

Trabajo Fin de Máster

Caracterización de macrófagos humanos activados
por BCG (B-MACs) como terapia celular
antitumoral.

Characterization of BCG-activated human
macrophages (B-MACs) as an anti-tumor cell
therapy.

Autor

Paula Ercilla Rodríguez

Directores

Juan Ignacio Aguiló Anento
Ainhua Arbúes Arribas

Facultad de Medicina
2023/2025

Índice:

Abreviaturas:	i
Lista de Figuras:	iii
Lista de Tablas:	iv
1. Resumen:	1
2. Abstract:	1
3. Introducción.....	3
3.1. Introducción al cáncer.....	3
3.2. Epidemiología del cáncer.....	3
3.3. El sistema inmunitario y su papel en la respuesta antitumoral	4
3.3.1. El sistema inmunitario innato	4
3.3.2. El sistema inmunitario adaptativo	5
3.4. Interacción entre el cáncer y el sistema inmunitario	6
3.4.1. Teoría de la inmunovigilancia e immunoedición tumoral	6
3.4.2. Ciclo de la respuesta inmune antitumoral.....	7
3.5. Inmunoterapia en cáncer	8
3.5.1. Tipos de inmunoterapia	9
3.6. El papel de los macrófagos en el cáncer	9
3.6.1. Polarización de los macrófagos (M1 vs. M2).....	10
3.6.2. Activación de los macrófagos a través de PRRs y TLRs	12
3.6.3. Memoria entrenada	13
3.7. El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) como modulador inmunológico.....	14
3.7.1. Las micobacterias y su interacción con el SI.....	14
3.7.2. Desarrollo histórico de BCG y variabilidad genética en sus subcepas.....	15
3.7.3. Atenuación de BCG.....	16
3.7.4. Aplicaciones de BCG: vacuna contra la tuberculosis y agente terapéutico contra el cáncer. 17	
4. Antecedentes y objetivos:.....	21
5. Materiales y métodos.....	23
5.1. Células eucariotas	23
5.1.1. Líneas celulares	23
5.1.1.1. THP-1	23
5.1.1.2. A549.....	24

5.1.2.	Macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (hMDMs)	25
5.2.	Cepas bacterianas	27
5.2.1.	Condiciones de cultivo	27
5.2.2.	Preparación de suspensiones “stock” para infección	27
5.3.	Infección con BCG-GFP	28
5.4.	Estudio de la infectividad de BCG y su capacidad para inducir la polarización de los macrófagos infectados.....	28
5.5.	Evaluación de la muerte celular inducida por la infección con BCG	29
5.6.	Determinación de la citotoxicidad de los hMDMs frente a células tumorales.....	30
5.7.	Análisis mediante citometría de flujo	30
5.7.1.	Procesamiento de muestras para citometría de flujo	31
5.7.1.1.	Recolección de muestras	31
5.8.	Cuantificación de la secreción de TNF- α mediante ELISA.....	32
5.9.	Análisis estadístico.....	33
6.	Resultados:	34
6.1.	BCG-GFP infecta eficazmente las células THP-1 diferenciadas, pero no induce cambios en marcadores M1/M2.	34
6.2.	La infección con BCG-GFP induce la polarización de los hMDMs hacia un fenotipo M1.....	38
6.3.	Los hMDMs activados con BCG ejercen un efecto citotóxico sobre las células tumorales	42
7.	Discusión	44
8.	Conclusiones:	47
9.	Conclusions:	47
10.	Bibliografía:.....	48
	Anexos:.....	A
	Anexo A: Caracterización de los Macrófagos M1 y M2 ¹²⁶	A
	Anexo B: Expresión, ligandos y rutas de señalización de los TLRs humanos ^{62,127}	B
	Anexo C: Espectros de excitación y emisión correspondientes a los fluorocromos empleados.	C

Abreviaturas:

ADC: Albúmina, Dextrosa y Catalasa

AG: Arabinogalactano

APCs: Células Presentadoras de Antígenos (*Antigen-Presenting Cells*)

ARG1: Arginasa-1

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

B-MACs: Macrófagos Activados por BCG (*BCG-Activated Macrophages*)

BSA: Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CAR-M: Macrófagos con Receptor de Antígenos Quimérico (*Chimeric Antigen Receptor Macrophages*)

CAR-T: Células T con Receptor de Antígenos Quimérico (*Chimeric Antigen Receptor T cells*)

CD: Clúster de Diferenciación

CFP-10: Proteína de Filtrado de Cultivo de 10 KDa (*Culture Filtrate Protein 10 kDa*)

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño (*Damage-Associated Molecular Patterns*)

DCs: Células Dendríticas (*Dendritic Cells*)

DE: Desviación Estándar

DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad Óptica

ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*)

ESAT-6: Proteína Antigénica de Secreción Temprana de 6 KDa (*Early Secreted Antigenic Target 6 kDa*)

ESX-1: Sistema de Secreción de ESAT-6 1 (*ESAT-6 Secretion System 1*)

FAP: Proteína de Unión a Fibronectina (*Fibronectin Attachment Protein*)

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (*Food and Drug Administration*)

GFP: Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein*)

GLOBOCAN: Observatorio Global del Cáncer (*Global Cancer Observatory*)

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

hMDMs: Macrófagos Humanos Derivados de Monocitos (*Human Monocyte-Derived Macrophages*)

ICIs: Inhibidores de Punto de Control Inmunitarios (*Immune Checkpoint Inhibitors*)

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

ILCs: Células Linfoides Innatas (*Innate Lymphoid Cells*)

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)

iPSC: Células Madre Pluripotentes Inducidas (*Induced Pluripotent Stem Cells*)

LAM: Lipoarabinomano

LM: Lipomano

LPS: Lipopolisacárido

MACS buffer: Buffer de Separación Celular (*Magnetic-Activated Cell Sorting buffer*)

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

MDSCs: Células Supresoras de Origen Mieloide (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*)

MFI: Mediana de Intensidad de Fluorescencia (*Median Fluorescence Intensity*)

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

MOI: Multiplicidad de Infección (*Multiplicity Of Infection*)

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*
 NET: Trampas Extracelulares de Neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps*)
 NF-κB: Factor nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)
 NI: No Infectadas
 NK: *Natural Killer*
 NMIBC: Cáncer De Vejiga No Músculo Invasivo (*Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*)
 OMS: Organización Mundial de la Salud
 OS: Supervivencia Global (*Overall Survival*)
 p.i.: Post Infección
 PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
 PB: Pacific Blue
 PBMC: Células Mononucleares de Sangre Periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
 PBS: Tampón Fosfato Salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
 Pen: Penicilina
 PG: Peptidoglucano
 PMA: Forbol 12-Miristato 13-Acetato (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*)
 PMN: Células Polimorfonucleares (*Polymorphonuclear Cells*)
 PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones (*Pattern Recognition Receptors*)
 PTX: Pentoxifilina
 RD: Región Diferencial
 REML: Método de Máxima Verosimilitud Restringida (*Restricted Maximum Likelihood*)
 RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*)
 ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
 SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
 SI: Sistema Inmunitario
 SSI: Statens Serum Institut
 Strep: Estreptomicina
 TAMs: Macrófagos Asociados a Tumores (*Tumor-Associated Macrophages*)
 TCR: Receptor de Células T (*T-Cell Receptor*)
 TGF-β: Factor de Crecimiento Transformador Beta (*Transforming Growth Factor beta*)
 Th: Linfocito T *helper*
 TLP: Tiempo Libre de Progresión
 TLR: Receptores Tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)
 TME: Microambiente Tumoral (*Tumor Microenvironment*)
 TNF: Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
 TRAIL: Ligando Apoptótico Relacionado con TNF (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)
 Treg: Linfocitos T reguladores
 UFC: Unidades Formadoras de Colonias
 VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
 VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 VPH: Virus del Papiloma Humano

Lista de Figuras:

Figura 1: Incidencia estimada en España para cada tipo de cáncer.....	4
Figura 2: Reconocimiento de patrones en la inmunidad innata.....	5
Figura 3: Etapas de la inmunomodulación tumoral.....	7
Figura 4: Ciclo de la respuesta inmune antitumoral.....	8
Figura 5: Enfoques actuales en el campo de la inmunoterapia frente al cáncer.....	9
Figura 6: Estrategias inmunoterapéuticas mediante el uso de macrófagos.....	12
Figura 7: Vía de señalización de TLRs en células inmunitarias innatas.....	13
Figura 8: Modificación de H3K4me3 en promotores de genes proinflamatorios.....	14
Figura 9: Estructura y componentes principales de la envuelta celular de las micobacterias.....	15
Figura 10: Árbol filogenético y evolución de las cepas de BCG derivadas de <i>Mycobacterium bovis</i>	16
Figura 11: Estructura genética y mecanismo de secreción del sistema ESX-1 en <i>Mtb</i>	17
Figura 12: Distribución mundial de las políticas de vacunación de BCG.....	17
Figura 13: Mecanismo de acción inmunológico de BCG en el cáncer de vejiga.	19
Figura 14: Caracterización de la respuesta inmune inducida por BCG en el TME.	20
Figura 15: Efecto de la administración de BCG en la respuesta inmunitaria en modelos murinos de cáncer de pulmón.	21
Figura 16: Efectos de la administración de BCG en la infiltración celular, citotoxicidad y carga tumoral en modelos murinos de cáncer de pulmón.....	22
Figura 17: Estrategia de gating para la evaluación de la eficiencia del aislamiento de células CD14 ⁺ a partir de PBMCs mediante microesferas magnéticas anti-CD14.....	26
Figura 18: Estrategia de gating utilizada para el análisis por citometría de flujo de los estudios de infectividad y polarización.....	29
Figura 19: Estrategia de gating para el cálculo de porcentaje de células muertas por citometría de flujo...29	29
Figura 20: Estrategia de gating para evaluar la viabilidad de células A549 en co-cultivo con macrófagos infectados por BCG.....	30
Figura 21: Curva estándar del ensayo ELISA para la cuantificación de TNF- α humano.....	33
Figura 22: Expresión de CD11b en células THP-1 tras exposición a PMA.....	34
Figura 23: Evaluación morfológica del fenotipo diferenciado en células THP-1 tras distintos tiempos de exposición a PMA.....	35
Figura 24: Esquema representativo del diseño experimental empleado para la línea celular THP-1.....	35
Figura 25: Análisis de infectividad en células THP-1 diferenciados con PMA tras infección con BCG-GFP.....	36
Figura 26: Secreción de TNF- α inducida por la infección con BCG en macrófagos derivados de THP-1..37	37
Figura 27: Evaluación del efecto de la infección con BCG-GFP de la polarización de las células THP-1 infectadas.....	37
Figura 28: Caracterización de hMDMs no infectados o infectados con BCG-GFP.....	39
Figura 29: Evaluación de la infectividad de BCG-GFP en hMDMs.....	39

Figura 30. Evaluación de la polarización de hMDMs tras la infección con BCG.....	40
Figura 31. Evaluación del efecto de la MOI en la muerte celular de hMDMs infectados con BCG.....	41
Figura 32: Cuantificación del TNF- α secretado por hMDMs infectados con BCG a las 72 h p.i.....	41
Figura 33: Diagrama experimental para la evaluación de citotoxicidad de los hMDMs activados con BCG sobre las A549.....	42
Figura 34: Imágenes representativas del co-cultivo de hMDMs con células A549 durante 24 h.....	42
Figura 35: Evaluación de la actividad citotóxica de los hMDMs activados con BCG frente a células A549.....	43
Figura 36. Espectros de excitación y emisión de los fluorocromos utilizados para la detección de los marcadores fenotípicos por citometría de flujo.....	iii

Lista de Tablas:

Tabla 1. Descripción del mantenimiento de las líneas celulares usadas en este estudio.....	23
Tabla 2. Características demográficas de los distintos donantes utilizados.....	25
Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas.....	27
Tabla 4: Anticuerpos utilizados para la detección de marcadores fenotípicos de superficie.....	31
Tabla 5. Análisis de la eficacia del aislamiento de monocitos CD14 ⁺ y su caracterización fenotípica por citometría de flujo.....	38

1. Resumen:

El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), una cepa atenuada viva de *Mycobacterium bovis*, se utiliza ampliamente tanto como vacuna frente a la tuberculosis como en la inmunoterapia de primera línea para el cáncer de vejiga no músculo invasivo. Su eficacia se debe, en gran parte, a la activación del sistema inmunitario, especialmente de los macrófagos, que desempeñan un papel clave en la respuesta antitumoral. En este estudio se plantea la caracterización inmunológica de los macrófagos activados por BCG (B-MACs) humanos y la evaluación de su posible aplicación como herramienta en inmunoterapia celular.

Mediante el uso de la línea monocítica THP-1 y macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (hMDMs), se analizó la infectividad de BCG-GFP, la polarización de macrófagos (M1/M2), la secreción de TNF- α y el efecto citotóxico de los B-MACs sobre células tumorales A549. Los resultados muestran que, si bien BCG-GFP infecta eficazmente las células THP-1 diferenciadas, no induce cambios significativos en su perfil de polarización. En contraste, los hMDMs infectados con BCG mostraron una clara polarización hacia un fenotipo M1, con disminución de la expresión CD163 y aumento de la expresión de CD40 y la secreción de TNF- α . Además, los B-MACs ejercieron un efecto citotóxico notable sobre las células tumorales en ensayos *in vitro*.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que BCG puede reprogramar funcionalmente a los macrófagos humanos hacia un fenotipo proinflamatorio con propiedades antitumorales. El estudio plantea así el potencial uso de los B-MACs como candidatos en inmunoterapia celular adoptiva, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento de tumores sólidos.

2. Abstract:

The Bacillus Calmette-Guérin (BCG), a live attenuated strain of *Mycobacterium bovis*, is widely used not only as a vaccine against tuberculosis but also as the first-line immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer. Its efficacy is attributed to the activation of the immune system, particularly macrophages, which play a crucial role in antitumor responses. In this study, we aimed to immunologically characterize human BCG-activated macrophages (B-MACs) and evaluate their potential application in cellular immunotherapy.

Using both the THP-1 monocytic cell line and primary human monocyte-derived macrophages (hMDMs), we analyzed the infectivity of BCG-GFP, macrophage polarization (M1/M2), pro-inflammatory cytokine secretion (TNF- α), and the cytotoxic effect of B-MACs on A549 tumor cells. Our findings show that while BCG-GFP infects THP-1 cells, it does not significantly alter their polarization profile. However, in hMDMs, BCG induces a pronounced shift toward an M1 phenotype, characterized by decreased CD163, and increased CD40 expression and TNF- α secretion. Moreover, B-MACs exhibited significant cytotoxic activity against A549 cells *in vitro*.

These results support the hypothesis that BCG can functionally reprogram human macrophages toward a pro-inflammatory and tumoricidal phenotype. The study highlights the potential of human B-MACs as candidates for adoptive cell therapy in cancer treatment, laying the groundwork for future preclinical models exploring their efficacy in solid tumors.

3. Introducción

3.1. Introducción al cáncer

El término “cáncer” se emplea de manera genérica para referirse a un conjunto amplio de enfermedades caracterizadas por la presencia de células anormales que pueden desarrollarse en cualquier parte del organismo. Estas células presentan características distintivas, como una proliferación descontrolada, un nivel reducido de diferenciación, y en algunos casos, la capacidad de invadir tejidos u órganos adyacentes, así como lejanos, a través de un proceso conocido como metástasis¹. La transformación maligna es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas en oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes implicados de manera directa o indirecta en la proliferación celular². Estas mutaciones afectan diversos niveles de organización biológica, como el nivel molecular, celular, tisular y sistémico³ contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Dado que el cáncer es una enfermedad de naturaleza multifactorial, su desarrollo no solo depende de estas alteraciones genéticas, sino también de factores epigenéticos y del microambiente tumoral (TME, de sus siglas en inglés). Además, la interacción con el sistema inmunitario y la exposición a agentes externos como carcinógenos químicos (como el tabaco o el alcohol), radiación o infecciones virales como el Virus del Papiloma Humano (VPH) o el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), también desempeñan un papel relevante^{4,5}.

3.2. Epidemiología del cáncer

En la actualidad el cáncer representa una de las principales causas de mortalidad en el mundo detrás de las enfermedades cardiovasculares, según la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶. En España, estas patologías también ocupan un lugar destacado como causa de morbi-mortalidad⁷ con una incidencia creciente atribuida tanto al envejecimiento poblacional como a la influencia de diversos factores de riesgo, como el tabaquismo, la obesidad y otros hábitos relacionados con el estilo de vida^{4,5,8}.

Según la base de datos *Global Cancer Observatory (GLOBOCAN)* ⁹, se proyecta que la incidencia global alcance 28,4 millones de casos para 2040, lo que representa un incremento cercano al 50% en comparación con cifras recientes. A nivel nacional, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), estima que en 2024 se registrarán aproximadamente 286.664 nuevos casos de cáncer, lo que supone un incremento del 2,6% en relación con el año anterior⁷. Esta tendencia refleja tanto avances en el diagnóstico como el envejecimiento poblacional y la persistencia de factores de riesgo. Entre los tipos de cáncer más frecuentes en España se encuentran el colorrectal, el de mama y el de pulmón, observándose patrones diferenciales según el sexo, como se ilustra en la Figura 1.

Más allá de su impacto sanitario, el cáncer también representa un desafío económico y social significativo, afectando no solo a los pacientes, sino también a sus familias y a los sistemas de salud debido a los costos asociados a los tratamientos y a la pérdida de productividad laboral. Además, la heterogeneidad genética y fenotípica de las células tumorales, junto con las diferencias geográficas y acceso a terapias, resalta la necesidad de enfoques personalizados y adaptados a las características específicas de cada paciente.

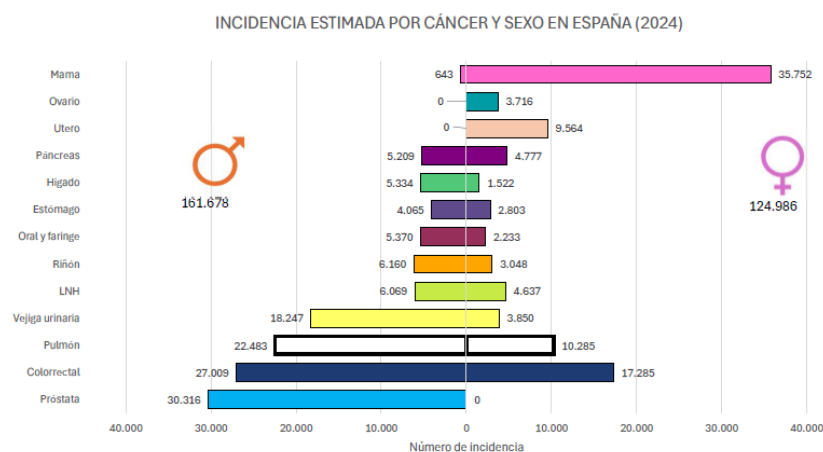


Figura 1: Incidencia estimada en España para cada tipo de cáncer⁷.

En este contexto, la investigación oncológica se centra en el desarrollo de tratamientos más eficaces que permitan reducir la mortalidad, incrementar las tasas de supervivencia y prolongar el tiempo libre de progresión (TLP), así como mejorar la supervivencia global (OS) en comparación con las terapias “tradicionales” como la quimioterapia y la radioterapia. En este contexto, la inmunoterapia ha emergido como una de las estrategias terapéuticas más prometedoras, al potenciar la capacidad del sistema inmunitario para atacar de manera efectiva a las células cancerígenas, abriendo nuevas posibilidades de tratamiento.

3.3. El sistema inmunitario y su papel en la respuesta antitumoral

El sistema inmunitario (SI) es una red compleja formada por diversos tipos de barreras físicas, tipos celulares y moléculas solubles que trabajan de forma coordinada para generar una respuesta que engloba los mecanismos y procesos destinados a reconocer y defender al organismo frente a agentes invasores, como patógenos (virus, bacterias, parásitos...) y células tumorales¹⁰. El SI se divide en dos grandes líneas de defensa: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa^{11,12}.

3.3.1.El sistema inmunitario innato

La inmunidad innata, también conocida como inmunidad natural o nativa, representa la primera línea de defensa celular del organismo. Se basa en mecanismos inespecíficos, independientes del reconocimiento de antígenos que se activan inmediatamente al entrar en contacto con un agente potencialmente dañino¹².

Este sistema incluye una amplia variedad de células efectoras. Entre ellas destacan los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) encargados de fagocitar y eliminar diversos agentes patogénicos mediante la liberación del contenido de sus gránulos citotóxicos^{11,13}. Los monocitos, por su parte, circulan por el torrente sanguíneo y migran a los tejidos en respuesta a señales de homeostasis o de inflamación, donde se diferencian a macrófagos o células dendríticas¹⁴. Las células dendríticas (DCs, de sus siglas en inglés), además de su capacidad fagocítica, actúan como células presentadoras de antígenos (APCs, de sus siglas en inglés) estableciendo un puente entre el SI innato y adaptativo¹⁵. Al igual que las DCs, los granulocitos¹⁶ y los macrófagos son células fagocíticas y APCs que orquestan la respuesta inmunológica mediante la inducción de inflamación y la liberación de factores de señalización que activan y reclutan a

otras células del SI¹⁷⁻¹⁹. Otro grupo importante son las células linfoides innatas (ILCs), que carecen de receptores específicos para antígenos, pero desempeñan un papel clave en la defensa contra infecciones y en la regulación de la inflamación. Dentro de este grupo, se encuentran las células NK (*Natural Killer*), cuya función es eliminar células infectadas o transformadas mediante la inducción de lisis y apoptosis, de manera análoga a las células T CD8^{+11,20,21}.

Además de las células, la inmunidad innata incluye barreras físicas y químicas, como el epitelio, el cual previene la entrada de agentes patógenos²². Algunos epitelios especializados, secretan moco, el cual es continuamente renovado gracias a la acción coordinada de los cilios epiteliales²². Otra parte fundamental de la inmunidad innata son las proteínas solubles y pequeñas moléculas bioactivas que están presentes de forma constitutiva en los fluidos biológicos. Entre ellas destacan las proteínas del complemento, que contribuyen a la opsonización y lisis de patógenos¹¹; las defensinas y ficolinas²² o aquellas que se liberan de las células activadas como las citoquinas (proteínas de señalización celular esenciales en la regulación y comunicación del SI)¹¹, quimiocinas (proteínas encargadas de la migración celular), mediadores lipídicos, y las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS)²².

Finalmente, el SI innato incluye receptores específicos, como los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), para identificar estructuras moleculares asociadas a patógenos (PAMPs) o al daño tisular (DAMPs)²². Su activación desencadena cascadas de señalización que culminan en respuestas inflamatorias eficaces contra infecciones o lesiones celulares¹¹ (Figura 2).

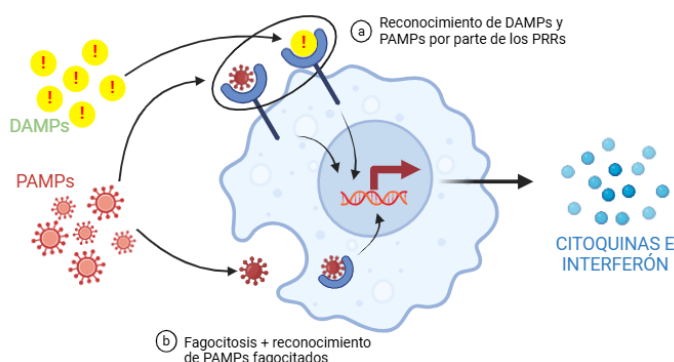


Figura 2: Reconocimiento de patrones en la inmunidad innata. Esta figura refleja cómo el sistema inmunológico innato detecta patógenos a través de PRRs y genera una respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas e interferones.

3.3.2.El sistema inmunitario adaptativo

El SI adaptativo se caracteriza por desarrollar una respuesta más lenta y específica, ya que requiere del reconocimiento del antígeno. Esta respuesta es altamente eficaz gracias a la especificidad de los receptores de las células que la conforman, lo que también permite la generación de la memoria inmunológica clásica¹².

Generalmente, la respuesta adaptativa se activa después de un periodo de aproximadamente 4-7 días desde el inicio de la respuesta innata¹², tiempo necesario para que las células del sistema adaptativo reconozcan los antígenos, se activen, proliferen y migren al sitio de infección donde generan las respuestas específicas¹². Dentro del sistema adaptativo, los linfocitos T y B son los principales efectores de la respuesta inmune debido a la alta variabilidad de sus receptores para reconocer antígenos específicos²³. Los linfocitos B producen anticuerpos tras diferenciarse a células plasmáticas en los órganos linfoides secundarios²⁴,

mientras que los linfocitos T se diferencian en el timo a linfocitos T efectores, que pueden eliminar células anormales mediante citotoxicidad (linfocitos CD8⁺), activar a los macrófagos y células B (linfocitos CD4⁺) o suprimir el curso de la respuesta inmunológica (linfocitos T reguladores o Treg)^{25,26}. Además, tanto los linfocitos B como T pueden diferenciarse en linfocitos de memoria, células de vida larga que generarán linfocitos de memoria efectores capaces de responder rápidamente a exposiciones posteriores al antígeno para el que son específicos²⁶.

3.4. Interacción entre el cáncer y el sistema inmunitario

3.4.1. Teoría de la inmunovigilancia e immunoedición tumoral

El SI, como ya hemos mencionado, posee un papel central en la vigilancia y eliminación de las células tumorales, una función inicialmente postulada por Paul Ehrlich y posteriormente desarrollada por Thomas y Burnet. Estos últimos introdujeron el concepto de “Inmunovigilancia” que describe la capacidad del SI para reconocer y eliminar las células tumorales, evitando así el desarrollo de la enfermedad²⁷.

En la actualidad, esta teoría ha evolucionado hacia el modelo de “Immunoedición”, que incluye tres etapas dinámicas: eliminación, equilibrio y escape. Estas fases, representadas en la Figura 3, reflejan la interacción entre el SI y las células tumorales, evidenciando tanto los mecanismos de defensa que restringen el crecimiento tumoral como las estrategias de los tumores para evadir dichas respuestas inmunológicas, contribuyendo al avance de la enfermedad.

3.4.1.1. Fases de la immunoedición: eliminación, equilibrio y escape

La fase de eliminación representa el fundamento clásico de la inmunovigilancia propuesta por Burnet. En esta etapa, tras la transformación maligna de las células y el fallo de los mecanismos intrínsecos no inmunológicos de supresión tumoral, el SI innato y adaptativo actúan de manera sinérgica para identificar y destruir estas células transformadas²⁸. Este proceso es posible gracias al reconocimiento de antígenos tumorales específicos por parte de las células inmunes, lo que permite generar una respuesta efectora adecuada dirigida contra las células transformadas que los expresan.

Sin embargo, si no se logra erradicar el tumor por completo, se transita a una etapa de equilibrio, en la cual el crecimiento tumoral se encuentra restringido por mecanismos inmunológicos, aunque no es erradicado por completo. Durante esta fase, las células inmunes mantienen la proliferación tumoral bajo control mediante mecanismos de vigilancia, pero la persistencia de las células tumorales puede conducir a su selección y adaptación en un TME modulado por el SI. La duración de esta fase es altamente variable entre pacientes y depende en gran medida de factores como la estructura y composición del TME establecido, ya que este entorno puede restringir la efectividad de las células inmunes, favoreciendo la coexistencia prolongada entre el tumor y el SI.

Finalmente, el crecimiento tumoral puede progresar hacia la fase de escape, en la cual las células tumorales desarrollan estrategias para evadir el SI. Entre estas estrategias destacan: el reclutamiento de células inmunosupresoras, como las células supresoras de origen mieloide (MDSCs, de sus siglas en inglés); la

expresión de moléculas de control inmunitario por parte de las células tumorales, como PD-L1 o CTLA-4, que inhiben directamente la actividad de las células T efectoras²⁸; la inducción de la secreción de moléculas inmunosupresoras como el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) y la interleuquina 10 (IL-10)¹¹ y la pérdida de la expresión de antígenos tumorales¹¹. Estas adaptaciones permiten que las células tumorales proliferen sin restricciones, contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

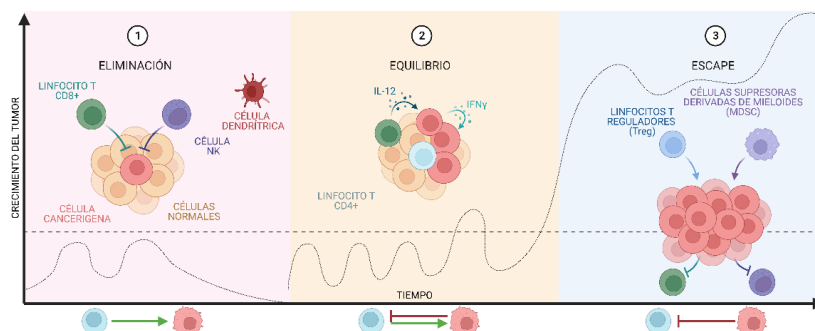


Figura 3: Etapas de la inmunoección tumoral. Esquema representativo del crecimiento tumoral durante las diferentes etapas de la inmunovigilancia desarrollada por Thomas y Burnet²⁹.

3.4.2.Ciclo de la respuesta inmune antitumoral

Para que una respuesta inmune antitumoral sea efectiva, es decir, sea capaz de controlar el crecimiento tumoral, es necesario que se den una serie de pasos secuenciales, lo que se conoce como el ciclo de la respuesta inmune antitumoral (Figura 4).

Este ciclo se inicia con la liberación y captura de neoantígenos generados durante la oncogénesis por las APCs. Las DCs procesan los antígenos y sufren un proceso de maduración, que conlleva un aumento de la expresión de diversas moléculas, incluido el receptor de quimiocinas CCR7. Esta maduración permite la migración de las DCs a los ganglios linfáticos, donde establecen la interacción con los linfocitos T.

Para inducir una respuesta T antitumoral efectiva, es necesario que este proceso este acompañado de señales que impidan la tolerancia periférica a los antígenos tumorales. Entre estas señales se encuentra una alta expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y coestimuladoras, como CD80, IL1 e interferón alfa (IFN- α)³⁰. Esto permite la presentación antigénica a través de MHC-I a los linfocitos T CD8⁺ o a través de MHC-II a los linfocitos T CD4⁺³¹ lo que desencadena el cebado y la activación de las respuestas T efectoras dirigidas contra estos antígenos tumorales. En esta etapa, el equilibrio entre los linfocitos Treg y los linfocitos T efectoras determina la naturaleza de la respuesta inmune y su resultado.

Dentro de los linfocitos T efectoras, existe una subpoblación clave en la respuesta antitumoral: los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos o Tc1³². Este subgrupo es capaz de reconocer y unirse mediante la interacción de su receptor de células T (TCR) con el antígeno afín presentado en MHC-I, lo que conduce a su activación y a la eliminación de las células tumorales mediante distintos mecanismos como la exocitosis sináptica de gránulos citotóxicos o mediante la secreción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) o el interferón gamma (IFN- γ)³³. La muerte de las células tumorales libera nuevos antígenos, lo que retroalimenta positivamente la respuesta antitumoral en ciclos sucesivos³⁰.

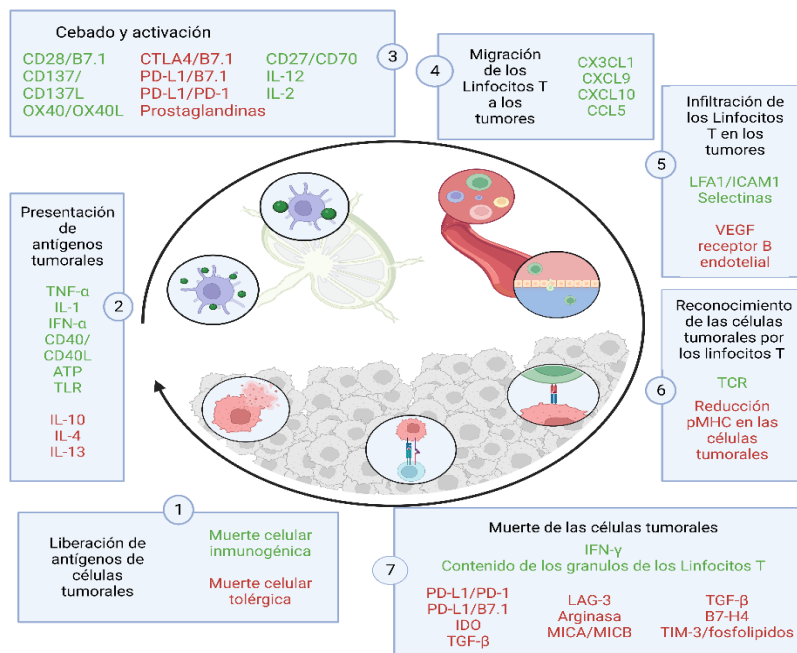


Figura 4. Ciclo de la respuesta inmune antitumoral. En esta figura se observan los diferentes pasos secuenciales que forman el ciclo de la inmunidad tumoral junto a los factores que estimulan (en verde) o inhiben (en rojo) la muerte de las células tumorales²⁹

3.5. Inmunoterapia en cáncer

El término “inmunoterapia oncológica” se refiere a cualquier tipo de tratamiento diseñado para estimular y aprovechar el SI del propio paciente o de un donante (en caso de terapias alogénicas) con el objetivo de atacar el cáncer o bloquear las vías de escape de éste³⁴. A diferencia de los tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radioterapia, que se dirigen directamente a las células cancerígenas, la inmunoterapia activa y modula la respuesta inmune del organismo, aprovechando su capacidad natural para detectar y eliminar las células malignas, ofreciendo beneficios en términos de especificidad y durabilidad.

Los primeros intentos de modular el SI para tratar el cáncer datan del siglo XIX. Los médicos alemanes Fehleisen y Busch, documentaron regresiones tumorales significativas tras infecciones espontáneas postquirúrgicas³⁵. Más tarde, William Bradley Coley, conocido como el padre de la inmunoterapia, intentó replicar este efecto deliberadamente al inyectar una mezcla de toxinas bacterianas (la llamada toxina de Coley), con el propósito de inducir respuesta inmunitaria para combatir sarcomas en 1891^{36,37}. Sin embargo, sus logros pasaron desapercibidos durante décadas.

No fue hasta mediados del siglo XX, con el descubrimiento de los linfocitos T y su papel en la inmunidad, que la investigación en inmunoterapia fue en auge. Estos avances marcaron una expansión significativa en el desarrollo de la inmunoterapia abriendo una nueva era en los tratamientos oncológicos. En este contexto, en 1976, la vacuna BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) se convirtió en la primera inmunoterapia aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, de sus siglas en inglés) para el tratamiento del cáncer de vejiga. Posteriormente, otras estrategias inmunoterapéuticas, como las citoquinas inmunoestimuladoras IFN- α e IL-12 fueron desarrolladas y aprobadas en oncología.

Hoy en día, las inmunoterapias han demostrado ser herramientas fundamentales en la lucha contra el cáncer, logrando respuestas duraderas y efectivas, incluso en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad³⁸.

3.5.1. Tipos de inmunoterapia

En la actualidad existen una amplia variedad de inmunoterapias disponibles (Figura 5), como el uso de inhibidores de puntos de control inmunitarios, que desbloquean la respuesta inmune; terapias basadas en células T, como la terapia CAR-T; anticuerpos monoclonales que atacan específicamente antígenos tumorales; y vacunas terapéuticas, entre las que se encuentra BCG, que inducen una respuesta inmune dirigida al cáncer.

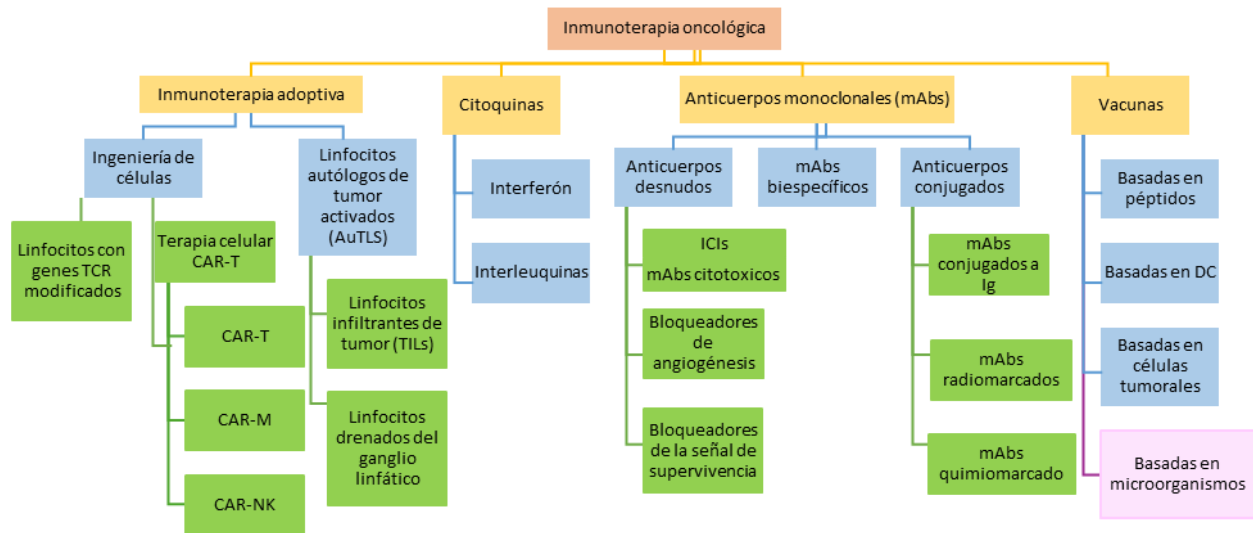


Figura 5: Enfoques actuales en el campo de la inmunoterapia frente al cáncer. TCR: Receptor de linfocitos T, CAR: receptor de antígenos quimérico, M: macrófagos, T: linfocitos T, Ig: inmunoglobulina, ICIs: inhibidores de punto de control inmunitario^{29,39}.

3.6. El papel de los macrófagos en el cáncer

Los macrófagos constituyen una población heterogénea de células inmunes de origen mieloide, que juegan un papel esencial en la homeostasis, la respuesta inmunitaria y la reparación de tejidos. Estas células son conocidas por su alta plasticidad y su capacidad de adaptarse a diferentes microambientes. Son las primeras células del SI en aparecer durante la maduración del organismo y son esenciales durante las primeras etapas del desarrollo⁴⁰. Aunque tradicionalmente se pensaba que estas células solo derivaban de los monocitos circulantes que migraban a los tejidos y se diferenciaban a macrófagos efectores⁴¹, estudios recientes han demostrado que la migración monocitaria solo ocurre en determinadas circunstancias de homeostasis, infección e inflamación⁴². Esto genera que una alta proporción de los macrófagos residentes de tejido provengan de precursores embrionarios (derivados del saco vitelino fetal o de progenitores del hígado fetal) que se asentaron en el periodo prenatal y perinatal⁴³. Sin embargo, en tumores, numerosos estudios recientes han sugerido que los macrófagos asociados a tumores (TAMs) provienen principalmente de monocitos circulantes, que tienen un perfil genético asociado a la inmunosupresión y la presentación de antígenos. En contraste, los TAMs de origen embrionario presentan un perfil de genes enriquecido en remodelación tisular y cicatrización de heridas⁴³.

Una de las características distintivas de los macrófagos es su alta plasticidad, lo que les permite adaptarse a distintos estímulos adoptando diversos fenotipos con funciones específicas, tanto en condiciones

fisiológicas como patológicas⁴⁴. Esta plasticidad está determinada principalmente por su origen, el tejido de residencia y el microambiente que los rodea⁴³, y a su vez está influenciada por cambios epigenéticos⁴³. Por ello, los macrófagos derivados de monocitos presentan un perfil fenotípico diferente al de los monocitos circulantes, adquiriendo características similares a los macrófagos tisulares, aunque con ciertas diferencias transcripcionales, epigenéticas y funcionales que se mantienen a lo largo del tiempo⁴⁵. Estas variaciones repercuten en procesos como la fagocitosis, la presentación de antígenos o la liberación de citoquinas y componentes del complemento⁴⁴, por lo que un desequilibrio entre los distintos fenotipos puede contribuir al desarrollo de diferentes patologías inflamatorias crónicas como la esclerosis múltiple, la diabetes o incluso al crecimiento y progresión tumoral^{46,47}.

3.6.1. Polarización de los macrófagos (M1 vs. M2)

Los macrófagos se clasifican en dos fenotipos funcionales extremos⁴⁴: los macrófagos de tipo M1, de carácter proinflamatorio, y los macrófagos de tipo M2, con funciones predominantemente antiinflamatorias e inmunorreguladoras (Anexo A). En los últimos años, se ha reconocido que esta clasificación simplifica en exceso la heterogeneidad de la población de los macrófagos. Evidencias recientes sugieren que los macrófagos pueden adoptar un espectro continuo de estados funcionales entre los fenotipos M1 y M2 en respuesta a señales específicas del microambiente.

Los macrófagos M1, asociados con la activación clásica, son inducidos por la estimulación con IFN- γ y ligandos que activan los receptores tipo Toll (TLR)⁴⁸. Esta activación desencadena la producción de RNS y ROS, esenciales en la respuesta inmunológica frente a patógenos. Además, promueve la síntesis de óxido nítrico (NO), mediador clave en la modulación del microambiente inflamatorio. Los macrófagos M1 secretan una variedad de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , y IL-6, que promueven el reclutamiento y la activación de otras células del SI como células NK o linfocitos T efectores⁴⁹. Este perfil funcional se correlaciona con la expresión de altos niveles de TNF- α , óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), CD14, moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, y el MHC-II^{43,50}.

En cambio, los macrófagos M2, vinculados a la activación alternativa, se inducen por la estimulación con IL-4, IL-10 e IL-13, inmunocomplejos y glucocorticoides⁴⁸. Su función principal radica en la resolución de la inflamación y la remodelación tisular, facilitando la eliminación de los desechos celulares generados⁵¹. Su perfil inmunosupresor se caracteriza por la secreción de mediadores antiinflamatorios como IL-10 y TGF- β , además de la expresión de altos niveles de arginasa-1 (ARG1), y el receptor de IL-1 tipo II y marcadores de superficie como CD163, CD204 o CD206⁵². Cambios en estos marcadores pueden indicar una repolarización de los macrófagos, lo que lleva a un cambio en su fenotipo.

3.6.1.1. Fenotipos M1 y M2 en el contexto tumoral

En el TME, los macrófagos desempeñan un papel dual y contexto-dependiente. Los M1 pueden contribuir a la eliminación de células tumorales mediante la producción de ROS y RNS, junto con la secreción de citoquinas proinflamatorias que promueven respuestas inmunitarias antitumorales⁵⁰. No obstante, su actividad infamatoria también puede inducir estrés oxidativo y daño tisular, lo que en algunos casos favorece

la inestabilidad genómica y la angiogénesis. Por ejemplo, la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promovida por la inflamación crónica, facilita la proliferación celular y la diseminación metastásica⁵⁰. Además, ciertos tipos de cáncer pueden reprogramar los macrófagos M1 para adquirir características del fenotipo M2, promoviendo así la inmunosupresión y el escape tumoral.

Por otro lado, los macrófagos M2 tienen un papel central en el TME, donde su función es predominantemente inmunosupresora, facilitando la evasión del SI por parte de las células tumorales. Mediante su perfil inmunorregulador, estos macrófagos contribuyen a la inducción de la tolerancia inmune, inhibiendo la activación de células inmunes antitumorales⁵⁰ y permitiendo el reclutamiento de otras células inmunosupresoras como los Treg, mediante la secreción de distintas quimioquinas como CCL5, CCL20 y CCL22^{50,53}. Además, el fenotipo M2 favorece la progresión tumoral al estimular la angiogénesis⁵⁴ mediante la secreción de VEGF⁵⁰ y otros factores de crecimiento. Su capacidad para remodelar la matriz extracelular es también un factor determinante, ya que facilita la invasión y migración de las células tumorales, contribuyendo al desarrollo de metástasis.

3.6.1.2. Uso de macrófagos como inmunoterapia

La inmunoterapia basada en macrófagos se puede dividir en dos grandes estrategias, pasivas y activas. Las estrategias pasivas buscan reprogramar los TAMs in situ, sin infusión de células exógenas (Figura 6.A). Estas incluyen estrategias de polarización (agonistas de TLR, inhibidores de CSF1R o PI3K γ) para inducir un fenotipo M1 o estrategias basadas en la función, como el bloqueo de señales inmunosupresoras (p. ej. eje CD47-SIRP α). Estas terapias promueven la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 antitumoral⁵⁵. Otras aproximaciones en desarrollo incluyen agonistas de CD40, STING y TLR9, así como inhibidores de puntos de control inmunológico (anti-PD-L1, anti-LILRB2), habitualmente en combinación con inmuno/quimioterapia⁵⁶. Todas ellas buscan promover la secreción de citoquinas proinflamatorias, aumentar la fagocitosis tumoral y facilitar la activación de los Linfocitos T, convirtiendo tumores “fríos” en inmunológicamente “calientes”^{55,56}.

Las estrategias activas consisten en la infusión de macrófagos modificados *ex vivo* como los CAR-M que combinan una alta capacidad de infiltración tumoral (limitación actual de los CAR-T en tumores sólidos) con múltiples mecanismos de acción citotóxicos propios de un macrófago de fenotipo M1 (Figura 6.B)⁵⁵. Además, actúan en sinergia con otras inmunoterapias, promoviendo una respuesta adaptativa más robusta. Se están explorando también variantes como macrófagos derivados de células madre pluripotentes inducibles (iPSC, de sus siglas en inglés) o cargados con nanopartículas, con el objetivo de potenciar su funcionalidad y persistencia en el TME⁵⁷.

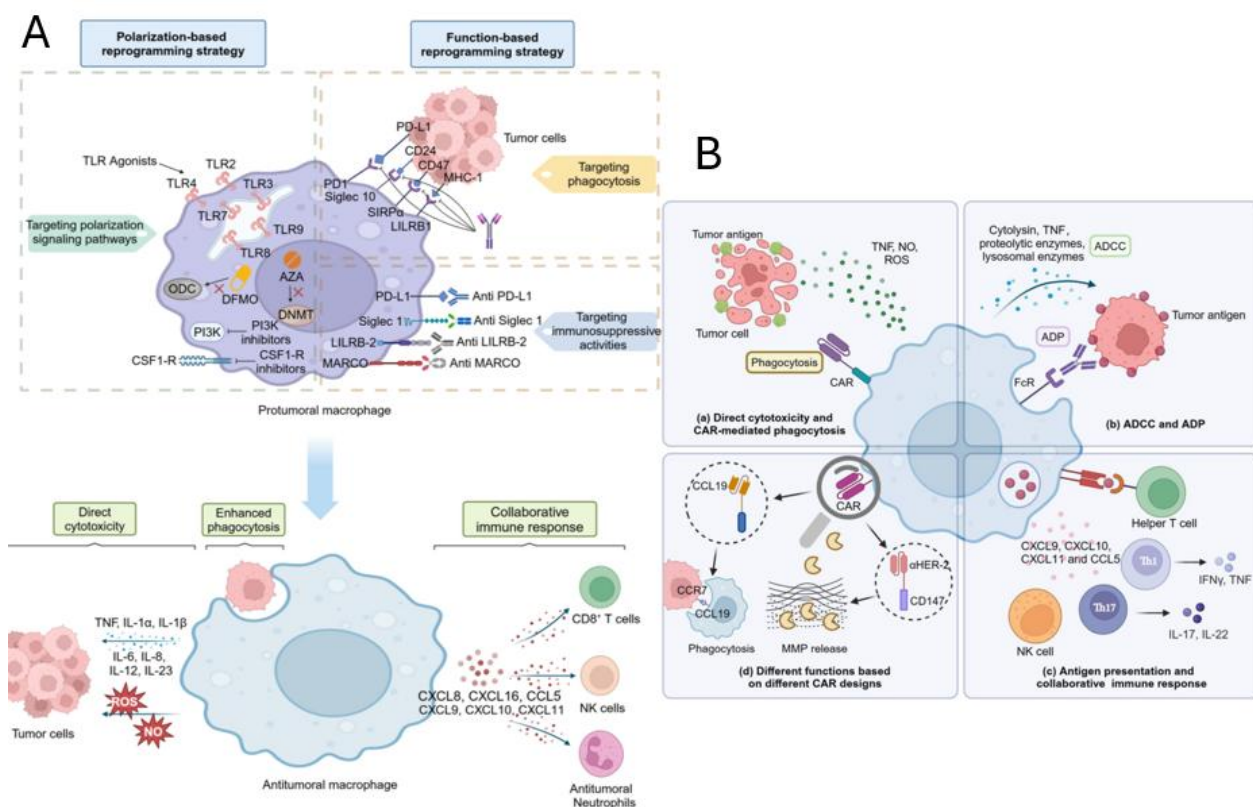


Figura 6. Estrategias inmunoterapéuticas mediante el uso de macrófagos. (A) Estrategias pasivas basadas en la reprogramación funcional y polarización. **(B)** Estrategias activas basadas en CAR-M⁵⁵

3.6.2. Activación de los macrófagos a través de PRRs y TLRs

La activación de los macrófagos se produce en respuesta al reconocimiento de señales externas (PAMPs, motivos moleculares microbianos no específicos conservados entre patógenos, como el LPS (lipopolisacárido) presente en las bacterias Gram negativas, o material genético, como el DNA o el RNA virales) o internas (DAMPs, factores endógenos que se sobreexpresan en condiciones no fisiológicas y son liberados al medio extracelular por tejidos dañados o células sometidas a estrés)⁵⁸. Estas señales son reconocidas por una familia de receptores conocidos como PRRs presentes en la superficie o el interior celular, que activan rutas de señalización responsables de desencadenar respuestas efectivas como la fagocitosis, la liberación de citoquinas y la resolución de la inflamación^{59,60}. Entre los PRRs, los TLR son los más estudiados. En humanos se han identificado 10 tipos distintos (Anexo B), cada uno especializado en el reconocimiento de patrones moleculares concretos^{61,62}. Su activación induce rutas de señalización intracelulares a través de adaptadores como MyD88 o TRIF, que regulan la expresión de genes proinflamatorios (Figura 7)⁶¹. Esta señalización contribuye a la activación funcional del macrófago y a su polarización hacia un fenotipo M1, asociado a una respuesta inmunitaria proinflamatoria y con potencial antitumoral⁶¹.

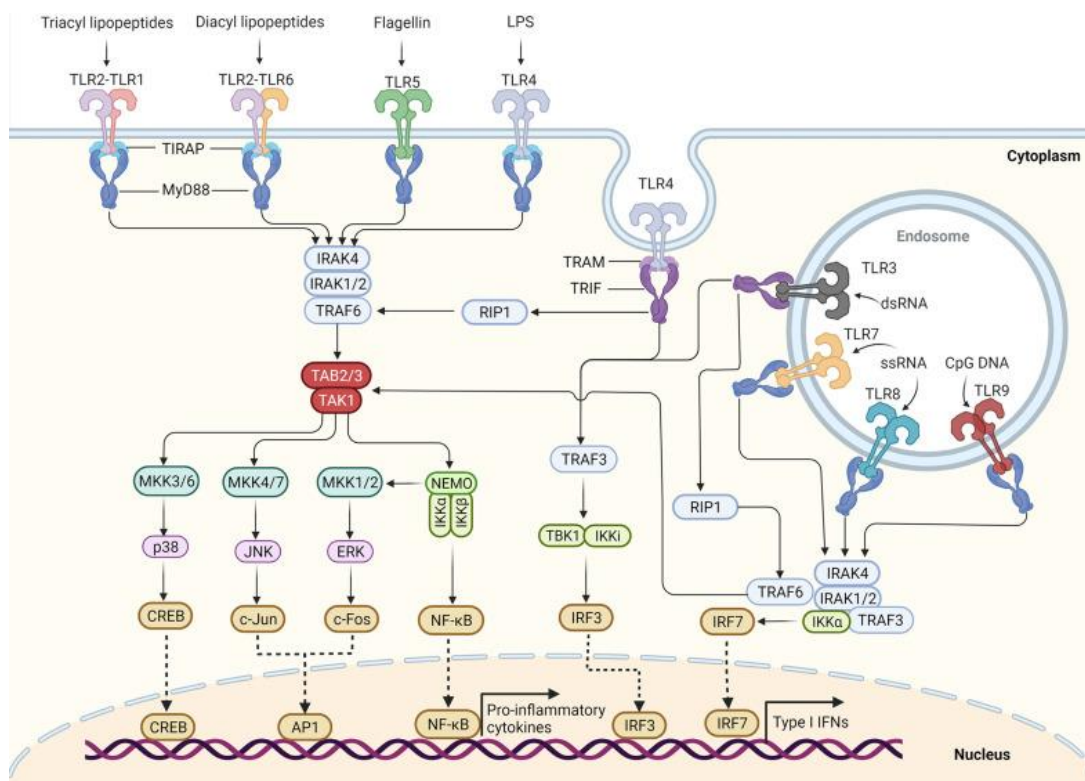


Figura 7: Vía de señalización de TLRs en células inmunitarias innatas⁶³.

3.6.3. Memoria entrenada

La memoria entrenada es una forma de memoria inmunológica propia de la inmunidad innata, descrita por Netea *et al.* en 2011⁶⁴. Está basada en la reprogramación funcional a largo plazo que permite a los macrófagos y otras células mieloides responder de manera más eficiente a un segundo estímulo, incluso después de haber regresado a un estado basal. A diferencia de la memoria adaptativa clásica, esta respuesta no depende de linfocitos T o B ni del reconocimiento específico de antígenos, sino que está mediada por cambios epigenéticos y metabólicos duraderos inducidos por ciertos estímulos como el β -glucano, un componente de la pared celular de *Candida albicans*, o la vacuna BCG⁶⁴.

Desde un punto de vista funcional, la memoria entrenada puede persistir durante semanas o meses, no solo en los macrófagos circulantes, sino también en progenitores hematopoyéticos en la médula ósea^{65,66}. Esta capacidad de respuesta amplificada puede manifestarse de manera bidireccional, ya que, dependiendo del estímulo inicial, puede potenciar la respuesta inflamatoria y mejorar la defensa frente a infecciones o, por el contrario, inducir un estado de tolerancia inmunológica que limite la inflamación excesiva y con ello la progresión de distintas enfermedades como el cáncer o infecciones recurrentes⁶⁶. Sin embargo, su impacto exacto en la homeostasis inmune y sus aplicaciones clínicas requieren una mayor investigación para comprender sus implicaciones en la fisiopatología de distintas enfermedades^{65,66}.

Un estudio reciente realizado por Arts *et al.*⁶⁷ demostró que la vacunación con el BCG induce inmunidad entrenada en monocitos y macrófagos a través de cambios epigenéticos y metabólicos. A nivel de la cromatina, se observó un aumento en las marcas de metilación de histonas, específicamente H3K4me3 y H3K9me3 (Figura 8.A) en genes relacionados con la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF-

α e IL-6 (Figura 8.B). Además, la inhibición de la vía Akt-mTOR mediante inhibidores metabólicos específicos impidió estos efectos, lo que confirma su papel en la inducción de este fenotipo funcional M1⁶⁷.

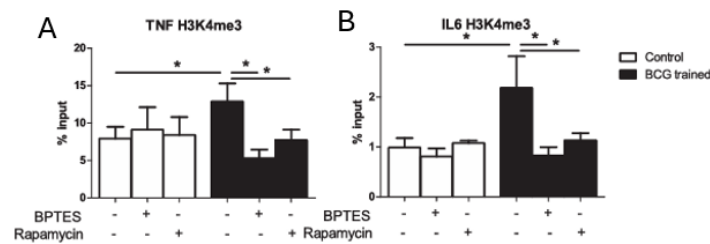


Figura 8: Modificación de H3K4me3 en promotores de genes proinflamatorios. (A) TNF- α y (B) IL-6 en células entrenadas con BCG, con y sin inhibición de la vía Akt-mTOR mediante inhibidores metabólicos⁶⁷.

3.7. El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) como modulador inmunológico.

3.7.1. Las micobacterias y su interacción con el SI

Las micobacterias son bacilos intracelulares Gram positivos que emplean mecanismos altamente eficientes para sobrevivir dentro de los macrófagos del huésped. Su envoltura celular, de estructura compleja, está compuesta por lípidos y polisacáridos organizados en tres segmentos claramente diferenciados (Figura 9): la membrana plasmática, la pared celular y la capa más externa (micomembrana).

3.7.1.1. Estructura de la pared celular micobacteriana

La membrana plasmática es similar a la de otras bacterias y proporciona integridad estructural y soporte. Esta se encuentra rodeada por una capa de peptidoglucano (PG) altamente reticulada, que proporciona rigidez y actúa como barrera física frente a los posibles daños causados por el microambiente. Unido covalentemente al PG se encuentra el Arabinogalactano (AG), un polisacárido lineal que enlaza esta estructura con los ácidos micólicos formando un macropolímero complejo situado entre la membrana plasmática y la envoltura lipídica externa.

Una característica distintiva de esta envoltura es su alto contenido lipídico, que representa aproximadamente el 40% de su masa celular confiriéndole una hidrofobicidad extrema⁶⁸. Entre estos lípidos se encuentran los ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga y alto peso molecular, que están esterificados a los extremos del AG, formando una barrera densa y poco permeable. Esta estructura confiere una eficaz protección contra antibióticos hidrofílicos, el daño oxidativo y la deposición de complemento⁶⁹.

Además de su función como barrera protectora, la micomembrana desempeña un papel activo en la modulación de la respuesta inmunitaria. Esta estructura facilita el reconocimiento de patógenos por parte del SI innato activando distintos TLRs, especialmente TLR2 y en menor medida a TLR4 y TLR7 en el caso de reconocer bacterias fagocitadas⁷⁰. Entre los componentes inmunológicamente relevantes se encuentran el lipomano (LM) y el lipoarabinomano (LAM), dos lipoglicanos inmunomoduladores capaces de inducir respuestas inflamatorias mediadas por citoquinas⁶¹. Por ejemplo, el LM induce producción de IL-12 y en última instancia la muerte celular de los macrófagos⁷¹. Estas propiedades inmunomoduladoras han

sustentado históricamente el interés por las micobacterias, no solo como agentes infecciosos, sino también como herramientas terapéuticas, incluyendo su potencial antitumoral.

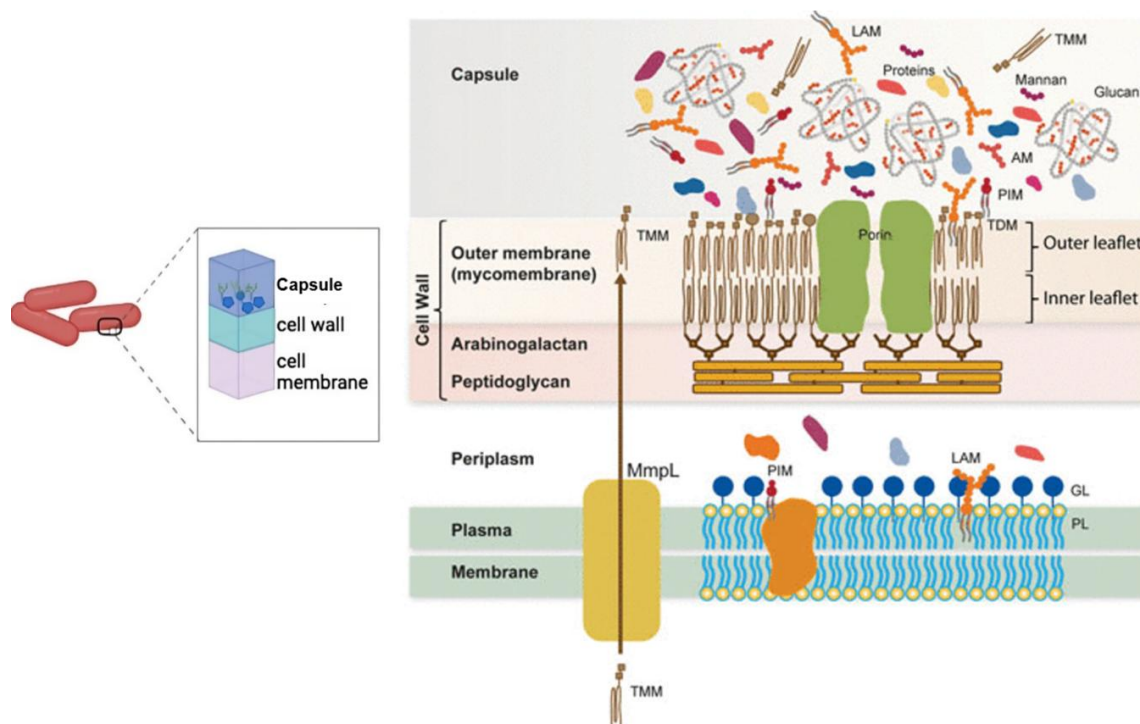


Figura 9: Estructura y componentes principales de la envuelta celular de las micobacterias ^{68,72}.

3.7.2. Desarrollo histórico de BCG y variabilidad genética en sus subcepas.

La vacuna BCG es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, el agente etiológico de la tuberculosis en bóvidos⁷³, que fue desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin entre los años 1908 y 1921 en el Instituto Pasteur de Lille. Su desarrollo implicó 230 pases consecutivos de una cepa virulenta (aislada por Edmon Nocard de la leche de una vaca enferma con mastitis tuberculosa⁷⁴) en un medio que contenía bilis, glicerina y patata⁷⁵. Este proceso condujo a su atenuación, la cual fue probada primero en terneros y posteriormente en cobayas y otros modelos animales⁷⁵. En 1921, la vacuna fue administrada por primera vez a un lactante cuya madre había fallecido por tuberculosis, sin efectos adversos ni desarrollo de la enfermedad⁷⁵. A partir de entonces, se comenzó a administrar a nivel mundial por vía oral, bajo la premisa de que el tracto gastrointestinal era la vía natural de infección en niños alimentados con leche no pasteurizada^{76,77}. Sin embargo, la falta de métodos estandarizados de conservación provocó la aparición de múltiples subcepas, como se puede ver en la Figura 10, con diferencias bioquímicas e inmunogénicas⁷⁵ que se deben principalmente a modificaciones genéticas acumuladas durante los múltiples pases de cultivo realizados antes de la implementación de la liofilización en 1960⁷⁸. Estas modificaciones incluyen deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. Hoy en día, las subcepas más utilizadas de la vacuna BCG son Connaught, Danish, Glaxo, Moreau, Pasteur and Japan, cada una con diferentes características de inmunogenicidad y reactogenicidad^{75,79}.

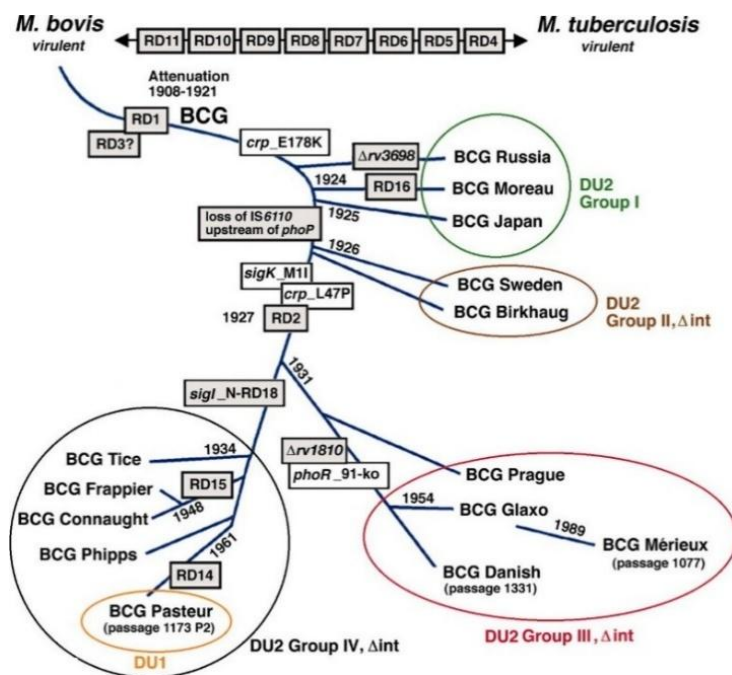


Figura 10: Árbol filogenético y evolución de las cepas de BCG derivadas de *Mycobacterium bovis*. Se muestra el proceso de atenuación entre 1908 y 1921 y las deleciones (RD, *regions of difference*) y mutaciones clave que diferenciaron las cepas a lo largo del tiempo⁸⁰.

3.7.3. Atenuación de BCG

La atenuación de BCG implicó la pérdida de diversas regiones genómicas clave, entre ellas la Región Diferencial 1 (RD1)⁷⁵, que codifica el sistema de secreción ESX-1. Se ha demostrado que la reintroducción de RD1 en el genoma de BCG es suficiente para restaurar su capacidad de crecimiento en pulmón y en bazo en ratones⁸¹. Por lo contrario, la eliminación de RD1 en la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv inactiva su capacidad de replicarse rápidamente en estos órganos⁸².

El locus RD1 codifica un sistema de secreción de tipo VII, conocido como sistema de secreción de ESAT-6 (ESX)-1⁸². Esta región contiene nueve genes (Figura 11), dos de los cuales codifican para dos pequeñas proteínas: la proteína del filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP-10 o EsxB) y la proteína antigénica de secreción temprana de 6 kDa (ESAT-6 o EsxA)^{74,83}. Estas proteínas son antígenos inmunodominantes esenciales para la virulencia de *Mtb* ya que la permite escapar del fagosoma, facilitando su supervivencia intracelular y su diseminación en el huésped⁸⁴.

Además de EsxA y EsxB, otros genes dentro de RD1 codifican proteínas clave para la maquinaria de secreción. Entre ellas se encuentran la ATPasa EccA, encargada de proporcionar energía para el transporte del complejo, las proteínas transmembrana EccB y EccC, y la proteína de canal EccD, situada en la membrana interna⁸⁵. Esta última proteína permite que el complejo ESAT-6/CFP-10 se transloque hacia el espacio periplásmico y, posteriormente, al lumen del fagosoma. Una vez en este compartimento, ESAT-6 induce la lisis de la membrana del fagosoma, favoreciendo la diseminación bacteriana, mientras que CFP-10 actúa como chaperona, estabilizando la estructura del complejo⁸⁶.

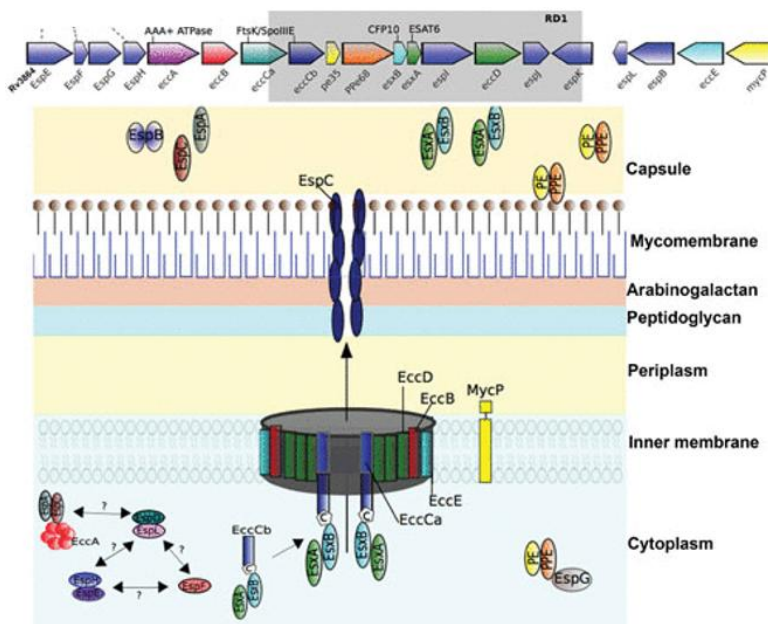


Figura 11: Estructura genética y mecanismo de secreción del sistema ESX-1 en *Mtb*. (A) Organización genómica del operón *espACD* y genes asociados al sistema ESX-1 destacando la región RD1 en color gris. (B) Ensamblaje y función del sistema de secreción ESX-1 en la pared celular micobacteriana⁸⁵.

3.7.4. Aplicaciones de BCG: vacuna contra la tuberculosis y agente terapéutico contra el cáncer

Hoy en día, BCG forma parte del Programa Ampliado de Inmunización de la OMS debido a su alta eficacia contra formas graves de tuberculosis en niños, como la tuberculosis miliar (forma diseminada de la enfermedad) y la meningitis tuberculosa⁸⁷. Sin embargo, su efectividad contra la tuberculosis pulmonar en adultos es variable, oscilando entre el 0% y el 80%, dependiendo de factores genéticos, ambientales y la subcepa empleada en la vacunación⁸⁸. A pesar de estas limitaciones, BCG sigue siendo administrada a nivel mundial, con una cobertura cercana al 90% en países donde la tuberculosis es una enfermedad endémica como se puede ver en la Figura 12.

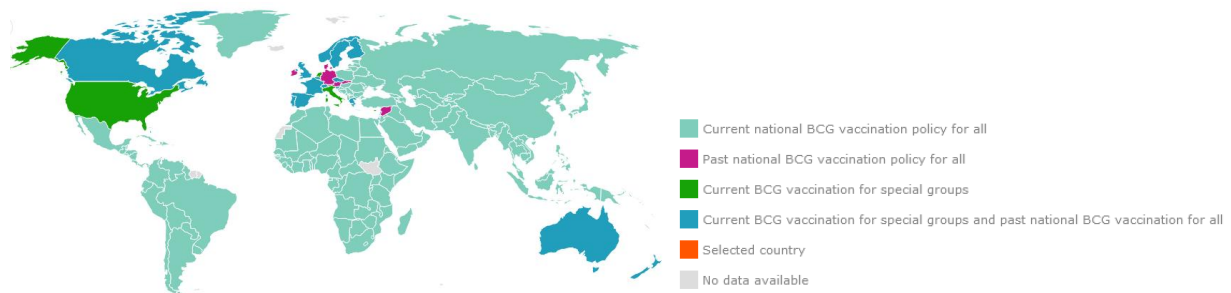


Figura 12: Distribución mundial de las políticas de vacunación de BCG⁸⁹.

Además de su papel como vacuna frente la tuberculosis, el interés de BCG como agente terapéutico contra el cáncer se originó en 1929 por Raymond Pearl, quien observó una correlación inversa entre la tuberculosis y el cáncer. A través de numerosas autopsias, se observó que solo el 6,6 % de los pacientes con tumores presentaban lesiones activas de tuberculosis, frente al 16,6 % de los individuos sin tumores en grupos de edad, sexo y raza similares, lo que sugirió una posible relación entre ambas enfermedades^{90,91}. Estudios posteriores demostraron que BCG estimula el SI al activar a los TLRs (TLR2, TLR4 y TLR7) lo que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-12 e IL-6⁹². Estas respuestas potencian la

capacidad de los macrófagos, NKs y linfocitos T para atacar a las células tumorales⁹². Las subcepas de BCG utilizadas en inmunoterapia incluyen Tice, Danish, Connaught y Pasteur⁷⁹.

3.7.4.1. BCG como tratamiento de primera línea para el cáncer superficial de vejiga

El cáncer de vejiga es la neoplasia maligna más común del tracto urinario y una de las más prevalentes a nivel mundial, con mayor incidencia en hombres y en personas de edad avanzada. En su forma superficial (NMIB, por sus siglas en inglés: *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*), representa el 70% de los casos y se limita al urotelio y la lámina propia sin invadir el músculo detrusor^{93,94}.

Actualmente, el tratamiento estándar para el NMIBC es la inmunoterapia intravesical con BCG (instilación intravesical), que genera una respuesta inmunitaria local masiva (Figura 13) caracterizada por la expresión de citoquinas proinflamatoria en la orina y tracto vesical⁹⁴, así como la infiltración de células inmunes como los macrófagos, linfocitos T y células NK, lo que contribuye a la eliminación de células tumorales residuales y la prevención de recidivas^{95,96}.

Durante la instilación intravesical, BCG se adhiere al urotelio a través de la fibronectina, una glicoproteína de la matriz extracelular expresada en la superficie de las células tumorales y uroteliales sanas, mediante el receptor $\alpha 5 \beta 1$. Esta interacción es mediada por la proteína de unión a fibronectina (FAP, de sus siglas en inglés) presente en la pared bacteriana de BCG^{97,98}. No obstante, la superficie de las células uroteliales sanas está protegida por una capa de glicosaminoglicano cargados negativamente, lo que limita la adhesión de BCG, reduciendo la citotoxicidad en tejidos no tumorales y la reacción adversa a la terapia con BCG⁹⁴.

Una vez adherido, BCG es internalizado por células uroteliales y APCs, como macrófagos o DCs, iniciando así la respuesta inmunitaria. Actuando como PAMP, activa TLRs, especialmente TLR4 o TLR9, lo que desencadena la vía de señalización mediada por MyD88-NF- κ B promoviendo la transcripción y liberación de múltiples citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ^{94,99}.

Este proceso estimula la activación del sistema reticuloendotelial, promoviendo el reclutamiento de granulocitos, macrófagos y células T auxiliares (CD4⁺), los cuales liberan citoquinas para amplificar la respuesta inmune y atraer otras células inmunitarias a la vejiga.

Simultáneamente, la fagocitosis de BCG por APCs permite el procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos T a través del MHC-II (para linfocitos T CD4⁺) y MHC-I (para linfocitos T CD8⁺) induciendo una respuesta adaptativa⁹⁴. Se ha demostrado que BCG induce una alta expresión de MHC-II en las células tumorales de vejiga al inhibir la ubiquitina ligasa MARCH1, permitiéndoles funcionar como APCs¹⁰⁰.

La activación de los linfocitos T CD4⁺ desencadena la producción y liberación de distintas citoquinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), IFN- γ , TNF- α e interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-18), que estimulan a los linfocitos T CD8⁺ y a las NK, encargadas de eliminar las células tumorales mediante la liberación de perforinas y gránulos citotóxicos¹⁰¹. Este perfil de citoquinas (también llamado Th1) se asocia con una mayor eficacia inmunoterapéutica, mientras que un perfil Th2 (o inmunosupresor), con niveles elevados de IL-4 e IL-10, se correlaciona con menor respuesta al tratamiento^{102,103}.

Finalmente, la activación inmunitaria desencadenada por BCG no solo recluta células T y NK, sino también granulocitos neutrófilos, que constituyen hasta el 75 % de las células infiltradas en la vejiga tras la instilación. Citoquinas como IL-6, IL-8 y IL-17 desempeñan un papel clave en el reclutamiento y activación, favoreciendo la cascada inflamatoria y contribuyendo a la destrucción de las células tumorales, mediante la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y la expresión del ligando apoptótico relacionado con TNF (TRAIL), capaz de inducir apoptosis en las células tumorales^{103,104}.

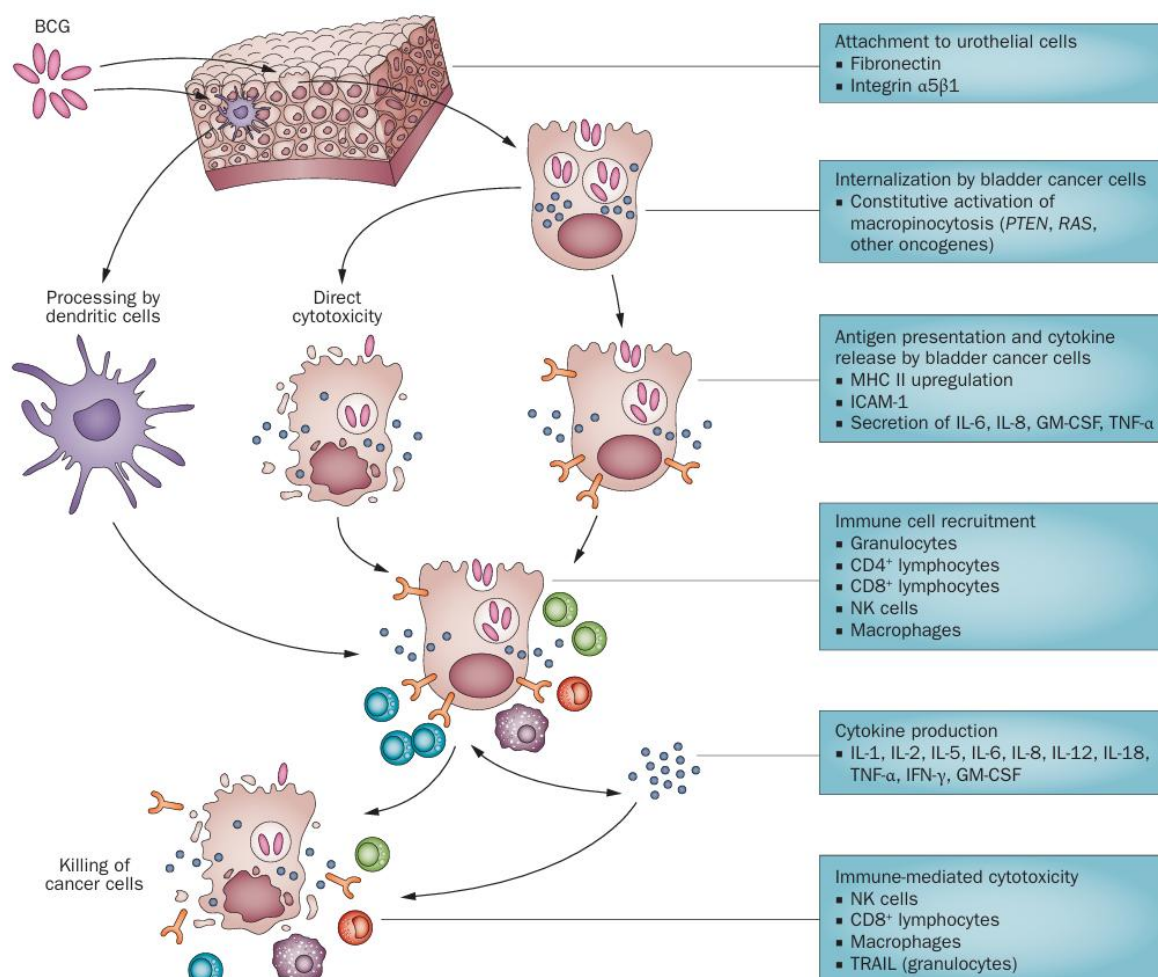


Figura 13: Mecanismo de acción inmunológico de BCG en el cáncer de vejiga¹⁰⁵.

También se ha demostrado *in vitro* que BCG puede producir un efecto citotóxico directo sobre algunas líneas celulares de cáncer de vejiga, mediante mecanismos como la apoptosis, necrosis o la inducción de estrés oxidativo, lo que refuerza su eficacia terapéutica^{103,106}.

En el estudio liderado por Martínez-López *et al.*¹⁰⁷ se desarrolló un modelo de cáncer de vejiga mediante xenoinjertos en embriones de pez cebra, permitiendo la visualización en tiempo real y a nivel de célula única de la interacción entre las células tumorales, BCG, y el SI innato. Los resultados mostraron una infiltración significativa de macrófagos en el TME tras la administración de BCG (Figura 14.A), con una polarización predominante hacia un fenotipo M1 caracterizado por una mayor producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 14.B-C). Asimismo, se comprobó que los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta antitumoral inducida por BCG ya que su eliminación selectiva mediante liposomas con clodronato eliminó

por completo la respuesta antitumoral de BCG (Figura 14.D). Finalmente, se confirmó que los macrófagos pueden inducir apoptosis directa en células tumorales mediante la vía del TNF, dado que la inhibición del TNF mediante pentoxifilina (PTX) bloqueó el efecto proapoptótico de BCG sobre las células tumorales (Figura 14.E).

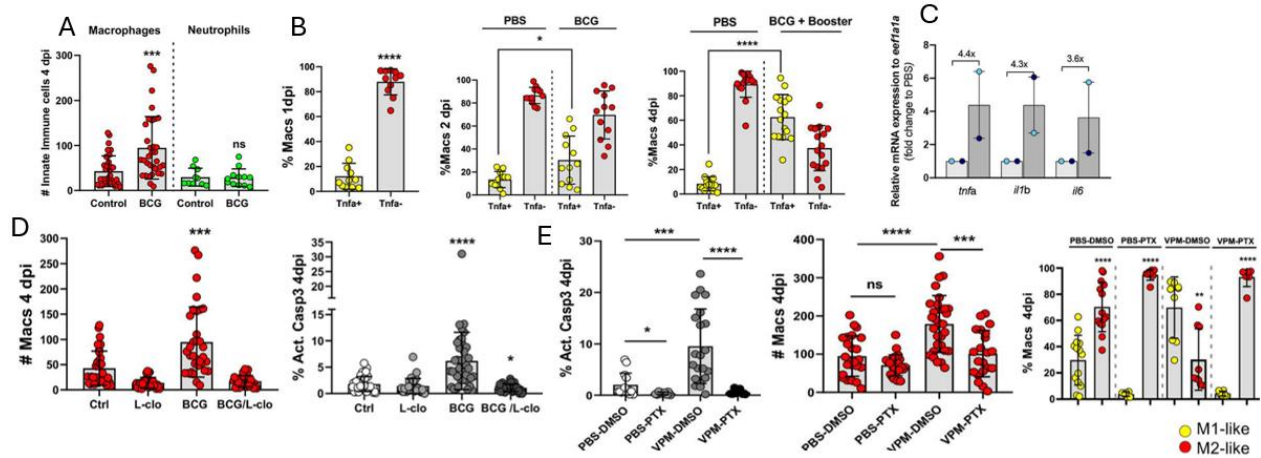


Figura 14: Caracterización de la respuesta inmune inducida por BCG en el TME. (A) Cuantificación del número absoluto de macrófagos y neutrófilos infiltrados tras la administración de BCG. (B) Evaluación de la activación de macrófagos de fenotipo proinflamatorio (M1) mediante la cuantificación de células positivas para TNF- α en distintos puntos temporales. (C) Expresión relativa de ARNm de *tnfa*, *il1b* e *il6*, marcadores clave de activación inflamatoria, en el microambiente tumoral tras la administración de BCG. (D) Cuantificación del número de macrófagos infiltrantes en el TME a los 4 días post-inoculación, junto con la evaluación del porcentaje de macrófagos positivos para caspasa-3 activada, como marcador de apoptosis celular. (E) Actividad de la caspasa cuantificación de los macrófagos en el TME y polarización de los macrófagos en presencia de BCG y PTX¹⁰⁷.

4. Antecedentes y objetivos:

La activación de macrófagos por BCG ha demostrado ser fundamental en el tratamiento de diversas patologías, especialmente en el NMIBC, donde constituye la terapia de primera línea. La administración intravesical de BCG genera una respuesta inmunitaria local robusta, caracterizada por la liberación de citoquinas y la infiltración de células inmunitarias como los macrófagos, linfocitos T y NK, que en conjunto contribuyen a la eliminación de las células tumorales. Los macrófagos desempeñan un papel importante al activarse a través de los TLRs, lo que desencadena una cascada de señalización inflamatoria mediada por NF- κ B lo que induce la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α .

Más allá de su efecto inmediato, se ha descrito que BCG induce una forma de memoria inmunológica entrenada en los macrófagos, mediada por reprogramación epigenética y cambios metabólicos. Esta plasticidad funcional facilita la adopción de un estado de activación sostenida y un perfil M1, lo que sugiere su potencial aplicación como herramienta de reprogramación inmune en inmunoterapias celulares.

En esta línea, un estudio reciente de Moreo *et al.*¹⁰⁸ demostró que la administración intravenosa de BCG en modelos murinos de cáncer de pulmón genera una respuesta inmunitaria robusta, que involucra tanto a la inmunidad innata como adaptativa. Se observó un aumento significativo de macrófagos derivados de monocitos e intersticiales en pulmón, con una mayor expresión de MHC-II, indicando un estado de activación M1 (Figura 15.A) y de otras células efectoras del SI (Figura 15.B).

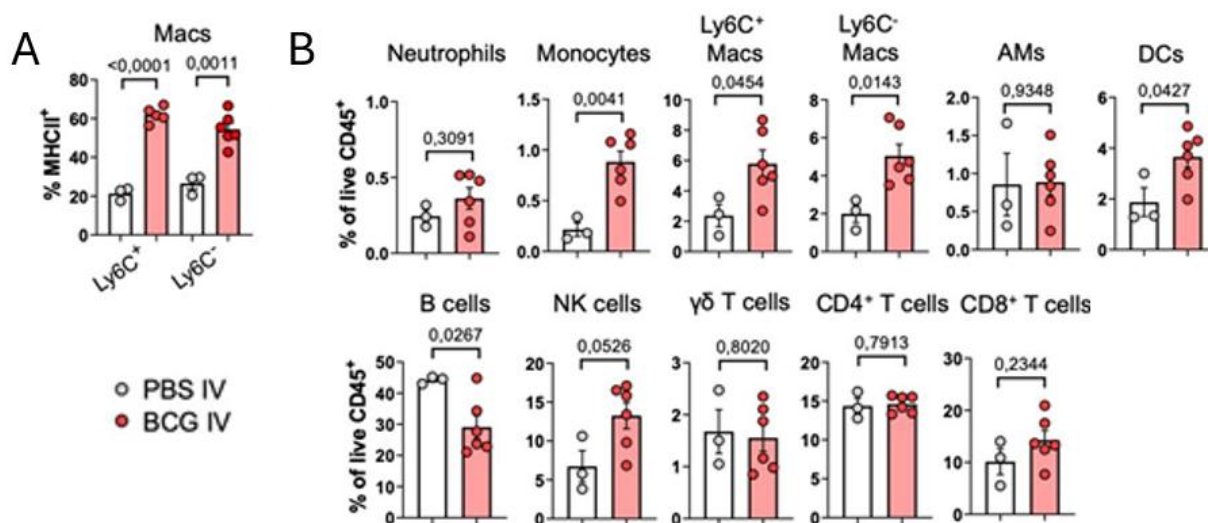


Figura 15: Efecto de la administración de BCG en la respuesta inmunitaria en modelos murinos de cáncer de pulmón. (A) Cuantificación de la expresión de MHC-II en macrófagos pulmonares. **(B)** Cuantificación de las frecuencias de diferentes células inmunes como porcentaje de células vivas CD45⁺¹⁰⁸.

Además, la administración de BCG estimuló la infiltración de células CD8⁺ y NK en el TME, acompañada de un incremento en la producción de citoquinas citotóxicas como, IFN- γ , IL-2 y Granzima B (Figura 16.A), lo que refleja una mayor capacidad citotóxica de las células efectoras (Figura 16.B) y una reducción significativa de la carga tumoral y mayor supervivencia de los ratones tratados (Figura 16.C-D).

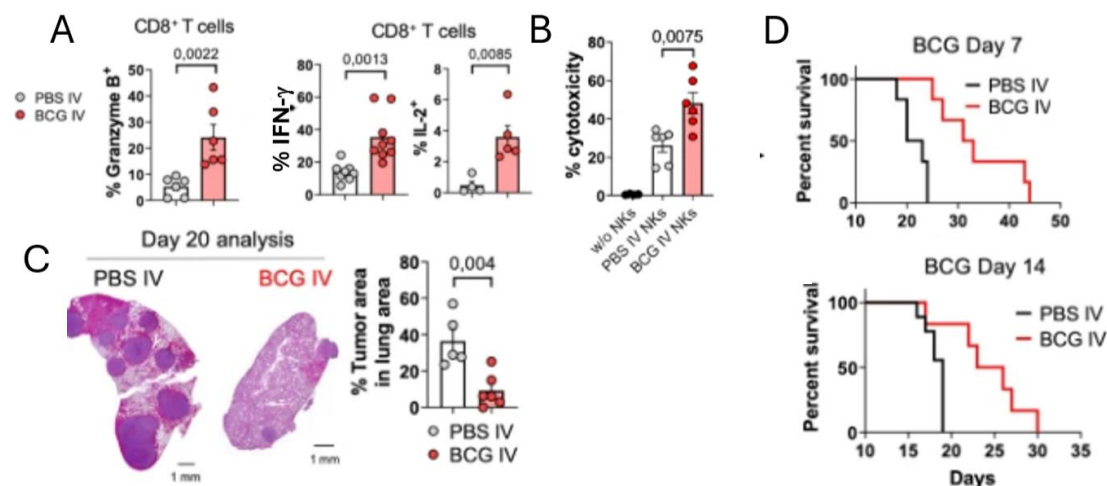


Figura 16: Efectos de la administración de BCG en la infiltración celular, citotoxicidad y carga tumoral en modelos murinos de cáncer de pulmón. (A) Expresión de Granzima B, IFN- γ o IL-2 en linfocitos T CD8 infiltrantes de tejido pulmonar. (B) Citotoxicidad *in vitro* de las células NK pulmonares frente a las células tumorales. (C) Imágenes representativas de pulmones portadores de tumores de ratones tratados (a los 7 días) y cuantificación del área tumoral. (D) Curva de supervivencia de ratones portadores de tumores ortotópicos en pulmón tratados en el día 7 y 14¹⁰⁸.

En este contexto, el objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster es la caracterización inmunológica de los macrófagos humanos activados por BCG, denominados B-MACS. Este estudio busca comprender cómo BCG reprograma los macrófagos a un fenotipo M1 y explorar su potencial para ser administrados en pacientes como parte de una inmunoterapia más eficaz. La hipótesis de trabajo plantea que BCG puede inducir una activación funcional en macrófagos humanos *ex vivo*, dotándolos de propiedades antitumorales y favoreciendo un microambiente tumoral proinflamatorio susceptible de mejorar la eficacia de las terapias inmunológicas convencionales.

Para ello, los objetivos específicos son los siguientes:

1. **Implementación de la generación de B-MACs *in vitro*:** Se optimizarán las condiciones de preparación de macrófagos a partir de la línea celular THP-1 y monocitos primarios humanos para ser infectados con BCG.
2. **Caracterización de la polarización de los B-MACs:** Los macrófagos infectados con BCG se analizarán mediante citometría de flujo para determinar la expresión de distintos marcadores asociados con los fenotipos M1 o M2.
3. **Evaluación de la activación proinflamatoria de los B-MACs:** Se cuantificará la secreción de TNF- α para determinar el tipo de respuesta inmunitaria inducida por BCG en los macrófagos y su intensidad.
4. **Evaluación de la citotoxicidad ejercida por los B-MACS sobre las células tumorales.** Se evaluará la capacidad de los B-MACS para inducir la muerte de células tumorales *in vitro*.

5. Materiales y métodos

5.1. Células eucariotas

En este Trabajo de Fin de Máster se han utilizado tanto líneas celulares (THP-1 y A549; tabla 1), como cultivos primarios de macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (hMDMs, del inglés *human monocyte-derived macrophages*).

Las distintas células humanas se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂ en el medio de cultivo correspondiente:

- Medio RPMI completo: RPMI-1640 con GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS).
- Medio DMEM completo: Dubelco's modified eagle medium (Sigma) con GlutaMAX 10% de FBS.

Para el mantenimiento de las líneas celulares dichos medios se suplementaron con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Pen/Strep; Gibco)

Tabla 1. Descripción del mantenimiento de las líneas celulares usadas en este estudio

Línea celular	THP-1	A549
Descripción	Monocitos humanos (ECACC: 88081201)	Células epiteliales pulmonares humanas (ECACC: 86012804)
Medio de cultivo de mantenimiento	RPMI-1640 + Glutamax + 10% FBS + Pen/Strep	DMEM + Glutamax + 10% FBS + Pen/Strep
Mantenimiento	Diluir la suspensión hasta una concentración de $2 \cdot 10^5$ células/mL	Mantener confluencia < 90%
Pases	Cada 3-4 días	Cada 3-4 días

5.1.1. Líneas celulares

5.1.1.1. THP-1

La línea celular monocítica en suspensión THP-1 fue obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, nº de catálogo 88081201) y almacenada en nitrógeno líquido. Para iniciar un cultivo nuevo, una vez descongelado un criotubo de THP-1 a 37°C, se lavaron las células con RPMI completo y se centrifugaron ($470 \times g$, 5 minutos). A continuación, se descartó el sobrenadante para eliminar el crioprotectante DMSO (dimetilsulfóxido) y se resuspendió el pellet celular en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de FBS. La suspensión celular se transfirió a un flask de cultivo celular y se incubó a 37°C con un 5% de CO₂. Las células se conservaron en crecimiento exponencial manteniendo la concentración celular entre 2×10^5 y 8×10^5 células/mL. Para determinar el momento adecuado para realizar un pase, la concentración del cultivo se cuantificó realizando un recuento celular con azul tripán en una cámara de Bürker (véase apartado 5.1.1.1.1.). Generalmente los pases se realizaron cada 3-4 días.

5.1.1.1.1. Recuento y determinación de la viabilidad celular

El recuento celular se realizó utilizando el método de exclusión de azul tripán en una cámara Bürker bajo microscopía óptica. Para ello, la suspensión celular se homogeneizó y se mezclaron 10 µL de la misma con

10 µL de azul tripán al 0,4%. Este colorante permite distinguir entre células viables y no viables, ya que aquellas con la membrana alterada permiten la penetración del colorante, lo que las tiñe de azul. A continuación, se depositaron 10 µL de la mezcla en la cámara Bürker. El número de células viables en la suspensión se calculó utilizando la siguiente formula:

$$n^{\circ} \text{ de células viables} = \frac{\sum n^{\circ} \text{ de células sin teñir en cada recuadro}}{n^{\circ} \text{ de recuadros contados}} \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{Volumen total}$$

Durante todo el proceso de obtención y mantenimiento celular, se controló el porcentaje de viabilidad celular. Para ello, se calculó el porcentaje de células no viables según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células muertas} = \frac{n^{\circ} \text{ de células muertas (azules)}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} \cdot 100$$

5.1.1.1.2. Diferenciación de las células THP-1 con PMA

Para inducir la diferenciación de las células THP-1 hacia un fenotipo similar a macrófagos, se trataron con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma). Para ello, se cuantificó la concentración celular (véase apartado 5.1.1.1.1.) y se recogió el volumen correspondiente de cultivo para alcanzar la cantidad total de células necesaria para cada uno de los experimentos. Las células se centrifugaron ($470 \times g$, 5 minutos) y el pellet celular se resuspendió en medio RPMI completo suplementado con PMA a una concentración final de 10 ng/mL. Finalmente, la suspensión celular resultante se sembró en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^5$ células por pocillo, y se incubó a 37°C, 5% CO₂ para permitir su adhesión y diferenciación. Para determinar el tiempo óptimo de exposición al PMA, las células se incubaron durante 24, 48 o 72 h en presencia de este estímulo. Al finalizar cada periodo de incubación, se procedió a la evaluación de los parámetros relacionados con la diferenciación celular. En primer lugar, se analizó la morfología y la adherencia mediante microscopía óptica. Posteriormente, se cuantificó la expresión del marcador CD11b mediante citometría de flujo (véase apartado 5.7.), como indicador fenotípico de la diferenciación a macrófago. Tras comparar los resultados obtenidos en los distintos tiempos de incubación, se estableció que 72 horas era el tiempo óptimo de exposición al PMA (Figura 22) y éste se empleó para los experimentos posteriores.

5.1.1.2. A549

La línea celular epitelial pulmonar A549 fue adquirida de la ECACC (nº de catalogo 86012804) y almacenada en nitrógeno líquido. Para iniciar un nuevo cultivo, las células fueron descongeladas a 37°C, se lavaron con medio DMEM completo y se centrifugaron ($475 \times g$, 5 minutos). Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio DMEM completo. La suspensión celular se transfirió a un flask de cultivo celular y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ permitiendo su adherencia. Las células se conservaron en crecimiento exponencial manteniendo una confluencia inferior a 90%. La densidad celular y el estado de confluencia se evaluaron mediante microscopía óptica y recuento celular (véase apartado 5.1.1.1.1.). Una vez alcanzado este valor se realizó un pase, para lo cual se disoció la monocapa empleando tripsina-EDTA 0,25% (Sigma) e incubando 5 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Generalmente los pases se realizaron cada 3-4 días.

5.1.2. Macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (hMDMs)

Para la obtención de hMDMs, se partió de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) de donantes sanos (tabla 2), las cuales se obtuvieron a través del Biobanco del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Tabla 2. Características demográficas de los distintos donantes utilizados

Donante	Sexo	Edad
A	Mujer	> 50
B	Mujer	>50
C	Mujer	46
D	Hombre	45

5.1.2.1. Descongelación de las PBMCs

Se descongeló un vial de PBMCs almacenado en nitrógeno líquido y se realizaron dos lavados consecutivos con 10 mL de medio RPMI completo suplementado con 12,5 U/mL de benzonasa. Tras centrifugar ($400 \times g$, 5 minutos) y eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio RPMI completo y se dejaron reposar durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂ antes de su manipulación. Para analizar la proporción de monocitos presentes originalmente en cada muestra, se recogió una alícuota de 50 µL para el análisis de los marcadores CD14 y CD16 por citometría de flujo (véase apartado 5.7.).

5.1.2.2. Aislamiento de las células CD14⁺

Para el aislamiento de monocitos a partir de las PBMCs, se utilizó un método de separación por selección positiva de células CD14⁺ basado en inmunomagnetismo. Para ello, se emplearon microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD14 (Miltenyi Biotec). En primer lugar, tras el reposo, las PBMCs se cuantificaron (véase apartado 5.1.1.1.1) y se centrifugaron ($400 \times g$, 5 minutos) para eliminar el medio de cultivo. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, las células se resuspendieron en 40 µL de buffer de separación (MACS buffer: PBS (tampón fosfato salino, de sus siglas en inglés) + 0,5% FBS + 2mM EDTA) por cada 10×10^6 PBMCs y se añadieron 10 µL de la solución de microesferas magnéticas anti-CD14. Esta suspensión se incubó durante 20 minutos a 4°C, permitiendo la unión específica de las microesferas a la superficie de las células CD14⁺. Una vez finalizada la incubación, se completó el volumen de la suspensión celular hasta 500 µL con MACS buffer. Para la separación celular, se utilizó un sistema de columnas LS acoplado a un campo magnético de alta intensidad. Antes de su uso, la columna fue equilibrada con 3 mL de MACS buffer. Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a la columna, donde las células CD14⁺ quedaron retenidas, mientras que las células no marcadas fueron eliminadas mediante tres lavados consecutivos con 3 mL de MACS buffer. Una vez finalizada la fase de lavado, la columna fue retirada del campo magnético y las células CD14⁺ fueron recuperadas mediante la adición de 5 mL de medio RPMI completo. La cantidad de monocitos aislados se cuantificó mediante conteo con azul tripán (véase apartado 5.1.1.1.1.). Para evaluar la eficacia del aislamiento de las células CD14⁺, se recogió una alícuota de 50 µL para el análisis de los marcadores CD14 y CD16 por citometría de flujo (véase apartado 5.7.).

5.1.2.3. Evaluación de la eficacia del aislamiento de las células CD14⁺

Las alícuotas tomadas antes y después del aislamiento fueron marcadas con anticuerpos anti-CD14 y anti-CD16 y analizadas mediante citometría de flujo, según se indica en el apartado 5.7. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante una estrategia de selección de poblaciones (*gating*) secuencial (Figura 17). Tras haber seleccionado los singletes, la población de linfocitos en la muestra de PBMCs se empleó como control negativo para la identificación de células CD14⁺. Con base en esta estrategia, se cuantificó el porcentaje de células CD14⁺ en ambas muestras y de células dobles positivas CD14⁺/CD16⁺ en la muestra post-aislamiento.

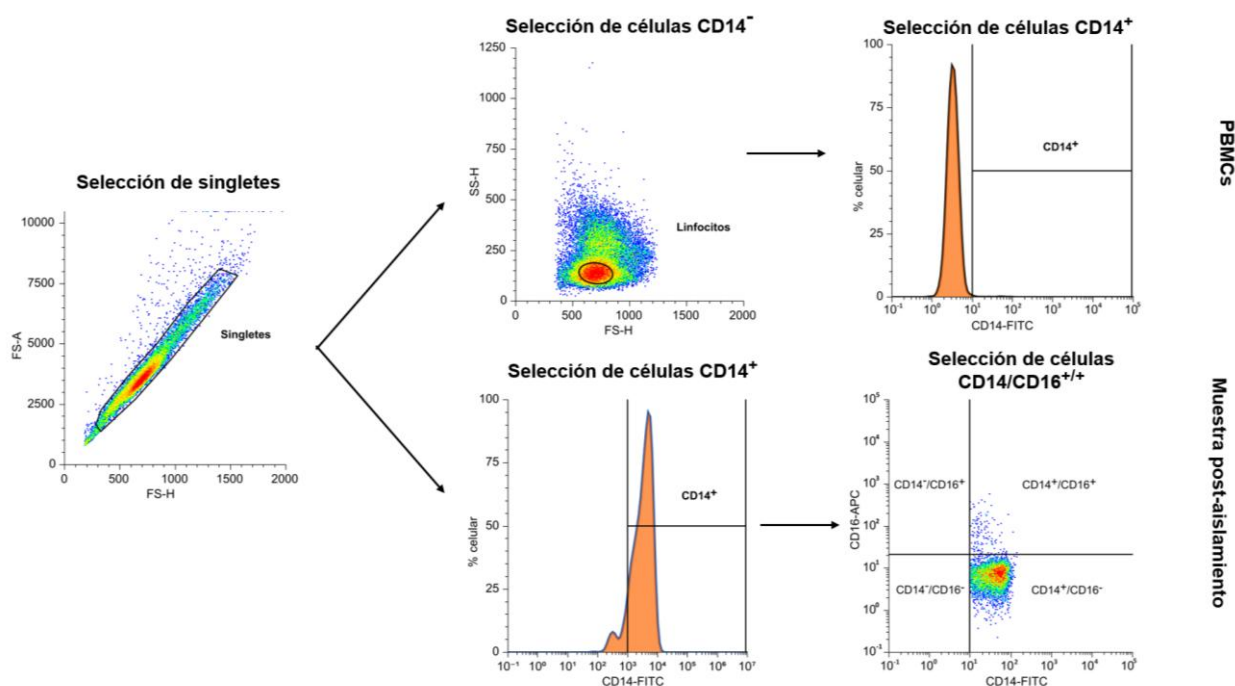


Figura 17. Estrategia de *gating* para la evaluación de la eficiencia del aislamiento de células CD14⁺ a partir de PBMCs mediante microesferas magnéticas anti-CD14. Tras la selección de singletes, se seleccionaron los linfocitos de la muestra de PBMCs (fila superior) como control negativo para definir la región CD14⁺. Dicha región se utilizó para calcular tanto el porcentaje de células CD14⁺ iniciales presentes en los PBMCs (fila superior) como en la muestra post-aislamiento (fila inferior). En esta última se cuantificó además el porcentaje de células dobles positivas CD14⁺/CD16⁺.

5.1.2.4. Diferenciación a macrófagos

La suspensión de monocitos obtenida se centrifugó (400 × g, 5 minutos) y el pellet celular resultante se resuspendió en un medio de diferenciación compuesto por RPMI completo suplementado con 50 ng/mL de M-CSF humano (Miltenyi Biotec). El volumen de suspensión fue ajustado para obtener una densidad aproximada de 2×10⁶ de células por pocillo en 3 mL de medio, lo que permitió una diferenciación en monocapa confluyente. A continuación, las células fueron distribuidas en placas de 6 pocillos e incubadas durante 6 días a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurrido este tiempo, fue necesario despegar las células mediante tratamiento enzimático. Primero, se retiró el sobrenadante y se lavó cada pocillo con 5 mL de PBS para eliminar las células no adherentes y los restos de FBS. Posteriormente, se añadió 1 mL de tripsina por pocillo y se incubó a 37°C durante 15 a 20 minutos. Después del periodo de incubación, se neutralizó la tripsina con 100 µL de FBS. Seguidamente, se

realizó una disociación mecánica utilizando un raspador celular (*cell scraper*) y pipeteo, con el fin de garantizar el desprendimiento completo de las células. Finalmente, las células fueron transferidas a un tubo Falcon y se realizó el recuento celular empleando la cámara Bürker (véase apartado 5.1.1.1.). Una vez determinado el número total de macrófagos obtenidos, se distribuyeron en placas de 48 pocillos a una densidad de 2×10^5 células en un volumen de 0,5 mL por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂ durante un mínimo de 2 horas para permitir la adecuada adhesión de los macrófagos al fondo de los pocillos antes de continuar con su manipulación.

5.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este Trabajo están reflejadas en la tabla 3:

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Descripción
BCG Tice GFP ¹⁰⁹	<i>M. bovis</i> BCG Tice transformada con el plásmido pJKD6 para expresar constitutivamente la proteína fluorescente verde (GFP).
BCG SSI ¹¹⁰	<i>M. bovis</i> BCG Danish 1331, producida por el Statens Serum Institut (Dinamarca).

5.2.1. Condiciones de cultivo

Las micobacterias se crecieron a 37°C en los siguientes medios de cultivo:

- Líquido: Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 10% de ADC (albumina 50 g/l, dextrosa 20 g/l y catalasa 0,03 g/l; BD), Tween-80 al 0,05% y glicerol al 0,2%.
- Sólido: Agar Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado con un 10% de ADC y glicerol al 0,5%.

5.2.2. Preparación de suspensiones “stock” para infección

Se inició un cultivo a partir de una alícuota previamente congelada la cual se inoculó en 10 mL de medio líquido en un flask de 25 cm³. Una vez alcanzada la fase exponencial del cultivo (densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) \approx 0,6), las bacterias se recolectaron por centrifugación (3000 \times g, 5 min). El pellet bacteriano se lavó con 10 ml de PBS con 0,05% de Tween-80 y se sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones. El pellet resultante fue resuspendido en RPMI completo utilizando el mismo volumen de partida, generando la denominada “Suspensión 1”. Debido a la composición de su envuelta celular, las micobacterias tienen tendencia a formar agregados en cultivo líquido. Para favorecer la obtención de suspensiones dispersas, la “Suspensión 1” fue centrifugada a velocidad suave (260 \times g, 5 minutos) y se recolectó la parte superior del sobrenadante (suspensión “stock” para infección), que contenía principalmente bacterias individuales. Las suspensiones “stock” se criopreservaron a -80°C en alícuotas suplementadas con glicerol al 5% (v/v) para garantizar su viabilidad a largo plazo.

Para determinar la concentración de bacterias viables en dichas suspensiones, se descongeló una alícuota a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas 1/10 en PBS + 0,05% Tween-80 por triplicado y se plaquearon en medio sólido. Tras 2 y 3 semanas de incubación a 37°C se procedió a hacer el recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU, de sus siglas en inglés).

5.3. Infección con BCG-GFP

Para llevar a cabo los experimentos de infección, las THP-1 fueron diferenciadas con PMA durante 72 horas en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo (véase apartado 5.1.1.2.). Por su parte, las infecciones de hMDMs se realizaron en placas de 48 pocillos sembradas a una densidad de 2×10^5 células por pocillo (véase apartado 5.1.2.4.).

Las suspensiones de infección se prepararon a partir de los stocks de las cepas bacterianas a utilizar previamente preparados y cuantificados (véase apartado 5.2.2.). El volumen de stock necesario se calculó en función de la multiplicidad de infección (MOI; bacterias:células) deseada. A continuación, se diluyó en medio RPMI-1640 completo teniendo en cuenta que el volumen de suspensión por pocillo fue de 0,5 mL. Para confirmar que la MOI real correspondía a la teórica, se realizaron diluciones seriadas y plaqueos en medio sólido de las suspensiones bacterianas utilizadas.

Para llevar a cabo la infección, el medio de cultivo fue retirado y se añadieron 0,5 mL de la suspensión de infección preparada. Las MOIs empleadas en cada experimento se indican en la figura correspondiente. Las células fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂ durante 24 h, permitiendo la internalización de las micobacterias. Pasado este tiempo se realizan tres lavados consecutivos con medio RPMI-1640 o PBS para eliminar las bacterias extracelulares (tiempo 0). Finalmente, se añadió 0,5 mL de medio RPMI completo por pocillo y se continuó la incubación a 37°C, 5% CO₂ hasta alcanzar los tiempos post-infección (p.i.) indicados en el experimento correspondiente.

5.4. Estudio de la infectividad de BCG y su capacidad para inducir la polarización de los macrófagos infectados.

La infectividad de BCG en THP-1 y hMDMs se evaluó mediante el uso de una cepa recombinante de BCG que expresa GFP (BCG-GFP), lo que permitió identificar las células infectadas a través de la detección de fluorescencia (células GFP⁺) mediante citometría de flujo. Las células fueron infectadas siguiendo el protocolo establecido en el apartado 5.3, utilizando MOIs 1 y 5 y se procesaron en los tiempos 0 y 72 h p.i. (véase apartado 5.7.1.).

Para estudiar la polarización inducida por la infección, se analizó en esas mismas condiciones la expresión de distintos marcadores de superficie asociados a los perfiles M1 y M2. En el caso de células THP-1 se evaluaron los marcadores HLA-DR (fenotipo M1) y CD206 (fenotipo M2). Para los hMDMs, se analizaron HLA-DR, CD40 y CD80 como indicativos de polarización hacia M1 y CD163 como representativo de M2. La información detallada sobre los anticuerpos utilizados, así como el protocolo de preparación y adquisición de muestras se encuentra descrita en el apartado 5.7.

El análisis se basó en la estrategia de *gating* secuencial mostrada en la Figura 18. Las muestras no infectadas se emplearon como control negativo para identificar las células GFP⁺. Como parámetros para evaluar la infectividad se calcularon el porcentaje de células GFP⁺ y la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI)

de GFP en la población infectada. Además, se determinó la MFI de los distintos marcadores de polarización en la población total de singletes.

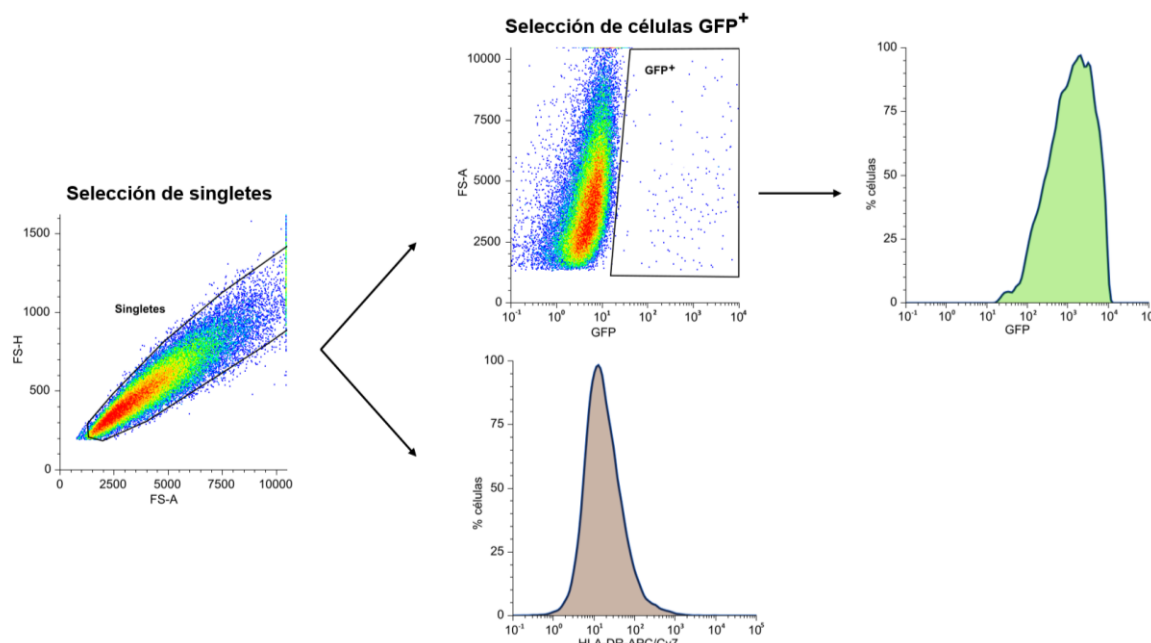


Figura 18: Estrategia de *gating* utilizada para el análisis por citometría de flujo de los estudios de infectividad y polarización. En la figura se muestra como ejemplo el análisis de las células THP-1 y el marcador de polarización HLA-DR.

5.5. Evaluación de la muerte celular inducida por la infección con BCG

La muerte celular inducida por BCG en los hMDMs se evaluó mediante la detección de células no viables por citometría de flujo utilizando la sonda LIVE/DEAD™ Fixable Violet (Invitrogen). Las células fueron infectadas siguiendo el protocolo establecido en el apartado 5.3, utilizando MOIs 5 y 20 y se analizaron a las 72 h p.i. Los datos se analizaron siguiendo una estrategia de *gating* adaptada para la identificación de células no viables (Figura 19). Tras la selección de los singletes, se creó la región correspondiente a los restos celulares (*debris*) de acuerdo con sus características morfológicas, y se utilizó el operador booleano NOT para definir la fracción celular. Dentro de esta última, la población FL9⁺ se definió tomando como referencia la muestra marcada exclusivamente con GFP (sin sonda LIVE/DEAD™), la cual carece de señal en el canal FL9. Con base en esta muestra se estableció un umbral que permitió distinguir entre células viables (FL9⁻) y no viables (FL9⁺) en las distintas condiciones experimentales.

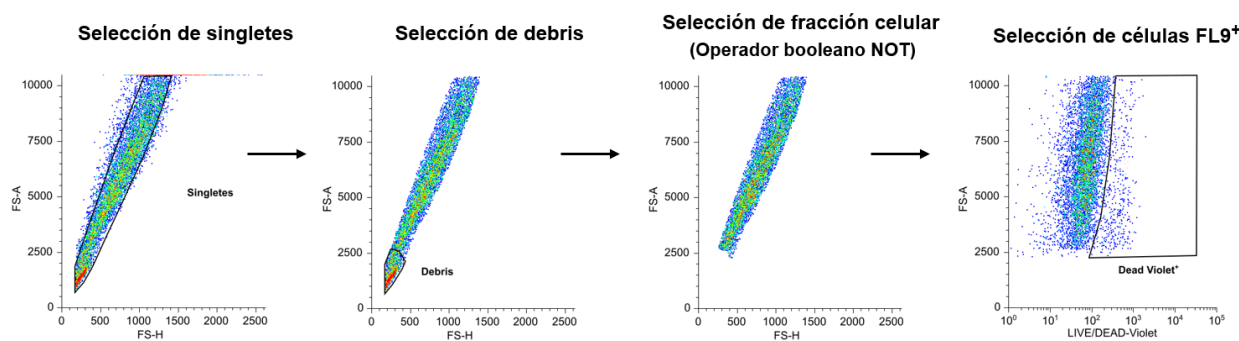


Figura 19: Estrategia de *gating* para el cálculo de porcentaje de células muertas por citometría de flujo.

5.6. Determinación de la citotoxicidad de los hMDMs frente a células tumorales

Con el objetivo de evaluar si los hMDMs presentaban actividad antitumoral inducida por BCG, se diseñó un experimento de co-cultivo con la línea celular A549. Los hMDMs fueron infectados con BCG-GFP según el protocolo establecido (véase el punto 5.3.). Transcurridas 72 h p.i. se retiró el sobrenadante y se añadió 0,5 mL/pocillo de una suspensión celular de A549 en medio RPMI completo a una densidad de 2×10^4 células/pocillo, estableciendo así una proporción de 10:1 (células efectoras:células tumorales). El co-cultivo se mantuvo durante 24 horas a 37 °C y 5% CO₂.

La viabilidad de las células A549 se evaluó mediante citometría. Para ello, las células fueron marcadas con la sonda LIVE/DEAD™ Fixable Violet (Invitrogen) y un anticuerpo anti-CD14 (véase protocolo 5.7.), con el fin de discriminar entre macrófagos (FL1⁺) y células tumorales (FL1⁻). Esta estrategia nos permitió detectar la pérdida de viabilidad en estas últimas como indicativo de actividad citotóxica de los hMDMs.

El análisis se realizó aplicando una estrategia de *gating* adaptada para identificar específicamente a las células tumorales no viables (Figura 20). Tras la selección de singletes, se definió la población de células A549 en función de su tamaño y complejidad (FS-A vs FL1-A), excluyendo las células FL1⁺ (macrófagos GFP⁺ o CD14⁺). Finalmente, la viabilidad celular se determinó en el canal FL9, considerando como no viables aquellas con fluorescencia positiva (FL9⁺). El porcentaje de células FL9⁺ dentro de la población de A549 se utilizó como medida de la citotoxicidad ejercida por los hMDMs.

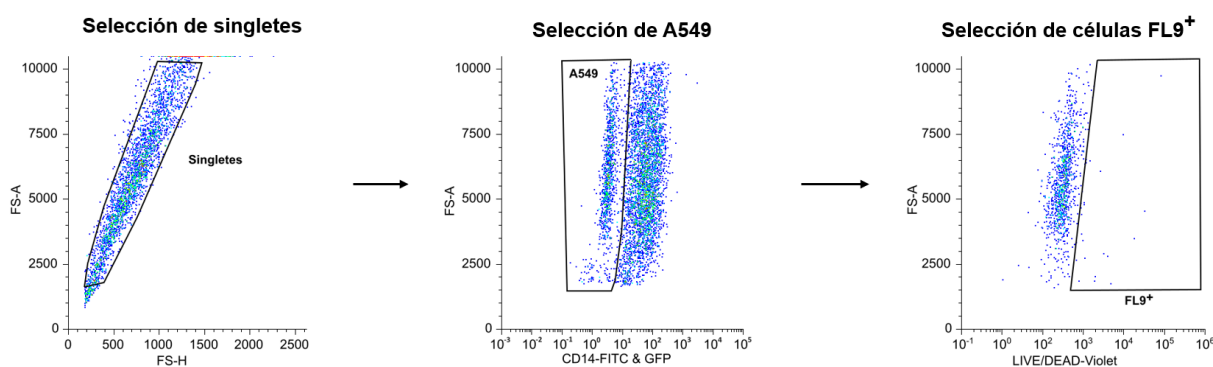


Figura 20: Estrategia de *gating* para evaluar la viabilidad de células A549 en co-cultivo con macrófagos infectados por BCG.

5.7. Análisis mediante citometría de flujo

Como se ha mencionado, el análisis de muchos de los parámetros evaluados en este Trabajo de Fin de Máster se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter). Se seleccionaron fluorocromos con espectros de emisión compatibles con los canales de detección disponibles, evitando solapamientos espectrales significativos entre fluorocromos. Los espectros de excitación y emisión se detallan en el Anexo C. Asimismo, se realizaron marcajes simples para cada fluorocromo, permitiendo la generación de una matriz de compensación adecuada para corregir los solapamientos espectrales entre canales (véase apartado 5.7.1.2.). La Tabla 4 resume los anticuerpos utilizados (Biolegend), especificando

su fluorocromo, el clon (todos ellos isotipo de ratón IgG1) y el canal de detección correspondiente. Para el análisis de viabilidad celular se utilizó la sonda LIVE/DEAD™ Fixable Violet (Invitrogen), detectable en el canal FL9. La detección de la proteína fluorescente GFP, expresada en células infectadas, se realizó en el canal FL1.

Tabla 4: Anticuerpos utilizados para la detección de marcadores fenotípicos de superficie.

Marcador	Fluorocromo	Clon	Canal	Marcador	Fluorocromo	Clon	Canal
CD14	FITC	HCD14	FL1	CD11b	APC	ICRF4	FL6
CD40	PE	5C3	FL2	CD16	APC	B73.1	FL6
CD163	PE/DAZZLE 594	GHI/61	FL3	HLA-DR	APC/Cy7	L243	FL8
CD80	PE/Cy7	2D10	FL5	CD206	Pacific Blue (PB)	15-2	FL9

5.7.1. Procesamiento de muestras para citometría de flujo

5.7.1.1. Recolección de muestras

Las células adherentes fueron disociadas mediante incubación con 450 µL de tripsina durante 10-15 minutos a 37°C. La actividad enzimática fue neutralizada con 50 µL de FBS, seguida de disociación mecánica utilizando un raspador celular (*cell scraper*) y pipeteo, para garantizar la recolección total de las células. La suspensión celular se centrifugó (400 × g, 5 minutos) para eliminar la tripsina.

Para muestras que no requirieron análisis de viabilidad, las células se lavaron con 500 µL de buffer de marcaje (PBS suplementado con FBS al 1% y EDTA 2 mM) y se centrifugaron nuevamente. En cambio, para muestras destinadas al análisis de viabilidad se utilizó PBS como tampón de lavado.

5.7.1.2. (Opcional) Incubación con LIVE/DEAD™ Fixable Violet para estudios de viabilidad celular

El pellet se resuspendió en una solución de LIVE/DEAD™ Fixable Violet (1:500 en PBS) y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente, se lavó con PBS, se centrifugó (400 × g, 5 min) y se procedió al marcaje con anticuerpos.

5.7.1.3. Marcaje con anticuerpos para marcadores de superficie

Las células se incubaron en un coctel de anticuerpos preparado con 1 µL de cada anticuerpo en 100 µL de buffer de marcaje durante 20 minutos en hielo y en oscuridad. Después, se lavaron las muestras con el mismo buffer y se centrifugaron (400 × g, 5 minutos).

5.7.1.4. Fijación de muestras con PFA

Las células marcadas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron (600 × g, 5 minutos) para eliminar el PFA. Finalmente, se resuspendieron en 350 µL de buffer de marcaje y se conservaron a 4°C sin superar 7 días antes de la adquisición.

5.7.2. Preparación de controles de compensación para citometría de flujo

En el caso de los marcajes con anticuerpos, los controles de compensación se prepararon llevando a cabo marcajes simples según lo descrito en el apartado 5.7.1. Cuando la cantidad de células disponibles no fue suficiente, se utilizaron microesferas de compensación (BioLegend). Las microesferas se homogeneizaron con vortex durante 2 minutos, y se añadió una gota (25–30 μL) de esferas positivas y negativas por cada fluorocromo. Tras mezclar con pipeteo, la suspensión se distribuyó en tubos individuales, añadiendo 100 μL de buffer de marcaje y 1 μL del anticuerpo correspondiente. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron y centrifugaron ($350 \times g$, 5 min), y se resuspendieron en 350 μL de buffer de marcaje.

Por otro lado, como control de compensación para la señal de GFP se utilizaron células infectadas con BCG-GFP a MOI 5. Como control positivo de muerte celular, se permeabilizó la membrana de las células mediante la adición de etanol al 25% (v/v). La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, tras lo cual se marcaron con la sonda LIVE/DEAD™ Fixable Violet siguiendo el protocolo descrito en el punto 5.7.1.2.

5.7.2.1. Adquisición y análisis de datos

Los datos fueron adquiridos en el citómetro Gallios (Beckman Coulter) a velocidad rápida por un tiempo de 80 segundos y analizados mediante el software Floreada.io¹¹¹. La estrategia de análisis utilizada en cada ensayo se representa en los apartados específicos correspondientes.

5.8. Cuantificación de la secreción de TNF- α mediante ELISA

Los sobrenadantes de las células THP-1 y de los hMDMs se recogieron antes de proceder a los lavados de la infección (tiempo 0) y a las 72 h p.i. y se conservaron a -80°C. Antes de analizarlos se centrifugaron (6000 rpm, 5 min) para eliminar tanto restos celulares como micobacterias potencialmente presentes.

La cuantificación de TNF- α se llevó a cabo mediante un ELISA tipo sándwich utilizando el kit comercial ELISA Flex: Human TNF- α (HRP) (Mabtech), siguiendo las instrucciones del fabricante. El día previo al ensayo, se recubrió una placa de 96 pocillos de alta afinidad para proteínas con 100 μL /pocillo del anticuerpo de captura diluido a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS, incubándose a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se bloqueó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con el tampón de incubación (PBS-Tween 80 0,05% + Albúmina de suero bovino (BSA) 0,1%) y se realizaron cinco lavados con PBS-Tween-80 0,05%. El patrón de calibración se preparó mediante diluciones seriadas 1:2 en tampón de incubación partiendo de una alícuota de TNF- α humano a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cubriendo un rango de 3,9 a 1000 pg/mL (véase Figura 21). A continuación, se añadieron 100 μL /pocillo de los sobrenadantes o de las diluciones del estándar preparadas y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Tras cinco lavados, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y, tras una hora de incubación, se repitió el lavado y se incubó con 100 μL /pocillo de estreptavidina-HRP durante otra hora. Finalmente, se volvió a lavar y se incubó con sustrato TMB durante 15 minutos en oscuridad, tras los cuales la reacción se detuvo con H_2SO_4 0,2 M.

La lectura se realizó utilizando un lector de microplacas Biotek Epoch midiendo la absorbancia a 450 nm y aplicando corrección de fondo a 600 nm. Se construyó una curva estándar mediante regresión lineal entre la absorbancia y la concentración conocida de TNF- α (Figura 21), la cual mostró una elevada linealidad ($R^2=0,9812$). Esta ecuación se utilizó para interpolar las concentraciones presentes en las muestras experimentales.

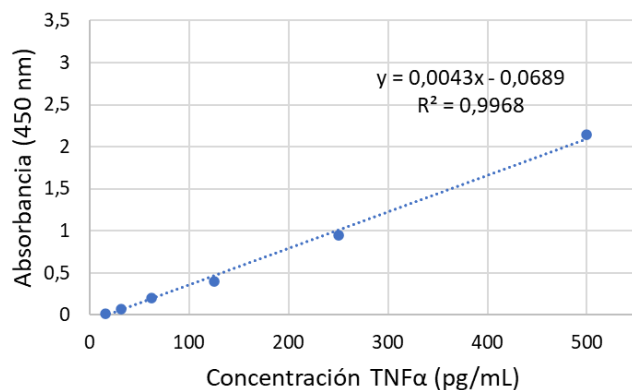


Figura 21: Curva estándar del ensayo ELISA para la cuantificación de TNF- α humano. Se utilizó un modelo de regresión lineal para el ajuste de los datos.

5.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 9. Los métodos estadísticos empleados se especifican en los respectivos pies de figura.

6. Resultados:

6.1. BCG-GFP infecta eficazmente las células THP-1 diferenciadas, pero no induce cambios en marcadores M1/M2.

Las células THP-1 son una línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia mieloide aguda. Esta línea celular es ampliamente utilizada como modelo *in vitro* para el estudio de funciones y respuestas de macrófagos, gracias a su capacidad de diferenciarse en células con características similares a los macrófagos mediante tratamientos específicos. En este trabajo, se emplearon como sistema modelo para evaluar el impacto de la infección con BCG en la polarización de los macrófagos hacia fenotipos M1 o M2 en un entorno controlado y reproducible.

Con el objetivo de optimizar la diferenciación de las células THP-1, se expuso la línea celular al agente estimulante PMA (10 ng/mL) durante diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72 h). La eficacia del tratamiento fue evaluada mediante análisis por citometría de flujo de la inducción de la expresión del marcador de superficie CD11b. Los resultados mostraron que las células no tratadas (No PMA) presentan niveles basales bajos de expresión de CD11b en términos de MFI (Figura 22). Tras 24 y 48 h de exposición a PMA se observó un ligero incremento de la MFI, aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (No PMA). Sin embargo, tras 72 h de tratamiento se evidenció un aumento significativo en la expresión de CD11b, indicando una diferenciación más pronunciada. Estos datos muestran que, para una concentración de PMA de 10 ng/mL, es necesario un tiempo mínimo de 72 h de exposición para inducir una diferenciación efectiva de las células THP-1 hacia un fenotipo similar al de macrófagos, evidenciado por el aumento en la expresión del marcador CD11b.

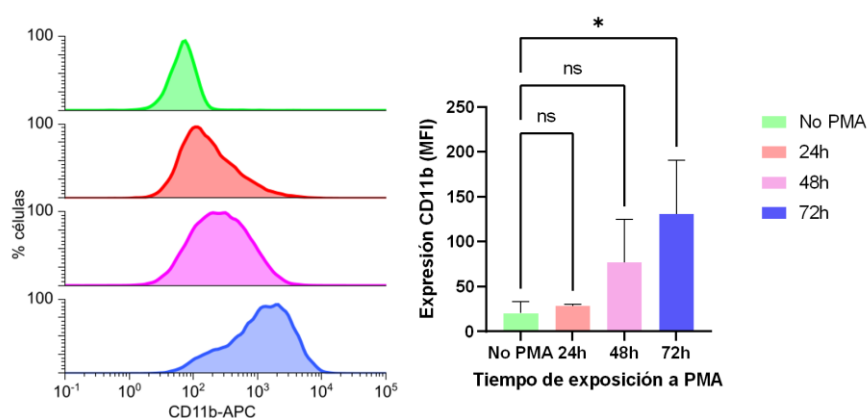


Figura 22. Expresión de CD11b en células THP-1 tras exposición a PMA. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD11b analizada por citometría de flujo en células THP-1 expuestas a PMA durante 24, 48 o 72 h y no tratadas (no PMA). (B) Diagrama de barras representando media + desviación estándar (DE) de la MFI de CD11b calculados a partir de los valores obtenidos de tres réplicas experimentales. Análisis estadístico mediante ANOVA de un factor seguido de un test de múltiples comparaciones de Dunnet; ns, no significativo; *, p < 0,05

Además, se monitorizó mediante microscopía óptica la morfología celular durante el tratamiento con PMA (Figura 23.A), así como su evolución 72 h tras la eliminación del estímulo (Figura 23.B). Las imágenes

mostraron que únicamente las células estimuladas durante 72 h adquirieron una morfología extendida, característica de los macrófagos adherentes. Los tratamientos más cortos (24 y 48 h) no fueron suficientes para mantener de forma estable el fenotipo diferenciado tras la eliminación del PMA, observándose desdiferenciación y reanudación de la proliferación celular (reflejada por un aumento de la densidad celular en los pocillos). En contraste, una estimulación de 72 h permitió conservar la morfología típica de los macrófagos tras la retirada del estímulo. Por todo ello, se seleccionó el tratamiento con PMA durante 72 h como condición estándar para todos los experimentos posteriores, asegurando una diferenciación robusta y estable de las células THP-1.

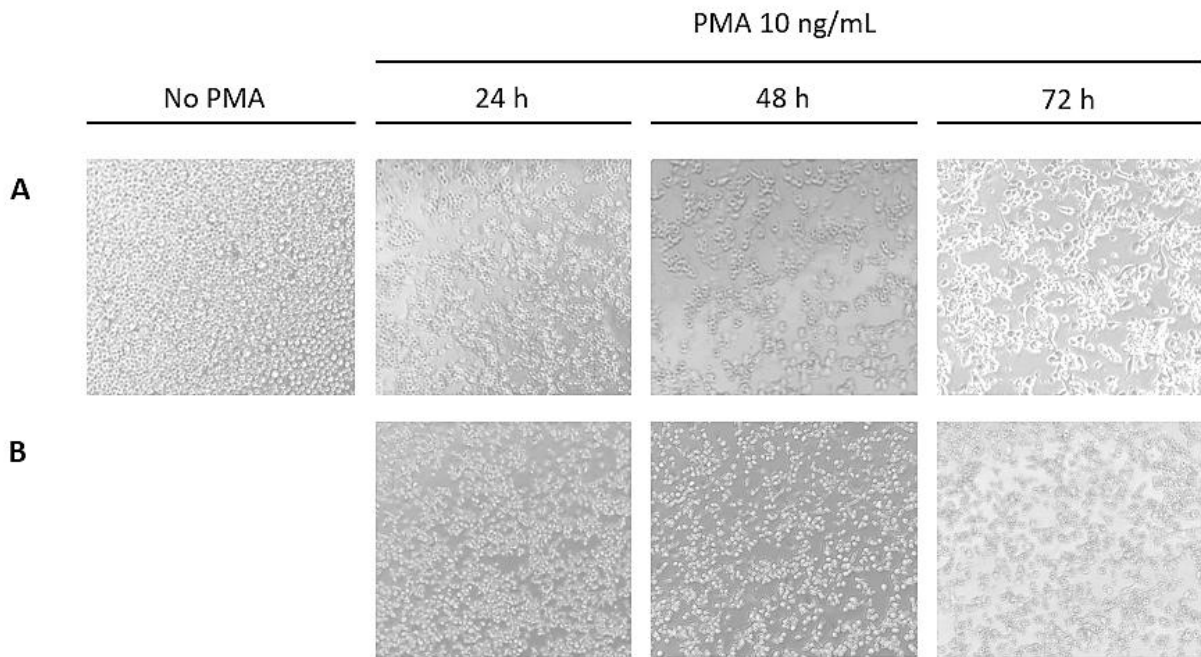


Figura 23: Evaluación morfológica del fenotipo diferenciado en células THP-1 tras distintos tiempos de exposición a PMA. Imágenes representativas de las células THP-1 (A) tratadas con PMA durante los tiempos indicados o no tratadas (No PMA), y (B) 72 h post-retirada de PMA tras los diferentes tiempos de tratamiento.

Una vez determinado que el tiempo optimo de diferenciación con PMA era de 72 h se diseñó un esquema experimental para evaluar la posibilidad de generar B-MACs *in vitro* a partir de células THP-1 diferenciadas (Figura 24).

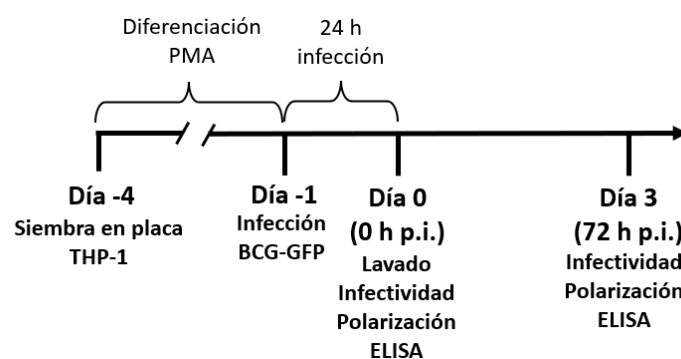


Figura 24: Esquema representativo del diseño experimental empleado para la línea celular THP-1.

Para evaluar la eficacia de BCG para infectar las células THP-1 diferenciadas con PMA, se utilizó una cepa recombinante de BCG Tice que expresa GFP de manera constitutiva (BCG-GFP). Las células fueron

infectadas con MOIs 1 y 5 y se analizaron mediante citometría de flujo a los tiempos establecidos en la Figura 24. El porcentaje de células GFP⁺ reflejó la proporción de células infectadas, mientras que la MFI de GFP fue utilizada como medida indirecta de la carga bacteriana intracelular. Como se observa en la Figura 25.A, el porcentaje de células infectadas fue significativamente mayor a MOI 5 frente a MOI 1, tanto a 0 como a 72 h p.i., obteniéndose en todos los casos valores mayores a 50% de células GFP⁺. Por otro lado, al comparar la MFI de GFP a las 0 h se observó una tendencia a que la obtenida con MOI 5 fuera mayor que la registrada con MOI 1, que se volvió significativa a las 72 h p.i. (Figura 25.B). Estos datos indican que la carga bacteriana alcanzada por célula es mayor cuanto mayor es la MOI empleada. Además, en las condiciones de MOI 1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la MFI de GFP entre los tiempos 0 y 72 h p.i. lo que sugiere una carga bacteriana intracelular relativamente estable en ese intervalo temporal. En contraste para las células infectadas con MOI 5 se observó un aumento significativo en la MFI de GFP a las 72 h p.i. respecto al tiempo 0, lo cual indica que BCG es capaz de replicar moderadamente en estas condiciones. En conjunto, estos resultados indican una mayor eficiencia de infección, tanto en términos de porcentaje de células infectadas como en carga bacteriana, a mayor MOI.

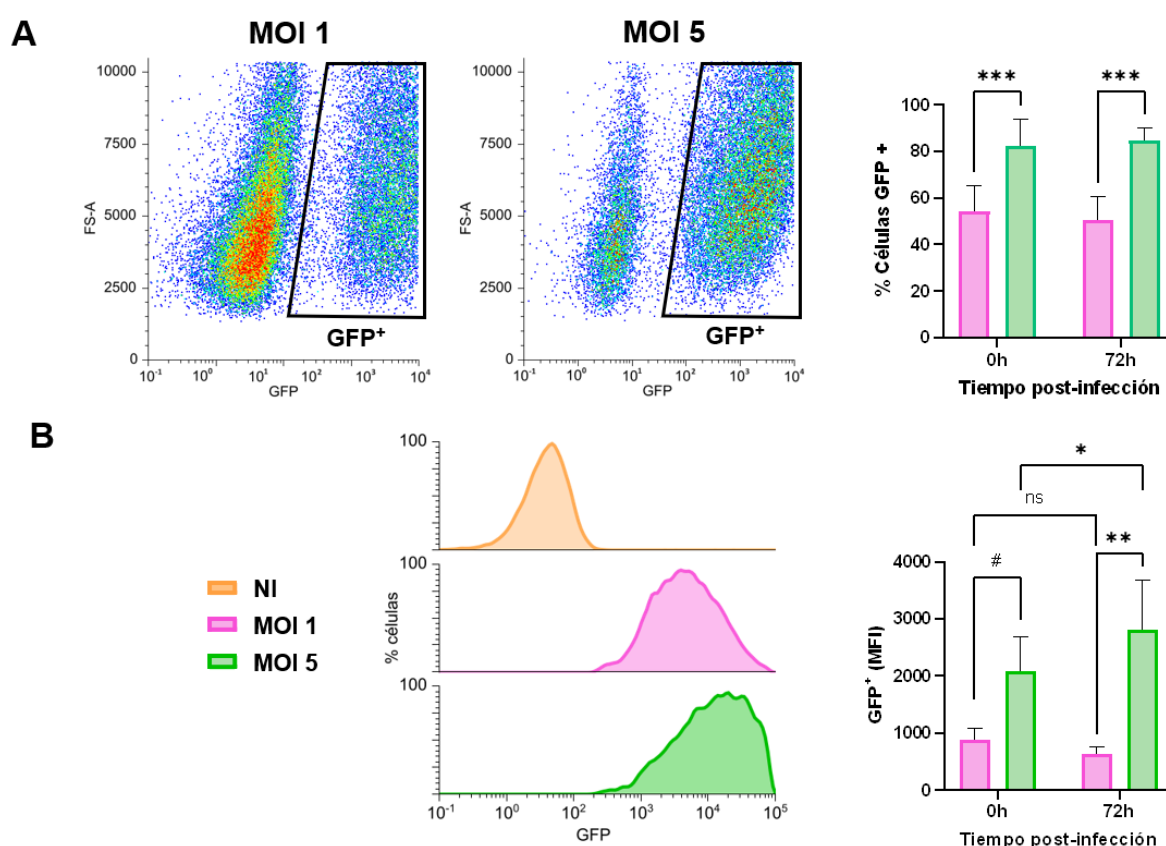


Figura 25. Análisis de infectividad en células THP-1 diferenciados con PMA tras infección con BCG-GFP. (A) Dot plots representativos del porcentaje de células infectadas (GFP⁺) a 72 h p.i. y diagrama de barras a ambos tiempos p.i. (B) Histogramas representativos de la señal de fluorescencia de GFP a 72 h p.i. y diagrama de barras representando la MFI de GFP a ambos tiempos p.i. En ambos casos los datos representan la media + DE de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante modelo de efectos mixtos (REML) seguido del test de Šidák para comparaciones múltiples; ns, no significativo; #, $p = 0,05$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Una vez confirmado que las células THP-1 diferenciadas pueden ser infectadas eficazmente con BCG, se analizó si éstas eran capaces de responder a la infección secretando TNF- α . Para ello, se cuantificó mediante ELISA la concentración de TNF- α presente en los sobrenadantes de los cultivos de THP-1 a 0 y 72 h p.i. Los resultados obtenidos revelaron que los niveles de secreción de esta citoquina en ausencia de estímulo (células NI) eran muy bajos en los dos tiempos analizados (Figura 26). A tiempo 0 p.i., se observó un aumento significativo de la secreción por las células infectadas respecto al control NI, que fue mayor a la MOI más alta. No obstante, estas diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas a las 72 h p.i, cuando los niveles de TNF- α se redujeron considerablemente en todos los grupos, aunque la tendencia se mantuvo.

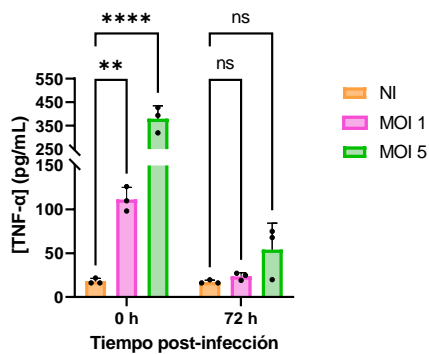


Figura 26. Secreción de TNF- α inducida por la infección con BCG en macrófagos derivados de THP-1. Las concentraciones de TNF- α presentes en los sobrenadantes de los cultivos a 0 y 72 h p.i. en células NI e infectadas con BCG-GFP a MOI 1 o 5 fueron medidas por ELISA. Los datos representan la media + DE de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante modelo de efectos mixtos (REML) seguido del test de Šidák para comparaciones múltiples: ns, no significativo; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

Por último, analizamos si la infección con BCG inducía cambios en la polarización de las células THP-1. Para ello, se evaluó por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD206 y HLA-DR relacionados con fenotipo M2 y M1, respectivamente. Tal y como se muestra en la Figura 27, no se detectaron cambios significativos en la MFI de ninguno de los marcadores utilizados tras la infección, independientemente de la MOI o del tiempo analizados. De hecho, en el caso de CD206 los niveles de fluorescencia fueron comparables a los de las células no marcadas, lo que indica una ausencia de expresión de este marcador en la línea celular THP-1 bajo estas condiciones. Estos resultados sugieren que la infección con BCG no induce alteraciones notables en la polarización M1/M2 de los macrófagos THP-1 diferenciados con PMA, al menos en las condiciones experimentales analizadas. Además, se observó una elevada dispersión de los datos, evidenciada por las amplias barras de error. Esta variabilidad apunta a una posible heterogeneidad en el grado de diferenciación alcanzado por las THP-1, lo que podría contribuir a una respuesta celular desigual frente a la infección. Ante esta limitación, se decidió emplear en los experimentos posteriores un modelo más fisiológicamente relevante, macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (hMDMs), con el fin de obtener resultados más consistentes y representativos de la respuesta inmune innata frente a BCG.

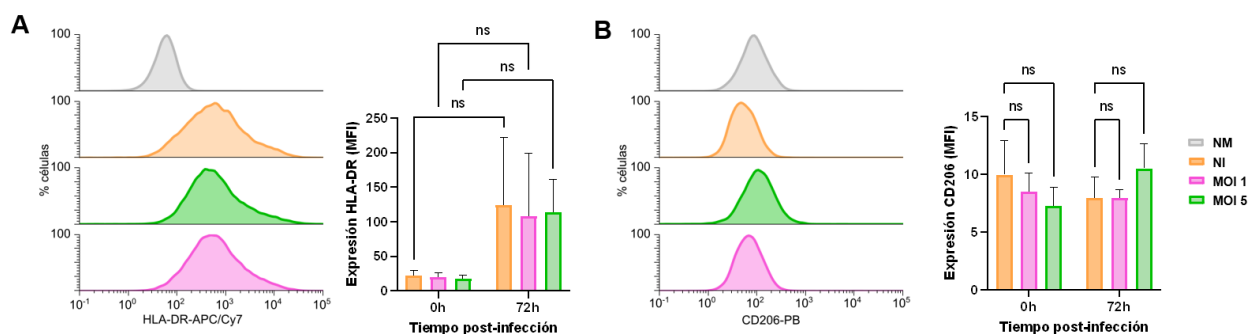


Figura 27. Evaluación del efecto de la infección con BCG-GFP de la polarización de las células THP-1 infectadas. Histogramas representativos de la señal de fluorescencia a 72 h p.i. y diagramas de barras representando la MFI a ambos tiempos p.i. de los marcadores de polarización HLA-DR (A) y CD206 (B) en células no marcadas (NM), no infectadas (NI) e infectadas (MOIs 1 y 5). Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis mediante modelo de efectos mixtos s(REML) seguido del test de Šidák para comparaciones múltiples; ns: no significativo.

6.2. La infección con BCG-GFP induce la polarización de los hMDMs hacia un fenotipo M1

Una vez establecidas las limitaciones de la línea celular THP-1, se pasó a estudiar la generación de B-MACs *in vitro* a partir de macrófagos humanos primarios (hMDMs). Para la obtención de hMDMs, se partió de PBMCs de donantes sanos a partir de los cuales se aislaron los monocitos utilizando un método de separación por selección positiva de células CD14⁺ basado en inmunomagnetismo. Con el objetivo de evaluar la eficacia del proceso de aislamiento, se analizó por citometría de flujo una muestra de las PBMCs iniciales y otra de las células aisladas para cada uno de los donantes empleados en los experimentos posteriores. Los resultados mostraron que el porcentaje de monocitos (CD14⁺) dentro de las PBMCs varió entre un 19 y 58% según el donante, reflejando la variabilidad interindividual habitual en este tipo de muestras biológicas (Tabla 5). Tras el aislamiento, se alcanzaron altos niveles de pureza, con porcentajes de células CD14⁺ superiores al 85%, lo que confirma la eficacia y consistencia del protocolo empleado. Adicionalmente, se caracterizó la proporción de monocitos intermedios y no clásicos (CD14⁺/CD16⁺) dentro de la fracción aislada observándose porcentajes bajos (entre 2,08% y 3,96%), lo cual está en concordancia con su menor representación fisiológica en sangre periférica respecto a los monocitos clásicos (CD14⁺/CD16⁻).

Tabla 5. Análisis de la eficacia del aislamiento de monocitos CD14⁺ y su caracterización fenotípica por citometría de flujo.

Donante	% CD14 ⁺ en PBMCs	% CD14 ⁺ post-aislamiento	% CD14 ⁺ /CD16 ⁺ post-aislamiento
A	19,75 \pm 1,01	86,85 \pm 2,98	2,08 \pm 0,37
B	35,66 \pm 3,97	92,28 \pm 3,14	3,96 \pm 0,65
C	57,30	91,28	2,44
D	30,48	91,51	2,22

Los porcentajes se muestran como porcentaje \pm DE en el caso de los donantes que se han utilizado múltiples veces.

Al igual que se hizo para las células THP-1, los hMDMs se infectaron con la cepa BCG-GFP a MOIs 1 y 5 y se analizaron mediante citometría de flujo a 0 y 72 h p.i. para evaluar la eficacia de la infección e investigar su potencial impacto en la polarización (Figura 28.A). Como podemos observar en la Figura 28.B a las 0 h p.i., las células NI presentan una morfología característica de macrófagos adherentes, con forma extendida y bordes definidos. En las condiciones infectadas, especialmente en MOI 5, ya se observan cambios morfológicos iniciales como mayor redondez celular y cierta tendencia a formar agregados. A las 72 h p.i., los cambios son más evidentes: los macrófagos infectados, particularmente MOI 5, muestran un perfil más redondeado y compacto, con menor proporción de células con morfología extendida en comparación con los controles no infectados.

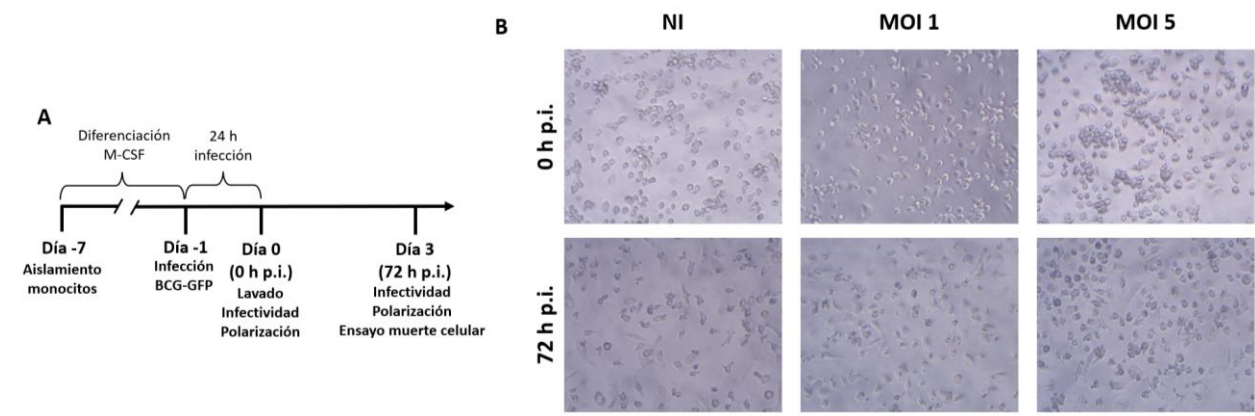


Figura 28: Caracterización de hMDMs no infectados o infectados con BCG-GFP. (A) Esquema experimental del protocolo de diferenciación e infección de los hMDMs, así como de los parámetros analizados. (B) Imágenes representativas de los hMDMs observadas mediante microscopía óptica a 0 y 72 h p.i.

Para evaluar la eficacia de la infección de hMDMs, se emplearon dos métricas, la MFI de GFP como estimación de la carga bacteriana intracelular y el porcentaje de células GFP⁺ (proporción de células infectadas), en muestras de cuatro donantes distintos. Como se muestra en la Figura 29.A, al igual que ocurrió con las células THP-1, la infección con MOI 5 generó un porcentaje significativamente mayor de hMDMs GFP⁺ tanto a 0 h como a 72 h p.i. Sin embargo, no se observaron diferencias en el porcentaje de infección entre 0 y 72 h p.i. para ninguna de las MOIs, indicando que la infección no se propaga a nuevas células. Respecto al análisis de la carga bacteriana, se detectó un aumento de la MFI a MOI 5, aunque esta diferencia solo fue significativa a 72 h p.i. (Figura 29.B). No obstante, la MFI aumentó significativamente a las 72 h p.i. respecto al tiempo 0 en ambas condiciones, siendo el incremento más pronunciado en MOI 5.

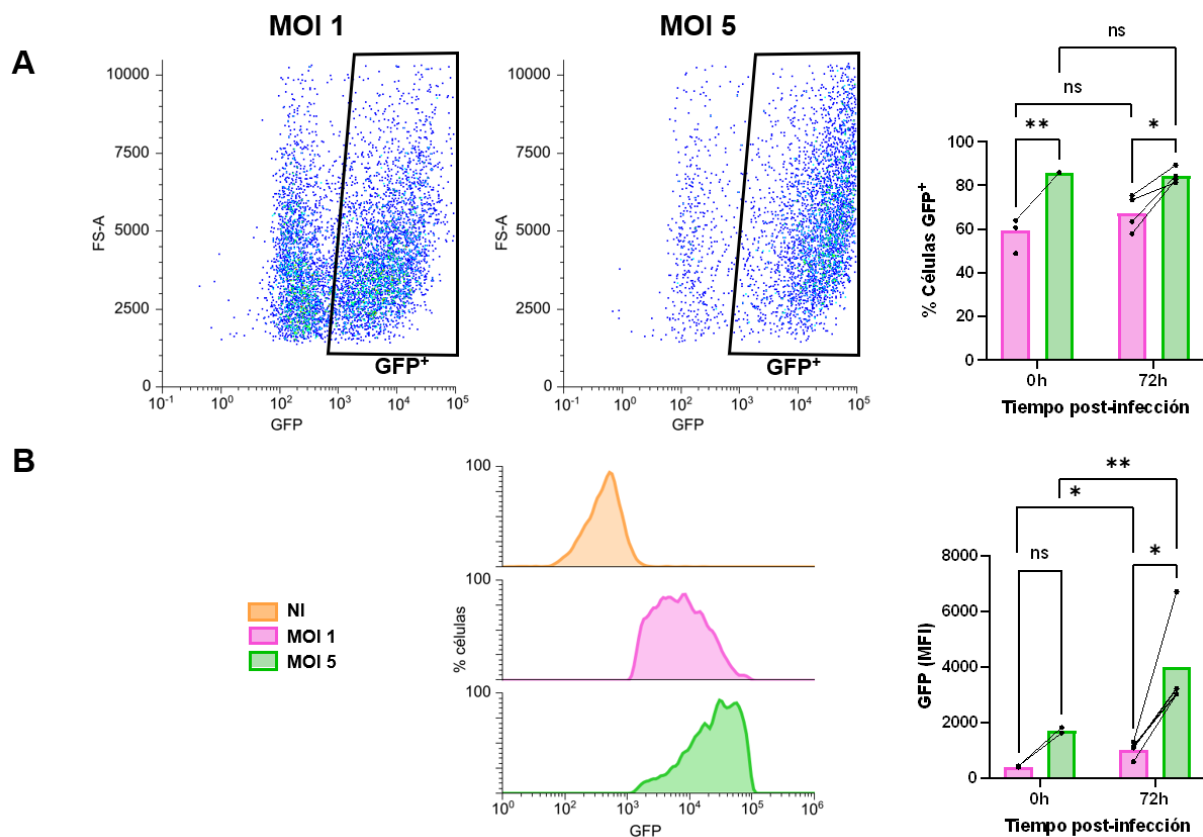


Figura 29. Evaluación de la infectividad de BCG-GFP en hMDMs. (A) Dot plots representativos del porcentaje de células infectadas (GFP⁺) a 72 h p.i. y diagrama de barras a ambos tiempos p.i. (B) Histogramas representativos de la señal de fluorescencia de GFP a 72 h p.i. y diagrama de barras representando la MFI de GFP a ambos tiempos p.i. En ambos casos las barras representan la media de cuatro donantes individuales, cada uno de los cuales está representado por puntos conectados mediante líneas. Análisis estadístico mediante modelos de efectos mixtos (REML), seguido del test de Šidák para comparaciones múltiples; ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Para analizar la polarización inducida por BCG en hMDMs, se evaluó por citometría de flujo la expresión de diversos marcadores de superficie cuyo nivel de expresión está asociado a los fenotipos M1 (CD40, CD80 y HLA-DR) o M2 (CD163). El marcador CD40 (Figura 30.A), asociado con la activación proinflamatoria (M1), mostró un aumento significativo en su expresión a las 72 h p.i. en los hMDMs infectados con MOI 5 respecto a los NI, con una tendencia creciente también para MOI 1. En el caso de CD80 (Figura 30.B) no se observaron diferencias significativas entre condiciones ni a lo largo del tiempo. Aunque cabe mencionar que se observó una alta variabilidad interdonante: a las 72 h p.i., dos individuos mostraron un aumento marcado en la expresión mientras que otros dos presentaron una reducción moderada. La expresión de HLA-DR (Figura 30.C) tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre condiciones. En cuanto al marcador M2 CD163 (Figura 30.D), se detectó una disminución significativa a las 72 h tanto en MOI 1 como en MOI 5 respecto a las células NI, lo que sugiere una pérdida del fenotipo alternativo. En conjunto nuestros resultados sugieren que la infección con BCG a MOI 5 es capaz de inducir la polarización de los hMDMs hacia un fenotipo de tipo M1 al cabo de 72h.

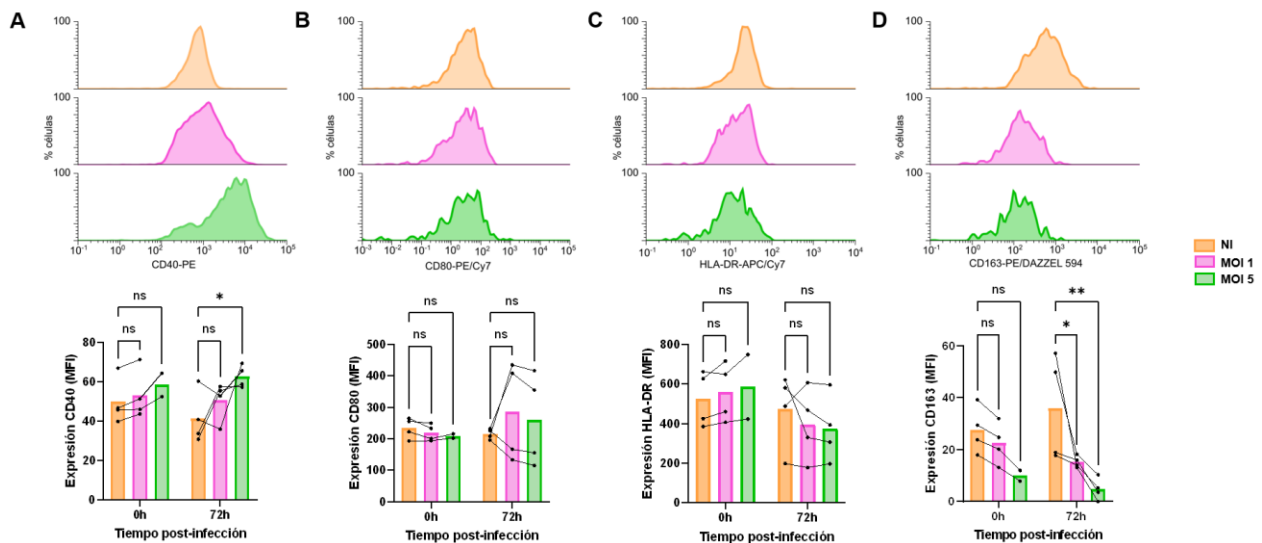


Figura 30. Evaluación de la polarización de hMDMs tras la infección con BCG. Histogramas representativos de la señal de fluorescencia a 72 h p.i. y diagramas de barras representando la MFI a ambos tiempos p.i. de los marcadores de polarización CD40 (A), CD80 (B), HLA-DR (C) y CD163 (D) en células no infectadas (NI) e infectadas (MOIs 1 y 5). En todos los casos las barras representan la media de cuatro donantes independientes, cada uno de los cuales está representado por puntos conectados mediante líneas. Análisis estadístico mediante modelos de efectos mixtos (REML) seguido del test de Šidák para comparaciones múltiples; ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Puesto que el efecto de BCG sobre la activación y la polarización de los macrófagos parecía ser dependiente de la MOI, decidimos comprobar si sería posible incrementar la MOI sin pérdida de la viabilidad celular. Para ello, se infectaron hMDMs con BCG-GFP a MOIs 5 y 20 y se analizaron las células a las 72 h p.i.

utilizando un ensayo de detección de células no viables por citometría de flujo con la sonda LIVE/DEAD™ Fixable Violet (células FL9⁺). Tal y como se muestra en la Figura 31.A, la proporción de células recuperadas en el caso de los hMDMs infectados con MOI 20 mostró una tendencia a ser significativamente más baja en comparación con las condiciones NI y MOI 5. Al analizar el marcaje con la sonda LIVE/DEAD en estas células no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las MOIs y las células NI, aunque sí se pudo observar una tendencia al aumento en el porcentaje de células no viables según aumenta la MOI.

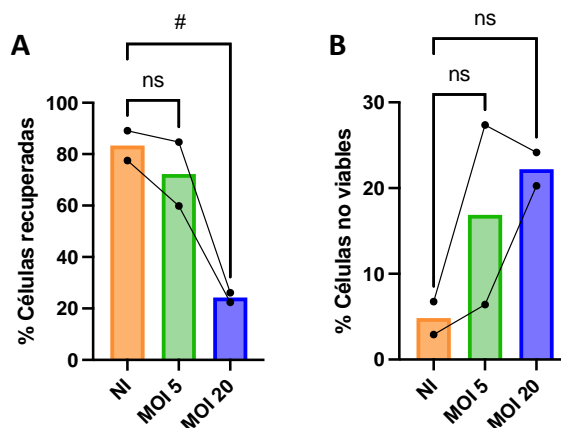


Figura 31. Evaluación del efecto de la MOI en la muerte celular de hMDMs infectados con BCG. Diagramas de barras representando el porcentaje de células recuperadas (A) y, dentro de éstas, el porcentaje de células no viables (B) a las 72 h p.i. en hMDMs no infectados (NI) o infectados con BCG a una MOI de 5 o 20. En ambos casos las barras representan la media de dos donantes independientes, cada uno de los cuales está representado por puntos conectados mediante líneas. Análisis estadístico mediante test de Friedman, seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples; ns, no significativo; #, $p = 0.09$.

Por último, con el objetivo de evaluar si el fenotipo M1 inducido por BCG en los hMDMs se encuentra asociado a una respuesta proinflamatoria, se midió mediante ELISA la concentración de TNF- α presente en los sobrenadantes celulares recolectados a las 72 h p.i. Como se muestra en la Figura 32, se observó un incremento significativo en la secreción de TNF- α en los hMDMs infectados con MOI 5 en comparación con las células NI. Por su parte, las células infectadas con MOI 1 presentaron niveles de secreción intermedios, aunque las diferencias respecto a las células NI no alcanzaron significación estadística. Cabe señalar que, al igual que ocurrió con algunos de los marcadores de polarización, se observó una alta variabilidad interdonante, reflejada en la dispersión de los datos.

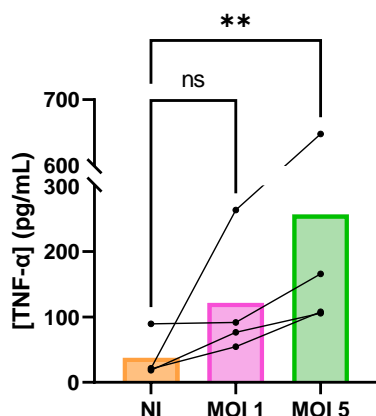


Figura 32: Cuantificación del TNF- α secretado por hMDMs infectados con BCG a las 72 h p.i. Los niveles de TNF- α presentes en los sobrenadantes de hMDMs no infectados (NI) o infectados con BCG-GFP (MOIs 1 y 5) se determinaron mediante ELISA. Las barras representan la media de cuatro donantes independientes, cada uno de los cuales está representado por puntos conectados mediante líneas. Análisis estadístico mediante test de Friedman seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples; ns, no significativo; **, $p < 0,01$.

6.3. Los hMDMs activados con BCG ejercen un efecto citotóxico sobre las células tumorales

Con base a los resultados previos, en los que se observó que la infección con BCG (MOI 5) a 72 h p.i. promovía la activación de hMDMs sin comprometer significativamente su viabilidad, se seleccionó esta condición para evaluar la capacidad citotóxica de los macrófagos activados frente a células tumorales. Para ello, se realizó un co-cultivo con la línea A549 durante 24 horas (Figura 33).

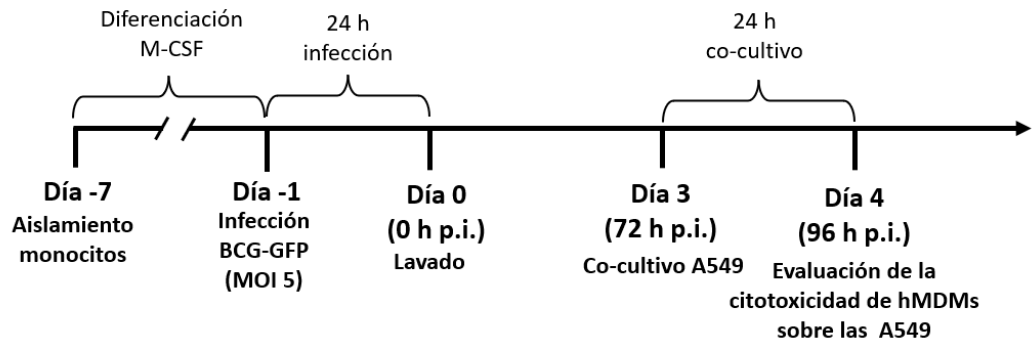


Figura 33: Diagrama experimental para la evaluación de citotoxicidad de los hMDMs activados con BCG sobre las A549.

Se realizaron análisis por microscopia óptica para evaluar el aspecto morfológico de los co-cultivos entre hMDMs y células A549 (Figura X). Aunque no fue posible distinguir con claridad a las células A549 debido a su morfología similar y al contacto estrecho con los macrófagos, se observaron diferencias en la organización de los hMDMs según la condición experimental. En la condición infectada (MOI 5) se evidenció una mayor tendencia a formar agregados celulares, en comparación con la condición NI donde las células se encuentran más dispersas.

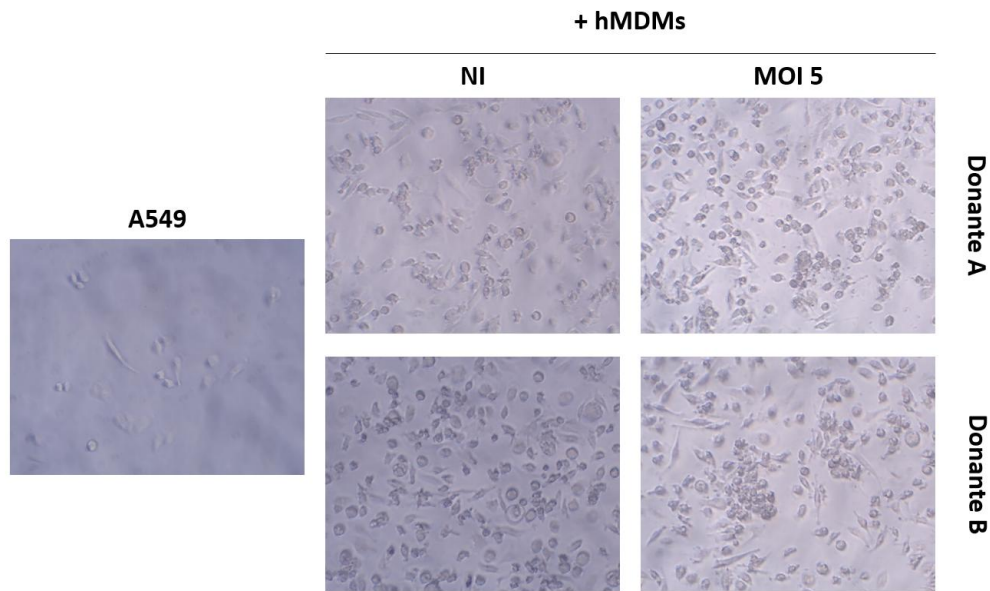


Figura 34: Imágenes representativas del co-cultivo de hMDMs con células A549 durante 24 h. Se muestran condiciones no infectadas (NI) e infectadas con BCG-GFP a MOI 5, correspondientes a dos donantes distintos.

Por otro lado, el análisis mediante citometría de flujo reveló que se redujo significativamente el número de células A549 (células CD14⁺) (Figura 35.A) cuando los hMDMs habían sido previamente infectados con BCG (MOI 5) en comparación con los hMDMs NI, lo que sugiere una posible actividad antitumoral inducida

por la infección. Aunque se observó una tendencia a un mayor porcentaje de células A549 no viables (células LIVE/DEAD-Violet⁺) en el grupo infectado (MOI 5), las diferencias no alcanzaron significación estadística frente al control NI (Figura 35.B). No obstante, esta tendencia fue mucho más marcada en uno de los donantes empleados. Cuando se evaluó la relación entre la intensidad de infección de los hMDMs (MFI de GFP) y la citotoxicidad ejercida (porcentaje de A549 LIVE/DEAD-Violet⁺) (Figura 35.C), se observó una clara tendencia positiva, indicando que una mayor carga infecciosa se podría asociar con un efecto citotóxico más marcado.

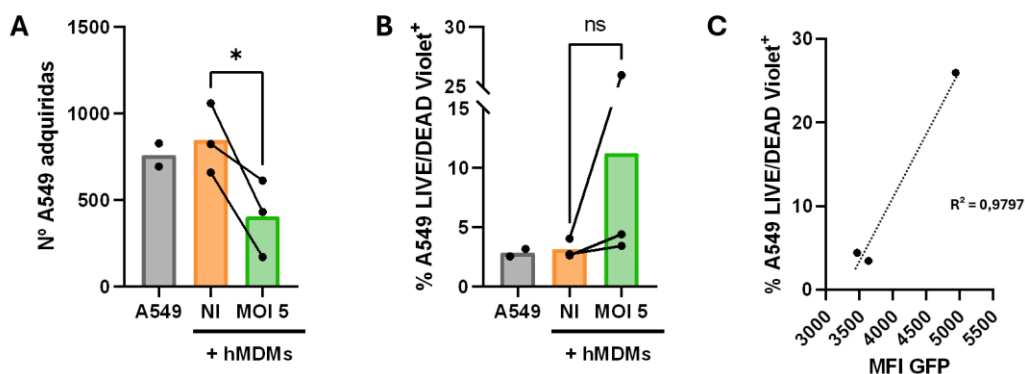


Figura 35: Evaluación de la actividad citotóxica de los hMDMs activados con BCG frente a células A549. Diagramas de barras representativos de (A) Número total de células A549 recuperadas y (B) porcentaje de células no viables (FL9⁺) tras 24 h de co-cultivo con hMDMs no infectados (NI) o infectados con BCG (MOI 5). Las barras muestran la media de tres experimentos independientes, representados mediante puntos conectados por líneas. (C) Correlación entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) de GFP en hMDMs y el porcentaje de células A549 FL9⁺, correspondiente al grupo MOI 5. El análisis estadístico se realizó mediante un test t pareado (A y B) y con el coeficiente de correlación de Pearson (C); ns, no significativo; *, $p < 0,05$.

7. Discusión

El bacilo de Calmette-Guerin (BCG) ha demostrado una notable eficacia clínica como inmunoterapia en el carcinoma urotelial no músculo-invasivo¹⁰⁵ lo que ha provocado el interés en su capacidad de modular la respuesta inmune innata, en particular en macrófagos. En este contexto, el presente estudio se propuso caracterizar el impacto de la infección con BCG sobre macrófagos humanos, con énfasis en su polarización fenotípica funcional hacia fenotipos M1/M2 y la evaluación de su potencial citotóxico frente a células tumorales, como paso preliminar hacia su aplicación como terapia antitumoral. La hipótesis inicial era que, tras la infección con BCG, las células mostrarían un aumento sostenido de marcadores M1 y una producción prolongada de TNF- α debido a que se activarían las vías de señalización a través del reconocimiento por parte de los TLRs⁹².

En primera instancia, se utilizó la línea monocítica THP-1 para establecer un modelo *in vitro* reproducible de diferenciación a macrófagos mediante estimulación con PMA. Nuestros resultados confirmaron que más del 50% de las células THP-1 se infectaron desde 0 p.i. y que esta proporción se mantuvo estable hasta las 72 h p.i., lo que indica que la línea inmortalizada THP-1 es un modelo adecuado para estudiar la entrada y persistencia intracelular de BCG en condiciones controladas de cultivo. Esta estabilidad en la infección puede explicarse por la atenuación de BCG, que le impide escapar del fagosoma y propagar la infección a nuevas células¹¹². No obstante, al analizar la polarización tras la infección, no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión de los marcadores de superficie evaluados, HLA-DR (M1) y CD206 (M2). Esta ausencia de respuesta puede estar relacionada con las limitaciones intrínsecas de las células THP-1. Su origen tumoral podría condicionar respuestas diferentes frente a estímulos inmunológicos en comparación con las células somáticas primarias en su entorno natural y no se puede simplemente asumir que las características fenotípicas, moleculares y funcionales de las THP-1 tras su diferenciación son necesariamente equivalentes a los de los hMDMs¹¹³. Además, en diversos estudios se ha demostrado que la diferenciación inducida por PMA genera un grado de activación variable, con morfología y expresión de receptores de superficie que difieren entre estudios y las condiciones experimentales, lo que crea dificultades a la hora de comparar los resultados de diferentes fenotipos celulares¹¹⁴. En este sentido, múltiples investigaciones han cuestionado la capacidad real de las THP-1 diferenciadas por PMA para polarizarse funcionalmente, señalando que los resultados pueden depender significativamente de otros factores como el medio de cultivo, tipo de placa o duración del tratamiento¹¹⁵. Un ejemplo es el marcador CD206 cuya expresión es inconsistente y altamente dependiente de estos factores¹¹⁶⁻¹¹⁸, lo que refuerza la conclusión de que esta línea no es adecuada para estudios detallados de polarización a través de la evaluación de marcadores de superficie. La dinámica de citoquinas también refleja esta respuesta limitada. Se detectó un aumento inicial de TNF- α inmediatamente tras la infección (0 h p.i.), consistente con su perfil como citoquina de secreción temprana, pero los niveles descendieron a las 72 h p.i. hasta valores comparables con las células no infectadas. Este patrón es congruente con observaciones previas en las que la estimulación de líneas celulares con agonistas de TLRs o bacterias atenuadas produce un pico transitorio de citoquinas seguido por una fase de tolerancia¹¹⁹. Por tanto, aunque el modelo THP-1 resultó útil para verificar la

infectividad de BCG, su incapacidad para mantener una respuesta inflamatoria sostenida y expresar adecuadamente marcadores de superficie fenotípicos limita su aplicabilidad para evaluar la funcionalidad inmunoterapéutica de macrófagos activados por BCG.

En contraste, los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (hMDMs) ofrecieron un modelo experimental más relevante fisiológicamente. Las dos MOIs evaluadas (1 y 5) resultaron en una elevada proporción de hMDMs infectados (> 60%), lo cual constituye una ventaja significativa en el contexto de su posible aplicación como terapia celular, ya que resulta imprescindible alcanzar una población celular lo más homogénea posible, es decir, que la mayoría de las células estén infectadas. Sin embargo, solo en los hMDMs infectados con MOI 5 (y no en aquellos infectados con MOI 1) se observó un aumento significativo a las 72 h p.i. en la expresión del marcador M1 CD40 y una reducción clara en el marcador M2 CD163, lo que sugiere una polarización hacia un fenotipo M1. CD40 es un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF el cual reconoce a CD40L (marcador de superficie que se encuentra principalmente en linfocitos T CD4⁺)^{120,121}. Esta unión desencadena varios eventos moleculares, incluida la activación de NF- κ B, lo que desencadena la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α ^{120,121}. Aunque los niveles de HLA-DR no mostraron diferencias significativas, el mantenimiento de la expresión también es importante, ya que indica que los hMDMs conservan su capacidad de presentación antigénica, fundamental para una respuesta adaptativa eficiente¹²². Cabe mencionar que, para todos los marcadores, independientemente del perfil exhibido, se observaron tendencias individuales atribuibles a la variabilidad interdonante. Esta heterogeneidad puede deberse a diferencias epigenéticas, exposiciones ambientales previas o al entrenamiento inmunológico del huésped¹²³.

Este perfil proinflamatorio se vio respaldado por un aumento significativo en la secreción de TNF- α a las 72 h p.i. Esta citoquina producida principalmente tras la activación de TLR2/4 por componentes de la envuelta bacteriana de BCG^{94,99,124}, lo que refuerza la idea de un fenotipo activado con potencial inmunoterapéutico. Notablemente, las células infectadas con MOI 5 mostraron una MFI de GFP significativamente mayor a las 72 h p.i., lo que sugiere una carga bacteriana aumentada, posiblemente responsable de una activación más robusta vía PRRs. Pese a que estos resultados sugerían que un aumento de la MOI podría tener un mayor impacto sobre la polarización de las células, la evaluación de la viabilidad mostró que la infección con MOI 20 tendía a inducir la muerte celular, mientras que la MOI 5 no comprometió significativamente la supervivencia de los hMDMs. Por lo tanto, esta condición se estableció como óptima para mantener un equilibrio entre activación y viabilidad. Este aspecto es importante si se pretende emplear estos macrófagos como terapia celular adoptiva, ya que es imperativo contar con células viables y funcionales, que no solo resistan a la infección, sino que mantengan su capacidad efectora antitumoral o proinflamatoria.

En línea con ello, la disminución significativa en el número total de células tumorales viables tras el co-cultivo con hMDMs activados con BCG refuerza el potencial de estos macrófagos como agentes terapéuticos con actividad antitumoral. Estos resultados podrían deberse a los distintos mecanismos efectores mediados por los hMDMs activados, por ejemplo, la liberación de TNF- α , citoquina capaz de

inducir apoptosis en células tumorales a través de la vía extrínseca; la generación de ROS o RNS como el NO que puede causar daño directo al ADN o estrés oxidativo en las células tumorales, entre otros⁵⁰.

A pesar de los hallazgos prometedores, este trabajo presenta limitaciones relevantes. En primer lugar, el número de donantes analizados fue limitado, lo que pudo restringir el poder estadístico. La variabilidad interdonante observada en los hMDMs afectó notablemente a la expresión de marcadores y niveles de citoquinas, dificultando la generalización de los resultados, lo que sugiere la necesidad de ampliar el tamaño muestral. En segundo lugar, la cantidad limitada de células disponibles por donante restringió el número de condiciones experimentales que pudieron ser ensayadas. Si bien se analizaron marcadores de superficie relevantes para los fenotipos M1 y M2 (CD40, CD80, HLA-DR y CD163), la caracterización inmunofenotípica puede considerarse limitada por no incluir otros marcadores adicionales como CCR7, CD86 o TLRs, cuya evaluación permitiría una definición más robusta del estado funcional de los macrófagos. De manera similar, aunque se cuantificó TNF- α como citoquina proinflamatoria principal, la inclusión de otras citoquinas relevantes del perfil M1 como IL-6 o IL-12 habría enriquecido la caracterización funcional. Finalmente, todos los experimentos se realizaron *in vitro*, sin embargo, para validar el potencial clínico de los B-MACs es imprescindible evaluarlos en modelos *in vivo* de cáncer que permitan evaluar no solo su eficacia antitumoral sino también su capacidad para infiltrarse en el tumor, para modular el TME e interactuar con otras células del sistema inmune.

Por último, a partir de los resultados obtenidos, se abren diversas posibilidades de investigación que permitirían avanzar en la comprensión y potencial aplicación clínica de los B-MACs como agentes inmunoterapéuticos. En primer lugar, se propone ampliar la caracterización funcional profundizando en el perfil de citoquinas y de marcadores de superficie, con el objetivo de consolidar la definición inmunofenotípica de los B-MACs y mejorar su discriminación frente a otros estados funcionales. Mas importante aún, sería caracterizar en profundidad los mecanismos responsables de la citotoxicidad ejercida por los B-MACs sobre las células tumorales. En segundo lugar, sería esencial evaluar su capacidad de presentación antigénica y de interacción con otras células del SI adaptativo, como los linfocitos T CD4+ y CD8+, o con células del SI innato, como las NK, mediante ensayos de co-cultivo. Esta aproximación permitiría determinar si los B-MACs no solo ejercen funciones efectoras innatas, sino que también pueden actuar como adyuvantes celulares en la activación de otras células del SI. En tercer lugar, para evitar la limitación de las células obtenidas a partir de los monocitos circulantes de sangre periférica, se propone realizar la diferenciación a partir de precursores mieloides presentes en sangre periférica, ya que así el número de células será ilimitado¹²⁵. También se propone explorar la combinación de polarización *ex vivo* con estrategias de ingeniería genética como la generación de CAR-M, con el fin de dotar a los B-MACs especificidad tumoral, mejorando su capacidad de infiltración en tejidos neoplásicos. Por último, será necesario validar la funcionalidad y seguridad de los B-MACs en modelos *in vivo* relevantes, como ratones inmunodeficientes con xenoinjertos tumorales humanos (con SI humano), que permitan evaluar de forma integrada la infiltración de los macrófagos en el tumor, la modulación del TME, la activación del SI adaptativo y la eficacia antitumoral en condiciones fisiológicas complejas. Asimismo, sería de gran interés estudiar la posible sinergia con inmunoterapias ya aprobadas, como los ICIs (anti-PD-1/ PD-L1).

8. Conclusiones:

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- I. La línea celular THP-1 diferenciada con PMA fue eficazmente infectada por BCG-GFP, pero no mostró una modificación significativa en la expresión de marcadores de polarización M1/M2.
- II. Los hMDMs, mostraron una clara polarización hacia un fenotipo M1 tras la infección por BCG, evidenciado por el aumento de marcadores de superficie característicos y la secreción significativa de TNF- α .
- III. Los B-MACs (hMDMs activados con BCG) demostraron capacidad citotóxica frente a células tumorales A549 *in vitro*, sugiriendo un potencial papel antitumoral directo que podría estar mediado por citoquinas inflamatorias.
- IV. La infección con BCG no indujo una alta muerte celular en los hMDMs, lo que indica que la activación no compromete su viabilidad, un aspecto positivo para su uso potencial en inmunoterapia adoptiva.

En conjunto, los resultados apoyan el uso de BCG como agente reprogramador de macrófagos hacia un fenotipo funcionalmente activo (M1) con propiedades antitumorales, posicionando a los B-MACs como posibles candidatos en estrategias de inmunoterapia celular frente a cánceres sólidos.

9. Conclusions:

Based on the results obtained in this study, the following conclusions can be drawn:

- I. The THP-1 cell line differentiated with PMA was efficiently infected by BCG-GFP but did not show a significant change in the expression of M1/M2 polarization markers.
- II. hMDMs showed a clear polarization toward an M1 phenotype after BCG infection, as evidenced by the increased expression of characteristic surface markers and significant TNF- α secretion.
- III. B-MACs (hMDMs activated with BCG) demonstrated cytotoxic activity against A549 tumor cells *in vitro*, suggesting a potential direct antitumor role that may be mediated by inflammatory cytokines.
- IV. BCG infection did not induce high levels of cell death in hMDMs, indicating that activation does not compromise their viability, which is a favorable aspect for their potential use in adoptive immunotherapy.

Overall, the results support the use of BCG as a macrophage reprogramming agent toward a functionally active (M1) phenotype with antitumor properties, positioning B-MACs as potential candidates for cellular immunotherapy strategies against tumors.

10. Bibliografía:

1. Molnar Charles & Gair Jane. El cáncer y el ciclo celular – Conceptos de biología – Primera edición canadiense. <https://opentextbc.ca/biology/chapter/6-3-cancer-and-the-cell-cycle/> (2015).
2. Medina Villaseñor, E. & Martínez Macías, R. *Fundamentos-Oncología-Unam*.
3. Pérez-Cabeza De Vaca, R., Cárdenas-Cárdenas, E., Mondragón-Terán, P., Argentina, A. & Solís, E.-V. *Biología Molecular Del Cáncer y Las Nuevas Herramientas En Oncología. Rev Esp Méd Quir* vol. 22 (2017).
4. Fedewa, S. A., Sauer, A. G., Siegel, R. L. & Jemal, A. Prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **24**, 637–52 (2015).
5. Podolskiy, D. I. & Gladyshev, V. N. Intrinsic Versus Extrinsic Cancer Risk Factors and Aging. *Trends Mol Med* **22**, 833–834 (2016).
6. Enfermedades no transmisibles. <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/MDB/noncommunicable-diseases>.
7. *Las Cifras Del Cáncer En España*. (2024).
8. Sauer, A. G., Siegel, R. L., Jemal, A. & Fedewa, S. A. Updated review of prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **26**, 1192–1208 (2017).
9. Sung, H. *et al*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
10. Ramirez, R. N. *et al*. Dynamic Gene Regulatory Networks of Human Myeloid Differentiation. *Cell Syst* **4**, 416-429.e3 (2017).
11. Abbas, A., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. vol. 9th Edition (2017).
12. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H. L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **14**, 49 (2018).
13. Mehta, H. M. & Corey, S. J. G-CSF, the guardian of granulopoiesis. *Semin Immunol* **54**, 101515 (2021).
14. Wolf, A. A., Yáñez, A., Barman, P. K. & Goodridge, H. S. The Ontogeny of Monocyte Subsets. *Front Immunol* **10**, (2019).
15. Balan, S., Saxena, M. & Bhardwaj, N. Dendritic cell subsets and locations. in 1–68 (2019). doi:10.1016/bs.ircmb.2019.07.004.
16. Mekori, Y. A. The mastocyte: the “other” inflammatory cell in immunopathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**, 52–57 (2004).
17. Locati, M., Curtale, G. & Mantovani, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of*

- Pathology: Mechanisms of Disease* **15**, 123–147 (2020).
18. Bowdish, D. M. E., Loffredo, M. S., Mukhopadhyay, S., Mantovani, A. & Gordon, S. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. *Microbes Infect* **9**, 1680–1687 (2007).
 19. Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A. C. & Schultze, J. L. The Myeloid Cell Compartment—Cell by Cell. *Annu Rev Immunol* **37**, 269–293 (2019).
 20. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C. & Mandelboim, O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* **34**, 182–191 (2013).
 21. Myers, J. A. & Miller, J. S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 85–100 (2021).
 22. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S3–S23 (2010).
 23. Chi, H., Pepper, M. & Thomas, P. G. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell* **187**, 2052–2078 (2024).
 24. Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 137–154 (2016).
 25. Wik, J. A. & Skålhegg, B. S. T Cell Metabolism in Infection. *Front Immunol* **13**, (2022).
 26. LAROSA, D. & ORANGE, J. 1. Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, S364–S369 (2008).
 27. Burnet, F. M. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* **7**, 3–25 (1971).
 28. Gubin, M. M. & Vesely, M. D. Cancer Immunoediting in the Era of Immunooncology. *Clin Cancer Res* **28**, 3917–3928 (2022).
 29. Ercilla-Rodríguez, P. *et al.* CAR-T lymphocyte-based cell therapies; mechanistic substantiation, applications and biosafety enhancement with suicide genes: new opportunities to melt side effects. *Front Immunol* **15**, (2024).
 30. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
 31. Chen, Y. *et al.* Nab-paclitaxel promotes the cancer-immunity cycle as a potential immunomodulator. *Am J Cancer Res* **11**, 3445–3460 (2021).
 32. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. & Huber, M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **62**, 449–58 (2014).
 33. Durgeau, A., Virk, Y., Cognac, S. & Mami-Chouaib, F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **9**, 14 (2018).
 34. Met, Ö., Jensen, K. M., Chamberlain, C. A., Donia, M. & Svane, I. M. Principles of

- adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol* **41**, 49–58 (2019).
35. Orange, M., Reuter, U. & Hobohm, U. Coley's Lessons Remembered: Augmenting Mistletoe Therapy. *Integr Cancer Ther* **15**, 502–511 (2016).
 36. Burdick, C. G. WILLIAM BRADLEY COLEY 1862-1936. *Ann Surg* **105**, 152–5 (1937).
 37. Zhang, Y. & Zhang, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol* **17**, 807–821 (2020).
 38. Dobosz, P. & Dzieciatkowski, T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **10**, (2019).
 39. Poorebrahim, M. *et al.* Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Crit Rev Clin Lab Sci* **56**, 393–419 (2019).
 40. Chitu, V. & Stanley, E. R. Regulation of Embryonic and Postnatal Development by the CSF-1 Receptor. in 229–275 (2017). doi:10.1016/bs.ctdb.2016.10.004.
 41. Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
 42. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762–774 (2011).
 43. DeNardo, D. G. & Ruffell, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **19**, 369–382 (2019).
 44. Zhu, S., Yi, M., Wu, Y., Dong, B. & Wu, K. Roles of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications on therapeutic strategies. *Exp Hematol Oncol* **10**, 60 (2021).
 45. T'Jonck, W., Guilliams, M. & Bonnardel, J. Niche signals and transcription factors involved in tissue-resident macrophage development. *Cell Immunol* **330**, 43–53 (2018).
 46. Luo, M., Zhao, F., Cheng, H., Su, M. & Wang, Y. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. *Front Immunol* **15**, (2024).
 47. Xia, T. *et al.* Advances in the study of macrophage polarization in inflammatory immune skin diseases. *J Inflamm* **20**, 33 (2023).
 48. Yi, M. *et al.* Exploiting innate immunity for cancer immunotherapy. *Mol Cancer* **22**, 187 (2023).
 49. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, (2014).
 50. Cendrowicz, E., Sas, Z., Bremer, E. & Rygiel, T. P. The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy. *Cancers (Basel)* **13**, 1946 (2021).
 51. Pesce, J. T. *et al.* Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–

Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog* **5**, e1000371 (2009).

52. MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555 (2002).
53. Shimizu, K., Iyoda, T., Okada, M., Yamasaki, S. & Fujii, S. Immune suppression and reversal of the suppressive tumor microenvironment. *Int Immunol* **30**, 445–455 (2018).
54. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* **5**, (2014).
55. Lu, J. *et al.* CAR Macrophages: a promising novel immunotherapy for solid tumors and beyond. *Biomark Res* **12**, 86 (2024).
56. Rannikko, J. H. & Hollmén, M. Clinical landscape of macrophage-reprogramming cancer immunotherapies. *Br J Cancer* **131**, 627–640 (2024).
57. Na, Y. R., Kim, S. W. & Seok, S. H. A new era of macrophage-based cell therapy. *Exp Mol Med* **55**, 1945–1954 (2023).
58. McCall, K. D., Muccioli, M. & Benencia, F. Toll-Like Receptors Signaling in the Tumor Microenvironment. in 81–97 (2020). doi:10.1007/978-3-030-35582-1_5.
59. Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. & Fitzgerald, K. A. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses* **3**, 920–940 (2011).
60. Schultze, J. L., Freeman, T., Hume, D. A. & Latz, E. A transcriptional perspective on human macrophage biology. *Semin Immunol* **27**, 44–50 (2015).
61. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
62. Aluri, J., Cooper, M. A. & Schuettpeitz, L. G. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. *Cells* **10**, 1374 (2021).
63. Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y. & Wang, R.-F. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* **13**, (2022).
64. Netea, M. G., Quintin, J. & van der Meer, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–361 (2011).
65. Fang, X., Li, Z., Liu, C., Mor, G. & Liao, A. Macrophage memory: Types, mechanisms, and its role in health and disease. *Immunology* **171**, 18–30 (2024).
66. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* **20**, 375–388 (2020).
67. Arts, R. J. W. *et al.* Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep* **17**, 2562–2571 (2016).
68. Jacobo-Delgado, Y. M., Rodríguez-Carlos, A., Serrano, C. J. & Rivas-Santiago, B.

- Mycobacterium tuberculosis cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? *Front Immunol* **14**, (2023).
69. Singh, G., Kumar, A., Maan, P. & Kaur, J. Cell Wall Associated Factors of Mycobacterium tuberculosis as Major Virulence Determinants: Current Perspectives in Drugs Discovery and Design. *Curr Drug Targets* **18**, (2017).
 70. Ferluga, J., Yasmin, H., Al-Ahdal, M. N., Bhakta, S. & Kishore, U. Natural and trained innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Immunobiology* **225**, 151951 (2020).
 71. Ghazaei, C. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J Res Med Sci* **23**, 63 (2018).
 72. Daffé, M. & Marrakchi, H. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
 73. Fitzgerald, K. A. & Kagan, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **180**, 1044–1066 (2020).
 74. Martin, C., Aguilo, N. & Gonzalo-Asensio, J. Vacunación frente a tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **36**, 648–656 (2018).
 75. Oettinger, T., Jørgensen, M., Ladefoged, A., Hasløv, K. & Andersen, P. Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and Lung Disease* **79**, 243–250 (1999).
 76. Kaufmann, S. H. E., Weiner, J. & von Reyn, C. F. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases* **56**, 263–267 (2017).
 77. Behr, M. A. BCG — different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* **2**, 86–92 (2002).
 78. Lange, C. *et al.* 100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin. *Lancet Infect Dis* **22**, e2–e12 (2022).
 79. Boehm, B. E. *et al.* Efficacy of bacillus Calmette-Guérin Strains for Treatment of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Journal of Urology* **198**, 503–510 (2017).
 80. Brosch, R. *et al.* Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5596–5601 (2007).
 81. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**, 709–717 (2002).
 82. Wong, K.-W. The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
 83. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and

- Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**, 709–717 (2002).
84. van der Wel, N. *et al.* M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* **129**, 1287–1298 (2007).
 85. Tiwari, S., Casey, R., Goulding, C. W., Hingley-Wilson, S. & Jacobs, W. R. Infect and Inject: How Mycobacterium tuberculosis Exploits Its Major Virulence-Associated Type VII Secretion System, ESX-1. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
 86. Passos, B. B. S., Araújo-Pereira, M., Vinhaes, C. L., Amaral, E. P. & Andrade, B. B. The role of ESAT-6 in tuberculosis immunopathology. *Front Immunol* **15**, (2024).
 87. Essential Programme on Immunization.
 88. Fine, P. E. M., Carneiro, I. A. M., Milstien, J. B. & Clements, C. J. *DEPARTMENT OF VACCINES AND BIOLOGICALS Issues Relating to the Use of BCG in Immunization Programmes A Discussion Document*. World Health Organization Geneva www.who.int/gpv-documents/ (1999).
 89. Zwerling, A. *et al.* The BCG World Atlas: A Database of Global BCG Vaccination Policies and Practices. *PLoS Med* **8**, e1001012 (2011).
 90. Pearl, R. On the Pathological Relations Between Cancer and Tuberculosis. *Exp Biol Med* **26**, 73–75 (1928).
 91. Pearl, R. Cancer and Tuberculosis. *Am J Epidemiol* **9**, 97–159 (1929).
 92. Kondratyeva, L. G. *et al.* The Cellular and Transcriptomic Early Innate Immune Response to BCG Vaccination in Mice. *Cells* **13**, 2043 (2024).
 93. Dobruch, J. & Oszczudłowski, M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina (Kaunas)* **57**, (2021).
 94. Manzanilla-García, H., Maldonado-Ávila, M., Aguilar-Barradas, J. & Lira-Dale, A. Inmunoterapia con el bacilo de Calmette-Guérin en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga. *Rev Mex Urol* **69**, 307–313 (1963).
 95. Cardillo, F. *et al.* Bacillus Calmette–Guérin Immunotherapy for Cancer. *Vaccines (Basel)* **9**, 439 (2021).
 96. Dobruch, J. & Oszczudłowski, M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina (B Aires)* **57**, 749 (2021).
 97. Nogueira march, J. L. *et al.* Indicaciones de la bcg en los tumores superficiales de vejiga. *Actas Urol Esp* **23**, 643–656 (1999).
 98. Han, J., Gu, X., Li, Y. & Wu, Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **129**, 110393 (2020).
 99. Darieva, Z., Lasunskiaia, E. B., Campos, M. N., Kipnis, T. L. & da Silva, W. D. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and c-Jun-N-terminal kinase cascades enhances NF-κB-dependent gene transcription in BCG-stimulated macrophages through

- promotion of p65/p300 binding. *J Leukoc Biol* **75**, 689–697 (2004).
100. IKEDA, N., TOIDA, I., IWASAKI, A., KAWAI, K. & AKAZA, H. Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guérin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *International Journal of Urology* **9**, 29–35 (2002).
 101. Gandhi, N. M., Morales, A. & Lamm, D. L. Bacillus Calmette- Guérin immunotherapy for genitourinary cancer. *BJU Int* **112**, 288–297 (2013).
 102. Kamat, A. M. *et al.* Cytokine Panel for Response to Intravesical Therapy (CyPRIT): Nomogram of Changes in Urinary Cytokine Levels Predicts Patient Response to Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol* **69**, 197–200 (2016).
 103. Han, J., Gu, X., Li, Y. & Wu, Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **129**, 110393 (2020).
 104. Green, J., Fuge, O., Allchorne, P. & Vasdev, N. Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol* **65** (2015) doi:10.2147/RRU.S63447.
 105. Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. & Bochner, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat Rev Urol* **11**, 153–162 (2014).
 106. Brandau, S. & Suttman, H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: A success story with room for improvement. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **61**, 299–305 (2007).
 107. Martínez-López, M. F. *et al.* Macrophages directly kill bladder cancer cells through TNF signaling as an early response to BCG therapy. *Dis Model Mech* **17**, (2024).
 108. Moreo, E. *et al.* Intravenous administration of BCG in mice promotes natural killer and T cell-mediated antitumor immunity in the lung. *Nat Commun* **14**, 6090 (2023).
 109. Kanno, A. I. *et al.* New Recombinant Mycobacterium bovis BCG Expression Vectors: Improving Genetic Control over Mycobacterial Promoters. *Appl Environ Microbiol* **82**, 2240–2246 (2016).
 110. Asadian, M., Hassanzadeh, S. M., Safarchi, A. & Douraghi, M. Genomic characteristics of two most widely used BCG vaccine strains: Danish 1331 and Pasteur 1173P2. *BMC Genomics* **23**, 609 (2022).
 111. Floreada.io. <https://floreada.io/>.
 112. Aguilo, J. I. *et al.* ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol* **15**, 1994–2005 (2013).
 113. Tedesco, S. *et al.* Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol* **9**, 71 (2018).

114. Shiratori, H. *et al.* THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol* **88**, 58–68 (2017).
115. Tedesco, S. *et al.* Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol* **9**, 71 (2018).
116. SHAO, L.-N. *et al.* Effects of autophagy regulation of tumor-associated macrophages on radiosensitivity of colorectal cancer cells. *Mol Med Rep* **13**, 2661–2670 (2016).
117. Soldano, S. *et al.* Alternatively Activated (M2) Macrophage Phenotype Is Inducible by Endothelin-1 in Cultured Human Macrophages. *PLoS One* **11**, e0166433 (2016).
118. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**, e8668 (2010).
119. Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **20**, 87–103 (2010).
120. Zhou, Y., Richmond, A. & Yan, C. Harnessing the potential of CD40 agonism in cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **75**, 40–56 (2024).
121. Liu, P.-S. *et al.* CD40 signal rewires fatty acid and glutamine metabolism for stimulating macrophage anti-tumorigenic functions. *Nat Immunol* **24**, 452–462 (2023).
122. Bertho, N. *et al.* HLA-DR mediated cell death is associated with, but not induced by TNF- α secretion in APC. *Hum Immunol* **62**, 106–112 (2001).
123. Williams, H. *et al.* Monocyte Differentiation and Heterogeneity: Inter-Subset and Interindividual Differences. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
124. Ferluga, J., Yasmin, H., Al-Ahdal, M. N., Bhakta, S. & Kishore, U. Natural and trained innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Immunobiology* **225**, 151951 (2020).
125. Wilgenburg, B. van, Browne, C., Vowles, J. & Cowley, S. A. Efficient, Long Term Production of Monocyte-Derived Macrophages from Human Pluripotent Stem Cells under Partly-Defined and Fully-Defined Conditions. *PLoS One* **8**, e71098 (2013).
126. Kadomoto, S., Izumi, K. & Mizokami, A. Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci* **23**, 144 (2021).
127. Elshabrawy, H. A., Essani, A. E., Szekanecz, Z., Fox, D. A. & Shahrara, S. TLRs, future potential therapeutic targets for RA. *Autoimmun Rev* **16**, 103–113 (2017).

128. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
129. FluoroFinder Experiment Design Platform.
<https://fluorofinder.com/>.

Anexos:

Anexo A: Caracterización de los Macrófagos M1 y M2 ¹²⁶

		M1	M2
Estimulación		IFN- γ , TNF- α , LPS, HMGB1	IL-4, IL-10, IL-13, AMP, GC
Marcadores	Superficie	CD36, CD80, CD86, MHC-II	CD163, CD206, CXCR1, CXCR2
	Intracelulares	iNOS, IRF5, STAT1	Arg1, IRF4, STAT6
Secreción	Citoquinas	IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF α	IL-10, TGF-B
	Factores de crecimiento	-	CSF-1, VEGF
	Quimiocinas	CXCL9, CXCL10, CXCL11	CCL17, CCL18, CCL22
Funciones		Proinflamatorios, protección contra infecciones, inmunidad antitumoral	Antiinflamatorios, reparación de tejidos, angiogénesis, inmunosupresión, protumorales

Anexo B: Expresión, ligandos y rutas de señalización de los TLRs humanos^{62,127}

TLRs localizados en la membrana plasmática				
Reconocen principalmente componentes de la membrana microbiana, como lípidos lipoproteínas y proteínas ⁶²				
TLR	PAMPs	DAMPs	Adaptador	Células que lo expresan
TLR1	Triacilgliceridos bacterianos, lipopeptidos	-	MyD88	Monocitos, mφ, LT, LB, NKs, DCs, PMN, fibroblastos y células epiteliales
TLR2	Lipopeptidos, lipopolisacaridos (LPS) de bacterias Gram positivas, ácido lipoteicoico, peptidoglicanos	Hsp60, Hsp70, HMGB1, fragmentos de ácido hialurónico (HA), lipoproteínas	MyD88	Monocitos, mφ, DCs, células epiteliales, mastocitos, neutrófilos.
TLR4	LPS de bacterias Gram negativas, proteínas de choque térmico.	HMGB1, Hsp60, Hsp70, fibrinógeno, fibronectina, sulfato de condroitina, ácido úrico	TRIF MyD88	mφ, DCs, células endoteliales, mastocitos, células epiteliales.
TLR5	Flagelina bacteriana.	-	MyD88	DCs, mφ, células epiteliales
TLR6	Diacilglicéridos bacterianos, lipopéptidos.	Diacilglicéridos, lípidos específicos de células dañadas	MyD88	Monocitos, mφ, DCs.
TLR10	Igual que TLR2	-	MyD88	LB, mφ, DCs.
TLRs localizados en estructuras membranosas citoplasmáticas				
Reconocen especialmente ácidos nucleicos o componentes intracelulares ^{61,62,128}				
TLR	PAMPs	DAMPs	Adaptador	Células que lo expresan
TLR3	ARN de doble cadena (virus)	ARN derivado de células necróticas	TRIF	DCs, mφ, células epiteliales.
TLR7	ARN monocatenario (virus), oligonucleotidos ricos en guanina y uracilo (GU)	ARN monocatenario endógeno liberado por células dañadas	MyD88	DCs plasmocitoides, LB, mφ.
TLR8	ARN monocatenario (virus, bacterias).	ARN monocatenario y productos de ARN degradado	MyD88	Monocitos, macrófagos, DCs mieloides, LB.
TLR9	ADN rico en secuencias CpG no metiladas (bacterias, virus).	ADN mitocondrial, ADN nuclear rico en CpG no metiladas	MyD88	DCs plasmocitoides, LB, macrófagos.

Células polimorfonucleares (PMN), Linfocitos B (LB), Linfocitos T (LT), Lipopolisacarido (LPS), Célula dendrítica (DC), macrófagos (mφ).

Anexo C: Espectros de excitación y emisión correspondientes a los fluorocromos empleados.

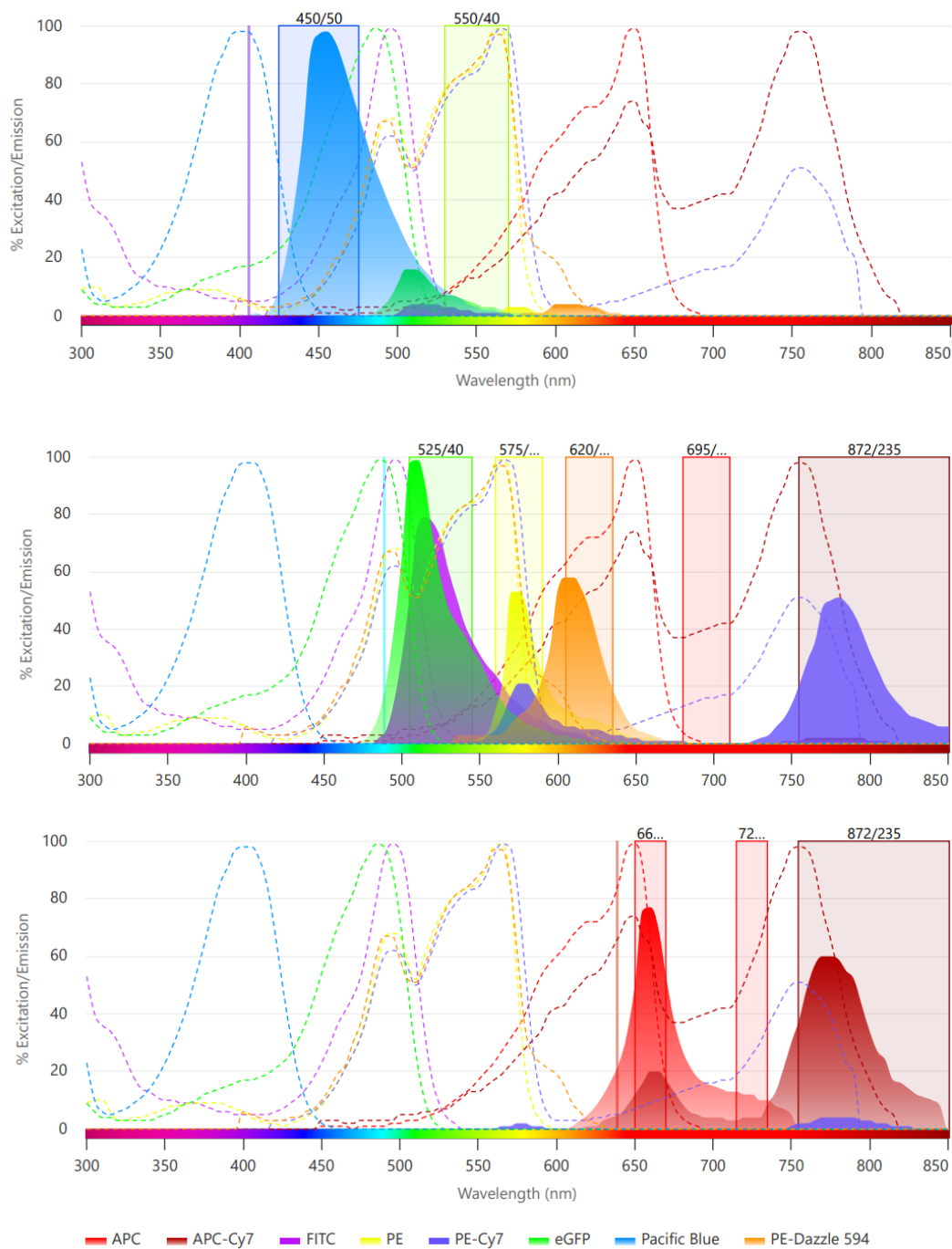


Figura 36. Espectros de excitación y emisión de los fluorocromos utilizados para la detección de los marcadores fenotípicos por citometría de flujo¹²⁹.