



Universidad
Zaragoza

Estudio del tráfico intracelular y presentación antigénica de la vacuna MTBVAC en macrófagos

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias

Autora:

Elena Mata Lozano

Directores:

Juan Ignacio Aguiló Anento
Carlos Martín Montañés

Grupo de Genética de Micobacterias
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina

2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Tuberculosis, una emergencia global.....	3
2.2 Vacunas contra la tuberculosis	3
2.2.1 BCG. La actual vacuna contra la tuberculosis	3
2.2.2 Nuevas vacunas contra la tuberculosis: MTBVAC	4
2.3 Respuesta inmune y mecanismos de evasión de <i>M. tuberculosis</i>	6
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Cultivo de micobacterias	12
4.2 Células eucariotas	13
4.2.1. Aislamiento y cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratón	13
4.2.2. Cultivo de células BB7	14
4.3 Infección de macrófagos derivados de médula ósea de ratón	14
4.4 Análisis del tráfico intracelular mediante microscopía confocal	15
4.5 Análisis de la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo	16
4.6 Ensayo de presentación antigénica	17
5. RESULTADOS	18
5.1 Estudio del tráfico intracelular de BCG y MTBVAC	18
5.2 Análisis de la activación de macrófagos infectados con BCG y MTBVAC	22
5.3 Estudio de la presentación antigénica de BCG y MTBVAC	25
6. DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIONES	36
8. BIBLIOGRAFÍA	38

1. RESUMEN

La falta de eficacia de la actual vacuna contra la tuberculosis, el bacilo de Calmette-Guérin o BCG, en proteger contra las formas respiratorias de la enfermedad y responsables de su transmisión, hace necesario el desarrollo de nuevas vacunas más eficaces que permitan reducir la incidencia de la tuberculosis, principalmente en países subdesarrollados.

El nuevo candidato a vacuna contra la tuberculosis –MTBVAC-, desarrollado en la Universidad de Zaragoza a partir de la atenuación de un asilado clínico de *Mycobacterium tuberculosis*, es la primera vacuna viva atenuada basada en *M. tuberculosis* en entrar en ensayos clínicos humanos, donde ha demostrado un alto grado de seguridad. Para el progreso de MTBVAC hacia ensayos clínicos de eficacia resulta crucial el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que le confieren mayor protección respecto a BCG, y que permitan el desarrollo de biomarcadores asociados a la protección de la vacuna.

El objetivo del presente trabajo es el estudio comparativo del tráfico intracelular de BCG y MTBVAC en macrófagos de ratón, y de cómo estas diferencias afectan a su capacidad para inducir una presentación antigénica eficaz que pueda correlacionarse con la diferente protección e inmunogenicidad *in vivo* de ambas vacunas.

El trabajo realizado se basa en el estudio del tráfico intracelular y la presentación antigénica en macrófagos derivados de médula ósea de ratón infectados con BCG o MTBVAC. En ellos se ha estudiado la colocación de las bacterias en compartimentos ácidos mediante microscopía confocal, y su capacidad de activar a las células que infectan a través del análisis de la expresión de distintos marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Finalmente, se ha optimizado un ensayo para estudiar la presentación antigénica de BCG y MTBVAC a través de la utilización de hibridomas T que reconocen específicamente un péptido inmunogénico derivado del antígeno mayor de *M. tuberculosis* Ag85B.

ABSTRACT

Due to the failure of the current tuberculosis vaccine, Bacille Calmette-Guerin or BCG, to protect against respiratory forms of the disease responsible for its transmission, it is needed to develop new and more effective tuberculosis vaccines able to reduce tuberculosis incidence, specially in developing countries.

The new vaccine candidate against tuberculosis –MTBVAC-, developed at the University of Zaragoza and based on rational attenuation of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate, is the first live-attenuated *M.tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials in humans, showing a high safety profile. To accelerate MTBVAC progress toward efficacy trials, it is crucial to know the immunological mechanisms that confer MTBVAC superior protection compared to BCG and to enable the development of biomarkers associated with vaccine protection.

The goal of this work is the comparative study of BCG and MTBVAC intracellular trafficking in mouse macrophages, and how these differences affect their ability to induce an effective antigen presentation. This could be correlated with differences in protection and immunogenicity induced *in vivo* by both vaccines.

This work is based on the study of intracellular trafficking and antigen presentation in murine bone marrow derived macrophages infected with BCG or MTBVAC. In these cells, colocalization of bacteria with acidic compartments was studied by confocal microscopy. The ability of mycobacteria to activate infected cells has been determined by analyzing the expression of different surface markers by flow cytometry. Finally, it has been developed an assay to study antigen presentation in BCG and MTBVAC through the use of a T hybridoma which specifically recognizes an immunogenic peptide from the *M. tuberculosis* major antigen Ag85B.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Tuberculosis, una emergencia global

La tuberculosis, junto al SIDA y la malaria, es actualmente una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad, principalmente en países subdesarrollados. Se estima que el bacilo de la tuberculosis infecta aproximadamente a un tercio de la población mundial causando alrededor de un millón y medio de muertes cada año. La aparición creciente de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB) a antibióticos, unido al deterioro de las infraestructuras de la salud pública en países subdesarrollados y al aumento de la incidencia del VIH, han contribuido a la expansión de la enfermedad, haciendo de la tuberculosis una emergencia global, tal como fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1993 [1].

Aunque en muchos casos la enfermedad puede ser controlada de forma efectiva mediante un tratamiento adecuado, éste implica la combinación de múltiples antibióticos durante largos periodos de tiempo, resultando inaccesible para muchos países. Además, su utilización inadecuada ha contribuido a la aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos. Por ello, la prevención a través de la vacunación resulta crucial para frenar la expansión de la enfermedad [2].

2.2 Vacunas contra la tuberculosis

2.2.1 BCG. La actual vacuna contra la tuberculosis

La actual y única vacuna en uso contra la tuberculosis, conocida como bacilo de Calmette-Guérin o BCG, es una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* obtenida a partir de un cultivo de la bacteria aislada de una vaca en 1904, y cultivada durante un periodo de 13 años con un total de 231 pasajes hasta la obtención de la actual vacuna. La base molecular de la atenuación de BCG como consecuencia de los sucesivos subcultivos de la bacteria es principalmente la pérdida de la región genómica RD1, que codifica la maquinaria necesaria para sintetizar y exportar el antígeno T

inmunodominante ESAT-6, uno de los principales factores implicados en la virulencia de *M. tuberculosis* [3].

La primera vacunación con BCG tuvo lugar en 1921 y desde 1974 la vacunación en niños está incluida en el programa de inmunización (EPI) de la organización mundial de la salud, dando como resultado unas 100 millones de vacunaciones por año.

BCG ha demostrado efectividad en reducir la incidencia de las formas severas de tuberculosis diseminada en niños (meningitis tuberculosa y tuberculosis miliar), pero su efectividad se reduce en la prevención de la expansión de la forma pulmonar, la manifestación más común de la enfermedad en adolescentes y adultos y principal fuente de expansión de la tuberculosis [1].

Por otra parte, la distribución mundial de BCG y los repetidos subcultivos de la bacteria en condiciones no estandarizadas han dado lugar a la aparición de diversas cepas bacterianas y a la acumulación de múltiples cambios moleculares, lo que hace que la respuesta inmune y la protección varíe entre las distintas cepas, incluso pudiendo llevar a la sobreatenuación de algunas de ellas, y reduciendo por tanto su inmunogenicidad [4].

2.2.2. Nuevas vacunas contra la tuberculosis: MTBVAC

A pesar de su extendido uso, la falta de eficacia de BCG en algunos aspectos, principalmente en la protección contra las formas respiratorias de la enfermedad, hace necesario el desarrollo de nuevas vacunas más eficaces contra la tuberculosis que permitan una mayor prevención de la transmisión y control de la enfermedad. Por ello, en la comunidad científica existe un esfuerzo global para el desarrollo de vacunas más efectivas que permitan, en combinación con regímenes de tratamientos adecuados, reducir la incidencia de la tuberculosis en las áreas endémicas [5,6].

MTBVAC es un candidato a vacuna viva atenuada contra la tuberculosis desarrollado en la Universidad de Zaragoza a partir de la atenuación de una cepa de *M. tuberculosis* aislada en humanos y modificada por ingeniería genética mediante la inactivación de genes clave en la virulencia de la bacteria. El desarrollo de una vacuna basada en la atenuación racional de *M. tuberculosis*, el patógeno causante de la

enfermedad en humanos, ofrece la ventaja de que en su genoma se conservan muchos genes que pueden ser importantes desde el punto de vista inmunológico para la interacción con el sistema inmune del huésped humano, con el que ha coevolucionado durante miles de años, mientras que en las subcepas de BCG derivadas de *M. bovis*, el patógeno causante de la tuberculosis en bovinos, muchos de estos genes están ausentes [7].

MTBVAC fue construida con el objetivo de cumplir los requerimientos del consenso de Ginebra para la entrada en ensayos clínicos humanos de nuevas vacunas basadas en micobacterias vivas. En él se requiere que los candidatos a vacuna basados en *M. tuberculosis* presenten dos mutaciones estables e independientes sin marcadores de resistencia a antibióticos, además de un perfil de seguridad y eficacia igual o superior al de BCG [8,9].

En el desarrollo de MTBVAC se partió del aislado clínico de *M. tuberculosis* MT103 para generar dos deleciones independientes sin marcadores de resistencia a antibióticos en los genes *phoP* y *fadD26* (figura 1) [7]. *PhoP* es un factor de transcripción clave en la regulación de la virulencia de *M. tuberculosis*, que forma parte del sistema de dos componentes PhoPR, el cual regula la transcripción de aproximadamente el 2% del genoma de *M. tuberculosis*, incluyendo genes implicados en mecanismos de virulencia, entre los que destaca la secreción de ESAT-6 [10,11]. Por otra parte, el gen *fadD26* es esencial en la síntesis del complejo de lípidos ftiocerol dimicocerostatos (PDIM), una familia de lípidos de superficie implicados en la virulencia de la micobacteria [12].

La cepa resultante MTBVAC muestra seguridad y perfiles de biodistribución similares a BCG y ha demostrado protección superior y mayor inmunogenicidad en los estudios preclínicos, convirtiéndose en la primera vacuna viva atenuada basada en *M. tuberculosis* en entrar en fases de ensayos clínicos [7,13,14]. La vacuna, producida por la empresa española Biofabri, ha superado con éxito la fase I de seguridad en humanos, representando un prometedor candidato para la sustitución de BCG [15].

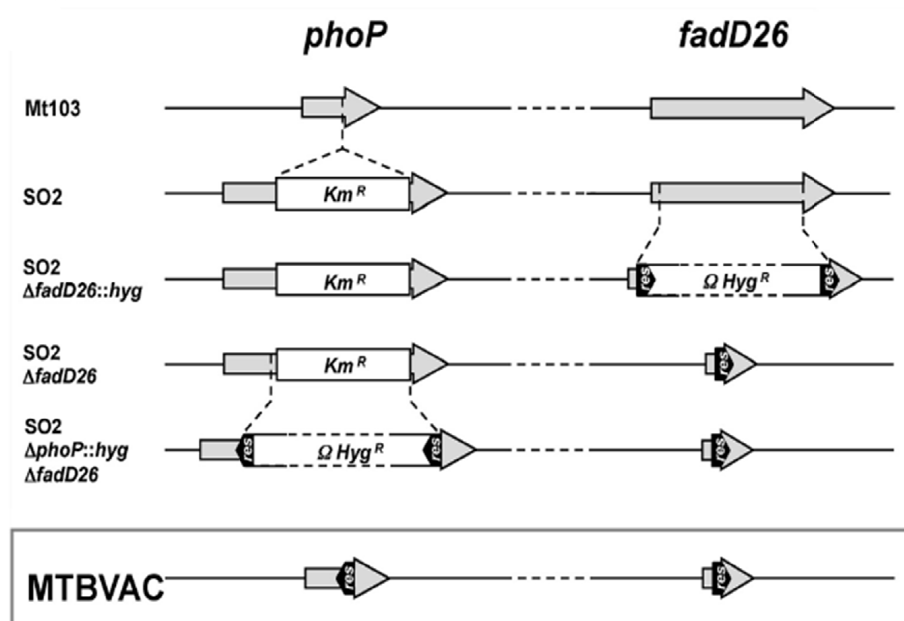


Figura 1. Pasos en la construcción del nuevo candidato a vacuna contra la tuberculosis: desde SO2 hasta MTBVAC [7]. La cepa SO2, construida previamente a partir del aislado clínico de *M. tuberculosis* MT103 mediante la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina en el gen *phoP*, fue modificada mediante ingeniería genética para generar deletiones independientes sin marcadores de resistencia a antibióticos en los genes *phoP* y *fadD26*, ambos implicados en la virulencia de la micobacteria.

2.3 Respuesta inmune y mecanismos de evasión de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis, la bacteria causante de la tuberculosis en humanos, se transmite principalmente por vía respiratoria, siendo los pulmones el primer órgano afectado.

La respuesta inmune generada frente a esta infección implica la acción de diversas células del sistema inmune, principalmente macrófagos, células dendríticas y células T CD4⁺ y CD8⁺, y de citoquinas como IFN γ y TNF α . La activación e interacción entre estas células da lugar a una reacción inflamatoria que puede acabar en la generación del granuloma, una estructura formada por agregados de macrófagos infectados rodeados de macrófagos activados que colaboran con células T y activan sus mecanismos bactericidas para la eliminación del patógeno. De esta forma, la estructura del granuloma permite mantener a la bacteria en estado latente y contener la infección, limitando su diseminación durante largos periodos de tiempo, de manera que sólo un 10% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad como consecuencia de la

infección primaria, mientras que en la mayoría de los casos la bacteria permanece en estado latente, pudiendo reactivarse en situaciones que comprometen la actividad del sistema inmune, como la infección por VIH, envejecimiento o malnutrición [16].

M. tuberculosis es un patógeno intracelular facultativo y su principal célula diana son los macrófagos. Esta bacteria ha desarrollado diferentes estrategias evolutivas que le permiten persistir en el ambiente hostil del interior celular y superar los mecanismos bactericidas de defensa de su célula diana [2,16].

Uno de los principales mecanismos de persistencia desarrollado por la micobacteria es la inhibición de la maduración y la acidificación del fagosoma [17]. Los fagosomas son compartimentos celulares que contienen en su interior las bacterias fagocitadas por los macrófagos. Durante su maduración, los fagosomas se fusionan con lisosomas, dando lugar al fagolisosoma, donde las bacterias son procesadas por diversas proteasas, como catepsinas, en un entorno ácido, lo que permite la eliminación de la bacteria y la generación de péptidos y lípidos para las vías de presentación antigénica. De este modo, los antígenos bacterianos son presentados a linfocitos T específicos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II o de clase I (MCH-II o MHC-I) en la superficie celular, generando la activación de las células T específicas CD4⁺ o CD8⁺ [18]. Sin embargo, *M. tuberculosis* ha desarrollado estrategias que detienen este proceso e impiden la maduración normal del fagosoma. La bacteria es capaz de bloquear la fusión del fagosoma con el lisosoma y de inhibir la acidificación fagosomal, lo cual está relacionado con la exclusión de la protón ATPasa vacuolar (v-ATPasa), crítica para la disminución del pH del fagosoma [19,20]. De esta forma, el patógeno inhibe la maduración endocítica, lo que puede reducir el procesamiento antigénico, y por tanto, la presentación eficaz de los antígenos de la micobacteria por parte de los macrófagos, inhibiendo la activación de las células T [20,21]. En este contexto, diversos autores han constatado que, a diferencia de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, cepas mutantes en el gen *phoP* o en la síntesis de PDIM son incapaces de impedir la maduración del fagosoma, poniendo de manifiesto la implicación de dichos genes en este mecanismo [22,23].

Además, existen otros mecanismos bacterianos que contribuyen a la persistencia, replicación y propagación de la micobacteria, y que están mediados principalmente por su capacidad de secreción de ESAT-6, entre los que destacan los siguientes:

- Inhibición de la autofagia. La autofagia es un proceso mediante el cual componentes citosólicos y orgánulos celulares dañados se engloban en el interior de autofagosomas, que terminan fusionándose con lisosomas. Aunque se trata de un proceso celular fisiológico, recientemente se ha descrito también como un importante mecanismo inmune en la defensa contra patógenos [24]. La activación de la autofagia reduce la viabilidad de las micobacterias intracelulares y facilita su eliminación, aumentando su capacidad de presentación antigénica. *M. tuberculosis* ha desarrollado mecanismos mediados por ESAT-6 que inhiben los procesos de autofagia en los macrófagos, favoreciendo su persistencia en ellos [25,26].
- Translocación al citosol. Otra de las estrategias desarrolladas por *M.tuberculosis* para evadir la acción bactericida de los macrófagos es la rotura del fagosoma y translocación de las micobacterias desde el interior del fagosoma al citosol, donde pueden replicar libremente en ausencia del ambiente hostil del fagosoma e infectar nuevas células [27,28].
- Inducción de apoptosis. La modulación de la apoptosis es un proceso ampliamente utilizado por los patógenos intracelulares para favorecer la expansión de la infección. *M. tuberculosis* es capaz de inducir la muerte por apoptosis en la célula diana, generando en este proceso cuerpos apoptóticos que contienen micobacterias. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por nuevas células, favoreciendo así su infección y contribuyendo a la diseminación del microorganismo [29].

En conjunto, estos mecanismos, desarrollados como consecuencia de la evolución de *M. tuberculosis* con el sistema inmune humano, favorecen la propagación célula-célula de las micobacterias y su persistencia en los macrófagos del huésped, y pueden interferir en la eficacia del procesamiento y presentación de sus antígenos para la generación de una respuesta inmune adaptativa eficaz.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los estudios preclínicos en ratones inmunocompetentes llevados a cabo durante el desarrollo de MTBVAC, así como los primeros resultados obtenidos en la primera fase de ensayos clínicos de seguridad en voluntarios sanos, han demostrado que esta vacuna induce mejor protección y mayor respuesta específica *in vivo* respecto a la actual BCG. Para poder acelerar el avance de MTBVAC hacia ensayos clínicos de eficacia, resulta crucial el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que permitan explicar, a nivel molecular, la mayor inmunogenicidad de MTBVAC respecto a BCG, e identificar biomarcadores predictivos de la protección asociada a la vacuna.

Los factores de virulencia *phoP* y PDIM, deletados en MTBVAC, se han relacionado con el bloqueo de las rutas del tráfico intracelular y la inhibición de la maduración fagosomal por parte de *M. tuberculosis* en macrófagos infectados [22,23]. Pese a no expresar ESAT-6, BCG expresa tanto *phoP* como PDIM, por lo que conserva parte de la capacidad asociada a la micobacteria virulenta de bloquear el tráfico intracelular en la célula diana [20].

La hipótesis de partida de este trabajo es que la implicación de los factores de virulencia *phoP* y PDIM en la inhibición de los mecanismos bactericidas de la célula diana puede alterar las vías de procesamiento del microorganismo, que derivan en la presentación de los antígenos bacterianos a las células del sistema inmune. De este modo, al carecer de ambos factores de virulencia, MTBVAC seguiría las vías normales de maduración fagosomal y procesamiento antigénico en el interior de los macrófagos, dando lugar a una presentación antigénica eficaz, que explicaría la mayor inmunogenicidad observada *in vivo* respecto a BCG. Esta última, debido a su capacidad de bloquear el tráfico intracelular, no sería correctamente procesada y por tanto, daría lugar a una presentación antigénica menos eficiente.

En este contexto, el objetivo global del presente trabajo es el estudio comparativo del tráfico intracelular de BCG y MTBVAC en macrófagos murinos, y de cómo estas diferencias se traducen en diferencias en la eficacia de la presentación antigénica de ambas vacunas.

Para llevar a cabo su consecución, los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- Estudio de la colocación de BCG y MTBVAC con compartimentos celulares ácidos en el interior de macrófagos infectados.
- Estudio de la maduración y activación de macrófagos infectados con BCG o MTBVAC.
- Estudio de la presentación antigénica en macrófagos infectados con BCG o MTBVAC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de micobacterias

En este trabajo se han utilizado cepas de BCG Pasteur y MTBVAC que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) (BCG::GFP y MTBVAC::GFP), previamente construidas a través de la expresión de un plásmido con un promotor fuerte seguido de la secuencia de la GFP.

Para llevar a cabo las infecciones en macrófagos, se prepararon previamente lotes de glicerol de estas cepas en los que se cuantificó la cantidad de bacterias presente. Para ello, se inocularon 100 µl de bacterias BCG::GFP o MTBVAC::GFP, procedentes de un stock congelado en glicerol, en medio de cultivo líquido 7H9 suplementado con 10% de albúmina, dextrosa y catalasa (ADC), 0.05% (v/v) de Tween-80 y en los casos necesarios con el antibiótico higromicina (20 µg/ml), y se mantuvieron a 37 °C durante aproximadamente una semana. Transcurrido este tiempo, con el objetivo de comprobar que el cultivo se encontraba en fase de crecimiento logarítmica, se midió su densidad óptica a 600 nm. Para sedimentar los agregados bacterianos, se recogieron 10 ml de cultivo y se centrifugaron durante 5 minutos a 100 xg. El sobrenadante, que contiene las bacterias, se recogió y se hizo pasar por una aguja de 0.45 mm de diámetro con la ayuda de una jeringa de 10 ml durante 5 ciclos, para favorecer lo máximo posible la disgregación bacteriana. A continuación, se tomaron 7 ml de cada cultivo a los que se añadieron 3 ml de glicerol 50% (v/v) y se alicuotaron en volúmenes de 0.5 ml en tubos adaptados para su congelación a -80°C.

Al día siguiente, se descongeló una alícuota de cada cepa y con ella se prepararon diluciones seriadas en PBS con un factor de dilución de 10. De cada una de las diluciones se plaquearon 100 µl en placas con medio de cultivo sólido 7H10 suplementado con ADC. Estas placas se sellaron y se incubaron a 37°C durante 21 días. Transcurrido ese tiempo, se contabilizaron las colonias y se calculó la densidad bacteriana del stock congelado, teniendo en cuenta la dilución aplicada en cada caso.

4.2 Células eucariotas

4.2.1 Aislamiento y cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDMs)

Los ensayos de infección llevados a cabo se han realizado en macrófagos murinos obtenidos a partir de la diferenciación de células de médula ósea de huesos de tibia y fémur de ratones de la estirpe C57/BL6. Estas células se cultivaron en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB), glutamax 2 mM y los antibióticos penicilina y estreptomicina 10 mg/ml.

Para su obtención, los ratones fueron eutanasiados y se extrajeron las tibias y fémures. Los huesos se limpiaron de restos de tejido muscular, se esterilizaron en etanol y se lavaron con PBS. Para extraer las células de la médula ósea se seccionaron las cabezas de los huesos y se introdujo por uno de los lados una aguja de 10 mm de largo y 0.45 mm de diámetro acoplada a una jeringa con 1 ml de medio de cultivo. El volumen inoculado por uno de los lados salió por el otro lado del hueso y se recogió en una placa de Petri con 20 ml del mismo medio de cultivo. El procedimiento se repitió inoculando otro mililitro de cultivo por el otro lado del hueso. Para separar los posibles fragmentos de tejido, el cultivo resultante de las células extraídas de los dos fémures y tibias se hizo pasar por un filtro de 70 μ m de tamaño de poro y se centrifugó durante 5 minutos a 450 xg. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo con 10% de un factor de diferenciación de macrófagos, obtenido a partir del cultivo de células L929, que secretan de forma constitutiva el factor de diferenciación de macrófagos (M-CSF). Las células obtenidas se sembraron finalmente en placas de Petri que se incubaron durante 7 días a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, hasta alcanzar el grado de adhesión y diferenciación adecuado.

Transcurrido este tiempo, los macrófagos adheridos a la placa se lavaron con 5 ml de PBS y se incubaron con 5 ml de tripsina a 37 °C durante 10 minutos. Una vez en suspensión, se añadieron 5 ml de medio de cultivo con FSB para inhibir la acción de la tripsina, y las células se centrifugaron durante 5 minutos a 450 xg. El pellet de células se resuspendió en medio de cultivo fresco y los macrófagos se contaron en un

microscopio utilizando una cámara Neubauer y la técnica de azul Trypan para diferenciar células vivas y muertas.

4.2.3. Cultivo de células BB7

En los ensayos de presentación antigénica se han utilizado hibridomas de células T CD4⁺ de ratón (células BB7), obtenidos a partir de un clon de células T CD4⁺ de ratones de la estirpe C57/BL6 que reconoce específicamente un péptido del Ag85B asociado a la molécula de MHC-II del serotipo I-A^b/I-E^b (En colaboración con el Doctor David Canaday, Case Western Reserve University (Cleveland, US)) [20, 25].

Las células BB7 se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS, glutamax 2 mM, penicilina y estreptomicina 10 mg/ml, aminoácidos esenciales 1% (v/v), HEPES 10 mM y β-mercaptoetanol 50 μM. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y la viabilidad celular se determinó periódicamente mediante conteo celular con azul Trypan en una cámara de Neubauer.

4.3 Infección de macrófagos derivados de médula ósea de ratón

Los macrófagos BMDM se sembraron en placas de 24 o 96 pocillos, en función del ensayo a realizar, a una densidad de 500.000 o 100.000 células por pocillo respectivamente, incubándose durante una noche para permitir su adhesión al plástico.

Para llevar a cabo las infecciones se descongelaron alícuotas del stock de BCG::GFP y MTBVAC::GFP previamente cuantificado y las bacterias se suspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado con SFB y glutamax a la densidad adecuada para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 1:1 o 10:1 bacterias por célula, según el ensayo realizado. El medio de cultivo de los macrófagos fue reemplazado por la suspensión bacteriana de cada cepa y los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 4 horas, tras lo cual se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar las bacterias extracelulares, añadiendo al final medio de cultivo fresco en cada pocillo.

4.4. Análisis del tráfico intracelular mediante microscopía confocal

Los macrófagos BMDM se sembraron sobre lamelas de vidrio en placas de 24 pocillos a una densidad de 500.000 células por pocillo y se infectaron a MOI 1:1 y a MOI 10:1 con BCG::GFP y MTBVAC::GFP. Como control positivo de colocalización se utilizaron bacterias inactivadas por calor, ya que estas carecen de mecanismos para inhibir la acidificación fagosomal. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de bafilomicina 50 nM, un inhibidor del tráfico intracelular.

Tras la infección, los macrófagos infectados se marcaron con la sonda LysoTracker Red. Para ello, las células se incubaron a 37°C con LysoTracker Red 50 nM durante una hora, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el PFA y se añadió PBS.

Los núcleos celulares se tiñeron con el colorante fluorescente Hoeschst. Para ello, las células se incubaron 5 min a temperatura ambiente con 1 µg/ml de colorante, tras lo cual se retiró y se añadió PBS.

Finalmente, las lamelas de vidrio se montaron sobre portas de microscopio y las preparaciones se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. La fluorescencia se analizó utilizando un microscopio de fluorescencia confocal compacto Olympus FV10-i Oil Type.

Para calcular el porcentaje de colocalización en cada preparación, se analizó la superposición de las fluorescencias de un mínimo de 100 bacterias intracelulares y aisladas.

4.5 Análisis de la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo

Los macrófagos BMDM se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 500.000 células por pocillo y se infectaron a MOI 10:1 con las cepas de BCG::GFP y MTBVAC::GFP. Tras 24 horas de infección, los macrófagos adheridos a la placa se lavaron con 500 µl de PBS por pocillo y se incubaron con 500 µl de tripsina por pocillo durante 10 minutos. Una vez despegadas, las células en suspensión se traspasaron a

tubos Eppendorf con 500 µl de medio de cultivo con SFB, para inactivar la acción de la tripsina. Las células se centrifugaron 5 minutos a 200 xg, el pellet se resuspendió en 100 µl de medio de cultivo y se añadió a una placa de 96 pocillos de fondo curvo. La placa se centrifugó hasta 1500 xg y se lavó el sobrenadante. Con el objetivo de evitar posteriores uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados, se añadieron 50 µl por pocillo de una solución de bloqueo de los receptores de la región Fc de los anticuerpos diluida 1/50 (Miltenyi), que se incubó durante 10 minutos a 4°C. La placa se centrifugó de nuevo hasta 1500 xg, se lavó el sobrenadante y se añadieron 50 µl por pocillo de anticuerpos anti-MHCII-APC (Miltenyi) diluido 1/100, anti- CD80-PE (BD Biosciences) y anti-CD86-PE (BD Biosciences) diluidos 1/200, y de los controles de isotipo pertinentes (BD Biosciences) diluidos 1/200. Las diluciones de los anticuerpos se prepararon en medio de cultivo con 10% de SFB. Los anticuerpos se incubaron con los macrófagos durante 20 minutos a 4 °C, tras lo cual las células se fijaron con PFA 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se suspendieron finalmente en PBS, manteniéndose a 4°C hasta su análisis.

La fluorescencia de las células se analizó utilizando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

4.6 Ensayo de presentación antigénica

Los macrófagos BMDM se sembraron en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de 1000 U/ml de IFN γ de ratón, y se incubaron durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células se infectaron a una MOI de 10:1 con cepas de BCG y MTBVAC. Como control negativo se utilizó una cepa de MTBVAC mutante para el antígeno Ag85B, previamente construida y disponible en un stock congelado y cuantificado, y como control positivo se utilizó el péptido inmunodominante del Ag85B reconocido por las células BB7 a 10 µg/ml. Transcurridas 4 horas de infección, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y los hibridomas T BB7 se añadieron sobre los macrófagos en una relación efector:célula diana (E:D) de 2:1 y 5:1. Las células BB7 se mantuvieron en contacto con los macrófagos infectados durante 24 horas. Tras este

periodo, los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 200 xg y se recuperó el sobrenadante resultante.

La presencia de IL-2 en el sobrenadante, secretada por parte de las células BB7 tras el reconocimiento antigénico, se determinó mediante ELISA, utilizando un ELISA tipo sándwich para la determinación cuantitativa de la IL-2 de ratón (MABTECH 3441-1H-6). El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó un anticuerpo primario de captura que se incubó durante una noche en una placa Maxisorp (Nunc) de 96 pocillos. La placa se bloqueó incubándola en un buffer de PBS con 0.05% de Tween 20 y 0.1% de albúmina bovina sérica (BSA), y a continuación se añadieron las muestras y estándares, preparados a partir de diluciones seriadas de 1 a 1000 pg/ml de un estándar de IL-2 proporcionado por el fabricante. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo monoclonal unido a biotina, que se detectó incubándolo con una solución de estreptavidina unida a peroxidasa que se reveló con el sustrato específico TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbencidina), y la reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 0.5 M. La densidad óptica se leyó a 450 nm en un lector de placas (BioTek).

5. RESULTADOS

5.1 Análisis del tráfico intracelular de BCG y MTBVAC

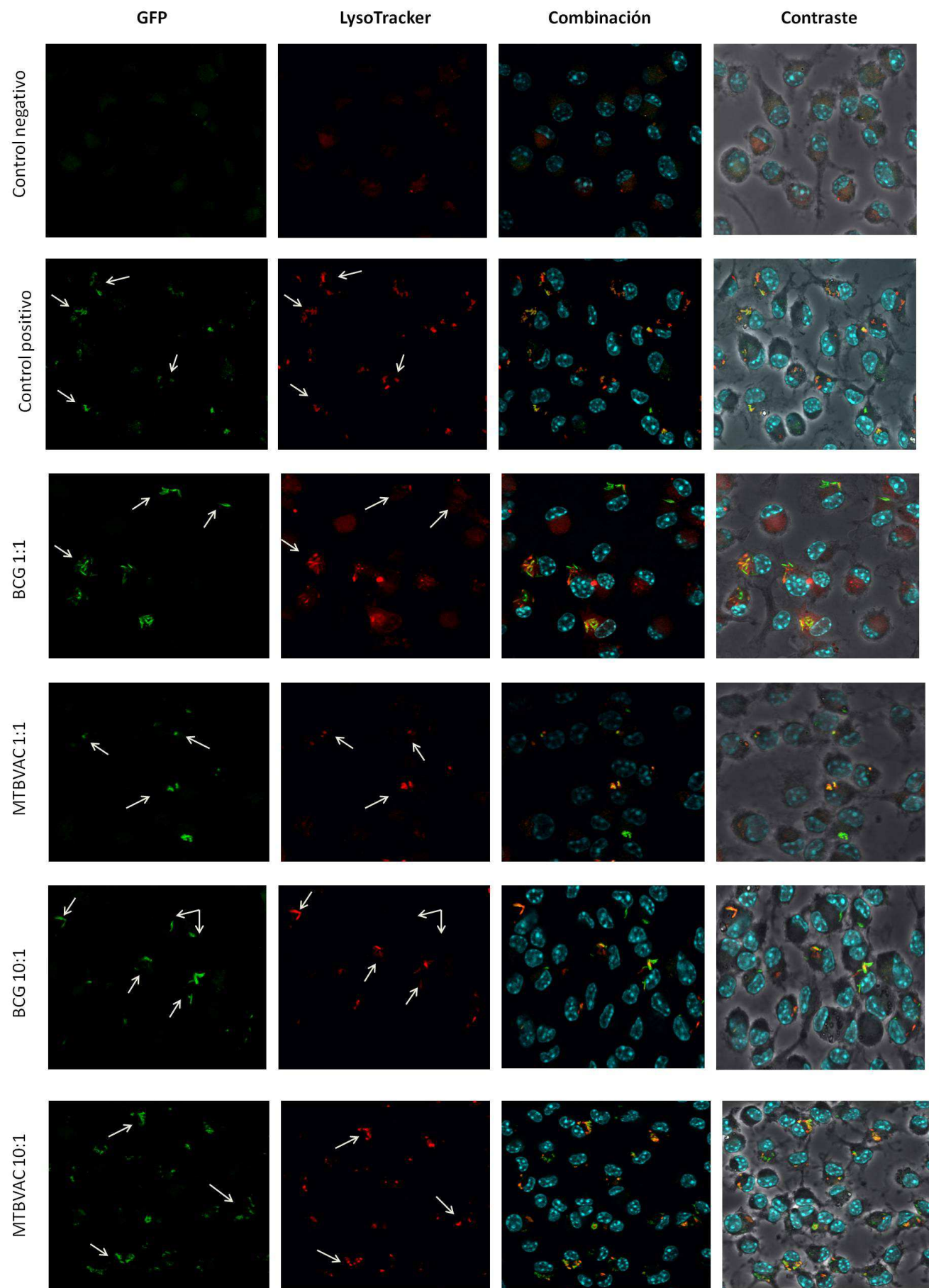
Con el objetivo analizar las diferencias en el tráfico intracelular de las vacunas BCG y MTBVAC, se infectaron macrófagos BMDM con cepas bacterianas que expresaban constitutivamente la proteína GFP, y se marcaron los compartimentos celulares ácidos con la sonda LysoTracker. Mediante microscopía confocal, se analizó la colocalización de las bacterias intracelulares, que emiten fluorescencia verde al expresar la proteína GFP, con los compartimentos ácidos, marcados con la sonda LysoTracker, que emite fluorescencia roja a pH ácido. Como control negativo se utilizaron macrófagos sin infectar y como control positivo los macrófagos se infectaron con bacterias inactivadas por calor, que como consecuencia de su fenotipo inactivado, siguen la ruta clásica de procesamiento endocítico. Para comprobar la integridad de las células infectadas, los núcleos de los macrófagos se tiñeron con la sonda fluorescente Hoeschst, que se une a los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia azul. Además, para estudiar su efecto en el tráfico de BCG y MTBVAC en las células infectadas, las infecciones con ambas vacunas se realizaron en presencia del compuesto bafilomicina en el medio de cultivo, un inhibidor de la protón v-ATPasa que impide la acidificación del fagosoma.

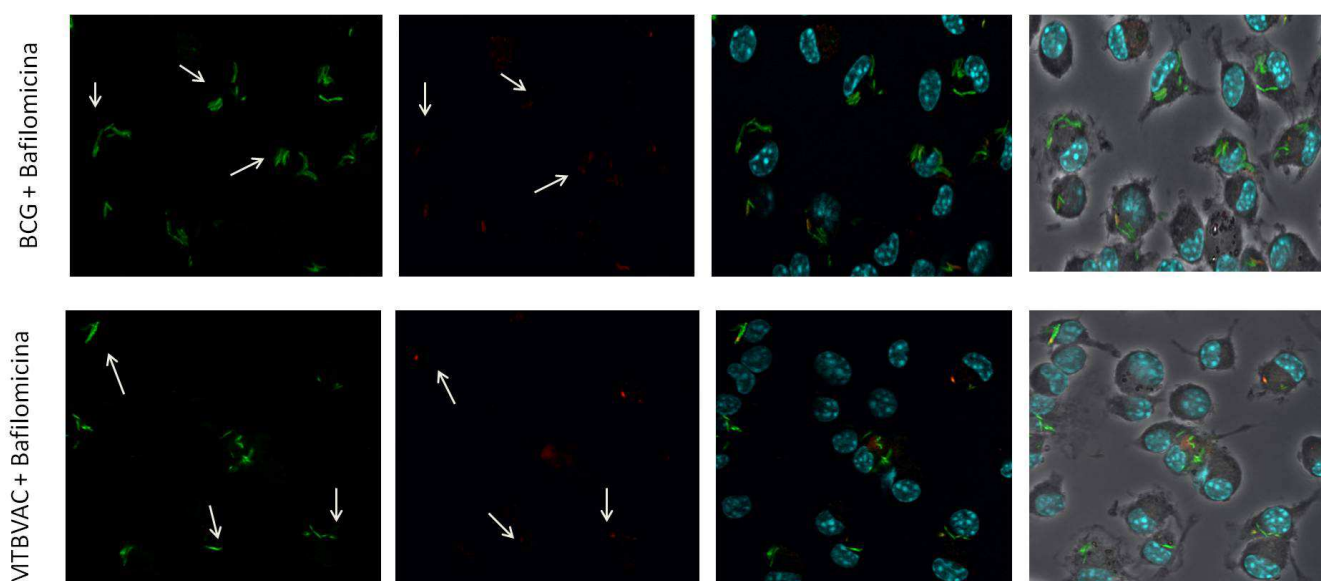
Las imágenes obtenidas (figura 2A) muestran como en ausencia de infección bacteriana (control negativo) apenas se observa la presencia de compartimentos ácidos. Sin embargo, en las diferentes infecciones llevadas a cabo, se observa la presencia tanto de BCG como de MTBVAC en compartimentos celulares ácidos, observándose un alto grado de colocalización en los macrófagos infectados con MTBVAC, similar al de las bacterias inactivadas por calor y mayor respecto a los infectados con BCG. Por otro lado, las imágenes obtenidas muestran de manera visible los efectos del inhibidor bafilomicina sobre el tráfico intracelular, que reduce en gran medida la acidificación de los compartimentos endosomales tanto en los macrófagos infectados con BCG como con MTBVAC.

Los porcentajes de colocalización (figura 2B) se han calculado mediante el conteo del número de bacterias aisladas en el interior de los macrófagos que colocalizan con

la sonda LysoTracker en un mínimo de 100 bacterias por cada preparación. Estos porcentajes indican una colocalización parcial tanto de BCG como de MTBVAC con los compartimentos celulares ácidos. Sin embargo, en los macrófagos infectados con MTBVAC se observa en general un mayor grado de colocalización respecto a los infectados con BCG, siendo comparable al de las bacterias inactivadas por calor a una MOI de 10:1, donde los porcentajes de colocalización son 72 y 84 % respectivamente, frente a un 56 % de BCG. Las diferencias entre BCG y MTBVAC son mayores cuando se analizan los datos a MOI 1:1, donde el porcentaje de colocalización en los macrófagos infectados con MTBVAC es en torno al doble del observado en los infectados con BCG (29 y 53% respectivamente). Finalmente, el efecto de la bafilomicina en el medio de cultivo reduce estos porcentajes considerablemente tanto en las infecciones con MTBVAC como con BCG (19 y 17% respectivamente).

A





B

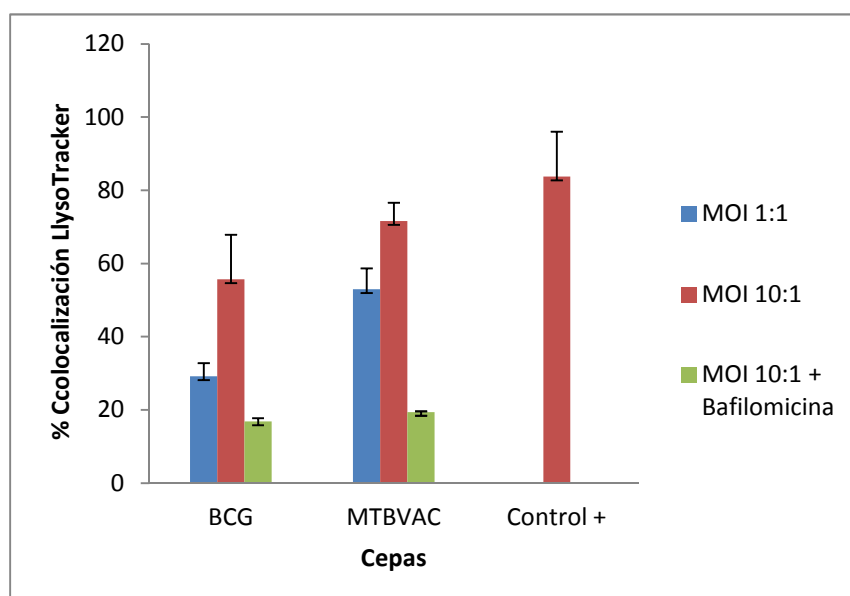


Figura 2. Análisis del tráfico intracelular de BCG y MTBVAC en macrófagos infectados mediante microscopía confocal. (A) Imágenes representativas de macrófagos BMDM sin infectar (control negativo) e infectados con bacterias inactivadas por calor (control positivo), BCG y MTBVAC a MOI 1:1 y a MOI 10:1 en presencia y ausencia del inhibidor bafilomicina. Las células se marcaron con la sonda LysoTracker tras 4 horas de infección (fluorescencia roja) y los núcleos celulares de los macrófagos se tiñeron con la sonda Hoestch (fluorescencia azul). Las micobacterias internalizadas emiten fluorescencia verde al expresar la proteína GFP. La superposición de la fluorescencia verde y roja indica que las micobacterias residen en compartimentos ácidos. La bafilomicina inhibe la acidificación del fagosoma, reduciendo la colocalización de las bacterias fluorescentes con la sonda LysoTracker. Se indica con flechas la posición de bacterias intracelulares en el canal de fluorescencia verde (GFP) y su posición correspondiente en el de fluorescencia roja (LysoTracker).

(B) Cuantificación del tráfico intracelular de las micobacterias en compartimentos ácidos. Los datos expresan el porcentaje de micobacterias en el interior de los compartimentos marcados con LysoTracker con respecto a las micobacterias intracelulares totales en el interior de macrófagos infectados con BCG, MTBVAC y bacterias inactivadas por calor (control +) a MOI 1:1, 10:1 y en presencia del inhibidor bafilomicina. Los datos de cada muestra son el resultado del valor medio de tres datos experimentales \pm desviación estándar (SD).

5.2 Análisis de la activación de macrófagos infectados con BCG y MTBVAC

CD80 y CD86 son las dos principales moléculas de coestimulación expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígeno, cuyo papel es generar la segunda señal de activación para los linfocitos T a través de su interacción con la molécula CD28 expresada en la superficie de estos linfocitos, siendo la primera señal de activación la producida como consecuencia de la interacción entre el TCR del linfocito T con el MHC de clase I (para células CD8⁺) o de clase II (para células CD4⁺) en la superficie de las células presentadoras de antígeno [30,31].

Con el objetivo de estudiar la capacidad de BCG y MTBVAC de inducir la expresión de moléculas de coestimulación en las células que infectan, se infectaron macrófagos BMDM con ambas cepas bacterianas durante 24 horas y las células se marcaron con anticuerpos específicos anti-CD80 y anti-CD86 unidos a ficoeritrina (PE), así como con un anticuerpo anti-MHCII unido a alofocianina (APC), y su expresión se determinó monitorizando la fluorescencia de estos fluorocromos mediante citometría de flujo. Además, la infectividad de BCG y MTBVAC se determinó monitorizando la fluorescencia verde emitida por la GFP expresada por las micobacterias. Para medir la fluorescencia basal causada por la unión inespecífica de los anticuerpos se utilizaron controles de isotipo, que consisten en anticuerpos inespecíficos de la misma especie e isotipo en la que se ha obtenido el anticuerpo monoclonal específico utilizado, marcados con el correspondiente fluorocromo. En este caso, se han utilizado controles de isotipo de hámster para CD80 y de rata para CD86 y MHC-II.

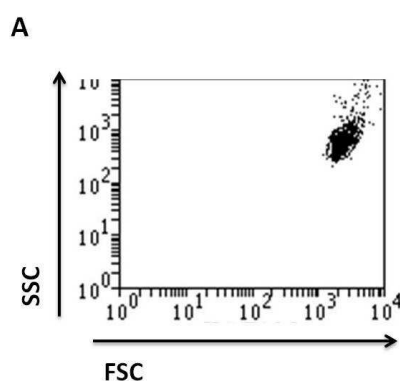
En primer lugar, se seleccionó la población de macrófagos a estudiar en función del tamaño y la complejidad celular, determinado por los parámetros Forward Scatter

(FSC) y Side Scatter (SSC) respectivamente (figura 3A). Todos los siguientes análisis se realizaron sobre esta población celular.

La fluorescencia de la GFP emitida por las bacterias fluorescentes se analizó respecto al parámetro SSC (figura 3B). Tanto en las infecciones con BCG como con MTBVAC, el porcentaje de macrófagos infectados es elevado (92 y 86% respectivamente), frente al control negativo (macrófagos sin infectar), donde no hay fluorescencia debida a GFP (figura 3B). Estos resultados indican que la capacidad fagocítica de los macrófagos BMDM es muy alta, y que las posibles diferencias encontradas entre ambas cepas bacterianas no se deben a diferencias en su capacidad de infección.

Para analizar la expresión de los marcadores de superficie mencionados, se estudió la fluorescencia roja emitida por los anticuerpos anti-CD80 y CD86 marcados con PE respecto a la emitida por el anticuerpo anti-MHCII marcado con APC (figura 3C). Respecto a la expresión de MHC-II, en el caso del control negativo se observa la expresión positiva de este marcador en una población importante de macrófagos sin infectar. Además, la infección con BCG o MTBVAC no altera significativamente este porcentaje, que se mantiene en torno al 50% de la población celular con expresión positiva para MHC-II. En el caso de CD80 o CD86, no se observan niveles de expresión significativos ni en el control negativo ni en los macrófagos infectados con BCG o MTBVAC.

Los resultados obtenidos indican que la infección con BCG o MTBVAC no induce, en las condiciones dadas, un aumento significativo en la expresión de estas moléculas en los macrófagos infectados.



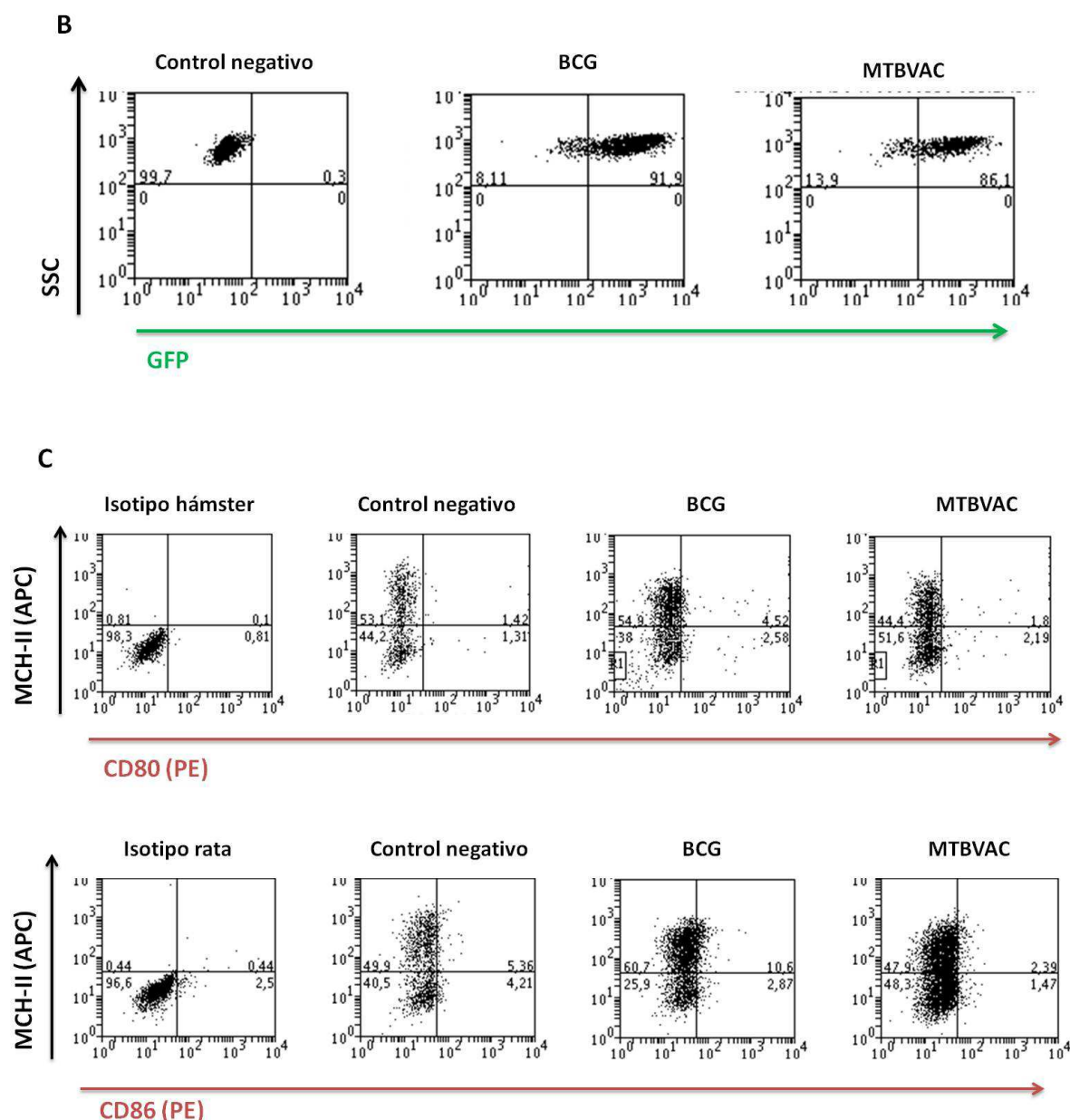


Figura 3. Análisis de la expresión de marcadores de activación en macrófagos infectados con BCG y MTBVAC mediante citometría de flujo. Los macrófagos BMDM infectados con BCG::GFP y MTBVAC::GFP se marcaron con anticuerpos contra distintos marcadores de superficie: MHC-II, CD80 y CD86, y su expresión se determinó mediante citometría de flujo. **(A)** Diagrama dot-plot de la población celular presente en la muestra en función de su tamaño, dado por el parámetro FSC y la complejidad celular, dada por el parámetro SSC. La región delimitada representa la población de macrófagos sobre la que se realiza el análisis. **(B)** Diagramas dot-plot que representan la fluorescencia debida a la GFP expresada por las micobacterias en función del parámetro SSC en macrófagos sin infectar (control negativo) e infectados con BCG y MTBVAC. Los números indican los porcentajes de células positivas en cada cuadrante. **(C)** Diagramas dot-plot que representan la fluorescencia de la APC debida a la expresión de MHC-II en función de la fluorescencia de la PE debida a la expresión de CD80 (arriba) y CD86 (abajo)

en macrófagos marcados con el control de isotipo de hámster y rata, macrófagos sin infectar (control negativo) e infectados por BCG y MTBVAC. Los números indican los porcentajes de células positivas en cada cuadrante.

5.3 Estudio de la presentación antigénica de BCG y MTBVAC

El objetivo principal de este trabajo consistía en correlacionar las diferencias observadas en el tráfico intracelular de ambas vacunas (5.1) con su capacidad para llevar a cabo una presentación antigénica eficaz que active la respuesta inmune y confiera protección contra la enfermedad. Para medir la presentación antigénica mediada por MHC-II en la superficie de los macrófagos se han utilizado las células BB7, hibridomas de ratón que reconocen específicamente un péptido del antígeno de tuberculosis Ag85B unido al MHC-II del haplotipo I-A^b/I-E^b, expresado por la estirpe de ratón C57/BL6. Puesto que estas células se encuentran preactivadas, cabe resaltar que no necesitan de señales de coestimulación, sino que la interacción con el MHC-II expresado por los macrófagos es suficiente para producir una respuesta.

Para aumentar la expresión de MHC-II en la superficie de los macrófagos, éstos se incubaron con IFN γ durante las 48 horas previas a la infección y al contacto con las células BB7. El IFN γ induce la expresión de MHC-II en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Los macrófagos BMDM naive o activados con IFN γ se infectaron con BCG y MTBVAC durante 4 horas, tras lo cual se lavaron con PBS para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron durante 24 horas con las células BB7. El reconocimiento entre estas células, que da lugar a la presentación antigénica y la activación de las células BB7, se determinó cuantitativamente midiendo mediante ELISA la concentración de IL-2, citoquina secretada al medio por las células BB7 activadas, en el sobrenadante del cultivo tras 24 horas de infección.

Puesto que el presente trabajo ha supuesto la puesta a punto en el laboratorio de este ensayo, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para su realización se probaron las siguientes condiciones experimentales:

Ensayo 1

En un primer intento, los macrófagos BMDM se sembraron e incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de IFN γ a una concentración de 200 U/ml, y se infectaron con BCG o MTBVAC a MOI 1:1 y 10:1 en medio de cultivo DMEM suplementado con de SFB y glutamax. Como control positivo se utilizó el péptido inmunodominante del Ag85B a tres concentraciones distintas (0.1, 1 y 10 μ g/ml). Las células BB7 se añadieron sobre los macrófagos infectados en el mismo medio DMEM suplementado con 10% de SFB y glutamax a un ratio E:D (células BB7: macrófagos) de 10:1. La determinación de la IL-2 en el sobrenadante mediante ELISA dio como resultado la recta de calibrado que se muestra en la figura 4, construida a partir de diluciones seriadas de una disolución estándar de IL-2. Sin embargo, ninguna de las muestras, incluyendo el control positivo, presentó valores de absorbancia significativos, siendo todos inferiores al rango de la recta patrón (datos no mostrados).

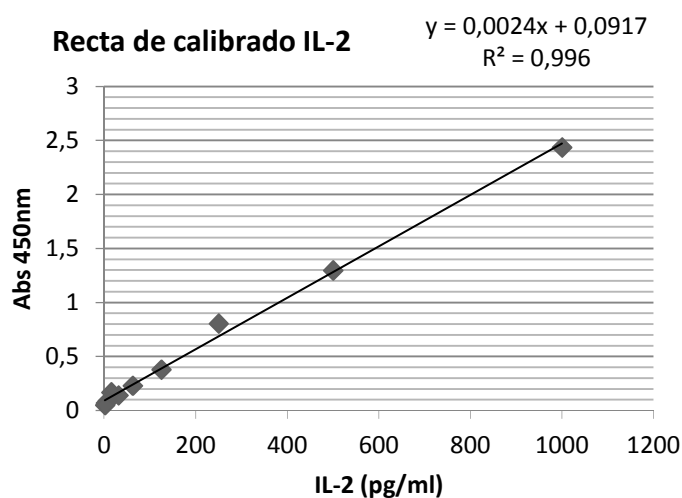


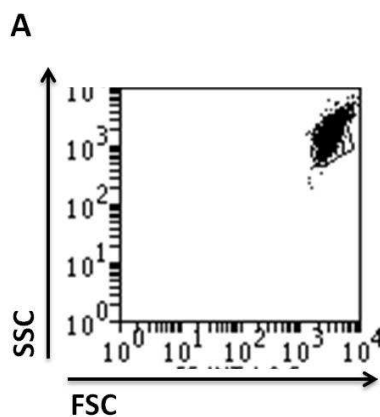
Figura 4. Recta de calibrado estándar de la IL-2 de ratón. Para construir la recta de calibrado se utilizaron diluciones de 1 a 1000 pg/ml de una disolución estándar de IL-2. El gráfico muestra la representación lineal de la medida de la absorbancia de cada dilución en función de su concentración, y su ajuste a una ecuación lineal.

Ensayo 2

Ante el resultado anterior, y puesto que la obtención de la recta de calibrado indica que el ensayo ELISA se ha desarrollado adecuadamente, se modificaron algunas de las condiciones previas del experimento. En primer lugar, se aumentó la concentración de IFN γ a 1000 U/ml y el tiempo de incubación de los macrófagos con el IFN γ previo a la infección se fijó en 48 horas.

Para comprobar que el efecto del IFN γ sobre la activación de los macrófagos estaba teniendo lugar en las condiciones establecidas, se estudió la inducción de la expresión de MHC-II por IFN γ en macrófagos mediante citometría de flujo. Para ello, se sembraron macrófagos BMDM en presencia y ausencia de IFN γ en las condiciones mencionadas, y las células se marcaron con un anticuerpo anti-MHCII marcado con el fluoróforo APC siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.5. La fluorescencia de la APC debida a la expresión de MHC-II en la superficie de los macrófagos se determinó mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos confirman el efecto del IFN γ sobre la activación de los macrófagos (figura 5). El número de células que emiten fluorescencia debida a la expresión de MHC-II aumenta significativamente en los macrófagos tratados con IFN γ (94%) respecto a los macrófagos no tratados (8%).



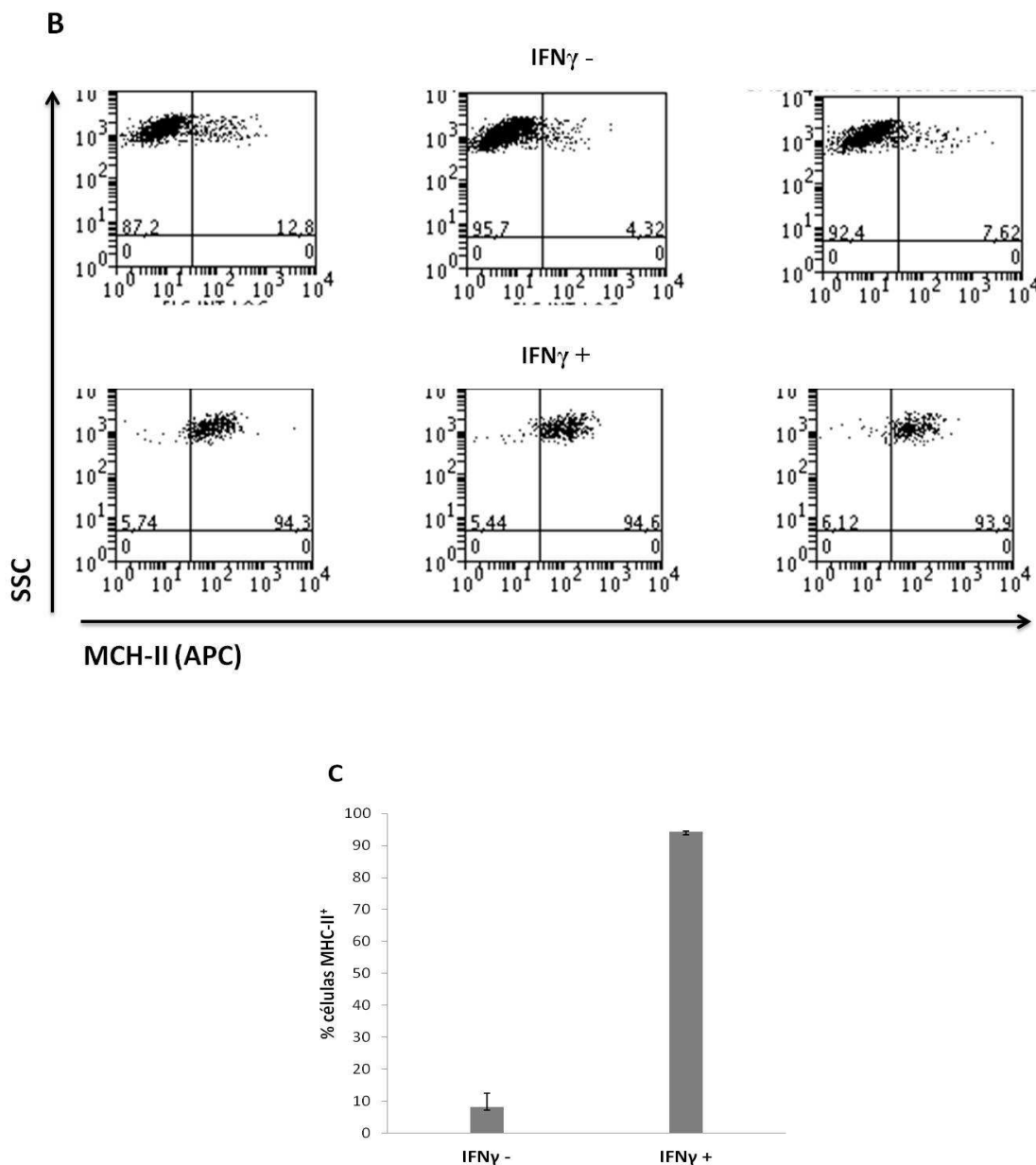


Figura 5. Análisis de la activación de macrófagos BMDM mediada por IFN γ mediante citometría de flujo. Los macrófagos BMDM se sembraron y se incubaron durante 48 horas en presencia o ausencia de IFN γ (1000 U/ml) por triplicado. La fluorescencia debida al marcaje de los macrófagos con el anticuerpo anti-MHC II se analizó mediante citometría de flujo. **(A)** Diagrama dot-plot de la población celular presente en la muestra en función de su tamaño, dado por el parámetro FSC y la complejidad celular, dada por el parámetro SSC. La región delimitada representa la población de macrófagos sobre la que se realiza el análisis. **(B)** Diagramas dot-plot que representan la fluorescencia de la APC debida a la expresión de MHC-II frente al parámetro SSC en macrófagos sin activar (arriba) y en macrófagos activados por IFN γ (abajo). Los números indican los porcentajes de células positivas en cada cuadrante. **(C)** Porcentaje de células sin activar por IFN γ (IFN γ -) y activadas por IFN γ (IFN γ +) positivas para la expresión de MHC-II. Los datos son el resultado del valor medio de tres puntos experimentales \pm SD.

Ensayo 3

Una vez fijadas las condiciones para la efectiva activación de los macrófagos inducida por IFN γ , se llevó a cabo un nuevo ensayo de presentación antigénica en el que los macrófagos BMDM se incubaron con IFN γ en las condiciones descritas y la infección se realizó únicamente con el péptido inmunodominante del Ag85B (control positivo) a una concentración de 10 μ g/ml. Con el objetivo de fijar la relación E:D óptima para el ensayo, las células BB7 se añadieron sobre los macrófagos a una relación de 0:1, 2:1, 5:1, 10:1 y 20:1 células por macrófago. Además, para evitar la posible influencia del medio de cultivo utilizado habitualmente en las infecciones (DMEM suplementado con SFB y glutamax) sobre la viabilidad de las células BB7, éstas se añadieron sobre los macrófagos en el medio de cultivo de hibridomas utilizado para su cultivo habitual en ausencia de antibióticos (DMEM suplementado con SFB, glutamax, aminoácidos esenciales, HEPES y β -mercaptoetanol).

La recta de calibrado estándar de la IL-2 obtenida en el ensayo ELISA se muestra en la figura 6A. A partir de la ecuación lineal obtenida del ajuste de esta recta, se calcularon las concentraciones de IL-2 secretada por las células BB7 en cada una de las muestras (figura 6B). Mientras que no se detecta la presencia de IL-2 en el sobrenadante del control negativo (macrófagos no incubados con el péptido) y en el de los macrófagos no incubados con las células BB7 (ratio E:D 0:1), en todos los demás puntos se detectaron cantidades significativas de IL-2, indicando que el reconocimiento del Ag85B por parte de las células BB7 está teniendo lugar de forma eficiente, confirmando así la especificidad del control positivo utilizado. Por otra parte, la cantidad de IL-2 secretada aumenta al aumentar la relación E:D de 2:1 a 5:1. Sin embargo, al incubar los macrófagos con las células BB7 en relación 10:1 y 20:1 los niveles de IL-2 secretados descienden. Este hecho puede deberse a que en estas condiciones, la presencia excesiva de células comprometa la viabilidad y funcionalidad celular de las mismas.

Con estos resultados, se fijó el ratio de 2:1 y 5:1 células BB7 por macrófago como óptimo para los ensayos posteriores.

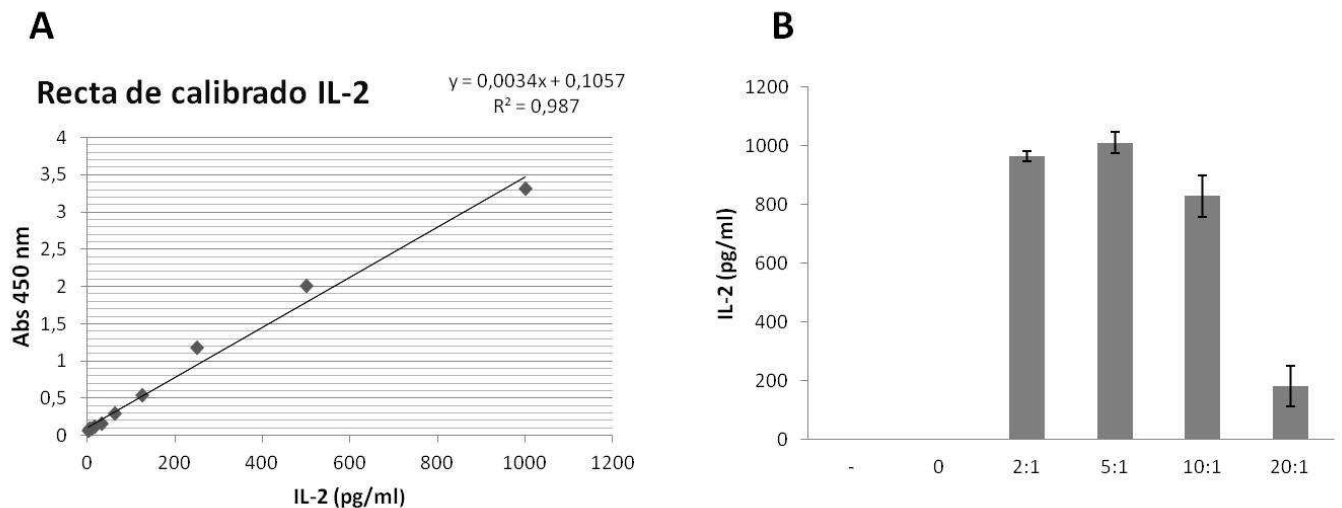


Figura 6. Análisis de la presentación antigénica del péptido inmunodominante del Ag85B a hibridomas T BB7. Los macrófagos BMDM activados con IFN γ 1000 U/ml durante 48 horas, se incubaron con el péptido inmunodominante del Ag85B a concentración de 10 μ g/ml y se cubrieron con células BB7 a una relación E:D de 0:1, 2:1, 5:1, 10:1 y 20:1. La secreción de IL-2 por parte de las células BB7 activadas se determinó cuantitativamente mediante ELISA. **(A)** Recta de calibrado de la IL-2 de ratón y ajuste lineal, construida mediante la medida de la absorbancia de diluciones de un estándar de IL-2 de 1 a 1000 pg/ml. **(B)** Concentraciones de IL-2 (pg/ml) medidas en el sobrenadante tras el reconocimiento entre el Ag85B presentado por los macrófagos unido a MHC-II y las células BB7. Las concentraciones de IL-2 en cada punto han sido calculadas a partir de la ecuación lineal obtenida de la recta de calibrado que se muestra en la figura A. Los datos mostrados son el resultado del valor medio de dos puntos experimentales \pm SD.

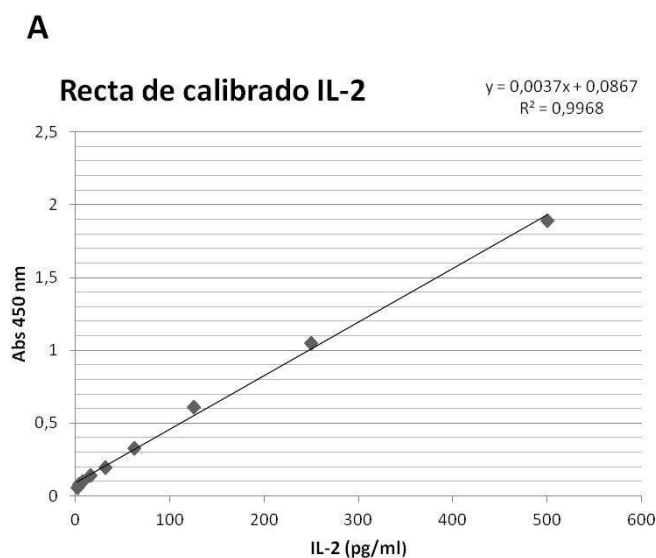
Ensayo 4

Partiendo de las condiciones establecidas en el experimento anterior, se llevó a cabo un nuevo ensayo en el que se sembraron macrófagos BMDM en presencia y ausencia de IFN γ , y se infectaron a MOI 10:1 con cepas de BCG, MTBVAC y con un mutante de MTBVAC defectivo en el Ag85B (MTBVAC85⁻) como control negativo. Las células BB7 se añadieron sobre los macrófagos en medio de cultivo de hibridomas a un ratio E:D de 2:1 y 5:1.

La recta de calibrado estándar de la IL-2 obtenida en el ensayo ELISA se muestra en la figura 7A. La determinación cuantitativa de la IL-2 secretada al medio por las células BB7 en contacto con los macrófagos naive sin activar por IFN γ (figura 7B), dio como

resultado la detección de cantidades significativas de IL-2 en los macrófagos incubados con el péptido inmunodominante del Ag85B, tal y como se observó en el ensayo anterior (figura 6B). Además, se detectó la presencia de IL-2 en el sobrenadante de los macrófagos infectados con MTBVAC e incubados con células BB7 tanto a ratio 2:1 como 5:1, siendo mayor en las incubadas a ratio 5:1 (figura 7B). Sin embargo, no se detectaron cantidades significativas de IL-2 en los macrófagos infectados con BCG, así como en los no infectados y en los infectados con la cepa de MTBVAC defectiva en el Ag85B, que al carecer de él, no puede ser presentado por los macrófagos ni reconocido por las células BB7.

Por otra parte, la determinación cuantitativa de la IL-2 secretada por las células BB7 en contacto con los macrófagos activados por IFN γ (figura 7C), dio como resultado la secreción de cantidades significativamente mayores de IL-2 tanto en los macrófagos incubados con el control positivo como en los infectados con MTBVAC para las dos relaciones de células BB7 utilizadas. A diferencia de los resultados obtenidos en los macrófagos no tratados con IFN γ (figura 7B), en este caso también se detecta la presencia de IL-2 en los cultivos de macrófagos infectados con BCG, aunque a niveles notablemente menores que en los infectados con MTBVAC. Tanto los macrófagos sin infectar como los infectados con el mutante de MTBVAC para el Ag85B no presentan señal.



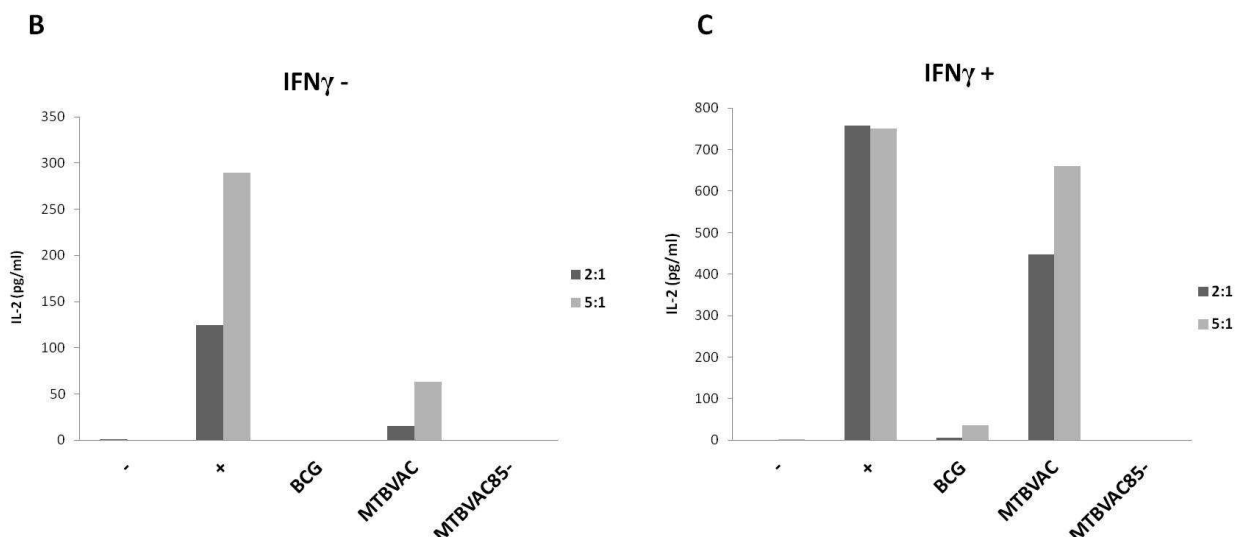


Figura 7. Análisis de la presentación antigénica del péptido inmunodominante del Ag85B en macrófagos infectados con BCG y MTBVAC. Los macrófagos BMDM naïve o activados con IFN γ 1000 U/ml durante 48 horas, se infectaron con BCG, MTBVAC y un mutante de MTBVAC para el Ag85B a MOI 10:1 y se cubrieron con células BB7 a un ratio E:D de 2:1 y 5:1. La secreción de IL-2 por parte de las células BB7 activadas se determinó cuantitativamente mediante ELISA. **(A)** Recta de calibrado de la IL-2 de ratón y ajuste lineal, construida mediante la medida de la absorbancia de diluciones de un estándar de IL-2 de 1 a 1000 pg/ml. **(B)** Concentraciones de IL-2 (pg/ml) medidas en el sobrenadante tras el reconocimiento entre las células BB7 y el Ag85B presentado en MHC-II por macrófagos naïve (sin activar por IFN γ) sin infectar (-), incubados con el péptido inmunodominante del Ag85B (+) e infectados con BCG, MTBVAC y un mutante de MTBVAC defectivo en el Ag85B (MTBVAC85-). **(C)** Concentraciones de IL-2 (pg/ml) medidas en el sobrenadante tras el reconocimiento entre las células BB7 y el Ag85B presentado en MHC-II por macrófagos activados por IFN γ (1000 U/ml) sin infectar (-), incubados con el péptido inmunodominante del Ag85B (+) e infectados con BCG, MTBVAC y un mutante de MTBVAC defectivo en el Ag85B (MTBVAC85-).

6. DISCUSIÓN

Con el objetivo de comprender las diferencias a nivel molecular en los mecanismos inmunológicos de la nueva vacuna MTBVAC respecto a la actual BCG, se ha llevado a cabo el análisis del tráfico intracelular y la presentación antigénica de estas vacunas en macrófagos de ratón.

El análisis del tráfico a través de la ruta fagocítica de BCG y MTBVAC en macrófagos, determinado por la presencia de las micobacterias en los compartimentos ácidos de las células que infectan, revela diferencias en las rutas endocíticas que siguen ambas vacunas. La colocalización de las bacterias intracelulares con la sonda LysoTracker indica la presencia de los microorganismos en compartimentos celulares ácidos, lo cual está relacionado con el proceso de maduración del fagosoma, durante el que adquiere un pH ácido que contribuye a crear un ambiente hostil para la bacteria y es necesario para la activación de las proteasas responsables del procesamiento bacteriano. Los niveles de colocalización de MTBVAC en estos compartimentos son superiores a los de BCG e indican la incapacidad de la micobacteria de bloquear la maduración del fagosoma, fenómeno característico del microorganismo patógeno. La inhibición de la maduración del fagosoma por *M.tuberculosis* es un proceso regulado por distintos factores en los que se han visto implicados diversos genes [32,33]. Entre ellos, como se ha mencionado anteriormente, este mecanismo se ha relacionado con la secreción de ESAT-6, regulado bajo el control de *phoP* [23], y con el complejo de lípidos PDIM, que se han implicado en la interacción inicial entre las células fagocíticas y las micobacterias a través de modificaciones en la composición de la membrana plasmática de la célula huésped que afectan a la endocitosis y acidificación del fagosoma [22].

Partiendo de esta base, las diferencias entre BCG y MTBVAC en su capacidad de modular la maduración fagosomal pueden relacionarse con el fenotipo y atenuación de ambas vacunas. Por un lado, el hecho de que tanto BCG, debido a la pérdida de la región genómica RD1 [3], como MTBVAC, debido a la delección del gen *phoP*, hayan perdido la secreción de ESAT-6, puede explicar que ambas bacterias presenten mayor

colocalización con los compartimentos ácidos respecto a la bacteria patógena, para la cual se ha descrito la ausencia absoluta de colocalización [23]. Sin embargo, MTBVAC, a diferencia de BCG, carece tanto de *phoP* como de *fadD26*, responsable de la síntesis de PDIM. Ambos defectos pueden contribuir a la incapacidad de la bacteria de bloquear la maduración fagosomal, lo que explica los elevados niveles de colocalización, que se acercan a los de las bacterias inactivadas por calor, y la mayor colocalización respecto a BCG, que aunque carece de la región RD1, expresa tanto *phoP* como PDIM.

Por otro lado, los resultados del estudio de la activación y maduración celular de los macrófagos infectados por BCG y MTBVAC mediante el análisis de la expresión de los marcadores de superficie MHC-II, CD80 y CD86 por citometría de flujo, indican que la infección con BCG y MTBVAC en las condiciones en las que se ha realizado el ensayo, no es suficiente para inducir un aumento de la expresión de estas moléculas en los macrófagos infectados, al no observarse un aumento significativo de la fluorescencia asociada a ninguna de estas moléculas en las células infectadas con BCG o MTBVAC respecto a las no infectadas. El hecho de que la infección no induzca la expresión de estas moléculas, puede deberse a que la activación de los macrófagos requiera de la interacción con citoquinas y distintas señales generadas por otras células como consecuencia de la infección, integradas en un marco celular complejo e interrelacionado, ausente en las condiciones experimentales *in vitro*.

Finalmente, los resultados obtenidos del análisis del tráfico intracelular, que confirman la incapacidad de MTBVAC de bloquear la ruta fagocítica y las diferencias en este aspecto respecto a BCG, han tratado de correlacionarse con sus consecuencias sobre la eficacia en la presentación antigénica de ambas vacunas. Una vez puesto a punto el ensayo de reconocimiento, el estudio de la presentación antigénica de un epítipo del Ag85B a hibridomas específicos de células T CD4⁺, pone de manifiesto que MTBVAC es más eficiente que BCG en el procesamiento y la presentación antigénica del Ag85B. Las células BB7 en contacto con macrófagos no tratados con IFN γ e infectados con MTBVAC secretan IL-2 a niveles significativos como consecuencia de su activación, mientras que en estas condiciones no se detecta la presencia de IL-2 en los cultivos de macrófagos infectados con BCG. Cuando éstos son activados por IFN γ , sus

niveles de expresión de MHC-II aumentan significativamente, y su efecto activador se confirma al dar lugar a la secreción de mayores niveles de IL-2 tanto en el control positivo como en la infección con MTBVAC. Además, en este caso se detecta secreción de IL-2 por las células BB7 en contacto con los macrófagos infectados con BCG, aunque a niveles notablemente menores que en los infectados con MTBVAC, lo que indica nuevamente una menor eficacia en la presentación antigénica. La ausencia de reconocimiento en la infección con la cepa de MTBVAC defectiva en el Ag85B sirve como control para confirmar que la activación de las células BB7 se está produciendo como consecuencia del reconocimiento específico del Ag85B.

Estos resultados confirman la hipótesis inicial respecto a la relación entre los eventos de maduración fagosomal y el procesamiento antigénico e indican que el Ag85B es procesado y presentado por los macrófagos de manera más eficiente en MTBVAC que en BCG, tanto en el estado de activación inducido por IFN γ como en condiciones basales, situación más similar a la producida en condiciones fisiológicas donde las células presentadoras carecen de señales de activación externas. Este hecho conduciría a una activación más eficaz de la respuesta inmune adaptativa inducida por la vacuna y responsable de generar inmunidad protectora, que puede relacionarse con la mejor protección inducida *in vivo* por la vacuna MTBVAC respecto a BCG.

En conjunto, los resultados de este trabajo demuestran diferencias en el tráfico intracelular y en la eficacia de la presentación antigénica de MTBVAC y BCG, y proporcionan pistas en el conocimiento del comportamiento y modo de acción intracelular de la nueva vacuna en un modelo celular *in vitro* de ratón, cuyos datos pueden relacionarse con los estudios de protección llevados a cabo *in vivo*. Los siguientes pasos para la continuación del estudio de los mecanismos inmunológicos de MTBVAC consistirían en el estudio tráfico intracelular y la presentación antigénica de ambas vacunas en comparación con la cepa virulenta MT103, cepa parental para la construcción de MTBVAC, y los mutantes simples de MT103 para *phoP* y *fadD26*, con el objetivo de estudiar la contribución de cada uno de estos genes al fenotipo atenuado de MTBVAC. Por otro lado, para extrapolar los resultados obtenidos en ratón al huésped humano, sería necesaria la realización de estos ensayos en modelos celulares humanos.

7. CONCLUSIONES

La información proporcionada por los resultados obtenidos en este trabajo ha llevado a plantear las siguientes conclusiones:

- Las diferencias en el tráfico intracelular de BCG y MTBVAC en el interior de macrófagos murinos indican que BCG conserva mayor capacidad de inhibir la maduración fagosomal que MTBVAC, que a diferencia de la bacteria patógena, sigue la ruta clásica de procesamiento endocítico.
- La infección con BCG y MTBVAC *in vitro* no es suficiente para inducir la expresión de los marcadores de activación MHC-II, CD80 y CD86 en la superficie de los macrófagos infectados.
- La acción del IFN γ favorece la activación de los macrófagos aumentando la expresión de MHC-II en su superficie y mejorando la eficacia de la presentación antigénica de BCG y MTBVAC.
- El tráfico intracelular de BCG y MTBVAC está relacionado con su capacidad de procesamiento y presentación antigénica.
- MTBVAC induce una presentación antigénica más eficaz respecto a BCG en macrófagos de ratón.

CONCLUSIONS

Results obtained in this work led us to propose the following conclusions:

- Differences in intracellular trafficking of BCG and MTBVAC infecting murine macrophages indicate that BCG retains greater ability to inhibit phagosomal maturation than MTBVAC, which unlike the pathogenic bacteria, follows the classical endocytic pathway.
- *In vitro* infection of macrophages with BCG and MTBVAC is not enough to induce surface expression of the activation markers MHC-II, CD80 and CD86.
- IFN γ promotes macrophage activation by increasing surface expression of MHC-II and improving the efficiency of BCG and MTBVAC antigen presentation in mouse macrophages.
- BCG and MTBVAC intracellular trafficking is related to its intracellular processing and antigen presentation.
- MTBVAC induces more effective antigen presentation compared to BCG in mouse macrophages.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Module 5: Tuberculosis. The immunological basis for immunization series. World Health Organization; 2011.
2. Flynn, J. L. *Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development*. Tuberculosis 2004; 84: 93–101.
3. Pym SA, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. *Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti*. Molecular Microbiology 2002; 46(3): 709-717.
4. Fine PE. *Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity*. Lancet 1995; 346(8986): 1339-45.
5. Young D, Dye C. *The development and impact of tuberculosis vaccines*. Cell 2006; 124: 683–7.
6. Abu-Raddad LJ, Sabatelli L, Achterberg JT, Sugimoto JD, Longini Jr IM, Dye C, et al. *Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009; 106: 13980–5.
7. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, et al. *Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials*. Vaccine 2013; 31: 4867-4873.
8. Kamath AT, Fruth U, Brennan MJ, Dobbelaer R, Hubrechts P, et al. *New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development*. Vaccine 2005; 23: 3753-61
9. Walker KB, Brennan MJ, Ho MM, Eskola J, Thiry G, Sadoff J, et al. *The second Geneva consensus: recommendations for novel live TB vaccines*. Vaccine 2010; 28: 2259–70.
10. Perez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. *An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence*. Molecular Microbiology 2001; 41: 179–87.
11. Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westervreen J, Huygen K, Hernández-Pando R, et al. *PhoP: A Missing Piece in the Intricate Puzzle of Mycobacterium tuberculosis Virulence*. PLoS ONE 2008; 3(10): e3496.
12. Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR Jr. *Complex lipid determines tissue-specific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice*. Nature 1999; 402: 79–83.

13. Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R, Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, et al. *The live Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs.* Vaccine 2006; 24: 3408–19.
14. Cardona PJ, Asensio JG, Arbues A, Otal I, Lafoz C, Gil O, et al. *Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on phoP mutant.* Vaccine 2009; 27: 2499–505.
15. ClinicalTrials.gov; id:NCT02013245.
16. Ernst JD. *The immunological life cycle of tuberculosis.* Nat Rev Immunol 2012; 12: 581–591.
17. Clemens DL1, Horwitz MA. *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited.* J Exp Med. 1995 Jan 1;181(1):257-70.
18. Levine, T. P., and B. M. Chain. *The cell biology of antigen processing.* Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1991; 26: 439–473.
19. Sturgill-Koszycki S, P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A et al. *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase.* Science 1994; 263: 678–681.
20. Singh CR, Moulton AR, Armitige LY, Bidani A, Snuggs M, et al. *Processing and presentation of a mycobacterial antigen 85B epitope by murine macrophages Is dependent on the phagosomal acquisition of vacuolar Proton ATPase and in situ activation of cathepsin D.* J Immunol 2006; 177: 3250-3259.
21. Noss, E. H., C. V. Harding, and W. H. Boom. *Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages.* Cell. Immunol. 2000; 201: 63–74.
22. Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh F-K, Chalut C, et al. *Phthiocerol dimycocerosates of M. tuberculosis participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids.* PLoS Pathog 2009 5(2): e1000289.
23. Ferrer NL, Gomez AB, Neyrolles O, Gicquel B, Martin C. *Interactions of attenuated Mycobacterium tuberculosis phoP mutant with human macrophages.* PLoS ONE 2010; 5(9): e12978.
24. Amano, A., Nakagawa, I. & Yoshimori, T. *Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria.* J. Biochem 2006; 140, 161–166.
25. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter Jr RL et al. *Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells.* Nature Medicine 2009; 15(3): 267-276.

26. Romagnol A, Etna MP, Giacomini E, Pardini M, Remoli ME et al. *ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells*. Autophagy. 2012 Sep 1; 8(9): 1357–1370.
27. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M et al. *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cell*. Cell 2007; 129: 1287-1298.
28. Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. *Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death*. PLoS Pathog 2012; 8: e1002507.
29. Aguilo JI, Alonso H, Uranga S, Marinova D, Arbués A et al. *ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of Mycobacterium tuberculosis*. Cellular Microbiology 2013; 15, 1994-2005.
30. Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, V. K. Kuchroo. *CD28/B7 costimulation: a review*. Crit. Rev. Immunol. 1998; 18: 389-418.
31. McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, A. H. Sharpe. *The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells*. Immunol. Rev. 1998; 165: 231-247.
32. Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A, Young DB. *Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification*. PLoS Pathog 2005; 1:269–278.
33. Pethe K, Swenson DL, Alonso S, Anderson J, Wang C, et al. *Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 13642–13647.