



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster en Salud Global

Estudio de inmunidad entrenada inducida por BCG en macrófagos primarios murinos

Study of BCG-induced trained immunity in murine primary macrophages

Autor/es

Iñaki Piñas Sádaba

Director/es

Juan Ignacio Aguiló  
Miguel Araujo

Facultad de Veterinaria

2024

---

# ÍNDICE

1.	LISTADO DE ABREVIATURAS .....	1
2.	RESUMEN/ABSTRACT .....	3
3.	INTRODUCCIÓN .....	4
3.1.	El sistema inmunológico: La inmunidad innata frente a la adaptativa .....	4
3.2.	La inmunidad entrenada, qué es y su importancia en la respuesta inmune del organismo.....	5
3.2.1.	BCG.....	9
3.3.	El sistema inmune y su actividad frente a las infecciones .....	10
3.4.	La inmunología del cáncer .....	13
3.4.1.	Los macrófagos asociados a tumores (TAM).....	14
3.4.2.	La inmunidad entrenada en el contexto del cáncer.....	15
4.	OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	17
5.	MATERIALES Y METODOS .....	18
5.1.	Ratones .....	18
5.2.	Extracción y preservación de médulas óseas.....	18
5.3.	Obtención y cultivo celular de BMDMs .....	19
5.3.1.	Generación de medios condicionados .....	20
5.4.	Exposición de los macrófagos a un estímulo externo secundario .....	20
5.5.	Marcaje para citometría .....	21
5.6.	Citometría y ELISAS .....	22
5.6.1.	Software .....	22
6.	RESULTADOS .....	24
6.1.	Optimización de la diferenciación a BMDMs.....	24
6.1.1.	Estudio de los marcadores F4/80 y Cd11b.....	24
6.1.2.	Recuento BMCs y BMDMs.....	26
6.2.	Evaluación del “training” en BMDMs tras un estímulo secundario en ratones vacunados con BCG .....	27
6.2.1.	Estimulación con LPS (10 ng/mL).....	27
6.2.2.	Estimulación con distintas concentraciones de LPS o con presencia de bacterias	31
6.3.	Evaluación del “training” en BMDMs expuestos a un estímulo secundario (LPS/bacterias) y a medio condicionado tumoral .....	36
6.3.1.	Efecto del MC en macrófagos estimulados solo con LPS .....	36
6.3.2.	Efecto del MC en macrófagos estimulados con LPS o bacterias .....	39
7.	DISCUSIÓN.....	41
8.	CONCLUSIONES .....	44
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

# 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

**μl** – Microlitros.

**BCG** – Bacillus Calmette-Guérin.

**BMCs** – Células derivadas de médula ósea.

**BMDMs** – Macrófagos derivados de médula ósea.

**CAF** - Fibroblastos asociados al cáncer.

**CE** - Células endoteliales.

**NK** – Natural Killers.

**CFU** – Unidades formadoras de colonias.

**CIBA** – Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón.

**CIS** – Carcinoma in situ.

**DAMP** – Patrones moleculares asociados a daños.

**DMSO** – Dimetilsulfóxido.

**FBS** -Suero fetal bovino.

**FDA** – Administración de Alimentos y Medicamentos.

**FMI** – Fluorescence Mean Intensity.

**FMO** – Fluorescence Minus One.

**HSC** – Células madre hematopoyéticas.

**HSPC** – Células madre y progenitoras hematopoyéticas.

**IL** - Interleucina.

**IV** – Intravenosa.

**LPS** – Lipopolisacárido.

**MC** – Medio condicionado tumoral.

**M-CSF** – Factor estimulante de colonias de macrófagos.

**MDP** – Muramil dipéptido.

**MDSC** – Células supresoras derivadas de mieloides.

**MHC-II** – Complejo Mayor de histocompatibilidad de tipo clase II.

**mL** – Mililitros.

**MO** – Médula ósea.

**ng** – Nanogramos.

**NMIBC** – Cáncer de vejiga no músculo-invasivo (NMIBC).

**OMS** – Organización Mundial de la Salud.

**P/S** – Penicilina/Streptomidina.

**PAI** – Programa Ampliado de Inmunización.

**PAMP** – Patrones moleculares asociados a patógenos.

**PD-1** - Proteína de muerte celular programada 1.

**PD-L1** - Ligando 1 de muerte celular programada.

**PGE2** – Prostaglandina E2.

**PRRs** – Receptores de reconocimiento de patrones.

**rcf** – Fuerza centrífuga relativa.

**ROS** – Especies reactivas de oxígeno.

**TAM** - Macrófagos asociados a tumores.

**TMC** - Tumor-conditioned medium.

**TME** – Microambiente tumoral.

**TNF** – Factor de necrosis tumoral.

## 2. RESUMEN/ABSTRACT

El presente estudio explora cómo la vacunación con BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) puede inducir "inmunidad entrenada" en progenitores de médula ósea de ratones, dando lugar a macrófagos diferenciados, derivados de médula ósea de ratones (BMDMs) con un fenotipo basal ya entrenado. Nos referimos como inmunidad entrenada a una forma de memoria inmune innata que mejora la respuesta del sistema inmunológico a infecciones posteriores. Nuestros experimentos evaluaron los efectos de BCG en la respuesta inflamatoria y antimicrobiana de los BMDMs tras un segundo estímulo con lipopolisacárido (LPS) o bacterias y posteriormente en presencia de medio condicionado tumoral (MC). Los principales hallazgos observados incluyen la mayor activación basal de macrófagos "entrenados" con BCG, evidenciada por una mayor expresión de marcadores de activación. Además, utilizando el lipopolisacárido (LPS) como estímulo secundario, demostramos el papel que puede tener la inmunidad entrenada no solo en mejorar la activación de macrófagos, sino también de mejorar su capacidad de desarrollar tolerancia a estímulos hiperinflamatorios. Finalmente, nuestros resultados sugieren que los macrófagos entrenados por BCG serían más refractarios a estímulos inmunosupresores generados por las células tumorales. Las implicaciones de este estudio son amplias, desde mejorar la efectividad de las vacunas hasta potenciales aplicaciones en terapias contra el cáncer y otras enfermedades infecciosas.

*The present study explores how BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) vaccination can induce "trained immunity" in bone marrow progenitors of mice, leading to differentiated macrophages, derived from mouse bone marrow (BMDMs) with an already trained basal phenotype. We refer to trained immunity as a form of innate immune memory that enhances the immune system's response to subsequent infections. Our experiments evaluated the effects of BCG on the inflammatory and antimicrobial response of BMDMs following a second stimulus with lipopolysaccharide (LPS) or bacteria and subsequently in the presence of tumor-conditioned medium (TCM). The main findings observed include the increased basal activation of "trained" macrophages with BCG, evidenced by a higher expression of activation markers. Additionally, using lipopolysaccharide (LPS) as a secondary stimulus, we demonstrated the role that trained immunity can play not only in enhancing macrophage activation but also in improving their ability to develop tolerance to hyperinflammatory stimuli. Finally, our results suggest that BCG-trained macrophages would be more refractory to immunosuppressive stimuli generated by tumor cells. The implications of this study are broad, from improving vaccine effectiveness to potential applications in therapies against cancer and other infectious diseases.*

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1. El sistema inmunológico: La inmunidad innata frente a la adaptativa

El sistema inmunológico es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citocinas cuya función principal es la defensa del huésped gracias a su capacidad para reconocer, repeler y erradicar patógenos y otras moléculas extrañas (1).

Para ejercer su acción protectora, el sistema inmune cuenta con barreras físicas como la piel y mucosas y con células fagocíticas (macrófagos, monocitos), células inflamatorias (basófilos, neutrófilos y eosinófilos), células asesinas naturales (NK) y moléculas como el sistema del complemento, citocinas como los interferones, etc (2). Todos estos mecanismos de defensa aparecen de forma inespecífica ante la exposición a organismos infecciosos u otras moléculas extrañas y es lo que se conoce como inmunidad innata o inespecífica. Sin embargo, otros mecanismos son inducidos o estimulados tras la exposición a sustancias extrañas y son específicos para cada uno de ellos variando así su magnitud y capacidad defensiva con el antígeno al que se dirigen. A estos mecanismos se los denomina inmunidad adquirida o específica y sus principales protagonistas son los linfocitos B (productores de anticuerpos) y T y las células presentadoras de antígeno (3).

Ambas respuestas se diferencian especialmente por su velocidad y especificidad de la reacción. Mientras que la inmunidad innata proporciona una protección instantánea (en las primeras horas o días) y es de respuesta rápida, a veces daña a los tejidos por ser poco específica. Lo contrario ocurre en el caso de la adaptativa, la cual se divide en respuesta humoral (Inmunoglobulinas o anticuerpos, sistema del complemento y Linfocitos B) y celular (Linfocitos T) y se activa en respuesta a un ataque específico (4). Ésta última produce reacciones que tardan varios días o semanas en desarrollarse (**Figura 1**) pero como se ha mencionado anteriormente son específicas del antígeno e incluyen propiedades tales como la especificidad, falta de reactividad frente a lo propio (tolerancia) y memoria inmunológica clásica (5 y 6).

No obstante, la respuesta inmune innata y adaptativa están interconectadas ya que las células inmunes innatas ante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAMP) autoderivados de una inflamación estéril, inducen rápidamente la secreción de citocinas inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral (TNF). Estas citocinas serán las que estimularán la generación y presentación de epítopos antígenicos que activen la respuesta inmune adaptativa (7).

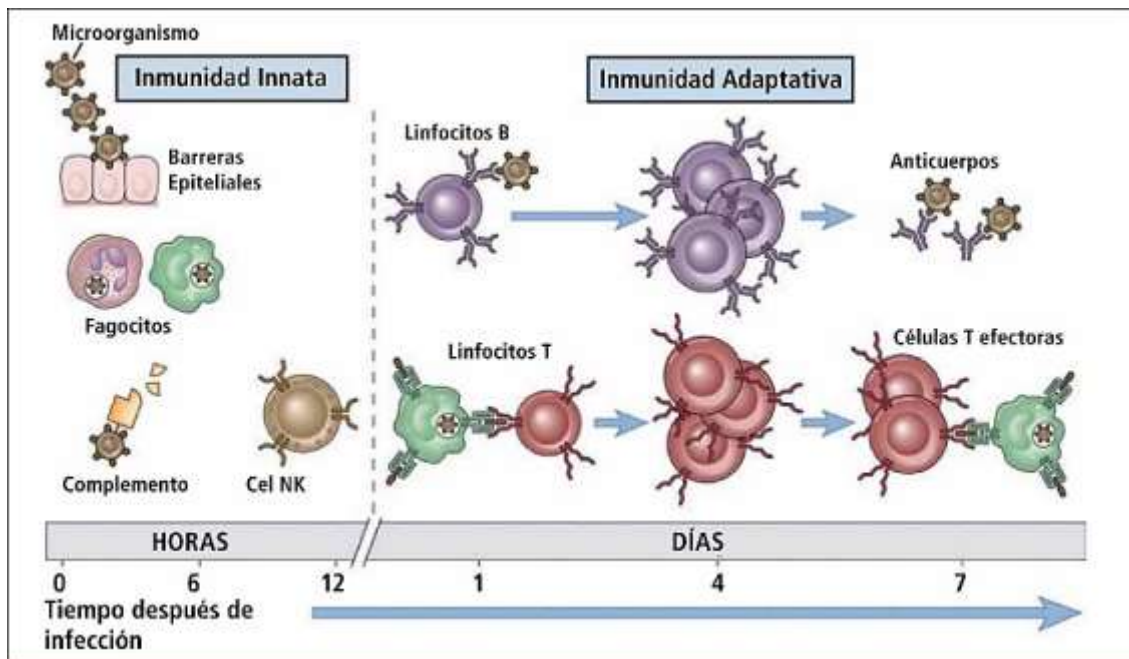


Figura 1. Sistema inmune innato y adaptativo (8).

### 3.2. La inmunidad entrenada, qué es y su importancia en la respuesta inmune del organismo

La distinción esquemática de inmunidad innata e inmunidad adaptativa se ha cuestionado (7 y 8) por el descubrimiento de que, en los invertebrados, los cuales carecen de inmunidad adaptativa, al exponerse o estimularse con microbios o sus componentes (ej: Lipopolisacárido (LPS), paredes celulares de levadura, etc.) se desencadena una respuesta inmune mediada por células cuya exposición protege contra infecciones posteriores durante días o semanas después de la exposición preliminar (9). Esto supone, por tanto, que no solo la inmunidad adaptativa adquiere memoria específica tras la infección, sino que también la memoria inmune innata puede desarrollar mecanismos de memoria inmune tras haber sido expuesta a agresiones previas (10). A este fenómeno se le conoce como inmunidad entrenada o inmunidad innata adaptativa (1).

La inmunidad entrenada se diferencia de la adaptativa clásica en que responde a patrones moleculares (PAMP o DAMP), que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (11), mejorando la respuesta inmune de manera general. En contraste, la inmunidad adaptativa clásica es más específica y se dirige a patógenos iguales o muy similares (1). Sin embargo, es improbable que las células inmunes innatas con un alto recambio como los neutrófilos experimenten estos cambios ya que su alta tasa de renovación dificulta la retención

de memoria de un insulto anterior. Serían por tanto células tales como monocitos, macrófagos o células asesinas naturales (células NK) que poseen una menor renovación las más propensas a ser “entrenadas” (12). Así, el fenotipo de dichas células se caracterizaría por elevados niveles de mediadores proinflamatorios, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y especies reactivas de oxígeno (ROS) y mayores actividades antimicrobianas y antitumorales (13).

Inicialmente, el efecto de la inmunidad entrenada se observó en células mieloides maduras tales como fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), que mostraban una respuesta mejorada y duradera a los componentes microbianos tras una exposición previa a *C. albicans*,  $\beta$ -glucano o BCG (12 y 14). Este efecto también se demostró en las células NK, donde los ratones a los que se les había transferido células NK “de memoria” (previamente expuestas a la infección) mostraban una mayor protección que aquellos infectados por primera vez, demostrando así características inmunes adaptativas (15). Se observó que esta respuesta mejorada es independiente de la inmunidad adaptativa y está impulsada por modificaciones epigenéticas en los fagocitos mononucleares (16 y 17). Sin embargo, estas células deben estar en contacto con el patógeno para desarrollar “training”. Esto último sumado al hecho de que la vida útil de los monocitos, macrófagos y células NK es relativamente corta, la eficacia de las estrategias vacunales dirigidas a estas células para generar memoria inmune innata a largo plazo es limitada (18).

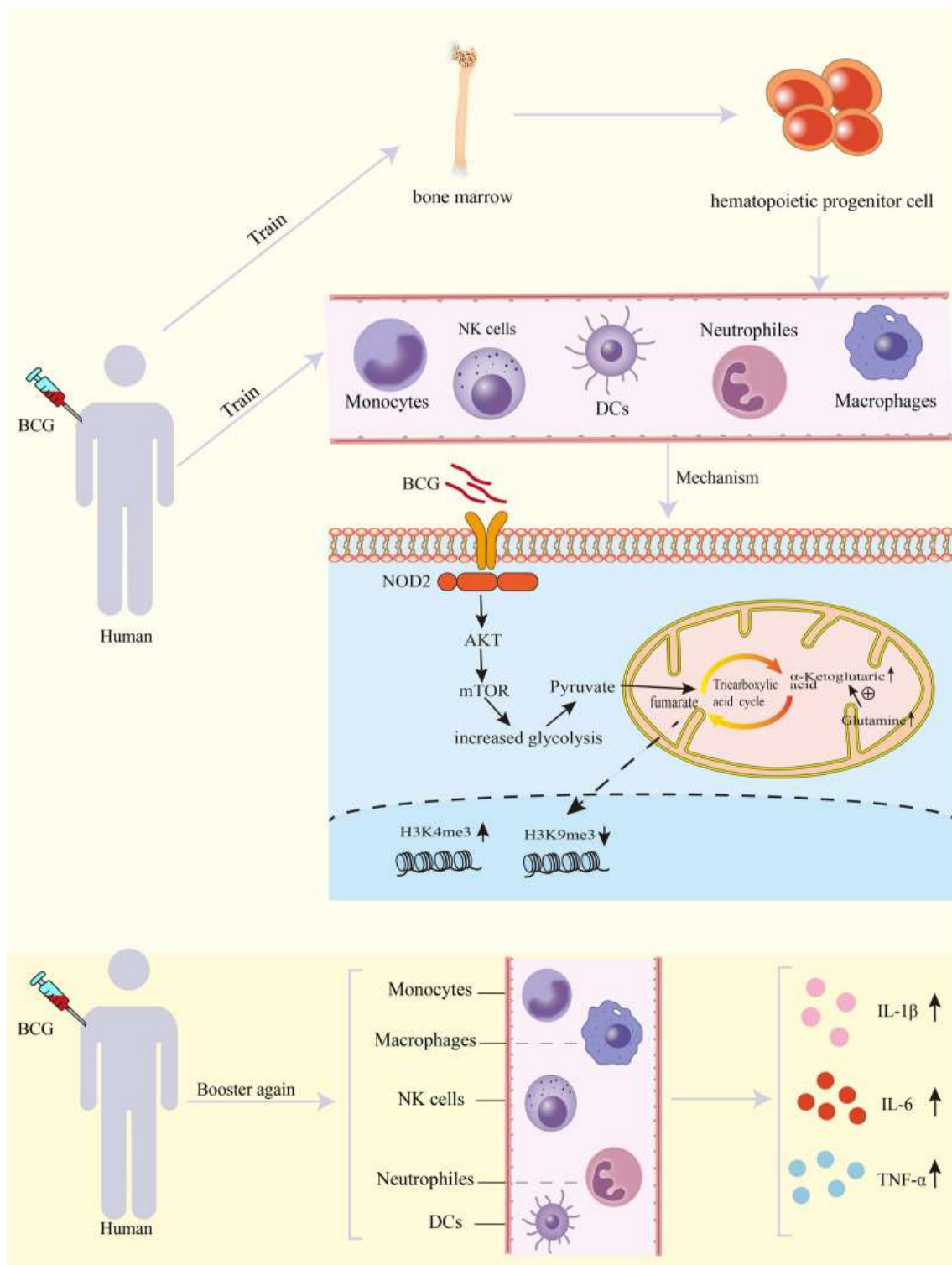
No obstante, en 2018 se descubrió que el “training” también podía inducirse en células de la médula ósea (MO) con una vida útil más larga, específicamente en las células madre hematopoyéticas (HSC). Estas células son las responsables de producir los progenitores hematopoyéticos multipotentes que generan todas las células del sistema sanguíneo de los mamíferos (18). Este descubrimiento sugiere que la inmunidad entrenada no solo afecta a células maduras en circulación, sino también a las células madre en la médula ósea (**figura 2**), proporcionando una base para respuestas inmunes mejoradas y duraderas (19).

El reconocimiento de DAMP y PAMP induce una reprogramación epigenética y metabólica a largo plazo en estas células (20) produciendo modificaciones en las histonas y una persistente modificación de la mielopoyesis, que se refleja en una respuesta inmune mejorada tras un estímulo secundario (12). Como ejemplo de PAMP/DAMP se ha estudiado la vacuna del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y el  $\beta$ -glucano, demostrándose que pueden influir en la inmunidad entrenada, alterando el microambiente de la médula ósea (MO) y afectando a la función de las células madre y progenitoras hematopoyéticas (18).

Se ha observado que la vacunación con BCG y la vacuna contra el virus del sarampión, reducen la mortalidad de enfermedades inespecíficas y mejoran las respuestas inmunes a otras vacunas, como la del virus de la influenza. Esto sugiere que el historial de vacunación puede afectar el estado inmunológico de manera clínicamente relevante (21). Además, la inmunidad entrenada también puede tener aplicaciones en el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas (22). No obstante, hay que tener en cuenta que la inmunidad entrenada está regulada en múltiples niveles, (3) y es posible que su inducción no siempre tenga efectos beneficiosos. Un ejemplo de esto es la arterosclerosis, donde se ha observado que los cristales de colesterol depositados en la placa aterosclerótica activan de manera proinflamatoria los macrófagos impulsando la respuesta inflamatoria persistente. Esto podría inducir la reprogramación de macrófagos, haciéndolos permanecer inflamatorios incluso después de retornar una dieta normal. No obstante, aumentar la solubilidad del colesterol y promover su eliminación podría reprogramar los macrófagos hacia un perfil menos inflamatorio, ofreciendo un enfoque terapéutico potencial para este tipo de enfermedades (21).

Comprender y aprovechar la inmunidad entrenada puede tener importantes implicaciones en la prevención y el tratamiento de una amplia gama de enfermedades bacterianas, virales e infecciones fúngicas oportunistas en pacientes inmunocomprometidos e incluso a la lucha contra los tumores malignos (24). Los mecanismos subyacentes, como la reprogramación metabólica y epigenética, son esenciales para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas y los cambios en la glucólisis, el metabolismo de la glutamina y la biosíntesis del colesterol son cruciales para el fenotipo entrenado (25 y 26). La metilación y acetilación de histonas producidas por las modificaciones epigenéticas también juegan un papel importante, induciendo un fenotipo proinflamatorio y mejorando la respuesta inmune a largo plazo (25 y 27).

Además de los cambios a nivel celular, la inmunidad innata entrenada implica una respuesta sistémica caracterizada por una mayor capacidad de respuesta de las células inmunitarias innatas tras la reestimulación, proporcionando una protección a largo plazo. Diversas investigaciones han demostrado que tanto el  $\beta$ -glucano como BCG pueden reprogramar las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) con tendencia mieloide para generar inmunidad innata entrenada (19). En humanos, se ha demostrado que la vacunación con BCG induce cambios epigenéticos en estas células, resultando en una inmunidad entrenada persistente en las células periféricas (28).



**Figura 2. BCG induce inmunidad entrenada en células mieloides circulantes maduras y células progenitoras hematopoyéticas. BCG produce una reprogramación metabólica y epigenética en estas células y tras la reestimulación con BCG se incrementa la producción de citocinas proinflamatorias (29).**

### 3.2.1. BCG

La vacuna Bacille Calmette-Guérin (BCG) se introdujo por primera vez en 1921 y es la única vacuna utilizada para prevenir la tuberculosis (30). Esta vacuna se basa en una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) aislada por Albert Calmette y Camille Guéri y desarrollada a partir de una serie de pases en serie que durante 13 años (29). Desde 1974, está incluida en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), dirigido a la vacunación infantil mundial. Aunque la mayoría de los expertos coinciden en que esta vacuna es eficaz con las formas más graves de tuberculosis infantil, su efectividad en adultos varía, lo que resulta en políticas de vacunación con BCG muy diferentes entre países (31). No obstante, después de 100 años de ser una estrategia eficaz para el control de la tuberculosis, la mejora en las estrategias de inmunización con BCG han revelado efectos inmunológicos nuevos y notables (32). Así, BCG no sólo se utiliza para la prevención de la tuberculosis, sino que también induce un efecto protector en el organismo conocido como inmunidad entrenada.

Entre las distintas aplicaciones de esta vacuna, además de la tuberculosis, destaca su uso como terapia contra el cáncer. En 1959, se demostró su efecto antitumoral (29) y en 1976 se utilizó por primera vez para el tratamiento de cáncer de vejiga superficial (33). Actualmente, la terapia con BCG para el cáncer de vejiga no músculo- invasivo (NMIBC) sigue siendo la terapia estándar ya que se ha demostrado que erradica el carcinoma in situ (CIS), retrasa la progresión a etapas invasivas en el musculo y evita la recurrencia y progresión (34), mejorando la supervivencia de pacientes de alto riesgo (35). Además, su uso en cáncer de vejiga se relaciona con una reducción significativa de padecer Alzheimer y Parkinson (36). La BCG también se ha estudiado en el contexto del cáncer gástrico (37), de colon y en un modelo de metástasis de pulmón donde se ha visto que una única inoculación IV en ratones con BCG, redujo significativamente la carga tumoral más que otras vías como la intranasal o la subcutánea (38). Esto convierte a BCG en una de las inmunoterapias más prometedoras y exitosas hasta la fecha en este campo (39).

Además de su uso terapéutico contra el cáncer, se ha observado que BCG puede tener un efecto antiviral sobre una gran variedad de virus. Un ejemplo de ello es el de prevención de infecciones respiratorias agudas en ancianos inoculados con BCG durante 3 meses consecutivos (40). Este efecto preventivo también se ha observado en infecciones causadas por otros virus como el herpes y la influenza (41) o en el tratamiento de verrugas en niños (42), aunque en los últimos años se ha investigado el potencial papel protector de la vacunación con BCG contra el COVID-19 (43).

BCG también puede tener un enorme potencial para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, ya que se ha visto que en ratones desempeña un papel fundamental en el tratamiento de enfermedades cerebrales autoinmunes, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (44) e incluso la reducción de la hiperglucemia en pacientes con diabetes tipo 1 avanzada (45).

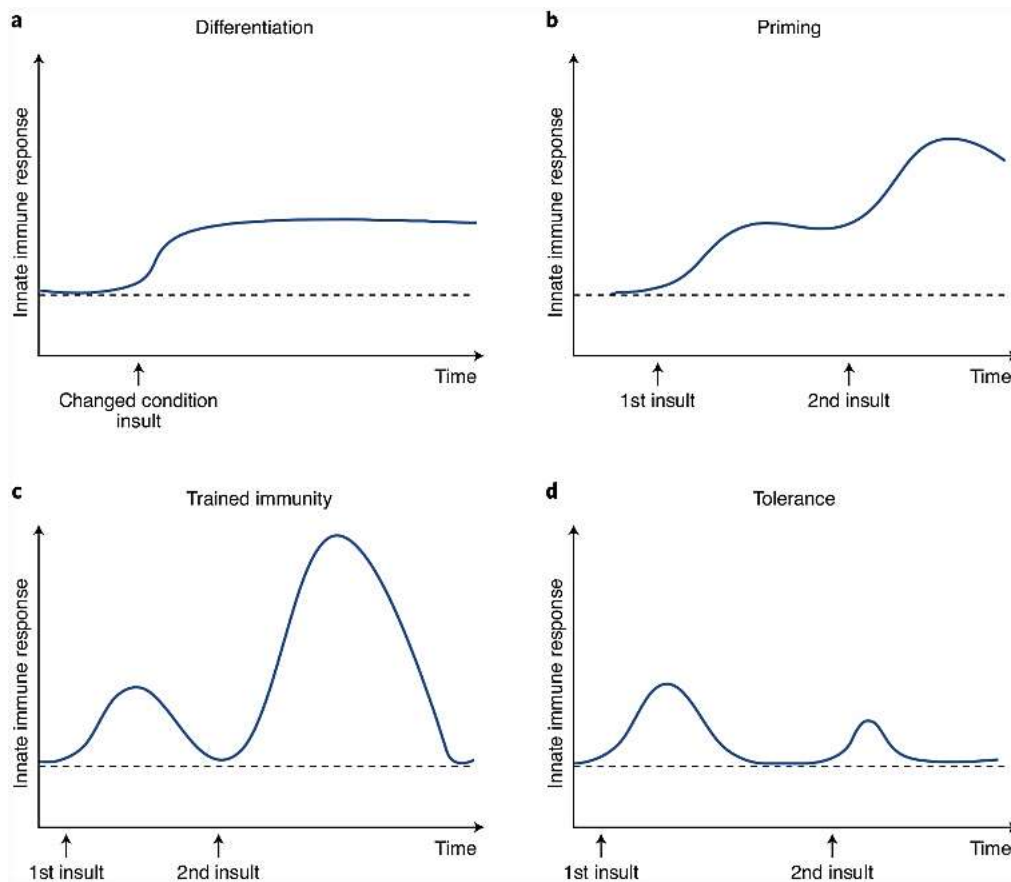
En conclusión, BCG parece tener muchos efectos inespecíficos beneficiosos, muchos aún desconocidos, para diversas enfermedades. No obstante, el efecto protector de esta vacuna no siempre tiene una evidencia muy sólida, por lo que es necesario seguir investigando al respecto.

### 3.3. El sistema inmune y su actividad frente a las infecciones

El sistema inmunológico se encarga de reducir el impacto dañino de las infecciones y mantener la homeostasis del huésped mediante la interrelación de sus componentes innatos y adaptativos (7, 46 y 47). De este modo, ante una infección, las células y/o moléculas solubles implicadas en el mantenimiento de la integridad de barreras epiteliales tienen un doble efecto protector contra los patógenos. Por un lado, proporcionan una barrera física de entrada y por otro lado, producen péptidos antimicrobianos entre otras moléculas, que modulan la interfaz epitelial (48 y 49).

Es importante tener en cuenta que la magnitud (dosis baja frente a dosis alta) y duración (corta frente a larga) de la estimulación de las células inmunitarias innatas induce adaptaciones específicas para mejorar las respuestas inmunitarias o prevenir la inmunidad o inmunopatología excesiva. Inicialmente las células innatas son inmaduras y se “diferencian” para adoptar un cambio fenotípico y funcional maduro. A continuación, cuando son expuestas a un primer estímulo (“priming”) (**Figura 3**), cambian su estado funcional mediante una reprogramación epigenética y no vuelven a niveles basales hasta que no desaparece el estímulo primario, aunque sus alteraciones epigenéticas persisten (50). De esta forma al ser reexpuestas a un estímulo secundario homólogo o heterólogo, las células pueden, o bien, exhibir una mayor capacidad de respuesta a desafíos posteriores, mejorando la protección contra infecciones secundarias, lo que se conoce como “training” (50, 12 y 51) o pueden evitar o minimizar daño tisular causado por la

respuesta inmunitaria reduciendo la gravedad de la enfermedad sin alterar la carga patógena, lo que se conoce como “tolerancia” (47, 49, 50 y 52).

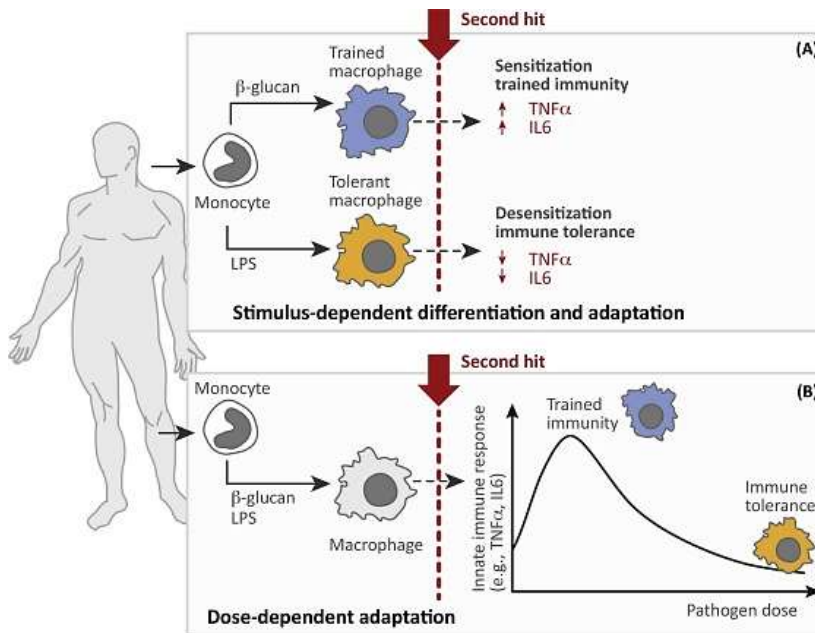


**Figura 3. Presentación esquemática del comportamiento de las respuestas inmunes innatas durante los diferentes programas adaptativos inducidos en células inmunes innatas. a: Diferenciación. b: Priming o cebado. c: Inmunidad entrenada (“training”). d: Tolerancia (50).**

De este modo, ante un estrés celular o lesión tisular producido por DAMP, se describe una reprogramación funcional a largo plazo que modifica el fenotipo de las células. Esto puede resultar en un "training" caracterizado por un incremento en los mediadores proinflamatorios (como IL-1B, TNF- $\alpha$  o IL-6) y mayores actividades antimicrobianas y antitumorales ante estímulos secundarios (5 y 53). En contraste, también puede ocurrir una "tolerancia", es decir, un estado de falta de respuesta de las células inmunitarias frente a estímulos secundarios. Este estado se caracteriza por una disminución de factores proinflamatorios y un aumento de la respuesta antiinflamatoria (54 y 55).

Hasta la fecha, tanto el “training” como las reacciones de tolerancia están impuestos principalmente por alteraciones que ocurren en diferentes clases de PRRS (23) y se han revelado dos hipótesis a raíz de investigaciones emergentes acerca de la inducción de inmunidad

entrenada y tolerancia en células inmunes innatas: Primero, la hipótesis dependiente del factor estresante, donde PAMP/DAMP específicos ( $\beta$ -glucano o BCG) desencadenan la inducción de “training” mientras que la endotoxina Gram-negativa (LPS) promueve sólo reacciones tolerantes; y la hipótesis dependiente de la dosis, que demuestra una dosis-respuesta bifásica donde a dosis bajas se da un fenotipo entrenado (14) mientras que la exposición a dosis altas desencadena un fenotipo inmunosupresor (tolerancia) después de una agresión secundaria (**Figura 4**). Ambas características adaptativas se han asociado a la reprogramación epigenética y metabólica (25).



**Figura 4. Memoria de las células inmunitarias innatas inducida por PAMP.** Para estudiarla se emplea habitualmente un procedimiento de “dos golpes” en el que primero se tratan con un PAMP específico ( $\beta$ -glucano o LPS) durante un corto periodo de tiempo (24h) y posteriormente se elimina el estímulo. Una semana después se induce otro “golpe” con LPS que induce la liberación de citocinas en función del tratamiento con el primer “golpe”(14). **A:**  $\beta$ -glucano y LPS inducen respuestas opuestas en las células inmunes innatas. **B:** Situación hipotética de las respuestas bifásicas dependientes de la dosis de las células inmunes innatas a los PAMP (56).

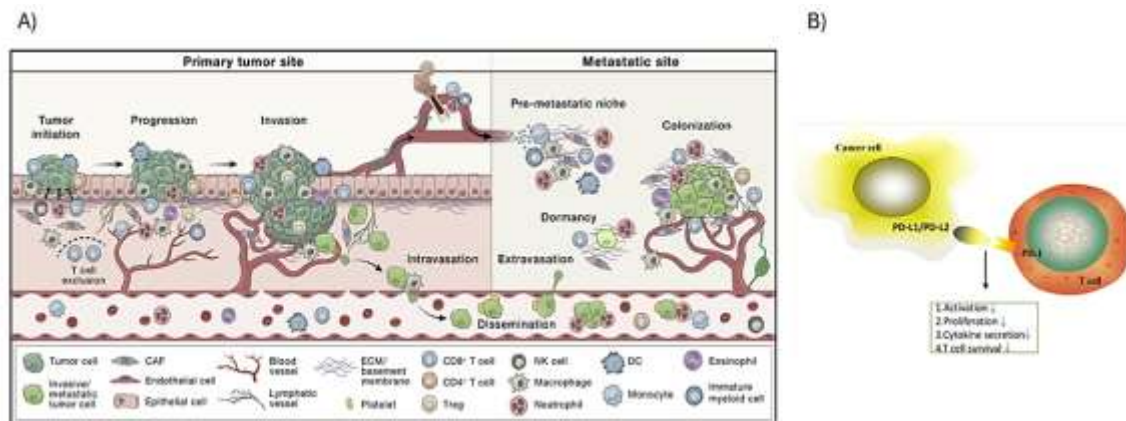
Este hecho se ha respaldado en estudios tales como uno en el que al aplicar dosis bajas de LPS antes de cualquier ataque séptico se observaba una mayor mortalidad de ratones caracterizados por elevados niveles de factores proinflamatorios. Sin embargo, en aquellos con dosis altas de LPS se desencadenaba un fenotipo inmunosupresor representado por niveles bajos de TNF- $\alpha$  y baja mortalidad por sepsis (57). No obstante, se ha estudiado que aunque los ratones LPS tolerantes tienen alterado su fenotipo y disminuida su capacidad para producir genes

proinflamatorios, reestimándolos con LPS durante 4h pueden responder al estímulo de LPS de manera intensa (58).

Por tanto, es necesario conocer los mecanismos de estas respuestas adaptativas para un mejor desarrollo terapéutico y comprensión del sistema inmune ya que una inducción inadecuada de estas señales puede, o bien promover una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias o al cáncer debido a la inmunosupresión generada o contribuir a la progresión del estado proinflamatorio debido a una hiperactivación descontrolada como en el caso de enfermedades como la aterosclerosis (inmunidad entrenada) (13).

### 3.4. La inmunología del cáncer

El cáncer es una enfermedad crónica compleja y heterogénea caracterizada por una elevada capacidad adaptativa para evadir al sistema inmune y adquirir resistencia tanto a la radioterapia como a la quimioterapia (59). Esta complejidad se hace evidente al estudiar el microambiente tumoral (TME) que involucra desde fibroblastos asociados al cáncer (CAF), células endoteliales (CE) y pericitos hasta células inmunes adaptativas (Células T CD8+ y CD4+, células T reguladoras y células B) e innatas (macrófagos, monocitos y células NK entre otras). Tanto las características intrínsecas como proporción de estas células no cancerosas dentro del tumor dependen del órgano donde se desarrolle (**Figura 5A**) (60), y su interacción con otras células cancerosas promueve el intercambio de información entre las células pudiendo transmitir su fenotipo protumoral y promover la progresión del cáncer (61). Un ejemplo de interacción celular es el de la vía de PD-L1/PD-1 (**Figura 5B**). La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) desempeña un papel vital en la inhibición de las respuestas inmunitarias y promoción de la autotolerancia reduciendo la actividad de los linfocitos T. Esta proteína combinada con el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1) que es un factor coinhibidor de la respuesta inmunológica, son los responsables de la evasión de la vigilancia inmunológica del cáncer (62).



**Figura 5. Microambiente tumoral (MTE) y las interacciones entre sus células. A: Regulación microambiental de la progresión y metástasis del tumor primario(60). B: Vía de PD-1/PD-1 en la que se inhibe la activación, proliferación y supervivencia de las células T y la secreción citotóxica dentro de las células cancerosas (62).**

Entre las células que componen el TME se distinguen aquellas que sugieren una resistencia a la progresión tumoral y que engloba a las células T CD8+ citotóxicas, células auxiliares Th1 e incluso las propias citocinas asociadas; Y aquellas, como los macrófagos asociados a tumores (TAM), que pueden promover el desarrollo del cáncer, lo que refleja el papel multifacético de sistema inmune (63).

### 3.4.1. Los macrófagos asociados a tumores (TAM)

Los macrófagos asociados a tumores (TAM) representan una población de células inmunes provenientes de distintos orígenes (Saco vitelino o derivados de médula ósea, por ejemplo) con propiedades altamente plásticas y funciones tanto pro como antitumorales. Entre las funciones protumorales destacan la promoción de la invasión de las células tumorales en el parénquima vecino y la extravasación de las mismas en el parénquima distante, la creación de un entorno angiogénico y la intravasación de células tumorales en el torrente sanguíneo y/o linfa (64 y 65) Todas estas funciones van acompañadas de la inmunosupresión, formación de metástasis y resistencia a la terapia (66). Los macrófagos, por tanto, son un componente principal del infiltrado leucocitario de los tumores y desempeñan un papel esencial en la inflamación relacionada con el cáncer (67).

No obstante, el papel tumoral de los macrófagos depende de su estado polarizado(68). Dependiendo de las diferentes señales de activación, pueden experimentar activación polarizada en respuesta a señales derivadas de patógenos (69). Mientras que los PAMP derivados de bacterias, como el LPS impulsan la activación clásica (M1), las citocinas tipo 2 IL-4 e IL-13 polarizan a los macrófagos reclutados al estado M2 alternativo (70). Los M1 se caracterizan por una actividad proinflamatoria mostrando una expresión elevada del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II (MHC-II), IL-12 y TNF- $\alpha$  que lidera una actividad tumoricida. En su contra, los macrófagos activados alternativamente (M2) expresan niveles bajos de MHC-II, IL-12 y TNF- $\alpha$  mientras que expresan niveles elevados de prostaglandina E2 (PGE2) lo que favorece la actividad promotora de tumores. En el microambiente tumoral, la mayoría de los macrófagos tienen un fenotipo similar al M2 ya que en las primeras etapas de inicio del tumor se produce un cambio de activación de M1 a M2, lo que plantea una posible diana terapéutica dirigida a la repolarización del fenotipo de los macrófagos M2 (71).

### 3.4.2. La inmunidad entrenada en el contexto del cáncer

La activación eficiente del sistema inmune es la base de la eliminación de células cancerosas. No obstante, la desregulación inmunitaria puede promover la progresión y transformación del tumor (27). Al infiltrarse en el microambiente tumoral (TME), las células inmunitarias innatas tales como los macrófagos asociados a tumores (TAM) y las células supresoras derivadas de mieloides o MDSC (población heterogénea de células inmunosupresoras derivada de precursores neutrofilicos o monocitos) (72) pueden reprogramarse hacia un fenotipo antiinflamatorio causante de la progresión del tumor. Esto tiene como consecuencia una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias, una alta capacidad fagocítica y una presentación deficiente de antígenos. Como consecuencia, los macrófagos tumorales tienen la capacidad de suprimir el reclutamiento y la función de las células T. A este fenómeno se le denomina "tolerancia tumoral" y presenta características similares a las de los monocitos tolerantes a endotoxinas, lo que conduce a la inmunosupresión (66 y 73).

No obstante, al menos hipotéticamente, el "training" terapéutico de células inmunitarias innatas y/o progenitores podría reescribir epigenéticamente las células mieloides inmunosupresoras cambiando la forma en que responden a factores derivados del tumor. De esta forma los macrófagos derivados de estas células progenitoras cambiarían del fenotipo M2 al fenotipo M1 con una actividad respiratoria robusta y fagocitosis, lo que conduciría a características

proinflamatorias y antitumorales (74). Por tanto, reequilibrar esta hematopoyesis aberrante inducida por el TME mediante la mielopoyesis entrenada con agentes como BCG o  $\beta$ -glucano podría contribuir a la pérdida del fenotipo inmunosupresor en células MDSC (27 y 75).

En el caso del  $\beta$ -glucano, se piensa que la reprogramación metabólica y epigenética que produce podría convertir el fenotipo inhibidor M2 en un fenotipo M1 proinflamatorio resultando en la secreción de citocinas reclutadoras de otras células inmunes. Sin embargo, la reprogramación epigenética de las células inmunitarias innatas también podría facilitar el crecimiento tumoral en algunos casos, como se ha observado después de un infarto de miocardio en humano y modelos de ratón de cáncer de mama (76). Por tanto, comprender los mecanismos subyacentes de acción, especialmente para evitar la reprogramación de efectores innatos en un estado protumoral, es imprescindible para poder aprovechar su acción terapéutica en el contexto del cáncer (39).

En cuanto al BCG, inicialmente se observó que junto con el LPS ejercía efectos potentes sobre los macrófagos incrementando sus capacidades fagocíticas y bactericidas. Esto se veía reflejado en el aumento de producción de factor de necrosis tumoral o TNF, el cual es un agente citotóxico tumoral que ejerce una acción parecida a la necrosis tumoral (77). Además, se ha observado que BCG puede retrasar la progresión tumoral (78) y su inyección intralesional parece aumentar el número de células T y macrófagos, así como la expresión de MHC-I y MHC-II (79).

## 4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los macrófagos son una pieza fundamental en el desarrollo del cáncer, tanto para su progresión, ya que los tumores educan directamente a los macrófagos para que adquieran un fenotipo regulador, como su eliminación, ya que los macrófagos cuentan con un amplio abanico de mecanismos citotóxicos e inflamatorios que pueden eliminar las células tumorales. En este trabajo hipotetizamos que los macrófagos procedentes de precursores hematopoyéticos de médula ósea entrenados por BCG, presentan un fenotipo proinflamatorio basal que los haría más refractarios a los factores procedentes de los tumores que conducen a su repolarización hacia fenotipos inmunosupresores.

Partiendo de esta hipótesis de base, se plantean una serie de objetivos:

1. Confirmar la diferenciación de células de médula ósea a macrófagos en ratones vacunados y sin vacunar con BCG.
2. Confirmar la mayor actividad del sistema inmune tras la exposición a un estímulo primario (BCG).
3. Confirmar la presencia de inmunidad entrenada tras la exposición a un estímulo secundario (LPS o lisis bacteriana).
4. Observar diferencias en la activación del sistema inmune utilizando diferentes concentraciones de LPS.
5. Estudiar el efecto de la inmunidad entrenada al utilizar un medio condicionado tumoral como medio de cultivo para macrófagos ya diferenciados.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Ratones

Los ratones C57BL/6JR se adquirieron en Janvier Labs o fueron criados en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA). El uso y cuidado de los animales para trabajos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53/2013 y la Directiva de la Unión Europea 2010/63 para la protección de los animales utilizados para fines experimentales y científicos. Los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética para Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (ref. PI44/23). Los ratones se alojaron y mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos y observados en busca de signos de enfermedad. Los ratones se aclimataron durante una semana antes de que comenzaran los experimentos. Se proporcionó comida y agua ad libitum y la temperatura ambiente fue de 20-24 °C, con humedad del 50-70% y una intensidad lumínica de 60 lux con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se utilizaron ratones de ambos sexos de 8 a 12 semanas de edad inmunizados con BCG IV ( $10 \times 10^6$  CFU/200  $\mu$ L PBS).

### 5.2. Extracción y preservación de médulas óseas

Pasados los 30 días de la inmunización con BCG (**Figura 6A**) se realizó el sacrificio por dislocación cervical de acuerdo con las directrices institucionales respectivas y regulaciones gubernamentales. Por tanto, se extrajeron los fémures y tibias (**Figura 6B**) usando tijeras y pinzas y se limpiaron eliminando los músculos con tijeras y papel de tejido. Posteriormente se cortaron las epífisis de los huesos y se guardaron en un eppendorf de 500  $\mu$ L agujereado en la punta y dentro de otro eppendorf de 1,5 mL que contiene 100  $\mu$ L de medio completo. Se centrifugó a 2000G, 20 segundos para que la médula precipitase dentro del segundo eppendorf. El pellet resultante se resuspendió en medio de congelación (90% FBS y 10% DMSO) y se preservó en N2 líquido a -195°C hasta su uso.

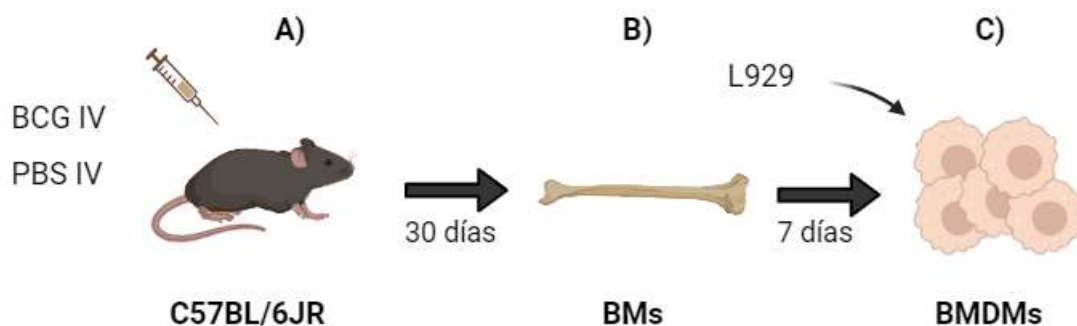
La **congelación** se realizó lentamente añadiendo al criotubo con la médula de cada ratón 1 mL de buffer de congelación (90% FBS + 10% DMSO) para posteriormente almacenarse a 4°C 24h. Por último, las médulas se guardaron en N2 líquido a -195°C hasta su uso.

La **descongelación** en su contra se llevó a cabo rápidamente trasladando el criotubo en N2 líquido a baño maría (37°C) hasta la descongelación (2 minutos) para prevenir la formación de cristales que pudieran dañar las células.

### 5.3. Obtención y cultivo celular de BMDMs

Los macrófagos murinos derivados de la médula ósea (BMDMs) se obtuvieron a partir de las células derivadas de la médula ósea (BMCs). Se sembraron  $7,6 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> de BMCs durante 7 días para su diferenciación a macrófagos en placas de cultivo en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) en forma de medio condicionado secretado por la línea celular comercial L929 (Ref CCL-1, ATCC) (**Figura 6C**).

Cada alícuota se descongeló en 7 mL de medio completo (50 mL medio DMEM + 5 mL Penicilina/Streptomidina (P/S) y FBS (10%)). Se centrifugó 5 min 400 rcf eliminando el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio de diferenciación (5 mL medio condicionado L929 y 20 mL medio completo). Posteriormente, se procedió al conteo de las células mediante cámara bürker a una dilución 1:20 en azul de tripano y se sembraron  $7,6 \times 10^6$  células/placa Petri dejando que se diferenciase a macrófagos durante 1 semana añadiendo medio de diferenciación fresco el día 3. Pasada la semana, se levantaron las células con buffer PBS-EDTA 10 mM frío y se contaron como en el paso anterior. Posteriormente se pasaron a una placa-TC de 24 pocillos (Sarstedt) de baja adherencia con una concentración de 400.000 células/pocillo.



**Figura 6. Obtención de BMDMs.** A: Inoculación a ratón C57BL/6JR con BCG o PBS (control). B: Extracción de médulas a partir del fémur y la tibia pasados los 30 días desde la inoculación. C: Tiempo de diferenciación (7 días) de BMCs a BMDMs al ser expuestos a la línea tumoral L929 secretora de M-CSF. Elaborado con BioRender.

### 5.3.1. Generación de medios condicionados

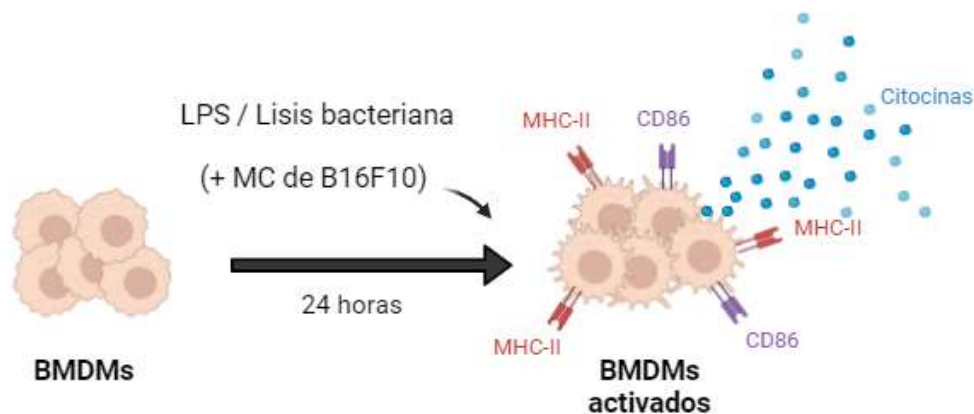
El medio de diferenciación de los macrófagos murinos L929 se obtuvo a partir de la línea celular de fibroblastos L-929 de ratón hembra C3H/AA cultivados en medio DMEM suplementado con 10% FBS y Glutamax. La concentración a la que se sembró estas células fue de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en 50 mL de medio e incubando las células 5 días para ver un cultivo confluyente. Pasado ese tiempo se filtró el medio por 0,22  $\mu$ m, se alícuotó y se preservó a -20°C hasta su uso.

El medio condicionado de tumores (MC) se obtuvo a partir de la línea celular B16F10 filtrado a 0,2 micras y tuvo una expansión de 3 días. La mitad de las células B16F10 se descongelaron y levantaron con tripsina 0,25% y se sembraron en un flask T75 durante 2-3 días hasta alcanzar un 80% de confluencia. Posteriormente, las células se subcultivaron en tres flasks T175 con 20 mL de medio por flask durante 3 días para obtener el medio condicionado. Al finalizar, se recogieron un total de 60 mL de medio condicionado tumoral.

## 5.4. Exposición de los macrófagos a un estímulo externo secundario

A las 24 horas de la siembra en la placa de 24 pocillos, se expusieron los macrófagos a un segundo estímulo de LPS (10 ng/mL) o de lisis bacteriana proveniente de un cultivo bacteriano de MTBVAC, una micobacteria atenuada derivada del patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Se ensayó un cultivo bacteriano a una concentración de  $3,7 \times 10^9$  CFU/mL) previamente inactivado mediante tratamiento térmico (85°C 10 minutos) y se alícuotó en viales de 200  $\mu$ l ( $7,4 \times 10^8$  CFU/mL).

Estos estímulos (LPS o lisis bacteriana) también se ensayaron en combinación del medio condicionado tumoral (B16F10) descrito en el apartado anterior (**Figura 7**).



*Figura 7. Exposición de BMDMs a un estímulo secundario (LPS o lisis bacteriana) en presencia o no de medio condicionado tumoral (MC) procedente de la línea celular B16F10. A: Exposición de las BMDMs al estímulo secundario durante 24h con o sin MC B: BMDMs estimulados tras la exposición al estímulo secundario. Elaborado con BioRender.*

## 5.5. Marcaje para citometría

A las 24 horas tras la segunda estimulación con LPS y/o lisis bacteriana se levantaron las células con o sin medio condicionado tumoral con buffer PBS-EDTA 10 mM frío y se añadió PBS+FBS (5%) para bloquear la acción del EDTA una vez las células ya se hubieran levantado. Se pasaron las células de la placa de 24 a la placa de 96 pocillos con fondo en “u”(TPP) y se centrifugó (3095 rcf 1 minuto) eliminando el sobrenadante.

Incubamos con FcR Blocking Reagent (order no. 130-092-575) según las instrucciones del fabricante a 4°C 5 minutos. A continuación, se añadió una mezcla de anticuerpos (CD86 - VioBright B515 o CD86-PE; F4/80- FITC; Cd11b-PerCP-VIO700 y MHC-II-APC) y se incubó 20 minutos 4°C. Posteriormente, se lavó dos veces con 150 µL de PBS + FBS (5%)/pocillo y centrifugó a 3095 rcf 1 min eliminando el sobrenadante. Se fijaron las muestras con formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las células con 150 µl de PBS + FBS (5%) y se preservaron en oscuridad y a 4°C hasta su análisis.

## 5.6. Citometría y ELISAS

Se empleó el citómetro Gallios Beckman Coulter y se ensayaron los siguientes anticuerpos (Tabla 1):

*Tabla 1. Anticuerpos ensayados para citometría. Elaboración propia.*

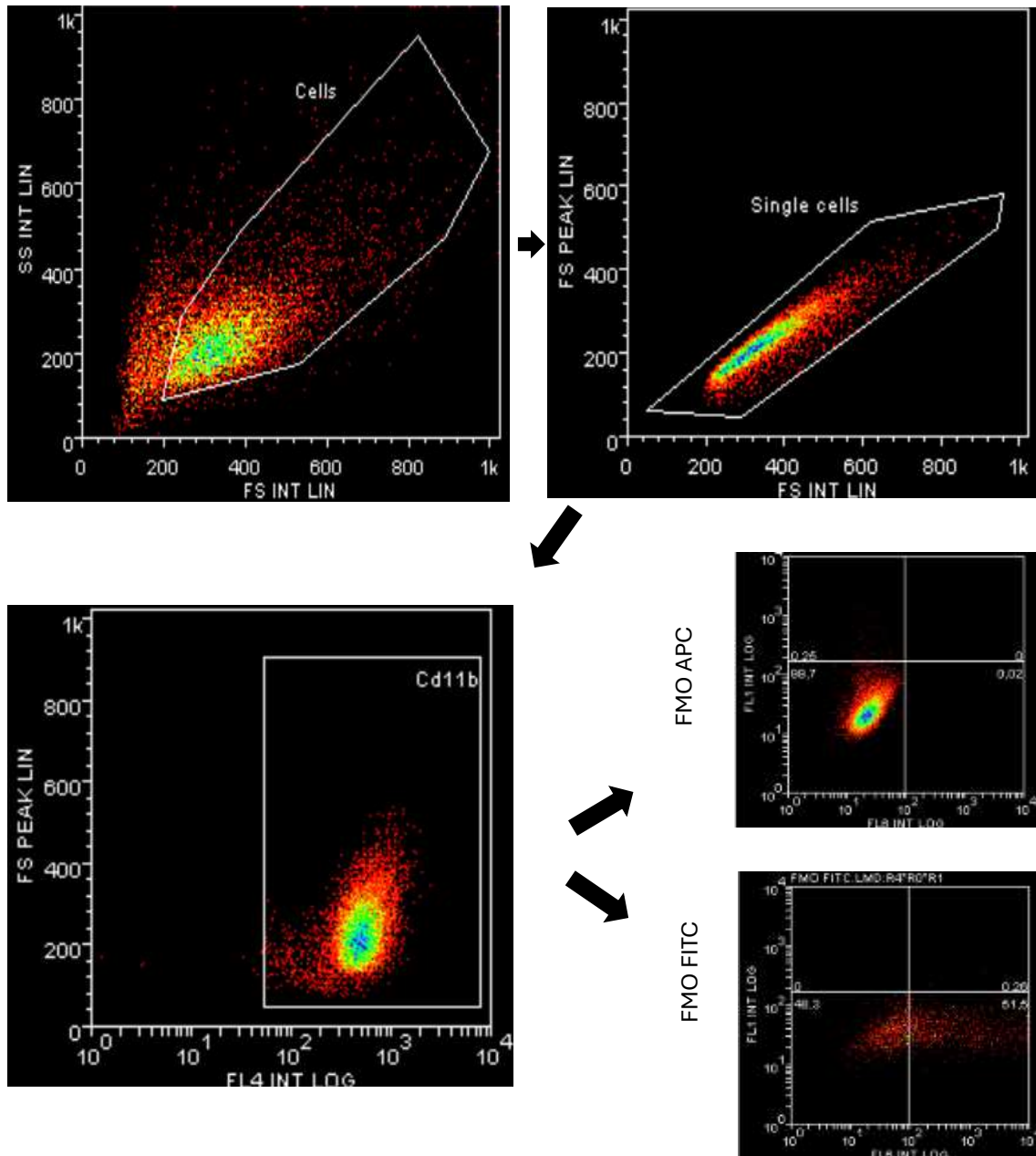
Tipo	Anticuerpo	Canal	Fluoróforo	Casa comercial	No. referencia
Diferenciación	F4/80	FL1	FITC	Miltenyi Biotec	130-117-509
	Cd11b	FL4	PerCP-Vio 700	Miltenyi Biotec	130-113-809
Activación	CD86	FL1	Vio Bright B515	Miltenyi Biotec	130-122-136
			PE	Miltenyi Biotec	130-122-129
	MHC-II	FL6	APC	Miltenyi Biotec	130-112-231

En cuanto a los ELISA, se empleó un kit comercial (Mabtech) siguiendo las recomendaciones del fabricante para ensayar las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  murinas a partir de los sobrenadantes de cultivo de BMDMs.

### 5.6.1. Software

Los archivos FCS obtenidos en el citómetro Gallios Beckman Coulter se analizaron con el programa Weasel v3.0.2. Los gráficos de barras y los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism v8.

A continuación, en la **Figura 8** aparecen reflejadas las estrategias genéricas de selección de poblaciones (gating) tomándose como ejemplo el proceso realizado para el control de la línea C57BL/6JR inoculada con PBS y sin aplicar estímulo.



*Figura 8. Estrategia de gating en el ensayo por citometría de flujo de marcadores de superficie celular.*

*Elaboración con GraphPad Prism 8 y Weasel.*

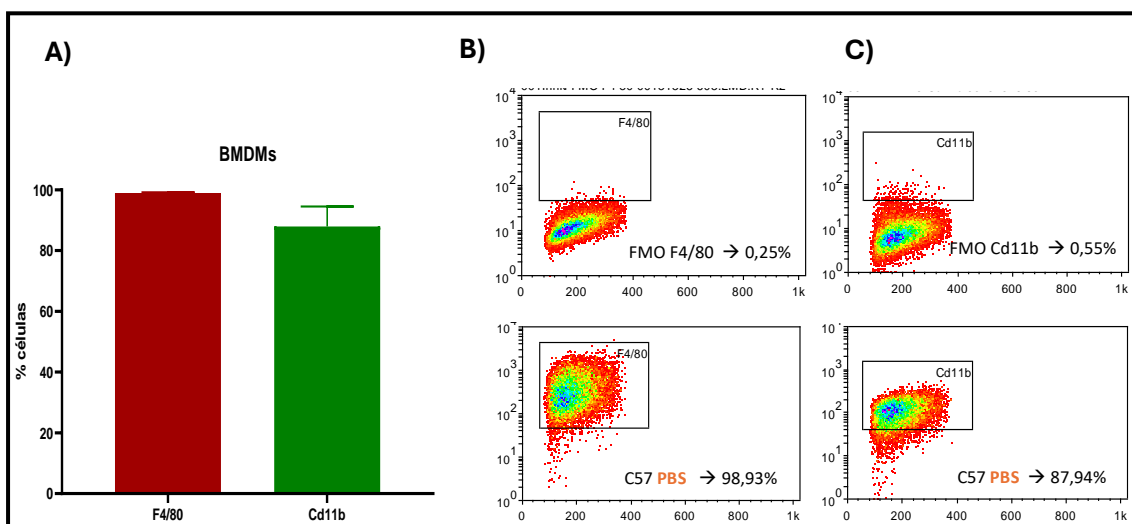
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Optimización de la diferenciación a BMDMs

#### 6.1.1. Estudio de los marcadores F4/80 y Cd11b

Para poder confirmar la correcta diferenciación de las células de la médula ósea a BMDMs es necesario conocer los niveles de expresión de marcadores de diferenciación (F4/80 y Cd11b) en lo que se define como el control, es decir, la línea murina C57BL/6JR o ratones wild-type vacunada con PBS. Esta línea es la única que se utiliza en todos los experimentos. Se utilizan estos marcadores ya que están descritos en la confirmación de la correcta diferenciación de las células a macrófagos.

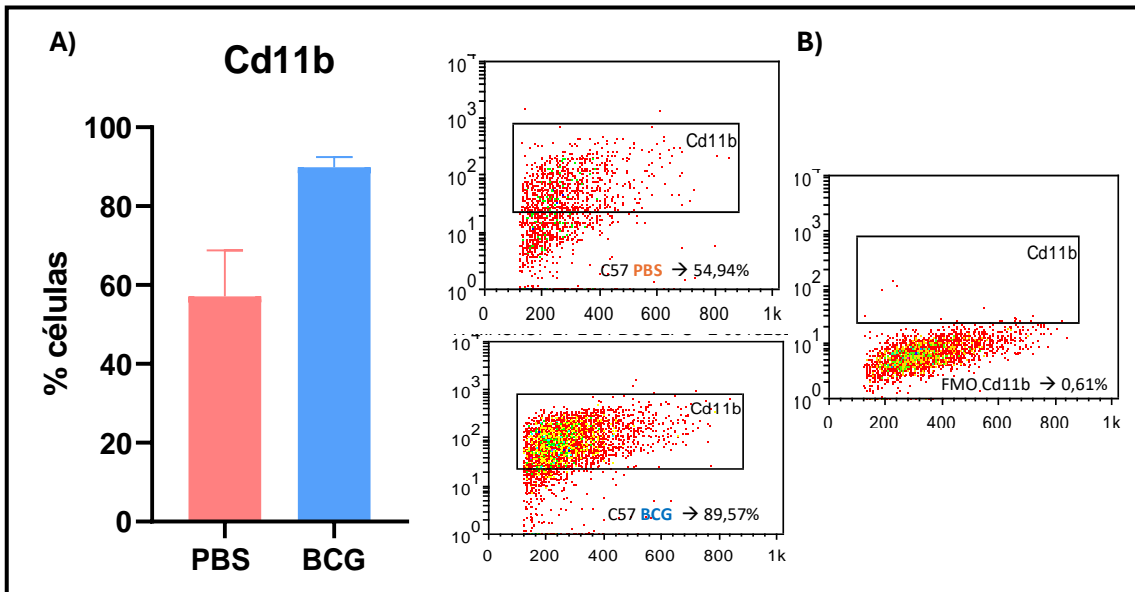
La cantidad de células que expresan ambos marcadores de diferenciación aparecen reflejados en la **figura 9** donde se puede observar que en ambos casos la diferenciación es muy similar, cerca del 100% de las células totales (**figura 9A**). Las células que se mostraron positivas para el marcador F4/80 aparecen reflejadas respecto a su FMO (*Fluorescence Minus One*) en la **figura 9B**, mientras que para Cd11b aparecen reflejadas en la **figura 9C**.



**Figura 9. Caracterización por citometría de flujo de BMDMs en ratones C57BL/6JR vacunados con PBS.** Las células de BM del ratón control fueron tratadas con MC de L929 durante 7 días. **A:** Los gráficos de barras representan el porcentaje de células diferenciadas positivas para F4/80 y Cd11b. **B y C:** Dot plots de la estrategia de gating para definir la subpoblación positiva para F4/80 y Cd11b respectivamente. Elaboración con GraphPad Prism 8 y Weasel.

Al observarse que ambos marcadores de diferenciación se expresaban de manera similar se escoge uno para los experimentos posteriores. En este caso el Cd11b.

Para completar el estudio de diferenciación, una vez confirmado en el control, se analiza la expresión de dichos marcadores esta vez en ratones vacunados con BCG (**Figura 10**). Se observa que en estos ratones que hay un mayor número de células positivas para Cd11b que en el control (PBS).



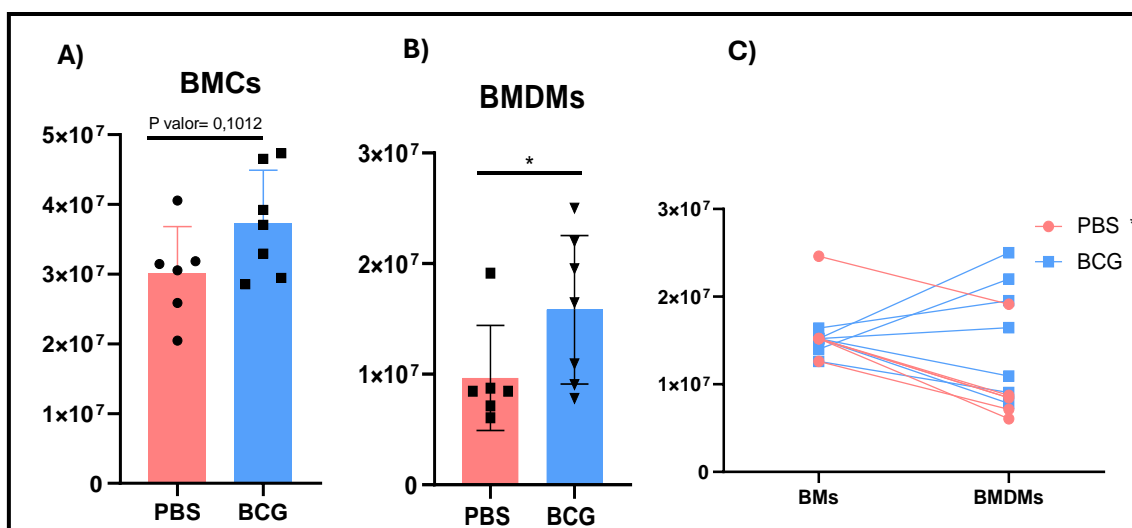
**Figura 10. Caracterización por citometría de flujo de BMDMs en ratones C57BL/6JR vacunados con BCG o PBS.** Las células de BM se trataron con medio MC de L929 durante 7 días. **A:** Los gráficos de barras representan la cantidad de células diferenciadas positivas para Cd11b. **B:** Dot plots de la estrategia de gating para definir la subpoblación de macrófagos positivos para Cd11b. Elaboración con GraphPad Prism 8 y Weasel.

## 6.1.2. Recuento BMCs y BMDMs

Se realizó el recuento tanto del número total de BMCs como del número total de BMDMs obtenidos a partir de una misma concentración de BMCs inicial. Esto se realiza para intentar justificar las diferencias de diferenciación en ratones vacunados con BCG frente a PBS.

Como se muestra en la **figura 11A**, se observa una tendencia al aumento en el número de BMCs en ratones vacunados con BCG frente a aquellos vacunados con PBS. En cuanto al recuento de BMDMs se observa la misma tendencia que en el caso anterior (**figura 11B**).

En la **figura 11C** se aprecia en el control de forma significativa una disminución de BMDMs partiendo de un mismo número de BMCs. Sin embargo, esta tendencia en vacunados con BCG parece variar.



**Figura 11. Comparación del número total de BMCs y BMDMs en ratones vacunados con PBS o BCG.** Los ratones de la misma línea fueron vacunados con PBS (control) o BCG. **A:** Número total de BMCs obtenidos tras la vacunación con BCG o PBS ( $P$  valor= 0.1012 mediante un  $t$  test). **B:** Representación gráfica del número total de BMDMs partiendo de una misma cantidad de BMCs ( $* p < 0,05$  mediante la prueba Mann-Whitney). **C:** Representación de la tendencia en la obtención de BMDMs partiendo de una misma cantidad de BMCs ( $*p < 0,05$  mediante la prueba 2way ANOVA solo significativo para PBS). Elaboración con GraphPad Prism 8.

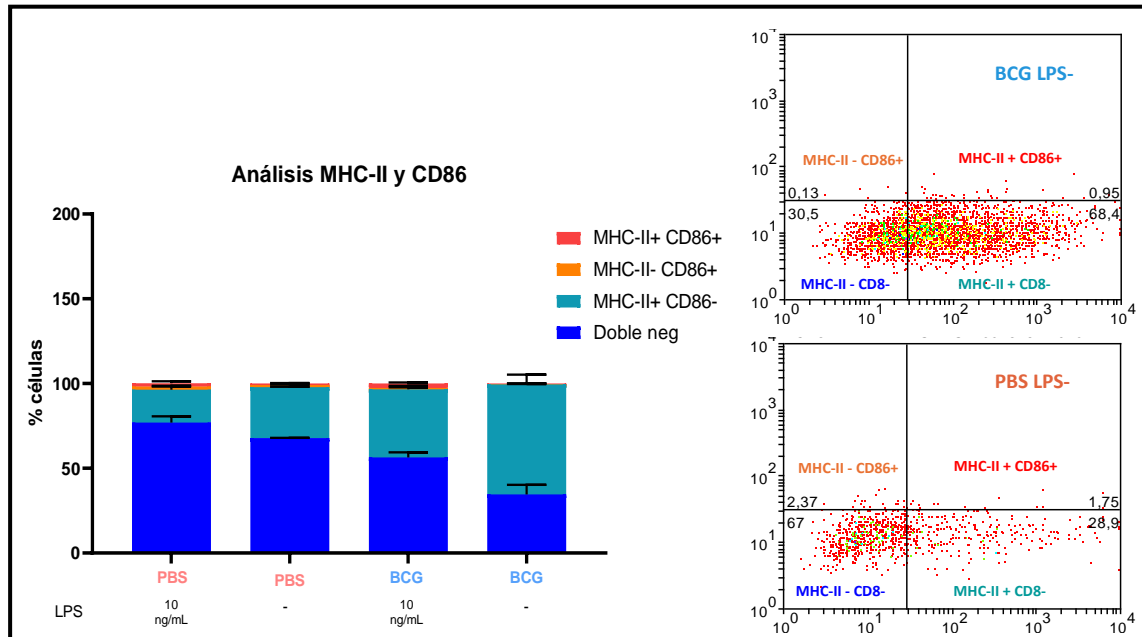
## 6.2. Evaluación del “training” en BMDMs tras un estímulo secundario en ratones vacunados con BCG

Para poder conseguir la mayor información posible se estudia la expresión de MHC-II y CD86 tras la estimulación con LPS o lisis bacteriana durante 24h. Se utilizan estos marcadores de superficie ya que son marcadores descritos de activación de macrófagos, cuya función principal es la presentación antigénica.

### 6.2.1. Estimulación con LPS (10 ng/mL)

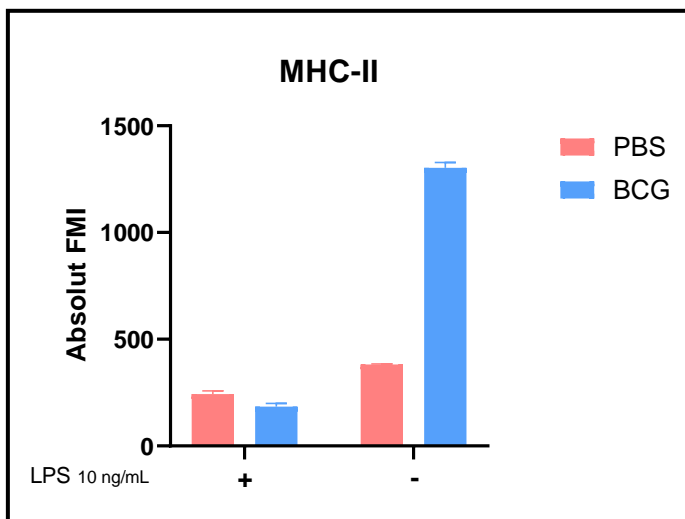
Inicialmente la concentración ensayada de LPS (10 ng/mL) es compatible con datos descritos en la literatura. Se observa en la **figura 12** que el porcentaje de macrófagos positivos para MHC-II parece ser mayor en ratones vacunados con BCG, sugiriendo que, tal y como se indica en la literatura, la vacunación con BCG da lugar a precursores hematopoyéticos entrenados que producen células maduras (en este caso macrófagos) con un fenotipo de base más activado. No obstante, en presencia de estímulo esta tendencia parece disminuir tanto en el control como en vacunados con BCG inactivándose un mayor número de macrófagos. Este hecho parece indicar que el LPS podría estar inhibiendo la expresión de este marcador en los macrófagos independientemente de su vacunación. Sin embargo, la subpoblación positiva para el MHC-II sigue siendo mayor en vacunados con BCG lo que plantea el papel activador del sistema inmune de esta vacuna.

En cuanto al CD86, la mayoría de los macrófagos en todas las condiciones no expresan este marcador por lo que se decide no analizarlo.



**Figura 12.** Distribución porcentual de subpoblaciones de macrófagos en función de la expresión de MHC-II y CD86 en ratones vacunados con PBS o BCG. Los macrófagos fueron derivados de médulas óseas de ratones vacunados con PBS (rojo) o BCG (azul) y posteriormente estimulados con LPS (10 ng/mL). Las subpoblaciones de macrófagos se clasificaron como MHC-II+ CD86+ (rojo), MHC-II- CD86+ (naranja), MHC-II+ CD86- (verde) y doble negativo para ambos marcadores (azul). Elaboración con GraphPad Prism 8.

Estudiando el FMI (*Fluorescence Mean Intensity*), que sería una medida proporcional a la cantidad media de marcador por célula, se aprecia también una mayor expresión del MHC-II en ausencia de estímulo en los BMDM procedentes de ratones vacunados con BCG, que se pierde tras la exposición a LPS, lo que sugiere que el LPS está afectando la expresión o localización de MHC-II la superficie de los macrófagos (**Figura 13**).



*Figura 13. Análisis del valor absoluto de FMI para MHC-II en macrófagos de ratones vacunados con PBS y BCG. Los macrófagos obtenidos fueron derivados de médulas óseas de ratones vacunados con PBS (rojo) o BCG (azul) y posteriormente estimulados con LPS (10 ng/mL) o no estimulados. Elaboración con GraphPad Prism 8.*

#### 6.2.1.1. Cuantificación de IL-6 y TNF- $\alpha$ mediante ELISAs

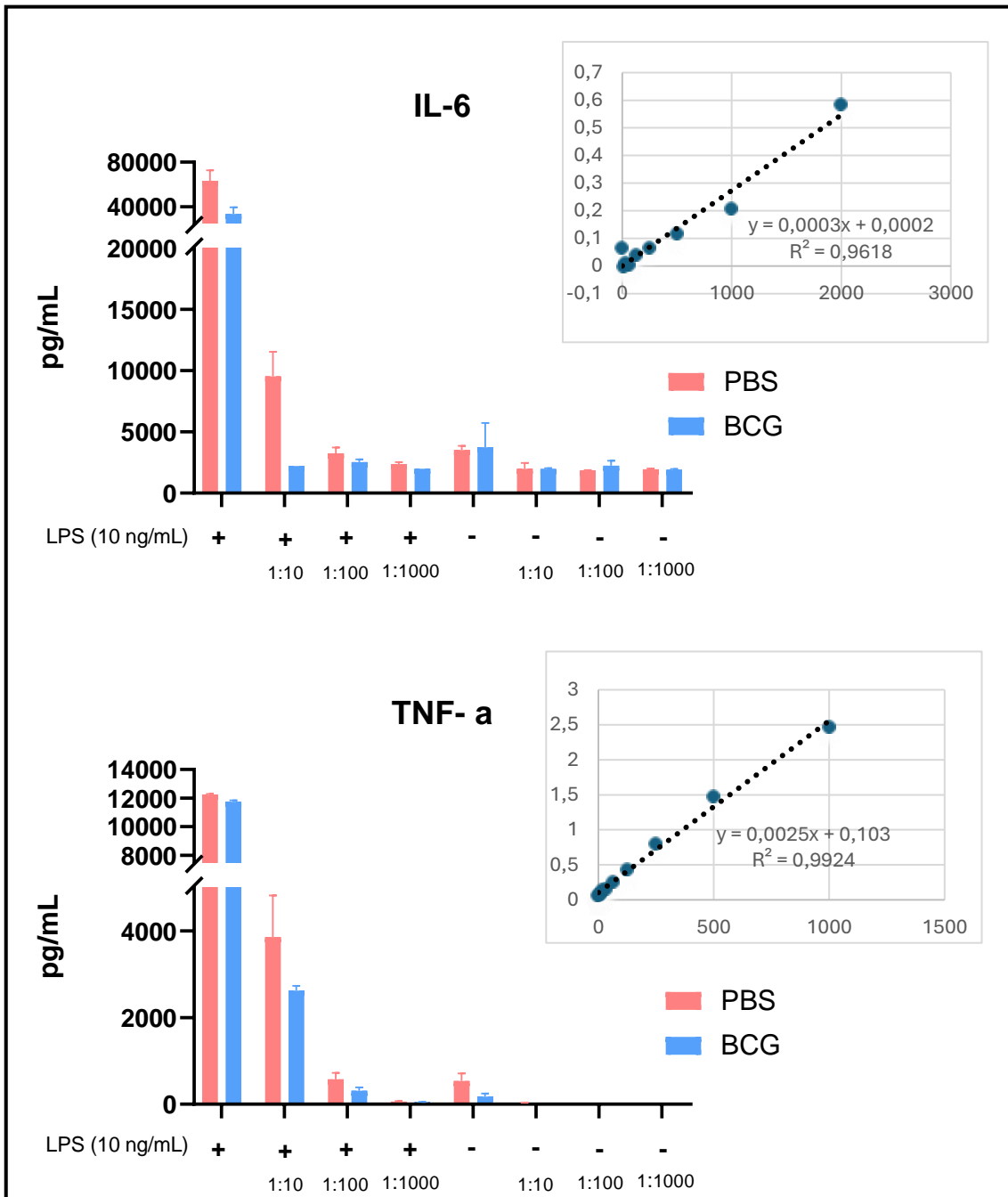
Para completar el estudio sobre el efecto del LPS en la regulación del MHC-II de los macrófagos se analizan los sobrenadantes de medio de cultivo de los BMDMs procedentes de vacunados con PBS o BCG tras haber sido estimuladas durante 24h al LPS (10 ng/mL). En este caso se analizan las concentraciones de dos proteínas proinflamatorias, la IL-6 y TNF- $\alpha$ . Estas dos citocinas son las que se analizan en todos los ELISAs descritos.

Para su correcto análisis primero se realizan diluciones seriadas de los sobrenadantes (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) y se observa que la dilución óptima para ambos protocolos de ELISA es 1:10, por lo que es la dilución que se emplea en todos los ELISAs realizados.

Al analizar los resultados se observa que el sobrenadante proveniente de BMDMs estimuladas con LPS presentan aparentemente una mayor concentración de ambas citocinas que si no han sido expuestas al estímulo. Esto sugiere una activación inflamatoria de los macrófagos expuestos al estímulo (**Figura 14**).

Se observa también que la concentración de ambas citocinas parece disminuir cuando los macrófagos provienen de ratones vacunados con BCG (en comparación con el control) aun habiendo sido expuestos al estímulo (**Figura 14**), lo que puede suponer que la vacunación con BCG ha regulado la actividad inflamatoria producida por el estímulo modificando la respuesta

inmune innata. Esto se correlaciona con el aumento de macrófagos positivos en ratones vacunados con BCG observado anteriormente ya que indicaría que la BCG incrementa la actividad del sistema inmune regulando la inflamación desmedida inducida por el LPS.



**Figura 14. Cuantificación de IL-6 y TNF-α mediante ELISA.** Concentración de IL-6 y TNF-α en distintas diluciones de los sobrenadantes obtenidos de macrófagos de ratones vacunados con PBS (rojo) o BCG (azul) y posteriormente estimulados con 24h con LPS (10 ng/mL) o sin estimular. Elaboración con GraphPad Prism 8.

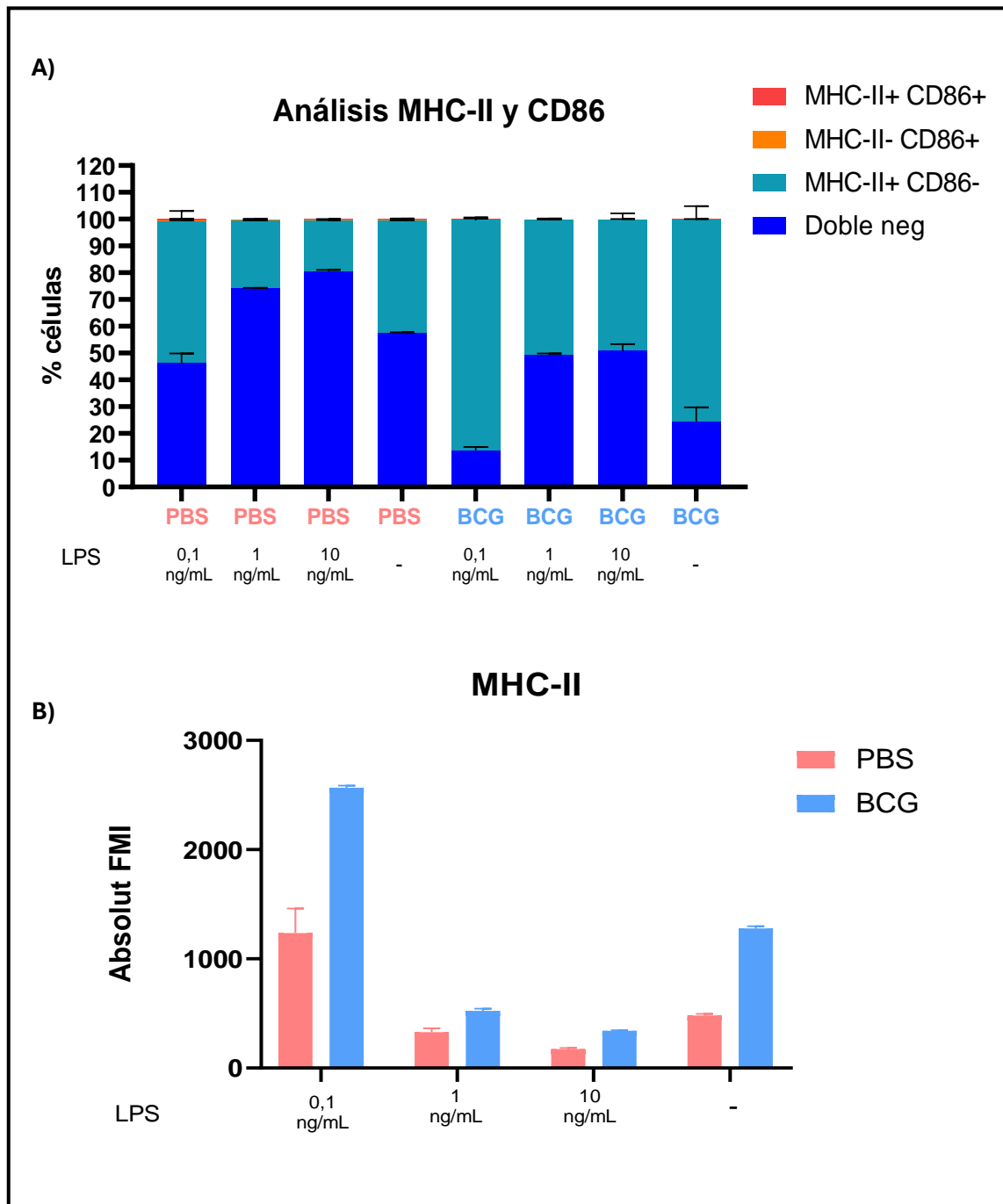
## 6.2.2. Estimulación con distintas concentraciones de LPS o con presencia de bacterias

Una vez observado el efecto del LPS en los macrófagos se decide ensayar el mismo estímulo, pero a concentraciones diferentes para verificar si el incremento de las subpoblaciones negativas a MHC-II tras la exposición al LPS se debe a la inmunomodulación del sistema inmune tras un exceso de estímulo. Con este fin se ensayan concentraciones menores de LPS a 0,1 ng/mL y 1 ng/mL, además de la de 10 ng/mL.

Además, se testa otro estímulo secundario distinto al de LPS, una lisis bacteriana de MTBVAC ( $7,4 \times 10^8$  CFU/mL) que aparece descrita en el punto 3.4. y que es la colonia que se emplea en todos los experimentos con bacterias.

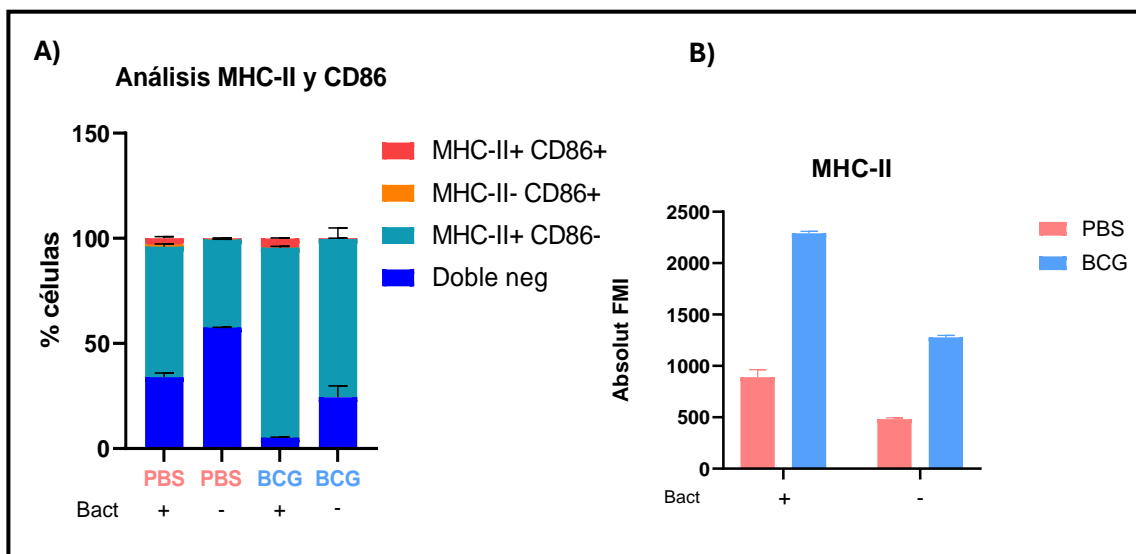
En cuanto al LPS se confirma lo visto anteriormente, es decir, el LPS a una concentración de 10 ng/mL incrementa el porcentaje de macrófagos doble negativos disminuyendo la subpoblación positiva a MHC-II en comparación con el control. No obstante, se observa que al disminuir la concentración de LPS a 1 ng/mL y aún más, a 0,1 ng/mL, se invierte esta situación incrementándose la subpoblación positiva a MHC-II (**Figura 15A**). Esto parece indicar que el LPS a concentraciones muy elevadas induce tolerancia en la subpoblación de macrófagos positiva a este marcador.

En la **figura 15B** se analiza el FMI para el marcador MHC-II ya que la subpoblación positiva para el CD86 es mínima por lo que se ignora. Se observa lo mismo que en el apartado anterior, es decir, una tendencia a la disminución de la expresión del MHC-II con una concentración de LPS de 10 ng/mL. Sin embargo, al igual que en el análisis de subpoblaciones macrofágicas positivas a MHC-II, la intensidad de la expresión del marcador se incrementa cuando se disminuye la concentración del LPS llegando incluso a superar al control en el caso de 0,1ng/mL.



**Figura 15.** Caracterización por citometría del MHC-II y CD86 en macrófagos de ratones vacunados con PBS o BCG estimulados durante 24h con LPS. **A:** Cuantificación porcentual de subpoblaciones de macrófagos en función de su expresión de MHC-II y CD86. **B:** Representación del valor absoluto de FMI del MHCII en las células de acuerdo con su exposición a un estímulo secundario (LPS a diferentes concentraciones). Elaboración con GraphPad Prism 8.

En presencia de bacterias (**Figura 16**) la presencia de MHC-II es similar al de LPS a la concentración de 0,1 ng/mL, observándose que la subpoblación de macrófagos MHC-II positivos se incrementa tanto en el control como en aquellas BMDMs provenientes de ratones vacunados con BCG, siendo el incremento en éstos últimos aparentemente mayor. Además, la lisis bacteriana parece tener un impacto mayor que el LPS en la expresión de CD86+ y MHC-II conjuntamente en ambas poblaciones vacunales (PBS y BCG). No obstante, al ser el porcentaje de células positivas a CD86 tan bajo, no se analiza su FMI. Esto último se mantiene en todos los experimentos ya que al haber tan pocas células positivas para CD86, el FMI es poco representativo de la población general.



**Figura 16.** Caracterización por citometría del MHC-II y CD86 en macrófagos de ratones vacunados con PBS o BCG estimulados durante 24h con bacterias. **A:** Cuantificación porcentual de subpoblaciones de macrófagos en función de su expresión de MHC-II y CD86. **B:** Representación del valor absoluto de FMI del MHCII en las células de acuerdo con su exposición a un estímulo secundario (bacterias). Elaboración con GraphPad Prism 8.

### 6.2.2.1. Cuantificación de IL-6 y TNF- $\alpha$ mediante ELISAs

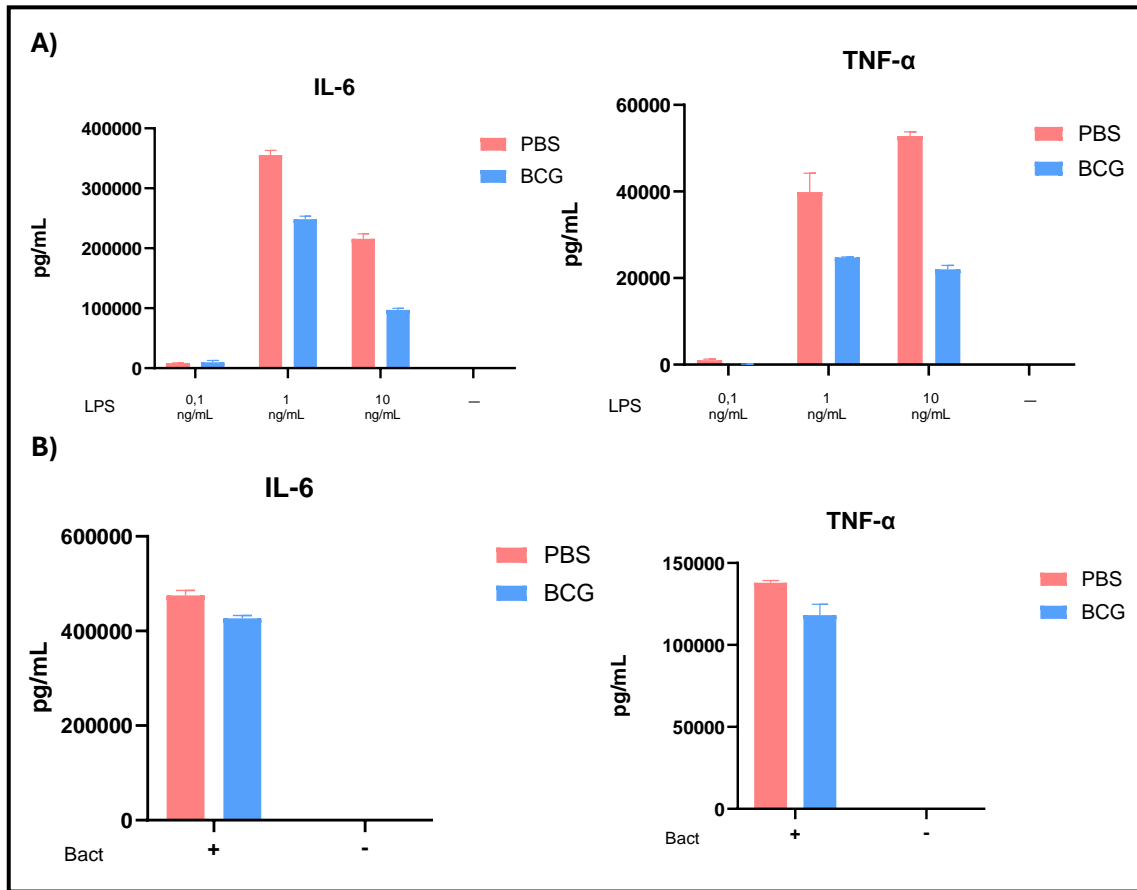
Para terminar de definir el efecto que tienen distintas concentraciones de LPS en la activación de los macrófagos, se analizan los sobrenadantes obtenidos del medio de cultivo provenientes de los macrófagos estimulados con LPS 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL o bacterias para determinar la concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Como se observa en la **figura 17A** la estimulación con LPS también induce una alta producción de ambas citocinas en ambos grupos siendo igual que en el caso anterior. No obstante, en este caso la reducción de la concentración de LPS disminuye la producción de citocinas. En el caso de IL-6, parece aumentar al disminuir la concentración de 10 ng/mL a 1 ng/mL pero esta tendencia se invierte completamente al disminuir la concentración a 0,1 ng/mL. Esto último parece reflejarse también en el caso del TNF- $\alpha$ , pero esta vez la cantidad de citocinas se mantiene aparentemente igual al reducir la concentración de 10 ng/mL a 1 ng/mL. Esto contrasta con lo observado en el MHC-II donde a mayores concentraciones de LPS menor era la presencia de este marcador de superficie.

Esta actuación de los macrófagos parece indicar que a concentraciones más bajas de LPS, los macrófagos modulan su respuesta dependiente de la dosis. De este modo, a concentraciones más bajas de LPS, los macrófagos pueden mantener una capacidad elevada para la presentación de antígenos a través de MHC-II sin una sobreproducción de citocinas inflamatorias.

En cuanto a las bacterias (**figura 17B**) aparentemente se observa con su presencia una fuerte respuesta en la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en macrófagos provenientes de ambos grupos. Sin embargo, la producción parece ser menor en macrófagos derivados de vacunados con BCG. Esto último también ocurre en el caso del LPS lo que podría indicar que si bien estos estímulos (y especialmente las bacterias y una concentración de LPS de 1 ng/mL) producen una fuerte actividad proinflamatoria del sistema inmune innato, BCG modula esta respuesta para que sea más equilibrada induciendo tolerancia innata y conduciendo a una respuesta efectiva pero más controlada a los patógenos.

Además, los vacunados con PBS parecen indicar una mayor concentración de citocinas que los vacunados con BCG, sugiriendo que BCG modula la respuesta inflamatoria.



**Figura 17. Cuantificación de IL-6 y TNF- $\alpha$  mediante ELISA. A:** Concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes obtenidos de macrófagos de y posteriormente estimulados 24h con diferentes concentraciones de LPS. **B:** Concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes obtenidos de macrófagos de y posteriormente estimulados 24h con lisis bacteriana. Elaboración con GraphPad Prism 8.

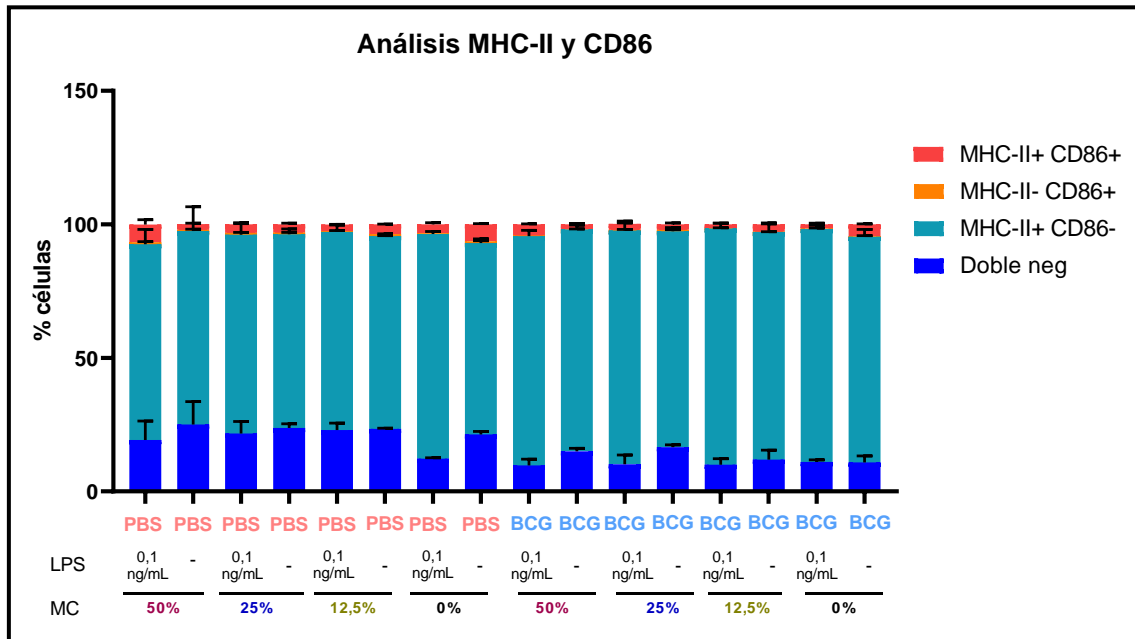
Teniendo en cuenta lo mencionado en apartados anteriores se decide ensayar a una concentración de 0,1 ng/mL para citometría y de 1 ng/mL para la realización de ELISAs.

## 6.3. Evaluación del “training” en BMDMs expuestos a un estímulo secundario (LPS/bacterias) y a medio condicionado tumoral

### 6.3.1. Efecto del MC en macrófagos estimulados solo con LPS

Para poder simular el efecto del “training” en cáncer se decide exponer las células a distintas concentraciones de un medio condicionado detallado en el apartado 3.3.1 para estudiar la activación del marcador MHC-II y en menor medida del CD86 (ya que como se observa anteriormente se expresaba ínfimamente) y la concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$ .

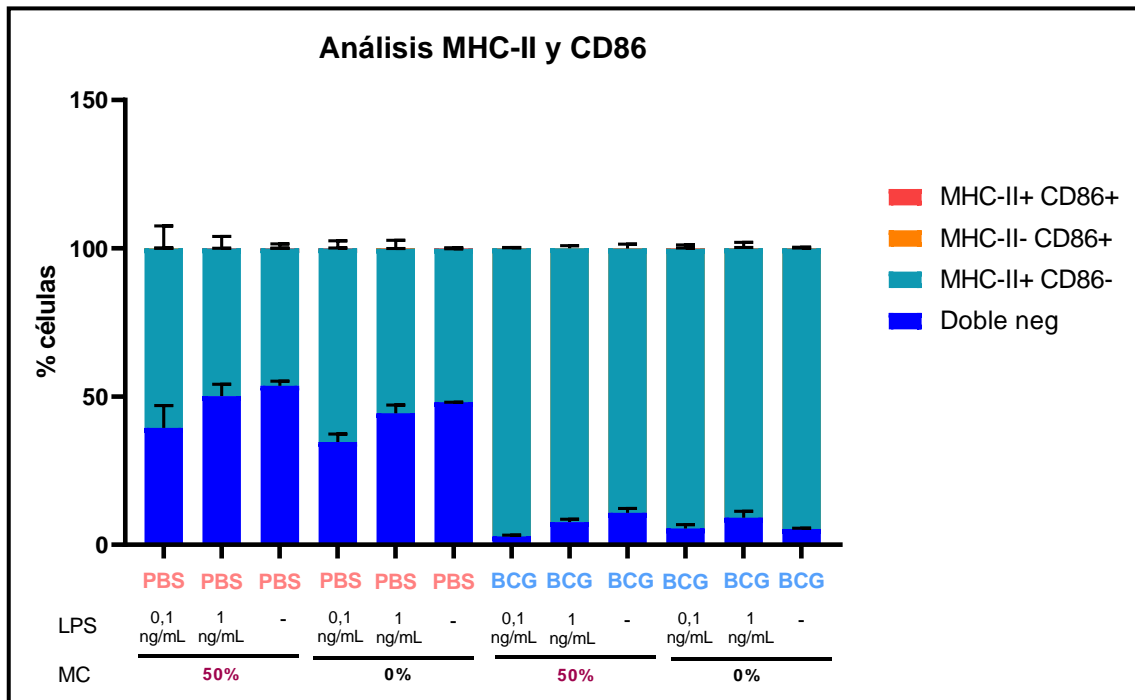
Lo primero que se observa es que en la **figura 18** es que, por alguna razón desconocida la muestra de ratón tratado con PBS presentaba un mayor número de MHC-II de base en comparación con experimentos anteriores. Una posible hipótesis es que el ratón del cual se aisló la médula podría haber tenido en marcha algún proceso infeccioso. Además, aunque de manera general se observa una tendencia a la positividad de los macrófagos para MHC-II en aquellos provenientes de ratones vacunados con BCG, se detecta un efecto particular en el control (PBS) que no se observa en ratones vacunados con BCG; Se intuye un aumento del MHC-II en macrófagos derivados del control (PBS) en presencia de LPS (0,1 ng/mL) cuando no hay MC. Este efecto desaparece en presencia de MC, algo que con BCG no ocurre. Este efecto de positividad tampoco parece ocurrir en ausencia del estímulo de LPS.



**Figura 18.** Distribución porcentual de subpoblaciones de macrófagos según la expresión de MHC-II y CD86 en ratones vacunados con PBS o BCG tras estimulación con LPS y diferentes proporciones de medio condicionado tumoral (MC). Los macrófagos diferenciados se expusieron al LPS (0.1 ng/mL) y a diferentes concentraciones de MC (50%, 25%, 12.5%, 0%) durante 24 horas. Las subpoblaciones de macrófagos se clasificaron en MHC-II+ CD86+ (rojo), MHC-II- CD86+ (naranja), MHC-II+ CD86- (verde) y doble negativos para ambos marcadores (azul). Elaboración con GraphPad Prism 8.

Teniendo en cuenta que la tendencia a aumentar la expresión del MHC-II no está aparentemente influida por la presencia de MC sino por la presencia de LPS (0,1 ng/mL), se evalúa si con dos concentraciones de LPS diferentes (0,1 ng/mL y 1 ng/mL) esta situación se mantiene (**Figura 19**).

Se observa por tanto que efectivamente la presencia de MC en ausencia de LPS apenas tiene efecto en las subpoblaciones de macrófagos positivas a MHC-II y que el incremento aparente de macrófagos positivos a MHC-II al disminuir la concentración de LPS de 1 ng/mL a 0,1 ng/mL se repite independientemente del MC. Lo mismo ocurre con los macrófagos derivados de ratones vacunados con BCG, es decir, que hay más positivas para el marcador que aquellas que provienen del control. Esto refuerzan la hipótesis del papel activador del sistema inmune de BCG (**Figura 19**).

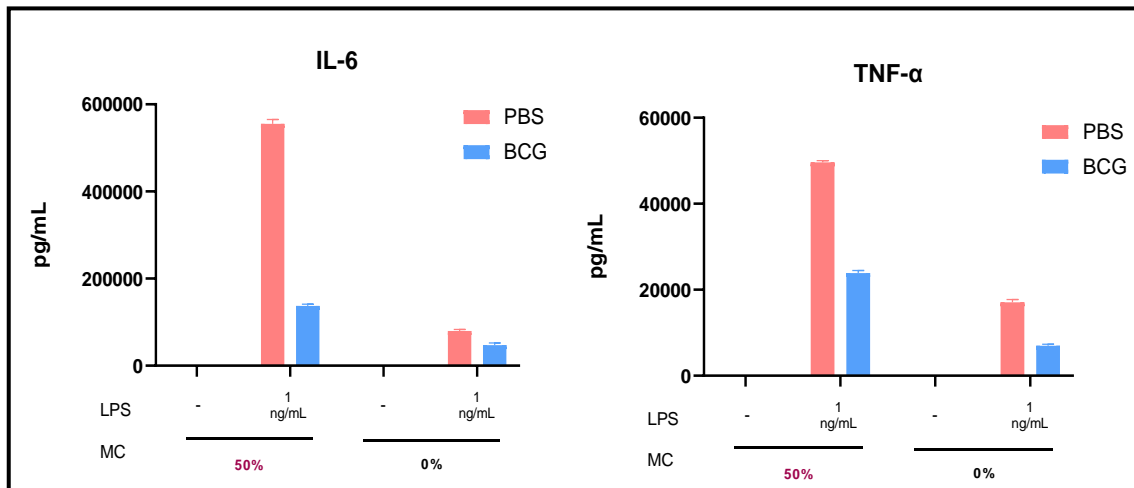


**Figura 19.** Caracterización por citometría del MHC-II y CD86 en macrófagos de ratones vacunados con PBS o BCG estimulados con LPS y/o MC. Los macrófagos diferenciados se expusieron al LPS (0,1 ng/mL o 1 ng/mL) y a MC (50%) durante 24 horas y se cuantificaron porcentualmente las subpoblaciones de macrófagos en función de su expresión de MHC-II y CD86. Elaboración con GraphPad Prism 8.

### 6.3.1.1. Cuantificación de IL-6 y TNF- $\alpha$ mediante ELISAs

Se realizó la cuantificación de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes derivados de los medios de cultivo con o sin MC al 50% y estimulados con LPS a la concentración optimizada (1 ng/mL) descrita en el apartado 4.2.2.1. para estudiar la influencia de los factores tumorales del MC en la producción de ambas citocinas.

Como aparece representado en la **figura 20** se observa que el MC por sí solo no tiene efecto en la concentración de ambas citocinas. No obstante, si se utiliza el LPS en conjunto con el MC la cantidad aumenta considerablemente más en ambas que solo utilizando LPS lo que parece indicar que el MC potencia el efecto del LPS en la producción de citocinas. Este aumento parece ser mayor en el control de PBS que en vacunados con BCG lo que vuelve a reflejar el aparente papel antiinflamatorio de la vacuna.



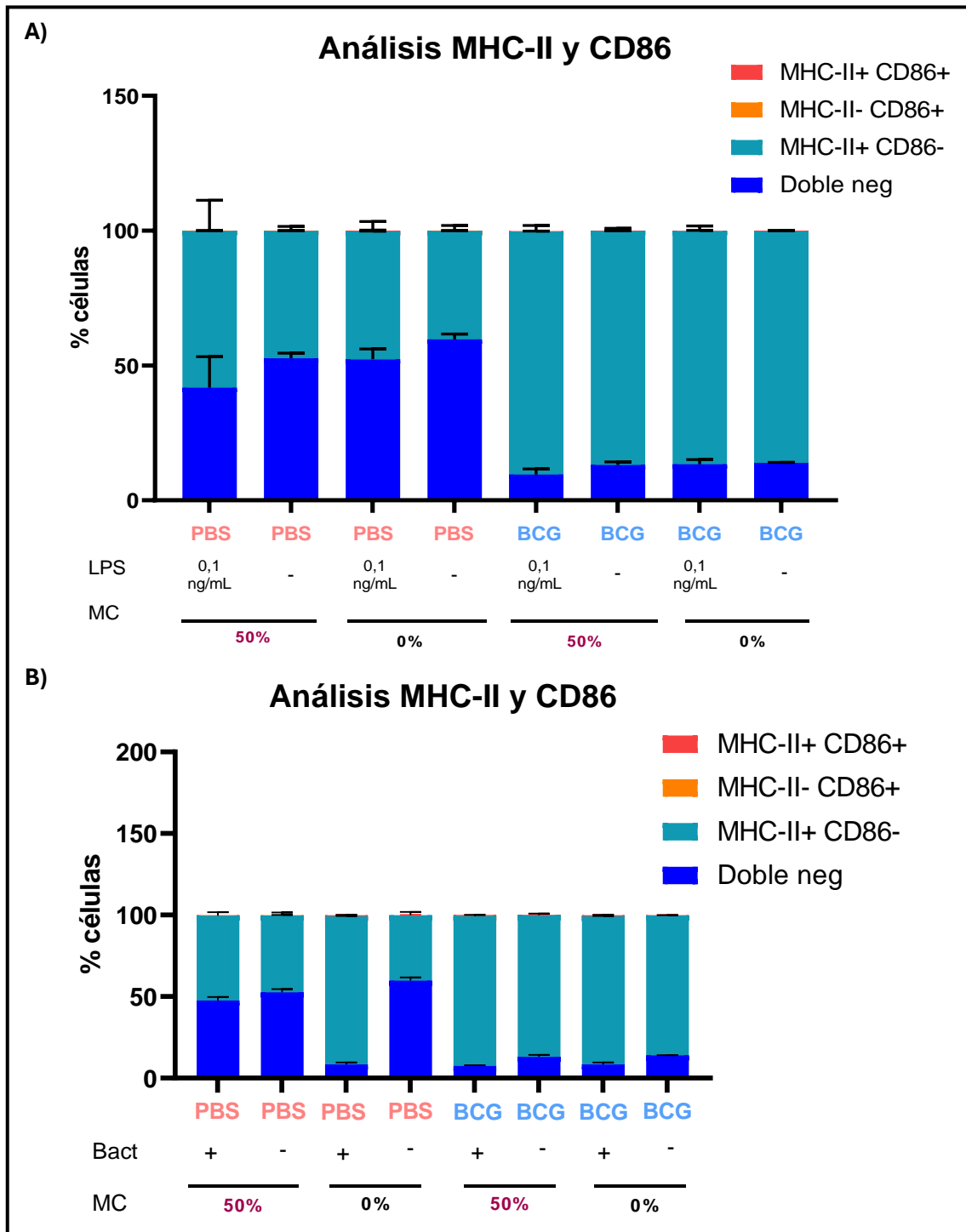
**Figura 20. Cuantificación de IL-6 y TNF- $\alpha$  mediante ELISA.** Concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes obtenidos de macrófagos de ratones vacunados con PBS (rojo) o BCG (azul), posteriormente estimulados 24h con diferentes concentraciones de LPS y/o con MC al 50%. Elaboración con GraphPad Prism 8.

### 6.3.2. Efecto del MC en macrófagos estimulados con LPS o bacterias

A continuación, se analiza el efecto de este medio condicionado tumoral con otro estímulo inflamatorio distinto de LPS, un lisado de bacterias.

En la **figura 21** se observa que de nuevo la presencia de MC en ausencia de LPS y bacterias apenas tiene efecto en las subpoblaciones de macrófagos positivas a MHC-II, y que la proporción de macrófagos positivos para MHC-II es claramente superior en los grupos de BCG, independientemente de la presencia del MC.

No obstante, la presencia bacterias (**figura 21B**) sí que activa el macrófago (aumenta MHC-II) en medio normal en macrófagos naïve (PBS), y este proceso se inhibe cuando se añade MC, sugiriendo un efecto supresor de algún factor tumoral presente en el MC. No obstante, esto no ocurre en los macrófagos de BCG. Esto reafirma lo observado en anteriormente en la **figura 18**, **que los macrófagos** procedentes de precursores hematopoyéticos entrenados serían más resistentes a sufrir la desactivación por parte de factores tumorales.



**Figura 21. Caracterización por citometría del MHC-II y CD86 en macrófagos de ratones vacunados con PBS o BCG estimulados con LPS y/o bacterias y/o MC. Los macrófagos se cuantificaron porcentualmente en subpoblaciones función de su expresión de MHC-II y CD86. A: Subpoblaciones de macrófagos diferenciados tras haber sido expuestos al LPS (0.1 ng/mL) y a MC (50%) durante 24 horas. B: Subpoblaciones de macrófagos diferenciados tras haber sido expuestos a las bacterias y a MC (50%) durante 24 horas. Elaboración con GraphPad Prism 8.**

## 7. DISCUSIÓN

Recientes investigaciones han demostrado que la adaptación funcional de las células inmunes innatas después de una infección o vacunación es responsable de la inmunidad entrenada (5). También se sabe que la vacunación con BCG disminuye la mortalidad de niños vacunados y este efecto se debe al menos en parte a la inducción de inmunidad entrenada (16).

Estudios anteriores describían que BCG era capaz de entrenar precursores hematopoyéticos, de manera que produjeran células inmunes innatas maduras con un fenotipo activado, que respondiera de manera más efectiva ante un estímulo secundario, como una infección (18). Nuestros resultados parecen confirmar este resultado. Los BMDMs diferenciados *in vitro* a partir de médula ósea de ratones vacunados con BCG tienen de base una mayor expresión del marcador de activación MHC-II, lo que se traduce en una mayor capacidad para presentar antígenos exógenos. Hay que remarcar que estos macrófagos no han estado directamente en contacto con la bacteria, sino que su fenotipo activado les viene dado por el “training” *in vivo* de sus progenitores. Este incremento de respuesta también se aprecia al comparar la cantidad de BMDMs generados partiendo de la misma cantidad de BMCs. Esto podría deberse a la existencia de más progenitores en las médulas entrenadas con BCG o a una capacidad proliferativa superior por parte de estos progenitores.

En el estudio actual, también se observa una mayor proporción de macrófagos positivos a MHC-II y un incremento en la expresión de este en BMDMs procedentes de ratones vacunados con BCG. Esto se correlaciona con estudios (18) donde se ha visto este incremento de la capacidad para presentar antígenos al utilizar la vacunación con BCG.

Al exponer a los macrófagos a LPS a distintas concentraciones (0,1 ng/mL, 1 ng/mL y 10 ng/mL) se observa una disminución en la cantidad de macrófagos positivos a MHC-II. Esta tendencia a disminuir es mayor a medida que incrementamos la concentración de LPS. Este fenómeno podría corresponder con lo que conocemos como tolerancia endotóxica y aparece descrita en la literatura como una reprogramación macrofágica ante el LPS. Esta reprogramación resulta en una presentación de antígenos deteriorada debido a una reducción en la expresión de moléculas del MHC-II (55). Esta reducción conlleva a una capacidad disminuida para activar las células T. Como consecuencia, se genera una respuesta inmune adaptativa menos efectiva.

Además, la tolerancia endotóxica también aparece descrita como una disminución de la expresión de genes que codifican citocinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  (55). Esto se correlaciona con nuestro estudio donde el grupo de vacunados con BCG, mostraban una

disminución mayor en la concentración de citocinas al utilizar una concentración de 10 ng/mL de LPS que el control (PBS). No obstante, se observó que la concentración de LPS requerida para aumentar la presencia de MHC-II y la producción de citocinas fue distinta: 0,1 ng/mL en el primer caso y 1 ng/mL en el segundo caso. Esto sugiere que el “training” en los macrófagos se produce por distintas vías y a diferentes niveles.

Utilizando las bacterias lisadas como estímulo secundario, esta tolerancia no parece reflejarse ya que además de que la producción de citocinas se mantiene elevada, la subpoblación de macrófagos positiva a MHC-II también lo aparece. La literatura sugiere que la tolerancia a patógenos puede depender de la dosis y del tipo de estímulo, y que diferentes concentraciones podrían producir respuestas diferentes (80) y en nuestro estudio no se han llegado a evaluar distintas concentraciones de CFU por lo que no se puede confirmar la ausencia de tolerancia.

En cuanto al efecto de la vacunación con BCG previa a la estimulación con LPS o lisis bacteriana, se observa que a diferencia de otros estudios (16, 81 y 82) en los que la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) se incrementa en vacunados expuestos a estímulos micobacterianos o a bacterias completamente muertas por calor, nosotros observamos lo contrario: Una reducción en la producción de citocinas (TNF- $\alpha$  y IL-6). Esta contradicción podría deberse a diferencias en los modelos experimentales estudiados, dosis de los estímulos aplicados o las condiciones específicas del microambiente inmunológico en los experimentos. Además, es posible que BCG desempeñe un papel regulatorio antiinflamatorio en función del tipo y la intensidad del estímulo, modulando la respuesta inmune de manera diferente según el contexto. No obstante, nuevas investigaciones son necesarias para comprender estos mecanismos y determinar las condiciones bajo las cuales BCG puede actuar como un modulador antiinflamatorio o proinflamatorio,

Además, BCG parece incrementar la expresión de MHC-II. Esto, combinado con lo anterior podría sugerir que la vacunación por un lado desempeña un papel antiinflamatorio regulando la respuesta inflamatoria exacerbada producida por las bacterias y el LPS. Esta regulación podría contribuir a la protección contra el shock séptico. Por otro lado, el incremento de la presentación de MHC-II podría facilitar una eliminación bacteriana más eficiente (55). Sin embargo, algunos estudios han indicado que BCG no parece afectar a la presentación de antígenos de los macrófagos tras la estimulación con LPS (83). Estas discrepancias refuerzan la necesidad de más investigaciones para aclarar estos mecanismos y determinar las condiciones específicas en las que BCG modula la respuesta inmune.

En el contexto del cáncer y el efecto que tiene BCG en un ambiente tumoral, observamos que nuestro medio condicionado no parece tener un efecto aparente en la subpoblación de macrófagos positivos a MHC-II ni a su nivel de expresión por sí solo. No obstante, en combinación con bacterias el medio condicionado parece actuar como un potente inmunosupresor al reducir la subpoblación positiva de MHC-II. En este contexto, BCG parece tener un papel potenciador del sistema inmune, lo que se correlaciona con diversos estudios (84) que demuestran que BCG induce una mayor expresión de MHC-II.

Al igual que en la literatura, se observa que el microambiente tumoral disminuye la producción de citocinas proinflamatorias (66). Sin embargo, aparece descrito que BCG induciría un incremento de esta producción (22, 74) y 85). No obstante, en nuestro estudio, la coexposición del LPS al microambiente tumoral parece incrementar exponencialmente la producción de estas citocinas proinflamatorias. En este contexto, BCG parece ejercer un papel regulador antiinflamatorio, modulando la respuesta inflamatoria exacerbada causada por la combinación de LPS y el microambiente tumoral.

En el marco del enfoque One Health, que busca optimizar la salud humana, animal y ambiental reconociendo su interconexión, el uso de vacunas dirigidas a la inmunidad innata como la BCG, presenta un nuevo paradigma terapéutico para enfermedades donde se desconoce el antígeno específico o es altamente variable, lo que complica la elaboración de vacunas dirigidas a la inmunidad adaptativa (antígeno específicas). La capacidad de la BCG para entrenar las células inmunes innatas y mejorar su respuesta de manera inespecífica ofrecería por tanto una protección robusta y adaptable, imprescindible en un mundo donde las zoonosis y enfermedades emergentes son cada vez más comunes debido a la interacción constante entre humanos, animales y el medio ambiente. Además, la habilidad de la BCG para inducir una mayor expresión de MHC-II y regular la respuesta inflamatoria sugiere su potencial en la prevención de enfermedades inflamatorias y en el manejo de condiciones como el shock séptico, tanto en humanos como en animales. Por tanto, integrar estas estrategias basadas en la inmunidad entrenada en el enfoque One Health puede fortalecer la capacidad global para enfrentar infecciones emergentes y otras enfermedades inmunológicas, destacando la importancia de continuar investigando y optimizando este tipo de inmunización para proteger la salud de todos los seres vivos y el ecosistema.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las células de médula ósea se diferenciaron correctamente tanto en animales vacunados con PBS como con BCG.
2. La vacunación con BCG fue capaz de inducir “training” en macrófagos murinos evidenciado por una mayor producción de citocinas proinflamatorias tras la exposición a un estímulo secundario.
3. El uso de diferentes concentraciones de LPS tras la vacunación con BCG tuvo diferentes efectos según la ruta analizada (MHC-II o la producción de citocinas).
4. En presencia de un microambiente tumoral, BCG parece tener un efecto regulador sobre la respuesta inflamatoria.
5. La capacidad de BCG para potenciar el sistema inmune o regular la respuesta inflamatoria sugiere su potencial uso en la prevención y tratamiento de enfermedades.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2 de junio de 2001;357(9270):1777-89.
2. Eter P, Elves JD, Oitt VMR. The immune system. First of Two Parts. Vol. 343. 2000.
3. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria - SEFH. Farmacia hospitalaria [Internet]. 2024 [citado 2024 Jun 2]. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP11.pdf>.
4. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. Vol. 23, *Nature Immunology*. Nature Research; 2022. p. 165-76.
5. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. Vol. 352, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2016. p. 427.
6. K Abbas A, H Lichtman A, Pillai S, Chávez Sánchez FR, Lascurain Ledesma R, Rivera Jiménez JM. *Inmunología celular y molecular*. 10a ed. Elsevier; 2022. 600 p.
7. Ahmad HI, Jabbar A, Mushtaq N, Javed Z, Hayyat MU, Bashir J, et al. Immune Tolerance vs. Immune Resistance: The Interaction Between Host and Pathogens in Infectious Diseases. *Front Vet Sci*. 29 de marzo de 2022;9.
8. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 1 de julio de 2012;23(4):446-57.
9. Sadd BM, Schmid-Hempel P. Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*. 20 de junio de 2006;16(12):1206-10.
10. Al B, Suen TK, Placek K, Netea MG. Innate (learned) memory. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1 de septiembre de 2023;152(3):551-66.
11. Ochando J, Mulder WJM, Madsen JC, Netea MG, Duivenvoorden R. Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. Vol. 19, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Research; 2023. p. 23-37.
12. Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JWM. Trained immunity: A memory for innate host defense. Vol. 9, *Cell Host and Microbe*. 2011. p. 355-61.
13. Lajqi T, Köstlin-Gille N, Bauer R, Zarogiannis SG, Lajqi E, Ajeti V, et al. Training vs. Tolerance: The Yin/Yang of the Innate Immune System. Vol. 11, *Biomedicines*. MDPI; 2023.
14. Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes. *Cell Host Microbe*. 16 de agosto de 2012;12(2):223-32.
15. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 29 de enero de 2009;457(7229):557-61.
16. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LAB, Ifrim DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via

- epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de octubre de 2012;109(43):17537-42.
17. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* (1979). 26 de septiembre de 2014;345(6204).
  18. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonça LE, Pacis A, et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*. 11 de enero de 2018;172(1-2):176-190.e19.
  19. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen LS, Grzybek M, Grinenko T, et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell*. 11 de enero de 2018;172(1-2):147-161.e12.
  20. Singh AK, Praharaj M, Lombardo KA, Yoshida T, Matoso A, Baras AS, et al. Re-engineered BCG overexpressing cyclic di-AMP augments trained immunity and exhibits improved efficacy against bladder cancer. *Nat Commun*. [Internet]. 2022 [citado el 13 de junio de 2024];13(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-28509-z>.
  21. Netea MG, Latz E, Mills KHG, O'Neill LAJ. Innate immune memory: A paradigm shift in understanding host defense. En: *Nature Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 675-9.
  22. Van Puffelen JH, Novakovic B, Van Emst L, Kooper D, Zuiverloon TCM, Oldenhof UTH, et al. Intravesical BCG in patients with non-muscle invasive bladder cancer induces trained immunity and decreases respiratory infections. *J Immunother Cancer*. 24 de enero de 2023;11(1).
  23. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. Vol. 6, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2021.
  24. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Medica Clin Condes* [Internet]. Julio de 2012 [consultado el 13 de junio de 2024];23(4):446-57. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70335-8).
  25. Arts RJW, Novakovic B, ter Horst R, Carvalho A, Bekkering S, Lachmandas E, et al. Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab*. 13 de diciembre de 2016;24(6):807-19.
  26. Arts RJW, Carvalho A, La Rocca C, Palma C, Rodrigues F, Silvestre R, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 6 de diciembre de 2016;17(10):2562-71.
  27. Hu S, Xiang D, Zhang X, Zhang L, Wang S, Jin K, et al. The mechanisms and cross-protection of trained innate immunity. Vol. 19, *Virology Journal*. BioMed Central Ltd; 2022.
  28. Cirovic B, de Bree LCJ, Groh L, Blok BA, Chan J, van der Velden WJFM, et al. BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. *Cell Host Microbe*. 12 de agosto de 2020;28(2):322-334.e5.
  29. Chen J, Gao L, Wu X, Fan Y, Liu M, Peng L, et al. BCG-induced trained immunity: history, mechanisms and potential applications. *J Transl Med*. 10 de febrero de 2023;21(1):106.

30. Calmette A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1931;24(11):1481.
31. Zwerling A, Behr MA, Verma A, Brewer TF, Menzies D, Pai M. The BCG World Atlas: A Database of Global BCG Vaccination Policies and Practices. *PLoS Med*. 22 de marzo de 2011;8(3):e1001012.
32. Qu M, Zhou X, Li H. BCG vaccination strategies against tuberculosis: updates and perspectives. *Hum Vaccin Immunother*. 11 de marzo de 2024;17(12):5284-95.
33. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *Journal of Urology*. agosto de 1976;116(2):180-2.
34. SYLVESTER RJ, van der MEIJDEN APM, LAMM DL. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Reduces the Risk of Progression in Patients with Superficial Bladder Cancer: A Meta-analysis of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *Journal of Urology*. noviembre de 2002;168(5):1964-70.
35. Power NE, Izawa J. Comparison of guidelines on non-muscle invasive bladder cancer (EAU, CUA, AUA, NCCN, NICE). Vol. 2, *Bladder Cancer*. IOS Press; 2016. p. 27-36.
36. Klinger D, Hill BL, Barda N, Halperin E, Gofrit ON, Greenblatt CL, et al. Bladder Cancer Immunotherapy by BCG Is Associated with a Significantly Reduced Risk of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Vaccines (Basel)*. 11 de mayo de 2021;9(5):491.
37. Moreo E, Uranga S, Picó A, Gómez AB, Nardelli-Haeffliger D, Del Fresno C, et al. Novel intravesical bacterial immunotherapy induces rejection of BCG-unresponsive established bladder tumors. *J Immunother Cancer*. 1 de julio de 2022;10(7).
38. Moreo E, Jarit-Cabanillas A, Robles-Vera I, Uranga S, Guerrero C, Gómez AB, et al. Intravenous administration of BCG in mice promotes natural killer and T cell-mediated antitumor immunity in the lung. *Nat Commun*. 1 de diciembre de 2023;14(1).
39. Moreo Lapieza EJ. Use of live attenuated mycobacteria for cancer treatment in experimental mouse models [tesis doctoral]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2023. 303 p.
40. Wardhana, Datau EA, Sultana A, Mandang VV V, Jim E. The efficacy of Bacillus Calmette-Guerin vaccinations for the prevention of acute upper respiratory tract infection in the elderly. *Acta Med Indones*. julio de 2011;43(3):185-90.
41. Moorlag SJCFM, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clinical Microbiology and Infection*. diciembre de 2019;25(12):1473-8.
42. Salem A, Nofal A, Hosny D. Treatment of Common and Plane Warts in Children with Topical Viable Bacillus Calmette-Guerin. *Pediatr Dermatol*. 7 de enero de 2013;30(1):60-3.
43. Curtis N, Sparrow A, Ghebreyesus TA, Netea MG. Considering BCG vaccination to reduce the impact of COVID-19. *The Lancet*. mayo de 2020;395(10236):1545-6.
44. Lee J, Reinke EK, Zozulya AL, Sandor M, Fabry Z. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin Infection in the CNS Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and

- Th17 Responses in an IFN- $\gamma$ -Independent Manner. *The Journal of Immunology*. 1 de noviembre de 2008;181(9):6201-12.
45. Kühnreiter WM, Tran L, Kim T, Dybala M, Nguyen B, Plager S, et al. Long-term reduction in hyperglycemia in advanced type 1 diabetes: the value of induced aerobic glycolysis with BCG vaccinations. *NPJ Vaccines*. 21 de junio de 2018;3(1):23.
  46. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off. *Science*. 1998 [citado el 13 de junio de 2024];280(5361):243–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9535647/>
  47. Soares MP, Teixeira L, Moita LF. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 83-96.
  48. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. Vol. 5, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010. p. 119-44.
  49. Soares MP, Gozzelino R, Weis S. Tissue damage control in disease tolerance. *Trends Immunol*. 1 de octubre de 2014;35(10):483-94.
  50. Divangahi M, Aaby P, Khader SA, Barreiro LB, Bekkering S, Chavakis T, et al. Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. Vol. 22, *Nature Immunology*. Nature Research; 2021. p. 2-6.
  51. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. Vol. 20, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2020. p. 375-88.
  52. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease Tolerance as a Defense Strategy [Internet]. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/>
  53. Netea MG, Joosten LAB. Trained Immunity and Local Innate Immune Memory in the Lung. Vol. 175, *Cell*. Cell Press; 2018. p. 1463-5.
  54. Rajaiah R, Perkins DJ, Polumuri SK, Zhao A, Keegan AD, Vogel SN. Dissociation of Endotoxin Tolerance and Differentiation of Alternatively Activated Macrophages. *The Journal of Immunology*. 1 de mayo de 2013;190(9):4763-72.
  55. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. Vol. 30, *Trends in Immunology*. 2009. p. 475-87.
  56. Bauer M, Weis S, Netea MG, Wetzker R. Remembering Pathogen Dose: Long-Term Adaptation in Innate Immunity. *Trends Immunol*. 1 de junio de 2018;39(6):438-45.
  57. Chen K, Geng S, Yuan R, Diao N, Upchurch Z, Li L. Super-low Dose Endotoxin Pre-conditioning Exacerbates Sepsis Mortality. *EBioMedicine*. 1 de abril de 2015;2(4):324-33.
  58. Novakovic B, Habibi E, Wang SY, Arts RJW, Davar R, Megchelenbrink W, et al.  $\beta$ -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell*. 17 de noviembre de 2016;167(5):1354-1368.e14.
  59. Hamoudi R, Conti L, Olive D, MacRobert A. Editorial: Understanding the immunological mechanism of cancer using systems immunology approaches. *Front Immunol*. 1 de diciembre de 2023;14.

60. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*. 13 de marzo de 2023;41(3):374-403.
61. Dominiak A, Chełstowska B, Olejarz W, Nowicka G. Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions. *Cancers (Basel)*. 14 de mayo de 2020;12(5):1232.
62. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer [Internet]. Vol. 10, *Am J Cancer Res*. 2020. Disponible en: [www.ajcr.us/](http://www.ajcr.us/)
63. Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Modern Pathology*. febrero de 2018;31(2):214-34.
64. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 73-86.
65. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res*. 15 de julio de 2010;70(14):5649-69.
66. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 1 de abril de 2010;22(2):231-7.
67. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology*. 2009. p. 259-70.
68. Avila-Ponce de León U, Vázquez-Jiménez A, Padilla-Longoria P, Resendis-Antonio O. Uncoding the interdependency of tumor microenvironment and macrophage polarization: insights from a continuous network approach. *Front Immunol*. 22 de mayo de 2023;14.
69. Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. Vol. 32, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc.; 2014. p. 609-34.
70. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Vol. 3, *Nature Reviews Immunology*. 2003. p. 23-35.
71. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. Vol. 141, *Cell*. Elsevier B.V.; 2010. p. 39-51.
72. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol*. 1 de febrero de 2006;16(1):53-65.
73. Soares-Schanoski A, Jurado T, Córdoba R, Siliceo M, Fresno C del, Gómez-Piña V, et al. Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 29 de junio de 2012;423(2):331-7.
74. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. Vol. 19, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 369-82.
75. Mulder WJM, Ochando J, Joosten LAB, Fayad ZA, Netea MG. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat Rev Drug Discov*. 1 de julio de 2019;18(7):553-66.

76. Koelwyn GJ, Newman AAC, Afonso MS, van Solingen C, Corr EM, Brown EJ, et al. Myocardial infarction accelerates breast cancer via innate immune reprogramming. *Nat Med.* 13 de septiembre de 2020;26(9):1452-8.
77. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* septiembre de 1975;72(9):3666-70.
78. Herr HW, Schwalb DM, Zhang ZF, Sogani PC, Fair WR, Whitmore WF, et al. Intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *Journal of Clinical Oncology.* junio de 1995;13(6):1404-8.
79. Steerenberg PA, Jong WH, Elgersma A, Burger R, Poels LG, Claessen AME, et al. Tumor infiltrating leukocytes (tils) during progressive tumor growth and BCG-mediated tumor regression. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* diciembre de 1990;59(1):185-94.
80. Ayres JS, Schneider DS. Tolerance of Infections. *Annu Rev Immunol.* 23 de abril de 2012;30(1):271-94.
81. Arts RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, Li Y, Wang SY, Oosting M, et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe.* enero de 2018;23(1):89-100.e5.
82. Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsilika M, Moorlag S, Antonakos N, Kotsaki A, Domínguez-Andrés J, et al. Activate: Randomized Clinical Trial of BCG Vaccination against Infection in the Elderly. *Cell.* octubre de 2020;183(2):315-323.e9.
83. Bickett TE, McLean J, Creissen E, Izzo L, Hagan C, Izzo AJ, et al. Characterizing the BCG Induced Macrophage and Neutrophil Mechanisms for Defense Against Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol.* 18 de junio de 2020;11.
84. Steerenberg PA, De Jong WH, Geerse E, Aleva BJ, Besselink CMLT, Van Rens BTTM, et al. Major histocompatibility complex class II antigen expression during potentiation of line-10 tumor immunity after intralesional administration of bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* marzo de 1990;32(2):95-104.
85. Larsen ES, Joensen UN, Poulsen AM, Goletti D, Johansen IS. Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. *APMIS.* 28 de febrero de 2020;128(2):92-103.