilis*, a member of the alpha-crystallin family of stress proteins, is induced during development and participates in spore outer coat formation. *J Bacteriol* 179:1887-97.
451. Jobin, M. P., F. Delmas, D. Garmyn, C. Divies, and J. Guzzo. 1997. Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* 63:609-14.
452. Boon, C., and T. Dick. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol* 184:6760-7.
453. Roberts, D. M., R. P. Liao, G. Wisedchaisri, W. G. Hol, and D. R. Sherman. 2004. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*.