

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Genética y de Microbiología

Facultad de Biociencias

Estudio *in silico*, *in vitro* y *ex vivo* de la
actividad antitumoral de diferentes cepas de
Mycobacterium brumae y su papel en la
activación y modulación del sistema inmune

PAULA HERRERO ABADÍA

Bellaterra, 2023



TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Microbiología

Departamento de Genética y de Microbiología

Universidad Autònoma de Barcelona

2023

Estudio *in silico*, *in vitro* y *ex vivo* de la actividad antitumoral de diferentes cepas de *Mycobacterium brumae* y su papel en la activación y modulación del sistema inmune

Paula Herrero Abadía

Memoria presentada para obtener el grado de Doctor en Microbiología por el Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2023

A mis padres y mi familia

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha recibido financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, del fondo FEDER (RTI2018-098777-B-I00, RTI2018-094399-A-I00, PID2021-125801OB-I00, PID2021-122331OB-I00, y PID2021 123443OB-I00) y de la Generalitat de Catalunya (2017SGR-229).

Llegando al final de esta etapa tan enriquecedora, me gustaría agradecer a todas las personas que, de una u otra forma, me han ayudado a disfrutar un poquito más de este proceso tanto dentro como fuera del laboratorio.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Esther Julián por todo el apoyo que me ha brindado durante estos años, no solo en lo profesional, sino también en lo personal. Pero, sobre todo, me gustaría agradecerle que me diera la oportunidad de vivir esta experiencia tan enriquecedora y, por la cual, estoy pudiendo escribir estas palabras. Muchas gracias por haber confiado en mí para hacer el doctorado en tu laboratorio, por transmitirme el cariño por la ciencia y por enseñarme a ser optimista hasta ante un resultado inesperado. También darle las gracias a la Dra. Marina Luquin, por compartir conmigo tu experiencia, pero ante todo, muchas gracias por tu forma de ser, el cariño y la tranquilidad que transmites.

Durante estos años he tenido el placer de compartir laboratorio con muchos de mis referentes profesionales, a la Dra. Estela agradecerte tu simpatía y todo lo enseñado durante el tiempo que coincidimos en el laboratorio. ¡Siempre es una alegría verte cuando vienes! También me gustaría agradecerle a la Dra. Marta Llorens su paciencia infinita al enseñarme a hacer pases a las células, gracias a inculcarme que siempre es mejor trabajar con orden alrededor.

Una de las cosas que siempre me acompañará es la suerte que he tenido de trabajar codo con codo con unos compañeros de tesis excepcionales, que a día de hoy más que compañeros, puedo decir que son amigos. Marc, muchas gracias por toda la ayuda, todas las horas codo con codo en el laboratorio, y por ser el mejor mentor para adentrarme en el mundo de la migración e invasión tumoral. Sandri, flor! Quien nos iba a decir la primera vez que nos presentaron que terminaríamos siendo como uña y carne, gracias por absolutamente todo, por las anécdotas tan divertidas (que no son pocas), los podcast que terminan en un ¿nos llamamos?, y tu alegría contagiosa. Pero, sobre todo gracias por tus sabios consejos y por estar siempre presente (aunque nos separen unos cuantos km) siendo un apoyo fundamental durante esta carrera a fondo. Víctor, que te voy a decir, una de las personas más importantes que me ha brindado esta tesis. Siempre dispuesto a tender una mano de ayuda y a dar un buen consejo. Gracias por ser un gran ejemplo de generosidad y de amistad, tanto dentro como fuera del laboratorio. Arnau, el valenciano que luce siempre una sonrisa infinita, gracias por transmitir esa calma y felicidad que te caracteriza y por ser siempre un gran soporte. Empezaste siendo mi estudiantito pero enseguida nos aliamos para gastar bromas a los demás. Amigo, sin duda, me quedo con las millones de horas, sin parar de reír, durante el experimento de ratones con la jefa suprema! Y a la alocada Núria, aunque comenzaste en el laboratorio siendo una persona seria y poco habladora, al poco tiempo descubrí lo divertida y generosa que eres. Muchas gracias por tantos momentos

divertidos, por sacarle hierro al asunto cuando teníamos un día dramático, por esos experimentos de sangres juntas y por ser un gran soporte estos últimos meses. ¡Espero aparecer muchos más días en tu agenda a partir de ahora!

También quiero darle las gracias a Judit, sin ti el laboratorio no funcionaría igual, gracias por la ayuda constante en la preparación de medios, material y la música chill-out para comenzar el día con un poquito menos de estrés.

Por otro lado, de todos los estudiantes de grado y máster que han pasado por el laboratorio. Me gustaría hacer especial mención a tres de ellas, Marina Igual que fue mi primera estudiante y que me demostró que el interés por la ciencia, la implicación y la dedicación diaria a veces son innatos. A Natali que nos trajo un trocito de Ecuador y la ilusión de conocer Europa. Y, por supuesto gracias a Fanny, porque en el tiempo que estuviste en el laboratorio nos robaste el corazón con tu forma de ser, forjando una amistad que nos ha llevado a hacer más de una locura y alguna que otra noche de chic@s.

Desde la distancia, pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a mis amigas de mi querida Zaragoza. Violeta, María, Sere, Cris, Paula, Carlota e Inés, muchas gracias por el apoyo que me habéis demostrado desde el momento en que os conté que me iba a vivir a Barcelona. Gracias por las conversaciones telefónicas infinitas y los ánimos que siempre me mandáis. También por no tenerme en cuenta mis abandonos de WhatsApp, prometo mejorar en eso. Pero sobre todo, gracias por no dudar ni un momento en vernos cada vez que os mando el típico mensaje de “chicas este finde voy”, no os hacéis a la idea del chute de energía y de felicidad que me insufláis con nuestras quedadas.

Quería darle la gracias a Pepa, Pedro, Pepis, Fer y, Andreea, siempre interesados en cómo me iban los experimentos y dándome ánimos para las épocas más complicadas. Seguro que a partir de ahora disfrutamos de muchos más momentos en familia. A mis tíos y primos, gracias por ser una fuente de energía desde la distancia, prometo no perderme tantas comidas, cumpleaños y acontecimientos familiares a partir de ahora. En especial, quería agradecerla a mi abuelo por ser un reflejo perfecto y maravilloso en el que fijarse, por inculcarnos desde pequeños lo importante que era el estudio y que aprovecharíamos las oportunidades que tu no tuviste. Soy muy feliz de saber que soy tan curiosa como tú. Un cachito de esta tesis es gracias a ti y a la abuela.

David, muchas gracias por todos los años que has tenido que aguantar mis conversaciones nocturnas con los apuntes, qué paciencia has debido tener. Gracias por animarme siempre que he tenido una situación difícil y darme un punto de vista más objetivo y sincero. Junto con Bea, gracias a los dos por todo el apoyo durante estos años y las locuras que han ido ocurriendo por el camino, pero sobre todo gracias por esas visitas sorpresa desde Zaragoza, siempre me han recargado las pilas y me han puesto súper feliz.

¡A mi pequeña familia! Vicente, nos vinimos a Barcelona por un año y....ya son siete los que llevamos aquí. La de cosas que nos han pasado en este tiempo y la de horas que me has escuchado con atención e ilusión todo lo que te contaba de esta tesis. No hay suficientes palabras que abarquen lo agradecida que estoy por tu generosidad, comprensión y tu apoyo incondicional en mis mejores y peores momentos. ¡Gracias por ayudarme a convertir las piedras del camino en algo maravilloso y por dejarlo todo para iniciar esta loca aventura! Carlos, mi pequeño terremoto. Muchas veces me sorprende en cómo una persona tan pequeñita puede enseñarte tanto. Gracias por llegar y darme tanta alegría y

felicidad en esta última etapa de la tesis ("No deixis mai de ser tu. I si el cor diu que vol jugar-s'ho tot. Qui soc jo per dir-li que no?")

Papá, mamá, todavía recuerdo vuestra cara de sorpresa el día que os dije que había aplicado a un máster y ¡Oh! me marchaba a vivir a Barcelona. Todos pensábamos que me iba para un año, y el destino ha hecho que todavía siga aquí, haciendo lo que me apasiona, ser una pequeña ratilla de laboratorio. Siempre me habéis apoyado en todas mis decisiones personales y profesionales y me habéis alumbrado el camino cuando no sabía qué decisión tomar. Gracias por no ponerme nunca límites a lo que he querido estudiar, pero mucho más agradecida estoy de una de las cosas más importantes que me habéis enseñado y, es a no ponerme límites a mí misma y pelear por aquello que quiero, aun cuando la meta parece lejana o incluso imposible. Como me decís desde pequeña, al final siempre hay solución para todo y todo siempre sale bien, de una forma u otra. Desde luego, si no fuera por vosotros y por todo el camino andado juntos, esta tesis no habría sido posible.

Índice

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIACIONES	8
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
RESUM	18
INTRODUCCIÓN	21
1. CÁNCER DE VEJIGA: ENFERMEDAD Y TRATAMIENTO	21
1.1 Características generales de la enfermedad	21
1.2 Impacto de la enfermedad y factores de riesgo	24
1.3 Tratamiento del cáncer de vejiga no músculo-invasivo	25
1.4 Microambiente e inmunología implicada en cáncer de vejiga	26
2. MICOBACTERIA	29
2.1 Clasificación y diversidad	29
2.2 Componentes inmunogénicos de la pared celular de las micobacterias	30
2.3 Historia de <i>M. bovis</i> BCG	32
2.4 Uso de <i>M. bovis</i> BCG como inmunoterapia en cáncer de vejiga	34
2.4.1 Mecanismo de acción de <i>M. bovis</i> BCG	34
2.4.2 Problemática en el uso de <i>M. bovis</i> BCG en pacientes con cáncer de vejiga	37
2.4.3 Alternativas a <i>M. bovis</i> BCG para el tratamiento del cáncer de vejiga	38
3. USO DE MICOBACTERIAS PARA OTROS TIPOS DE CÁNCER	43
4. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ESTADO INMUNOLÓGICO: EDAD E INMUNOSENESCENCIA	43
4.1 Efecto sobre el sistema inmune innato	44
4.2 Efecto sobre el sistema inmune adaptativo	46
5. INMUNIDAD ENTRENADA DEL SISTEMA INMUNE INNATO COMO MECANISMO DE PROTECCIÓN	48
5.1 Reprogramación metabólica y epigenética	49
CAPÍTULO I	57
1. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1.1 Origen de las micobacterias	57
1.2 Conservación y mantenimiento de micobacterias	58
1.3 Técnicas de cultivo de micobacterias	59
1.3.1 Suspensiones bacterianas	59
1.4 Extracción y análisis de lípidos y ácidos micólicos	60
1.4.1 Extracción total de lípidos de la pared bacteriana	60

1.4.2 Extracción superficial de lípidos de la pared bacteriana	61
1.4.3 Extracción de ácidos micólicos	61
1.4.4 Análisis mediante cromatografía en cada fina unidimensional (TLC)	61
1.5 Susceptibilidad a antibióticos	62
1.6 Análisis genómico de las cepas de <i>M. brumae</i>	63
1.6.1 Genomas utilizados en la comparación génica	63
1.6.2 Extracción de DNA de las diferentes cepas de <i>M. brumae</i>	63
1.6.3 Secuenciación, construcción de las librerías del genoma de las cepas de <i>M. brumae</i>	64
1.6.4 Ensamblaje y anotación del genoma completo de la cepa tipo de <i>M. brumae</i>	64
1.6.5 Mapeo y detección de variantes de las secuencias de las cepas de <i>M. brumae</i> en Illumina respecto a la cepa de referencia	65
1.6.6 Reconstrucción filogenética de la cepa de referencia de <i>M. brumae</i>	65
1.6.7 Análisis de genes de interés	66
1.7 Conservación y cultivo de células eucariotas	68
1.7.1 Origen y obtención de las células eucariotas	68
1.7.2 Conservación y mantenimiento in vitro de células eucariotas	69
1.7.3 Infección celular con las suspensiones bacterianas	71
1.7.4 Determinación de la viabilidad celular. Ensayo de proliferación celular	71
1.7.5 Recolección del sobrenadante de los cultivos celulares	72
1.7.6 Determinación de citocinas, quimiocinas y NO de los cultivos celulares	72
1.8 Supervivencia intracelular de <i>M. brumae</i> en macrófagos murinos y humanos	73
1.8.1 Supervivencia intracelular de <i>M. brumae</i> en macrófagos J774 y THP-1	73
1.9 Actividad antitumoral directa de las micobacterias sobre líneas tumorales y análisis de producción de citocinas	73
1.9.1 Actividad antitumoral directa de las micobacterias sobre líneas tumorales	73
1.9.2 Análisis de la producción de citocinas	74
1.10 Análisis estadístico	74
2. RESULTADOS	75
2.1 Estudio fenotípico de las diferentes cepas de <i>M. brumae</i>	75
2.1.1 Descripción macroscópica de las diferentes cepas de <i>M. brumae</i>	75
2.1.2 Análisis del contenido lipídico total de las cepas de <i>M. brumae</i>	76
2.1.3 Análisis del contenido lipídico superficial de las cepas de <i>M. brumae</i>	78
2.1.4 Análisis de los ácidos micólicos de la pared de las cepas de <i>M. brumae</i>	79
2.1.5 Análisis de la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de <i>M. brumae</i>	79
2.2 Análisis genómico de las cepas de <i>M. brumae</i>	81
2.2.1 Composición del genoma de la cepa de referencia de <i>M. brumae</i>	81
2.2.2 Posición filogenética de <i>M. brumae</i> en el género <i>Mycobacterium</i>	85
2.2.3 Comparación de genes de virulencia y de la capacidad inmunogénica	86
2.2.4 Análisis del perfil genotípico de la resistencia a antimicrobianos	88
2.2.5 Análisis del perfil genotípico asociado a la composición de la pared celular	89
2.2.6 Variabilidad intraespecífica de las cepas de <i>M. brumae</i> y la cepa de referencia	89
2.3 Estudio de la supervivencia intracelular de las cepas de <i>M. brumae</i> e inmunomodulación en macrófagos humanos y murinos	92

2.4 Análisis y comparación de la actividad antitumoral y la liberación de citocinas inducida por diferentes cepas de <i>M. brumae</i>	95
2.4.1 Inhibición de proliferación y liberación de citocinas inducida por las cepas de <i>M. brumae</i> frente a células tumorales de vejiga	95
2.4.2 Inhibición de la proliferación e inducción de producción de citocinas inducida por las cepas de <i>M. brumae</i> frente a células tumorales de diferentes localizaciones anatómicas.....	98

CAPÍTULO II.....104

1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	104
1.1 Población de estudio	104
1.2 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	104
1.2.1 Aislamiento de PBMC	105
1.2.2 Activación de las PBMC por parte de las micobacterias.....	106
1.2.3 Co-cultivos de las PBMC activadas y células tumorales de vejiga T24	106
1.2.4 Inhibición de la proliferación directa e indirecta de las PBMC activadas frente a células tumorales humanas T24	108
1.2.5 Análisis de la liberación de citocinas y quimiocinas.....	108
1.3 Migración de células tumorales T24	109
2. RESULTADOS	110
2.1 Capacidad de activación de las PBMC por parte de <i>M. brumae</i> y <i>M. bovis BCG</i>	110
2.2 Efecto antiproliferativo directo e indirecto de las PBMC activadas frente a células tumorales humanas T24	113
2.3 Estudio del efecto indirecto de las PBMC sobre la migración celular de la línea tumoral T24	115

CAPÍTULO III.....119

1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	119
1.1 Estudio <i>in vitro</i> de inmunidad entrenada en THP-1	119
1.1.1 Variables de los experimentos <i>in vitro</i> de inmunidad entrenada en THP-1	119
1.1.2 Procedimiento del experimento <i>in vitro</i> de inmunidad entrenada con THP-1	119
1.2 Estudio <i>ex vivo</i> de inmunidad entrenada en monocitos humanos.....	121
1.2.1 Aislamiento de monocitos humanos a partir de PBMC.....	121
1.2.2 Siembra, estímulos, y recolección de SN de los monocitos humanos aislados	122
1.3 Ex vivo con monocitos de ratones derivados de PECs y esplenocitos	123
1.3.1 Obtención y cultivo de macrófagos derivados de PEC y de esplenocitos	123
1.3.2 Siembra y estimulación de macrófagos murinos	124
1.4 Cuantificación de citocinas	125
1.5 Cuantificación de parámetros metabólicos: glucosa y lactato	125
1.6 Cuantificación de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9	125
1.6.1 Procedimiento de extracción y análisis de la trimetilación de histonas a partir de monocitos/ macrófagos humanos estimulados	125
2. RESULTADOS	126

2.1 Estudio <i>in vitro</i> de la inducción de inmunidad entrenada en THP-1	126
2.1.1 Inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de <i>M. brumae</i>	126
2.1.2 Inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de <i>M. bovis</i> BCG	129
2.2 Inducción <i>ex vivo</i> de inmunidad entrenada por diferentes cepas de <i>M. brumae</i> en monocitos humanos	132
2.2.1 Liberación de citocinas e impacto sobre el metabolismo en la inducción de inmunidad entrenada en monocitos humanos.....	132
2.2.2 Histonas.....	134
2.3 Inducción <i>ex vivo</i> de inmunidad entrenada por parte de <i>M. brumae</i> y <i>M. bovis</i> BCG en macrófagos murinos.....	135
2.3.1 Estudio <i>ex vivo</i> de la inducción de inmunidad entrenada en macrófagos murinos derivados de PEC.....	135
2.3.2 Estudio <i>ex vivo</i> de la inducción de inmunidad entrenada en macrófagos murinos derivados de esplenocitos.....	137
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	140
CONCLUSIONES.....	157
REFERENCIAS.....	160
ANEXO I.....	177

Índice de tablas

Tabla 1. Origen de las micobacterias utilizadas.....	57
Tabla 2. Características de las distintas líneas celulares utilizadas.....	68
Tabla 3. Resumen de las citocinas analizadas <i>in vitro</i>	72
Tabla 4. Susceptibilidad de las cepas de <i>M. brumae</i> a antimicrobianos	80
Tabla 5. Resumen del genoma de <i>M. brumae</i>	83
Tabla 6. Impacto previsto y características de los SNP de las cepas de <i>M. brumae</i>	91
Tabla 7. Genes afectados por deleciones en las cepas de <i>M. brumae</i>	92
Tabla 8. Grupos de ratones incluidos en los experimentos de entrenamiento de la respuesta inmune innata.....	123

Índice de figuras

Figura 1. Estadios en el cáncer de vejiga.....	23
Figura 2. Representación de la pared celular del género <i>Mycobacterium</i>	31
Figura 3. Historia filogenética de las cepas de <i>M. bovis</i> BCG	33
Figura 4. Capacidad inmunogénica de <i>M. brumae</i> vs <i>M. bovis</i> BCG Connaught	41
Figura 5. Perfil de seguridad de <i>M. brumae</i>	42
Figura 6. Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de agentes derivados de micobacterias para tratamiento de melanoma y cáncer de pulmón.....	43
Figura 7. Cambios funcionales en el sistema inmunológico asociados a la edad	47
Figura 8. Representación de los mecanismos de activación celular del sistema innato	52

Figura 9. Colonias de las cepas de <i>M. brumae</i>	75
Figura 10. Cromatografías en capa fina del contenido lipídico total de <i>M. brumae</i>	77
Figura 11. Cromatografías en capa fina del extracto lipídico superficial de <i>M. brumae</i>	78
Figura 12. Cromatografía en capa fina del extracto de ácidos micólicos de <i>M. brumae</i>	79
Figura 13. Representación circular del cromosoma de <i>M. brumae</i>	84
Figura 14. Relación filogenética de <i>M. brumae</i> dentro del género <i>Mycobacterium</i>	86
Figura 15. Análisis de la presencia o ausencia de genes en <i>M. brumae</i>	88
Figura 16. Supervivencia intracelular en macrófagos y producción de citocinas de las cepas de <i>M. brumae</i>	94
Figura 17. Inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas de líneas tumorales de vejiga infectadas por distintas cepas de <i>M. brumae</i>	97
Figura 18. Inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas de líneas tumorales de otras localizaciones anatómicas infectadas por las cepas de <i>M. brumae</i>	100
Figura 19. Inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas de líneas tumorales de otras localizaciones anatómicas infectadas por las cepas de <i>M. brumae</i>	101
Figura 20. Separación celular de una muestra de sangre venosa periférica	105
Figura 21. Esquema de la metodología utilizada en la activación de PBMC y co-cultivos con las células tumorales T24	107
Figura 22. Producción de citocinas por las PBMC tras su activación	112
Figura 23. Efecto antiproliferativo en la línea tumoral T24 de PBMC activadas	114
Figura 24. Impacto sobre la migración <i>in vitro</i> de células tumorales T24 por parte de los factores solubles de las PBMC activadas	117

Figura 25. Procedimiento de inducción de inmunidad entrenada con monocitos y macrófagos de THP-1.	119
Figura 26. Procedimiento de inducción de inmunidad entrenada <i>ex vivo</i> con monocitos humanos.	122
Figura 27. Estudio de la inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de <i>M. brumae</i> en monocitos THP-1 <i>in vitro</i>	128
Figura 28. Estudio de la inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de <i>M. bovis</i> BCG en monocitos THP-1 <i>in vitro</i>	131
Figura 29. Estudio <i>ex vivo</i> de entrenamiento de la inmunidad innata de monocitos humanos	133
Figura 30. Estudio <i>ex vivo</i> de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9 en macrófagos humanos	134
Figura 31. Estudio <i>ex vivo</i> de entrenamiento de la inmunidad innata de macrófagos derivados de células del exudado peritoneal (PEC)	136
Figura 32. Estudio <i>ex vivo</i> de entrenamiento de la inmunidad innata de macrófagos derivados de esplenocitos.....	138

Abreviaciones

AECC	Asociación Española Contra el Cáncer
AG	Acilgliceroles
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BAAR	Bacteria ácido-alcohol resistente
BC	Cáncer de vejiga (<i>Bladder Cancer</i>)
BD	Becton & Dickinson
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMM	Macrófagos murinos de médula ósea (<i>Bone Marrow-Derived Macrophages</i>)
BSA	Albúmina de Suero Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CECT	Colección Española de Cultivos Tipos
CFU	Unidades formadoras de colonias (<i>Colony Forming Units</i>)
CMH	Células Madre Hematopoyéticas
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRISPRs	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente (<i>Clustered regular interspaced short palindromic repeat</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
CVMI	Cáncer de vejiga músculo-invasivo
CVNMI	Cáncer de vejiga no músculo-invasivo
DAT	Diacil trehalosas
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic cell</i>)
DMEM	Dubelco's Modified Eagle's Medium
DMEM F12	Dubelco's Modified Eagle's Medium/ Ham's F12 Medium
DMSO	Demitil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)

DSMZ	Colección alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares
EAU	Asociación Europea de Urología (<i>European Association of Urology</i>)
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAPs	Proteínas de unión a fibronectina (<i>Fibronectin attachment protein</i>)
FBS	Suero Bovino Fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Fosfolípidos
GM-CSF	Factor estimulante de granulocitos y macrófagos (<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GPL	Glicopeptidolípidos
GroMM	Glycerol Monomicolato
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HLA	Antígeno Leucocitario Humano (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
H₂O_d	Agua destilada
H3	Histona 3
H3K4me	Metilación de la histona 3 en lisina 4
H3K9me	Metilación de la histona 3 en lisina 9
H3K17ac	Acetilación de la histona 3 en lisina 27
IFN-γ	Interferón-γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica (<i>International Society of Urological Pathology</i>)
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
LPS	Lipopolisacárido
<i>M. bovis</i> BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin
<i>M. brumae</i>	<i>Mycobacterium brumae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
McF	Estándar McFarland
MCNA	Complejo de pared celular + ácidos nucleicos de <i>M. phlei</i>
MDSC	Células supresoras derivadas de mieloides (<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>)

MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIP	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>
MNT	Micobacterias No Tuberculosas
MOI	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity of Infection</i>)
MTT	Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio
NK	Células Natural Killer
NKT	Células T Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
OADC	Ácido oleico-Albúmina-Dextrosa-Catalasa
OD	Densidad óptica (<i>Optical Density</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Toda la noche (<i>overnight</i>)
PAMP	Patrones asociados a patógenos
PAT	Poliacil trehalosas
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Tampón salino fosfatado (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDIM	Ftiocerosol dimicocerosatos
PD-1	Receptor 1 de muerte programada (<i>Programmed death-ligand 1 receptor</i>)
PD-1/L1	Ligando 1 de muerte programada (<i>Programmed death-ligand 1</i>)
PEC	Células del Exudado Peritoneal (<i>Peritoneal Exudate Cells</i>)
PGAP	<i>Prokaryotic Genome Annotation Pipeline</i>
PGL	Fenolglucolípidos
PHA	Fitoheماغلوتينina (<i>Phytohemagglutinin</i>)
PIM	Fosfatidilinositol manósidos
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato (<i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>)
PMN	Células polimorfonucleares
PPD	Prueba cutánea de tuberculina (<i>Purified Protein Derivative test</i>)
Prokka	<i>Rapid Prokaryotic Genome Annotation</i>
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
RAST	<i>Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
rBCG	<i>M. bovis</i> BCG recombinante
RD	Región de Diferenciación
Rf	Factor de retención
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)

ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTU	Resección transuretral
R&D	R & D Systems
SASP	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
SCID	Inmunodeficiencia grave combinada (<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
SCP	Secuencias de Codificación de Proteínas
SD	Desviación estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SGL	Sulfoglicolípidos
SL	Sulfolípidos
SN	Sobrenadante
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPL	Esplenocitos (<i>Splenocytes</i>)
T _a	Temperatura
TAM	Macrófagos asociados a tumores
TAT	Triacil trehalosa
TB	Tuberculosis
TCA	Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos (<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>)
TCR	Receptor de linfocitos T
TCS	Proteínas de sistemas reguladores de dos componentes
TDM	Dimicolato de trehalosa (<i>Trehalose dimycolate</i>)
TGFTDM	Dimicolato de trehalosa (<i>Trehalose dimycolate</i>)
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMM	Monomicolato de trehalosa (<i>Trehalose monomycolate</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α (<i>Tumour Necrosis Factor-α</i>)
TRAIL	Factor relacionado con el ligando de inducción a apoptosis (<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>)
Treg	Linfocitos T reguladores
UICC	Unión Internacional para el Control del Cáncer
Vs	Versus

RESUMEN / ABSTRACT / RESUM

Resumen

La instilación por vía intravesical de *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) es el tratamiento de elección en pacientes con cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CVNMI) tras la resección del tumor. *M. bovis* BCG presenta una eficacia demostrada disminuyendo la recurrencia y la progresión tumoral gracias a la activación del sistema inmune del paciente, lo cual mejora la tasa de supervivencia de los individuos con CVNMI. Sin embargo, el tratamiento intravesical con este agente inmunoterapéutico se asocia a efectos adversos en más del 50% de los pacientes tratados, pudiendo desarrollar complicaciones graves en un 5% de casos, incluyendo infecciones pulmonares o diseminadas. Además, hasta un 30-40% de los pacientes no responden favorablemente a la terapia con *M. bovis* BCG, por lo que se ven obligados a interrumpir el tratamiento. Una de las alternativas propuestas para sustituir el tratamiento con *M. bovis* BCG es el uso de *Mycobacterium brumae*, una micobacteria ambiental no patógena con un efecto antitumoral e inmunomodulador demostrado tanto *in vitro*, como *ex vivo* e *in vivo* en modelo murino de cáncer vesical. Con el objetivo de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que sean eficaces para todos los pacientes, el objetivo de esta tesis es profundizar en las características fenotípicas y genotípicas de diferentes cepas de *M. brumae* y compararlas con *M. bovis* BCG; evaluar su interacción con diversos tipos de células tumorales; estudiar el efecto inmunomodulador de ambas micobacterias en el contexto específico de personas mayores; y caracterizar su potencial capacidad de inducir inmunidad entrenada.

Inicialmente se secuenció y analizó el genoma de la cepa de referencia de *M. brumae* y de tres aislados ambientales de *M. brumae*. La comparación con el genoma de *M. bovis* y *M. tuberculosis* demostró la no patogenicidad de *M. brumae*, así como la presencia de genes involucrados en la activación del sistema inmune del huésped demostrando su inmunogenicidad. No se observaron diferencias a nivel fenotípico de las diferentes cepas de *M. brumae* y muy pocas a nivel genotípico. Sin embargo, se observó que la cepa CR-103 era capaz de inhibir la proliferación tumoral de una forma más eficaz en algunas líneas tumorales y que la cepa CR-142 inducía una mayor producción de citocinas en macrófagos infectados, comparando con el resto de las cepas de *M. brumae*. Se demostró la capacidad de inhibir la proliferación tumoral de *M. brumae* en líneas tumorales de localizaciones diferentes a vejiga, como colon, hígado o páncreas.

Por otro lado, se estudió la capacidad de activar el sistema inmune por parte de *M. brumae* y *M. bovis* BCG en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos sanos jóvenes y mayores, así como de pacientes con neoplasia vesical, obteniendo una

diferencia significativa entre las poblaciones evaluadas en cuando a la inducción de la producción de citocinas proinflamatorias y la capacidad antitumoral de las PBMC estimuladas.

Finalmente, se evaluó si *M. brumae* era capaz de inducir inmunidad entrenada como *M. bovis* BCG en diferentes cultivos *in vitro* y *ex vivo*, utilizando un modelo *in vitro* con monocitos humanos THP-1 y monocitos derivados de PBMC, respectivamente. Los resultados indicaron que la estimulación inicial de monocitos con *M. brumae* era capaz de inducir un incremento en la producción de IL-6, TNF- α e IL-1 β , así como un incremento en la producción de lactato tras un estímulo secundario inespecífico, indicando un cambio en el perfil metabólico y revelando el potencial de *M. brumae* para inducir inmunidad entrenada.

Abstract

Intravesical instillations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) is the preferred treatment in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) after tumour resection. *M. bovis* BCG has demonstrated efficacy in reducing the recurrence and tumor progression due to the activation of the patient immune system, which enhances the survival rate of individuals with NMIBC. However, intravesical treatment with this immunotherapeutic agent is associated with adverse events in more than 50% of treated patients, being able to develop serious complications in 5% of cases, including lung or disseminated *M. bovis* BCG infections. Furthermore, up to 30-40% of patients do not respond to *M. bovis* BCG therapy and, consequently, they have to finish the treatment. One of the alternatives proposed to replace the *M. bovis* BCG treatment is the use of *Mycobacterium brumae*, an environmental non-pathogenic mycobacterium with an antitumor and immunomodulatory effect demonstrated *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* in a murine model of bladder cancer. With the aim of developing new therapeutic alternatives that are effective for all patients, the objective of this thesis is to decipher into the phenotypic characteristics and genotypes of different strains of *M. brumae* and compare them with *M. bovis* BCG; to evaluate their interaction with different tumour cells; to study the immunomodulatory effect of both mycobacteria in the specific context of older people; and to characterize its potential ability to induce trained immunity.

Initially, the genome of the reference strain and three environmental isolates of *M. brumae* were sequenced and analysed. The comparison with the genome of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* demonstrated the non-pathogenicity of *M. brumae*, as well as the presence of genes involved in the activation of the host immune system demonstrating its immunogenicity. No differences were observed at the phenotypic level of the different strains of *M. brumae* and very few at the genotypic level. However, it was observed that the CR-103 strain could inhibit some tumour cell proliferation more efficiently. Besides, the CR-142 strain induced an increase in cytokine production in infected macrophages, compared with the rest of the strains. The ability of *M. brumae* to inhibit the tumour proliferation was demonstrated in tumour cell lines from locations other than the bladder, such as colon, liver, or pancreas.

On the other hand, the ability of *M. brumae* and *M. bovis* BCG to activate the immune system from young and old healthy populations, as well as from patients with bladder neoplasia was evaluated. Using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) a significant difference between the evaluated populations in terms of triggering the production of proinflammatory cytokines and the antitumor capacity of the activated PBMCs.

Finally, the capacity of *M. brumae* to induce trained immunity, compared to *M. bovis* BCG, was evaluated in different *in vitro* and *ex vivo* cultures using an *in vitro* model with THP-1 human monocytes and PBMC-derived monocytes, respectively. The results indicated that the initial stimulation of monocytes with *M. brumae* followed by a secondary non-specific stimulus induce an elevated production of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , and an enhanced lactate production. This indicates a change in the metabolic profile of the cells and shows the potential of *M. brumae* to induce trained immunity.

Resum

Les instil·lacions intravesicals del *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) és el tractament d'elecció en pacients de càncer de bufeta no múscul-invasiu (CBNMI) després de la resecció del tumor. El *M. bovis* BCG presenta una demostrada eficàcia en disminuir la recurrència i la progressió tumoral gràcies a l'activació del sistema immune del pacient, fet que millora la taxa de supervivència dels pacients de CBNMI. No obstant, el tractament intravesical amb aquest agent immunoterapeutic s'associa a efectes adversos en més del 50% dels pacients tractats, que poden desenvolupar complicacions greus fins en un 5% de casos, incloent infeccions pulmonars o disseminades. A més, fins a un 30-40% dels pacients no responen favorablement a la teràpia amb el *M. bovis* BCG, pel que es veuen obligats a interrompre el tractament. Una de les alternatives proposades per a substituir el tractament amb el *M. bovis* BCG és l'ús del *Mycobacterium brumae*, un micobacteri ambiental no patogen amb un efecte antitumoral i immunomodulador demostrat tant *in vitro*, com *ex vivo* i *in vivo* en un model murí de càncer vesical. Amb l'objectiu de desenvolupar noves alternatives terapèutiques que siguin eficaces per a tots els pacients de CBNMI, l'objectiu d'aquesta tesi és aprofundir en les característiques fenotípiques i genotípiques de diferents soques del *M. brumae* i comparar-les amb el *M. bovis* BCG; avaluar la seva interacció amb diversos tipus de cèl·lules tumorals; estudiar l'efecte immunomodulador d'ambdós micobacteris en el context específic de persones grans; i caracteritzar-ne la potencial capacitat d'induir immunitat entrenada.

Inicialment, es va seqüenciar i analitzar el genoma de la soca de referència del *M. brumae* i de tres aïllats ambientals del *M. brumae*. La comparació amb el genoma del *M. bovis* i del *M. tuberculosis* va demostrar la no patogenicitat del *M. brumae*, així com la presència de gens involucrats en l'activació del sistema immune de l'hoste demostrant la seva immunogenicitat. No es van observar diferències a nivell fenotípic entre les diferents soques del *M. brumae* i molt poques a nivell genotípic. No obstant això, es va observar que la soca CR-103 era capaç d'inhibir la proliferació tumoral d'una manera més eficaç en algunes línies tumorals i que la soca CR-142 induïa una major producció de citocines en macròfags infectats, comparades amb la resta de soques. A més, es va demostrar la capacitat d'inhibir la proliferació tumoral del *M. brumae* a línies tumorals de localitzacions diferents a la bufeta, com a còlon, fetge o pàncrees.

D'altra banda, es va estudiar la capacitat d'activar el sistema immune per part del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) de poblacions sanes joves i grans, així com de pacients amb neoplàsia vesical, observant-se diferències significatives entre les poblacions avaluades en quant a l'inducció de la

producció de citocines pro-inflamatòries i la capacitat antitumoral de les PBMC estimulades.

Finalment, es va avaluar si el *M. brumae* era capaç d'induir immunitat entrenada de la mateixa manera que el *M. bovis* BCG en diferents sistemes de cultius *in vitro* i *ex vivo*, utilitzant un model amb monòcits humans THP-1 i monòcits derivats de PBMCs, respectivament. Els resultats van indicar que l'estimulació inicial dels monòcits amb el *M. brumae* era capaç d'induir un increment a la producció de IL-6, TNF- α i IL-1 β , així com un increment en la producció de lactat després d'un estímul secundari inespecífic, indicant un canvi al perfil metabòlic de les cèl·lules i revelant el potencial del *M. brumae* per induir immunitat entrenada.

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Cáncer de vejiga: enfermedad y tratamiento

1.1 Características generales de la enfermedad

La vejiga urinaria es un órgano hueco ubicado en la parte inferior del abdomen, cerca de la pelvis, donde se acumula la orina filtrada procedente de los riñones a través de los uréteres. La vejiga está compuesta por un conjunto de capas músculo-membranosas capaces de distenderse para almacenar la orina y contraerse para expulsarla del organismo.

Estructuralmente, las diferentes capas de la pared vesical se disponen de la siguiente forma:

- **Capa serosa:** compuesta principalmente por grasa, tejido fibroso y vasos sanguíneos, está situada en la parte más externa, recubriendo el exterior de la vejiga.
- **Capa muscular:** formada por el músculo detrusor. Es una capa de músculo liso que se contrae para expulsar la orina hacia la uretra y, está compuesto por tres diferentes capas concéntricas:
 - Capa externa o superficial formada por fibras musculares longitudinales.
 - Capa media formada por fibras musculares circulares.
 - Capa interna o profunda formada por fibras longitudinales.
- **Capa mucosa:** situada en la parte más interna y formada por:
 - Lámina propia de tejido conjuntivo
 - Urotelio o epitelio de transición urinario, el cual es un epitelio estratificado de hasta ocho capas celulares, impermeable, que se encuentra en contacto con la orina.

Uno de los trastornos más comunes, relacionados con la vejiga, son las infecciones del tracto urinario, las cuales cursan con inflamación de la vejiga (cistitis), hematuria (presencia de sangre en la orina) y disuria (dificultad y/o dolor en la micción). Estos síntomas son tan inespecíficos, que pueden ser fácilmente confundidos con los síntomas mostrados con otros trastornos o patologías vesicales, como el cáncer de vejiga (BC).

Existen tres diferentes tipos histopatológicos de BC dependiendo del tejido y tipología celular afectado por el tumor:

- **Carcinoma de células transicionales:** comienza en el epitelio transicional de la vejiga y supone alrededor del 90% de los casos en el momento del diagnóstico. Dentro del carcinoma transicional, existen diferentes variantes según la invasión tumoral de las capas musculares de la pared vesical. Tal como muestran las guías de la Asociación Europea de Urología (EAU), se diferencia entre cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CVNMI) y cáncer de vejiga músculo invasivo (CVMI). El primero, el CVNMI, se limita al recubrimiento de la vejiga, afectando únicamente a la capa mucosa (epitelio transicional y/o lámina propia). Supone el 70% de los diagnósticos y presenta una elevada recurrencia. Sin embargo, el otro 30% de los casos, se originan en las células de transición produciendo MIBC. Esto es debido a que el tumor invade la capa muscular, ganglios linfáticos y órganos adyacentes como próstata, útero, vagina o abdomen.
- **Carcinoma escamoso:** representa aproximadamente el 6-8% de los casos diagnosticados de BC. Se origina en las células escamosas, las cuales son pequeñas y planas, siendo consecuencia de una infección o irritación prolongadas.
- **Adenocarcinoma:** sólo representa el 1-2% de los diagnósticos de BC, se trata de células tumorales de origen glandular de otros órganos como pulmón, páncreas, próstata, mama, hígado o colon que llegan a afectar a la vejiga.

Así mismo, el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC), clasifican también el cáncer vesical dependiendo de la invasión del tumor primario y su tamaño (T), junto con la afectación de los ganglios linfáticos locales (N) y la presencia o ausencia de metástasis (M) [1–3].

- **Invasión y tamaño del tumor primario (T):**
 - T0: no existen pruebas de tumor primario.
 - Ta: carcinoma papilar no invasivo. Se trata de una variante de buen pronóstico en la que el tumor se encuentra confinado en el urotelio, presentando crecimiento hacia el interior de la vejiga sin invadir las capas que la recubren.
 - CIS: carcinoma *in situ*. Es un tumor superficial plano que no invade la lámina propia.
 - T1: el tumor invade el tejido conectivo subepitelial o la lámina propia.
 - T2: el tumor invade la capa muscular vesical, superficialmente (T2a) o a un nivel profundo (T2b).
 - T3: el tumor invade la capa serosa o perivesical, el cual se puede observar microscópicamente (T3a) o macroscópicamente (T3b).
 - T4: el tumor invade órganos y tejidos adyacentes como la próstata, útero o vagina (T4a), o la pared pelviana o abdominal (T4b).

Según esta clasificación, los tumores de vejiga Ta, CIS y T1 son CVNMI, mientras que los T2, T3 y T4 son MIBC (Figura 1).

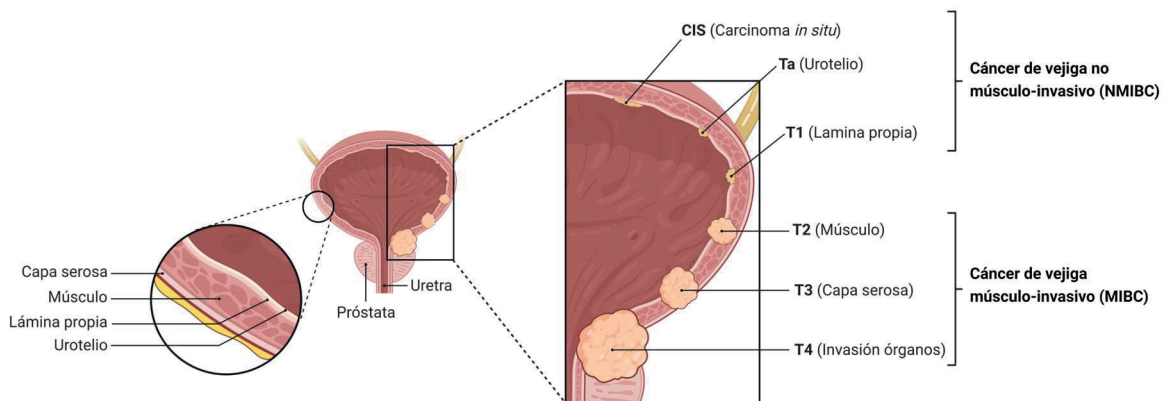


Figura 1. Estadios en el cáncer de vejiga. Modificada de Biorender

- **Afectación de los ganglios linfáticos locales (N):**
 - N0: no hay afectación de los ganglios linfáticos.
 - N1: afectación de un solo ganglio linfático de 2 cm o menos en su eje mayor.
 - N2: afectación de un solo ganglio linfático mayor de 2 cm pero menos de 5 cm en su eje mayor o, varios ganglios linfáticos menores de 5 cm en su eje mayor.
 - N3: afectación de un ganglio linfático mayor de 5 cm en su eje mayor.
- **Metástasis (M):**
 - M0: ausencia de metástasis
 - M1: presencia de metástasis.

Además de la clasificación propuesta por la AJCC y la UICC, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1973 una clasificación basada en el grado histológico del CVNMI, donde se diferencian tres grados de anaplasia celular (G). De menor a mayor grado de anaplasia, nos encontramos tumores de grado:

- **G1:** bien diferenciado
- **G2:** moderadamente diferenciado
- **G3:** pobremente diferenciado

Finalmente, la OMS junto con la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP), publicaron en 2016 una actualización de la clasificación histológica, donde los grados establecidos en la clasificación de 1973, se ampliaban y especificaban según el crecimiento potencial de los tumores no invasivos[4], dividiéndolos de la siguiente manera:

- Neoplasia papilar urotelial de baja potencia maligna: son tumores papilares de bajo grado. Según la clasificación de 1973, correspondería al carcinoma G1.
- Carcinoma papilar urotelial de bajo grado: son carcinomas papilares uroteliales no invasivos de bajo grado. Según la clasificación de 1973, correspondería a carcinomas G1 y algunos carcinomas G2.
- Carcinoma papilar urotelial de elevado grado: son carcinomas con un pronóstico de mayor recurrencia y progresión. Según la clasificación de 1973, correspondería a la mayoría de los carcinomas G2 y a todos los G3.

De todas formas, estas dos clasificaciones no son excluyentes y se complementan.

El principal síntoma temprano en el BC es la presencia de hematuria en la orina, en ocasiones acompañada por dolor, tenesmo y/u obstrucción urinaria. La presencia de hematuria, junto con el estudio de la historia clínica, un examen físico y/o la evaluación histológica mediante biopsia, llevan al diagnóstico de BC. El examen físico es útil cuando el tamaño del tumor es suficientemente grande, por lo que no sería relevante en el caso de tumores Ta, CIS o T1. La urografía, citoscopia o test de orina moleculares, son algunas de las técnicas de diagnóstico aplicadas en el BC superficial [1].

1.2 Impacto de la enfermedad y factores de riesgo

Según apunta la EAU en su revisión del 2022, BC es el décimo tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo, representando una causa significativa de morbi-mortalidad. Aunque la incidencia varía según el punto geográfico mundial, las mayores ratios para ambos sexos son en el sur y oeste de Europa, así como en el norte de América [1]. En España se estiman unos 21.694 casos diagnosticados para el año 2023, de los cuales 17.731 será en varones [5]. Según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), la incidencia en España del BC es de las más altas del mundo, siendo el cuarto tumor más frecuente en hombres, tras los de próstata, colorrectales y de pulmón. El BC es aproximadamente cuatro veces más frecuente en hombres que en mujeres con una incidencia de 9,5 y 2,4 por cada 100.000, respectivamente. Por ello, en hombres, BC representa el sexto cáncer más diagnosticado y el noveno como principal causa de muerte.

Además del género, los principales factores de riesgo de BC son el tabaco, la edad, la exposición a determinados agentes químicos y quimioterápicos, infecciones crónicas de la vejiga o la predisposición genética. El consumo de tabaco supone el principal factor de riesgo de desarrollo de BC, atribuyéndose aproximadamente el 50% de los casos a su consumo, y presentando los fumadores un riesgo 2 veces mayor de padecerlo que los no fumadores. El tabaco contiene múltiples carcinógenos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) o aminas aromáticas y hetrocíclicas [4].

El segundo factor de riesgo más importante en el desarrollo de cáncer de vejiga, al que se le atribuyen el 10% de los casos, es la exposición laboral a carcinógenos como aminas aromáticas, HAPs o hidrocarburos clorados, presentes en determinadas industrias.

Así mismo, el BC principalmente ocurre en las personas de edad avanzada, siendo 73 años la edad promedio en el momento de realizarse el diagnóstico. Alrededor de 9 de cada 10 personas con este cáncer tienen más de 55 años [6].

Otros factores como la ingesta de compuestos tóxicos como el arsénico o la cloración del agua, la exposición a quimioterápicos como la ciclofosfamida, la radioterapia, la susceptibilidad genética o las infecciones de vejiga recurrentes y/o crónicas como la producida por el parásito *Schistosoma haematobium*, contribuyen en la incidencia y el aumento del riesgo a padecer BC [4].

1.3 Tratamiento del cáncer de vejiga no músculo-invasivo

El tratamiento de elección tras el diagnóstico de CVNMI es la resección transuretral (RTU) tanto del tumor visible como del tejido circundante, seguido de tratamiento adyuvante con quimioterapia o inmunoterapia intravesical. De esta forma se evita la aparición de recurrencias y/o progresión del tumor.

Los agentes quimioterápicos intravesicales que se utilizan más habitualmente son gemcitabina, epirubicina y mitomicina C, mientras que el tratamiento inmunoterapéutico de elección es la instilación de *Mycobacterium M. bovis* BCG [1].

Gemcitabina. Es una pirimidina análoga que actúa inhibiendo el crecimiento celular e induce apoptosis por inhibición de la síntesis de DNA. Actualmente, se utiliza en pacientes con BC de riesgo bajo e intermedio o, en aquellos de alto riesgo cuando el tratamiento con *M. bovis* BCG ha fallado.

Epirubicina. Son antraciclinas que inhiben la topoisomerasa II y la síntesis de DNA. Se utilizan ampliamente en CVNMI cuando se produce un fallo o intolerancia al tratamiento con *M. bovis* BCG.

Mitomicina C. Es un antibiótico citostático del grupo de los agentes alquilantes, el cual actúa inhibiendo la síntesis de DNA. Es uno de los tratamientos indicados en CVNMI después de la RTU con resultados positivos en la disminución de la recurrencia tumoral. Sin embargo, a diferencia de *M. bovis* BCG, no es capaz de disminuir la progresión de la neoplasia.

***M. bovis* BCG.** Es una bacteria atenuada que se administra intravesicalmente en su forma viva en pacientes con CVNMI de riesgo intermedio y alto. Debido a la disminución de recurrencias y de progresión tumoral, se trata del tratamiento de elección tras la RTU.

A diferencia de los quimioterápicos expuestos anteriormente que tienen un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales, *M. bovis* BCG presenta una doble actividad: es capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales y, además, induce una activación e infiltración de células del sistema inmune del paciente en la vejiga, induciendo indirectamente un efecto antitumoral al estimular la inmunidad innata y adquirida. El tratamiento con BCG en pacientes con CVNMI, se inicia dos semanas después de la RTU. Durante un primer periodo denominado tratamiento de inducción, acorde con la propuesta realizada originalmente por Morales *et al.*, se realiza una instilación intravesical semanal de *M. bovis* BCG durante 6 semanas consecutivas, seguida por una fase denominada tratamiento de mantenimiento. El calendario estándar del periodo de mantenimiento consta de una instilación semanal durante 3 semanas consecutivas, repitiendo el tratamiento a los 3, 6, 9 y 12 meses [4].

Aunque todos estos agentes son utilizados, el que ha demostrado mejores resultados en cuanto a disminución de la recurrencia y de la progresión del tumor es el uso de *M. bovis* BCG como terapia adyuvante única o asociada a quimioterapia, en contra del uso de quimioterápicos en monoterapia. Una de las propuestas de más interés es el uso de mitomicina C alternándola o combinándola con *M. bovis* BCG para mejorar la eficacia del tratamiento. Algunas guías recomiendan realizar una dosis única intravesical de quimioterapia justo después de la RTU como paso inicial del tratamiento, salvaguardando las dos semanas necesarias para comenzar con el tratamiento inmunoterapéutico con *M. bovis* BCG, observando resultados positivos para el paciente y disminuyendo la probabilidad de recurrencia respecto a la realización sólo de RTU.

1.4 Microambiente e inmunología implicada en cáncer de vejiga

Uno de los factores relevantes para el éxito o fracaso del tratamiento en el BC es el microambiente tumoral que se desarrolla en la vejiga una vez instaurada la neoplasia. Concretamente, la inmunoterapia con *M. bovis* BCG en el contexto de BC actúa sobre dicho microambiente tumoral, por lo que comprenderlo es fundamental.

En el microambiente tumoral se incluyen las células tumorales y las células inmunitarias, intercomunicadas mediante citocinas y quimiocinas, las cuales actúan activando e inhibiendo las subpoblaciones celulares inmunes y determinando su infiltración[3]. Los procesos que ocurren para el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral adecuada son el reconocimiento de los antígenos tumorales por parte de las células presentadoras de antígeno, el *priming* o mecanismo activador del sistema inmune y el reclutamiento de

células T efectoras[7,8]. Otros factores que pueden afectar al microambiente tumoral en el BC son la genética del paciente y el microbioma comensal.

Las principales tipologías celulares del sistema inmune implicadas en BC son[2,9]:

Células T. La presencia de células T con fenotipo inflamatorio es imprescindible en la actividad de la inmunoterapia antitumoral. Esta respuesta se caracteriza por linfocitos T citotóxicos y células presentadoras de antígenos, un *priming* espontáneo de células T, así como marcadores de células T y quimiocinas implicadas en el reclutamiento de células T efectoras como CCL4, CXCL9 o CXCL10.

- **Linfocitos TD8+ citotóxicos.** Con un papel importante en la respuesta antitumoral, atacan directamente a las células tumorales, por lo que una mayor infiltración de estas células se relaciona con resultados favorables de supervivencia. Algunos ensayos han mostrado que el bloqueo de la ruta supresora PD-1/L1, aumenta la actividad citotóxica de las células T CD8+ en el microambiente tumoral. La expresión de PD-1 es un marcador del agotamiento de las células T y, por ello se ha correlacionado con un estado inmunitario agotado y una supervivencia general deficiente. También se ha demostrado en ensayos preclínicos que la activación de la vía de señalización PPAR γ /RxR α suprime la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, alterando la infiltración de células T CD8+, lo cual conduce a la resistencia a algunas inmunoterapias.
- **Linfocitos T reguladores (Treg).** Son un subconjunto de linfocitos T CD4+ que presentan un papel inmunosupresor a través de la inhibición de las células presentadoras de antígeno a través del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el consumo de IL-2 y la producción de factores inhibidores del sistema inmunitario. Uno de los mecanismos de expansión de las células Treg se debe a la expresión de TGF- β e IL-10 por las células tumorales, promoviendo una infiltración abundante de células Treg en el tejido canceroso. Varios estudios han reportado que es importante la cantidad de linfocitos Treg en el microambiente tumoral, pero también es imprescindible el equilibrio entre las células Treg y el resto de los linfocitos T con implicación antitumoral, asociándose a los resultados positivos o negativos de supervivencia.

Células dendríticas (DC). Actúan como células presentadoras de antígenos y como inductoras y reguladoras de la respuesta inmune adaptativa antitumoral mediada por células T. Algunas de estas DC endocitan a las células cancerosas y transportan los antígenos asociados a tumores a los ganglios linfáticos, donde se produce la presentación de antígenos y el *priming* de las células T CD8+. Los factores CCL5 y CXCL1, sintetizados por las células Natural Killer, reclutan DC para el microambiente tumoral, las cuales desencadenan la liberación de CXCL9 y CXCL10 necesarios para el *priming* y reclutamiento de células T efectoras. Varios estudios han demostrado que una abundante infiltración de

DC en los tumores se correlaciona con mejor eficacia de la inmunoterapia con *M. bovis* BCG y con mejores resultados de supervivencia.

Macrófagos asociados a tumores (TAM). Las TAM pueden polarizarse a M1 o M2 según las señales del microambiente tumoral. Los macrófagos M1 inducen un efecto inmunomodulador con producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, IL-12, TNF- α o NO[10,11], mientras que los macrófagos M2 favorecen una respuesta inmunosupresora con liberación de IL-10, TGF- β y expresión de IL-1ra, lo cual favorece el desarrollo tumoral[12]. Los macrófagos M2 forman parte del sistema de evasión promovido por el tumor, llegando a suprimir la inmunidad antitumoral y promover el crecimiento tumoral y su progresión mediante la producción de citocinas y quimiocinas, la promoción de la inestabilidad genética, el fomento de un nicho para las células tumorales y el desarrollo de metástasis[13]. Los macrófagos con fenotipo M1, que expresan marcadores de superficie únicos como CD80 y CD86, es activado por IFN- γ derivado de Th1 y por lipopolisacáridos, por el contrario, los macrófagos M2 se inducen por la exposición a IL-4 e IL-13 [14]. El tumor es capaz de inducir la infiltración de TAM mediante señales quimiotácticas como CCL2, CCL5 y CSF-1, lo cual se ha relacionado con la agresividad del proceso neoplásico, el estadio tumoral o los resultados de supervivencia[15,16].

Células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) [17]. Esta población celular es capaz de inhibir la actividad antitumoral de otras células inmunitarias y promueven la progresión tumoral. Son reclutadas por la liberación de CXCL-2 y la ruta MIF-CXCR-2 promovida por las células tumorales. Las MDSC pueden derivar de monocitos, macrófagos o DC (M-MDSC); o presentar un origen granulocítico al derivar de neutrófilos, eosinófilos o basófilos (G-MDSC). Se ha demostrado que las G-MDSC inhiben la proliferación de células T CD4+ y la infiltración de T CD8+ e inducen la presencia de células Treg. Esta acción inmunosupresora se debe a la liberación de los factores Arg1, iNOS, ROS o PD-L1[18]. Su abundante presencia en el microambiente tumoral o una proporción baja de la ratio células T/MDSC en orina ha mostrado menor supervivencia sin recurrencia tras el tratamiento con *M. bovis* BCG en pacientes con CVNMI[11].

2. Micobacteria

2.1 Clasificación y diversidad

El género *Mycobacterium* fue nombrado por primera vez en 1896 por Lehmann y Neumann [19]. En 2018 se produjo una subdivisión del mismo como consecuencia a los nuevos análisis filogenéticos basados en la comparación de las secuencias génicas del RNAr 16S de las diferentes especies de micobacterias, junto con sus características moleculares [20,21]. Como resultado, se obtuvieron cinco nuevos géneros: *Mycobacterium*, *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus* y *Mycobacteroides* [22]. En conjunto, estos géneros pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae* del orden *Actinomycetales*. Sin embargo, esta nueva clasificación del género ha sido muy discutida, por lo que recientemente se llegó a un consenso con el que poder nombrar de nuevo todas las especies como *Mycobacterium* y considerar la división de las especies como subgéneros [19]. Por tanto, a efectos prácticos para simplificar y, como se permite actualmente, en el resto del presente trabajo se utilizará la nomenclatura original utilizando *Mycobacterium* como género de todas las especies de micobacterias que se nombrar posteriormente.

Las micobacterias tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 25 a 40°C[23], además, se caracterizan por ser bacilos, aerobios o microaerófilos con una longitud de entre 1 a 10 μm y no presentar motilidad [24]. Debido a la presencia de ácidos micólicos y al alto contenido lipídico de su pared celular, se les conoce como bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) [25]. Esto se debe a que al realizar la tinción de Ziehl Neelsen como parte de su caracterización, su pared no se decolora con una mezcla ácido-alcohólica, quedando teñida por la fucsina básica, lo que permite diferenciarlas del resto de microorganismos [22,25]. Su morfología colonial puede ser rugosa o lisa, aunque hay algunas especies que presentan ambos morfotipos cuando crecen en medio sólido. A nivel genómico, se trata de un grupo de bacterias que tienen alrededor de un 60-70% de guanosina-citosina en su DNA[26].

Actualmente, gracias a las características fenotípicas detalladas anteriormente y la secuenciación y ensamblaje genómico[23], se han descrito 195 especies distintas de micobacterias (<https://bacterio.net/genus/mycobacterium>). Se pueden encontrar en una gran diversidad de nichos ecológicos como agua y suelo [19,22], aunque hay también patógenos obligados.

Atendiendo a su patogenicidad, destacan las extensamente descritas micobacterias patógenas humanas, donde se engloban las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y del complejo *Mycobacterium leprae*. Además, en un segundo grupo se incluyen las micobacterias no-tuberculosas, las cuales incluyen micobacterias patógenas

oportunistas, como *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* o *Mycobacterium marinum*, que infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos; así como, las micobacterias ambientales como *Mycobacterium brumae*, que representan más del 75% del total de las especies descritas y presentan una baja virulencia o son no virulentas[27–29].

Runyon propuso en 1959 una clasificación según la cual agrupaba las micobacterias según su velocidad de crecimiento y la pigmentación de sus colonias[30]. De esta forma, cuando las micobacterias necesitan más de 7 días para crecer en medio sólido, se les denomina de crecimiento lento; mientras que cuando el tiempo necesario para obtener colonias en medio sólido igual o inferior a una semana, las micobacterias son de crecimiento rápido [22,30]. Así mismo, algunas micobacterias se caracterizan también por ser capaces de sintetizar pigmentos frente a distintas condiciones como la exposición a la luz o el crecimiento prolongado[31]. Se describen especies fotocromógenas, que producen un pigmento amarillo-anaranjado con la exposición a la luz; escotocromógenas, cuando forman colonias pigmentadas incluso en oscuridad, independientemente de la exposición lumínica; y no cromógenas, las cuales no producen pigmentos y crecen dando colonias de color blanco[32].

2.2 Componentes inmunogénicos de la pared celular de las micobacterias

La pared celular de las micobacterias se caracteriza por su complejidad, su composición rica en lípidos y la presencia de antígenos proteicos (Figura 2). La estructura básica de la pared micobacteriana está formada por la unión covalente del peptidoglicano a la membrana citoplasmática y, unido a éste está el arabinogalactano, el cual se encuentra unido covalentemente a los ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga que constituyen uno de los componentes característicos de las micobacterias. Aunque también se encuentran en los géneros *Corynebacterium* y *Nocardia*, su longitud en micobacterias es significativamente superior, entre 60 y 90 átomos de carbono[33]. Cada especie de micobacteria presenta un patrón específico de ácidos micólicos, el cual puede ser compartido por distintas especies del género.

Además de los ácidos micólicos, todas las especies del género *Mycobacterium* presentan en su pared lipoarabinomanano, lipomanano, fosfatidilinositol manósidos (PIM) y micolatos de trehalosa, aunque su estructura puede diferir entre las distintas especies. Destaca el papel inmunoestimulador de los micolatos de trehalosa, especialmente del dimicolato de trehalosa (TDM), el cual está formado por una trehalosa esterificada con dos ácidos micólicos[34]. El TDM está relacionado con la inducción de una respuesta proinflamatoria por promover la producción de citocinas como IL-1 β , IL-6 o TNF- α . Finalmente, algunas estructuras como poliacil trehalosas (PAT), sulfoglicolípidos (SGL),

fenolglucolípidos (PGL) o ftiocerol dimicocerosatos (PDIM), solo se encuentran en la pared celular de algunas especies de micobacterias.

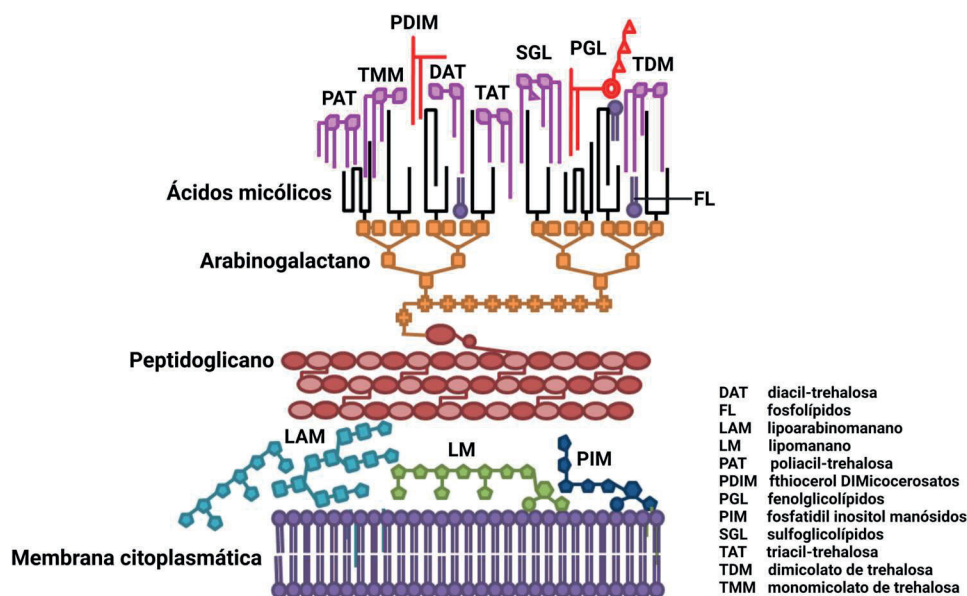


Figura 2. Representación esquemática de los componentes de la pared celular del género *Mycobacterium*. Modificado con Biorender de Noguera-Ortega *et al.* [35]

los lípidos de la pared celular presentan un papel fundamental en el reconocimiento de las micobacterias por el sistema inmunitario. Estas moléculas de la pared celular de las micobacterias son reconocidas por receptores de manosa o receptores *Toll-like* (TLR) [36] presentes en las células presentadoras de antígenos (CPA) del sistema inmune innato. Las CPA, entre las que destacan macrófagos y DC, procesan los antígenos reconocidos y los presentan a los linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, induciendo la síntesis de citocinas y quimiocinas y amplificando la respuesta inmunitaria mediante la activación de otras células efectoras. En una respuesta antitumoral adecuada, la activación por parte de los antígenos de las micobacterias de las CPA promueve una respuesta Th1 [36], con la consiguiente polarización de las células *T naïve* y la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12p70, IL-17, IFN- γ y TNF- α [36] [10]. Otras células efectoras implicadas en esta respuesta antitumoral son linfocitos T γ/δ o células Natural Killer (NK).

2.3 Historia de *M. bovis* BCG

M. bovis BCG ha sido utilizada en todo mundo desde 1930 como vacuna en la prevención de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, siendo actualmente la única vacuna comercializada para este fin[37].

El origen de *M. bovis* BCG se debe a una sucesión de acontecimientos que comenzaron en 1904 con el aislamiento de una cepa virulenta de *M. bovis* a partir de una vaca con mastitis. Este hecho llevado a cabo por Edmond Nocard, fue el punto de partida para Albert Calmette y Camille Guérin en la obtención de una cepa atenuada y el desarrollo de la que se conoce hoy como vacuna frente a la tuberculosis (TB). Calmette y Guérin realizaron 230 subcultivos de la micobacteria hasta que obtuvieron una cepa atenuada de *M. bovis* en 1921, la cual se denominó *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Posteriormente, se demostró que dicha atenuación se debía a la delección de la Región de Diferenciación (RD) 1. A partir de los exitosos resultados obtenidos en los siguientes años respecto a la vacunación de animales y humanos, se produjo a gran escala y se distribuyó por todo el mundo como vacuna profiláctica contra la TB [38,39].

Como se ha comentado anteriormente, una de las aplicaciones más relevantes de *M. bovis* BCG es en el tratamiento de CVNMI, uno de los descubrimientos más exitosos del uso de micobacterias en la inmunoterapia antitumoral. Gracias a los estudios y observaciones de Coley, Pearl y Zbar[40] se comenzó a sugerir el uso de *M. bovis* BCG como agente en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y se establecieron las condiciones necesarias para conseguir el efecto antitumoral y desarrollo de una respuesta inmune adecuadas en el modelo animal. Finalmente, en 1976 fue cuando, Morales estableció el protocolo de tratamiento del CVNMI como resultado de un ensayo en el que 7 de cada 10 pacientes con CVNMI que habían sido tratados intravesicalmente con *M. bovis* BCG, no presentaron afección tumoral al final del estudio. Debido a los hechos ocurridos en éste y posteriores ensayos, *M. bovis* BCG fue ampliamente aceptado y, en 1990 la *Food and Drug Administration* (FDA) autorizó *M. bovis* BCG como tratamiento de CVNMI por su demostrada disminución de la recurrencia y de la progresión tumoral tras la RTU.

El envío de la cepa atenuada de *M. bovis* BCG a laboratorios de todo el mundo, y el mantenimiento mediante subcultivos de la cepa original recibida en los laboratorios, dio lugar a la aparición de diferentes cepas, las cuales se ha demostrado con posterioridad que difieren genéticamente de la cepa original debido a duplicaciones en tándem, delecciones e inserciones en la secuencia de sus genomas originadas a lo largo de los subcultivos[41]. Taxonómicamente, observando la variabilidad genética debido a varias mutaciones puntuales, se produjo la divergencia de un primer grupo de cepas de *M. bovis* BCG, compuesto por *M. bovis* BCG Birkhaug, Japan, Moreau, Russian y Sweden. Así mismo, debido a la eliminación adicional de la RD2 generó un grupo tardío de cepas de *M. bovis*

BCG formado por *M. bovis* BCG China, Connaught, Danish, Frappier, Glaxo, Mexico, Pasteur, Phipps, Prague y Tice [42] (Figura 3).

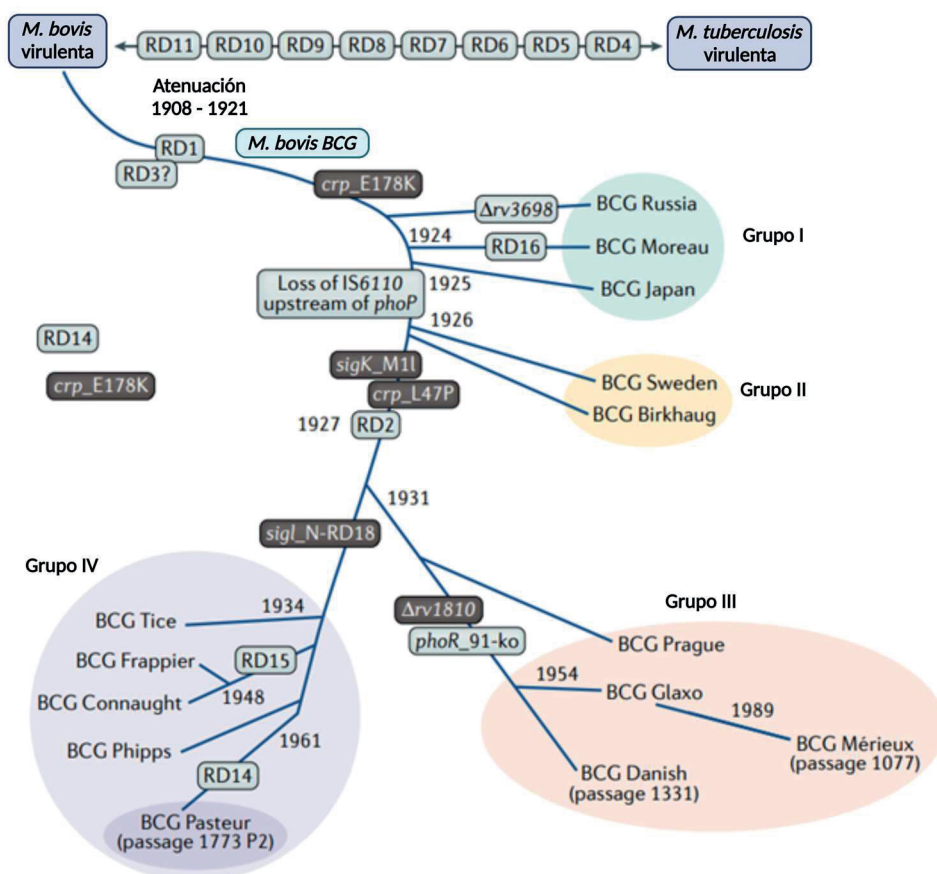


Figura 3. Historia filogenética de las cepas de *M. bovis* BCG. Las resiembras consecutivas y de forma continua de la cepa original atenuada por Calmette y Guérin resulta en un número diverso de cepas hijas. La pérdida genómica de la región de diferenciación 1 (RD1) genera las cepas tempranas de *M. bovis* BCG (grupos I y II). Las cepas tardías (grupos III y IV) se generaron posteriormente por la delección de RD2. Modificada con Biorender a partir de Lobo *et al.*, 2021 [38].

Además de esta diferencia genética entre las distintas cepas de *M. bovis* BCG, se han descrito diferencias en las propiedades bioquímicas, antigénicas e incluso de efectividad y seguridad en su aplicación como vacuna contra TB o en la inmunoterapia en el CVNMI, aumentando el interés en el estudio de las diferencias entre las diversas cepas existentes de *M. bovis* BCG o de cualquier otra especie de micobacteria con relevancia clínica, para entender su eficacia como agente antitumoral.

2.4 Uso de *M. bovis* BCG como inmunoterapia en cáncer de vejiga

2.4.1 Mecanismo de acción de *M. bovis* BCG

El mecanismo de acción antitumoral de *M. bovis* BCG no se ha descrito completamente y sigue bajo investigación después de más de cuatro décadas de uso en pacientes con CVNMI[43]. Sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos preclínicos y clínicos demuestran que después de las instilaciones con *M. bovis* BCG se produce una cascada de eventos secuenciales en el epitelio de la vejiga. Se trata de una combinación de mecanismos que incluye la interacción directa de *M. bovis* BCG con las células uroteliales y tumorales, activación de una respuesta inmune innata e inducción de una respuesta inmune adaptativa[44]. Así, como consecuencia de las instilaciones de *M. bovis* BCG, también se promueve una respuesta inmune sistémica[12,40,45,46].

2.4.1.1 Respuesta local en la vejiga

En primer lugar, tras la instilación vesical de *M. bovis* BCG, se produce la interacción de la micobacteria con las células del epitelio vesical. La adhesión entre *M. bovis* BCG y las células del urotelio no se ve favorecida debido, por un lado, al ambiente hidrofílico de la mucosa vesical y, por otro, a la carga negativa de la superficie de ambas. Sin embargo, la pared de las células tumorales presenta una expresión menor de glucosaminoglicanos, disminuyendo la carga negativa en la superficie vesical, lo cual favorece la adhesión de la micobacteria. La unión está mediada por la asociación de proteínas de unión a fibronectina (FAPs) de *M. bovis* BCG con la integrina $\alpha_5\beta_1$ de la célula tumoral[47,48]. Esta interacción desencadena la macropinocitosis de *M. bovis* BCG[47], siendo mayor su internalización por células tumorales de alto grado respecto a las de bajo grado o a las células uroteliales no tumorales.

Como consecuencia de la internalización, *M. bovis* BCG puede ejercer un efecto antiproliferativo directo sobre las células neoplásicas. Se ha descrito que el mecanismo es mediante la detención del ciclo celular y/o induciendo apoptosis celular de las células tumorales. La inducción de NO que se produce en este proceso juega un papel relevante alterando la expresión génica de la célula tumoral y causando daños en el DNA. Finalmente, las células tumorales que internalizan *M. bovis* BCG intracelularmente, secretan citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y TNF- α , conduciendo al reclutamiento y activación de células inmunitarias.

Además de esta acción directa, *M. bovis* BCG presenta una respuesta antitumoral indirecta mediante la activación de las CPA y, consecuentemente, desencadenando la liberación de un amplio abanico de citocinas y quimiocinas que conducen a la estimulación e infiltración

tumoral de ciertas células inmunitarias generando una respuesta inmune innata y adaptativa.

2.4.1.1.1 El papel de la inmunidad innata

El reconocimiento de los patrones asociados a patógenos (PAMP) de *M. bovis* BCG mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del huésped[49], hace posible la activación de una respuesta inmune innata con las CPA como protagonistas. Los PRR capaces de reconocer los PAMP de *M. bovis* BCG incluyen receptores del complemento, el receptor NOD2, o los receptores *Toll-Like* (TLR)-2, -4 y -9 [12]. Los TLR han sido ampliamente estudiados en este contexto por ser los responsables de inducir la vía de señalización MyD88, dando como resultado la activación y translocación nuclear de factores de transcripción como el factor de transcripción nuclear (NF)- κ B, lo que conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-12, TNF y NO.

Algunas de las características más destacables de las células implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune inespecífica desencadenada por la inmunoterapia con *M. bovis* BCG son las que se detallan a continuación.

Macrófagos. Internalizan las micobacterias mediante fagocitosis siendo su principal huésped. Los pacientes tratados con *M. bovis* BCG presentan un aumento en el número de macrófagos en la pared de la vejiga y su capacidad citotóxica frente a células tumorales de vejiga está incrementada, ya que *M. bovis* BCG induce una polarización de los macrófagos hacia el morfotipo M1. Se ha demostrado que cuando el tratamiento inmunoterápico falla, en el microambiente tumoral se produce una polarización de macrófagos hacia un morfotipo M2, lo cual es predictivo de recurrencia tumoral[13,50].

Células polimorfonucleares (PMN). Grupo celular compuesto por neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Este tipo celular es predominante en la orina tras las instilaciones de *M. bovis* BCG y presentan la capacidad de eliminar las células tumorales infectadas con la micobacteria.

Células dendríticas (DC). Presentan una función crucial en la activación de las células T y, por ende, en el mecanismo de acción de *M. bovis* BCG. Junto con su implicación en la presentación de antígenos a los linfocitos T, las DC pueden activar a neutrófilos, células T Natural Killer (NKT) y células T $\gamma\delta$ induciendo su capacidad citotóxica.

Células NK. Son activadas por *M. bovis* BCG y por la presencia de citocinas Th1 como IL-2, IL-12 y IFN- α . Han mostrado un efecto antiproliferativo *in vitro* y de infiltración tumoral frente a células tumorales de vejiga infectadas con *M. bovis* BCG.

2.4.1.1.2 El papel de la inmunidad adaptativa

En cuanto a la respuesta adaptativa, las CPA (macrófagos y DC) procesan los antígenos de *M. bovis* BCG y los presentan en su superficie celular a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-II[51]. El MHC-II es reconocido por las células T CD4⁺, activándose así su diferenciación [52]. Los linfocitos T CD4⁺ activados son capaces de liberar una extensa variedad de citocinas, entre las que destacan IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 y/o IFN- γ , amplificando la respuesta inmune proinflamatoria. Adicionalmente, la mayoría de las células expresan MHC-I, reconocido por células T CD8⁺[53,54].

El tratamiento intravesical con *M. bovis* BCG favorece una respuesta inmune adaptativa hacia un perfil Th1, caracterizado por elevadas concentraciones de citocinas IL-2, IL-12 e IFN- γ , lo mismo que niveles aumentados de IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α y factor relacionado con el ligando de inducción a apoptosis (TRAIL)[55,56].

Igualmente, la presentación de antígenos también puede estar mediada por el aumento en la expresión de la proteína de adhesión ICAM-1 en la superficie de las células epiteliales del urotelio, favoreciendo la entrada masiva de *M. bovis* BCG al interior celular.

Como conclusión, a pesar de la comprensión incompleta del mecanismo de acción en el efecto terapéutico de *M. bovis* BCG en el CVNMI, la evidencia disponible sugiere que la respuesta inflamatoria celular incluye linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, células NK, granulocitos, linfocitos γ/δ y macrófagos, además de quimiocinas como IP-10 o citocinas como IL-2, IL-8, IL-12, IFN- γ y TNF- α [57] [9]. En conjunto se favorece una respuesta inmunitaria de tipo Th1, suponiendo un efecto antitumoral y una respuesta clínica a *M. bovis* BCG favorables[53,58].

2.4.1.2 Respuesta a nivel sistémico

El tratamiento de CVNMI con *M. bovis* BCG no solo presenta una respuesta local en la pared de la vejiga, sino que también es capaz de inducir una respuesta inmune sistémica. Aproximadamente un 40% de los pacientes sometidos a instilaciones intravesicales con *M. bovis* BCG, experimentan una conversión positiva de la prueba cutánea de tuberculina (*Purified Protein Derivative test*, prueba PPD). Esta conversión de la prueba PPD ha resultado ser un indicador de buen pronóstico en los pacientes con BC, presentando mejores tasas de supervivencia libre de recurrencia[50].

Se han reportado datos en los que se muestra que los pacientes que siguen tratamiento intravesical con *M. bovis* BCG, presentan niveles séricos elevados de quimiocinas y citocinas como IL-2 e IFN- γ , además de una respuesta humoral con aumento de los niveles séricos y urinarios de inmunoglobulinas[59].

Finalmente, se produce un aumento del número de linfocitos y un incremento en la capacidad antitumoral de las PBMC de los pacientes que han recibido instilaciones repetidas de *M. bovis* BCG.

2.4.2 Problemática en el uso de *M. bovis* BCG en pacientes con cáncer de vejiga

En el tratamiento intravesical con *M. bovis* BCG se ha descrito que un 30-40% de los pacientes no responden al tratamiento. Además, se han descrito en aproximadamente el 70% de las personas tratadas, como síntomas febriles, malestar o irritación local de la mucosa vesical. De acuerdo con los estudios publicados por la EAU, un pequeño porcentaje de los individuos tiene que suspender la inmunoterapia con *M. bovis* BCG debido a su toxicidad: Cuando se reporta un efecto adverso severo en un paciente con CVNMI, se debe parar inmediatamente el tratamiento con *M. bovis* BCG. Menos de un 1% sufren infecciones diseminadas y/o requieren de tratamiento con medicamentos antituberculosos[1,4].

Debido a la administración en su forma viva y a los efectos secundarios asociados, *M. bovis* BCG no puede administrarse inmediatamente después de la RTU, sino que debe transcurrir un periodo de dos semanas hasta el comienzo de la fase de inducción del tratamiento inmunoterapéutico [1]. Como se ha demostrado que el tratamiento inmediato tras la RTU es esencial, con el objetivo de disminuir la recurrencia y progresión tumoral hasta que pueda iniciarse el tratamiento intravesical con *M. bovis* BCG, es necesario el uso de quimioterápicos justo después de la RTU, con el consecuente aumento de probabilidad de eventos adversos.

Por otro lado, como se ha detallado anteriormente, las cepas derivadas de *M. bovis* BCG están ampliamente distribuidas por el mundo. En varios estudios se han reportado diferencias en cuanto a la efectividad y seguridad de *M. bovis* BCG en sus indicaciones principales de protección frente a TB e inmunoterapia en el CVNMI, de hecho, actualmente no existe un consenso en el uso de una cepa común. En el contexto de CVNMI, la diferencia en cuanto a la efectividad de las distintas cepas es controvertida y requiere de un estudio más profundo, así como diseños experimentales, análisis estadísticos más robustos, donde la comparativa entre las cepas se pueda realizar bajo las mismas condiciones. En un ensayo randomizado donde se comparó el efecto de *M. bovis* BCG Connaught y *M. bovis* BCG Tice sobre la supervivencia libre de recurrencia a los 5 años, se obtuvieron resultados significativamente mayores para aquellos pacientes tratados con *M. bovis* BCG Connaught [60,61]. Sin embargo, en otro de los estudios destacados, se mostró que la supervivencia libre de recurrencia a los 5 años era superior en los pacientes tratados con *M. bovis* BCG Tice respecto a la cepa de BCG Connaught[61,62]. Otro estudio reciente muestra datos de supervivencia libre de recurrencia similares para los pacientes tratados con las de *M. bovis* BCG Moreau y Tice.

Resultados similares se obtuvieron de un metaanálisis actual en el que no se obtuvieron grandes diferencias en cuanto a la efectividad de 10 diferentes cepas de *M. bovis* BCG[60,63,64].

2.4.3 Alternativas a *M. bovis* BCG para el tratamiento del cáncer de vejiga

Como resumen a lo expuesto, se han estudiado distintas alternativas para hacer frente a las limitaciones y efectos adversos producidos por el uso de *M. bovis* BCG en el CVNMI, evitando la recurrencia y/o progresión tumoral. Además del consenso en el calendario actual de instilaciones intravesicales de *M. bovis* BCG, existen distintas publicaciones que sugieren modificaciones de éste en caso de ciertas patologías en el paciente o fallo en el tratamiento con *M. bovis* BCG. Por otro lado, están en estudio otras alternativas a *M. bovis* BCG como la combinación de *M. bovis* BCG con agentes quimioterapéuticos como mitomicina C, el uso de cepas recombinantes de *M. bovis* BCG o alternativas inmunoterapéuticas. En este último grupo, se encuentran las alternativas inmunoterapéuticas basadas en compuestos inhibidores de rutas implicadas en el microambiente tumoral o el uso de micobacterias no-tuberculosas, como *M. brumae*, que ha demostrado una efectividad y seguridad adecuadas en el tratamiento del CVNMI.

Paralelamente al uso de los quimioterápicos convencionales (mitomicina C, doxorubicina, epirubicina), nuevos estudios han aportado datos sobre técnicas novedosas en el manejo de CVNMI. Por ejemplo, técnicas como la quimioterapia conducida por hipertermia, la terapia fotodinámica o la administración de fármacos mediante fuerza electromotriz, aumentan la precisión y la penetración del fármaco en las membranas biológicas[65,66].

Una de las alternativas ampliamente estudiadas ha sido la modificación del calendario de administración intravesical de la micobacteria o el uso de dosis inferiores de *M. bovis* BCG, disminuyendo los efectos secundarios. Algunas de las propuestas para el tratamiento de mantenimiento con *M. bovis* BCG incluyen instilaciones de la micobacteria cada dos semanas durante 12 semanas; una instilación mensual durante un periodo de entre 12 a 20 meses o incluso la supresión de la terapia de mantenimiento [12]. Sin embargo, recientemente la EAU publicó el abandono del estudio NIMBUS, con el que se evaluaba el uso de calendarios más reducidos de instilaciones intravesicales y dosis más bajas de *M. bovis* BCG. Los resultados de este estudio nos indican que espaciar las instilaciones en el tratamiento de mantenimiento o utilizar dosis de *M. bovis* BCG menores, no funciona adecuadamente, observando un incremento en la recurrencia tumoral[67–70].

Una alternativa basada en *M. bovis* BCG es el uso de cepas recombinantes, obtenidas mediante técnicas de ingeniería molecular [49]. Se consigue disminuir la toxicidad del tratamiento y potenciar la capacidad antitumoral e inmunomoduladora, con mayor

producción de citocinas de tipo Th1. Se ha observado en estudios *in vitro* el aumento de la citotoxicidad de PBMC frente a células tumorales de vejiga después de ser estimuladas con una cepa recombinante de BCG (rBCG) capaz de expresar IFN- α (rBCG- IFN- α) y, consecuentemente desencadenando una respuesta Th1[12,45]. Paralelamente, otros estudios *in vitro* con cepas rBCG- IFN- α mostraron una disminución en la toxicidad. Otro ejemplo, sería el estudio *in vivo* realizado sobre un modelo murino de cáncer de vejiga en el que una cepa rBCG-IL-15 demostró disminuir el crecimiento tumoral, incrementar la infiltración de neutrófilos y la expresión de quimiocinas, así como prolongar la supervivencia de los ratones respecto a la cepa de *M. bovis* BCG no recombinante[49].

Por otro lado, algunas de las alternativas más estudiadas se basan en el uso de virus como vehículo para introducir específicamente material genético en las células tumorales. Un ejemplo de ello es el uso del enterovirus oncolítico Coxsackievirus A21, cuyo estudio clínico en fase I ha mostrado su unión específica a la molécula-1 de adhesión intracelular, favoreciendo la lisis celular tumoral [71].

Otra de las alternativas propuestas es el uso de inhibidores de puntos de control de alguna de las rutas vitales para el desarrollo tumoral, con los que se consigue el bloqueo preciso de algunas moléculas como el receptor 1 de muerte programada (PD-1), el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), rescatando la inmunidad antitumoral suprimida por el propio tumor[72].

Del mismo modo, mediante diferentes ensayos, se está evaluando el efecto antitumoral de nuevos agentes inmunoterapéuticos basados en otras bacterias o en alguno de sus componentes. Para la introducción de estas bacterias es clave demostrar su perfil de seguridad y que presentan una efectividad igual o superior a *M. bovis* BCG en el tratamiento de CVNMI. Ha presentado resultados prometedores la respuesta inmune desencadenada por agentes como *Salmonella choleraesuis*, *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus casei* [73–75]. De igual manera, están arrojando datos interesantes ciertas proteínas activadoras de neutrófilos de *Helicobacter pylori* o la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* expresada en un virus oncolítico[76,77].

Otras especies de micobacterias no tuberculosas han mostrado propiedades antitumorales similares a *M. bovis* BCG en ensayos *in vitro*, *ex vivo* o en modelos animales. Algunas de las especies más prometedoras son las que se detallan a continuación.

- ***Mycobacterium phlei*:** Se ha analizado la capacidad antitumoral de *M. phlei* muerto por calor, obteniendo resultados similares *in vitro* a la forma viva de la bacteria. Además, el uso del complejo formado por la pared celular y los ácidos nucleicos de *M. phlei*, denominado MCNA, se ha mostrado en un ensayo clínico en fase III, como una alternativa segura y efectiva para los pacientes que no responden al tratamiento con *M. bovis* BCG[78–80].

- **Mycobacterium smegmatis**: se ha estudiado principalmente el efecto antitumoral de extractos de su pared celular o de *M. smegmatis* muerto por calor [81,82]. Además, también se han realizado estudios con una cepa recombinante de *M. smegmatis* capaz de expresar TNF- α humano, demostrando efecto antitumoral e inmunomodulador *in vitro* e *in vivo* [83]. *M. smegmatis* se considera una micobacteria no patógena, sin embargo, el uso de su forma viva está restringido por la notificación de casos de infecciones.
- **Mycobacterium indicus pranii (MIP)**: previamente conocida como *Mycobacterium w.* El estudio de esta micobacteria como herramienta en el tratamiento antitumoral, en su forma muerta por calor, reside en el efecto citotóxico e inductor de apoptosis celular que ha mostrado *in vitro* sobre diferentes líneas tumorales, incluyendo células tumorales de cáncer de vejiga. Se ha realizado un ensayo clínico con un grupo reducido de pacientes con BC, donde se han mostrado ratios de supervivencia del 100% en el uso de *M. indicus pranii* combinado con radioterapia [84,85].

2.4.3.1 Uso de micobacterias no tuberculosas: el caso de *M. brumae*

M. brumae (sinónimo de *Mycolicibacterium brumae*; [19]) es una micobacteria saprófita no-tuberculosa aislada de muestras ambientales de suelo y agua, descrita por primera vez en 1993 [86].

Recientemente, se ha descrito en distintos estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* a *M. brumae* como una herramienta inmunoterapéutica atractiva y con resultados prometedores para el tratamiento de CVNMI (Figura 4) [87]. Su capacidad para inhibir la proliferación tumoral *in vitro* se descubrió al comparar el efecto antitumoral de distintas especies de micobacterias sobre células tumorales de vejiga de diversos grados de diferenciación (T24 y J82 de alto grado y, RT4 y SW780 de bajo grado). *M. brumae* mostró una capacidad antiproliferativa similar a *M. bovis* BCG en células de alto grado, siendo incluso más eficaz que *M. bovis* BCG, en células tumorales de vejiga bien diferenciadas (tumores de bajo grado) [88].

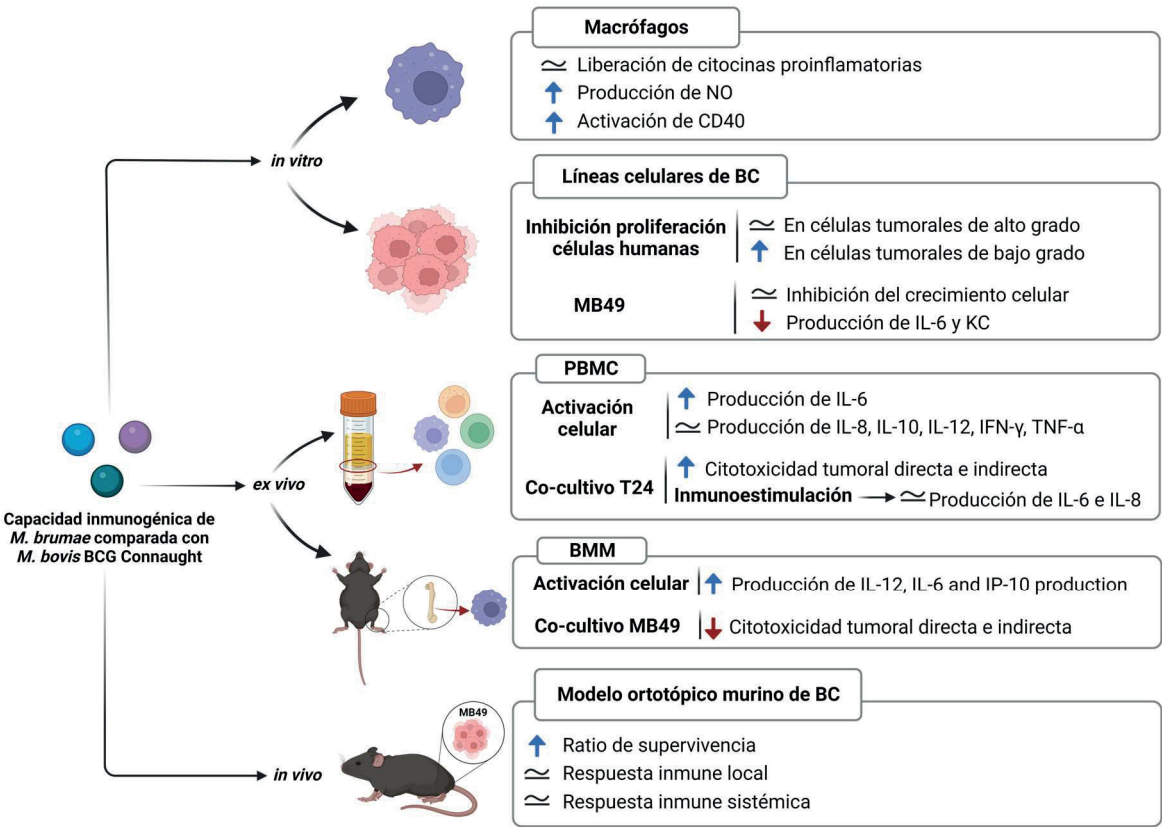


Figura 4. Capacidad inmunogénica de *M. brumae* comparada con *M. bovis* BCG Connaught. Resumen de los resultados obtenidos en estudios previos que usan ambas micobacterias con la línea celular de macrófagos murinos J774, líneas celulares de cáncer de vejiga, PBMC y macrófagos murinos de médula ósea (BMM). La flecha ascendente azul indica un nivel superior al de *M. bovis* BCG Connaught, la flecha descendente roja indica un nivel inferior al de *M. bovis* BCG Connaught y el símbolo de igualdad indica similar a *M. bovis* BCG Connaught. Creado con Biorender.

Además, se ha observado que *M. brumae* induce la activación *ex vivo* de PBMC, desencadenando la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 ó IFN-γ. De la misma manera, frente a las células tumorales T24, las PBMC activadas por *M. brumae* muestran un perfil citotóxico, tanto por contacto directo con las células tumorales, como el uso de los factores solubles liberados por las PBMC activadas [88].

En el modelo ortotópico murino de cáncer de vejiga, la inducción de respuesta inmunitarias locales y sistémicas mediante el tratamiento con *M. brumae* conduce a prolongar la supervivencia de los ratones con tumor respecto a los animales con tumor no tratados o tratados con *M. bovis* BCG [88,89]. Dicho tratamiento con *M. brumae*, igual que

con *M. bovis* BCG, también induce la infiltración local de células inmunes como linfocitos T, células NK o células NKT, mientras que, como respuesta sistémica, se detecta un aumento en la proliferación ex vivo de esplenocitos estimulados con micobacterias y un aumento en la producción de anticuerpos IgG circulantes.

Por otro lado, *M. brumae* ha mostrado un perfil de seguridad apropiado y extensamente probado (Figura 5) [88,90]. En la bibliografía no se han reportado casos de infección por esta micobacteria ni en animales ni humanos. Esto se refuerza con el hecho de que *M. brumae* no es capaz de sobrevivir en el interior de células tumorales de vejiga ni en macrófagos humanos o murinos, lo cual es clave de su no-patogenicidad. Recientemente, se ha demostrado su seguridad mediante la administración intravenosa de la forma viva de la micobacteria en los modelos animales de *Galleria melonella* y de ratón [90].

Por tanto, *M. brumae* se presenta como una alternativa prometedora a *M. bovis* BCG por sus características fenotípicas al ser una micobacteria de crecimiento rápido, por su seguridad demostrada *in vitro* e *in vivo*, su capacidad antitumoral o de inmunomodulación del sistema inmune en contextos tan amplios como la inmunoterapia de CVNMI.

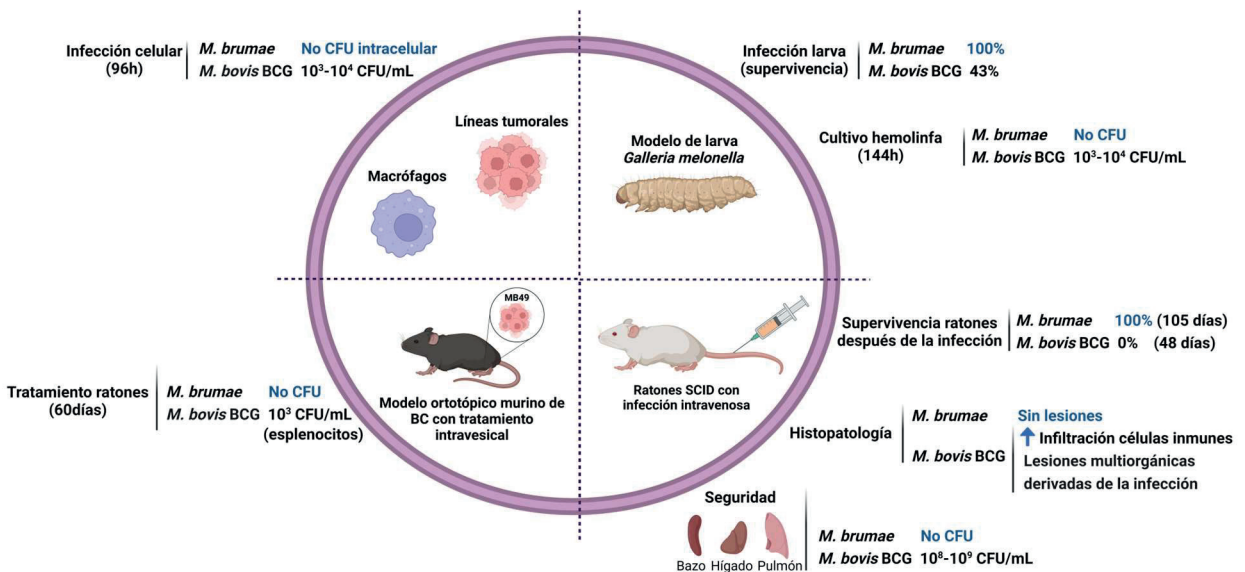


Figura 5. Perfil de seguridad de *M. brumae*. Comparación de la patogenicidad y toxicidad entre *M. brumae* y *M. bovis* BCG Connaught. Resumen de los resultados obtenidos en diferentes estudios *in vitro* infectando macrófagos y líneas celulares de cáncer de vejiga y, en estudios *in vivo* en diferentes modelos de animales: infección intrahematocóica de *Galleria mellonella*, instilaciones intravesicales en modelo ortotópico murino de cáncer de vejiga e infección intravenosa en ratones SCID. Flecha ascendente azul indica alta infiltración de células inmunitarias. Creado con Biorender.

3. Uso de micobacterias para otros tipos de cáncer

En las últimas décadas se han realizado un amplio número de estudios con diferentes especies de micobacterias como, *M. smegmatis*, *M. parafortdonae*, *M. phlei* o *M. indicus pranii*, en los que se ha descrito el efecto beneficioso sobre otros tipos de cáncer distintos al cáncer de vejiga.

En este sentido, las neoplasias más estudiadas han sido el melanoma y el cáncer de pulmón. En la figura 6 se detallan los estudios más relevantes realizados con micobacterias sobre ambos tipos tumorales. El resto de los estudios realizados se resumen en Noguera-Ortega *et al.*, (2020) [35,91]

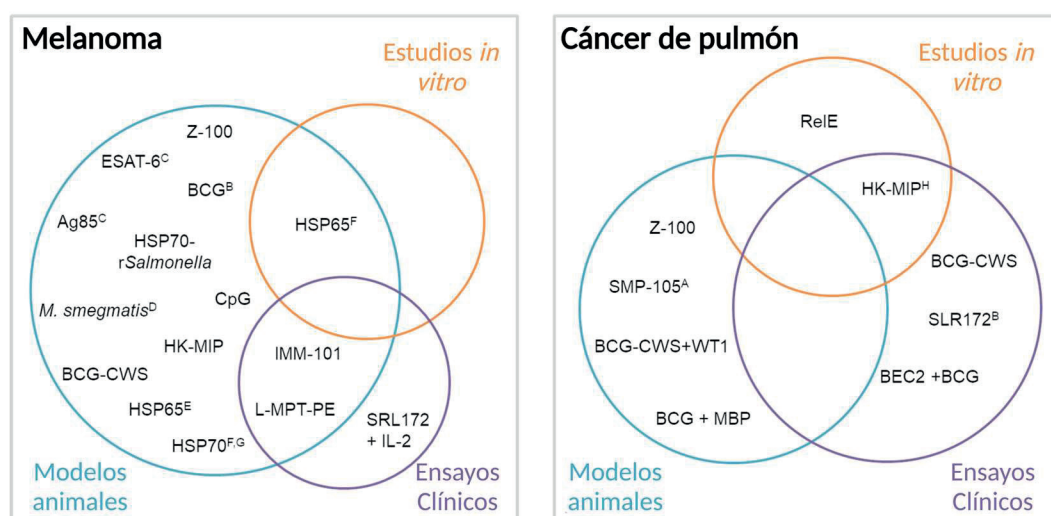


Figura 6. Estudios *in vitro* e *in vivo* usando agentes derivados de micobacterias para el tratamiento de melanoma y cáncer de pulmón. Modificada con Biorender de Noguera-Ortega *et al.*, 2020 [35]

4. Factores que influyen en el estado inmunológico: edad e inmunosenescencia

En el contexto del BC, la edad es un factor relevante ya que aproximadamente el 65% de los pacientes que sufren esta enfermedad tienen más de 65 años. Según los resultados arrojados en los distintos estudios a lo largo de los más de 40 años de uso de *M. bovis* BCG como inmunoterapia de CVNMI, se demuestra que la edad es un factor pronóstico para el resultado del tratamiento, así como para la recurrencia y progresión tumoral. Se ha

descrito una asociación entre edad y progresión: pacientes de edades avanzadas, superiores a 75 años, presentan una mayor tasa de progresión [92,93].

Este impacto negativo de la edad podría deberse a que la capacidad de generar una respuesta inmune adecuada va disminuyendo a lo largo de la vida, debido al fenómeno denominado como inmunosenescencia. En la inmunosenescencia el sistema inmunitario experimenta una serie de cambios degenerativos que implican respuestas significativamente deprimidas en personas de más de 60 años, lo cual se ha asociado con el inicio del proceso tumoral y la progresión [92–94].

Este proceso fue descrito por primera vez en 1969 por Walford *et al.* [93], quienes detallaron que se produce una degeneración progresiva que afecta la composición, cantidad y función tanto de los órganos inmunitarios como de las células inmunes y las citocinas [94]. La inmunosenescencia afecta la regulación del sistema inmunitario innato y adquirido, donde las células inmunes sufren una serie de cambios y una tendencia a producir respuestas inflamatorias excesivas [95,96] (Figura 7).

A grandes rasgos, las principales características son involución tímica, disminución de la población y diversidad de células T, disminución de la capacidad de presentación de antígenos por parte de las DC, atenuación de la fagocitosis de los macrófagos y aumento de las MDSC. Se muestra una disminución de la vigilancia inmunitaria y de la eliminación eficiente de células neoplásicas, aumentando la evasión del tumor al sistema inmune con mayor proliferación, metástasis y resistencia al tratamiento antitumoral [93]. Se favorece una atmósfera inmunosupresora en el microambiente tumoral donde disminuye la infiltración de DC, células T, macrófagos M1 y neutrófilos. Así mismo, se produce un aumento en la infiltración y acumulación de células inmunosupresoras como células Treg y macrófagos M2. Todo ello conduce a una eficacia desfavorable del tratamiento antitumoral y a un mal pronóstico [93,97].

4.1 Efecto sobre el sistema inmune innato

Monocitos. Con la edad la cantidad de monocitos circulantes se mantiene estable, sin embargo, la relación entre las diferentes subpoblaciones se ven alteradas. Se observa una disminución de los monocitos clásicos ($CD14^+CD16^-$) y un aumento de las subpoblaciones de monocitos intermedios ($CD14^+CD16^+$) y no-clásicos ($CD14^{dim}CD16^+$). Como consecuencia se reduce la expresión del receptor de quimiocina CX3CR1 y la molécula de antígeno leucocitario humano de clase II HLA-DR, afectando la función de presentación de antígenos a linfocitos. Aunque es controvertido el efecto de la inmunosenescencia sobre la capacidad de producir citocinas por parte de monocitos, un estudio reciente ha demostrado que dicha capacidad se mantiene intacta, viéndose incluso aumentada la liberación de factores inflamatorios [98].

Macrófagos. Aunque el número de monocitos circulantes se mantiene estable a lo largo de la vida, se ha demostrado que los niveles de precursores de macrófagos se reducen con la edad. Se comprometen sus funciones de quimiotaxis, expresión y función de la respuesta mediada por TLR, transducción de señales, fagocitosis y producción de superóxido. En un estudio preclínico *in vivo* en un modelo murino, se observó que los macrófagos de ratones envejecidos expresaban menos MCH-II, niveles más bajos de TLR y una producción reducida de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α . Además, también mostraron ser menos capaces de eliminar desechos apoptóticos. Debido a la dificultad metodológica, la mayor parte de los estudios realizados son con ratones, sin embargo, varios ensayos han podido extrapolar estos resultados en humanos, corroborando estas alteraciones de los macrófagos en individuos mayores de 65 años.

Neutrófilos. Se ha descrito que el estado inflamatorio crónico descrito en las personas de edad avanzada puede conducir a cambios epigenéticos en los neutrófilos, causando anomalías en su metabolismo y funcionalidad. Durante este proceso, se compromete su capacidad fagocítica, adhesión y quimiotaxis, así como un aumento de la apoptosis y disfunción de TLR [94].

DC. La inmunosenescencia parece comprometer la capacidad de desarrollar sus funciones principales como la captación de antígenos, actividad fagocítica, quimiotaxis, su migración o la secreción de citocinas [94,97]. Aunque la diferencia es sutil, se ha descrito que la capacidad para estimular las células T CD4⁺ por parte de las DC se encuentra comprometida, debido a la disminución en la capacidad de producir rápidamente IFN tipo I [97].

Células NK. Aunque se han observado niveles más altos de células NK con la edad, su función resulta más deficiente [97]. Esto parece deberse a la disminución de IL-2, IFN- α e IFN- γ , citocinas que median en la activación de células NK, especialmente importante en las personas mayores de 75 años. Además, con la edad se ha observado una diferencia más acusada entre hombres y mujeres, siendo mayor en mujeres tanto la cantidad de células NK como el poder citotóxico de éstas [94].

MDSC. Diferentes estudios han evidenciado que en la edad avanzada se observan niveles superiores de células MDSC que en personas más jóvenes. Estas células, como se ha explicado anteriormente, son características del microambiente tumoral y su expansión se ve favorecida por el propio tumor, con mayor producción basal de radicales libres y citocinas proinflamatorias.

4.2 Efecto sobre el sistema inmune adaptativo

Células B. Con la edad la proporción de células B periféricas disminuye, mientras que la cantidad de células B proinflamatorias aumenta debido al aumento de señales proinflamatorias como CD40L, IFN- γ e IL-21. Sin embargo, se muestra una menor diversidad en el repertorio de células B pero una mayor clonalidad del receptor de antígeno de células B (BCR)[94]. Se ha descrito la acumulación de un subconjunto de células B “asociadas a la edad” (ABCs) caracterizadas por su tendencia a la muerte celular. Estas células son capaces de expresar diversos receptores inhibidores y son relativamente refractarias a la estimulación mediante el receptor de células B y el receptor coestimulador CD40 caracterizándolas como células B “agotadas” [99].

Células T. Los cambios más notables de la inmunosenescencia se observan particularmente en las células T, produciendo un agotamiento funcional de éstas con expresión de citocinas inflamatorias [100]. A pesar de la marcada disminución en la producción de células T debido a la involución tímica [95,96], sus niveles periféricos se mantienen con la edad gracias a la proliferación homeostática. Se produce una acumulación de células T diferenciadas, resultando en un menor repertorio de TCR [96]. La restricción en el repertorio de TCR conduce a respuestas inmunitarias deficientes en la vejez, pudiendo dar resultados deficientes en los tratamientos quimioterápicos e inmunoterápicos y mayor mortalidad [95,97]. En cuanto a las subpoblaciones, los niveles de células T CD4⁺ se mantiene estables durante el envejecimiento, mientras que las células T CD8⁺ pueden sufrir una ligera disminución, disminuyendo el efecto letal sobre microorganismos o células tumorales y comprometiendo la capacidad antitumoral [95]. Así mismo, debido a la acumulación de células T de memoria en personas mayores, se ha descrito un aumento del marcador de células de memoria CD45RO y del marcador senescente CD57 en esta población.

- **Células Treg.** Los niveles de esta subpoblación de células T aumentan con la edad debido a la diferenciación de células T CD4⁺ y la proliferación de las propias células Treg. Estas células son capaces de expresar receptores inhibitorios como PD-1 y CTLA-4 y secretan citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10. Este hecho afecta drásticamente el mantenimiento del equilibrio inmunitario regulando las respuestas inmunitarias hacia un perfil supresor [94]. Igualmente, en la edad avanzada se ha demostrado una mayor infiltración de células Treg en el tumor, promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis.

En resumen, mientras que el sistema inmunitario innato muestra defectos funcionales en la fagocitosis y quimiotaxis y una disminuida producción de citocinas, las células inmunitarias adaptativas muestran una diversidad de receptores reducida, producción de anticuerpos defectuosa y una fuerte disminución en las poblaciones celulares [98]. Se

promueve un deterioro funcional celular relacionado con la edad y un estado de inflamación crónica, que puede comprometer la respuesta al tratamiento antitumoral y/o al fracaso de la vacunación con una disminución de la protección heteróloga.

Finalmente, la senescencia celular de cualquier tipo celular también desencadena disfunción metabólica y daño en el DNA. Los daños en el DNA son un sello típico de envejecimiento, observados por el deterioro de los sistemas de reparación, entre otros [95]. Paralelamente, muchas células senescentes secretan factores proinflamatorios conocidos como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) [96], compuesto por citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas de matriz [100]. La función principal de las SASP es perpetuar el estado antiproliferativo y fomentar la eliminación de las células senescentes por el sistema inmune, generando la activación de subconjuntos de células T y B, células NK, células NKT, células dendríticas, macrófagos y células $\gamma\delta$, lo cual favorece el estado inflamatorio crónico que ya se produce durante la inmunosenescencia [95].

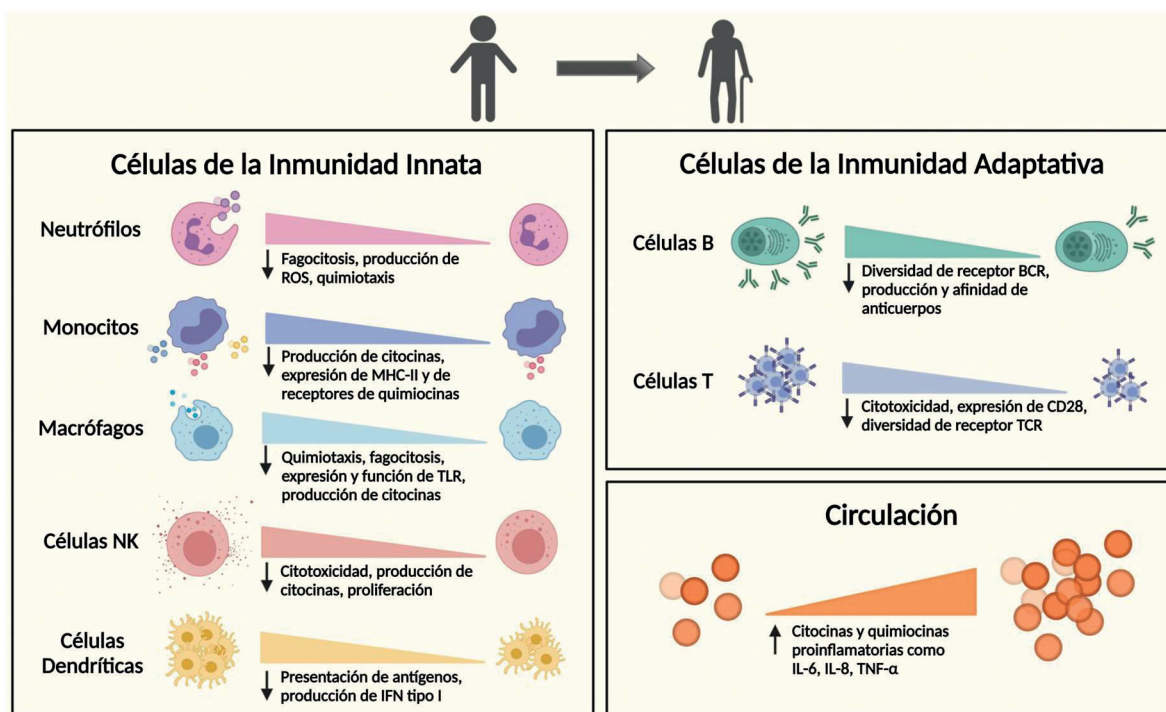


Figura 7. Cambios funcionales en el sistema inmunológico asociados a la edad. Modificado con Biorender a partir de Bulut *et al.*, 2020 [98].

5. Inmunidad entrenada del sistema inmune innato como mecanismo de protección

Este efecto inmunomodulador del sistema inmune que presentan ciertas micobacterias también puede ser útil como protección frente a procesos autoinmunes o infecciones por otros microorganismos.

A este proceso se le ha denominado como *Trained immunity* o inmunidad entrenada y, se caracteriza por la inducción de citocinas proinflamatorias y cambios metabólicos y epigenéticos en las células inmunes innatas.

La capacidad de generar memoria en el sistema inmune se ha considerado a lo largo del tiempo como una capacidad limitada al sistema inmune adaptativo, catalogando a la respuesta innata como primitiva y no específica [101]. Sin embargo, con el aumento de estudios inmunológicos, se han descrito otros mecanismos implicados en el efecto protector del sistema inmune [102], desterrando este pensamiento.

Diferentes experimentos indican que el sistema inmune innato es capaz de brindar protección heteróloga al huésped debido a su capacidad de desarrollar una respuesta de memoria inespecífica frente a una amplia variedad de estímulos. A este proceso se le denomina "*Trained immunity*" o inmunidad entrenada y se basa en la reprogramación funcional a largo plazo de las células inmunitarias innatas después de un contacto con un estímulo primario. Como consecuencia, se induce una respuesta inmune innata aumentada en respuesta a una infección o estímulo secundario [102,103]. Esta respuesta de memoria en las células inmunes innatas es menos específica que en la memoria inmunológica adaptativa [103] y, viene determinada por el aumento de citocinas proinflamatorias, así como cambios metabólicos y epigenéticos en las células implicadas.

La primera descripción que se asemeja al concepto actual de inmunidad entrenada lo describió Howard *et al.*, en 1959, describiendo la resistencia de las células fagocíticas a la infección de *Salmonella enteritidis* después de la infección del huésped por *M. bovis* BCG [102]. De hecho, dos de los agentes más estudiados como inductores de inmunidad entrenada son *M. bovis* BCG y el β -glucano de *Candida albicans*. Se ha descubierto que ambos inducen una reprogramación epigenética estable favoreciendo la activación celular, un aumento de la producción de citocinas y cambios en el estado metabólico de la célula [101]. Durante la década de 1960, a través de estudios experimentales en animales y humanos, se demostró que existía protección cruzada con otros patógenos bacterianos no relacionados después de la vacunación con *M. bovis* BCG. Estos estudios mostraban que el contacto previo de las PBMC con *M. bovis* BCG inducía un posterior aumento de la producción de IFN- γ cuando se producía una infección con otros

microorganismos no relacionados, impulsando la protección inespecífica [39]. Esto se debe a que la inmunidad entrenada periférica inducida por *M. bovis* BCG resulta en mejores respuestas por parte de monocitos y macrófagos, con incremento de la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como una liberación más efectiva de especies reactivas de oxígeno y proteasas antimicrobianas, lo que conduce a la fagocitosis más eficiente [39]. Aunque los monocitos y macrófagos son células troncales en la respuesta innata, también se ha estudiado la inducción de memoria en otras células mieloides mononucleares como DC o neutrófilos [102].

Además, *M. bovis* BCG también es capaz de inducir reprogramación funcional a nivel de los progenitores de células mieloides de la médula ósea, desarrollando inmunidad entrenada central [102]. Un estudio reciente con un modelo murino ha demostrado que el entrenamiento de monocitos y macrófagos inducido por *M. bovis* BCG era efectivo *in vivo*. La micobacteria accedía a la médula ósea cambiando el panorama transcripcional de las células madre hematopoyéticas (CMH) y de los progenitores multipotentes, dando lugar a la expansión celular local y a una mielopoyesis mejorada. Esto mostró CMH educadas que generan macrófagos modificados epigenéticamente, favoreciendo una mayor protección frente a la infección por *M. tuberculosis* respecto a los CMH sin estimular [104]. El acúmulo de estudios inmunológicos y epidemiológicos ha demostrado que los cambios funcionales que generan memoria en células inmunes innatas son de larga duración [39], observándose hasta al menos un año después del primer estímulo. Así mismo, se han descrito efectos de la protección inespecífica inducida por vacunación hasta 5 años después de ésta [102,103]. El desarrollo de nuevos estudios junto con el seguimiento en el tiempo de los ya iniciados tendrá una gran relevancia por ser un área prometedora para conseguir nuevas vacunas y tratamientos donde el sistema inmune innato tenga un papel destacado/principal [101,105].

Así, como resultado de la exposición inicial al estímulo primario, se promueve el *priming* celular no específico del sistema inmune innato [103], con la activación en cascada de una serie de rutas intracelulares que se caracterizan por producir una remodelación metabólica, epigenética y transcripcional [102,106], lo cual se detalla a continuación.

5.1 Reprogramación metabólica y epigenética

La respiración aeróbica es la principal fuente de ATP en muchas de las células humanas. Sin embargo, la glucólisis, como forma alternativa de metabolismo de la glucosa y obtención energía, juega un papel importante en la inmunidad [107]. Durante la activación celular inmune se ha observado un aumento de la regulación de la glucólisis, incrementando el consumo de glucosa con una producción elevada de lactato [108]. Es decir, la inducción de la inmunidad entrenada conduce a un cambio del metabolismo celular desde la fosforilación oxidativa hacia la glucólisis, específicamente a través de la

vía mTOR/HIF1 α /Akt [109]. En la estimulación de macrófagos, se ha observado que el piruvato generado durante la glucólisis, en vez de ser utilizado por la mitocondria favoreciendo el proceso de fosforilación oxidativa, se transforma en lactato, el cual se libera al exterior celular. Las células inmunitarias innatas utilizan esta adaptación metabólica para obtener la energía necesaria para su activación en el momento oportuno [108].

Este cambio metabólico conlleva la acumulación de metabolitos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), como el fumarato y el succinato, lo cual parece estar relacionado con el control en la metilación y acetilación de las histonas, formando la base metabólica y epigenética de la inmunidad entrenada [110]. La acumulación de estos metabolitos es crucial debido a que actúan como cofactores para el DNA y las enzimas que actúan sobre histonas, siendo las más relevantes: metiltransferasas, desmetilasas, acetiltransferasas y desacetilasas de histonas [102]. Además, se ha descrito que después de una semana del *priming* de los monocitos con un primer estímulo, se observa una regulación epigenética de los genes involucrados en la codificación de las enzimas glucolíticas hexoquinasa y piruvato quinasa.

La concentración en los niveles de ciertos intermediarios del ciclo TCA tiene un impacto directo en la funcionalidad de las enzimas implicadas en las modificaciones epigenéticas a nivel de histonas. Un ejemplo es el efecto inmunomodulador del fumarato que media la inhibición de la familia KDM5 de histonas desmetilasas, lo que aumenta la metilación de histonas y provoca un estado abierto de la cromatina, favoreciendo la expresión de genes proinflamatorios [111]. Otro ejemplo se debe al acúmulo de succinato, que produce la inhibición de la hidroxilación de HIF1, lo cual promueve la transcripción de IL-1 β en los macrófagos inflamatorios.

Como consecuencia del balance metabólico a favor de la vía glucolítica durante la inducción del entrenamiento inmunitario, se produce una reprogramación epigenética, atribuida a cambios estables en la trimetilación y acetilación de histonas. Se ha mostrado que las marcas epigénéticas más relevantes relacionadas con un fenotipo de inmunidad entrenada inducido por β -glucano y *M. bovis* BCG residen, principalmente en la histona 3 (H3), siendo las más importantes la mono- y tri-metilación de la H3 en la lisina 4 (K4) (H3K4me1 y H3K4me3, respectivamente), la metilación de la H3 en la lisina 9 (H3K9me) y la acetilación de H3 en la lisina 27 (H3K27ac) [109,112–114]. Estos cambios moleculares, presenta un impacto a largo plazo [115], modificando la accesibilidad de la cromatina. El estado abierto de la cromatina conduce a una transcripción más eficaz de los genes importantes para la protección y defensa del huésped [39].

La posición de la metilación y el número de grupos metilo (mono-, di- o tri-metilación) están asociados tanto a inducción como a represión génica. Mientras que la di- o tri-metilación de las H3K9 y H3K27 son marcas de histonas represivas, la acetilación de H3K27

y la di- o tri-metilación de la H3K4 en genes proinflamatorios [116] denota cromatina abierta y está asociada con la activación génica[113], con un incremento en la producción de citocinas [115]. Un ejemplo de metilación represiva sería la H3K9me3, facilitando la metilación del ADN, la formación de heterocromatina y, como consecuencia, el silenciamiento génico [117]. Otro fenómeno relacionado con la modificación de histonas sería el de tolerancia. Se ha descrito que la estimulación continuada de los monocitos con lipopolisacárido (LPS), induce tolerancia mediante el acúmulo de metilaciones en H3K9 tras la re-estimulación con este agente inespecífico [118] (Figura 8).

En los estudios realizados por Arts *et al.*, se evaluó la regulación del metabolismo de la glucosa en monocitos y macrófagos entrenados[119]. Para ello, se determinó la expresión de RNAm de mTOR, de enzimas implicadas en el proceso y se determinó la trimetilación de H3K4 y H3K9. Se demostró que cuando los monocitos se entrenaron con *M. bovis* BCG, se obtuvo un aumento de H3K4me3 y una acusada disminución de H3K9me3 en los promotores de mTOR, IL-6 y TNF- α . Esto demuestra que *M. bovis* BCG induce entrenamiento de la inmunidad innata, pero también muestra que los cambios metabólicos y epigenéticos están entrelazados y son altamente dependientes entre sí [119]

En conclusión, se ha demostrado que la glucólisis elevada y la acumulación de metabolitos intermedios del TCA, controlan la metilación y acetilación de diferentes posiciones de la H3, generando así la base metabólica y epigenética para la inmunidad entrenada del sistema innato [120,121].

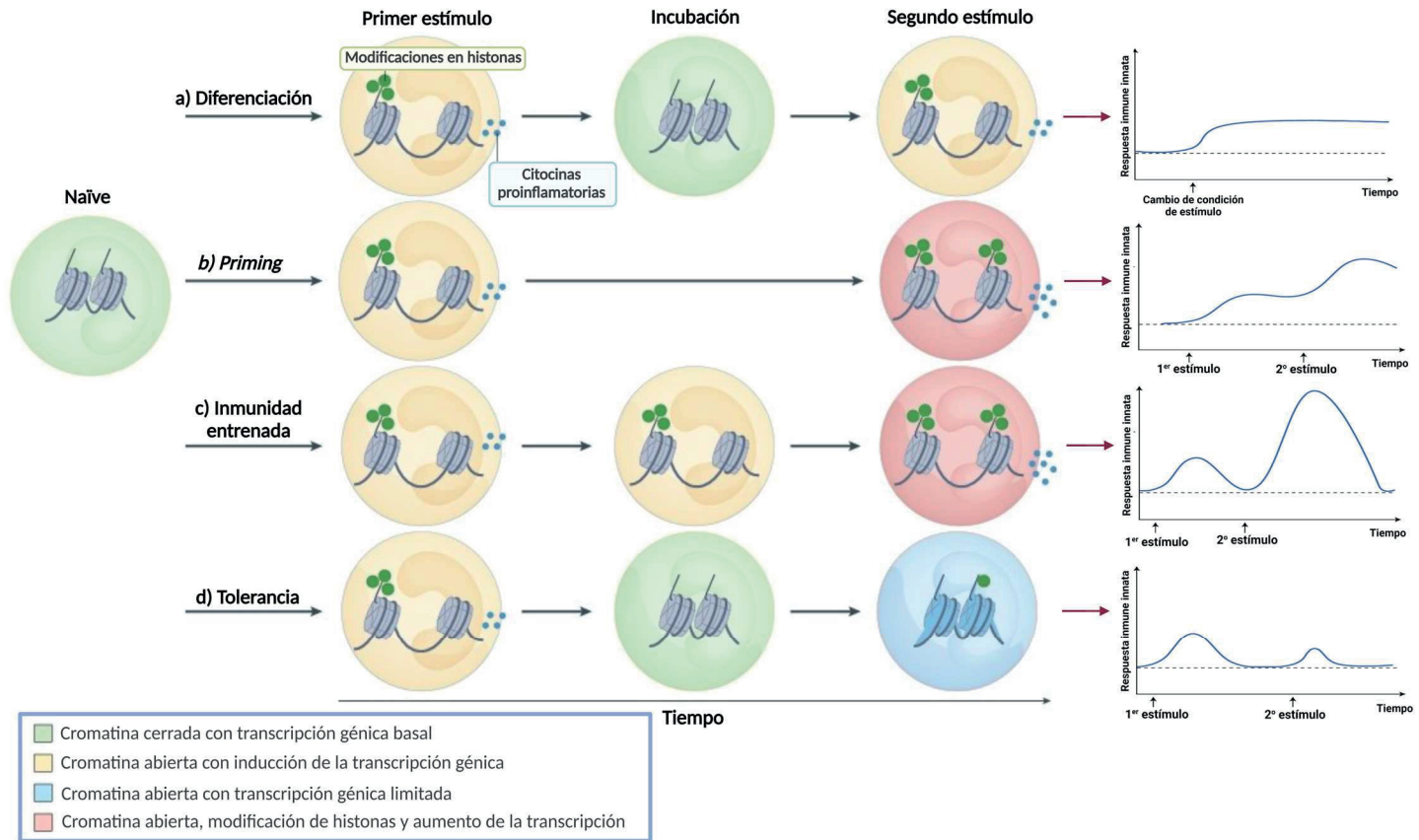


Figura 8. Representación esquemática de las diferencias en la activación celular y del comportamiento de las respuestas inmunes innatas durante los diferentes mecanismos adaptativos inducidos por las células del sistema inmune innato. a) Diferenciación, b) *Priming*, c) Inmunidad entrenada (memoria inmune innata) y d) Tolerancia. Modificado con Biorender a partir de Divangahi *et al.*, 2021, y Ochando *et al.*, 2023 [121,122].

CONTEXTO CIENTÍFICO Y OBJETIVOS

CONTEXTO CIENTÍFICO Y OBJETIVOS

Desde hace más de 40 años, *M. bovis* BCG se utiliza como terapia inmunológica local para el tratamiento del cáncer de vejiga no músculo invasivo (CVNMI) por su alta efectividad. Sin embargo, se describen eventos adversos graves en un alto porcentaje de los pacientes tratados [1], incluyendo casos de infección por BCG, por lo que explorar nuevas alternativas es imprescindible. Se ha demostrado que *M. brumae*, una micobacteria ambiental no patógena, es segura [90] y presenta una capacidad antitumoral similar, siendo un buen candidato para reemplazar a *M. bovis* BCG en el tratamiento del CVNMI [87]. Hay estudios que han reportado el efecto antitumoral *in vitro* de diferentes micobacterias frente a células tumorales de distinta anatomía a la vesical [35], por lo que es interesante estudiar el efecto antiproliferativo de *M. brumae* sobre distintas líneas tumorales diferentes a CVNMI para aumentar el número de tratamientos disponibles.

Así mismo, la población diana para el tratamiento con micobacterias, en el contexto de cáncer de vejiga, son mayoritariamente hombres con una edad superior a 60 años. Se ha descrito el deterioro que el sistema inmune presenta con la edad, disminuyendo la capacidad citotóxica y fagocítica por el descenso celular y/o de su capacidad efectiva [94,96,98,123]. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre el potencial inmunoterapéutico de nuevos agentes *ex vivo*, se realiza en muestras de donantes de una población más joven. Con el fin de evaluar si los resultados obtenidos *ex vivo* en una población joven son comparables con los de una población senescente, es necesario evaluar *ex vivo* la capacidad inmunomoduladora de *M. brumae* y *M. bovis* BCG en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de poblaciones sanas de distintos rangos de edad, así como pacientes con cáncer de vejiga.

En cuanto al mecanismo por el que las micobacterias activan el sistema inmunológico, se ha demostrado la capacidad de *M. bovis* BCG en la activación y modulación del sistema inmune innato, generando memoria y protección inespecífica frente a diferentes patologías como afecciones autoinmunes, infecciones por microorganismos patógenos o ciertos tipos de procesos tumorales [102,124]. Varios estudios demuestran que determinados componentes de la pared celular de algunas micobacterias inducen un aumento en la liberación de citocinas y, promueven cambios metabólicos y epigénéticos en la célula [101,119,121]. Debido a ello, es relevante ampliar el conocimiento sobre la implicación de las micobacterias no tuberculosas, como *M. brumae*, en la protección inmune y, poder dilucidar el mecanismo de acción por el cual se genera la inmunomodulación de la respuesta inmune innata.

Objetivos

- **Objetivo 1:** Caracterizar fenotípica y genéticamente diferentes cepas de *M. brumae* y evaluar su capacidad inmunomoduladora y antitumoral.
 - Caracterización fenotípica de cuatro cepas de *M. brumae* comparando su perfil lipídico y la susceptibilidad a antimicrobianos.
 - Secuenciación del genoma de las diferentes cepas de *M. brumae* y análisis de las diferencias genéticas entre ellas.
 - Análisis comparativo del efecto inmunomodulador *in vitro* de las cepas de *M. brumae* sobre macrófagos humanos y murinos.
 - Evaluación *in vitro* del efecto antiproliferativo de las cepas de *M. brumae* frente a líneas tumorales de vejiga, tracto gastrointestinal, mama, cérvix y pulmón.
- **Objetivo 2:** Estudiar *ex vivo* la capacidad inmunoterapéutica de *M. brumae* y *M. bovis* BCG en cáncer vesical sobre diferentes grupos poblacionales.
 - Evaluación de la activación de PBMC inducida por *M. brumae* y *M. bovis* BCG.
 - Análisis del efecto antitumoral directo e indirecto de las PBMC activadas sobre células de cáncer vesical.
- **Objetivo 3:** Estudio de la capacidad de inducir el entrenamiento del sistema inmune innato por diferentes cepas de *M. brumae* y de *M. bovis* BCG en modelos *in vitro* y *ex vivo*.
 - Inmunidad entrenada inducida por las micobacterias utilizando como modelo de estudio *in vitro* la línea celular THP-1
 - Evaluación de la estimulación y modulación inmune innata de *M. brumae* y *M. bovis* BCG en modelos *ex vivo* humanos y murinos.

CAPÍTULO I

Caracterización de diferentes cepas de *M. brumae* a nivel genómico, fenotípico y funcional.

CAPÍTULO I. IN VITRO DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *M. BRUMAE*

1. Material y métodos

1.1 Origen de las micobacterias

Distintas cepas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG Connaught se utilizaron para evaluar su efecto antitumoral frente a distintas líneas tumorales de origen diverso. Además, se analizó *ex vivo* la capacidad de la cepa de referencia de *M. brumae* (CR-270) y *M. bovis* BCG Connaught para inmunomodular la activación de PBMC de individuos de poblaciones de distinto rango de edad en el contexto de cáncer de vejiga. Por último, se utilizaron tres cepas de *M. brumae* y nueve cepas de *M. bovis* BCG para evaluar la línea de monocitos THP-1 como modelo *in vitro* de inmunidad entrenada, así como para analizar la capacidad de las cepas de *M. brumae* de estimular *ex vivo* monocitos humanos generando una respuesta heteróloga inespecífica compatible con el concepto de inmunidad entrenada. El origen y código ATCC de las distintas micobacterias utilizadas en los experimentos se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Origen y código ATCC de las micobacterias utilizadas en los experimentos

Micobacteria	ATCC	Lugar de obtención
<i>M. brumae</i> CR-270	51384	Cepario del Laboratorio de Micobacteriología, UAB, Barcelona, España
<i>M. brumae</i> CR-269	Luquin <i>et al</i> , 1993 [86]	Cepario del Laboratorio de Micobacteriología, UAB
<i>M. brumae</i> CR-142	Luquin <i>et al</i> , 1993 [86]	Cepario del Laboratorio de Micobacteriología, UAB
<i>M. brumae</i> CR-103	Luquin <i>et al</i> , 1993 [86]	Cepario del Laboratorio de Micobacteriología, UAB
<i>M. bovis</i> BCG Connaught	35745	Aventis Pasteur Laboratories (immunocyst)
<i>M. bovis</i> BCG Glaxo	35741	Cedida por el Dr. Jun Liu (Universidad de Toronto, Toronto, Canadá)
<i>M. bovis</i> BCG Japan	35737	Cedida por el Dr. Jun Liu (Universidad de Toronto)

<i>M. bovis</i> BCG Moreau	35736	Cedida por el Dr. Carlos Martín, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España)
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	35734	Cedida por la Dra. María Jesús García, Universidad Autónoma de Madrid
<i>M. bovis</i> BCG Phipps	35734	CECT, Colección española de cultivos tipos
<i>M. bovis</i> BCG Russian	35740	Cedida por el Dr. Carlos Martín, Universidad de Zaragoza)
<i>M. bovis</i> BCG Tice	27289	DSMZ, Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares
<i>M. bovis</i> BCG Oncotice	674275	Merck Sharp
<i>M. gastri</i>	15754	Cepario del Laboratorio de Micobacteriología, UAB, Barcelona, España

De las cepas de *M. brumae* que se utilizaron, la cepa de referencia y las cepas CR-142 y CR-103 fueron aisladas de muestras del río Llobregat en Barcelona (España), mientras que la cepa CR-269 fue aislada de una muestra de suelo (Luquin *et al.*, 1993).

1.2 Conservación y mantenimiento de micobacterias

La conservación a largo plazo de las diferentes especies de micobacterias se realiza almacenándolas en leche desnatada al 20% en agua destilada (H₂O_d) (p/v), previamente autoclavada a 115°C durante 15 minutos para su esterilización, y congeladas a -40°C.

Para el cultivo y mantenimiento de las micobacterias, se utilizó medio Agar Middlebrook 7H10 (Difco™ Laboratories, Reino Unido) suplementado con un 10% de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC). Para su correcto crecimiento, las micobacterias se incubaron a 37°C durante 7 días para las cepas de *M. brumae* y *M. gastri*, y 21 días para las cepas de *M. bovis* BCG.

1.3 Técnicas de cultivo de micobacterias

1.3.1 Suspensiones bacterianas

Debido a que para este trabajo se han utilizado microorganismos de nivel de bioseguridad 1 (*M. brumae*) y 2 (*M. bovis* BCG y *M. gastri*), los experimentos se realizaron en las instalaciones de bioseguridad adecuadas: laboratorio A/ES/15/I-35, siguiendo procedimientos aprobados por el Comité de Bioseguridad de la UAB.

1.3.1.1 Preparación de suspensiones bacterianas para estudios de citotoxicidad e inmunomodulación

Para infectar los cultivos celulares con las diferentes micobacterias, se prepararon suspensiones de éstas que se utilizaron recién preparadas para el estudio del efecto de las micobacterias vivas.

Se recogieron las bacterias de la superficie del medio de cultivo sólido y se depositaron en un tubo de vidrio con bolitas de vidrio estériles. Para disgregar la biomasa de micobacterias, se agitaron en el Vórtex y, a continuación, se añadió PBS para formar una suspensión concentrada de las bacterias. Se dejó reposar durante 20-30 minutos para que precipitasen los agregados y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de vidrio, ajustándolo a una turbidez correspondiente a un estándar McFarland 1 (McF1). Seguidamente la suspensión homogénea se centrifugó a 1640 *g* durante 10 minutos y 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió en medio de cultivo celular completo sin antibióticos y se ultrasónico en un baño durante 3 ciclos de 30 segundos cada uno. Finalmente se obtuvo una suspensión celular de bacterias individuales, sin formación de agregados.

Con las suspensiones bacterianas se realizaron las infecciones celulares del estudio, así como diluciones seriadas y siembra en medio de cultivo 7H10 para el recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU). La suspensión bacteriana correspondiente a un McF1, fue equivalente a una concentración bacteriana diferente según la micobacteria sembrada, siendo de 5×10^6 CFU/mL para las cepas de *M. brumae*, de 5×10^5 CFU/mL para las cepas de *M. bovis* BCG y, de 1×10^7 para *M. gastri*.

1.4 Extracción y análisis de lípidos y ácidos micólicos

Con el objetivo de conocer la composición lipídica de las diferentes cepas de *M. brumae*, se realizó la extracción de lípidos y ácidos micólicos. Mientras que para la extracción de ácidos micólicos se llevó a cabo un solo procedimiento, para la extracción de lípidos se realizaron dos protocolos distintos. Con uno de ellos se estudió el contenido total de lípidos de la célula micobacteriana, mientras que con el segundo se determinaron los lípidos expuestos en la parte más superficial en la pared de la micobacteria. Una vez realizadas las extracciones, se monitorizó la composición lipídica y de ácidos micólicos de las diferentes cepas mediante cromatografía en capa fina (TLC, *thin-layer chromatography*).

1.4.1 Extracción total de lípidos de la pared bacteriana

Se pesaron 0.2g de la bacteria crecida en medio sólido 7H10 y se transfirió a un Erlenmeyer de vidrio. Sobre la biomasa pesada, se añadió una mezcla de solventes orgánicos compuesta por cloroformo y metanol (cloroformo:metanol, 1:2, v/v). Con los Erlenmeyer perfectamente cerrados, la mezcla se mantuvo en constante agitación toda la noche (ON, *overnight*). Al día siguiente, el contenido del Erlenmeyer se filtró con papel de filtro y se recogió la fase líquida (solventes orgánicos con el extracto de micobacteria) en nuevos tubos de cristal. Los solventes orgánicos de la parte líquida se evaporaron insuflando un flujo de nitrógeno en el interior del tubo e introduciéndolos en un baño de calor seco a 37°C. Una vez evaporados los solventes orgánicos, los tubos se cerraron con una atmósfera de nitrógeno y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Por otro lado, los restos celulares secos de la micobacteria se recogieron del papel de filtro y se mantuvieron en agitación ON, de nuevo, con una mezcla de cloroformo y de metanol (cloroformo:metanol, 2:1, v/v). Posteriormente se filtraron los restos celulares, recogiendo la fase líquida con los extractos lipídicos en los tubos de vidrio utilizados el día anterior, que se evaporaron y almacenaron como se indicó anteriormente.

A continuación, los extractos lipídicos se resuspendieron en una solución de cloroformo, metanol y agua destilada (H₂O_d) (cloroformo: metanol: H₂O_d, 8:4:2, v/v/v). El agua destilada utilizada contenía un 0,04% de cloruro de calcio (CaCl₂) para minimizar la formación de interfases. Esta mezcla de lípidos se transfirió a un embudo de decantación, se mezcló suavemente y se dejó reposar ON hasta observar dos fases transparentes e inmiscibles entre sí. Se recogió la fase inferior, correspondiente al extracto lipídico, mientras que la fase superior, con los lípidos más polares, se recogió por separado. El contenido de ambos tubos fue evaporado, cerrado y almacenado a 4°C hasta la realización del análisis lipídico mediante TLC.

1.4.2 Extracción superficial de lípidos de la pared bacteriana

Para la extracción superficial de lípidos de la pared bacteriana, las micobacterias se inocularon en medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 (7H9) formando una biopelícula que cubriera toda la superficie.

Para ello, se realizó una suspensión bacteriana de cada cepa de *M. brumae* siguiendo el procedimiento explicado anteriormente y ajustando cada suspensión bacteriana a la turbidez de un McF 1. Las botellas con medio 7H9 líquido fueron inoculadas en la interfase líquido/aire con 0.3mL de la suspensión bacteriana y se incubaron sin agitación a 37°C durante 11 días. Trascurrido este tiempo, sobre la biopelícula de micobacterias se añadieron suavemente 20mL de éter de petróleo (40-60°). El solvente se mantuvo en contacto con la biopelícula durante 5 minutos con el recipiente cerrado herméticamente. El éter de petróleo se recogió con una pipeta Pasteur de vidrio y se transfirió a un tubo de vidrio. Finalmente, el contenido de los tubos fue evaporado y almacenado como se detalla anteriormente hasta la realización del análisis lipídico mediante TLC.

1.4.3 Extracción de ácidos micólicos

La extracción de ácidos micólicos de la pared de la micobacteria se realizó mediante metanólisis ácida. Para ello, la biomasa de cada micobacteria crecida en medio 7H10, se transfirió a un tubo de vidrio sobre el que se añadieron 2mL de solución esterificante (metanol: tolueno: H_2SO_4 , 30:15:1, v/v/v). La mezcla se agitó con un Vórtex y se mantuvo ON a 80°C en un baño de calor seco, favoreciendo la ruptura del enlace éster entre los ácidos micólicos y el arabinogalactano y, liberando los ácidos micólicos de la pared bacteriana.

A continuación, se añadió hexano sobre la solución esterificante, se homogeneizó y se dejó reposar hasta observar dos fases inmiscibles entre sí. Con una pipeta Pasteur de vidrio se recogió y transfirió a un tubo nuevo la fase apolar con los ácidos micólicos extraídos. El contenido de los tubos fue evaporado con nitrógeno a 40°C, cerrado y almacenado a 4°C hasta la realización del análisis de ácidos micólicos mediante TLC.

1.4.4 Análisis mediante cromatografía en cada fina unidimensional (TLC)

Los extractos lipídicos obtenidos de las extracciones total y superficial, así como los extractos de ácidos micólicos fueron analizados mediante TLC unidimensional en placas de silicagel 60 (Merck, Alemania). Mientras que los extractos lipídicos totales y superficiales de la pared bacteriana se resuspendieron en 100-200µL de cloroformo, los extractos de ácidos micólicos se resuspendieron en 100-200µL de hexano. Se depositaron 10µL de cada muestra sobre la placa de TLC, usando capilares de vidrio (Blaubrand®), dejándolos secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Los solventes utilizados como fase móvil se añadieron y mantuvieron por lo menos 20 minutos en las cubetas de TLC para generar una atmósfera de saturación. A continuación, la placa de TLC se introdujo en la cubeta, favoreciendo que la fase móvil subiera por la placa de TLC. Finalmente, la placa de silicagel se sacó de la cubeta, se dejó secar bajo en una cabina de extracción y se reveló utilizando el reactivo más adecuado para cada visualización. Cuando las placas se revelaron con antrona al 1% en ácido sulfúrico (p/v) o con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol absoluto (p/v), la placa de TLC se calentó a 120°C entre 2 a 5 minutos. Sin embargo, si el revelador utilizado fue el reactivo Dittmer (óxido de molibdeno al 1.3% en ácido sulfúrico 4.2M (p/v)), la placa de silicagel se mantuvo a temperatura ambiente.

Las muestras obtenidas tras la extracción total de lípidos de la micobacteria se eluyeron mediante los siguientes sistemas de elución: soluciones de cloroformo, metanol y agua destilada en distintas proporciones (cloroformo: metanol: agua, 100:14:0.8, 30:8:1, 65:25:4 y 60:35:8, v/v/v); cloroformo y metanol (cloroformo: metanol, 85:15, v/v); así como una solución de éter de petróleo (60-80°) y dietiléter (éter de petróleo: dietiléter, 90:10, v/v). Todas las placas de TLC fueron reveladas con antrona, excepto la placa eluída con el sistema éter de petróleo: dietiléter (90:10, v/v), la cual se relevó con ácido fosfomolibdico. Además, una de las placas de TLC eluídas con la solución de cloroformo: metanol: agua, 65:25:4 (v/v/v), fue relevada con el reactivo Dittmer.

En el análisis de lípidos de la superficie de la pared bacteriana, se usaron soluciones de cloroformo y metanol (cloroformo: metanol, 96:4, v/v) y; éter de petróleo (60-80°) y dietiléter (éter de petróleo: dietiléter, 90:10, v/v) como sistemas de elución. Las placas de TLC de ambos sistemas de elución se relevaron con ácido fosfomolibdico.

Finalmente, las placas destinadas al análisis de ácidos micólicos se eluyeron 3 veces con un sistema de elución compuesto por hexano y dietiléter (hexano: dietileter, 85:15, v/v) y se revelaron con ácido fosfomolibdico.

1.5 Susceptibilidad a antibióticos

Los paneles comerciales Sensititre RAPMYCOI y Sensititre SLOMYCOI (Thermofisher Scientific, Estados Unidos) fueron utilizados para determinar la susceptibilidad de las diferentes cepas de *M. brumae* a diferentes antimicrobianos. Se probaron una amplia variedad de grupos de antibióticos, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, oxazolidinonas, sulfonamidas y diversos fármacos antituberculosos.

Se preparó una suspensión bacteriana ajustando la turbidez a un estándar McF 1. Se añadieron 50µL de dicha suspensión a un tubo con medio líquido Mueller-Hinton, añadiendo 100µL de este inóculo bacteriano a cada pocillo de las placas de comerciales. El resto del procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método y las pautas para la interpretación de los resultados fueron obtenidos del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio.

1.6 Análisis genómico de las cepas de *M. brumae*

El análisis genómico de las cepas de *M. brumae* se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Mireia Coscollà en el Institut de Biologia Integrativa de Sistemes I2SysBio de la Universidad de Valencia-CSIC.

1.6.1 Genomas utilizados en la comparación génica

Se analizó la relación filogenética de *M. brumae* con los genomas de referencia o completos previamente publicados de diferentes especies de micobacterias. Para la comparación con la secuencia del genoma de la cepa de referencia de *M. brumae*, se utilizaron tres secuencias de *M. brumae* previamente publicadas, aunque no estuvieran cerrados los genomas. Las secuencias de *M. brumae* previamente publicadas fueron: CIP1034565 (GCF_002553575.1), DSM44177 (GCF_004014795.1), and MBR1 (GCF_900073015.1).

Para la comparación genómica, se utilizaron los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Connaught, los cuales se obtuvieron de la base de datos GenBank. Los números de acceso fueron: GCA_000195955.2 and GCA_001287325.1, respectivamente.

1.6.2 Extracción de DNA de las diferentes cepas de *M. brumae*

Para la extracción de DNA de las cuatro cepas de *M. brumae*, la biomasa de cada micobacteria se recolectó a partir de su crecimiento en medio de cultivo 7H10. Se disgregó en un tubo de cristal con bolitas estériles de vidrio y el DNA se extrajo usando el test comercial de aislamiento de DNA microbiano UltraClean® siguiendo las instrucciones del fabricante (MO BIO Laboratories, Inc., Estados Unidos) con ligeras modificaciones. Las muestras se calentaron a 65°C durante 10 minutos en el paso 4 del procedimiento, para mejorar la extracción. Los extractos obtenidos se monitorizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, usando el colorante 6x NZYDNA Loading (Nzytech, Portugal) y el marcador λ DNA/Hind III (Thermofisher Scientific, Estados Unidos).

Las muestras se concentraron por evaporación a 45°C con el concentrador Eppendorf® centrifugal vacuum concentrator 5301 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Finalmente, la cuantificación de DNA de las muestras se llevó a cabo usando el espectofotómetro NanoDrop™ 2000 (NanoDrop Technologies, Inc. Estados Unidos).

1.6.3 Secuenciación, construcción de las librerías del genoma de las cepas de *M. brumae*

La secuenciación del genoma completo de la cepa de referencia de *M. brumae* se realizó en el SCSIE Genomics Core Facility de la Universidad de Valencia mediante el sistema PacBio Sequel™ (Pacific Biosciences, Estados Unidos). Se preparó una única librería de secuenciación no múltiplex mediante el kit 10kb SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0 (Pacific Biosciences), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se creó un complejo SMRTbell-polymerase usando el kit PacBio's Sequel binding kit 3.0 siguiendo las instrucciones del fabricante. La librería final se secuenció mediante 1 Sequel™ SMRT® Cell 1M v3, usando el kit comercial Sequel Sequencing Kit 3.0.

El genoma completo de las cepas CR-269, CR-142 y CR-103 de *M. brumae* fue secuenciado con Illumina®. Las librerías de los genomas se construyeron con Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina®, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta secuenciación se llevó a cabo con la plataforma Illumina® MiSeq en el Instituto de Biomedicina de Valencia, realizando por duplicado 300 ciclos de lecturas emparejadas.

1.6.4 Ensamblaje y anotación del genoma completo de la cepa tipo de *M. brumae*

El ensamblaje de la secuencia se realizó a partir de un total de 584,529,485 bases (los datos crudos de secuenciación utilizados para el ensamblaje están disponibles en NCBI bajo el código PRJNA798885) con una profundidad de lectura de 136 sobre el genoma y una longitud de lectura N50 de 6,188 bases, utilizando la interfaz SMRT Link v8.0.0 y la aplicación de análisis Microbial Assembly (Pacific Biosciences). El ensamblaje del genoma fue realizado con el parámetro de tamaño del genoma establecido en 4Mb, produciendo un único cóntigo circular pulido de 3,988,920 bases. Se evaluó la calidad del montaje mediante el *software* Inspector [125], asignando las lecturas largas al cóntigo. Se utilizó Ori-Finder 2022 (<https://tubic.org/Ori-Finder2022>, acceso en agosto 2022) para identificar el origen de replicación bacteriano. El *draft del genoma* de la cepa de referencia de *M. brumae* ATCC 51384^T fue anotado por las *pipelines* Rapid Prokaryotic Genome Annotation (Prokka) v1.14.5 [126], Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v2022-04-14.build6021 [127], Bakta v1.4.2 [128], y el servidor Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) [129]. PseudoFinder [130] y PGAP se usaron para la detección de pseudogenes candidatos. Solo aquellos pseudogenes predichos por ambos enfoques se

mantuvieron como pseudogenes altamente fiables, mientras que el resto fueron anotados manualmente como “pseudogenes putativos”. La anotación PGAP fue curada mediante una inspección detallada de los genes relacionados con la virulencia.

1.6.5 Mapeo y detección de variantes de las secuencias de las cepas de *M. brumae* en Illumina respecto a la cepa de referencia

Se usaron dos *pipelines* descritos previamente [131,132] para el mapeo y detección de variantes de las tres cepas de *M. brumae* (CR-269, CR-103 y CR-142) respecto a la cepa de referencia (CR-270). Solo los polimorfismos de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) que alcanzaron fijación dentro del aislamiento se consideraron SNPs homocigotos (frecuencia dentro del huésped, es decir, frecuencia de SNPs superior al 90% dentro de las lecturas de la misma muestra), siendo clasificados como SNPs heterocigotos si no cumplían con este requisito. Todos los SNPs se anotaron utilizando SnpEff v4.11 [133] y la anotación de la cepa de *M. brumae* ATCC 51384^T (CP104302). Las regiones repetidas del genoma de *M. brumae* se obtuvieron utilizando run-mummer3 y una *pipeline* personalizada mediante Python para identificar genes repetidos con un umbral mínimo de 300pb de identidad. La secuencia de comandos utilizados y la lista de genes repetidos se cargaron en GitHub (https://github.com/PathoGenOmics/mbrumae_closedgenome). Los SNPs ubicados en esas regiones se clasificaron como “SNPs de baja confianza”. Para el análisis de deleciones, fueron calculadas las medias de coberturas por gen, corregidas por el tamaño del gen (https://github.com/PathoGenOmics/mbrumae_closedgenome). Solo fueron eliminados aquellos genes con menos de cinco lecturas por sitio en al menos un 10% de la longitud del gen. Dado que las regiones repetitivas podían comprometer la precisión del análisis, también fueron excluidos los genes ubicados en regiones repetidas.

1.6.6 Reconstrucción filogenética de la cepa de referencia de *M. brumae*

Para la construcción filogenética principal, se seleccionaron un subconjunto de genomas del género *Mycobacterium* los cuales representaran diferentes partes del género, especialmente los taxones más cercanos a *M. brumae*. Solo se utilizaron genomas cerrados y completamente descritos [134]. En total se incluyeron 21 ensamblajes de genomas descargados el ensamblaje de la cepa de referencia de *M. brumae* recién secuenciada y las secuencias de las cepas CR-269, CR-142 y CR-103 de *M. brumae*. Se utilizó el software Roary v3.11.2 [135] para obtener el genoma central alineado definido como el subconjunto de genes que se encuentran en al menos el 99% de las muestras, incluyendo 177 genes conservados. La alineación se usó para inferir un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando IQ-TREE v1.6.12 [136] con el modelo GTR y, se volvió a examinar usando el método de remuestreo Bootstrap (1000 réplicas). *Hoyosella subflava* (familia *Mycobacteriaceae*) se utilizó para enraizar el árbol, ya que era la bacteria

secuenciada más cercana al género *Mycobacterium* [22]. El potencial de virulencia y la tasa de crecimiento [134] se anotaron en la filogenia utilizando el *software* ITOL v4 [137]. Los posibles eventos de recombinación en el árbol se verificaron utilizando Gubbins v3.2 [135].

Se realizó un análisis filogenético adicional para confirmar la consistencia de la secuencia del genoma de la cepa de referencia de *M. brumae* con otras secuencias genómicas de la misma cepa. Así, se incluyeron la secuencia de *M. brumae* ATCC 51384^T y las tres secuencias publicadas de la cepa de referencia de *M. brumae* que no estaban cerradas, denominadas como CIP1034565, DSM44177 y MBR1 con números de acceso GCF_002553575.1, GCF_004014795.1 y GCF_900073015.1, respectivamente (figura complementaria 1 del artículo). Se incluyeron también las secuencias obtenidas mediante Illumina® de las tres cepas de *M. brumae* (CR-269, CR-142 y CR-103). Se utilizó el *software* Panaroo v1.2.9 (Tonkin-Hill *et al.*, 2020) para obtener el genoma central, utilizando los siguientes parámetros “panaroo -i*.gff -o results_panaroo_core –clean-mode strict -a core”. La alineación se construyó con el *software* IQ-TREE v1.6.10 con el modelo GTR y, se volvió a examinar usando el método de remuestreo Bootstrap (1000 réplicas).

1.6.7 Análisis de genes de interés

Para la identificación de regiones de interés se utilizaron diferentes sistemas. Todas las regiones de ESX fueron obtenidas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mycobrowser, acceso en abril 2022) y se usó BLASTp para identificar y anotar manualmente esas regiones en el genoma de la cepa de referencia de *M. brumae*. Se utilizó CRISPRFinder [138] para la predicción del sistema CRISPR-Cas. La conservación interna de las regiones candidatas a repeticiones directas y a la divergencia de los espaciadores se comprobaron manualmente. PhiSpy v4.2.21 fue utilizado para identificar los profagos alojados en el genoma de *M. brumae*. Con el *software* CIRCOS [139] se realizó la representación circular del cromosoma.

En el análisis de los genes que codifican para proteínas potencialmente inmunogénicas, se obtuvieron todos los epítomos de células T y B verificados experimentalmente de la base de datos de epítomos inmunes para *M. tuberculosis* H37Rv estudiados en humanos en el contexto de enfermedades infecciosas, alérgicas, enfermedades autoinmunes y trasplantes. A continuación, los genes asociados a los epítomos inmunogénicos se obtuvieron de *M. tuberculosis* H37Rv usando una *pipeline* personalizada. Para evaluar la presencia o ausencia de estos genes de *M. tuberculosis* en otros genomas, primero se obtuvo la secuencia de nucleótidos del genoma H37Rv (número de acceso GCA_000195955.2) anotando la posición de cada nucleótido con el módulo Biopython de Python versión 1.79 [140], obteniéndose las coordenadas y la orientación de los genes mediante Mycobrowser. A continuación, se tradujo y se obtuvo la secuencia de aminoácidos. Para los genes de la cadena negativa, se realizó la traducción

complementaria e inversa utilizando el módulo Biopython. Se usó tBLASTn para encontrar la similitud de aminoácidos entre las proteínas de *M. tuberculosis* y proteínas de *M. bovis* BCG Connaught y *M. brumae*, utilizando BLAST+ v 2.10.0 [141] mediante una secuencia de comandos personalizada de Python v 3.6.0. Tras explorar diferentes porcentajes de identidad, se consideró un gen presente cuando se alcanzó el 70% de identidad y el 70% de cobertura.

Para obtener una lista de los genes de *M. tuberculosis* involucrados en la biosíntesis de la pared celular se realizó la siguiente búsqueda bibliográfica en PubMed: “(*Mycobacterium tuberculosis*[Title/Abstract]) AND (biosynthesis[Title/Abstract]) AND ((mycolic acids[Title/Abstract]) OR (PDIM[Title/Abstract]) OR (PGL[Title/Abstract]) OR (PIM[Title/Abstract]) OR (TDM[Title/Abstract]) OR (TMM[Title/Abstract]))”. Se obtuvo una lista de 221 artículos, por lo que se filtraron los estudios que describían genes relacionados con la pared celular en *M. tuberculosis*, obteniendo una lista final de 95 artículos y 179 genes.

Respecto a las mutaciones descritas en *M. tuberculosis* H37Rv asociadas a la resistencia a antimicrobianos, se obtuvieron del catálogo anual de mutaciones en *M. tuberculosis* de la OMS de 2021. La presencia o ausencia de las mutaciones en las regiones de interés (genes *rpoB* y *katG* y regiones de regulación *inhA*) fueron buscados manualmente en la secuencia del gen, extraído del genoma de *M. brumae* usando MEGA X [142].

1.7 Conservación y cultivo de células eucariotas

1.7.1 Origen y obtención de las células eucariotas

En los distintos estudios *in vitro* realizados se utilizaron diferentes líneas celulares de macrófagos y células tumorales de vejiga, colon, hígado, pulmón, mama, cervix y páncreas.

El código de referencia de la ATCC y tipo celular para cada línea, se encuentra resumida en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las distintas líneas celulares utilizadas

Líneas celulares	ATCC	Tipo celular
THP-1	TIB-202	Monocito
J774	TIB-67	Monocito/Macrófago
SW780	CRL-2169	Carcinoma de vejiga grado 1
RT112	ACC 418	Carcinoma de vejiga grado 2
5637	HTB-9	Carcinoma de vejiga grado 2
T24	HTB-4	Carcinoma de vejiga grado 3
MB49	-	Carcinoma de vejiga grado 3
J82	HTB-1	Carcinoma de vejiga grado 3
CaCo-2	HTB-37	Adenocarcinoma colorrectal
HCT-116	CCL-247	Carcinoma colorrectal
HT-29	HTB-38	Adenocarcinoma colorrectal
Hep-G2	HB-8065	Carcinoma hepatocelular
A549	CCL-185	Carcinoma de pulmón
MCF-7	HTB-22	Adenocarcinoma de mama
SK-BR-3	HTB-30	Adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	HTB-26	Adenocarcinoma de mama
HeLa	CCL-2	Adenocarcinoma de cervix
QGP-1	-	Adenocarcinoma de páncreas

La línea celular de monocitos THP-1 fue cedida por el Dr. Alfonso del Río (Fundació IGPT, Badalona, España) y la línea murina de cáncer de vejiga MB-49 fue cedida por el Dr. Mangsbo (Uppsala, Suecia). El resto de las líneas celulares fueron obtenidas a partir del Banco de Líneas Celulares de Cáncer del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB, Barcelona, España) [87,143].

1.7.1.1 Líneas celulares de monocitos humanos y macrófagos murinos

La línea de monocitos humanos THP-1 se cultivó en medio de cultivo completo RPMI con L-glutamina y suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS, Lonza), 100 U/mL de penicilina G (Laboratorios ERN, España) y 100 µg/mL de estreptomycin (Laboratorios Reig Jofré, España). El cultivo se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Esta línea celular fue utilizada para ensayos de supervivencia intracelular de micobacterias, ensayos de producción de citocinas e inmunomodulación y, en ensayos de inmunidad entrenada. Cuando fue necesario diferenciar los monocitos a macrófagos, se añadió al medio forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Abcam, Reino Unido) en una concentración de 100 nM.

La línea celular de macrófagos murinos J774 se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con L-glutamina (Gibco®) completo. El cultivo se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Esta línea celular fue utilizada para ensayos de supervivencia intracelular de micobacterias y ensayos de producción de citocinas e inmunomodulación.

1.7.1.2 Líneas celulares murinas y humanas (*in vitro*) de cáncer de vejiga.

Las líneas celulares humanas de cáncer de vejiga RT112, SW780, 5637, T24 y J82 (tabla 2), se cultivaron con medio completo Dulbecco's Modified Eagle Medium/Medio Ham's F12 (DMEM-F12) (Gibco®). Por su parte, la línea murina MB49 fue cultivada en medio de cultivo DMEM completo. La incubación de todas las líneas tumorales de vejiga se realizó a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

1.7.1.3 Líneas celulares humanas de cáncer de otras localizaciones anatómicas

Las células tumorales humanas obtenidas de otras localizaciones anatómicas fueron: HT-29, CaCo-2, HCT-116, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, A549, QGP-1 y Hep-G2 (Tabla 2). Todas ellas se cultivaron con medio DMEM completo y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

1.7.2 Conservación y mantenimiento *in vitro* de células eucariotas

1.7.2.1 Congelación de células eucariotas

En primer lugar, se obtuvieron las células eucariotas a partir de un cultivo con un 80-90% de confluencia y se realizó su cuantificación utilizando cámara de Neubauer. Se centrifugaron a 300 *g* durante 5 minutos y 25°C, y el *pellet* de células se resuspendió y homogeneizó con medio de congelación (FBS con un 10% de dimetil sulfoxido (DMSO,

Merck)), dispensándose finalmente en crioviales a una concentración celular de entre 1 y 3×10^6 células/mL. Los crioviales se almacenaron a -80°C .

1.7.2.2 Descongelación de células eucariotas

Para descongelar las células eucariotas almacenadas a -80°C , la suspensión celular se descongeló a temperatura ambiente y se transfirió a un tubo con 5 mL de medio de cultivo completo. Seguidamente, se centrifugó a 300 *g* durante 5 minutos y 25°C , descartando el sobrenadante por decantación para eliminar el DMSO del medio. El *pellet* se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo completo y se homogeneizó antes de traspasarlo a un flascón de cultivo celular. Periódicamente se controló el crecimiento de las células realizándose subcultivos cuando la confluencia celular era aproximadamente del 80-90% del flascón.

1.7.2.3 Recuento celular

Para el recuento de las células se utilizó la cámara de Neubauer y la tinción de las células con azul tripano (Gibco®) al 0,4% en tampón salino fosfatado (PBS, *phosphate buffered saline*). De la dilución celular con azul tripano, se añadieron por capilaridad 10 μL entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. Se contaron el número de células viables en los cuatro cuadrantes de las dos secciones de la cámara de Neubauer, obteniendo la concentración celular de la muestra. El recuento celular se realizó en microscopio óptico invertido con el objetivo de 10X.

1.7.2.4 Cultivos celulares y recolección de células para su uso en experimentos

Para el cultivo de las células que crecen adheridas a la superficie del flascón, se descartó el medio de cultivo por decantación y se realizó un lavado con PBS. A continuación, se añadió Tripsina-EDTA 10X (Biowest, Francia) para despegar las células de la superficie del flascón, se decantó el exceso de tripsina y se dejaron incubar las células durante 5 minutos a 37°C y 5% CO_2 . Las células ya en suspensión se recuperaron y homogeneizaron, con el medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular.

Por otro lado, la línea celular humana THP-1 crece en suspensión, por lo que su recolección del cultivo celular no requirió del uso de tripsina. Con una pipeta serológica, se traspasaron las células a un tubo y se centrifugaron a 300 *g* durante 5 minutos y 25°C . El sobrenadante se descartó por decantación y el *pellet* se resuspendió en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (Lonza, BioWhittaker®, Suiza) completo.

Finalmente, se realizó el recuento mediante cámara de Neubauer para conocer la concentración celular. Si el objetivo era hacer un subcultivo, las células se sembraron en un flascón nuevo a la concentración final óptima para cada línea celular. Sin embargo, si

las células se recolectaron para utilizarlas en un experimento, se sembraron en la placa de cultivo celular a la concentración final deseada para el experimento.

1.7.3 Infección celular con las suspensiones bacterianas

Se recolectaron las células del flascón y se siembran en placas de cultivo (Nunc, Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) con medio de cultivo completo sin antibióticos y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda del 5% de CO₂, durante el tiempo requerido para cada tipo celular. En el caso de las células adherentes tumorales y de macrófagos murinos J774, el tiempo de incubación fue de 3 horas, mientras que la línea de monocitos humanos THP-1 se incubó durante 72 horas tras la adición de PMA para permitir la diferenciación a macrófagos.

Las células se infectaron con las suspensiones bacterianas preparadas como se indica en el apartado 1.7.2.4. Los cultivos infectados se incubaron durante 3 horas a 37°C en una atmósfera húmeda del 5% de CO₂, para favorecer la internalización de las micobacterias. Transcurrido este tiempo, las bacterias extracelulares se eliminaron mediante tres lavados con PBS y se incubaron a 37°C con medio de cultivo completo con antibióticos. A diferentes tiempos, se monitorizaron los efectos de la infección por parte de las micobacterias.

1.7.4 Determinación de la viabilidad celular. Ensayo de proliferación celular

La respuesta de las células al reactivo bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) fue el método utilizado para medir el efecto citotóxico de las micobacterias sobre las células eucariotas, permitiendo la cuantificación colorimétrica de la proliferación celular.

Para ello, se retiró el sobrenadante de los pocillos del cultivo celular infectados con micobacterias o no infectados, y se adicionó medio de cultivo completo con un 10% de MTT (v/v), dejándose incubar durante 3 horas a 37°C y una atmósfera húmeda de CO₂. A continuación, se resuspendieron los cristales de formazan generados con isopropanol ácido (0,04-0,1 N ácido clorhídrico (Carlo Erba) en isopropanol absoluto (1-propanol, Panreac) (v/v)) en una relación 1:1 (v/v) respecto al volumen añadido de medio con MTT. Se homogeneizó la mezcla y se midió la absorbancia a 550nm en un lector de placas (Infinite 200 PRO, Tecan, Suiza). El valor obtenido se expresó en forma de porcentaje dando un valor del 100% de proliferación a la lectura de absorbancia obtenida en las células control (sin infección con micobacterias), valor que se consideró directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

1.7.5 Recolección del sobrenadante de los cultivos celulares

Para determinar la concentración de citocinas, quimiocinas y/o óxido nítrico (NO) producidos por los cultivos celulares estimulados con los diferentes agentes, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos, se centrifugaron a 1000g durante 10 minutos y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

1.7.6 Determinación de citocinas, quimiocinas y NO de los cultivos celulares

Para determinar la producción de citocinas y quimiocinas a partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares se utilizaron tests comerciales de enzimo-inmunoanálisis (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), en placas de 96 pocillos (Corning), siguiendo las instrucciones indicadas por cada fabricante.

Según el tipo celular utilizado para cada estudio, se cuantificaron determinados tipos de citocinas y quimiocinas. Éstas se muestran en la tabla 3, junto con el tipo celular del que se obtuvo el sobrenadante y el proveedor de cada test utilizado.

Tabla 3. Resumen de las citocinas analizadas, origen del sobrenadante analizado y proveedor de los tests de ELISA

Citocina/quimiocina	Origen del sobrenadante	Proveedor
CXCL-8 / KC	J774, MB49	R&D Systems (estados Unidos)
IL-1 β	THP-1	Mabtech (Suecia)
IL-6	THP-1, J774, tumorales de vejiga y tumorales de otras localizaciones anatómicas	Becton & Dickinson (BD, Estados Unidos)
IL-8	THP-1, tumorales de vejiga y tumorales de otras localizaciones anatómicas	BD
IL-10	THP-1, J774	Mabtech
IL-12 (p40)	THP-1, J774	Mabtech
IL-17	THP-1	Mabtech
TNF- α	THP-1 y J774	Mabtech

Por otro lado, se realizó un ensayo colorimétrico con el reactivo de Griess modificado para la cuantificación de los niveles de NO $_2^-$. Para ello, se depositaron 50 μ L de los sobrenadantes a evaluar en placas de 96 pocillos. A continuación, se añadió el reactivo de Griess (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en una proporción 1:1 (v/v) y se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y preservado de la luz. Finalmente, se midió la absorbancia a 550nm con un lector de placas y, las concentraciones se calcularon utilizando una curva estándar de diluciones seriadas de nitrito de sodio.

1.8 Supervivencia intracelular de *M. brumae* en macrófagos murinos y humanos

1.8.1 Supervivencia intracelular de *M. brumae* en macrófagos J774 y THP-1

Con el objetivo de conocer la supervivencia intracelular de las diferentes cepas de *M. brumae*, se realizaron experimentos con las líneas celulares de macrófagos J774 y THP-1. Las células se sembraron en placas de 48 pocillos (Nunc, Nunclon Surface, Thermofisher Scientific, Estados Unidos), 24 y 72 horas antes de la infección, respectivamente. Se añadieron 6×10^4 células/pocillo para J774 y $8,5 \times 10^4$ células/pocillo para THP-1, las cuales se diferenciaron a macrófago con PMA.

Tras el periodo de incubación, las células se infectaron como se detalla anteriormente, a una MOI (*multiplicity of infection*) de 10 (10 bacterias por cada célula eucariota).

A las 3, 24, 48, 72 y 96 horas tras la infección se lisaron los macrófagos con una solución de 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en PBS (v/v). Los sobrenadantes de las 96 horas tras la infección se recolectaron, centrifugaron y almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de citocinas. En el caso de los macrófagos THP-1, el estudio se llevó a cabo hasta las 120 horas después de la infección. Diluciones seriadas de las muestras resultantes fueron sembradas en medio de cultivo 7H10 para conocer la supervivencia de la micobacteria en el interior celular. Tras una semana de incubación a 37°C , se hizo el recuento de las CFU crecidas. Se realizaron tres experimentos independientes con replicados en cada una de las condiciones.

1.9 Actividad antitumoral directa de las micobacterias sobre líneas tumorales y análisis de producción de citocinas

1.9.1 Actividad antitumoral directa de las micobacterias sobre líneas tumorales

Para el estudio del efecto antitumoral directo de las cuatro cepas de *M. brumae*, se realizaron experimentos de inhibición del crecimiento celular en las líneas tumorales detalladas en la Tabla 2.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración de 3×10^4 células/pocillo. Los procedimientos de siembra celular, preparación de inóculos bacterianos e infección de las células con las micobacterias se detallaron anteriormente.

Las líneas tumorales de vejiga fueron infectadas con las cuatro cepas de *M. brumae*, mientras que el resto de las líneas tumorales se infectaron también con *M. bovis* BCG Connaught. Tras 24, 48 y 72 horas de incubación, se realizó un ensayo colorimétrico de MTT para analizar la inhibición del crecimiento de las células tumorales, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 1.7.4. Se realizaron 3 experimentos independientes con tres replicados de cada una de las condiciones. Los sobrenadantes se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 minutos y, se almacenaron a -80°C hasta su uso en el estudio de la producción de citocinas desencadenada durante el proceso de infección.

1.9.2 Análisis de la producción de citocinas

En todas las líneas tumorales se cuantificaron los niveles de IL-6 e IL-8 liberados a las 72 horas después de la infección. Para ello, se utilizaron test comerciales de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos *in vitro* se realizaron al menos tres veces de manera independiente. Los datos representan la media y la desviación estándar (SD) de cada condición.

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con el método posterior *U* de Mann-Whitney para analizar la significancia estadística de la supervivencia intracelular de las micobacterias en macrófagos humanos y murinos, la inhibición de la proliferación tumoral *in vitro* inducida por la infección por micobacterias y las diferencias de producción de citocinas en las distintas líneas celulares.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el *software* GraphPad Prism versión 8.0 (Estados Unidos). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

2. Resultados

Con el objetivo de estudiar las posibles diferencias entre las diferentes cepas de *M. brumae*, se realizó una caracterización fenotípica y genotípica de las mismas. Además, también se evaluó su capacidad de supervivencia intracelular en macrófagos, su efecto inmunomodulador en diferentes macrófagos y su capacidad de inhibir la proliferación de diferentes líneas tumorales de vejiga, tracto gastrointestinal, mama, cérvix y pulmón.

2.1 Estudio fenotípico de las diferentes cepas de *M. brumae*

Se realizó una caracterización fenotípica de las distintas cepas de *M. brumae*: la cepa de referencia (CR-270), y los aislados CR-269, CR-142 y CR-103. Para ello, se realizó una caracterización macroscópica de sus colonias, se analizó el patrón lipídico, glicolipídico y de ácidos micólicos de la pared celular de cada una de ellas, así como la susceptibilidad que presentaban a diferentes grupos de antimicrobianos.

2.1.1 Descripción macroscópica de las diferentes cepas de *M. brumae*

Se caracterizó macroscópicamente cada cepa de *M. brumae* mediante la observación de las colonias obtenidas de su crecimiento en medio sólido Middlebrook 7H10 (Figura 9). No se apreciaron diferencias significativas en la morfología colonial en cuanto a pigmentación, textura o tamaño. En todas las cepas se pudo observar colonias con una pigmentación blanquecina, opaca y de textura rugosa. Su tamaño fue grande (en comparación con colonias de otras especies de micobacterias de crecimiento rápido), con morfología granular, márgenes lobulados y elevación convexa con tendencia umbilicada.

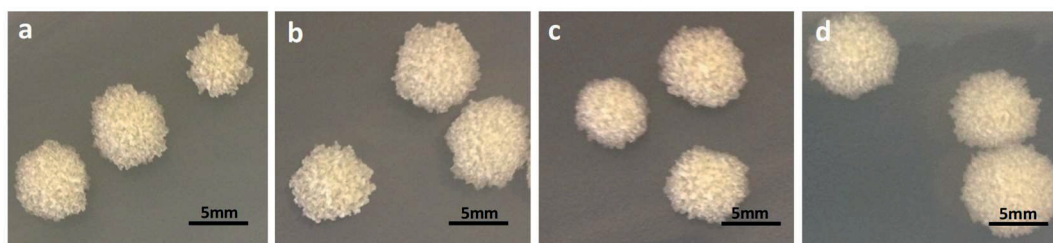


Figura 9. Colonias de las cepas de *M. brumae* CR-270 (a), CR-269 (b), CR-142 (c) y CR-103 (d), crecidas en medio Middlebrook 7H10 durante una semana. Las imágenes se realizaron con cámara Nikon.

2.1.2 Análisis del contenido lipídico total de las cepas de *M. brumae*

Las especies del género *Mycobacterium* se caracterizan por su compleja pared celular, siendo muy diversa la composición de lípidos y glicolípidos entre las distintas especies e incluso cepas de la misma especie. Para obtener el extracto lipídico total de las distintas cepas de *M. brumae*, se utilizó la misma cantidad de biomasa de las cepas crecidas en medio sólido Middlebrook 7H10. Se realizó la extracción lipídica con mezclas de cloroformo y metanol para, posteriormente, monitorizar los extractos lipídicos mediante TLC. Se utilizaron sistemas de elución con diferente polaridad para describir los principales lípidos de las cepas a estudio.

Utilizando el sistema de elución más apolar, compuesto por éter de petróleo (60-80°) y dietiléter (90:10, v/v), se demostró la presencia de acilglicerolos (AG) en todas las cepas, siendo ligeramente más intensa su presencia en la cepa CR-142 (Figura 10 a). Cuando se analizaron los lípidos utilizando los sistemas de elución compuestos por cloroformo y metanol (85:15, v/v) y cloroformo, metanol y agua (100: 14: 0.8, v/v/v; 30: 8: 1, v/v/v; 65: 25: 4, v/v/v), se pudo observar que las cuatro cepas sintetizan dimicolato de trehalosa (TDM) y monomicolato de trehalosa (TMM) (Figura 10. b-e), mostrándose un factor de retención (Rf) similar entre las cepas en los distintos sistemas de elución utilizados, obteniendo un desplazamiento de estos lípidos hacia la parte superior de la placa de TLC (superior Rf), conforme aumentaba la polaridad en la mezcla de solventes del sistema de elución.

Finalmente, se detectó la presencia de fosfatidil-inositol manósidos (PIMs) en todas las cepas estudiadas, sin diferencias entre cepas, cuando se utilizó cloroformo, metanol y agua en una proporción de 65: 25: 4 (v/v/v) y 60: 35: 8 (v/v/v) (Figura 10. e-g). Los PIMs, que se han descrito como inmunogénicos, se observaron en ambos sistemas de elución: en 65:25:4 (v/v/v) tanto cuando se reveló con antrona (Figura 10. e) como cuando el revelador fue el reactivo Dittmer (Figura 10. f), que específicamente revela compuesto con grupos fosfato; y en 60: 35: 8 (v/v/v) (Figura 10. g), con Rf mayor al tratarse de un sistema de elución con mayor polaridad. En estos sistemas de elución se pueden observar también otros fosfolípidos revelados con Dittmer.

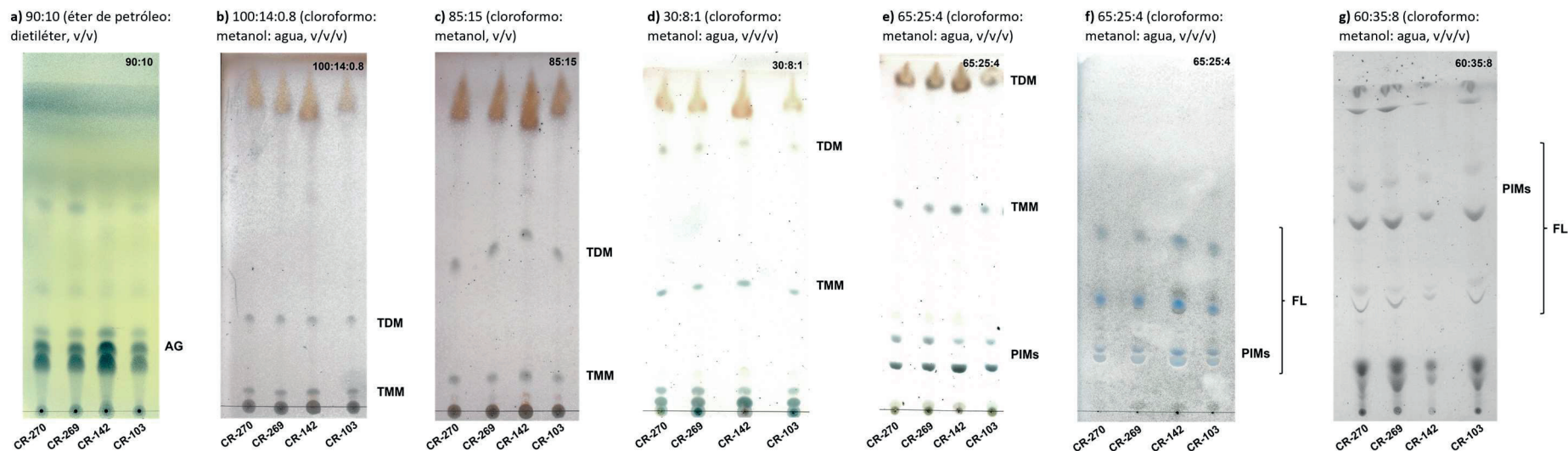


Figura 10. Cromatografías en capa fina (TLC) correspondientes al contenido lipídico total de las cepas de *M. brumae* (CR-270 (cepa de referencia), CR-269, CR-142 y CR-103). Los resultados de TLC mostrados son de un experimento representativo de al menos tres replicados. Los sistemas de elución utilizados en las TLC fueron a) éter de petróleo: dietiléter (90: 10, v/v); b) cloroformo: metanol: agua (100: 14: 0.8, v/v/v); c) cloroformo: metanol (85: 15, v/v); d) cloroformo: metanol: agua (30: 8: 1, v/v/v); e-f) cloroformo: metanol: agua (65: 25: 4, v/v/v); g) cloroformo: metanol: agua (60: 35: 8, v/v/v). Las TLC se revelaron con un 1% de antrona en ácido sulfúrico (b, c, d, e y g), reactivo Dittmer (f), y 10% de ácido fosfomolíbdico en etanol (a). Todas las cepas se obtuvieron de cultivos crecidos durante una semana en medio sólido Middlebrook 7H10. AG: acilglicerol; TDM: dimicolato de trehalosa; TMM: monomicolato de trehalosa; FL: fosfolípidos; PIMs: fosfatidil-inositol manósidos.

2.1.3 Análisis del contenido lipídico superficial de las cepas de *M. brumae*

A partir de biopelículas obtenidas del crecimiento de las cepas de *M. brumae* en medio líquido Middlebrook 7H9, se realizó la extracción para recuperar los lípidos presentes en la parte más externa de la pared de las micobacterias. El extracto lipídico se analizó mediante TLC (Figura 11), utilizando dos sistemas de elución distintos. Por un lado, los extractos lipídicos expuestos al sistema de elución formado por éter de petróleo y dietiléter (Figura 11. a), mostraron que en la superficie de las cuatro cepas de *M. brumae* hay presencia de acilgliceroles (AG). Sin embargo, estos AG se ven disminuidos en la cepa de referencia (CR-270) y en CR-103. Por su lado, en las cepas CR-269 y CR-142, se observó la presencia de compuestos que, según la bibliografía [89], se correspondería a compuestos con largas cadenas alifáticas y aromáticas (Figura 11. a. 1), así como moléculas que contienen cadenas largas con insaturaciones *cis* y *trans* (Figura 11. a. 2).

Finalmente, usando el sistema de elución compuesto por cloroformo y metanol, se detectó la presencia de glicerol monomicolato (GroMM) en todas cepas de *M. brumae* estudiadas, siendo su presencia menor en la cepa de referencia (CR-270).

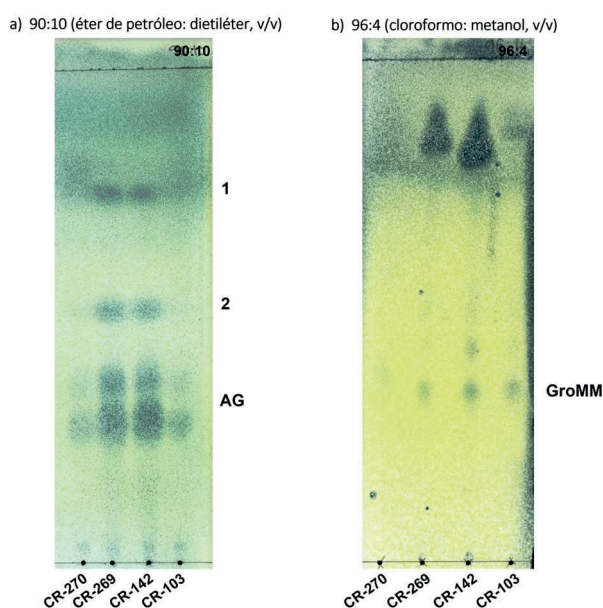


Figura 11. Cromatografías en capa fina (TLC) correspondientes al extracto lipídico superficial de las cepas de *M. brumae* (CR-270 (cepa de referencia), CR-269, CR-142 y CR-103). Los resultados de TLC mostrados son de un experimento representativo de al menos tres replicados. Los sistemas de elución utilizados en las TLC fueron a) éter de petróleo (60-80°): dietiléter (90: 10, v/v) y b) cloroformo: metanol (96:4, v/v). Las TLC se revelaron con un 10% de ácido fosfomolibdico en etanol. Todas las muestras se obtuvieron de biopelículas crecidas durante 11 días en medio líquido Middlebrook 7H9. AG: acilgliceroles; GroMM: glicerol monomicolato.

2.1.4 Análisis de los ácidos micólicos de la pared de las cepas de *M. brumae*

Tras la metanólisis ácida realizada sobre la biomasa de las diferentes cepas de *M. brumae*, se obtuvo el extracto de ácidos micólicos alojados en la pared celular. El extracto de ácidos micólicos se analizó mediante TLC utilizando un sistema de elución compuesto por hexano y dietiléter. Para todas las cepas se obtuvo un patrón de ácidos micólicos idéntico, compuesto únicamente por α -micolato (Figura 12).

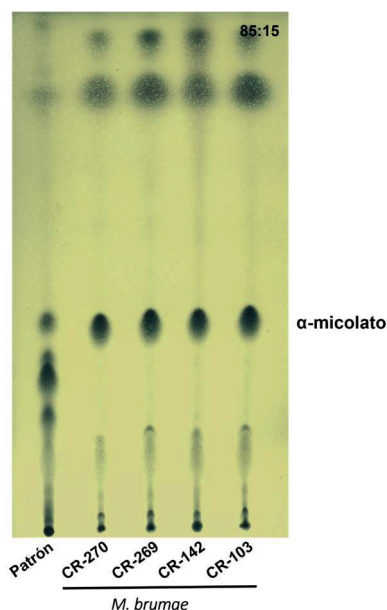


Figura 12. Cromatografía en capa fina (TLC) correspondientes al extracto de ácidos micólicos de las cepas de *M. brumae* (CR-270 (cepa de referencia), CR-269, CR-142 y CR-103). Los resultados de TLC mostrados son de un experimento representativo de al menos tres replicados. El sistema de elución utilizado en la TLC fue hexano: dietiléter (85:15, v/v). La TLC se reveló con un 10% de ácido fosfomolibdico en etanol. Todas las muestras se obtuvieron de cultivos crecidos durante una semana en medio sólido Middlebrook 7H10.

2.1.5 Análisis de la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de *M. brumae*

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los diferentes antimicrobianos testados en las cuatro cepas de *M. brumae* se determinaron mediante dos paneles comerciales de microdilución. Como se muestra en la Tabla 4, los resultados fueron idénticos para las cuatro cepas, demostrando resistencia a cefepime, isoniazida (concentración de antimicrobiano $\leq 10 \mu\text{g/mL}$) y rifampicina. Además, se obtuvo un valor de susceptibilidad intermedio para ceftriaxona. Las cuatro cepas de *M. brumae* mostraron susceptibilidad a amikacina,

amoxicilina/ácido clavulánico 2:1, cefoxitina, cefprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, etambutol, etionamida, imipenem, isoniazida (concentración de antimicrobiano $\geq 10 \mu\text{g/mL}$), linezolid, minociclina, moxifloxacino, rifabutin, estreptomina, sulfametoxazol, tigeciclina y tobramicina.

Los resultados de susceptibilidad de los antimicrobianos ácido *p*-aminosalicílico, capreomicina, cicloserina y kanamicina, fueron obtenidos de estudios publicados previamente [86].

Tabla 4. Susceptibilidad de las diferentes cepas de *M. brumae* a distintos antimicrobianos. El panel de antimicrobianos se evaluó frente a las cuatro cepas de *M. brumae* usando los paneles Sensititre RAPMYCOI y SLOMYCOI. *, resultados de susceptibilidad fueron obtenidos de estudios publicados previamente por Luquin *et al.* (1993) [86]. Los resultados de susceptibilidad a antimicrobianos se muestran como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ($\mu\text{g/mL}$). S, sensible; I, intermedio y R, resistente.

Antimicrobianos	Cepas de <i>M. brumae</i>				Interpretación
	CR-270	CR-269	CR-142	CR-103	
Amikacina	1	1	1	1	S
Amoxicilina/ácido clavulánico 2:1	2/1	2/1	2/1	2/1	S
Cefepime	32	32	32	32	R
Cefoxitina	8	4	4	4	S
Ceftriaxona	32	16	16	16	I
Ciprofloxacino	0.12	0.12	0.12	0.12	S
Claritromicina	0.06	0.06	0.06	0.06	S
Doxiciclina	0.25	0.25	0.25	0.12	S
Etambutol	2	4	2-44	1-4	S
Etionamida	2.5	2.5	2.5	2.5	S
Imipenem	2	2	2	2	S
Isoniazida	2	2-4	1	1-2	R
Linezolid	1	1	1	1	S

Minociclina	1	1	1	1	S
Moxifloxacino	0.12	0.12	0.12	0.12	S
Rifabutina	0.5	1	0.5-1	0.5-1	S
Rifampicina	2	2	2	1	R
Estreptomicina	1	2	1	1-2	S
Sulfametoxazol	0.12/2.38	0.12/2.38	0.12/2.38	0.12/2.38	S
Tigeciclina	0.25	0.5	0.5	0.5	S
Tobramicina	2	2	2	2	S
Ácido <i>p</i> -aminosalicílico*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	R
Capreomicina*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	S
Cicloserina*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	S
Kanamicina*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	S

2.2 Análisis genómico de las cepas de *M. brumae*

2.2.1 Composición del genoma de la cepa de referencia de *M. brumae*

Para obtener más información sobre la composición del genoma y la variabilidad intraespecífica, la secuencia del genoma completo de la cepa de referencia de *M. brumae* fue determinada mediante PacBio. El genoma completo y la anotación curada manualmente fueron depositados en la base de datos GenBank bajo el código BioProject PRJNA798885, con el código de acceso CP104302.

El genoma de *M. brumae* constaba de un solo cromosoma circular de 3.988.920 pb, con un contenido medio de GC del 69% (tabla 5). La calidad del ensamblaje se evaluó mediante el *software* Inspector. El *oriC* fue ubicado junto a la región *rnpA-rpmH-dnaA-dnaN-recF-gyrB-gyrA* como se muestra en la Figura 13. Diferentes anotaciones de *M. brumae* estimaron 3791, 3794, 3827 y 3781 secuencias de codificación de proteínas (SCP) usando PGAP, Bakta, RAST y Prokka, respectivamente. Como PGAP mostró menos SCP como proteínas hipotéticas, se mantuvo la anotación PGAP para la curación manual. Además, se encontraron 48 genes para la codificación de tRNA y dos operones de rRNA, cada uno de los cuales incluyó tres rRNA.

La anotación de pseudogenes se realizó combinando los resultados de dos enfoques. PGAP predijo 97 pseudogenes, mientras que PseudoFinder predijo 326, de los cuales 47 coincidieron en ambos análisis. Para ser conservadores, se anotaron los detectados por ambos enfoques como pseudogenes y los detectados solo por PGAP como un pseudogen probable. El número de pseudogenes encontrados con ambos enfoques fue similar al número de pseudogenes en *M. tuberculosis* (GCA_000195955.2) e inferiores a los encontrados en *M. bovis* (GCA_001287325.1) o *M. fallax* (GCA_010726955.1).

Tabla 5. Resumen del genoma de *M. brumae* basado en anotaciones PGAP, Bakta, RAST y Prokka y, comparado con los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Connaught y *M. fallax* JCM 6405.

Características	<i>M. brumae</i> PGAP	<i>M. brumae</i> Bakta	<i>M. brumae</i> RAST	<i>M. brumae</i> PROKKA	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. bovis</i> BCG Connaught	<i>M. fallax</i>
Tamaño genoma	4	4	4	4	4.41	4.29	4.16
Contenido GC (%)	69.2	69.2	69.2	69.2	65.6	65.6	70.4
Número de cóntigos	1	1	1	1	1	1	1
CDSs	3791	3794	3827	3781	3906	3804	3995
Pseudogenes	97	-	-	-	30	190	118
RNAs totales	57	68	52	89	70	50	55
tRNAs	48	49	46	58	45	45	47
rRNAs	6	6	6	6	3	3	6
other RNAs	3	25	-	25	22	2	2
Proteínas hipotéticas	529	568	1587	1542	1051	473	641
Código de acceso (NCBI)	-	-	-	-	GCA_000195955.2	GCA_001287325.1	GCA_010726955.1

Se analizó otra característica interesante en el genoma: los sistemas adaptativos de la bacteria frente a infecciones virales. Se analizaron las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente (CRISPRs) y profagos. El *software* CRISPRFinder predijo que no había secuencias CRISPR en todo el genoma de *M. brumae*. Para identificar los profagos presentes en el genoma, se usó el *software* PhiSpy, con el que se detectó un inserto entre las posiciones 83.324 – 110.205 dentro del genoma de *M. brumae*, incluyendo un total de 235 SCP.

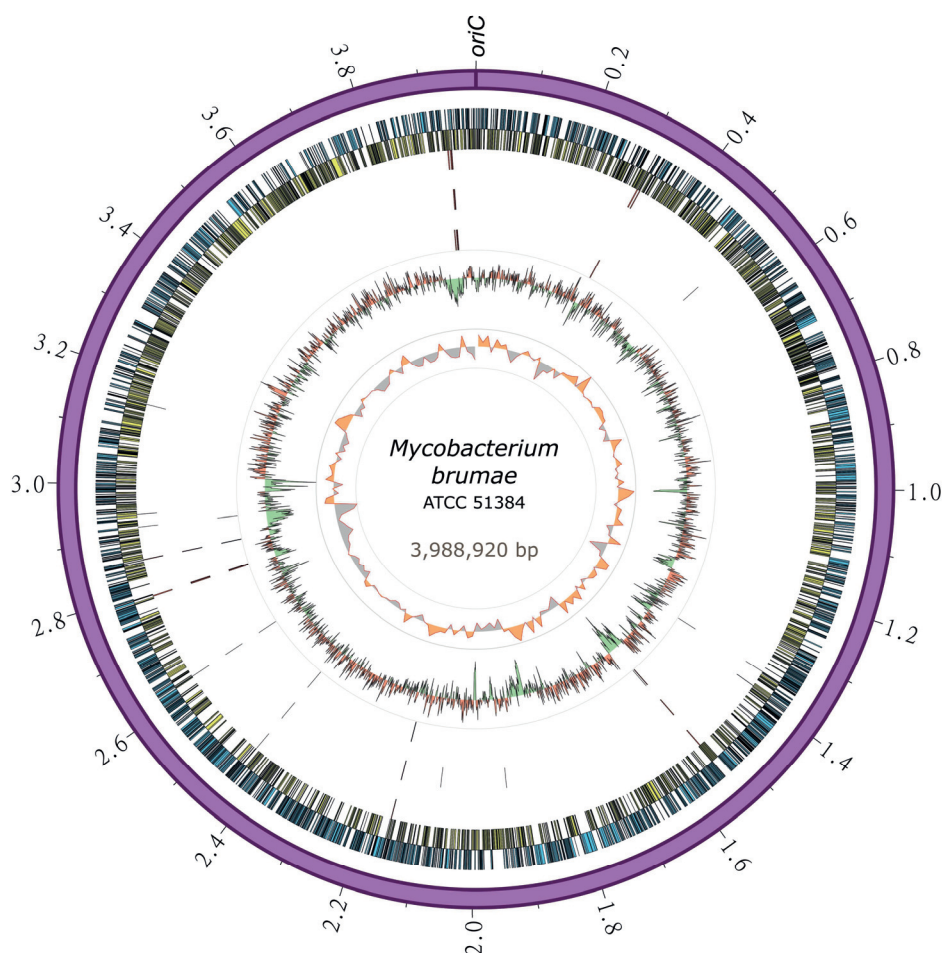


Figura 13. Representación circular del cromosoma de *M. brumae*. El anillo más externo muestra la longitud del cromosoma en megabases, seguido por los anillos que muestran los genes *forward* (azul) y *reverse* (amarillo). Los SNP en las cepas de *M. brumae* (CR-269, CR-142 y CR-103) con respecto al genoma de la cepa de referencia ATCC 51384^T se indica en los siguientes tres anillos, respectivamente. Moviéndose hacia el interior, el siguiente anillo muestra el contenido de GC, con valores por encima

(rojo) y por debajo (verde) de la media. El último anillo muestra la desviación del contenido en GC ($G - C$)/($G + C$) usando una ventana de 20kb.

2.2.2 Posición filogenética de *M. brumae* en el género *Mycobacterium*

Para determinar la posición de *M. brumae* en la historia evolutiva del género *Mycobacterium*, se construyó un árbol filogenético usando una muestra representativa de especies dentro del género (Figura 14). El alineamiento se construyó utilizando todos los genes centrales entre las diferentes especies para proporcionar una mayor resolución de las relaciones filogenéticas entre ellas. Los eventos de recombinación fueron eliminados del alineamiento y la estructura del árbol permaneció inalterada, lo que aporta solidez al análisis. *M. brumae* se agrupó con otras micobacterias no patógenas de crecimiento rápido. *Mycobacterium fallax* fue la micobacteria más cercana a *M. brumae*, seguida por *Mycobacterium insubricum* y, los tres *clusters* se agruparon con el grupo monofilético formado por *Mycobacterium confluentis* y *Mycobacterium chitae*.

Aunque el genoma presentado en este trabajo fue el primero en ser cerrado de *M. brumae*, la misma cepa de referencia se secuenció previamente. Por ello, se evaluó la consistencia de la secuencia del genoma cerrado con el resto de las secuencias publicadas previamente de la cepa de referencia de *M. brumae*. El análisis filogenético mostró que la secuencia cerrada se agrupa con el grupo monofilético formado por MBR1 y CIP1034565, todos ellos correspondientes a la cepa tipo. Otro grupo monofilético estuvo formado por las otras tres cepas de *M. brumae* (CR-269, CR-142 y CR-103) y DSM44177, que también correspondía a la cepa de referencia. Este resultado indicó la consistencia de los resultados con dos o tres secuencias genómicas de la misma cepa de referencia de *M. brumae*.

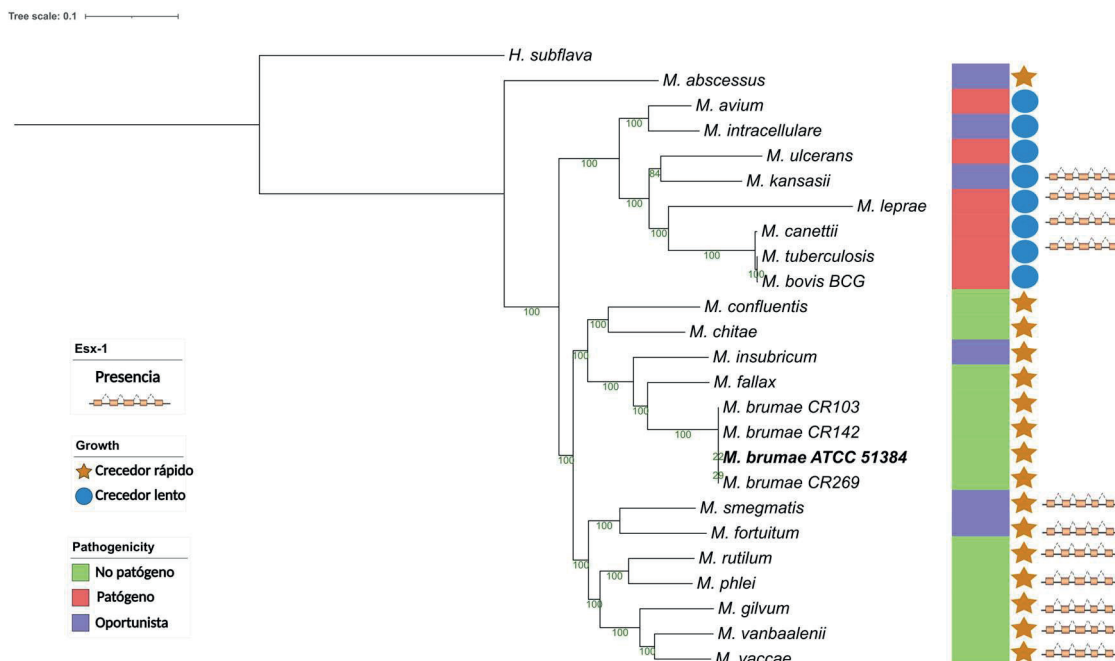


Figura 14. Relación filogenética de *M. brumae* dentro del género *Mycobacterium*. Árbol genético de máxima verosimilitud de cepas de referencia del género *Mycobacterium* basado en una alineación de 177 genes centrales, destacando la posición de la cepa de referencia de *M. brumae* ATCC 51384^T. El modelo GTR se utilizó con una confianza de *Bootstrap* de 1,000 réplicas. Las longitudes de las ramas son proporcionales a las sustituciones de nucleótidos y el árbol se enraíza con *Hoyosella subflava*. El árbol filogenético se anotó con la patogenicidad, la presencia o ausencia de ESX-1 y la tasa de crecimiento.

2.2.3 Comparación de genes de virulencia y de la capacidad inmunogénica

Para analizar la presencia o ausencia de los factores genéticos de virulencia propios de *M. tuberculosis* en los genomas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG Connaught, se compararon aquellos genes relacionados con la virulencia más relevantes, entre los que se incluían proteínas PE/PPE, sistemas de exportación ESX, proteínas Mce, proteínas MmpL y proteínas de sistemas reguladores de dos componentes (TCS), entre otros. Los resultados indicaron que *M. brumae* solo contenía 57 de los 324 genes asociados con la virulencia de *M. tuberculosis*, con un rango de identidad proteica del 71.0 al 98.7%, cubriendo entre el 92.7 y el 100% de la secuencia de cada gen de *M. tuberculosis*. De estos 57 genes, 56 genes también estaban compartidos con *M. bovis* BCG (Figura 15. a). Solo la proteína phoT, implicada en la importación de fosfato inorgánico a través de la membrana, se encontró en *M. brumae* pero no en *M. bovis* BCG, debido a una mutación de cambio de marco de lectura en BCG que

altera la secuencia de aminoácidos desde la posición 156 y probablemente altera la función *phoT*[144]. No se detectaron en *M. brumae* genes de las familias PE/PPE, Mce o MmpL con más del 70 % de identidad proteica con *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG, que corroboró la ausencia de estos genes en la anotación realizada con Proka. Sin embargo, la anotación PGAP de *M. brumae* predijo la presencia de 9 genes de la familia MmpL, 15 genes Mce y 11 genes PE/PPE. Los genes MmpL y Mce mostraron alta identidad proteica con las anotaciones anteriormente publicadas en los cóntigos de *M. brumae* y *M. fallax*, especie estrechamente relacionada. Finalmente, los 11 genes de la familia PE/PPE mostraron una similitud o cobertura proteica muy baja para ambos. Aunque no todos los grupos de ESX incluyen genes de virulencia de *M. tuberculosis*, se analizó con detalle la presencia o ausencia de los cinco grupos de ESX en *M. brumae* y encontramos que *M. brumae* solo tenía grupos de genes ESX-3 y ESX-4, aunque un gen en ESX-3 está anotado como un putativo pseudogén (*eccD4*). *M. brumae* no contiene el ESX-1 relacionado con la virulencia, lo que es consistente con su ausencia en todas las especies que se agrupan en la filogenia: *M. fallax*, *M. chitae* y *M. confluentis*. Además, aunque ESX-2 no estaba completo en *M. brumae*, se encontraron 6 genes que podrían ser homólogos a la mitad de los genes en el grupo ESX-2 de *M. tuberculosis* H37Rv (Rv3884c a Rv3889c).

Por otro lado, se analizó la capacidad inmunógena de *M. brumae* como un potencial agente inmunoterapéutico. Se ha demostrado que la inmunidad de las infecciones causadas por especies de micobacterias como *M. tuberculosis*, depende principalmente de los linfocitos T. Para el análisis *in silico* de los antígenos en *M. brumae*, se obtuvieron epítomos de células T humanas probados experimentalmente y, se evaluó el gen correspondiente a cada epítomo, obteniendo un total de 442 antígenos no redundantes. Dentro de este grupo de genes, se incluyó el grupo de genes ESAT-6 como potentes regiones inmunogénicas y asociadas a la virulencia.

Se evaluó y comparó la presencia o ausencia de cada gen en las cepas de *M. bovis* BCG Connaught y cepa de *M. brumae* ATCC 51384^T. Como resultado, se encontró que el genoma de *M. brumae* solo tenía 85 genes de los 441 genes relacionados con el sistema inmunitario descrito en el genoma de *M. tuberculosis*. De los 85 genes, 83 genes se compartían con *M. bovis* BCG, mientras que los dos restantes: los genes Rv2074 (una posible piridoxamina 5'-fosfato oxidasa) y Rv3427c (una posible transposasa), solo los compartían *M. brumae* y *M. tuberculosis* (Figura 15. b). *M. bovis* BCG compartía 374 de los 441 genes con *M. tuberculosis*. No se encontró ESAT-6 entre los genes hallados en *M. brumae*, lo que corrobora su fenotipo no virulento y muestra que la actividad inmunogénica de esta micobacteria estaría relacionada con otros genes. Para explorar otros mecanismos de inmunidad que pudieran modular la respuesta inmune, también se analizó la presencia de antígenos de células B en *M. brumae*. De una lista de 127 genes no redundantes relacionados con la actividad inmunogénica mediada por células B, el genoma de *M. brumae* solo contenía 17 genes, todos

ellos compartidos con *M. bovis* BCG (Figura 15. c), mientras que *M. bovis* BCG compartía 81 genes con *M. tuberculosis*.

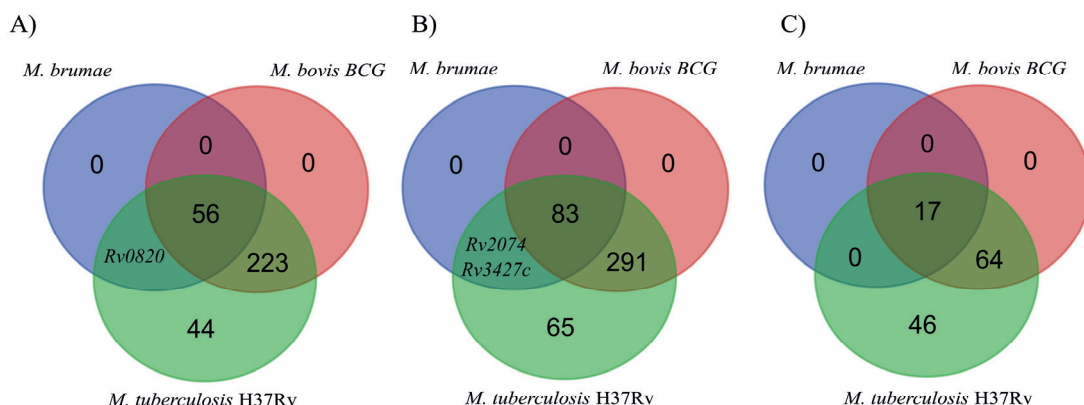


Figura 15. Análisis de la presencia o ausencia de genes. Los diagramas de Venn muestran la comparación de la presencia/ausencia y la abundancia de: **A)**, genes asociados a la virulencia de *M. tuberculosis*; **B)**, antígenos reconocidos por células T; y **C)**, antígenos reconocidos por células B en los genomas de *M. bovis* BCG y *M. brumae*.

2.2.4 Análisis del perfil genotípico de la resistencia a antimicrobianos

Para explicar el perfil genotípico de resistencias a los antimicrobianos de *M. brumae*, se analizaron las mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina e isoniazida. En cuanto a la resistencia a la rifampicina, no se encontró ninguna de las 90 mutaciones reportadas en el gen *rpoB* asociado con resistencia a dicho antimicrobiano en *M. tuberculosis*. Del mismo modo, para la resistencia a isoniazida, no se encontraron en *M. brumae* ninguna de las 9 mutaciones reportadas para este antimicrobiano, las cuales se incluían en el gen *katG* y en el promotor *upstream* del operón *fabG1-inhA*. Sin embargo, la secuencia de *M. brumae* tenía varias mutaciones en estas regiones en comparación a la secuencia de cepas susceptibles de *M. tuberculosis*, lo que indica que las mutaciones asociadas para la resistencia a rifampicina e isoniazida podrían estar potencialmente localizadas en otras zonas de estos genes.

2.2.5 Análisis del perfil genotípico asociado a la composición de la pared celular

Para analizar la composición de la pared celular a nivel genético, se evaluó en la cepa de referencia de *M. brumae* la presencia de 179 genes relacionados con la pared celular micobacteriana. Además, también se valoraron genes asociados a la síntesis y transporte de ácidos micólicos, PDIM, PGL, PIM, FL y los glicolípidos TDM y TMM. El análisis demostró que el genoma de *M. brumae* contenía genes para la síntesis y el transporte de ácidos micólicos del grupo I, es decir, para α -micolato, así como genes para la producción de TDM, TMM y PIM y, carecía de genes asociados con PDIM y PGL. Curiosamente, entre los 96 genes relacionados con la producción de ácidos micólicos y asociados a las funciones de biosíntesis general de ácidos grasos, en *M. brumae* solo se encontraron 31 de estos genes. Por otro lado, de los 83 genes evaluados relacionados con la producción de TDM, TMM, PIM y FL, se detectaron 13 genes en *M. brumae* (Rv0126, Rv0129c, Rv0982, Rv1166, Rv1236-Rv1238, Rv1564c, Rv2188, Rv2610c, Rv2869c, Rv3264c, and Rv3793).

2.2.6 Variabilidad intraespecífica de las cepas de *M. brumae* y la cepa de referencia

En la evaluación de la variación intraespecífica entre las diferentes cepas de *M. brumae*, se analizaron los genomas de tres aislados: cepas CR-269, CR-142 y CR-103. Las secuencias de las tres cepas se cargaron en la base de datos ENA-EBI bajo el código de BioProject PRJEB52012 y los códigos de acceso ERR9463985 (CR-269), ERR9463984 (CR-142) y ERR9463983 (CR-103). La variabilidad intraespecies se evaluó detectando SNP y deleciones en comparación con el genoma completo de la cepa de referencia de *M. brumae* ATCC 51384^T recién secuenciada, usando dos *pipelines* distintas como se detalla en el apartado de material y métodos. La calidad del mapeo o alineamiento fue suficiente para estudiar la variabilidad en los SNP y las regiones de diferencia. Ambas *pipelines* predijeron un número similar de SNP antes del filtrado y, el mismo número de SNP después de filtrar los SNP encontrados en regiones no repetitivas.

Las cepas CR-269, CR-142 y CR-103 diferían del genoma de referencia en seis, tres y cinco SNP de alta confianza, respectivamente. La mayoría, cinco de los ocho SNP totales encontrados, estaban presentes en las regiones de codificación (Tabla 6). En comparación con la cepa de referencia, las tres cepas de *M. brumae* aisladas presentaron una mutación con cambio de sentido relacionada con la aminopeptidasa N y otro SNP localizado en un pseudogen. La cepa CR-269 albergaba dos únicos SNP en regiones intergénicas que podrían potencialmente modificar genes relacionados con la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa/oxidasa y la acuoporina Z. La cepa CR-142 mostró un único SNP relacionado con la propionil-CoA- y succinato- CoA-transferasa (mutación sinónima). Finalmente, la cepa CR-103 presentó sólo un SNP en una proteína hipotética (mutación con cambio de sentido).

Mediante el análisis de la cobertura de las lecturas de Illumina® en cada posición, se examinaron si los genes de la cepa de referencia estaban ausentes en cualquiera de los tres genomas de *M. brumae*. En este análisis, no se encontró ningún gen completamente eliminado en cualquiera de las tres cepas a estudio. Sin embargo, se mostraron 14 genes para los cuales al menos el 10% de su longitud no estaba cubierta por los datos de la secuencia en al menos una de las cepas. Solo tres de estos genes contenían regiones no cubiertas en las tres cepas de *M. brumae*: L2Z93_000058, L2Z93_000604 y L2Z93_001659, que codifica una proteína H-NS estructural de nucleóide, una proteína de la familia de la transglicosilasa y una proteína de la familia de la peptidasa C40, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 6. Impacto previsto y características de los SNP presentes en las cepas CR-269, CR-142 y CR-103 de *M. brumae* en comparación con el genoma de referencia de *M. brumae*. SNP encontrados con *pipelines* de variantes y fuera de las regiones repetitivas. La tabla muestra la posición del SNP dentro del genoma de referencia, la base de referencia (Ref) y el respectivo SNP encontrado (Alt), las posiciones inicial y final del CDS, la presencia (“sí”) o ausencia (“-”) del SNP en cada cepa de *M. brumae* y el impacto previsto de la mutación determinado por el *software* SnpEff. La función de la proteína se decide para el CDS involucrado o el siguiente gen en las regiones intergénicas.

Posición	Ref	Alt	Comienzo	Final	CR-269	CR-142	CR-103	Efecto SNP	Variante	Función
254,422	A	G	Región intergénica	Región intergénica	Sí	-	-	Modificador	Modificador	Acuaporina Z
1,357,198	T	C	1,357,157	1,357,465	Sí	-	Sí	Bajo	Sinónimo	Proteína hipotética
1,541,659	A	G	1,541,571	1,542,494	-	-	Sí	Moderado	Sin sentido	Proteína hipotética
1,929,203	C	T	1,928,301	1,929,584	-	Sí	-	Bajo	Sinónimo	Propionil-CoA/ succinato-CoA transferasa
2,440,841	C	T	2,440,345	2,441,145	Sí	Sí	Sí	Moderado	Sin sentido	Pseudogen
2,620,902	A	G	2,618,705	2,621,296	Sí	Sí	Sí	Moderado	Sin sentido	Aminopeptidasa N
2,919,681	A	G	Región intergénica	Región intergénica	Sí	-	Sí	Modificador	Modificador	Proteína hipotética
3,150,050	A	G	Región intergénica	Región intergénica	Sí	-	-	Modificador	Modificador	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa/oxidasa

Tabla 7. Genes afectados por deleciones en las diferentes cepas de *M. brumae* en comparación con el genoma de referencia de *M. brumae*. CDS ID indica el código de identidad PGAP para genes afectados por deleciones. El producto obtenido para cada gen fue predicho por PGAP.

Anotación génica		Porcentaje de deleción (%)		
CDS ID	Producto	CR-269	CR-142	CR-103
L2Z93_000058	Proteína estructural de nucleoide H-NS	20	13	21
L2Z93_000315	Transposasa familia IS256	0	0	21
L2Z93_000322	Proteína hipotética	19	0	0
L2Z93_000342	Proteína hipotética	0	26	18
L2Z93_000604	Proteína familia transglicosilasa	32	37	37
L2Z93_001423	Proteína hipotética	23	20	0
L2Z93_001447	Proteína hipotética	23	29	9
L2Z93_001544	Endonucleasa HNH	0	0	10
L2Z93_001659	Peptidasa familia C40	38	32	37
L2Z93_001702	Proteína de secreción Apa rica en alanina y prolina	25	10	0
L2Z93_001714	Proteína hipotética	0	0	16
L2Z93_001739	Proteína hipotética	0	11	0
L2Z93_002425	Factor de iniciación de la traducción IF-2	0	15	15
L2Z93_003782	Transposasa familia IS3	0	0	24

2.3 Estudio de la supervivencia intracelular de las cepas de *M. brumae* e inmunomodulación en macrófagos humanos y murinos

Tras el estudio fenotípico y genotípico de las cuatro cepas de *M. brumae*, se evaluó la supervivencia intracelular de las micobacterias en macrófagos humanos (THP-1) y murinos (J774). Los macrófagos se infectaron con una MOI 10:1 y las células se lisaron a diferentes tiempos (3, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) tras la infección para conocer las CFU/pocillo recolectadas de cada cepa (Figura 16. a). Finalmente, los sobrenadantes fueron recolectados para cuantificar los niveles de citocinas y la producción de NO por parte de los macrófagos (Figura 16. b).

Los macrófagos J774 fueron capaces de eliminar, con una tendencia similar, tres de las cuatro cepas de *M. brumae* 72 horas post-infección, con aproximadamente una disminución de un orden de magnitud para cada tiempo evaluado. En el último tiempo evaluado en esta línea celular (96 horas) solo se observó una concentración de 10^2 CFU/pocillo en macrófagos lisados que habían sido infectados con la cepa CR-269, mientras que el resto de las cepas no habían sobrevivido en el interior celular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones estudiadas. Sin embargo, sí se encontraron diferencias en

el análisis de la producción de citocinas en los macrófagos infectados con las diferentes cepas. Por un lado, aunque en todos los casos los niveles liberados fueron muy bajos, destacó la mayor producción de KC por parte de los macrófagos infectados con la cepa CR-103 respecto al resto de las cepas evaluadas, así como una mayor producción de NO en los macrófagos estimulados con esta cepa respecto a la cepa de referencia CR-270 y la cepa CR-269. Por otro lado, la producción de IL-6, TNF- α , IL-12p40 inducida por la cepa CR-142 fue significativamente superior a los niveles encontrados para las cepas CR-269, CR-103 e, incluso en algunos casos, a la cepa de referencia. Respecto a la cepa CR-269, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre esta cepa y la de referencia en cuanto a la inducción de la producción de TNF- α , IL-12p40 y NO en los macrófagos murinos infectados.

Se mostró un comportamiento similar en los resultados obtenidos para la supervivencia intracelular de las cepas de *M. brumae* en el interior de macrófagos THP-1 (Figura 16. a). Los macrófagos THP-1 fueron capaces de eliminar a las 96 horas y, con una tendencia similar, las cuatro cepas de *M. brumae*. Sin embargo, a las 120 horas, sólo fueron capaces de eliminar en su totalidad la cepa de referencia y la cepa CR-142. La cepa CR-142 ya había mostrado una disminución de su concentración intracelular significativamente mayor, respecto al resto de cepas, en cada tiempo evaluado. A las 120 horas se obtuvo una concentración del orden de 10^1 CFU/pocillo y 10^2 CFU/pocillo para las cepas CR-103 y CR-269, respectivamente. En cuanto a la producción de citocinas desencadenada por cada una de las cepas de *M. brumae* tras la infección, se apreció una mayor producción de IL-6, IL-8 y IL-12p40 y una liberación similar de TNF- α , IL-10 e IL-1 β en los macrófagos estimulados con la cepa de referencia y la cepa CR-269, siendo ambas las que destacan respecto a la cuantificación de citocinas obtenidas con las cepas CR-142 y CR-103. Sin embargo, se obtuvo una mayor producción de IL-1 β en la estimulación con la cepa CR-142, siendo estadísticamente significativa respecto a las cepas CR-269 y CR-103 (Figura 16. b).

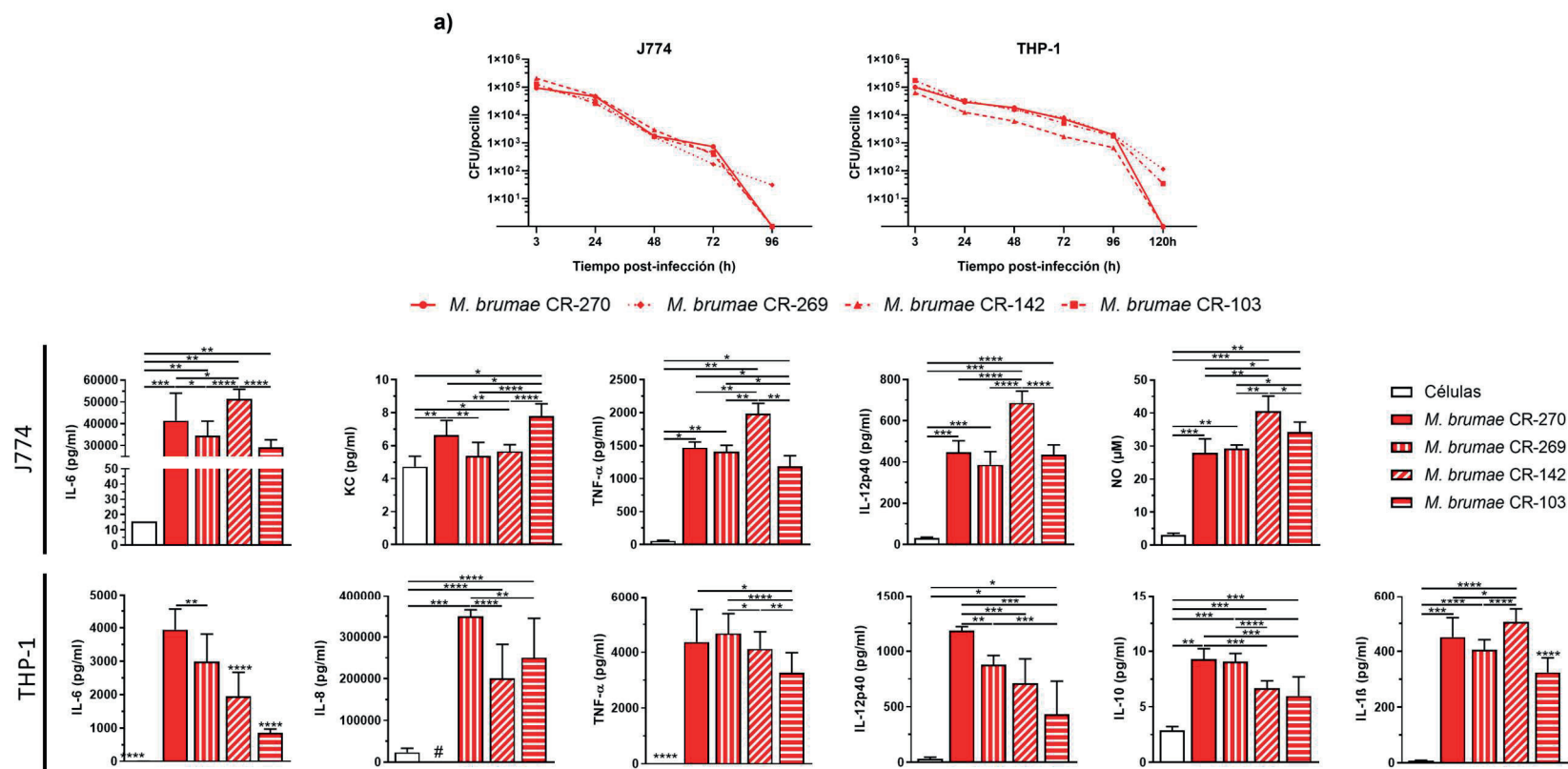


Figura 16. Supervivencia intracelular de las cepas de *M. brumae* (a) y producción de citocinas (b) en macrófagos murinos J774 y humanos THP-1 infectados. Los macrófagos fueron infectados con las diferentes cepas de *M. brumae* (cepa de referencia C-270 y las cepas CR-269, CR-142 y CR-103) crecidas en medio sólido Middlebrook 7H10. Los macrófagos fueron lisados a diferentes tiempos tras la infección. Se realizaron diluciones seriadas de los lisados que se sembraron en en medio Middlebrook 7H10 para recuento de CFUs. Los gráficos muestran CFU de micobacterias intracelulares a diferentes tiempos, así como la producción de citocinas y NO en el sobrenadante de los cultivos a las 72 horas tras la infección. Los datos se representan con la media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.4 Análisis y comparación de la actividad antitumoral y la liberación de citocinas inducida por diferentes cepas de *M. brumae*

En la evaluación de la actividad antitumoral de las diferentes cepas de *M. brumae*, se analizó y comparó el impacto de cada cepa sobre la inhibición del crecimiento celular de distintas líneas tumorales del tracto vesical, gastrointestinal, de mama, cérvix y pulmonar. Además, se cuantificó la liberación de citocinas desencadenada por la infección de las células tumorales con las distintas micobacterias.

2.4.1 Inhibición de proliferación y liberación de citocinas inducida por las cepas de *M. brumae* frente a células tumorales de vejiga

La actividad antiproliferativa de las diferentes cepas de *M. brumae* se evaluó frente a seis líneas celulares de cáncer de vejiga, con distintos grados de histopatología, tras 72 horas de infección de las células tumorales con las micobacterias. Como se muestra en la Figura 17. se observó un efecto similar en la inhibición de la proliferación producida por las diferentes cepas de *M. brumae* sobre todas las líneas tumorales, mientras que sí se apreciaron ciertas diferencias estadísticamente significativas entre las cepas en cuanto a la inducción de producción de citocinas.

En cuanto a la capacidad de inhibición de la proliferación celular, se observó una mayor inhibición de las células correspondientes a la línea 5637, de grado 2 de diferenciación respecto a las células de grado 1 (SW780), de grado 2 (RT112) y grado 3 (T24, MB-49 y J82). Sin embargo, comparando las líneas tumorales de grado 1 y 3, se observó una mayor inhibición del crecimiento tumoral en las células de grado 3, destacando la línea celular J82. En las únicas células infectadas de grado 1, línea celular SW780, se demostró una inhibición de la proliferación del 30% para la cepa de referencia y la cepa CR-103, siendo estadísticamente significativo respecto al efecto producido por la cepa CR-142, la cual presentó una capacidad citotóxica del 20%, aproximadamente. En la línea tumoral de grado 2 de dediferenciación RT112 fue en la que se observó un menor efecto antiproliferativo, mostrando una disminución del crecimiento en torno al 10%. Sin embargo, en la segunda línea de grado 2 evaluada, células 5637, se observó una disminución del crecimiento celular del 40-43%, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes cepas de *M. brumae*. Finalmente, entre los resultados obtenidos en las líneas tumorales de grado 3, cabe destacar la inhibición de la proliferación sobre las células J82, siendo del 35-40% respecto a las células sin infectar. Se mostró una mayor inhibición inducida por parte de la cepa CR-269 siendo estadísticamente significativa respecto a la cepa de referencia y la cepa CR-142. Se obtuvo una disminución del crecimiento tumoral del 25-30% frente a la línea MB-49, presentando un menor efecto por parte de la cepa CR-142, aunque no fue significativo respecto al resto de las cepas. Por último, se mostró una capacidad

citotóxica del 20-30% sobre las células T24, siendo significativamente mayor la inhibición producida por la cepa de referencia y la cepa CR-142.

Respecto a la producción de citocinas analizadas en las sobrenadantes del cultivo, se cuantificaron los niveles de IL-8 e IL-6 producidos por las células tumorales al ser infectadas por las distintas cepas de *M. brumae*. Para ambas citocinas se obtuvieron niveles más bajos en las líneas tumorales SW780 y RT112, una producción intermedia en las líneas celulares de grado 3 de dediferenciación y una mayor liberación incluso a nivel basal (sin infección) en la línea 5637 (grado 2). Concretamente, la mayor inducción de IL-8 se produjo en la línea tumoral 5637, seguida de T24, MB-49 y J82 y, presentando las concentraciones más bajas para RT-112 y SW-780, respectivamente. La misma tendencia se observó en la producción de IL-6, a excepción de la línea J82 en la que se obtuvo una liberación de IL-6 significativamente superior al resto, incluida la línea tumoral 5637. En la liberación de IL-8, destacó la producción significativamente mayor inducida por la cepa CR-103 sobre la línea tumoral SW-780 respecto al resto de las cepas de *M. brumae*, así como los niveles superiores promovidos por CR-142 en las células 5637 y T24. Para la producción de IL-6, se obtuvieron valores mínimos en las células SW-780 y RT112 para todas las cepas de *M. brumae* y destacó la mayor producción generada en las células 5637 por parte de la cepa de referencia y la cepa CR-103. En cuanto a las líneas tumorales de grado 3, en la línea MB-49 se mostró una inducción de IL-6 ligeramente superior para la cepa CR-142, mientras que la cepa de referencia y la cepa CR-269 destacaron por inducir una mayor liberación de esta citocina en la línea tumoral J82.

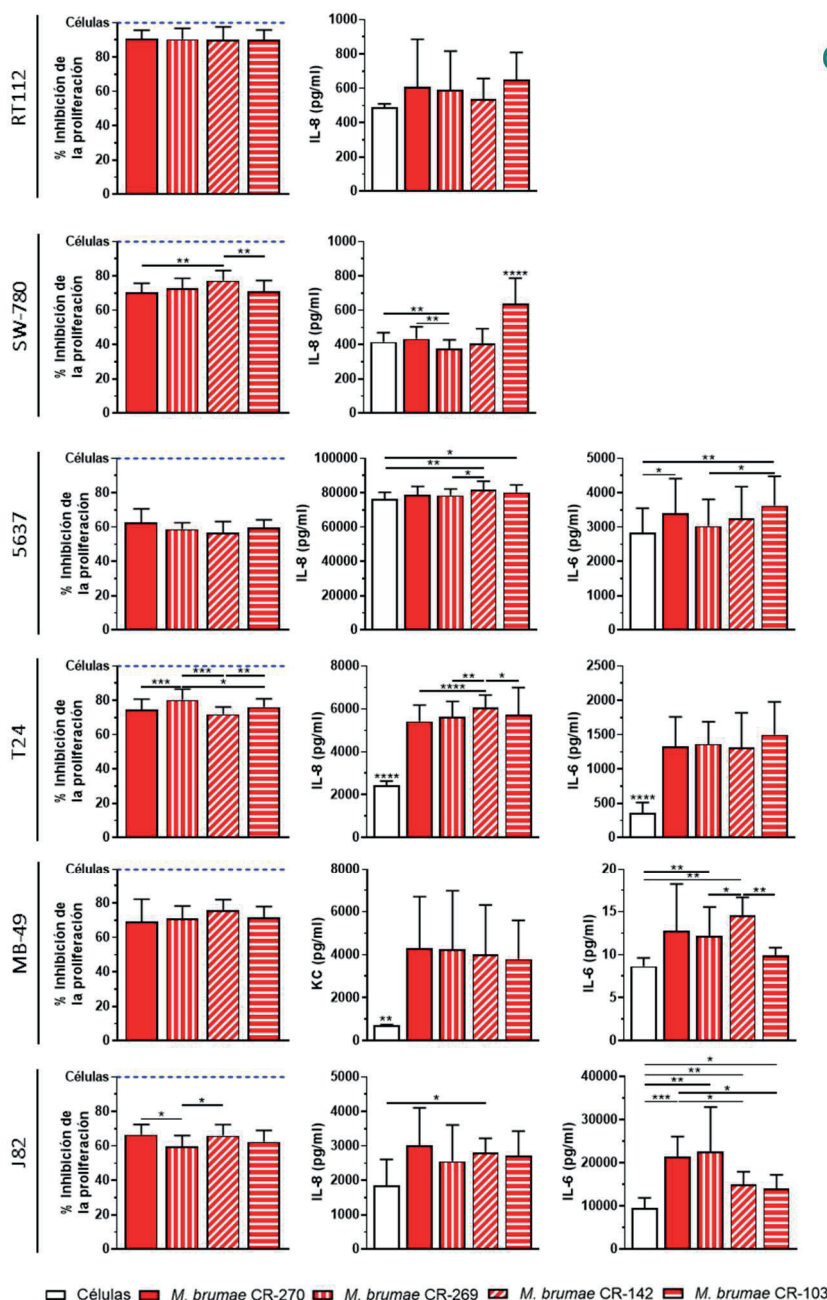


Figura 17. Inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas de líneas tumorales de vejiga infectadas por las distintas cepas de *M. brumae*. El efecto citotóxico de las diferentes cepas de *M. brumae* (cepa de referencia CR-270 y las cepas CR-269, CR-142 y CR-103) fue evaluado en líneas tumorales de vejiga humanas (RT112, SW-780, 5637, T24 y J82) y murinas (MB-49). Los gráficos muestran el porcentaje de inhibición del crecimiento de las células tumorales a las 72 horas tras ser infectadas respecto a las mismas células no infectadas. La producción de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se evaluó a las 72 horas tras la infección. Los datos se representan con la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.4.2 Inhibición de la proliferación e inducción de producción de citocinas inducida por las cepas de *M. brumae* frente a células tumorales de diferentes localizaciones anatómicas

La capacidad de inhibir la proliferación tumoral de las diferentes cepas de *M. brumae* y de *M. bovis* BCG Connaught se evaluó frente a distintas líneas tumorales de colon (CaCo-2, HCT-116, HT-29), hígado (Hep-G2), páncreas (QGP-1), mama (MCF-7, SK-BR-3), cérvix (HeLa) y pulmón (A549). La actividad antiproliferativa se evaluó a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) después de la infección de las células tumorales con las diferentes micobacterias.

Como se muestra en las Figuras 18 y 19. en todas las líneas tumorales se produjo una disminución acusada de la capacidad de crecimiento celular a las 24h mediada por la actividad antiproliferativa de las tres cepas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG. Además, para todos los tiempos evaluados, se observó un efecto antiproliferativo mayor de las tres cepas de *M. brumae* respecto a *M. bovis* BCG, excepto en las células HeLa, donde *M. bovis* BCG presentó un efecto similar y, en sobre la línea tumoral A549, donde la disminución del crecimiento tumoral fue más acusada cuando se infectaron las células con *M. bovis* BCG. A las 24h post-infección la inhibición del crecimiento tumoral mediado por las cepas de *M. brumae* estuvo entre el 30 y el 60%, siendo más acusada en las células Hep-G2 (50%), QGP-1 (55%) y MCF-7 (50-60%). Mientras que la disminución producida por *M. bovis* BCG fue de entre el 5 al 45%, siendo menor para las células HT-29 y mayor para Hep-G2 y A549. Destacó el efecto observado en la inhibición del crecimiento celular de HT-29, donde el mayor efecto se demostró a las 48h con un porcentaje de inhibición del 40-50% para las cepas de *M. brumae*, y un 30% de inhibición a las 72 horas cuando las células estaban infectadas por *M. bovis* BCG. Para todas las micobacterias evaluadas, se observó un efecto de inhibición sostenido en el tiempo para las líneas tumorales HeLa y A549. Comparando las tres cepas de *M. brumae*, el efecto antiproliferativo fue similar en todas las líneas tumorales, aunque se observó un efecto antitumoral superior en las cepas CR-142 y CR-103 respecto a la cepa de referencia para las líneas celulares HT-29, QGP-1, SK-BR-3 y A549, sin diferencias estadísticamente significativas.

Además, se cuantificaron los niveles de IL-8 e IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos tumorales a las 72 horas tras la infección con las micobacterias. Se observó una producción significativamente superior en la producción de IL-8 cuando las células tumorales fueron infectadas con *M. bovis* BCG respecto a cualquiera de las cepas de *M. brumae*. Como excepción, destacó la mayor producción de IL-8 en las células HT29 estimuladas con las cepas de *M. brumae*, siendo estadísticamente significativos los niveles de la cepa de referencia y la cepa CR-142. Además, se produjo una mayor liberación de esta citocina en las células HCT-116 cuando se infectó con la cepa CR-103 respecto al resto de micobacterias estudiadas. En cuanto a la liberación de IL-6, en general la concentración producida en el sobrenadante por las diferentes líneas tumorales fue baja, sin embargo, se produjo una menor inducción en las células HCT-116, HT-29 y MCF-7 por parte de todas las micobacterias analizadas respecto al

resto de líneas estudiadas. Excepto en las células CaCo-2 y Hep-G2, donde no se mostraron diferencias estadísticas, en el resto de las líneas celulares se observó una tendencia similar, con una producción significativamente mayor cuando las células se infectaron con *M. bovis* BCG respecto a las infecciones con las diferentes cepas de *M. brumae*.

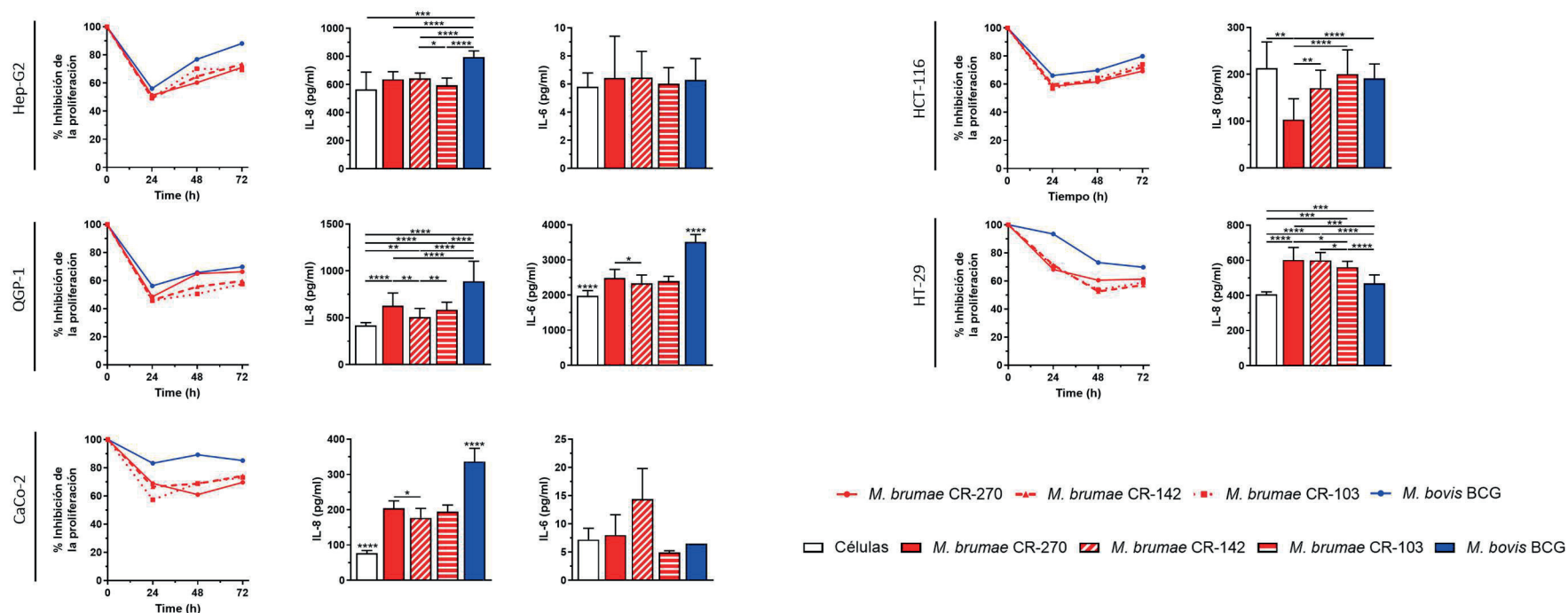


Figura 18. Inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas de líneas tumorales de localizaciones anatómicas diferentes a vejiga infectadas por las distintas cepas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG. El efecto antiproliferativo de las diferentes cepas de *M. brumae* (cepa de referencia CR-270 y las cepas CR-142 y CR-103) y *M. bovis* BCG fue evaluado en líneas tumorales humanas de hígado (Hep-G2), páncreas (QGP-1) y de colon (CaCo-2, HCT-116 y HT-29). Los gráficos muestran el porcentaje de inhibición del crecimiento de las células tumorales a diferentes tiempos tras ser infectadas respecto a las mismas células no infectadas. La producción de citocinas se evaluó en los sobrenadantes de cultivos tras 72 horas de la infección. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

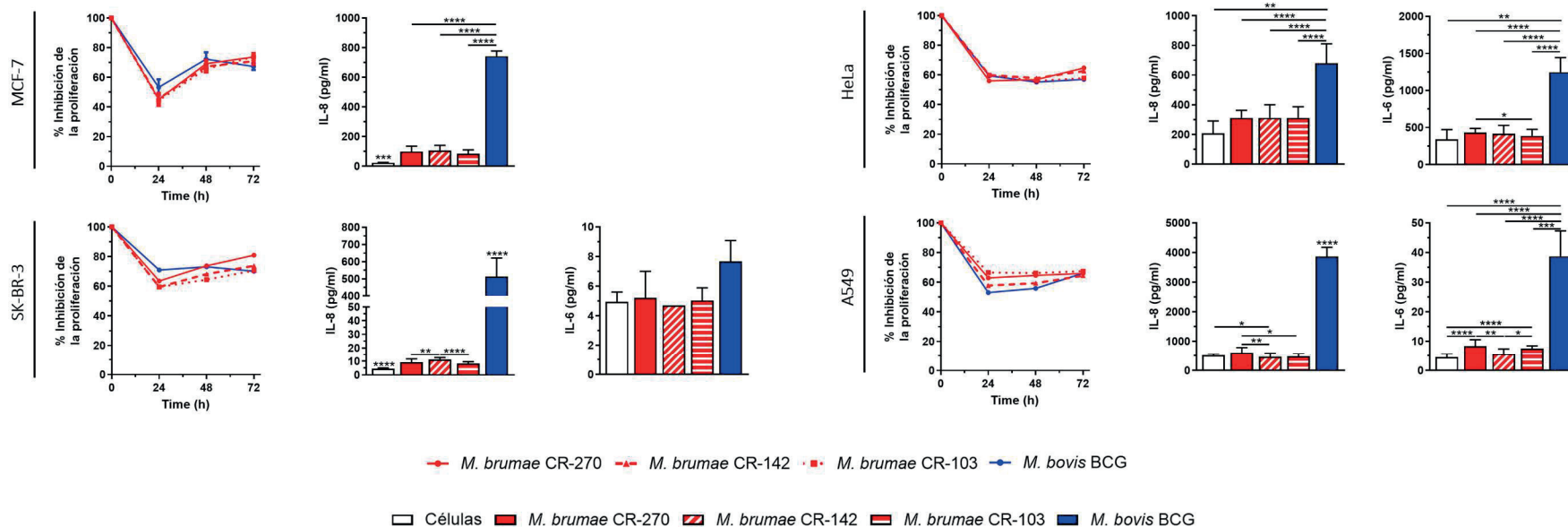


Figura 19. Inhibición de la proliferación celular y producción de citocinas de líneas tumorales de localizaciones anatómicas diferentes a vejiga infectadas por las distintas cepas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG. El efecto antiproliferativo de las diferentes cepas de *M. brumae* (cepa de referencia CR-270 y las cepas CR-142 y CR-103) y *M. bovis* BCG fue evaluado en líneas tumorales humanas de mama (MCF-7 y SK-BR-3), cervix (HeLa) y pulmón (A549). Los gráficos muestran el porcentaje de inhibición del crecimiento de las células tumorales a diferentes tiempos tras ser infectadas respecto a las mismas células no infectadas. La producción de citocinas se evaluó en los sobrenadantes de los cultivos tras 72 horas de la infección. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

CAPÍTULO II

Activación del sistema inmune con *M. brumae* de poblaciones con diferente rango de edad en el contexto de cáncer de vejiga

CAPÍTULO II. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON *M. BRUMAE* DE POBLACIONES CON DIFERENTE RANGO DE EDAD EN EL CONTEXTO DE CÁNCER DE VEJIGA

1. Material y métodos

1.1 Población de estudio

Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron su consentimiento para la obtención de las muestras y fueron informados del procedimiento y objetivos del ensayo. Además, se les informó de la posibilidad de abandonar de forma voluntaria el estudio en cualquier momento, si así lo consideraban.

los individuos que participaron en el estudio se dividieron en tres grupos poblacionales según su rango de edad y condición neoplásica. Uno de los grupos estaba compuesto por personas sanas jóvenes con edades comprendidas entre 18 y 35 años, un segundo grupo lo formaban personas sanas mayores con edades comprendidas entre los 60 y los 75 años y, un tercer grupo lo formaron personas con cáncer de vejiga de más de 65 años, los cuales no habían comenzado el tratamiento intravesical con *M. bovis* BCG.

1.2 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC procedieron de personas voluntarias a las cuales se les informó del objetivo del experimento y dieron su consentimiento firmado. Se aislaron PBMC a partir de 50mL de sangre venosa periférica de individuos sanos jóvenes e individuos sanos mayores de 60 años. Las extracciones se realizaron en el dispensario de la UAB, recogiendo la sangre en tubos con un 1% de heparina. Las PBMC se obtuvieron mediante centrifugación en un gradiente de densidad isoosmótico de Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Canadá), permitiendo la separación de las células mononucleares de las células polimorfonucleares, eritrocitos y plaquetas. Como resultado, se obtuvo la sedimentación de los eritrocitos y las células polimorfonucleares, así como la formación de una nube de células, correspondiente a las PBMC, en la parte superior del gradiente de densidad. Además, se obtuvieron PBMC de individuos enfermos de CVNMI, antes de que los pacientes comenzaran con el respectivo tratamiento antineoplásico con *M. bovis* BCG. Las células se obtuvieron del banco de

muestras del grupo Virología Tisular del AIDS Research Institute IrsiCaixa (Badalona, Barcelona). Todas las PBMC se cultivaron con medio de cultivo completo RPMI.

1.2.1 Aislamiento de PBMC

Para el aislamiento de las PBMC a partir de voluntarios sanos jóvenes, sanos adultos mayores y pacientes enfermos de cáncer de vejiga, se realizó la extracción de 50mL de sangre venosa periférica de cada individuo. El procesamiento de cada sangre comenzó con su homogeneización y dilución con medio de cultivo RPMI sin FBS y sin antibióticos en una relación 1:1 (v/v).

Para separar las PBMC del resto de componentes de la sangre, se utilizaron los tubos para centrifugación de gradiente de densidad SepMate™ de 50mL (Stemcell Technologies) y el medio de gradiente de densidad Lymphoprep™, el cual es específico para el aislamiento de células mononucleares. Siguiendo las indicaciones del fabricante, en cada tubo se añadieron 15mL de Lymphoprep™ a través del orificio de la cazoleta. Sobre el medio de gradiente, se agregaron lentamente 17mL de la sangre diluida, formando una capa inmisible con el Lymphoprep™. Se centrifugaron las muestras a 1200 *g* durante 10 minutos, a 25°C y con desaceleración de la centrifuga. Según su densidad, los componentes celulares se separaron formando 4 fases, tal y como se muestra en la figura 20: una fase superior correspondiente al plasma sanguíneo, una segunda capa blanquinosa con las PBMC (linfocitos y monocitos) y las plaquetas, una tercera fase transparente (medio de gradiente Lymphoprep™) y una última capa roja con los eritrocitos y las células polimorfonucleares.

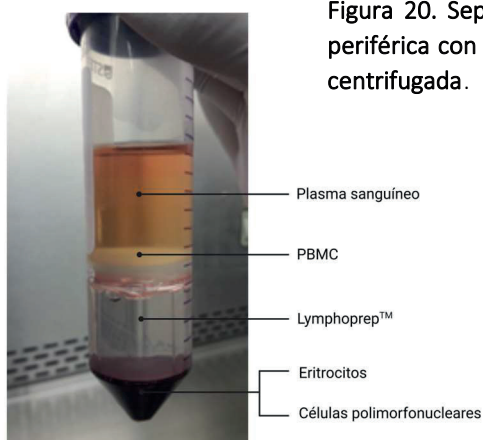


Figura 20. Separación celular de una muestra de sangre venosa periférica con medio de gradiente Lymphoprep™ después de ser centrifugada.

Se recuperó la nube de PBMC, decantando sobre un Falcon™ nuevo el contenido alojado por encima de la cazoleta del tubo SepMate™. Las células recuperadas se centrifugaron a 300 *g* durante 8 minutos, a 25°C y con desaceleración de la centrifuga. El *pellet* obtenido, se resuspendió y homogeneizó en medio RPMI con FBS y sin antibióticos para realizar un primer

lavado de las PBMC. Para eliminar los restos celulares y las trazas de plaquetas, las células se centrifugaron a 120 *g* durante 10 minutos, a 25°C. El *pellet* de células se resuspendió con RPMI con FBS y sin antibióticos para realizar el recuento celular mediante cámara de Neubauer, obteniendo la concentración de PBMC de la muestra. Una vez quedó ajustada la concentración celular, se sembraron las PBMC en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc, Nunclon Surface, Thermofisher Scientific, Estados Unidos), añadiendo 4x10⁶ células/pocillo en un volumen total de 3mL.

1.2.2 Activación de las PBMC por parte de las micobacterias

Las células sembradas se trataron con 3 cepas diferentes de *M. brumae*, *M. bovis* BCG Connaught, o fitohemaglutinina-M (*phytohemagglutinin*-M, PHA, Gibco®) como estímulo, o RPMI completo con FBS y sin antibióticos como control (Figura 21). Las suspensiones bacterianas de *M. brumae* y de *M. bovis* BCG Connaught se prepararon como se indica anteriormente en el primer capítulo, utilizando un patrón de turbidez McF 1. Las MOI utilizadas fueron dependientes de la especie de micobacteria, utilizando estímulos con MOI 1:1 y 0.1:1 para *M. brumae* y *M. bovis* BCG, respectivamente y, añadiendo 0.5mL/pocillo. PHA se utilizó como agente inespecífico de activación en diluciones 1/100 y 1/300. Finalmente, las placas con las PBMC infectadas se incubaron durante 7 días a 37°C y una atmósfera húmeda del 5% de CO₂. Cada una de las infecciones se realizó por duplicado en cada experimento.

1.2.3 Co-cultivos de las PBMC activadas y células tumorales de vejiga T24

1.2.3.1 Recuperación de las PBMC activadas con micobacterias para co-cultivo directo

Tras los 7 días de incubación, se recogieron los sobrenadantes de cada pocillo, así como las PBMC activadas. Se realizaron 3 lavados con medio de cultivo completo RPMI para recuperar el total de las células activadas. Se centrifugaron a 250 *g* durante 10 minutos y 25°C. El sobrenadante obtenido, se separó en un tubo nuevo, reservándolo para procesarlo y utilizarlo en el co-cultivo indirecto, como se detalla en el apartado 1.2.3.2.

Por otro lado, las células se resuspendieron en medio completo RPMI y se centrifugaron a 120 *g* durante 10 minutos, a 25°C y sin freno, para la total eliminación de restos bacterianos y celulares derivados del cultivo. Finalmente, el *pellet* de PBMC se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo completo RPMI y se realizó el recuento celular mediante cámara de Neubauer para conocer la concentración celular en cada una de las condiciones a estudio.

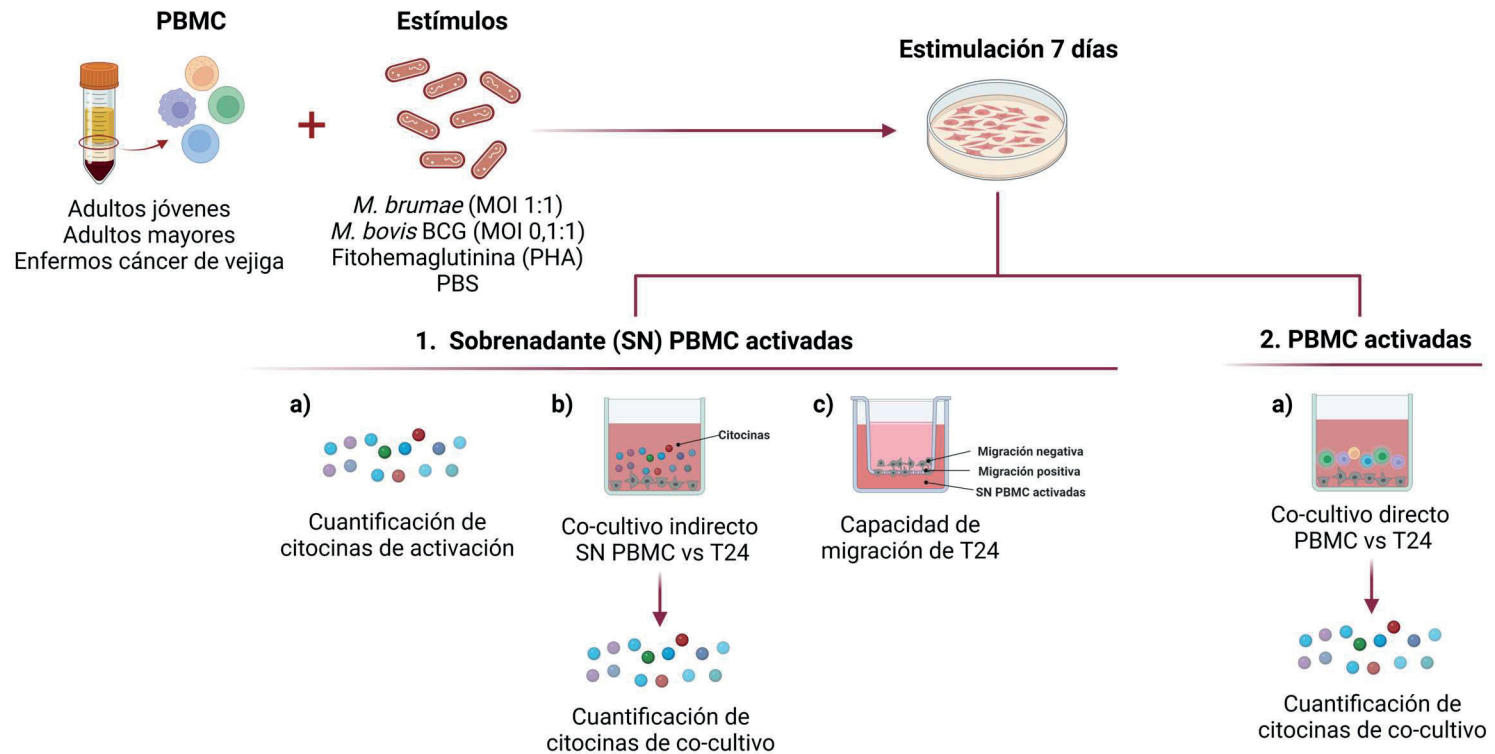


Figura 21. Esquema de la metodología utilizada en la activación de PBMC y cuantificación de la inmunomodulación (1. a), co-cultivo directo (2. a) e indirecto (1. b) frente a células tumorales de vejiga T24, e impacto sobre la capacidad de migración de T24 (1. c).

1.2.3.2 Co-cultivo de los sobrenadantes de las PBMC activadas con células tumorales

El sobrenadante obtenido y separado de las PBMC activadas se centrifugó a 2680 *g* durante 20 minutos y 25°C para eliminar los restos celulares y bacterianos. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo para ser utilizado en el estudio de inhibición de proliferación indirecta sobre células tumorales de vejiga T24. Con ello, se pudo conocer el efecto que presentaban los factores solubles liberados por las PBMC activadas en la inhibición del crecimiento de las células tumorales. Parte de estos sobrenadantes se almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de citocinas, quimiocinas y, para el estudio del impacto sobre la migración celular de la línea tumoral T24.

1.2.4 Inhibición de la proliferación directa e indirecta de las PBMC activadas frente a células tumorales humanas T24

En primer lugar, tanto para valorar la capacidad de inhibir la proliferación de forma directa e indirecta, se sembraron las células tumorales de vejiga T24 en placas de cultivo de 96 pocillos con una concentración de 1×10^4 células/pocillo. Se incubaron durante 3 horas a 37°C y una atmósfera húmeda del 5% de CO₂. Por un lado, en el análisis del efecto directo de las PBMCs activadas, el medio de cultivo de los pocillos con las células T24 se reemplazó por la suspensión de PBMC activadas con una concentración de 2×10^5 células/pocillo (PBMC: T24, 20:1). Por otro lado, para conocer el efecto directo de las PBMCs activadas sobre las células tumorales T24, el medio de cultivo de los pocillos con las células T24 se reemplazó por el sobrenadante obtenido en el apartado anterior (1.2.3.2). Todos los co-cultivos se dejaron incubar durante 48 horas a 37°C y una atmósfera húmeda del 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes se recolectaron, se procesaron y almacenaron a -80°C, como se detalla anteriormente, hasta la cuantificación de las citocinas liberadas. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS de los pocillos y se analizó la inhibición de la proliferación tumoral directa de las PBMC activadas mediante un ensayo de MTT.

1.2.5 Análisis de la liberación de citocinas y quimiocinas

Se cuantificó la producción de citocinas y quimiocinas de los sobrenadantes obtenidos tras la activación de las PBMC, así como de los sobrenadantes obtenidos tras el co-cultivo de células tumorales T24 con dichas PBMC activadas o los sobrenadantes de éstas.

En los sobrenadantes de activación se cuantificó: CXCL-10/IP-10, IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-17, IL-32 y TNF- α . En las muestras obtenidas tras el co-cultivo con tumorales de vejiga T24, se analizaron los niveles de IL-6 e IL-8. Para ello, se utilizaron kits comerciales de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3 Migración de células tumorales T24

Mediante un ensayo de migración celular, se estudió *in vitro* la capacidad de migración de las células tumorales de vejiga T24, así como el efecto que tienen sobre estas los sobrenadantes de las PBMC activadas con micobacterias (*M. brumae* y *M. bovis* BCG) o con PHA. Se utilizaron cámaras de Boyden (*transwells*) (Corning, Estados Unidos) con una membrana porosa semipermeable (diámetro de poro de 8µm) en la parte inferior, creando dos microambientes en el pocillo de la placa de cultivo. Los *transwells* se colocaron en el interior de los pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, Estados Unidos) y se sembraron 1.5×10^4 células/inserto de la línea celular T24. Previamente, las células T24 se dejaron durante 24 horas con medio de cultivo sin FBS. Como quimioatrayente se utilizaron los sobrenadantes de las PBMC activadas, añadiéndolo en el pocillo de la placa de cultivo. A continuación, el inserto se sumergió en el sobrenadante añadido al pocillo, pudiendo evaluar la capacidad de migración de las células tumorales T24 frente a las citocinas y factores solubles liberados por las PBMC en el proceso de activación.

Después de un periodo de incubación de 24 horas, se descartaron las células adheridas a la superficie interna del *transwell* mediante el rascado con un escobillón. A continuación, para poder contar el número de células tumorales que habían sido capaces de migrar a través de los poros del inserto, se fijaron las muestras en metanol durante 15 minutos y, posteriormente, se tiñeron con cristal violeta 0,23% durante 15 minutos. Finalmente, se capturaron imágenes de 5 campos aleatorios mediante microscopía óptica invertida (Nikon Eclipse TE-2000E, Japón). Las células presentes en las imágenes se contaron con el programa libre ImageJ versión 1.54d.

2. Resultados

Se analizó la activación de las células mononucleares de sangre periférica por parte de la cepa de referencia de *M. brumae* y *M. bovis* BCG sobre tres grupos poblacionales distintos. Para ello, se evaluó la activación de las células mediante cuantificación de un panel de citocinas secretadas en los sobrenadantes de los cultivos. Además, se realizó un estudio del efecto antiproliferativo directo de las PBMC activadas sobre células tumorales de vejiga T24. Finalmente se estudió el efecto los factores solubles y citocinas liberados por las PBMC durante su activación sobre la proliferación tumoral y sobre la migración de las células tumorales.

2.1 Capacidad de activación de las PBMC por parte de *M. brumae* y *M. bovis* BCG

Con el objetivo de analizar el efecto inmunoestimulador de la cepa de referencia de *M. brumae* y de *M. bovis* BCG Connaught, se infectaron las PBMC, de tres grupos poblacionales diferentes, con las micobacterias vivas y se cuantificó la producción de las citocinas inducidas en cada condición (Figura 22).

Se demostró que las PBMC en un cultivo durante 7 días sin estimular, presentaban una producción constitutiva de todas las citocinas evaluadas, aunque en la mayor parte de los casos, los niveles obtenidos fueron bajos, incluso cercanos al límite de detección del kit, concretamente para IFN- γ , IL-10, IL-12p40 e IL-17.

Cuando las células se estimularon con las micobacterias y el agente inespecífico PHA, los niveles de citocinas liberadas incrementaron significativamente respecto a las células sin estimular. Sin embargo, al analizar la producción del factor soluble CXCL-10/ IP-10, se pudo mostrar una disminución de su liberación cuando las PBMC fueron activadas con las micobacterias respecto a las células sin estimular o estimuladas con PHA. Por otro lado, en todas las condiciones y para todos los grupos de población, se observó una producción mínima de IL-32, siendo menor al límite de detección del test.

En general, se obtuvo una mayor producción de IFN- γ , IL-8 e IL-17 en el grupo poblacional de adultos jóvenes respecto a adultos mayores y a enfermos de cáncer de vejiga, obteniendo diferencias estadísticamente significativas para ambas micobacterias. Además, se observó esta misma tendencia en el resto de las citocinas evaluadas. También se observó una producción similar de citocinas entre el grupo de adultos mayores y enfermos de cáncer de vejiga, siendo inferior en los pacientes enfermos de cáncer de vejiga para el factor soluble CXCL-10/ IP-10.

Se observó una producción de citocinas similar entre las PBMC de adultos jóvenes activadas con *M. brumae* y con *M. bovis* BCG. Esta misma tendencia se pudo apreciar también en el grupo de adultos mayores, excepto en la liberación de IL-6, donde se obtuvo un nivel ligeramente superior cuando las células se activaron con *M. bovis* BCG que con *M. brumae*. Sin embargo, la producción de CXCL-10/IP-10, IFN- γ , IL-6, IL-12p40, IL-17, y TNF- α , fue mayor cuando las PBMC de los pacientes con cáncer de vejiga se estimularon con *M. bovis* BCG. Tanto en el grupo de adultos mayores como en los enfermos, se obtuvo una producción menor de IL-6, IL-12p40 y TNF- α cuando las células se estimularon con PHA respecto al estímulo con las micobacterias, mientras que se produjo un aumento de la producción de CXCL-10/IP-10, IFN- γ , IL-10, y IL-17 con PHA respecto a la estimuladas con las micobacterias.

Se obtuvieron concentraciones inferiores al límite de detección de los tests para las citocinas IL-2 e IL-32 en todos los grupos poblacionales de estudio y para todas las condiciones.

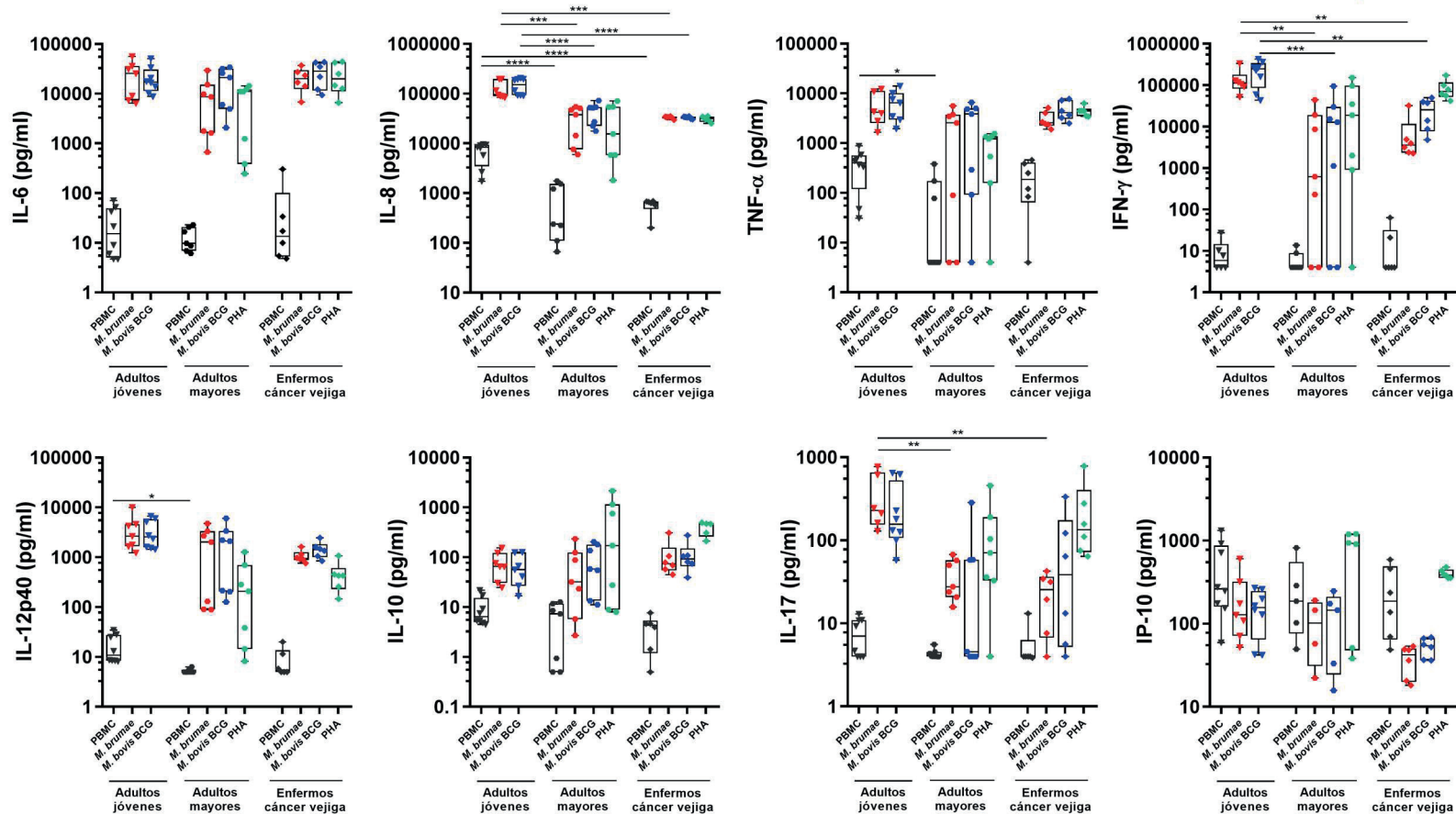


Figura 22. Producción de IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-17, IP-10 y TNF- α en los sobrenadantes de las PBMC tras su activación con *M. brumae* (rojo), *M. bovis* BCG (azul), PHA (verde) o sin estimular (negro); en los diferentes grupos poblacionales. El efecto inmunoestimulador de la cepa tipo de *M. brumae* y de *M. bovis* BCG fue evaluado en PBMC aisladas de adultos jóvenes (18 – 35 años), adultos mayores (60 – 75 años) y enfermos de cáncer de vejiga (> 65 años). Cada punto representa un individuo. Los datos se representan como la media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.2 Efecto antiproliferativo directo e indirecto de las PBMC activadas frente a células tumorales humanas T24

Después de haber estado activadas con los distintos estímulos durante 7 días, se analizó la actividad antiproliferativa de las PBMC frente a la línea tumoral de vejiga T24. Por un lado, se realizó el estudio mediante el contacto celular directo entre las células T24 y las PBMC (co-cultivo directo) y, por otro lado, se analizó el efecto antiproliferativo indirecto utilizando el sobrenadante con los factores solubles y citocinas de las PBMC activadas (co-cultivo indirecto).

Como se observa en la Figura 23. a, las PBMC, tanto estimuladas (*M. brumae*, *M. bovis* BCG o PHA) como sin estimular, presentaron actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral testada, aunque con las PBMC estimuladas se obtuvieron valores superiores de inhibición de la proliferación celular respecto a las PBMC sin estimular. También se mostró un menor poder antiproliferativo para todas las condiciones y en todos los grupos poblacionales, cuando el co-cultivo fue indirecto.

En los co-cultivos directos de adultos jóvenes y mayores, se obtuvo un efecto antiproliferativo de aproximadamente el 80% cuando las PBMC habían sido estimuladas con las micobacterias, mientras que la inhibición de la proliferación generada por las PBMC sin estimular fue del 50 y el 60%, respectivamente. En cambio, se obtuvieron valores de 55%, 65% y 85% cuando las PBMC de los enfermos de cáncer de vejiga no se estimularon o se activaron con *M. brumae* y *M. bovis* BCG, respectivamente (Figura 23). De esta comparación, sólo se encontraron diferencias significativas entre el efecto antitumoral de las PBMC estimuladas con *M. brumae* entre los adultos mayores y los pacientes de cáncer. Además, el efecto inducido por la estimulación con PHA fue similar a las condiciones con las micobacterias en los dos grupos poblacionales.

Por otro lado, en el análisis de los co-cultivos indirectos, se pudo observar un mayor efecto antitumoral de las condiciones de *M. brumae* para los grupos poblacionales de adultos jóvenes y mayores sanos, con valores de inhibición de la proliferación del 65% para ambos, mientras que se obtuvo una inhibición del crecimiento tumoral del 50% cuando las PBMC de ambos grupos fueron activadas con *M. bovis* BCG. Cabe destacar que en el grupo de pacientes, se demostró un efecto antiproliferativo menor por parte de los factores solubles de las PBMC activadas, siendo del 40% para las estimuladas por las micobacterias y del 45% en la condición de PHA. En este co-cultivo, destacó significativamente la diferencia del efecto antiproliferativo entre las células estimuladas con *M. brumae* en los pacientes con tumor vesical respecto a la misma condición de los otros dos grupos de adultos sanos.

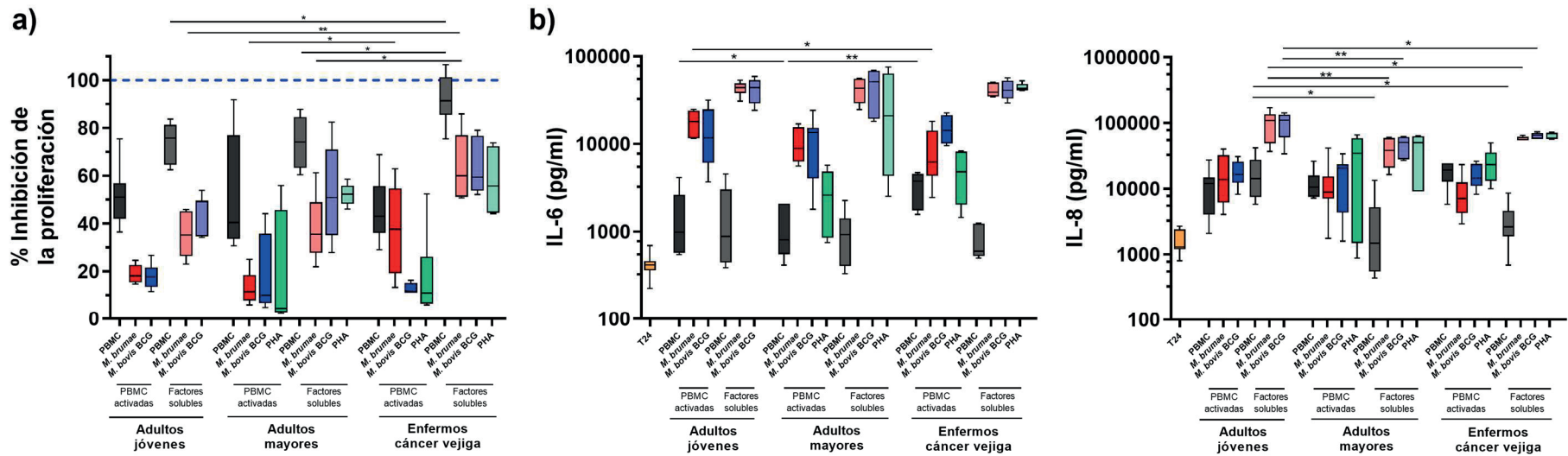


Figura 23. Efecto antiproliferativo en la línea tumoral T24 de PBMC activadas con *M. brumae* (rojo), *M. bovis* BCG (azul), PHA (verde) o sin estimular (negro), y del SN de las PBMC activadas; en los diferentes grupos poblacionales. a) Porcentaje de inhibición de la proliferación de células T24 tras 48 horas de co-cultivo con las PBMC activadas o con los factores solubles de las PBMC activadas, respecto a las mismas células T24 no infectadas. b) Producción de IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes (SN) de T24 tras 48 horas co-cultivada con PBMC activadas con micobacterias, factores solubles de las PBMC activadas, PHA o sin estimular. Los datos se representan como la media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (ANOVA test).

Así mismo, también se analizó la producción de las citocinas IL-6 e IL-8 por parte de las células tumorales T24 en los co-cultivos directo e indirecto, como se muestra en la Figura 23. b.

Se observó, por un lado, una producción constitutiva de IL-6 por parte de las células T24 y, por otro lado, una producción significativamente mayor en todas las condiciones del ensayo para los tres grupos poblacionales estudiados. Concretamente, se obtuvieron niveles superiores de IL-6 cuando el co-cultivo se realizó con las PBMC activadas o sus sobrenadantes, respecto a las PBMC sin activar. Además, se mostraron concentraciones mayores de dicha citocina cuando se utilizaron los sobrenadantes de las PBMC activadas con micobacterias respecto a los co-cultivos directos de las mismas condiciones. Sin embargo, los niveles de IL-6 liberados tras el co-cultivo indirecto no fueron significativos al comparar la producción entre las distintas poblaciones a estudio. Por último, se comprobó que había un mayor nivel de IL-6 en las tumorales que habían estado en contacto directo con las PBMC activadas con *M. brumae* de los adultos jóvenes, respecto a la misma condición en adultos mayores y pacientes con tumor vesical, siendo esta última comparación estadísticamente significativa.

En la producción de IL-8 por parte de las células T24, se obtuvo una tendencia similar, con una producción constitutiva de esta citocina por parte de las células tumorales y una liberación superior en los co-cultivos indirectos respecto a los co-cultivos directos en todas las condiciones del ensayo y en las tres poblaciones estudiadas. En el contacto directo con las PBMC, destacó la similitud en los niveles de IL-8 producidos cuando se comparó el co-cultivo con las PBMC sin activar o activadas con cualquiera de las dos micobacterias, sin mostrar diferencias entre las distintas condiciones dentro de la misma población o al compararlas entre los grupos poblacionales. Finalmente, es importante recalcar las diferencias significativas entre los adultos jóvenes respecto a los adultos mayores y los enfermos, cuando se comparó la concentración de IL-8 en los co-cultivos indirectos con los factores solubles de las PBMC estimuladas con las micobacterias.

2.3 Estudio del efecto indirecto de las PBMC sobre la migración celular de la línea tumoral T24

Finalmente, se realizó un ensayo de migración celular para conocer el efecto indirecto de las PBMC activadas sobre la migración de las células tumorales T24. Mediante el uso de *transwells* se crearon dos microambientes bien diferenciados dentro del pocillo de cultivo celular, sembrando con un déficit de FBS las células T24 en la parte superior del inserto y, añadiendo los sobrenadantes con los factores solubles de las PBMC activadas (cepa de referencia de *M. brumae*, *M. bovis* BCG o PHA) y sin activar en los pocillos de cultivo, en contacto con la parte externa e inferior del inserto. Para cuantificar el efecto sobre la

migración tumoral, se fijaron, tiñeron y observaron por microscopía óptica las células tumorales que habían atravesado la membrana del inserto (Figura 24. a)

Como se observa en la Figura 24. b, se demostró una migración celular inferior en todas las condiciones de los tres grupos poblacionales respecto al control, en el que se utilizó medio de cultivo con FBS, sin ningún tipo de citocina o factor soluble adicional.

Entre los grupos poblacionales, se demostró una mayor migración de las células T24 cuando se utilizaron los sobrenadantes de las PBMC activadas de los pacientes con cáncer vesical, seguida de las PBMC de adultos mayores y siendo inferior cuando las células tumorales estaban en contacto con los sobrenadantes de las PBMC de los adultos jóvenes. Fue estadísticamente significativa la comparación poblacional cuando el agente usado para estimular las PBMC fue *M. brumae*. También se observaron diferencias significativas al comparar el efecto de los factores solubles liberados por las PBMC activadas con *M. bovis* BCG de los adultos jóvenes y los enfermos de cáncer de vejiga.

Por último, destacó el menor efecto quimioatrayente de las PBMC sin activar de los adultos sanos mayores y enfermos, presentando una menor migración celular de T24 respecto a las PBMC activadas con micobacterias o PHA, dentro de su mismo grupo poblacional, siendo más acusada esta diferencia dentro de los pacientes con tumor vesical.

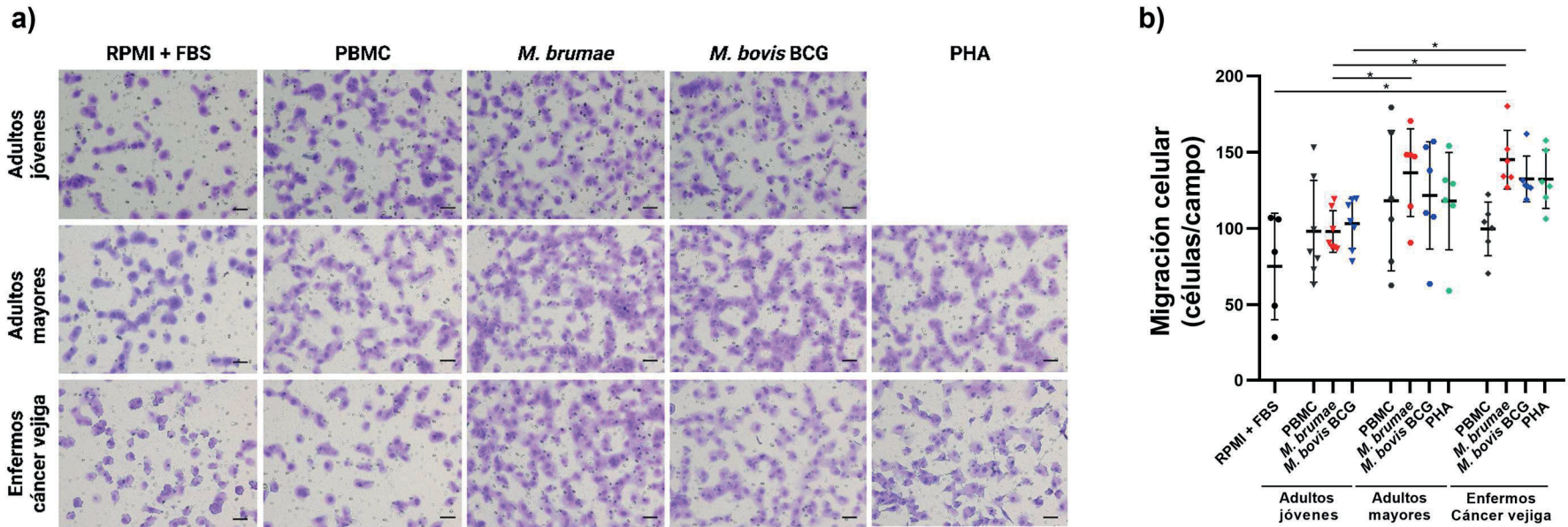


Figura 24. Impacto sobre la migración in vitro de células tumorales T24 por parte de los factores solubles de las PBMC activadas con *M. brumae* (rojo), *M. bovis* BCG (azul), PHA (verde) o sin estimular (negro). a) Imágenes representativas de la migración de células tumorales T24 (X10, — 100µm). b) Recuentos de migración de células tumorales T24. Los experimentos se realizaron con los sobrenadantes de las PBMC activadas durante 7 días con *M. brumae*, *M. bovis* BCG, PHA o sin activar. Cada punto representa un individuo. Los datos se representan con la media \pm SD. * $p < 0.05$ (ANOVA test).

CAPÍTULO III

Estudio de la inmunidad entrenada inducida por *M. brumae*

CAPÍTULO III. ESTUDIO DE LA INMUNIDAD ENTRENADA INDUCIDA POR *M. BRUMAE*

1. Material y métodos

1.1 Estudio *in vitro* de inmunidad entrenada en THP-1

1.1.1 Variables de los experimentos *in vitro* de inmunidad entrenada en THP-1

Para validar la línea celular THP-1 como modelo *in vitro* de inmunidad entrenada inducida por micobacterias, se realizaron experimentos con tres cepas de *M. brumae* (cepa de referencia CR-270 y las cepas CR-142 y CR-103), diez cepas de *M. bovis* BCG (Connaught, Glaxo, Japan, Moreau, Oncotice, Pasteur, Phipps, Russian y Tice) y *M. gastri*.

Además, se evaluó la inducción de inmunidad entrenada tanto con monocitos como macrófagos de THP-1, analizando el efecto de las micobacterias sobre la liberación de citocinas proinflamatorias y los cambios metabólicos propios del entrenamiento celular.

1.1.2 Procedimiento del experimento *in vitro* de inmunidad entrenada con THP-1

En la Figura 25 se detalla el procedimiento llevado a cabo para la realización de los estímulos primario y secundario de la línea celular THP-1, tanto en su forma de monocito como de macrófago.

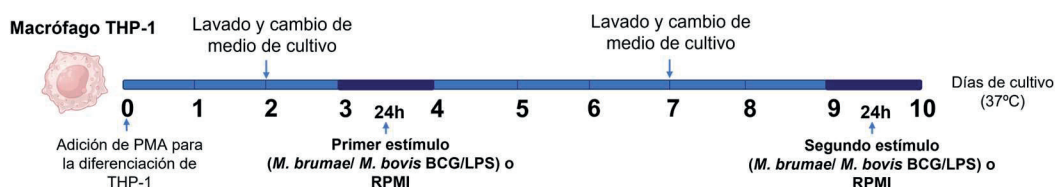
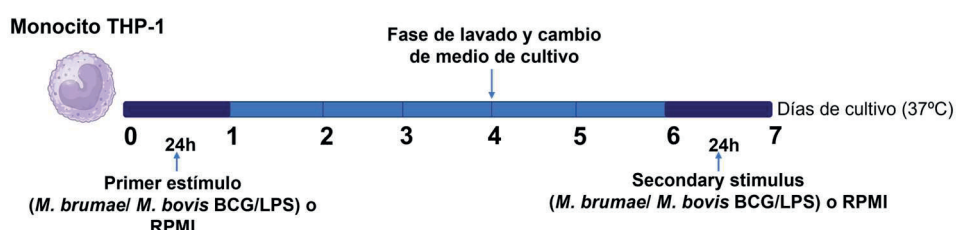


Figura 25. Procedimiento realizado en los experimentos de inducción de inmunidad entrenada con monocitos (figura superior) y macrófagos (figura inferior) de THP-1.

1.1.2.1 Preparación y siembra en placa de células THP-1

En primer lugar, se recolectaron las células THP-1, se centrifugaron y se contaron mediante cámara de Neubauer para conocer la concentración celular de la suspensión de partida. A continuación, se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos en una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Cuando los monocitos se destinaron al análisis de la trimetilación de histonas, se sembraron en una concentración de 1×10^6 células/pocillo en placas de cultivo de 12 pocillos (Nunc, Nunclon Surface, Thermofisher Scientific, Estados Unidos).

Como se indica anteriormente, para los experimentos en los que los monocitos THP-1 se diferenciaron a macrófago, se añadió PMA en una concentración de 100nM y se dejaron incubar durante 72 horas a 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ antes de estimularlas con los distintos inóculos.

En los experimentos en los que se trabajó con las células en forma de monocito, no se diferenciaron con PMA y, tras la siembra de las células en las placas de cultivo, se incubaron un mínimo de 1 hora a 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% CO₂ antes de estimularlas.

1.1.2.2 Preparación de estímulos y estimulación de las células THP-1

Se recogieron las bacterias de la superficie del medio de cultivo sólido 7H10 y se depositaron en un tubo de cristal con bolitas de vidrio, previamente esterilizado y pesado. Se pesó la cantidad de micobacterias, añadiendo en el tubo aproximadamente 40-50mg de biomasa de bacteria. Para disgregar las bacterias, se agitó con el Vórtex el contenido del tubo y se añadió el volumen de PBS necesario para conseguir una concentración bacteriana de 25mg/mL. Se sometió a ultrasonidos durante 3 ciclos de 30 segundos cada uno y se realizaron dos diluciones con PBS y RPMI con FBS y sin antibiótico, respectivamente, obteniendo una concentración final en el pocillo de 5µg/mL para cada micobacteria.

El lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), utilizado como estímulo en los experimentos, se preparó a una concentración final de 10ng/mL en dos diluciones con PBS y medio RPMI con FBS y sin antibiótico, respectivamente,

A continuación, el medio de cultivo de los pocillos se sustituyó por los estímulos preparados de micobacterias (cepas de *M. brumae*, cepas de *M. bovis* BCG o *M. gastri*), LPS o medio de cultivo RPMI con FBS y sin antibióticos. Para las condiciones en las que los monocitos THP-1 no se diferenciaron a macrófago, las placas de cultivo se centrifugaron a 300 *g* durante 5 minutos para favorecer la precipitación de las células al fondo del pocillo. Las células con los estímulos se incubaron durante 24h a 37°C y una atmósfera húmeda del 5% CO₂. Finalmente, en los días 2 y 5 de experimento, tras retirar los sobrenadantes de los pocillos, se realizó un lavado con PBS y renovó el medio de cultivo, añadiendo RPMI con FBS y antibióticos.

1.1.2.3 Re-estímulo y recolección de SN

En el día 7 de experimento, se recogieron los sobrenadantes de los pocillos, se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 minutos y se almacenaron a -80°C para el posterior análisis y cuantificación de parámetros metabólicos como glucosa y lactato.

Se realizó el segundo estímulo sobre las células, añadiendo como agente inespecífico LPS. Para la preparación del inóculo de LPS y el reestímulo de las células, se llevó a cabo el mismo procedimiento que se detalla en el apartado anterior (apartado 1.1.2.2). Tras 24 horas de reestimulación con LPS, se recogieron los sobrenadantes de los pocillos, se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 minutos y se almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de las citocinas implicadas en el proceso de inmunidad entrenada (IL-6, TNF- α e IL-1 β).

1.2 Estudio *ex vivo* de inmunidad entrenada en monocitos humanos

Los monocitos humanos destinados al estudio *ex vivo* de la inducción de inmunidad entrenada mediada por las cepas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG, se obtuvieron a partir de PBMC aisladas de adultos jóvenes sanos.

1.2.1 Aislamiento de monocitos humanos a partir de PBMC

El aislamiento de monocitos se realizó a partir de las PBMC obtenidas de voluntarios sanos adultos jóvenes como se detalla en el apartado 1.2.1 del Capítulo II. Una vez aisladas las PBMC, se utilizó una solución hiperosmótica de Percoll® (Merck) (48.5% Percoll®, 41.5% H₂O destilada, 10% NaCl 1.6M, v/v) como gradiente de densidad específico para la obtención de los monocitos de la muestra. Se añadieron 3-4mL de suspensión de células por cada 10 mL de solución de Percoll® y se centrifugaron a 580 *g* durante 15 minutos sin desaceleración en la centrífuga. Como resultado, en la parte superior se obtuvo una capa blanquinosa de monocitos, mientras que el resto de las poblaciones celulares precipitaron al fondo del tubo. Se recuperó la capa de monocitos con una pipeta Pasteur y se realizó un lavado con medio de cultivo RPMI completo. La mezcla se centrifugó a 350 *g* durante 10 minutos, obteniendo un *pellet* con los monocitos purificados. A continuación, los monocitos se incubaron durante 1.5 horas a 37°C en placas de Petri para cultivo celular eliminando las trazas del resto de poblaciones celulares. Seguidamente, los monocitos adheridos se recolectaron mediante rascado suave con Cell Scraper y 3 lavados de la placa de cultivo. Finalmente, se realizó el recuento celular mediante cámara de Neubauer.

Tras el aislamiento de los monocitos a partir de las PBMC, el procedimiento llevado a cabo para la inducción de inmunidad entrenada se detalla en la Figura 26.

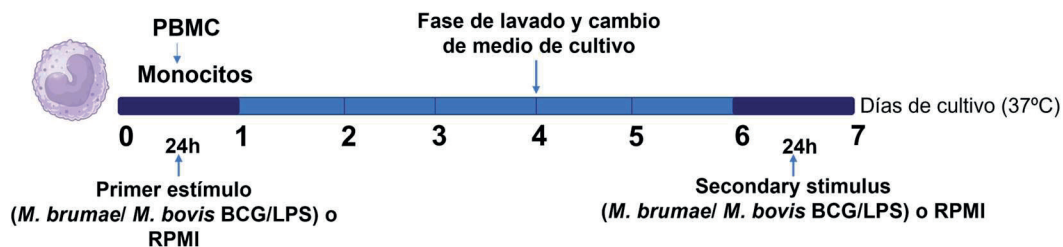


Figura 26. Procedimiento realizado en los experimentos de inducción de inmunidad entrenada *ex vivo* con monocitos humanos.

1.2.2 Siembra, estímulos, y recolección de SN de los monocitos humanos aislados

Los monocitos purificados se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con una concentración de 1×10^5 células/pocillo y se incubaron durante 1.5 horas a 37°C y una atmósfera húmeda del 5% CO₂, antes de realizar su estimulación.

La preparación de los estímulos de micobacteria (cepas de *M. brumae*, cepas de *M. bovis* BCG o *M. gastri*) y de LPS, se realizó siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 1.1.2.2. Las células se inocularon con los estímulos preparados de micobacterias, LPS o RPMI con FBS y sin antibióticos y, se incubaron durante 24h a 37°C y una atmósfera húmeda con el 5% CO₂. En los días 2 y 5 de experimento, tras retirar los sobrenadantes de los pocillos, se realizó un lavado con PBS y se renovó el medio de cultivo con RPMI con FBS y antibióticos. En el día 7 de experimento, se recogieron los sobrenadantes de los pocillos, se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos y se almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de glucosa y lactato.







Además, en este caso, las células se utilizaron con dos objetivos diferentes. Por un lado, se realizó el procesamiento de éstas como se indica en el apartado 1.6, para la posterior cuantificación de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9. Por otro lado, se continuó con el experimento de inmunidad entrenada, estimulando de nuevo las células con LPS. Para la preparación del inóculo de LPS y el reestímulo de las células, se llevó a cabo el mismo procedimiento que se detalla anteriormente. Tras 24 horas de reestimulación con LPS, se recogieron los sobrenadantes de cada condición para la posterior cuantificación de las citocinas implicadas en el proceso de inmunidad entrenada (IL-6, TNF- α e IL-1 β). Los sobrenadantes se procesaron y almacenaron como se ha indicado con anterioridad.

1.3 Ex vivo con monocitos de ratones derivados de PECs y esplenocitos

1.3.1 Obtención y cultivo de macrófagos derivados de PEC y de esplenocitos

Los macrófagos murinos derivados del exudado peritoneal (PEC, *Peritoneal Exudate Cells*) y los macrófagos murinos derivados de esplenocitos, se obtuvieron a partir de un modelo ortotópico de cáncer de vejiga, en el cual se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 (Charles River Laboratories, España) con una edad de entre 6 a 8 semanas. Los animales sanos y con tumor fueron sometidos a instilaciones intravesicales con micobacterias (*M. brumae* y *M. bovis* BCG Connaught) o PBS, realizando un tratamiento semanal durante 4 semanas consecutivas.

Tabla 8. Grupos de ratones incluidos en los experimentos para evaluar el impacto del tratamiento con *M. brumae* y *M. bovis* BCG en el entrenamiento de la respuesta inmune innata.

Grupo animal	Tumor	Tratamiento
 <i>M. brumae</i>	Sí	<i>M. brumae</i>
 <i>M. brumae</i>	No	<i>M. brumae</i>
 <i>M. bovis</i> BCG Connaught	Sí	<i>M. bovis</i> BCG Connaught
 <i>M. bovis</i> BCG Connaught	No	<i>M. bovis</i> BCG Connaught
 Tumor	Sí	PBS
 Sano	No	PBS

Los macrófagos murinos se utilizaron para el estudio de la activación y efecto inmunomodulador en el contexto de inmunidad entrenada del sistema inmune innato.

1.3.1.1 Recolección de PEC

Tras limpiar el abdomen del ratón con etanol al 70%, se realizó una escisión superficial con unas tijeras estériles y, con unas pinzas se retiró la piel del ratón, dejando expuesto el peritoneo. Seguidamente, con cuidado y usando una aguja de 25g de grosor, se introdujeron dentro de la cavidad peritoneal 5mL de PBS estéril con un 3% FBS. Se realizó un masaje vigoroso del abdomen del ratón y se recolectaron las PEC. Las células se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento. Las PEC fueron centrifugadas a 310g durante 5 minutos y 4°C, se resuspendieron en medio de cultivo completo RPMI y se realizó un recuento mediante cámara de Neubauer.

1.3.1.2 Recolección de macrófagos derivados de esplenocitos

El bazo de los ratones se procesó bajo condiciones de esterilidad para la obtención de los esplenocitos. Para ello se siguió el procedimiento descrito previamente en Noguera-Ortega *et al.*, (2028) [145]. Para el aislamiento de los macrófagos derivados de esplenocitos, las células obtenidas se incubaron en placas de Petri de cultivo celular durante 1.5 horas con medio completo RPMI sin antibióticos. A continuación, se descartó el sobrenadante junto con las células en suspensión, correspondientes a poblaciones celulares inmunes distintas de los macrófagos de interés. Finalmente, se recuperaron los macrófagos adheridos a la superficie de la placa de Petri mediante raspado suave con Cell Scraper y se realizó el recuento celular mediante cámara de Neubauer.

1.3.2 Siembra y estimulación de macrófagos murinos

Los macrófagos murinos obtenidos, se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Se incubaron durante 1.5 horas a 37°C y una atmósfera húmeda del 5% CO₂, antes de realizar su estimulación. La preparación de los estímulos de micobacteria (*M. brumae* cepa tipo y *M. bovis* BCG Connaught) y de LPS, se realizaron siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 1.1.2.2. Además, en la estimulación de los macrófagos derivados de esplenocitos, se realizó también un estímulo con antígenos celulares de la línea tumoral murina MB49. Para la obtención de estos antígenos se lisaron células MB49 (macrófagos: MB49, 20:1) con Tritón X-100 al 0.1% durante 15 minutos seguida de dos centrifugaciones consecutivas de 4000rpm y 14.000rpm, durante 10 minutos cada una a 4°C.

Las células se inocularon con los estímulos preparados de micobacterias, restos celulares de MB49, LPS, o RPMI con FBS y sin antibióticos y se incubaron durante 24h a 37°C en una atmósfera húmeda del 5% CO₂.

Después del periodo de incubación, se recogieron los sobrenadantes de los pocillos para la posterior cuantificación de las citocinas implicadas en el proceso. Los sobrenadantes se procesaron y almacenaron como se ha indicado con anterioridad. Adicionalmente, para cuantificar la estimulación derivada del contacto de los macrófagos murinos con los distintos inóculos, también se realizó un ensayo de MTT siguiendo el procedimiento detallado anteriormente.

1.4 Cuantificación de citocinas

Se realizó la cuantificación de los niveles de las citocinas más relevantes que están implicadas en el proceso de inmunidad entrenada, las cuales son IL-6, TNF- α y IL-1 β . Esta cuantificación se realizó tanto en las muestras obtenidas en los experimentos *in vitro* con la línea celular de monocitos humanos THP-1 sin diferenciar y diferenciados a macrófagos, como en los experimentos *ex vivo* con monocitos humanos de voluntarios sanos y macrófagos de origen murino (macrófagos derivados de PEC y derivados de esplenocitos). Para la cuantificación de citocinas se utilizaron kits comerciales de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.5 Cuantificación de parámetros metabólicos: glucosa y lactato

Se realizó la cuantificación de los niveles de glucosa y lactato tanto en las muestras obtenidas en los experimentos *in vitro* con la línea celular de monocitos humanos THP-1 sin diferenciar y diferenciados a macrófagos, como en los experimentos *ex vivo* con monocitos humanos. Para la cuantificación de citocinas se utilizaron los kits comerciales Glucose Colorimetric/Fluorometric Assay (Biovision Inc., Estados Unidos) y Lactate Colorimetric/Fluorometric Assay (Biovision Inc., Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ambos protocolos se utilizaron placas de 96 pocillos (Corning, Estados Unidos).

1.6 Cuantificación de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9

1.6.1 Procedimiento de extracción y análisis de la trimetilación de histonas a partir de monocitos/macrófagos humanos estimulados

Tras retirar el sobrenadante de los pocillos, se realizó la extracción total de las histonas de los monocitos humanos estimulados mediante el kit comercial EpiQuik™ Total Histone Extraction (Epigentek, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto obtenido se congeló inmediatamente a -80°C para su correcta conservación y almacenaje hasta la posterior cuantificación de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9. Para llevar a cabo dicha cuantificación, se utilizaron los kits comerciales EpiQuik™ Global Tri-Methyl Histone H3-K4 Colorimetric Quantification (Epigentek, Estados Unidos) y EpiQuik™ Global Tri-Methyl Histone H3-K9 Colorimetric Quantification (Epigentek, Estados Unidos), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Resultados

2.1 Estudio *in vitro* de la inducción de inmunidad entrenada en THP-1

Con el objetivo de evaluar la capacidad de inducir inmunidad entrenada de las diferentes cepas de *M. brumae* y de *M. bovis* BCG, se utilizó como modelo la línea celular de monocitos THP-1 como modelo *in vitro* de entrenamiento de la inmunidad. Para ello se analizó y comparó la inducción de las citocinas y los cambios metabólicos (producción de glucosa y lactato) que sufren las células tras la estimulación con las micobacterias. Para ambos grupos de micobacterias, se analizó la estimulación del sistema inmune innato de los monocitos sin diferenciar y en monocitos diferenciados a macrófagos.

2.1.1 Inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de *M. brumae*

En un primer estudio se comparó el efecto sobre el entrenamiento de los monocitos THP-1 de LPS y diferentes micobacterias: tres cepas de *M. brumae* (cepa de referencia CR-270, CR-142 y CR-103), dos cepas de *M. bovis* BCG (BCG Connaught y BCG Oncotice) y *M. gastri*. Se evaluó tanto en células diferenciadas como en células sin diferenciar. Para ello, se cuantificó la liberación de IL-6, TNF- α e IL-1 β por parte de las células THP-1, mientras que además se evaluó el cambio metabólico sufrido por las células tras la estimulación.

En el caso de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos (Figura 27. a), los resultados mostraron en todos los casos un incremento en la producción de citocinas en los cultivos estimulados respecto a los no estimulados. En la producción de IL-1b y IL-6 se observó un incremento de la producción cuando los macrófagos fueron estimulados con las micobacterias respecto a los macrófagos estimulados con LPS, pero el incremento no fue estadísticamente significativo. En el caso de la producción de TNF, únicamente *M. bovis* BCG Oncotice y *M. gastri* supero los niveles inducidos por la estimulación con LPS, aunque tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la inducción de la producción de las citocinas por las diferentes cepas de micobacterias.

Respecto a los cambios metabólicos en los macrófagos THP-1 estimulados, se pudo comprobar una disminución de la concentración de glucosa por todas las condiciones a estudio, respecto a las células sin estimular. Además, respecto a la concentración obtenida en las células estimuladas con LPS, se mostró una disminución de los niveles de glucosa para todas las micobacterias, excepto para *M. bovis* BCG Connaught y, muy similar para la cepa de referencia de *M. brumae*. Las micobacterias en las que se obtuvo una menor producción de glucosa fueron *M. gastri*, seguido de *M. bovis* BCG Oncotice y las cepas CR-142 y CR-103 de

M. brumae. Relacionando la cuantificación de glucosa con la síntesis y liberación de lactato, producidos por las células THP-1 estimuladas, se observó un aumento estadísticamente significativo en la producción de lactato por parte de los macrófagos estimulados con las tres cepas de *M. brumae* respecto a las células sin estimular, siendo superior para la cepa CR-142. Los niveles de lactato obtenidos con la estimulación con *M. brumae* fueron similares a los obtenidos en los macrófagos estimulados con *M. gastri* y LPS.

En el caso de estimular las células Thp-1 sin diferenciar con PMA, los resultados mostraron que la mayor producción de las tres citocinas se producía cuando las células se estimularon con cualquiera de las tres cepas de *M. brumae* (Figura 27. b), siendo la cepa CR-103 la que mostró inducir una concentración mayor de TNF- α e IL-1 β . Las dos cepas de *M. bovis* y *M. gastri* presentaron una inducción de citocinas de un orden de magnitud inferior respecto a de *M. brumae*, aunque destacó la mayor inducción de la producción de IL-6 y TNF- α para *M. bovis* BCG Oncotice. Todas las micobacterias mostraron niveles de citocinas superiores a LPS, con diferencias significativas para las tres cepas de *M. brumae*. Cabe resaltar la alta producción de TNF- α que mostraron los monocitos sin estimular, tras su re-estimulación con LPS, consiguiendo niveles similares a los monocitos que habían sido estimulados y re-estimulados por LPS en ambos pasos.

En cuanto al metabolismo celular, se observó una disminución de la síntesis y liberación de glucosa y un aumento de los niveles de lactato, para todas las micobacterias excepto para *M. gastri*, cuando se compararon con las células estimuladas con LPS. En la producción de lactato, destacó la cepa de referencia de *M. brumae*, así como *M. bovis* BCG Connaught, ambas con diferencias estadísticamente significativas respecto a la estimulación con LPS; seguidos de las cepas CR-142 y CR-103 de *M. brumae*.

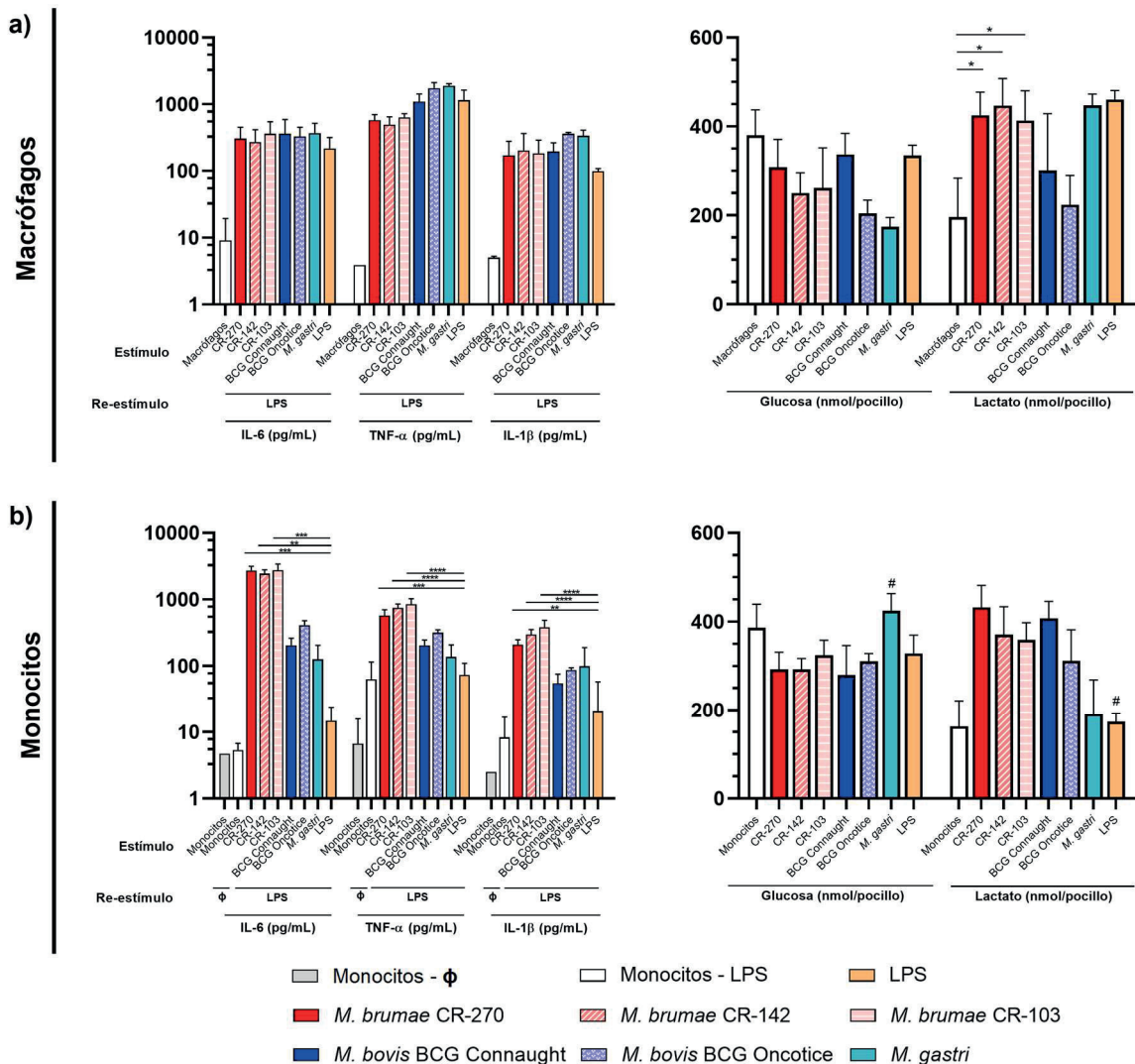


Figura 27. Estudio de la inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de *M. brumae* en monocitos THP-1 *in vitro*. Las células fueron estimuladas con tres cepas de *M. brumae* (CR-270, CR-142 y CR-103), dos cepas de *M. bovis* BCG (Connaught y Oncotice), *M. gastri*, LPS o sin estimular. Para todas las condiciones, las células se re-estimularon con el agente inespecífico LPS. Las citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β se cuantificaron en los sobrenadantes recogidos después de 24 horas de re-estimulación. Los niveles de glucosa y lactato se cuantificaron en los sobrenadantes obtenidos antes de realizar la re-estimulación. a) Cuantificación de citocinas y parámetros metabólicos en Thp-1 diferenciadas a macrófagos mediante PMA. b) Cuantificación de citocinas y parámetros metabólicos en monocitos THP-1. Los datos se representan como la media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.1.2 Inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de *M. bovis* BCG

Se realizó un estudio en el que se comparó la capacidad de inducir inmunidad entrenada entre las diferentes cepas de *M. bovis* BCG: Connaught, Glaxo, Japan, Moreau, Pasteur, Phipps, Russian y Tice, utilizando como modelo los monocitos THP-1. De la misma forma que en el estudio anterior con *M. brumae*, se comparó el efecto tanto en monocitos THP-1 como en macrófagos cuantificándose los niveles de IL-6, TNF- α , IL-1 β , glucosa y lactato.

Los resultados permitieron observar una tendencia similar a los resultados obtenidos utilizando las diferentes cepas de *M. brumae* como estímulo. Mientras que las diferentes cepas de *M. bovis* BCG indujeron niveles de citocinas similares entre ellas y similares a los inducidos por LPS cuando se diferenciaron los monocitos con PMA a macrófagos; los niveles de citocinas producidos inducidos por la estimulación de las diferentes cepas de *M. bovis* BCG fueron estadísticamente superiores a los inducidos por LPS o a los monocitos sin estimular.

Específicamente, se demostró que con la diferenciación a macrófagos con el uso de PMA, la concentración de IL-6 fue inferior en la estimulación de los monocitos con LPS, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa respecto al resto de condiciones. Para esta citocina, se obtuvieron concentraciones similares para los monocitos sin infectar que cuando se estimularon con las diferentes cepas de *M. bovis* BCG. En cuanto a los niveles de TNF- α , no se observaron diferencias entre las condiciones de estudio. Finalmente, en la comparación de la producción de IL-1 β , se observó una liberación significativamente superior en todas las condiciones respecto a las células sin estimular, aunque la producción cuando se usó LPS como estímulo fue mayor que con las cepas de *M. bovis* BCG Glaxo, Moreau, Phipps y Tice. *M. bovis* BCG Pasteur y Connaught indujeron niveles de IL-1 β similares y superiores a LPS, respectivamente (Figura 28. A).

Analizando los cambios metabólicos celulares, no se demostró ni una disminución de glucosa ni un aumento de lactato significativos, de ninguna de las cepas testadas, respecto a las células activadas con LPS o los monocitos no estimulados. Sin embargo, la cepa con un perfil metabólico ligeramente más glucolítico fue Moreau, seguida por Connaught y Pasteur. En los experimentos en los que no se diferenció la línea celular THP-1, se obtuvo un comportamiento similar a los mismos experimentos llevados a cabo con *M. brumae*. Las células estimuladas con las diferentes cepas de *M. bovis* BCG indujeron una mayor producción de las tres citocinas respecto a las condiciones de control o de estimulación con LPS. Fueron significativamente superiores los niveles de IL-6 para las cepas BCG Phipps, Japan, Moreau y Tice; mientras que para TNF- α , las cepas Phipps, Connaught y Russian fueron las que destacaron por inducir una mayor concentración con respecto a las células estimuladas con LPS o sin estimular. Además, se mostraron niveles significativamente superiores de IL-1 β para todas las cepas de *M. bovis* BCG excepto con Glaxo y Pasteur, destacando las cepas Phipps y

Connaught como las micobacterias más inductoras de IL-1 β respecto los monocitos tratados con LPS o sin tratar (Figura 28. B).

Finalmente, en el análisis metabólico, se demostró un aumento glucolítico de todas las cepas, excepto de las células estimuladas con *M. bovis* BCG Pasteur. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas, se observó un nivel menor en la liberación de glucosa en las células estimuladas con las cepas *M. bovis* BCG Russian y Tice, respecto a las células sin estimular o estimuladas con LPS. Paralelamente, *M. bovis* BCG Pasteur mostró una síntesis inferior de lactato, incluso menor a la concentración obtenida para las células activadas con LPS. Por otro lado, las cepas que indujeron un nivel mayor de lactato fueron *M. bovis* BCG Connaught, Moreau y Japan, seguidas de BCG Phipps, sin embargo, en ningún caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

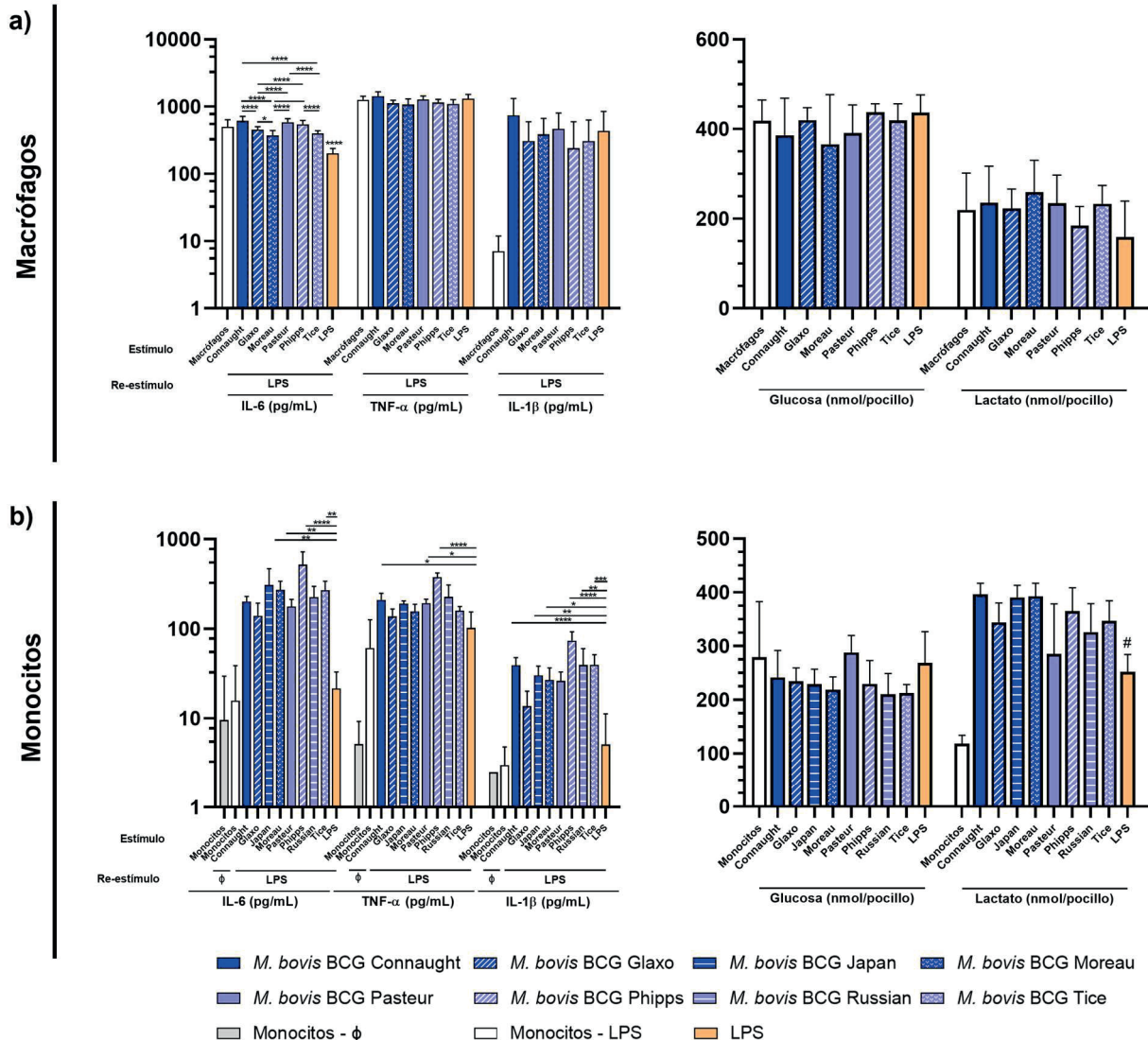


Figura 28. Estudio de la inmunidad entrenada inducida por diferentes cepas de *M. bovis* BCG en monocitos THP-1 *in vitro*. Las células fueron estimuladas con ocho cepas de *M. bovis* BCG (Connaught, Glaxo, Japan, Moreau, Pasteur, Phipps, Russian y Tice), LPS o sin estimular. Para todas las diferentes condiciones, las células se re-estimularon con el agente inespecífico LPS. Las citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β se cuantificaron en los sobrenadantes recogidos después de 24 horas de re-estimulación. Los niveles de glucosa y lactato se cuantificaron en los sobrenadantes obtenidos antes de realizar la re-estimulación. A) Cuantificación de citocinas y parámetros metabólicos cuando las células THP-1 fueron previamente diferenciadas a macrófagos mediante PMA. B) Cuantificación de citocinas y parámetros metabólicos sin diferenciación previa con PMA de las células THP-1. Los datos se representan como la media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.2 Inducción *ex vivo* de inmunidad entrenada por diferentes cepas de *M. brumae* en monocitos humanos

En el estudio *ex vivo* de la modulación inmune inducida por diferentes cepas de *M. brumae*, *M. bovis* BCG y *M. gastri*, se aislaron monocitos de voluntarios sanos y se estimularon con las micobacterias. Tras el re-estimulo celular con LPS como agente inespecífico, se analizó la producción de las citocinas implicadas en el proceso de entrenamiento del sistema inmune innato, así como del cambio metabólico y epigenético que sufrieron durante el proceso.

2.2.1 Liberación de citocinas e impacto sobre el metabolismo en la inducción de inmunidad entrenada en monocitos humanos

Se evaluó la liberación de IL-6, TNF- α e IL-1 β por parte de los monocitos derivados de PBMC estimulados con las diferentes micobacterias y con LPS, obteniendo resultados favorables para la mayor parte de las cepas a estudio en los niveles de las tres citocinas. Como se muestra en la Figura 29. a, se obtuvieron concentraciones significativamente mayores en todos los monocitos estimulados respecto de las células sin estimular, para todas las citocinas. Además, se demostró una liberación de citocinas de un orden de magnitud mayor cuando los monocitos fueron activados con cualquiera de las micobacterias respecto al LPS, aunque fue en el caso de la producción de TNF- α donde se obtuvieron diferencias estadísticas entre la estimulación con LPS y las cepas de *M. brumae* o la cepa de *M. bovis* BCG Connaught.

Al comparar el impacto sobre la modulación del sistema inmune innato de las diferentes micobacterias, se puede destacar el papel de la cepa CR-103 de *M. brumae*, siendo la micobacteria que indujo una producción ligeramente superior al resto de la inducida por el resto de las cepas de las tres citocinas. Por otro lado, entre las dos cepas de *M. bovis* BCG, se pudo apreciar una mayor inducción por parte de la cepa BCG Connaught, aunque la diferencia no fue significativa entre BCG Connaught y el resto de las micobacterias. Destacó que *M. gastri* indujo un nivel de producción de IL-6 y TNF- α superior al inducido por la cepa de *M. brumae* de referencia y la cepa CR-142 y, similar a *M. bovis* BCG Connaught.

Se pudo observar un cambio metabólico con un aumento de la glucólisis por parte de los monocitos, como resultado de la estimulación con *M. bovis* BCG Connaught y BCG Oncotice o la cepa de referencia de *M. brumae*. Se observó un descenso en la producción de glucosa y un aumento en la síntesis de lactato por las células activadas con estas tres micobacterias, siendo más significativo el efecto inducido por *M. bovis* BCG Connaught. Como indicador del proceso de glucólisis inducido se observaron diferencias significativas en los niveles de lactato producidos por las células estimuladas con LPS y los producidos por las células estimuladas con cuatro de las micobacterias. Se obtuvieron niveles superiores de lactato para *M. bovis*

BCG Connaught, la cepa de referencia de *M. brumae*, *M. bovis* BCG Oncotice y la cepa CR-103 de *M. brumae*, respectivamente.

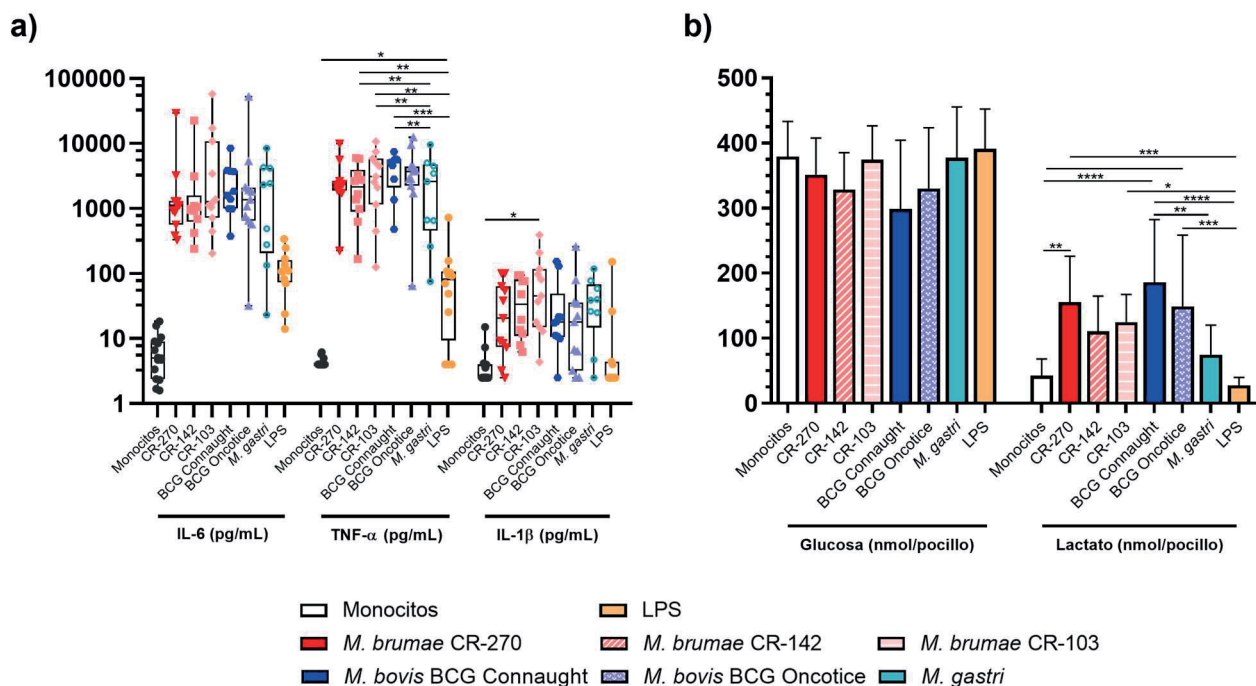


Figura 29. Estudio ex vivo de entrenamiento de la inmunidad innata de monocitos humanos inducido por diferentes cepas de *M. brumae*, *M. bovis* BCG y *M. gastri*. Las células fueron estimuladas con tres cepas de *M. brumae* (CR-270, CR-142 y CR-103), dos cepas de *M. bovis* BCG (Connaught y Oncotice), *M. gastri*, LPS o se dejaron sin estimular. Tras una semana del primer estímulo, las células se re-estimularon con LPS. A) Cuantificación de IL-6, TNF-α e IL-1β mediante ELISA en los sobrenadantes recogidos después de 24 horas de re-estimulación. B) Cuantificación de los niveles de glucosa y lactato en los sobrenadantes obtenidos antes de realizar la re-estimulación. Cada punto representa un individuo. Los datos se representan como la media ± SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.2.2 Histonas

En el análisis de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9 de los monocitos estimulados con la cepa de referencia de *M. brumae*, *M. bovis* BCG Connaught o LPS (Figura 30), se observó un aumento en los niveles de trimetilación de la histona H3K4 cuando las células se estimularon *ex vivo* con *M. brumae* o con *M. bovis* BCG. Sin embargo, solo se obtuvieron diferencias significativas en la inducción producida por *M. bovis* BCG respecto a las células estimuladas con LPS o sin estimular.

Por otra parte, no se obtuvieron niveles altos de trimetilación de la histona H3K9 para ninguna de las condiciones a estudio, presentando todas ellas menos de 5ng/μL.

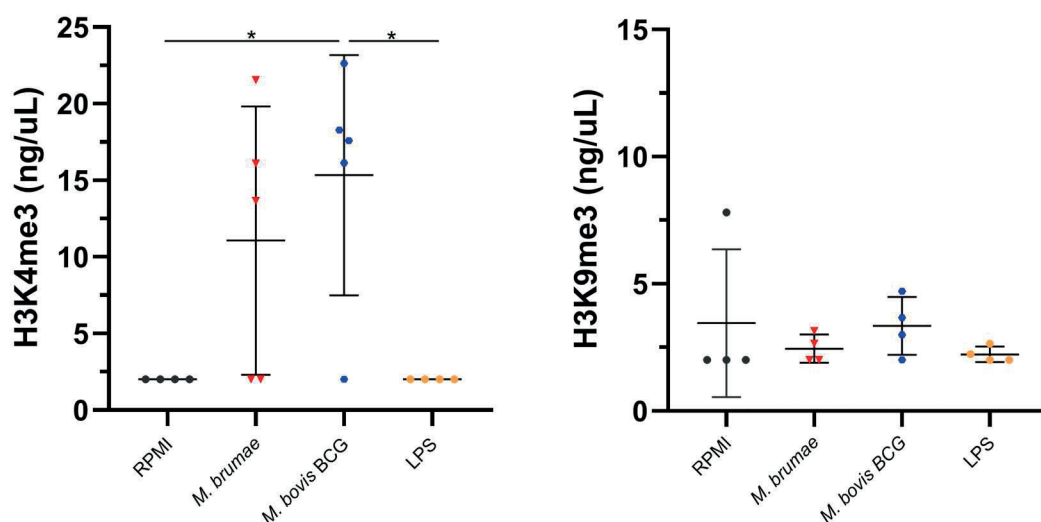


Figura 30. Estudio *ex vivo* de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9 en macrófagos humanos. Las células fueron estimuladas con la cepa de referencia de *M. brumae*, con *M. bovis* BCG Connaught, LPS o se dejaron sin estimular, posteriormente se analizó la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9 tras la extracción total del contenido celular de histonas. Cada punto representa un individuo. Los datos se representan como la media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA test).

2.3 Inducción *ex vivo* de inmunidad entrenada por parte de *M. brumae* y *M. bovis* BCG en macrófagos murinos

Para conocer el impacto de *M. brumae* y *M. bovis* BCG sobre la inmunidad inespecífica en el contexto del cáncer vesical, se utilizó un modelo ortotópico murino de cáncer de vejiga. Los animales sanos y con tumor fueron tratados mediante instilaciones vesicales semanales con estas micobacterias o con PBS durante cuatro semanas (Figura 31) y, tras la finalización del tratamiento, se aislaron y re-estimularon *ex vivo* los macrófagos derivados del exudado peritoneal y los macrófagos derivados de esplenocitos. Finalmente, se analizó la producción de IL-6, TNF- α e IL-1 β , citocinas implicadas en el proceso de entrenamiento del sistema inmune innato.

2.3.1 Estudio *ex vivo* de la inducción de inmunidad entrenada en macrófagos murinos derivados de PEC

Los macrófagos derivados de PEC se aislaron y re-estimularon *ex vivo* con la misma micobacteria con la que había sido tratado el animal del que procedían, con LPS o se dejaron sin re-estimular. Los ratones sanos y con tumor que no fueron tratados con ninguna de las micobacterias, se re-estimularon tanto con *M. brumae* como con *M. bovis* BCG para poder cuantificar el efecto de ambas micobacterias en estas condiciones.

En el análisis de citocinas, no se observó diferencias significativas en la inducción de IL-6 e IL-1 β entre los diferentes grupos de ratones con y sin tumor, ni entre los diferentes tratamientos recibidos. Para las tres citocinas evaluadas, se apreció un aumento en la liberación de las células re-estimuladas con las micobacterias o con LPS, respecto a las células sin re-estimular. En aquellos ratones tratados con *M. brumae*, la inducción de IL-6 fue mayor cuando las células se re-estimularon con la misma micobacteria respecto al estímulo inespecífico con LPS. Sin embargo, en los ratones tratados con BCG, la inducción mayor de IL-6 se produjo cuando se re-estimuló con LPS. En los animales sanos, destacó la mayor producción de IL-6 generada por *M. brumae* respecto a la de *M. bovis* BCG, siendo ambas ligeramente inferiores a las producidas por LPS. Se demostró una inducción de TNF- α era significativa cuando se re-estimularon con *M. bovis* BCG las PEC de los animales con tumor tratados con la misma micobacteria, respecto a los re-estimulados inespecíficamente con LPS o, los no estimulados *ex vivo*. La misma tendencia mostraron las células que provenían de animales con tumor que no recibieron tratamiento, al ser re-estimuladas con *M. bovis* BCG. En los grupos de ratones tratados con *M. brumae* el re-estímulo con la misma micobacteria indujo niveles de TNF- α similares a los inducidos por LPS. Para los diferentes grupos de estudio (animales con o sin tumor) no se obtuvieron diferencias significativas entre la producción de citocinas después de haber estimulado con cualquiera de ambas micobacterias.

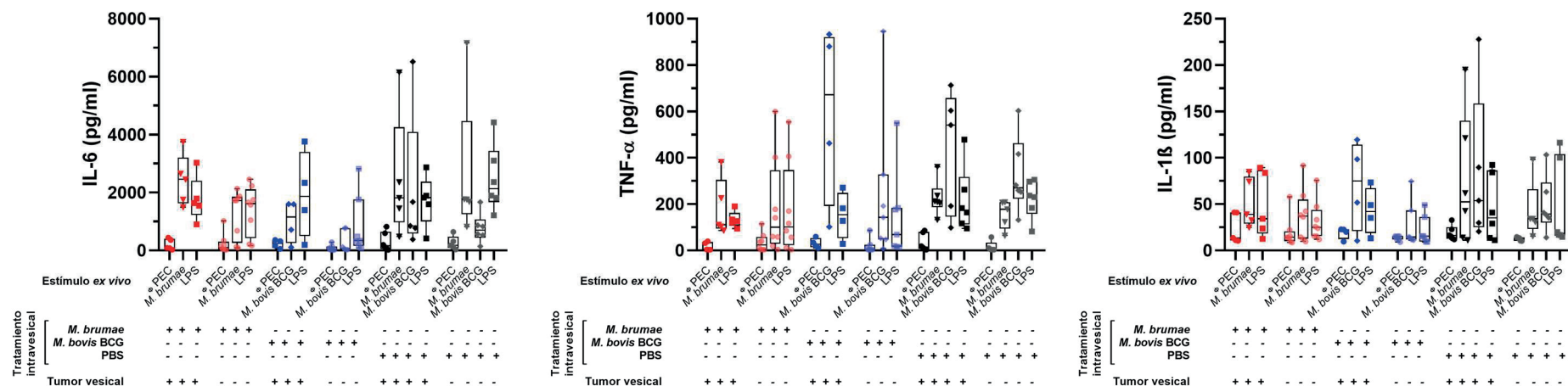


Figura 31. Estudio *ex vivo* de entrenamiento de la inmunidad innata de macrófagos derivados de células del exudado peritoneal (PEC), inducido por *M. brumae*, *M. bovis* BCG y LPS. Cuantificación de IL-6, TNF-α y IL-1β en los sobrenadantes recogidos después de 24 horas de re-estimulación. Las células fueron re-estimuladas *ex vivo* con la cepa de referencia de *M. brumae*, *M. bovis* BCG Connaught, LPS o sin estimular. “+” y “-”, indican la presencia o no del estímulo, del tratamiento intravesical realizado y/o de la presencia de tumor en la vejiga. Cada punto representa un animal. Los datos se representan como la media ± SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA test).

2.3.2 Estudio *ex vivo* de la inducción de inmunidad entrenada en macrófagos murinos derivados de esplenocitos

Los macrófagos derivados de esplenocitos (SPL) se aislaron y re-estimularon *ex vivo* con la misma micobacteria con la que había sido tratado el animal del que procedían, antígenos de células MB-49, LPS o se dejaron sin estimular. Los ratones sanos y con tumor que no fueron tratados con ninguna de las micobacterias, se re-estimularon tanto con *M. brumae* como con *M. bovis* BCG para poder cuantificar el efecto de ambas micobacterias en estas condiciones.

Se obtuvieron niveles mínimos de producción de IL-1 β para todas las condiciones de re-estimulación y en todos los grupos de animales evaluados. Destacaron los niveles de IL-6 liberados por la estimulación con LPS de las células que provenían de animales sanos y con tumor que habían recibido tratamiento con *M. bovis* BCG. Por otro lado, en los animales tanto sanos como con tumor que no habían sido tratados intravesicalmente con micobacterias, se observó una liberación ligeramente superior cuando las células se re-estimularon con *M. bovis* BCG y con el agente inespecífico LPS, respecto al resto de estímulos, aunque en ninguno de los casos se obtuvieron diferencias estadísticas. Finalmente, al analizar la inducción de TNF- α , se demostró una liberación de esta citocina cuando las células se re-estimularon con micobacterias o con LPS, independientemente del grupo de animales evaluado. Para los animales sanos tratados con *M. brumae*, así como en los sanos y con tumor tratados intravesicalmente con *M. bovis* BCG, se obtuvo una concentración superior de TNF- α cuando se re-estimularon con la misma micobacteria respecto al estímulo con LPS. Sin embargo, en los animales con tumor que no recibieron tratamiento intravesical, los niveles que se obtuvieron de esta citocina proinflamatoria fue muy similar cuando las células se estimularon con micobacterias o con LPS, mientras que la señal fue mayor en el re-estímulo con LPS cuando se evaluaron los animales sanos. En ninguno de los casos, se obtuvieron diferencias significativas entre las condiciones ni entre los grupos anteriormente expuestos. Se observaron diferencias estadísticas para TNF- α entre las condiciones de los grupos de animales sanos y con tumor que fueron tratados con *M. bovis* BCG, destacando en ambos grupos, los niveles superiores producidos por *M. bovis* BCG respecto a las células sin re-estimular o estimuladas con los antígenos de las células tumorales MB-49 (Figura 32).

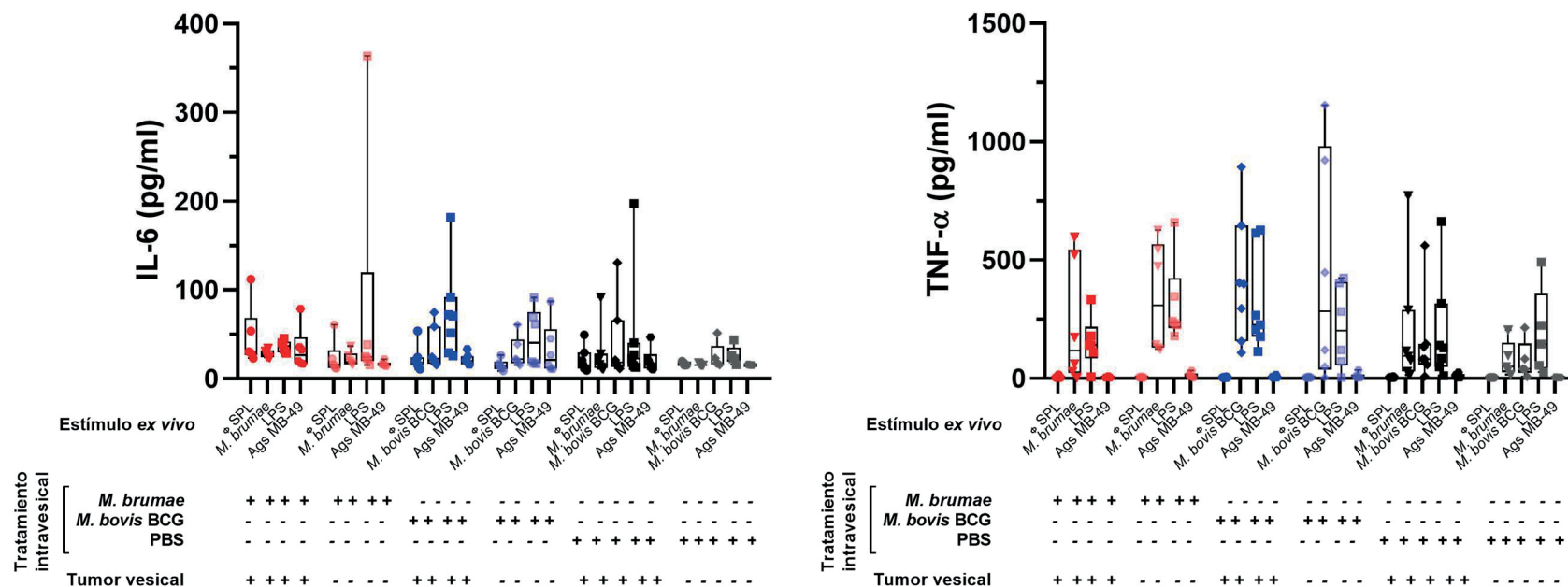


Figura 32. Estudio *ex vivo* de entrenamiento de la inmunidad innata de macrófagos derivados de esplenocitos, inducido por *M. brumae* y *M. bovis* BCG. Cuantificación de IL-6 y TNF- α mediante ELISA, en los sobrenadantes recogidos después de 24 horas de re-estimulación. Las células fueron re-estimuladas *ex vivo* con la cepa de referencia de *M. brumae*, *M. bovis* BCG Connaught, LPS o sin estimular. “+”, indica el tipo de tratamiento intravesical realizado y/o presencia de tumor en la vejiga; “-”, indica el tipo de tratamiento intravesical no realizado y/o ausencia de tumor en la vejiga. Cada punto representa un animal. Los datos se representan como la media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (ANOVA test).

DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Caracterización de diferentes cepas de *M. brumae* a nivel genómico, fenotípico y funcional

Caracterización genómica y fenotípica de *M. brumae*

A pesar de los numerosos estudios con *M. bovis* BCG, el tratamiento usado en los últimos 40 años para el CVNMI, y las recientes investigaciones con *M. brumae*, demostrando el nivel de patogenicidad y capacidad inmunomoduladora, se desconocen qué diferencias genómicas podrían ser las responsables de las diferentes propiedades biológicas de estas dos micobacterias. El antígeno o antígenos responsables del efecto antitumoral de *M. bovis* BCG o de *M. brumae* siguen siendo esquivos. Por lo tanto, es relevante analizar el genoma de *M. brumae*, y compararlo con el de *M. bovis* BCG para entender sus capacidades terapéuticas. Por otro lado, también es de interés la comparación de la variabilidad intraespecie de *M. brumae* comparando la diversidad genética entre diferentes aislamientos de la misma especie.

Como parte de la caracterización de las cepas de *M. brumae*, se realizó el ensamblaje y comparación del genoma de la cepa de referencia de *M. brumae* con *M. bovis* BCG Connaught y *M. tuberculosis*, para analizar las peculiaridades de esta especie descritas anteriormente [90,145–147]: su no patogenicidad y su alta capacidad inmunoestimuladora. En la comparación genómica también se incluyó *M. fallax*. *M. fallax* comparte características fenotípicas con *M. brumae* y filogenéticamente había resultado ser la especie más cercana a *M. brumae* [86,88], gracias a los análisis previos basados en las secuencias de RNAr 16S [87].

En primer lugar, los resultados indican que la posición filogenética de *M. brumae* es congruente con las características microbiológicas observadas como micobacteria no patógena de crecimiento rápido. La reconstrucción filogenética basada en el genoma ensamblado confirma la posición de *M. brumae* dentro de *Mycobacteriaceae* y reafirma su estrecha cercanía a *M. fallax*. El análisis también confirmó el pequeño tamaño del genoma de *M. brumae*, coincidiendo con el *draft* del genoma obtenido anteriormente, el cual presentaba una longitud de 4.026.006 pb y una proporción media de GC del 69.1 % [148]. Aunque se acepta que el tamaño del genoma de las micobacterias no patógenas es superior que el de las micobacterias oportunistas y patógenas obligadas [149,150], el tamaño del genoma de *M. brumae* es pequeño y similar al de *M. tuberculosis*. De hecho, el genoma de *M. brumae* se encuentra entre los genomas más pequeños de las micobacterias descritas hasta ahora, después del de *Mycobacterium uberis* [151], *Mycobacterium lepromatosis* [152] y

Mycobacterium leprae [149,153]. El porcentaje de contenido de GC en el genoma de *M. brumae* coincide en el rango del de otros genomas de micobacterias de crecimiento rápido (entre 66 y 69%) y es superior al de las micobacterias de crecimiento lento. Entre las micobacterias de crecimiento rápido, solo el grupo *M. chelonae*-*M. abscessus* contiene un porcentaje menor de contenido de GC, siendo entre 63.9 y 64.1% [154].

En el análisis de la virulencia de las micobacterias es relevante el estudio del sistema de secreción Tipo VII (ESX1-5), las proteínas de la familia PE/PPE y proteínas Mce. Por un lado, el sistema de secreción VII está especializado en la secreción de varios sustratos proteicos a través de la compleja pared celular micobacteriana, y está compuesto por diversas familias de proteínas: ESX [155]. *M. tuberculosis* y algunas micobacterias no patógenas como *Mycobacterium paragordoniae* (Kim et al., 2019) albergan cinco grupos de ESX, mientras que otras como *M. smegmatis*, *Mycobacterium flavescens*, *M. phlei*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium vaccae* o *Mycobacterium gordonae* solo contienen tres grupos de ESX [155,156]. Al igual que *M. abscessus* y *Mycobacterium massiliense* [156], el genoma de *M. brumae* presenta únicamente los grupos ESX-3 y ESX-4. El sistema ESX-1 se ha relacionado con la virulencia de la micobacteria, por lo que su delección genera la atenuación de las micobacterias patógenas como ocurre con *M. bovis* BCG [157,158]. Sin embargo, los genes de sistemas ESX están presentes en todas las micobacterias del género, incluso en las no patógenas de crecimiento rápido [156]. Esto sugiere que la virulencia no es la función principal de este grupo de genes, y que la relación con la virulencia de ESX-1 se debe a la evolución más reciente en organismos patógenos.

Por otro lado, las proteínas de la familia PE/PPE representan aproximadamente el 10 % del genoma de *M. tuberculosis*, quien las expresa tras la infección de macrófagos, desempeñando funciones críticas en la virulencia, la diversidad antigénica y la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped [159,160]. En el caso de *M. brumae*, se anotaron muy pocos genes de la familia PE/PPE en su genoma, de forma análoga a *M. fallax*, siendo su identidad de secuencia muy baja respecto a los de *M. tuberculosis*. El bajo número de estos genes en *M. brumae* y *M. fallax* se atribuye a la mayor abundancia de estos genes en micobacterias de crecimiento lento y no en micobacterias de crecimiento rápido [161,162].

Las proteínas Mce son transportadores de lípidos/esteroles [163] que desempeñan un papel importante en la modulación de la señalización de la célula huésped [164] y que están implicadas en la entrada y supervivencia intracelular de las micobacterias en los macrófagos [164,165]. Solo se detectaron tres grupos de genes *mce* en el genoma de *M. brumae*, mostrando una similitud de secuencia muy baja con los genes *mce* de *M. tuberculosis*. En actinomicetos, el número de operones *mce* presentes en el genoma se ha relacionado con su patogenicidad. En este sentido, destacan los siete operones *mce* (*mce1-7*) de *M. abscessus*, los cuatro de *M. smegmatis* [166], los seis de *Nocardia farcinica* o el único operon *mce* que presentan *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces coelicolor* [167]. En un estudio reciente,

Bachmann *et al.* [29] encontraron que el operón *mce1* es muy variable en los cinco subgéneros de micobacterias. Este estudio indica una muy baja similitud de secuencia de las proteínas codificadas por los genes *mce1* entre *M. tuberculosis* y *M. brumae*, confirmando los resultados obtenidos en esta tesis.

Aunque no se han descrito marcadores genéticos o fenotípicos que se correlacionen con la virulencia de micobacterias no tuberculosas (MNT)[168], la ausencia de genes de virulencia, como ESX-1, y la mayoría de los PE/PPE pueden explicar la seguridad y no toxicidad de *M. brumae* demostrada previamente tanto en estudios *in vitro* como en modelos *in vivo* [35,90,147,169]. Para *M. brumae*, como la mayoría de las más de 190 especies de micobacterias descritas, no se han descrito casos de infección en humanos y animales. Por otro lado, en algunas micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis*, la región cromosómica del sistema de secreción ESX-1 está implicada en un mecanismo de conjugación único que permite a las micobacterias saprófitas cambiar de nicho y presentar un carácter de patógeno oportunista [170,171], por lo que la ausencia en *M. brumae* es interesante para su perfil de seguridad.

En cuanto a la información en el genoma relativa a la resistencia a antimicrobianos, estudios previos muestran que la resistencia a los principales fármacos antituberculosos en las MNT se debe a mutaciones específicas en genes que codifican para su diana, las enzimas que los activan o sus regiones promotoras [172,173]. La resistencia a la rifampicina en *M. tuberculosis* se debe principalmente a mutaciones en el gen *rpoB*. También se han descrito mutaciones similares para *M. leprae* y en algunas especies de MNT como *Mycobacterium kansasii*, *M. smegmatis*, *M. avium* complex y *Mycobacterium ulcerans* [172,174,175]. *M. brumae* carece de mutaciones puntuales dentro de la región determinante de resistencia a rifampicina del gen *rpoB*, pero presenta mutaciones en áreas adyacentes de la región. De manera similar, en algunos aislamientos resistentes de *M. avium*, no se encontraron mutaciones internas en *rpoB* sino en una región *downstream*. Este hecho, junto con la composición de la pared celular de las micobacterias [174,176], podría explicar la resistencia a la rifampicina observada en *M. brumae*. En cuanto a la resistencia a la isoniazida, a menudo asociada a una pérdida de actividad de la catalasa-peroxidasa, se han descrito mutaciones puntuales en la secuencia del gen *katG* (responsable de la activación del fármaco) en *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* o *M. kansasii* [172,174,177]. Además, se ha descrito resistencia a isoniazida en *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* por sobreexpresión o mutación del gen estructural *inhA* o su promotor, que están implicados en la síntesis de la pared bacteriana [172,174,178]. Las cepas de *M. brumae* carecen de mutaciones puntuales en las posiciones más relevantes descritas para la isoniazida. La baja permeabilidad de la pared celular de las micobacterias y los diferentes sistemas de bombas de eflujo o canales de porina también podrían desempeñar un papel crucial en la resistencia intrínseca a los antimicrobianos en MNT como *M. fortuitum* o *M. smegmatis* [173,175] y podría explicar la resistencia intrínseca a la isoniazida encontrada en *M. brumae*. Finalmente, al igual que *M. fortuitum* y *M. avium* complex [179], *M. brumae*

también es resistente al ácido p-aminosalicílico, aunque no se han identificado específicamente las mutaciones responsables de la resistencia [180].

Aparte del interés en la descripción de la no virulencia de *M. brumae* a través de su genoma, es crítico el análisis de su capacidad inmunogénica. El análisis comparativo de genes que codifican para proteínas inmunogénicas que contienen epítomos de células T y células B destaca que *M. brumae* comparte hasta 85 con de los 441 descritos en la bibliografía, mientras que con *M. tuberculosis* solo comparte 2, con *M. bovis* comparte 83 de estos 85 (Figura 15), lo que explicaría su capacidad demostrada en varios estudios preclínicos de desencadenar una respuesta inmunitaria similar a la de *M. bovis* BCG en CVNMI. *M. brumae* podría contener otros epítomos inmunogénicos no descritos en *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG, por lo que encontrarlos proporcionaría un conocimiento más robusto del perfil inmunogénico de *M. brumae*, además de ahondar en la función de los que comparte con *M. bovis* BCG.

La composición tan compleja de la pared celular de las micobacterias es otra fuente de moléculas inmunogénicas. Los genes de biosíntesis de la pared celular que se encuentran en el genoma de *M. brumae* se correlacionan con la composición de la pared celular descrita para esta especie [181]. El sello distintivo de las micobacterias es la abundancia única de lípidos y glicolípidos en su pared celular [182][183], incluyendo los ácidos micólicos, los cuales están relacionados con la interacción huésped-micobacteria y son marcadores taxonómicos útiles en la identificación de micobacterias. *M. brumae* es una de las pocas especies que solo contiene ácidos micólicos de tipo I o α -micólicos [86]. Como la mayoría de las especies de micobacterias, *M. brumae* contiene TMM, TDM, PIM y PL [181]. Sin embargo, los glicopeptidolípidos (GPL) o lipooligosacáridos (LOS), presentes en otras MNT, están ausentes en *M. brumae*. A diferencia de *M. bovis* BCG, *M. brumae* no contiene lípidos relacionados con la virulencia como el altamente hidrofóbico PDIM o PGL, y tampoco contiene sulfolípidos (SL) ni diacyl—y polyacyl-trehalosas (DAT, PAT) presentes en la pared celular de *M. tuberculosis* [183,184].

Además de la cepa de referencia de *M. brumae* (ATCC 51384^T inicialmente denominada CR-270), se encuentran disponibles otras tres cepas de *M. brumae*: las cepas CR-142 y CR-103 aisladas de muestras de agua procedentes del río Llobregat en España entre 1983 y 1987, y la cepa CR-269 aislada de muestras de suelo entre 1989 y 1991 [86]. A pesar de provenir de fuentes ambientales diferentes y haber sido aisladas en diferentes periodos de tiempo, las cuatro cepas mostraron una gran similitud genómica y fenotipos *in vitro* similares. Fenotípicamente, mostraron la misma morfología colonial cuando se cultivaron en medios sólidos (figura 9), un patrón similar de lípidos y glicolípidos en la pared celular y el mismo patrón de susceptibilidad a una amplia gama de antimicrobianos (tabla 4). A nivel genómico, mostraron un máximo de seis SNP y siete regiones de diferencia, que es una diversidad genómica muy baja entre diferentes cepas ambientales. Otras micobacterias, como *M.*

abscessus, también han mostrado una diversidad genética muy baja entre sus cepas. En *M. abscessus* se ha propuesto como explicación más probable de la baja diversidad genética, una menor tasa de mutación debido a diferencias en el mecanismo de reparación. En resumen, el análisis de diversidad de *M. brumae* demostró que, aunque el origen de sus cepas es variado, *M. brumae* es genéticamente menos diversa de lo esperado. Su composición genética revela que *M. brumae* comparte numerosos genes relacionados con la inmunogenicidad de esta micobacteria con *M. bovis* BCG, teniendo más en común con *M. bovis* BCG que con *M. tuberculosis*. En este estudio no solo se revela la variedad de características genómicas entre las especies de MNT, sino que también proporciona información sobre cómo encontrar moléculas antigénicas críticas que podrían ser la base para diseñar terapias basadas en bacterias para combatir el cáncer u otros trastornos inmunológicos.

Caracterización funcional de las cepas de *M. brumae*

1. Supervivencia intracelular y modulación inmune *in vitro* de las cepas de *M. brumae*

Viendo el perfil de seguridad demostrado por *M. brumae* y los resultados obtenidos en el estudio genómico de las cuatro cepas de esta especie, se propuso realizar un panel de ensayos para profundizar en el comportamiento funcional tanto de la cepa de referencia de *M. brumae* como de las otras tres cepas descritas por Luquin *et al.*, en 1993.

Inicialmente se realizaron ensayos en líneas celulares de macrófagos murinos y humanos (líneas celulares J774 y THP-1, respectivamente), que mostraron la capacidad de sobrevivir en el interior celular y su capacidad inmunomoduladora de las cuatro cepas de *M. brumae* evaluadas. De forma coherente a lo mostrado en la bibliografía [185], los resultados obtenidos mostraron que la cepa de referencia era eliminada completamente del interior de los macrófagos J774 y THP-1 a las 96 y 120 horas después de la infección (Figura 16), respectivamente. El resto de cepas tuvieron un comportamiento similar, la cepa CR-142 presentó un comportamiento igual al de la cepa de referencia, mientras que al máximo de tiempo las cepas CR-103 y CR-269 aún se mantuvieron viables en el interior celular (Figura 16). Las cuatro cepas de *M. brumae* indujeron la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-6, KC/IL-8, TNF- α e IL-12 en ambas líneas de macrófago. Además, en la línea J774 se observó liberación de NO, relacionado con la alteración de la expresión génica de la célula tumoral y causando daños en su DNA [14].

La disminución de la carga micobacteriana intracelular es relevante en cuanto a la seguridad, mientras que la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos es esencial para el inicio de una respuesta inmune adecuada en el microambiente tumoral. La liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, e inducida por *M. brumae*, va a desencadenar la activación y diferenciación de otras células inmunitarias como

linfocitos. Como resultado, se produce la producción de una cascada de citocinas y quimiocinas, con un aumento del perfil citotóxico del sistema inmune y continua infiltración de células inmunitarias en el tumor que actúan de forma directa sobre las células tumorales, e indirectamente modificando el microambiente tumoral.

2. Efecto antitumoral *in vitro* en cáncer de vejiga de las cepas de *M. brumae*

El efecto antiproliferativo de *M. brumae* se ha descrito *in vitro* frente a una amplia variedad de líneas tumorales de vejiga de diferente grado de diferenciación histopatológica, mostrando resultados similares e incluso superiores a *M. bovis* BCG en la mayoría de las líneas analizadas. Estos datos *in vitro* dieron pie a la evaluación de la eficacia *in vivo* en el modelo ortotópico murino de CVNMI, obteniendo también un resultado favorable en cuanto a su acción antineoplásica y de inducción de la respuesta proinflamatoria en los animales tratados con la micobacteria. Todo ello se realizó con la cepa de referencia de *M. brumae*. Para ampliar el abanico de alternativas terapéuticas se ha querido evaluar la acción antitumoral de otras tres cepas de *M. brumae*. Aunque con una similitud elevada a la cepa de referencia, el análisis genómico mostró diferencias en la secuencia de algunos genes que podrían comprometer o incrementar su capacidad terapéutica respecto a la cepa de referencia, además de haber observado diferencias en la inducción de producción de citocinas en macrófagos infectados por las cuatro cepas de *M. brumae*, como se ha discutido anteriormente.

Así, se evaluó la capacidad de las cuatro cepas de *M. brumae* de inhibir la proliferación *in vitro* de seis líneas tumorales diferentes de BC con distinto grado de diferenciación (Figura 17), obteniendo resultados similares a los ensayos previos para la cepa de referencia. En conjunto para las cuatro cepas evaluadas, los resultados mostraron una mayor inhibición del crecimiento tumoral en la línea 5637 (de grado 2) respecto al resto de células testadas, seguida de por las células tumorales de grado 3, donde destaca el efecto favorable sobre la línea celular J82. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las diferentes líneas de BC entre las diferentes cepas de *M. brumae*.

De acuerdo con la respuesta proinflamatoria inducida *in vitro*, la cepa de referencia y las cepas CR-142 y CR-103 de *M. brumae* inducen la liberación de niveles superiores de IL-6 e IL-8 en la mayoría de las líneas de BC, comparado con la cepa CR-269, la cual presenta un comportamiento más deficiente. La capacidad de inducir la liberación de citocinas proinflamatorias en las células tumorales infectadas por las micobacterias, crea un ambiente antitumoral más propicio y favorece la quimiotaxis de más células inmunes al microambiente tumoral. IL-6 e IL-8 son dos citocinas proinflamatorias que desencadenan la activación y atracción de células inmunes como macrófagos o linfocitos con el objetivo de eliminar las células neoplásicas y resolver el tumor.

El comportamiento funcional de la cepa CR-269, junto con su perfil de supervivencia mostrado en los cultivos de macrófagos murinos y humanos, llevaron a descartar dicha cepa para el resto de los experimentos.

3. Efecto antitumoral *in vitro* en otros tipos tumorales de las cepas de *M. brumae*

Teniendo como referente los exitosos resultados de la inmunoterapia con *M. bovis* BCG en CVNMI, diferentes autores han investigado el uso de especies del género *Mycobacterium* para el tratamiento de otros tipos de tumores diferentes al de vejiga [35]. Viendo los resultados prometedores encontrados en la bibliografía, el estudio de la capacidad de inhibir la proliferación tumoral y de inducir la producción de citocinas de las diferentes cepas de *M. brumae* se amplió a un panel de nueve líneas tumorales distintas a BC, incluyendo células tumorales de hígado, páncreas, colon, mama, cérvix y pulmón (Figuras 18 y 19). Los resultados indican que las tres cepas de *M. brumae* inhiben el crecimiento de las células tumorales en general, destacando una capacidad superior a *M. bovis* BCG en las líneas tumorales de colon e hígado (Figura 18). Se observaron diferencias tanto en la capacidad antiproliferativa como en la capacidad de inducir la producción de citocinas dependiendo de la línea tumoral estudiada.

En primer lugar, tanto las tres cepas de *M. brumae* como la cepa de *M. bovis* BCG Connaught tuvieron una respuesta antiproliferativa frente a la línea neoplásica pulmonar A549 [84]. Un estudio publicado anteriormente demuestra cómo ni MIP ni sus componentes son capaces de inhibir la proliferación de esta línea tumoral, lo que demuestra un mayor potencial de *M. brumae* sobre MIP.

En nuestro estudio, tanto los datos obtenidos con las tres cepas de *M. brumae* como con *M. bovis* BCG muestran su potencial para inhibir la proliferación de la línea tumoral QGP-1, correspondiente a páncreas. Además, el contacto directo entre las micobacterias y las células tumorales muestra una inducción de citocinas proinflamatorias que actuaría a favor de la respuesta antitumoral. Estudios previos han mostrado que algunas cepas de *M. bovis* BCG se han estudiado como inmunoterapia frente a cáncer gástrico o de páncreas junto con agentes quimioterapéuticos [186,187]. Los datos obtenidos de los estudios en cáncer de páncreas, sitúa a *M. bovis* BCG como una alternativa a desarrollar más robustamente debido al aumento de la supervivencia en ratones vacunados con la micobacteria respecto a los no vacunados o a individuos que recibieron monoterapia con quimioterapia.

En cuanto al cáncer colorrectal, se han estudiado ampliamente diferentes opciones de tratamiento basadas en micobacterias, mostrando en global la necesidad de combinar las micobacterias con un tratamiento adyuvante. Yuk *et al.* [188] demostraron un aumento en la muerte celular por autofagia de las células HCT116 como consecuencia del tratamiento con *M. bovis* BCG Pasteur y radiación ionizante. Del mismo modo se demostró el efecto beneficioso en el tratamiento de tumores colorrectales tras la administración de *M. bovis* BCG

Tokyo o *M. phlei* [189]. La valoración de los resultados en las tres líneas tumorales de colon evaluadas en este trabajo se debe analizarse independientemente debido a la heterogeneidad de los resultados obtenidos. Cabe resaltar, en primer lugar, el bajo efecto antitumoral de *M. bovis* BCG Connaught sobre la línea CaCo-2 en comparación con los resultados obtenidos con las tres cepas de *M. brumae*. También es destacable el efecto antiproliferativo de las cepas de *M. brumae* en las otras dos líneas colorrectales analizadas, HCT116 y HT-29, presentando en esta última un efecto antitumoral sostenido en el tiempo. Sin embargo, ninguna de las micobacterias que se estudiaron frente a las líneas de cáncer colorrectal muestra una inducción en la producción de IL-6, por lo que podría verse comprometida la respuesta inmune desencadenada en caso de extrapolar estos resultados a estudios *in vivo*.

En las líneas tumorales correspondientes a mama, se observa una inhibición de la proliferación inicial pero un incremento de la proliferación tumoral posterior tanto tras la infección con *M. brumae* como, aunque en menor medida, con *M. bovis* BCG. Así mismo, la producción de citocinas proinflamatorias promovida por *M. brumae* sobre las líneas de cáncer de mama SK-BR-3 y MCF-7 es deficiente, obteniendo niveles bajos o indetectables de IL-6 e IL-8 que podrían comprometer la amplificación de la respuesta inmune en un modelo *in vivo* más complejo. Sin embargo, en sistemas *ex vivo* tanto *M. bovis* BCG como otras vacunas a base de compuestos de la pared celular de micobacterias mostraron ser eficaces en inhibir la proliferación tumoral. Así, el uso de extractos de *M. bovis* BCG y *M. phlei* junto con anticuerpos HER-2 que estimularon la actividad citotóxica de las células inmunitarias contra células tumorales con expresión de HER2 [190]. Del mismo modo, la combinación de MIP con quimioterápicos como cisplatino redujo el volumen tumoral en modelos *in vivo* de ratón [84,191]. En la mayoría de los casos mostrados en la bibliografía el uso de micobacterias para el tratamiento del cáncer de mama suele combinarse con otro tratamiento antineoplásico, por lo que podría ser una opción para solventar la progresión del crecimiento tumoral en el tiempo, observada *in vitro*.

Finalmente, se ha descrito el efecto antitumoral de las micobacterias MIP y *M. bovis* BCG sobre líneas tumorales de cérvix, observando buenos resultados en el efecto inhibitor [192–195]. Nuestros resultados corroboran estos resultados, pudiéndose observar una capacidad citotóxica adecuada y sostenida en el tiempo de todas las micobacterias testadas.

Activación del sistema inmune con *M. brumae* de poblaciones con diferente rango de edad en el contexto de cáncer de vejiga

Como se ha explicado anteriormente, algunos de los factores de riesgo más relevantes para el desarrollo del CVNMI son el consumo de tabaco, exposición a contaminantes tóxicos, el género o la edad. Concretamente, la población diana para el tratamiento del CVNMI con micobacterias son hombres con una edad superior a 55-60 años. Esto contrasta con los estudios que se realizan para la evaluación de nuevas sustancias inmunomoduladoras. Habitualmente las muestras utilizadas para estudios *ex vivo* se obtienen de donantes situados en un rango de edad más joven que los pacientes con CVNMI. Así, los resultados obtenidos son difíciles de extrapolar. El sesgo en los resultados entre ambas poblaciones de individuos está influenciado por el deterioro que el sistema inmune sufre con la edad o inmunosenescencia, que altera tanto la cantidad de células inmunes como la capacidad efectiva de las células activadas.

Con el objetivo de conocer el impacto de la edad sobre la activación de PBMC *ex vivo* utilizando micobacterias, se escogió para el estudio una población de individuos sanos cuya edad comprendía entre los 60 y los 78 años, abarcando la edad media a la que generalmente se diagnostican los casos de CVNMI, que se comparó con una población de individuos jóvenes. Además, también se hizo una comparación de estos dos grupos poblacionales con pacientes diagnosticados de cáncer de vejiga y que todavía no habían comenzado con la inmunoterapia con *M. bovis* BCG.

Además, se observó que el incremento en la producción de citocinas, respecto a las PBMC sin activar, en todas las poblaciones estaba inducido por el contacto de las células con *M. brumae* o *M. bovis* BCG.

En las tres poblaciones estudiadas en el presente estudio se indujo la activación de la respuesta inmunitaria cuando las PBMC se estimularon con *M. brumae* o con *M. bovis* BCG. Los resultados obtenidos en la población joven coinciden con el único estudio preclínico previo publicado anteriormente por nuestro grupo en el que se compara la capacidad inmunoestimuladora de la cepa de referencia de *M. brumae* y *M. bovis* BCG Connaught [87]. En ambos estudios se muestra que *M. brumae* activa PBMC de personas jóvenes obteniendo niveles similares a *M. bovis* BCG en cuanto a la producción de las principales citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ y TNF- α).

De hecho, en cuanto a la activación de las células inmunitarias no solo la población de jóvenes sino que ambas poblaciones mayores de 65 años presentaron una estimulación de las PBMC con un perfil proinflamatorio. Se observaron niveles elevados de IL-6 e IL-12, probablemente liberadas por macrófagos y linfocitos T CD4⁺; niveles significativamente incrementados de IFN- γ por parte de las células T activadas; y concentraciones elevadas de IL-17, lo que apuntaría a una activación de linfocitos T CD 4⁺ y al desarrollo de una respuesta Th1/Th17

[96,196]. De todos modos, es necesario un estudio más detallado de la expresión de la síntesis de citocinas y de marcadores de superficie para comprender la activación por parte de las micobacterias y la funcionalidad de cada una de las subpoblaciones celulares que componen tanto el sistema inmune innato como el adaptativo.

En cuanto a la diferencia entre las poblaciones, cabe destacar que las células de pacientes con CVNMI y de individuos sanos mayores, mostraron una producción significativamente menor de IL-8, IL-17 e IFN- γ que las células de individuos sanos jóvenes tras ser estimuladas con las micobacterias. En estos resultados se aprecia el impacto de la edad y, por tanto, el deterioro funcional y/o celular del sistema inmune en cuanto a la respuesta frente a las micobacterias. La diferencia interpoblacional se puede atribuir a un deterioro en la amplificación de la respuesta o en la funcionalidad de los linfocitos T CD4⁺, aunque también podría deberse a un fallo en la inmunidad innata, producida por una menor presentación de antígenos por parte de las CPA [98]. Como ya se ha detallado, una presentación de antígeno deficiente se traduce en una menor liberación de las citocinas responsables de activar de forma eficiente el sistema inmune adaptativo. Esta disminución de IL-17 en personas con BC y de edad avanzada, supondría una menor respuesta proinflamatoria por la deficiente amplificación de la respuesta y con menor infiltración de células inmunes como neutrófilos o macrófagos en el microambiente tumoral. Se ha descrito el aumento de la capacidad citotóxica de los macrófagos frente a células tumorales debido a la estimulación con *M. bovis* BCG. Como consecuencia, se produce una polarización de los macrófagos hacia un morfotipo de respuesta M1, incrementándose la liberación de IL-6, IL-12 y TNF- α . A su vez, los macrófagos M1 pueden mediar en la presentación de antígenos a células T CD4⁺ junto con las DC. Estos linfocitos T CD4⁺ van a producir más IL-6 como consecuencia de su estimulación, además de IL-8 e IFN- γ , amplificando la respuesta inmune y activando otras poblaciones celulares inmunes. Esta activación celular se retroalimenta debido a que los linfocitos T CD4⁺ gracias a la liberación de IFN- γ y la respuesta adaptativa Th1 que se produce, van a estar implicados en la activación específica de los macrófagos M1. Además, debido a la activación de las células T CD4⁺, estas células son capaces de producir IL-17 incrementando la respuesta inflamatoria e induciendo la proliferación de linfocitos B [197]. Así mismo, se ha descrito que el aumento de la concentración de IL-17 es una señal de activación de múltiples factores de transcripción, como el NF- κ B, el cual induce genes intensamente proinflamatorios y el reclutamiento de neutrófilos [198]. Por otro lado, los niveles elevados de IL-17 son también una señal de migración para macrófagos y monocitos, jugando un papel importante en la defensa del huésped[199].

Así, la inmunosenescencia y el impacto del propio tumor, en el caso de los pacientes, sobre la respuesta inmune puede estar jugando un papel crucial en la disminución de producción de citocinas de las personas mayores en comparación con los jóvenes. Esta disminución en la producción de citocinas tiene un efecto crucial sobre la capacidad antiproliferativa de las PBMC activadas por las micobacterias sobre las células tumorales (Figura 23. a). Se observó

una menor inhibición de la proliferación tumoral de las células T24 cuando se co-cultivaron con las PBMC activadas por las micobacterias, o cuando se co-cultivaron con los sobrenadantes de los cultivos de las PBMC activadas, en las poblaciones de mayores y pacientes con BC, en comparación con los resultados obtenidos en los co-cultivos donde se utilizaron PBMC de personas jóvenes. Cabe destacar que la afectación mayor en esta capacidad antitumoral se observó principalmente en los cultivos de los sobrenadantes, demostrando que, aunque las PBMC mantenían una actividad citotóxica, los factores excretados por estas células no son capaces de generar un microambiente antitumoral. Acerca de la respuesta proinflamatoria inducida por el contacto directo e indirecto de las PBMC activadas con las células tumorales T24, *M. brumae* y *M. bovis* BCG inducen una mayor liberación de IL-6 e IL-8 comparado con el efecto antitumoral de las PBMC sin activar (Figura 23. b). Es destacable la respuesta inflamatoria que generaron los factores solubles de las PBMC activadas por *M. brumae* o *M. bovis* BCG sobre la liberación de IL-8 por parte de las células tumorales. Así, los factores responsables del efecto citotóxico pueden ser los niveles menores de citocinas comentados en los experimentos anteriores, u otros factores que modulen la proliferación celular. Es necesario ampliar los estudios para poder elucidar todas las moléculas producidas por las células activadas que pueden modular este microambiente.

En general, los experimentos demuestran que el deterioro en el sistema inmune debido a la inmunosenescencia y el impacto tumoral. Las PBMC de individuos jóvenes estimuladas tanto con *M. brumae* como con *M. bovis* BCG son capaces de generar una respuesta citotóxica adecuada y desencadenar la cascada proinflamatoria necesaria para la actividad antitumoral de estas células. Sin embargo, en las células de individuos mayores esta activación se ve disminuida. Aunque es necesario profundizar más en el mecanismo por el cual se produce una disminución de la activación de PBMC, de este estudio se puede afirmar que es imprescindible en la inmunoterapia contra el CVNMI, realizar estudios adaptados a las poblaciones diana, con personas en la edad media del diagnóstico de BC y/o que presenten la patología.

Estudio de la inmunidad entrenada inducida por *M. brumae*

Se ha descrito que *M. bovis* BCG presenta un efecto estimulador sobre las células del sistema inmune innato, generando memoria inmunológica mediada por la modificación funcional y epigenética en estas células. A este nuevo concepto se le ha denominado inmunidad entrenada y se caracteriza por desencadenar una respuesta inmune inespecífica y duradera.

En la última década el uso de *M. bovis* BCG ha sido extensamente estudiado para dilucidar cuál es el mecanismo por el cual es capaz de inducir una respuesta inespecífica. Como se ha comentado en la introducción, la detección de la micobacteria a través del receptor NOD2 de las células inmunes innatas, activa una cascada que promueve las modificaciones metabólicas y epigenéticas, con el resultado final del aumento en la liberación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α [200–204].

Esta capacidad ha sido extensamente estudiada con *M. bovis* BCG o con β -glucano, un componente de la pared de ciertas levaduras como *Candida albicans*. Esta estimulación del sistema inmunológico cobra especial relevancia como mecanismo de protección inespecífica frente a diferentes patologías como afecciones autoinmunes, infecciones por microorganismos patógenos o se cree que puede tener un papel en ciertos procesos neoplásicos en los que la inmunoterapia tiene un papel fundamental. Aunque no se ha demostrado experimentalmente, se ha sugerido que la inmunidad entrenada inducida por *M. bovis* BCG podría explicar la eficacia de esta micobacteria en el tratamiento del CVNMI.

1. Evaluación de la inmunidad entrenada *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la capacidad de inducir inmunidad entrenada de *M. brumae* y diferentes cepas de BCG, se ha utilizado un modelo *in vitro* con monocitos humanos THP-1. La línea celular THP-1 permite la evaluación de numerosos estímulos en comparación con el uso de monocitos derivados de sangre periférica de voluntarios, lo que acelera la obtención de resultados y la selección de posibles estímulos antes de ser evaluados en otros sistemas celulares más difíciles o costosos de obtener.

Durante la optimización, se demostró que el uso de PMA previo a la estimulación como factor de diferenciación, afecta negativamente en la activación celular, limitando la reprogramación metabólica de la célula. Los resultados demostraron que los monocitos THP-1 sin diferenciar con la estimulación inicial por *M. brumae* o *M. bovis* BCG producían el perfil de citocinas (IL-1b, IL-6 y TNF-a) y un cambio en el metabolismo con un incremento de niveles de lactato, descritos en la inducción de inmunidad entrenada. En cambio, este cambio no se producía utilizando *M. brumae* o *M. bovis* BCG en macrófagos THP-1. De hecho, cuando los monocitos se diferenciaban con PMA a macrófagos se observaba un incremento en la producción de citocinas tras la estimulación con las micobacterias correspondiente a un proceso de activación y no de inducción de inmunidad entrenada [121].

En los experimentos en los que se comparaban las tres cepas de *M. brumae*, las cepas de *M. bovis* BCG Connaught y Oncotice y *M. gastri* (Figura 25), se observó que tanto en monocitos como en macrófagos los niveles de glucosa eran similares, sin embargo, en macrófagos no se produjo un aumento de la concentración de lactato descrito en el mecanismo de inmunidad entrenada. En la estimulación de los monocitos/macrófagos se ha descrito un cambio en el metabolismo celular, en el cual la célula disminuye la tasa de obtención de energía mediante la fosforilación oxidativa y aumenta la ruta glucolítica para la obtención de energía gracias a la descomposición de la glucosa. La glucosa, en el proceso de entrenamiento inmunitario, es metabolizada a lactato, aumentando la concentración del mismo y dejando de estar disponible para su uso en el ciclo de Krebs [102]. El fenómeno observado en los datos de macrófagos de THP-1 sugiere aunque se ha iniciado la vía glucolítica, el aceptor principal de este azúcar sigue siendo el ciclo de Krebs y, no se está favoreciendo en gran medida el metabolismo hacia la producción de lactato. Este efecto es más acusado en el metabolismo desencadenado por las cepas de *M. bovis* BCG que por las de *M. brumae*. Además, este resultado está correlacionado con los niveles de citocinas producidos, los cuales son similares e incluso inferiores a los obtenidos cuando el estímulo inespecífico LPS es utilizado como en la estimulación inicial. Se ha descrito en la bibliografía que el cambio metabólico produce una acumulación de los intermediarios del ciclo de TCA [121,205], teniendo un efecto directo sobre las enzimas encargadas de modificar histonas, especialmente las H3K4 y H3K9. Resulta relevante la inhibición de enzimas desmetilasas que actúan sobre la histona H3K4, promoviendo que dicha histona permanezca di- o tri-metilada y favoreciendo la apertura de la cromatina. Si este fenómeno se produce en los promotores de IL-1 β , IL-6 y/o TNF- α , se favorece la transcripción de dichos genes y un aumento en la liberación de estas citocinas [39,109]. En los resultados obtenidos, se muestra como los niveles de todas las citocinas son similares entre sí e, incluso, respecto a la producción inducida cuando LPS se utiliza como estímulo. A falta de analizar la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9, podemos deducir que ninguna de las micobacterias evaluadas es capaz de inducir entrenamiento de los macrófagos THP-1.

Por otro lado, cuando la evaluación del cambio metabólico se realizó en los monocitos de THP-1 estimulados con las diferentes micobacterias, sí se demuestra una mayor producción de citocinas proinflamatorias y de lactato respecto a la estimulación de los monocitos con LPS. Los mejores resultados se obtuvieron con las tres cepas de *M. brumae* en comparación con las cepas de *M. bovis* BCG, pudiéndose atribuir un cambio metabólico e inducción de citocinas más eficiente por parte de *M. brumae*, aunque los resultados con las cepas de *M. bovis* BCG también son compatibles con el proceso de entrenamiento de la memoria en células inmunes innatas.

En los datos obtenidos en los experimentos con las diferentes cepas de *M. bovis* BCG (Figura 26), se observa en los macrófagos THP-1 una tendencia similar respecto a la liberación de citocinas y niveles de glucosa y lactato a la descrita para las cepas de *M. brumae*. No se

produce el cambio metabólico descrito en la inmunidad entrenada, ya que las concentraciones de glucosa y lactato son similares a las producidas por los macrófagos sin estimular. Además, también se observó liberación de IL-6 y TNF- α en concentraciones similares a las producidas por los macrófagos sin estimular. Esto indica que en los macrófagos, como hemos discutido, no se ha producido la reprogramación epigenética con aumento de la expresión de los genes implicados en la síntesis de estas dos citocinas.

Cuando se observan las citocinas y la tasa metabólica generada en los monocitos THP-1, se muestran los cambios compatibles con el entrenamiento inmunitario tanto en la liberación de citocinas como en la tasa de consumo-síntesis de glucosa y lactato. Destaca, sobre todo, la diferencia de respuesta obtenida entre las diferentes cepas de *M. bovis* BCG. Como ya se ha detallado anteriormente, una de las partes de la micobacteria más relevantes que están implicadas en la inmunogenicidad es su pared celular. En el caso de las distintas cepas de *M. bovis* BCG, debido a la diferencia en su genoma por la delección de la RD2 en las cepas de aparición más tardía y la aparición de mutaciones puntuales, la composición de la pared celular de varias especies de *M. bovis* BCG es variable entre sí. Esto puede conllevar un impacto en la respuesta de activación del sistema inmune inducido por la micobacteria. En el contexto de BC, se han descrito diferencias en la capacidad de producir las proteínas antigénicas MPT64, MPT70 y MPT83. Mientras que las cepas BCG Russian, BCG Tokyo o BCG Moreau sí eran capaces de sintetizarlas, otras cepas como BCG Tice, BCG Glaxo o BCG Pasteur, no sintetizaban dichas proteínas [39]. Lo mismo ocurre con la síntesis de los lípidos relacionados con la internalización de la micobacteria con células presentadoras de antígenos PDIM y PGL, los cuales no son expresados por las cepas BCG Tokyo, BCG Moreau o BCG Glaxo [39]. Esto podría implicar un menor reconocimiento por parte del sistema inmunitario y los resultados distintos entre las cepas. En CVNMI, la elección de la cepa de *M. bovis* BCG utilizada en la inmunoterapia se cree que puede influir en la eficacia del tratamiento intravesical. Por ejemplo, en varios ensayos clínicos retrospectivos se demostró como *M. bovis* BCG Connaught resultaba ser más efectiva en retrasar el tiempo de aparición de la primera recurrencia o demostró tener una mejor tasa de recurrencia libre de progresión a los 5 años en comparación con la cepa BCG Tice [38,206]. Viendo la heterogeneidad de los resultados obtenidos en la comparación de la eficacia en inducir inmunidad entrenada entre las diferentes cepas de *M. bovis* BCG, profundizar en las características funcionales de cada una de ellas es esencial para conseguir un consenso que resulte en el uso extendido de aquellas cepas con mejores datos de retraso en la aparición de recurrencias y/o progresión tumoral. En los resultados obtenidos *in vitro*, no se puede decir que se observara una tendencia en la que un grupo de cepas, de aparición más temprana o tardía, presente mejores o peores resultados en cuanto a la activación de monocitos THP-1, pero sí se observó que la cepa de *M. bovis* BCG Phipps (cepa de aparición tardía) presenta el mejor perfil de inducción de inmunidad entrenada en monocitos, seguida de la cepa BCG Moreau (cepa de aparición temprana). Como resumen, podemos concluir que es relevante la cepa de *M. bovis* BCG

utilizada en el proceso de entrenamiento de la inmunidad para conseguir una adecuada estimulación de la memoria en el sistema inmunitario innato.

2. Evaluación de la inmunidad entrenada *ex vivo*

Una vez observada la capacidad de *M. brumae* de inducir un perfil compatible con inmunidad entrenada en el sistema *in vitro* utilizando monocitos THP-1, se propuso su estudio en diferentes sistemas *ex vivo*. Siguiendo lo descrito en la bibliografía, en el presente estudio *ex vivo* realizado con monocitos humanos, se comparó la estimulación heteróloga producida por las cepas de *M. brumae* respecto a *M. bovis* BCG. Las cepas de *M. brumae* evaluadas desencadenaron una liberación similar de citocinas proinflamatorias en comparación con las cepas de *M. bovis* BCG evaluadas. Destacó la elevada inducción de expresión de TNF- α por parte de todas las micobacterias respecto al estímulo realizado con LPS, así como las diferencias obtenidas en la liberación de IL-1 β e IL-6 inducidas por la cepa CR-103 de *M. brumae* respecto al resto de micobacterias. Por otro lado, el cambio metabólico obtenido en los resultados *ex vivo* indica que se produjo la reprogramación metabólica propia de una respuesta innata entrenada para las cepas de *M. brumae* y *M. bovis* BCG. Se produjo el aumento en el consumo de la glucosa, así como en la producción de lactato, derivado de la activación de la vía glucolítica y bloqueo del ciclo de Krebs con la consecuente disminución del proceso de fosforilación oxidativa. Los resultados obtenidos para *M. bovis* BCG coinciden con los publicados con anterioridad [104,207,208] y, en su comparación con las cepas de *M. brumae*, se muestra que *M. brumae* es un agente candidato a usarse en el entrenamiento de la memoria inmune innata. Finalmente, en el análisis de la trimetilación de las histonas H3K4 y H3K9, respectivamente activadora y represora del proceso de inmunidad entrenada, se obtuvieron datos acordes a lo descrito en la bibliografía (referencia). Sin embargo, los experimentos se realizaron con una muestra limitada en el número de individuos, por lo que sería necesario ampliar la muestra para obtener mayor robustez en los resultados acerca de los cambios epigenéticos producidos durante el proceso de entrenamiento inmune. En los experimentos *ex vivo* se obtuvo un aumento en la trimetilación de H3K4 en los monocitos estimulados con *M. brumae* y con *M. bovis* BCG, siendo significativa en este último respecto a los monocitos estimulados con LPS o sin estimular. Por su parte, aunque no se obtuvieron diferencias significativas, se produjo una trimetilación de la histona H3K9 mínima para todas las condiciones evaluadas. Estos resultados muestran que se produce una reprogramación epigenética compatible a la descrita en la bibliografía.

Finalmente, se estudiaron macrófagos obtenidos del modelo murino de cáncer de vejiga. Los macrófagos, derivados de PEC y de esplenocitos, mostraron una mayor producción de citocinas proinflamatorias cuando fueron estimulados *ex vivo* con micobacterias o LPS. Destaca la diferente producción de citocinas entre los grupos de animales con y sin tumor, que han sido tratados con *M. brumae* o con *M. bovis* BCG. Además, se observó una mayor producción de TNF- α por parte de los macrófagos derivados de PEC estimuladas *ex vivo* con

M. bovis BCG, de aquellos animales que presentaban tumor y habían sido tratados con esta misma micobacteria.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La cepa de referencia de *M. brumae* ATCC 51384^T y los tres aislados ambientales CR-269, CR-142 y CR-103 estudiados presentan las mismas características fenotípicas relativas al crecimiento colonial, susceptibilidad a antimicrobianos y composición lipídica y glicolipídica de la pared celular.
2. El genoma de *M. brumae* consta de un solo cromosoma circular de 3,8 megabases y con un contenido medio de GC del 69,1%, siendo más pequeño respecto a otros genomas de micobacterias ambientales no tuberculosas. Filogenéticamente, *M. brumae* se agrupa con otras micobacterias no patógenas de crecimiento rápido.
3. El análisis del genoma de *M. brumae* confirma la elevada inmunogenicidad de la especie y su no patogenicidad. El genoma de *M. brumae* presenta 85 genes relacionados en *M. tuberculosis* con la inducción de una respuesta del sistema inmunitario de células T, 83 de los 85 los comparte con *M. bovis* BCG, y los otros 2 con *M. tuberculosis*. Además *M. brumae* comparte con *M. bovis* BCG 17 genes de los 127 genes relacionados con la actividad inmunogénica mediada por células B de *M. tuberculosis*. El genoma de *M. brumae* solo contiene 57 de los 324 genes asociados con la virulencia de *M. tuberculosis*, compartiendo también 56 de estos genes con *M. bovis* BCG.
4. La diversidad genómica entre las diferentes cepas de *M. brumae* es muy baja. Las cepas de *M. brumae* CR-269, CR-142 y CR-103 difieren del genoma de la cepa de referencia ATCC 51384^T en seis, tres y cinco SNP, respectivamente. Las tres cepas aisladas presentan en común únicamente una mutación relacionada con la aminopeptidasa N y un SNP localizado en un pseudogen.
5. Ni la cepa de referencia de *M. brumae* ATCC 51384^T ni las cepas de *M. brumae* CR-269, CR-142 y CR-103 son capaces de persistir a lo largo del tiempo en el interior celular de macrófagos humanos o murinos.
6. Las cepas de *M. brumae* CR-269, CR-142 y CR-103 son capaces de inhibir la proliferación de las líneas tumorales de vejiga de forma similar a la cepa de referencia de *M. brumae* ATCC 51384^T. La capacidad antiproliferativa de *M. brumae* es superior en la línea tumoral 5637 con un grado de diferenciación tipo 2, independientemente de la cepa estudiada.

7. La capacidad de inhibir la proliferación tumoral de las cepas de *M. brumae* es superior a la capacidad antitumoral de *M. bovis* BCG en las líneas tumorales del tracto gastrointestinal, aunque los niveles de citocinas liberadas por *M. bovis* BCG son significativamente mayores a los inducidos por las cepas de *M. brumae*.
8. La estimulación células mononucleares de sangre periférica con *M. brumae* y *M. bovis* BCG es diferente en función de la edad de los individuos. La estimulación con las micobacterias induce una mayor producción de citocinas y/o quimiocinas cuando las células provienen de individuos jóvenes que, de individuos mayores sanos o pacientes con cáncer de vejiga mayores, siendo significativa para la producción de IL-8, IL-17, IFN- γ y TNF- α .
9. En las tres poblaciones estudiadas, las células de sangre periférica activadas por *M. brumae* y *M. bovis* BCG y sus factores solubles, promueven una citotoxicidad directa e indirecta significativas frente a la línea tumoral T24. La capacidad antitumoral de estas células activadas o los factores producidos por las células activadas es significativamente menor cuando provienen de pacientes con cáncer de vejiga que cuando provienen de individuos sanos.
10. Las células de sangre periférica de pacientes de cáncer de vejiga activadas tanto con *M. brumae* como con *M. bovis* BCG, así como los factores solubles producidos por las células activadas, promueven la invasión y migración tumoral de forma significativa con respecto al efecto producido por las células activadas de individuos sanos.
11. Todas las cepas de *M. bovis* BCG son capaces de inducir entrenamiento celular en el modelo *in vitro* de monocitos THP-1. La estimulación celular difiere entre las cepas de *M. bovis* BCG, con una mayor actividad de las cepas *M. bovis* BCG Phipps y BCG Connaught respecto al resto de cepas.
12. Las cepas de *M. brumae* inducen entrenamiento de la inmunidad innata en monocitos TPH-1 *in vitro* y en monocitos derivados de sangre periférica *ex vivo*, obteniendo una inmunomodulación similar a *M. bovis* BCG, con un incremento en la liberación de IL-6, TNF- α e IL-1 β , cambios metabólicos dirigidos a un aumento de la glucólisis con producción de lactato y modificaciones epigenéticas con trimetilación de la histona H3K4.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European Association of Urology Guidelines on Non–muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol.* 2022;81(1):75-94. doi:10.1016/j.eururo.2021.08.010
2. Semeniuk-Wojtaś A, Poddębniak-Strama K, Modzelewska M, et al. Tumour microenvironment as a predictive factor for immunotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* Published online July 1, 2023. doi:10.1007/s00262-023-03376-9
3. Semeniuk-Wojtaś A, Poddębniak-Strama K, Modzelewska M, et al. Tumour microenvironment as a predictive factor for immunotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2023;72(7):1971-1989. doi:10.1007/s00262-023-03376-9
4. Sylvester RJ, Rodríguez O, Hernández V, et al. European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups for Non–muscle-invasive Bladder Cancer (NMIBC) Incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 Classification Systems for Grade: An Update from the EAU NMIBC Guidelines Panel[Formula presented]. *Eur Urol.* 2021;79(4):480-488. doi:10.1016/j.eururo.2020.12.033
5. *Las Cifras Del Cáncer En España.*; 2023.
6. *Acerca Del Cáncer de Vejiga ¿Qué Es El Cáncer de Vejiga?*
7. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015;368(1):7-13. doi:10.1016/j.canlet.2015.07.039
8. Giraldo NA, Sanchez-Salas R, Peske JD, et al. The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer.* 2019;120(1):45-53. doi:10.1038/s41416-018-0327-z
9. Crusio WE, Radeke HH. *Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 1296 Series Editors.* <http://www.springer.com/series/5584>
10. Shadpour P, Zamani M, Aghaalkhani N, Rashtchizadeh N. Inflammatory cytokines in bladder cancer. *J Cell Physiol.* 2019;234(9):14489-14499. doi:10.1002/jcp.28252
11. Crispin PL, Kusmartsev S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2020;69(1):3-14. doi:10.1007/s00262-019-02443-4
12. Jiang S, Redelman-Sidi G. BCG in Bladder Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2022;14(13). doi:10.3390/cancers14133073
13. Lardone RD, Chan AA, Lee AF, et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette–Guérin Alters melanoma microenvironment Favoring antitumor T cell responses and improving M2 Macrophage Function. *Front Immunol.* 2017;8(AUG). doi:10.3389/fimmu.2017.00965

14. Al Dubayee MS, Alayed H, Almansour R, et al. Differential expression of human peripheral mononuclear cells phenotype markers in type 2 diabetic patients and type 2 diabetic patients on metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(OCT). doi:10.3389/fendo.2018.00537
15. Seliger B, Massa C. The Dark Side of Dendritic Cells: Development and Exploitation of Tolerogenic Activity That Favor Tumor Outgrowth and Immune Escape. *Front Immunol*. 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00419
16. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*. 2019;79(18):4557-4566. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962
17. Domingos-Pereira S, Sathiyandan K, Polak L, et al. Tumor-Microenvironment Characterization of the MB49 Non-Muscle-Invasive Bladder-Cancer Orthotopic Model towards New Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2023;24(1). doi:10.3390/ijms24010123
18. Wang X, Ni S, Chen Q, et al. Bladder cancer cells induce immunosuppression of T cells by supporting PD-L1 expression in tumour macrophages partially through interleukin 10. *Cell Biol Int*. 2017;41(2):177-186. doi:10.1002/cbin.10716
19. Meehan CJ, Barco RA, Loh YHE, Cogneau S, Rigouts L. Reconstituting the genus mycobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021;71(9). doi:10.1099/ijsem.0.004922
20. Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48(2):159-178. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00123.x
21. Tortoli E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):319-354. doi:10.1128/CMR.16.2.319-354.2003
22. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. *Front Microbiol*. 2018;9(FEB). doi:10.3389/fmicb.2018.00067
23. Seth-Smith HMB, Imkamp F, Tagini F, et al. Discovery and Characterization of Mycobacterium basiliense sp. nov., a Nontuberculous Mycobacterium Isolated From Human Lungs. *Front Microbiol*. 2019;9. doi:10.3389/fmicb.2018.03184
24. Pereira AC, Ramos B, Reis AC, Cunha M V. Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches. *Microorganisms*. 2020;8(9):1380. doi:10.3390/microorganisms8091380
25. Saviola B, Bishai W. The Genus Mycobacterium--Medical. In: *The Prokaryotes*. Springer New York; 2006:919-933. doi:10.1007/0-387-30743-5_34
26. Krieg AM. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):709-760. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
27. Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press; 2015:536-569. doi:10.1128/9781555817381.ch30

28. van der Werf MJ, Ködmön C, Katalinić-Janković V, et al. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):62. doi:10.1186/1471-2334-14-62
29. Bachmann NL, Salamzade R, Manson AL, et al. Key Transitions in the Evolution of Rapid and Slow Growing Mycobacteria Identified by Comparative Genomics. *Front Microbiol.* 2020;10. doi:10.3389/fmicb.2019.03019
30. Runyon EH. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Medical Clinics of North America.* 1959;43(1):273-290. doi:10.1016/S0025-7125(16)34193-1
31. Saviola B. Pigments of pathogenic bacteria. *J Microbiol Exp.* 2018;6(2). doi:10.15406/jmen.2018.06.00198
32. Iivanainen E, Martikainen PJ, Vaaumlinänen P, Katila M -L. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J Appl Microbiol.* 1999;86(4):673-681. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00711.x
33. Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem Biol.* 2014;21(1):67-85. doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011
34. Jackson M. The Mycobacterial Cell Envelope--Lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(10):a021105-a021105. doi:10.1101/cshperspect.a021105
35. Noguera-Ortega E, Guallar-Garrido S, Julián E. Mycobacteria-based vaccines as immunotherapy for non-urolological cancers. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1-25. doi:10.3390/cancers12071802
36. Kumar P, Tyagi R, Das G, Bhaskar S. Mycobacterium indicus pranii and Mycobacterium bovis BCG lead to differential macrophage activation in Toll-like receptor-dependent manner. *Immunology.* 2014;143(2):258-268. doi:10.1111/imm.12306
37. Verma I, Grover A. Antituberculous vaccine development: a perspective for the endemic world. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(11):1547-1553. doi:10.1586/erv.09.111
38. Lobo N, Brooks NA, Zlotta AR, et al. 100 years of Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy: from cattle to COVID-19. *Nat Rev Urol.* 2021;18(10):611-622. doi:10.1038/s41585-021-00481-1
39. Lange C, Aaby P, Behr MA, et al. 100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette–Guérin. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(1):e2-e12. doi:10.1016/S1473-3099(21)00403-5
40. Pettenati C, Ingersoll MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2018;15(10):615-625. doi:10.1038/s41585-018-0055-4
41. Secanella-Fandos S, Luquin M, Julián E. Connaught and Russian Strains Showed the Highest Direct Antitumor Effects of Different Bacillus Calmette–Guérin Substrains. *Journal of Urology.* 2013;189(2):711-718. doi:10.1016/j.juro.2012.09.049

42. Secanella-Fandos S, Noguera-Ortega E, Olivares F, Luquin M, Julián E. Killed but Metabolically Active *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Retains the Antitumor Ability of Live bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Urology*. 2014;191(5):1422-1428. doi:10.1016/j.juro.2013.12.002
43. Gan C, Mostafid H, Khan MS, Lewis DJM. BCG immunotherapy for bladder cancer—the effects of substrain differences. *Nat Rev Urol*. 2013;10(10):580-588. doi:10.1038/nrurol.2013.194
44. Green J, Fuge O, Allchorne P, Vasdev N. Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol*. Published online May 2015:65. doi:10.2147/RRU.S63447
45. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer-A current perspective. *Nat Rev Urol*. 2014;11(3):153-162. doi:10.1038/nrurol.2014.15
46. Shan G, Tang T, Qian H, Xia Y. Certain BCG-reactive responses are associated with bladder cancer prognosis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2018;67(5):797-803. doi:10.1007/s00262-018-2127-y
47. Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J, Rook GA. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1988;56(12):3046-3051. doi:10.1128/iai.56.12.3046-3051.1988
48. Sinn HW, Elzey BD, Jensen RJ, Zhao X, Zhao W, Ratliff TL. The fibronectin attachment protein of bacillus Calmette-Guerin (BCG) mediates antitumor activity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008;57(4):573-579. doi:10.1007/s00262-007-0397-x
49. Kowalewicz-Kulbat M, Loch C. Recombinant BCG to Enhance Its Immunomodulatory Activities. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(5). doi:10.3390/VACCINES10050827
50. Biot C, Rentsch CA, Gsponer JR, et al. Preexisting BCG-Specific T Cells Improve Intravesical Immunotherapy for Bladder Cancer. *Sci Transl Med*. 2012;4(137). doi:10.1126/scitranslmed.3003586
51. PRESCOTT S, JAMES K, BUSUTTL A, HARGREAVE TB, CHISHOLM GD, SMYTH JF. HLA-DR Expression by High Grade Superficial Bladder Cancer Treated with BCG. *Br J Urol*. 1989;63(3):264-269. doi:10.1111/j.1464-410X.1989.tb05187.x
52. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.636568
53. Mukherjee N, Julián E, Torrelles JB, Svatek RS. Effects of *Mycobacterium bovis* Calmette et Guérin (BCG) in oncotherapy: Bladder cancer and beyond. *Vaccine*. 2021;39(50):7332-7340. doi:10.1016/j.vaccine.2021.09.053
54. Han J, Gu X, Li Y, Wu Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;129:110393. doi:10.1016/j.biopha.2020.110393

55. Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, et al. Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood*. 2005;106(10):3474-3482. doi:10.1182/blood-2005-03-1327
56. Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008;26(4):341-345. doi:10.1016/j.urolonc.2007.11.031
57. Su F, Liu M, Zhang W, et al. Bacillus Calmette–Guérin Treatment Changes the Tumor Microenvironment of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Front Oncol*. 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.842182
58. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):237-251. doi:10.1038/nrc3237
59. van der Sloot E, Kuster S, Böhle A, Braun J, Wood WG. Towards an Understanding of the Mode of Action of Bacillus Calmette-Guérin-Therapy in Bladder Cancer Treatment, Especially with Regard to the Role of Fibronectin. *Clin Chem Lab Med*. 1992;30(9). doi:10.1515/cclm.1992.30.9.503
60. D'Andrea D, Soria F, Abufaraj M, et al. Comparative Effectiveness of Intravesical BCG-Tice and BCG-Moreau in Patients With Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2020;18(1):20-25.e2. doi:10.1016/j.clgc.2019.10.021
61. Del Giudice F, Busetto GM, Gross MS, et al. Efficacy of three BCG strains (Connaught, TICE and RIVM) with or without secondary resection (re-TUR) for intermediate/high-risk non-muscle-invasive bladder cancers: results from a retrospective single-institution cohort analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021;147(10):3073-3080. doi:10.1007/s00432-021-03571-0
62. Rentsch CA, Birkhäuser FD, Biot C, et al. Bacillus Calmette-Guérin Strain Differences Have an Impact on Clinical Outcome in Bladder Cancer Immunotherapy. *Eur Urol*. 2014;66(4):677-688. doi:10.1016/j.eururo.2014.02.061
63. Unda-Urzaiz M, Cozar-Olmos JM, Miñana-Lopez B, et al. Safety and efficacy of various strains of bacille Calmette–Guérin in the treatment of bladder tumors in standard clinical practice. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*. 2018;42(4):238-248. doi:10.1016/j.acuroe.2018.03.004
64. Krajewski W, Matuszewski M, Poletajew S, Grzegorzówka J, Zdrojowy R, Kołodziej A. Are There Differences in Toxicity and Efficacy between Various Bacillus Calmette-Guerin Strains in Bladder Cancer Patients? Analysis of 844 Patients. *Urol Int*. 2018;101(3):277-284. doi:10.1159/000492722
65. Tan WS, Kelly JD. Intravesical device-assisted therapies for non-muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2018;15(11):667-685. doi:10.1038/s41585-018-0092-z

66. Packiam VT, Johnson SC, Steinberg GD. Non–muscle-invasive bladder cancer: Intravesical treatments beyond Bacille Calmette-Guérin. *Cancer*. 2017;123(3):390-400. doi:10.1002/cncr.30392
67. Morales A. BCG: A throwback from the stone age of vaccines opened the path for bladder cancer immunotherapy. *Can J Urol*. 2017;24(3):8788-8793.
68. Lamm DL, DeHaven JI, Shriver J, Sarosdy MF. Prospective Randomized Comparison of Intravesical with Percutaneous Bacillus Calmette-Guerin Versus Intravesical Bacillus Calmette-Guerin in Superficial Bladder Cancer. *Journal of Urology*. 1991;145(4):738-740. doi:10.1016/S0022-5347(17)38439-2
69. Luftenegger W, Ackermann DK, Futterlieb A, et al. Intravesical Versus Intravesical Plus Intradermal Bacillus Calmette-Guerin: A Prospective Randomized Study In Patient With Recurrent Superficial Bladder Tumors. *Journal of Urology*. 1996;155(2):483-487. doi:10.1016/S0022-5347(01)66427-9
70. Witjes JA, Fransen MPH, van der Meijden APM, Doesburg WH, Debruyne FMJ. Use of Maintenance Intravesical Bacillus Calmette-Guérin (BCG), with or without Intradermal BCG, in Patients with Recurrent Superficial Bladder Cancer. *Urol Int*. 1993;51(2):67-72. doi:10.1159/000282516
71. Annels NE, Mansfield D, Arif M, et al. Phase I Trial of an ICAM-1-Targeted Immunotherapeutic-Coxsackievirus A21 (CVA21) as an Oncolytic Agent Against Non Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(19):5818-5831. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-4022
72. Rhea LP, Mendez-Martí S, Kim D, Aragon-Ching JB. Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;26. doi:10.1016/j.ctarc.2020.100296
73. Pangilinan CR, Lee CH. Salmonella-Based Targeted Cancer Therapy: Updates on A Promising and Innovative Tumor Immunotherapeutic Strategy. *Biomedicines*. 2019;7(2):36. doi:10.3390/biomedicines7020036
74. Feyisetan O, Tracey C, Hellawell GO. Probiotics, dendritic cells and bladder cancer. *BJU Int*. 2012;109(11):1594-1597. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10749.x
75. Seow SW, Cai S, Rahmat JN, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG induces tumor regression in mice bearing orthotopic bladder tumors. *Cancer Sci*. 2010;101(3):751-758. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01426.x
76. Codolo G, Fassan M, Munari F, et al. HP-NAP inhibits the growth of bladder cancer in mice by activating a cytotoxic Th1 response. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012;61(1):31-40. doi:10.1007/s00262-011-1087-2
77. Han C, Hao L, Chen M, et al. Target expression of Staphylococcus enterotoxin A from an oncolytic adenovirus suppresses mouse bladder tumor growth and recruits CD3+ T cell. *Tumor Biology*. 2013;34(5):2863-2869. doi:10.1007/s13277-013-0847-3

78. Li R, Amrhein J, Cohen Z, Champagne M, Kamat AM. Efficacy of Mycobacterium Phlei Cell Wall-Nucleic Acid Complex (MCNA) in BCG-Unresponsive Patients. *Bladder Cancer*. 2017;3(1):65-71. doi:10.3233/BLC-160084
79. Packiam VT, Pearce SM, Steinberg GD. The role of mycobacterial cell wall nucleic acid complex in the treatment of bacillus Calmette–Guérin failures for non-muscle-invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol*. 2016;8(1):29-37. doi:10.1177/1756287215607818
80. Phillips NC, Filion MC. Therapeutic potential of mycobacterial cell wall-DNA complexes. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(12):2157-2165. doi:10.1517/13543784.10.12.2157
81. Lamensans A, Chedid L, Lederer E, et al. Enhancement of immunity against murine syngeneic tumors by a fraction extracted from non-pathogenic mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(9):3656-3660. doi:10.1073/pnas.72.9.3656
82. Yarkoni E, Rapp HJ. Immunotherapy of experimental cancer by intralesional injection of emulsified nonliving mycobacteria: comparison of Mycobacterium bovis (BCG), Mycobacterium phlei, and Mycobacterium smegmatis. *Infect Immun*. 1980;28(3):887-892. doi:10.1128/iai.28.3.887-892.1980
83. Young SL, Murphy M, Zhu XW, et al. Cytokine-modified Mycobacterium smegmatis as a novel anticancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 2004;112(4):653-660. doi:10.1002/ijc.20442
84. Subramaniam M, In LLA, Kumar A, Ahmed N, Nagoor NH. Cytotoxic and apoptotic effects of heat killed Mycobacterium indicus pranii (MIP) on various human cancer cell lines. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep19833
85. Chaudhuri P, Mukhopadhyay S. Bladder preserving approach for muscle invasive bladder cancer--role of mycobacterium w. *J Indian Med Assoc*. 2003;101(9):559-560.
86. Luquin M, Ausina V, Vincent-Levy-Frebault V, et al. *Mycobacterium Brumae Sp. Nov., a Rapidly Growing, Nonphotochromogenic Mycobacterium*. International Union of Microbiological Societies; 1993.
87. Noguera-Ortega E, Secanella-Fandos S, Eraña H, et al. Nonpathogenic Mycobacterium brumae Inhibits Bladder Cancer Growth In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo. *Eur Urol Focus*. 2016;2(1):67-76. doi:10.1016/j.euf.2015.03.003
88. Noguera-Ortega E, Blanco-Cabra N, Rabanal RM, et al. Mycobacteria emulsified in olive oil-in-water trigger a robust immune response in bladder cancer treatment. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep27232
89. Guallar-Garrido S, Campo-Pérez V, Pérez-Trujillo M, et al. Mycobacterial surface characters remodeled by growth conditions drive different tumor-infiltrating cells and systemic IFN- γ /IL-17 release in bladder cancer treatment. *Oncoimmunology*. 2022;11(1). doi:10.1080/2162402X.2022.2051845

90. Bach-Griera M, Campo-Pérez V, Barbosa S, et al. Mycolicibacterium brumae is a safe and non-toxic immunomodulatory agent for cancer treatment. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2). doi:10.3390/vaccines8020198
91. Subramaniam M, In LLA, Kumar A, Ahmed N, Nagoor NH. Cytotoxic and apoptotic effects of heat killed Mycobacterium indicus pranii (MIP) on various human cancer cell lines. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep19833
92. Oddens JR, Sylvester RJ, Brausi MA, et al. The effect of age on the efficacy of maintenance bacillus calmette-guérin relative to maintenance epirubicin in patients with stage Ta T1 urothelial bladder cancer: Results from EORTC genito-urinary group study 30911. *Eur Urol*. 2014;66(4):694-701. doi:10.1016/j.eururo.2014.05.033
93. Zhou R, Liang J, Tian H, Chen Q, Yang C, Liu C. An Immunosenescence-Related Gene Signature to Evaluate the Prognosis, Immunotherapeutic Response, and Cisplatin Sensitivity of Bladder Cancer. *Dis Markers*. 2022;2022. doi:10.1155/2022/2143892
94. Wang Y, Dong C, Han Y, Gu Z, Sun C. Immunosenescence, aging and successful aging. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.942796
95. Pangrazzi L, Weinberger B. T cells, aging and senescence. *Exp Gerontol*. 2020;134. doi:10.1016/j.exger.2020.110887
96. Shirakawa K, Sano M. T cell immunosenescence in aging, obesity, and cardiovascular disease. *Cells*. 2021;10(9). doi:10.3390/cells10092435
97. Pawelec G. Does patient age influence anti-cancer immunity? *Semin Immunopathol*. 2019;41(1):125-131. doi:10.1007/s00281-018-0697-6
98. Bulut O, Kilic G, Dominguez-Andres J, Netea MG. Overcoming immune dysfunction in the elderly: Trained immunity as a novel approach. *Int Immunol*. 2020;32(12):741-753. doi:10.1093/intimm/dxaa052
99. Zou YR, Davidson A. Age-associated B cells acquire a new wrinkle news-and-views. *Nat Immunol*. 2018;19(4):317-318. doi:10.1038/s41590-018-0072-8
100. Uyar B, Palmer D, Kowald A, et al. Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Res Rev*. 2020;64. doi:10.1016/j.arr.2020.101156
101. van der Meer JWM, Joosten LAB, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol*. 2015;68(1):40-44. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.019
102. Geckin B, Konstantin Föhse F, Domínguez-Andrés J, Netea MG. Trained immunity: implications for vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2022;77:102190. doi:10.1016/j.coi.2022.102190
103. Pan W, Hao S, Zheng M, et al. Oat-Derived β -Glucans Induced Trained Immunity Through Metabolic Reprogramming. *Inflammation*. 2020;43(4):1323-1336. doi:10.1007/s10753-020-01211-2

104. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*. 2018;172(1-2):176-190.e19. doi:10.1016/j.cell.2017.12.031
105. Huijser E, van Helden-Meeuwsen CG, Grashof DGB, et al. Trained Immunity in Primary Sjögren's Syndrome: Linking Type I Interferons to a Pro-Atherogenic Phenotype. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.840751
106. de Homdedeu M, Sanchez-Moral L, Violán C, et al. Mycobacterium manresensis induces trained immunity in vitro. *iScience*. 2023;26(6). doi:10.1016/j.isci.2023.106873
107. Domínguez-Andrés J, Fanucchi S, Joosten LAB, Mhlanga MM, Netea MG. Advances in understanding molecular regulation of innate immune memory. *Curr Opin Cell Biol*. 2020;63:68-75. doi:10.1016/j.ceb.2019.12.006
108. Domínguez-Andrés J, Joosten LA, Netea MG. Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Curr Opin Immunol*. 2019;56:10-16. doi:10.1016/j.coi.2018.09.001
109. Arts RJW, Joosten LAB, Netea MG. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin Immunol*. 2016;28(5):425-430. doi:10.1016/j.smim.2016.09.002
110. Domínguez-Andrés J, Novakovic B, Li Y, et al. The Itaconate Pathway Is a Central Regulatory Node Linking Innate Immune Tolerance and Trained Immunity. *Cell Metab*. 2019;29(1):211-220.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.09.003
111. Domínguez-Andrés J, Joosten LA, Netea MG. Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Curr Opin Immunol*. 2019;56:10-16. doi:10.1016/j.coi.2018.09.001
112. van der Meer JWM, Joosten LAB, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol*. 2015;68(1):40-44. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.019
113. Arts RJW, Blok BA, Aaby P, et al. Long-term in vitro and in vivo effects of γ -irradiated BCG on innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2015;98(6):995-1001. doi:10.1189/jlb.4ma0215-059r
114. Bekkering S, Blok BA, Joosten LAB, Riksen NP, Van Crevel R, Netea MG. In Vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016;23(12):926-933. doi:10.1128/CI.00349-16
115. Pereira JM, Hamon MA, Cossart P. A Lasting Impression: Epigenetic Memory of Bacterial Infections? *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):579-582. doi:10.1016/j.chom.2016.04.012
116. Domínguez-Andrés J, Arts RJW, Bekkering S, et al. In vitro induction of trained immunity in adherent human monocytes. *STAR Protoc*. 2021;2(1). doi:10.1016/j.xpro.2021.100365
117. Hoeksema MA, De Winther MPJ. Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(14):758-774. doi:10.1089/ars.2016.6695

118. De Luca M, Pels K, Moleirinho S, Curtale G. The epigenetic landscape of innate immunity. *AIMS Mol Sci.* 2017;4(1):110-139. doi:10.3934/molsci.2017.1.110
119. Arts RJW, Carvalho A, La Rocca C, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep.* 2016;17(10):2562-2571. doi:10.1016/j.celrep.2016.11.011
120. Sohrabi Y, Godfrey R, Findeisen HM. Altered Cellular Metabolism Drives Trained Immunity. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2018;29(9):602-605. doi:10.1016/j.tem.2018.03.012
121. Ochando J, Mulder WJM, Madsen JC, Netea MG, Duivenvoorden R. Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev Nephrol.* 2023;19(1):23-37. doi:10.1038/s41581-022-00633-5
122. Divangahi M, Aaby P, Khader SA, et al. Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol.* 2021;22(1):2-6. doi:10.1038/s41590-020-00845-6
123. Grievink HW, Moerland M. Sample aging profoundly reduces monocyte responses in human whole blood cultures. *J Immunol Res.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/8901485
124. Moorlag SJCFM, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clinical Microbiology and Infection.* 2019;25(12):1473-1478. doi:10.1016/j.cmi.2019.04.020
125. Chen Y, Zhang Y, Wang AY, Gao M, Chong Z. Accurate long-read de novo assembly evaluation with Inspector. *Genome Biol.* 2021;22(1):312. doi:10.1186/s13059-021-02527-4
126. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068-2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
127. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6614-6624. doi:10.1093/nar/gkw569
128. Cantalapiedra CP, Hernández-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol Biol Evol.* 2021;38(12):5825-5829. doi:10.1093/molbev/msab293
129. Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics.* 2008;9(1):75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
130. Syberg-Olsen MJ, Garber AI, Keeling PJ, McCutcheon JP, Husnik F. Pseudofinder: Detection of Pseudogenes in Prokaryotic Genomes. *Mol Biol Evol.* 2022;39(7). doi:10.1093/molbev/msac153
131. Chiner-Oms Á, Berney M, Boinett C, et al. Genome-wide mutational biases fuel transcriptional diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Nat Commun.* 2019;10(1):3994. doi:10.1038/s41467-019-11948-6

132. Coscolla M, Gagneux S, Menardo F, et al. Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microb Genom.* 2021;7(2). doi:10.1099/mgen.0.000477
133. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly (Austin).* 2012;6(2):80-92. doi:10.4161/fly.19695
134. Fedrizzi T, Meehan CJ, Grottola A, et al. Genomic characterization of Nontuberculous *Mycobacteria*. *Sci Rep.* 2017;7(1):45258. doi:10.1038/srep45258
135. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):e15-e15. doi:10.1093/nar/gku1196
136. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268-274. doi:10.1093/molbev/msu300
137. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239
138. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server):W52-W57. doi:10.1093/nar/gkm360
139. Krzywinski M, Schein J, Birol Í, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009;19(9):1639-1645. doi:10.1101/gr.092759.109
140. Cock PJA, Antao T, Chang JT, et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1422-1423. doi:10.1093/bioinformatics/btp163
141. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10(1):421. doi:10.1186/1471-2105-10-421
142. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38(7):3022-3027. doi:10.1093/molbev/msab120
143. Amézaga N, Sanjurjo L, Julve J, et al. Human scavenger protein AIM increases foam cell formation and CD36-mediated oxLDL uptake. *J Leukoc Biol.* 2013;95(3):509-520. doi:10.1189/jlb.1212660
144. Collins DM, Kawakami RP, Buddle BM, Wards BJ, de Lisle GW. Different susceptibility of two animal species infected with isogenic mutants of *Mycobacterium bovis* identifies *phoT* as having roles in tuberculosis virulence and phosphate transport. *Microbiology (N Y).* 2003;149(11):3203-3212. doi:10.1099/mic.0.26469-0

145. Noguera-Ortega E, Rabanal RM, Gómez-Mora E, Cabrera C, Luquin M, Julián E. Intravesical *Mycobacterium* *brumae* triggers both local and systemic immunotherapeutic responses against bladder cancer in mice. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-33253-w
146. Secanella-Fandos S, Noguera-Ortega E, Olivares F, Luquin M, Julián E. Killed but metabolically active mycobacterium *bovis* bacillus Calmette-Guérin retains the antitumor ability of live bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Urology*. 2014;191(5):1422-1428. doi:10.1016/j.juro.2013.12.002
147. Noguera-Ortega E, Rabanal RM, Secanella-Fandos S, Torrents E, Luquin M, Julián E. γ Irradiated Mycobacteria Enhance Survival in Bladder Tumor Bearing Mice although Less Efficaciously than Live Mycobacteria. *Journal of Urology*. 2016;195(1):198-205. doi:10.1016/j.juro.2015.07.011
148. D'Auria G, Torrents E, Luquin M, Comas I, Julián E. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium* *brumae* ATCC 51384. *Genome Announc*. 2016;4(2). doi:10.1128/genomeA.00237-16
149. Rahman SA, Singh Y, Kohli S, et al. Comparative Analyses of Nonpathogenic, Opportunistic, and Totally Pathogenic Mycobacteria Reveal Genomic and Biochemical Variabilities and Highlight the Survival Attributes of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*. 2014;5(6). doi:10.1128/mBio.02020-14
150. Jia X, Yang L, Li C, Xu Y, Yang Q, Chen F. Combining comparative genomic analysis with machine learning reveals some promising diagnostic markers to identify five common pathogenic non-tuberculous mycobacteria. *Microb Biotechnol*. 2021;14(4):1539-1549. doi:10.1111/1751-7915.13815
151. Benjak A, Avanzi C, Benito Y, et al. Highly Reduced Genome of the New Species *Mycobacterium* *uberis* , the Causative Agent of Nodular Thelitis and Tuberculoid Scrotitis in Livestock and a Close Relative of the Leprosy Bacilli. *mSphere*. 2018;3(5). doi:10.1128/mSphere.00405-18
152. Silva FJ, Santos-Garcia D, Zheng X, Zhang L, Han XY. Construction and Analysis of the Complete Genome Sequence of Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis*. *Microbiol Spectr*. 2022;10(3). doi:10.1128/spectrum.01692-21
153. Matsumoto Y, Kinjo T, Motooka D, et al. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1043-1053. doi:10.1080/22221751.2019.1637702
154. Sassi M, Drancourt M. Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics*. 2014;15(1):359. doi:10.1186/1471-2164-15-359
155. Newton-Foot M, Warren RM, Sampson SL, van Helden PD, Gey van Pittius NC. The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems. *BMC Evol Biol*. 2016;16(1):62. doi:10.1186/s12862-016-0631-2
156. Gcebe N, Michel A, Gey van Pittius NC, Rutten V. Comparative Genomics and Proteomic Analysis of Four Non-tuberculous *Mycobacterium* Species and *Mycobacterium tuberculosis*

- Complex: Occurrence of Shared Immunogenic Proteins. *Front Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00795
157. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(21):12420-12425. doi:10.1073/pnas.1635213100
158. Pym AS, Brodin P, Majlessi L, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med.* 2003;9(5):533-539. doi:10.1038/nm859
159. Mukhopadhyay S, Balaji KN. The PE and PPE proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis.* 2011;91(5):441-447. doi:10.1016/j.tube.2011.04.004
160. Fishbein S, van Wyk N, Warren RM, Sampson SL. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol.* 2015;96(5):901-916. doi:10.1111/mmi.12981
161. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. Evolution and expansion of the mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evol Biol.* 2006;6(1):95. doi:10.1186/1471-2148-6-95
162. Qian J, Chen R, Wang H, Zhang X. Role of the PE/PPE Family in Host–Pathogen Interactions and Prospects for Anti-Tuberculosis Vaccine and Diagnostic Tool Design. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.594288
163. Cantrell SA, Leavell MD, Marjanovic O, Iavarone AT, Leary JA, Riley LW. Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the mce1 operon mutant strain of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Microbiology.* 2013;51(5):619-626. doi:10.1007/s12275-013-3092-y
164. Fenn K, Wong CT, Darbari VC. Mycobacterium tuberculosis Uses Mce Proteins to Interfere With Host Cell Signaling. *Front Mol Biosci.* 2020;6. doi:10.3389/fmolb.2019.00149
165. Saini NK, Sharma M, Chandolia A, Pasricha R, Brahmachari V, Bose M. Characterization of Mce4A protein of Mycobacterium tuberculosis: role in invasion and survival. *BMC Microbiol.* 2008;8(1):200. doi:10.1186/1471-2180-8-200
166. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non Mycobacterial Virulence Genes in the Genome of the Emerging Pathogen Mycobacterium abscessus. *PLoS One.* 2009;4(6):e5660. doi:10.1371/journal.pone.0005660
167. Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, et al. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004;101(41):14925-14930. doi:10.1073/pnas.0406410101
168. Falkinham IJO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 2009;107(2):356-367. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x

169. Brambilla C, Llorens-Fons M, Julián E, et al. Mycobacteria clumping increase their capacity to damage macrophages. *Front Microbiol.* 2016;7(OCT). doi:10.3389/fmicb.2016.01562
170. Coros A, Callahan B, Battaglioli E, Derbyshire KM. The specialized secretory apparatus ESX-1 is essential for DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* Published online July 2008:???-??? doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06299.x
171. Gray TA, Derbyshire KM. Blending genomes: distributive conjugal transfer in mycobacteria, a sexier form of HGT. *Mol Microbiol.* 2018;108(6):601-613. doi:10.1111/mmi.13971
172. Alcaide F, Esteban J, González-Martin J, Palacios JJ. Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed).* 2017;35(8):527-533. doi:10.1016/j.eimce.2017.08.005
173. Bakula Z, Kościuch J, Safianowska A, et al. Clinical, radiological and molecular features of *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease. *Respir Med.* 2018;139:91-100. doi:10.1016/j.rmed.2018.05.007
174. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):545-582. doi:10.1128/CMR.05030-11
175. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resistance Updates.* 2012;15(3):149-161. doi:10.1016/j.drug.2012.04.001
176. Huh HJ, Kim SY, Jhun BW, Shin SJ, Koh WJ. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. *Infection, Genetics and Evolution.* 2019;72:169-182. doi:10.1016/j.meegid.2018.10.003
177. Iwao Y, Nakata N. Roles of the three *Mycobacterium smegmatis* katG genes for peroxide detoxification and isoniazid susceptibility. *Microbiol Immunol.* 2018;62(3):158-167. doi:10.1111/1348-0421.12574
178. Larsen MH, Vilchèze C, Kremer L, et al. Overexpression of *inhA* , but not *kasA* , confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis* , *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2002;46(2):453-466. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03162.x
179. Cheng G, Xu D, Wang J, et al. Isolation and identification of multiple drug resistant nontuberculous mycobacteria from organs of cattle produced typical granuloma lesions. *Microb Pathog.* 2017;107:313-316. doi:10.1016/j.micpath.2017.03.047
180. Yang T, Gan M, Liu Q, et al. SAM-TB: a whole genome sequencing data analysis website for detection of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance and transmission. *Brief Bioinform.* 2022;23(2). doi:10.1093/bib/bbac030
181. Guallar-Garrido S, Luquin M, Julián E. Analysis of the lipid composition of mycobacteria by thin layer chromatography. *Journal of Visualized Experiments.* 2021;2021(170). doi:10.3791/62368

182. Chiaradia L, Lefebvre C, Parra J, et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep.* 2017;7(1):12807. doi:10.1038/s41598-017-12718-4
183. Minnikin DE, Kremer L, Dover LG, Besra GS. The Methyl-Branched Fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol.* 2002;9(5):545-553. doi:10.1016/S1074-5521(02)00142-4
184. Gong Y, Wang J, Li F, Zhu B. Polysaccharides and glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* and their induced immune responses. *Scand J Immunol.* 2023;97(5). doi:10.1111/sji.13261
185. Guallar-Garrido S, Ez V, Sánchez-Chardi A, Luquin M, Julián E. Each mycobacterium requires a specific culture medium composition for triggering an optimized immunomodulatory and antitumoral effect. *Microorganisms.* 2020;8(5). doi:10.3390/microorganisms8050734
186. Popiela T, Kulig J, Czupryna A, Szczepanik AM, Zembala M. Efficiency of adjuvant immunochemotherapy following curative resection in patients with locally advanced gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2004;7(4):240-245. doi:10.1007/s10120-004-0299-y
187. Pei Q, Pan J, Ding X, Wang J, Zou X, Lv Y. Gemcitabine sensitizes pancreatic cancer cells to the CTLs antitumor response induced by BCG-stimulated dendritic cells via a Fas-dependent pathway. *Pancreatology.* 2015;15(3):233-239. doi:10.1016/j.pan.2015.04.001
188. Yuk JM, Shin DM, Song KS, et al. Bacillus Calmette-Guerin cell wall cytoskeleton enhances colon cancer radiosensitivity through autophagy. *Autophagy.* 2010;6(1):46-60. doi:10.4161/auto.6.1.10325
189. Yoo YC, Hata K, Lee KB, Azuma I. Inhibitory effect of BCG cell-wall skeletons (BCG-CWS) emulsified in squalane on tumor growth and metastasis in mice. *Arch Pharm Res.* 2002;25(4):522-527. doi:10.1007/BF02976612
190. Altundag K, Mohamed AS, Altundag O, Silay YS, Gunduz E, Demircan K. SRL172 (killed *Mycobacterium vaccae*) may augment the efficacy of trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *Med Hypotheses.* 2005;64(2):248-251. doi:10.1016/j.mehy.2004.07.016
191. Garg H, Gupta JC, Talwar GP, Dubey S. Immunotherapy approach with recombinant survivin adjuvanted with alum and MIP suppresses tumor growth in murine model of breast cancer. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018;48(3):264-269. doi:10.1080/10826068.2018.1425710
192. Daniel D, Chiu C, Giraudo E, et al. CD4+ T Cell-Mediated Antigen-Specific Immunotherapy in a Mouse Model of Cervical Cancer. *Cancer Res.* 2005;65(5):2018-2025. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3444
193. Chu NR, Wu HB, Wu TC, Boux LJ, Mizzen LA, Siegel MI. Immunotherapy of a human papillomavirus type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprised of *Mycobacterium bovis* BCG Hsp65 and HPV16 E7. *Cell Stress Chaperones.* 2000;5(5):401-405. doi:10.1379/1466-1268(2000)005<0401:ioahpt>2.0.co;2

194. Sharma C, Khan MA, Mohan T, Shrinet J, Latha N, Singh N. A synthetic chimeric peptide harboring human papillomavirus 16 cytotoxic T lymphocyte epitopes shows therapeutic potential in a murine model of cervical cancer. *Immunol Res.* 2014;58(1):132-138. doi:10.1007/s12026-013-8447-2
195. Kitamura A, Mastumoto S, Asahina I. Growth inhibition of HeLa cell by internalization of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo. *Cancer Cell Int.* 2009;9(1):30. doi:10.1186/1475-2867-9-30
196. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system review-article. *Nat Immunol.* 2018;19(1):10-19. doi:10.1038/s41590-017-0006-x
197. De la Cruz-Mosso U, García-Iglesias T, Bucala R, et al. MIF promotes a differential Th1/Th2/Th17 inflammatory response in human primary cell cultures: Predominance of Th17 cytokine profile in PBMC from healthy subjects and increase of IL-6 and TNF- α in PBMC from active SLE patients. *Cell Immunol.* 2018;324:42-49. doi:10.1016/j.cellimm.2017.12.010
198. 2018_Cañete_IL17.
199. Aotsuka A, Matsumoto Y, Arimoto T, et al. Interleukin-17 is associated with expression of programmed cell death 1 ligand 1 in ovarian carcinoma. *Cancer Sci.* 2019;110(10):3068-3078. doi:10.1111/cas.14174
200. Moorlag SJCFM, Röring RJ, Joosten LAB, Netea MG. The role of the interleukin-1 family in trained immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):28-39. doi:10.1111/imr.12617
201. Vierboom MPM, Dijkman K, Sombroek CC, et al. Stronger induction of trained immunity by mucosal BCG or MTBVAC vaccination compared to standard intradermal vaccination. *Cell Rep Med.* 2021;2(1). doi:10.1016/j.xcrm.2020.100185
202. van Puffelen JH, Keating ST, Oosterwijk E, et al. Trained immunity as a molecular mechanism for BCG immunotherapy in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2020;17(9):513-525. doi:10.1038/s41585-020-0346-4
203. Tarancón R, Domínguez-Andrés J, Uranga S, et al. New live attenuated tuberculosis vaccine MTBVAC induces trained immunity and confers protection against experimental lethal pneumonia. *PLoS Pathog.* 2020;16(4). doi:10.1371/journal.ppat.1008404
204. dos Santos JC, Barroso de Figueiredo AM, Teodoro Silva MV, et al. β -Glucan-Induced Trained Immunity Protects against Leishmania braziliensis Infection: a Crucial Role for IL-32. *Cell Rep.* 2019;28(10):2659-2672.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.08.004
205. Acevedo OA, Berrios R V., Rodríguez-Guilarte L, Lillo-Dapremont B, Kalergis AM. Molecular and Cellular Mechanisms Modulating Trained Immunity by Various Cell Types in Response to Pathogen Encounter. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.745332
206. Lobo N, Afferi L, Moschini M, et al. Epidemiology, Screening, and Prevention of Bladder Cancer. *Eur Urol Oncol.* 2022;5(6):628-639. doi:10.1016/j.euo.2022.10.003

207. Arts RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):89-100.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.12.010
208. Tarancón R, Domínguez-Andrés J, Uranga S, et al. New live attenuated tuberculosis vaccine MTBVAC induces trained immunity and confers protection against experimental lethal pneumonia. *PLoS Pathog*. 2020;16(4):e1008404. doi:10.1371/journal.ppat.1008404

ANEXO I

Genomic analysis of *Mycobacterium brumae* sustains its nonpathogenic and immunogenic phenotype.

Chantal Renau-Mínguez, **Paula Herrero-Abadía**, Paula Ruiz-Rodriguez, Vicente Sentandreu, Eduard Torrents, Álvaro Chiner-Oms, Manuela Torres-Puente, Iñaki Comas, Esther Julián and Mireia Coscolla

Frontiers in Microbiology. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2022.982679