



Grupo de Genética de Micobacterias
Departamento de Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública

“Optimización de ensayos inmunológicos con células
sanguíneas de ratón para evaluación de vacunas de
tuberculosis.”

Trabajo de Fin de Máster en Biología Molecular y Celular
dirigido por Juan Ignacio Aguiló Anento

Claudia Guerrero Perales

Curso 2018/2019

Don Juan Ignacio Aguiló Anento, investigador Doctor Colaborador Senior del Grupo de Genética de Micobacterias del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICA

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado “Optimización de ensayos inmunológicos con células sanguíneas de ratón para evaluación de vacunas de tuberculosis.”, presentado por Claudia Guerrero Perales, ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de Genética de Micobacterias del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Zaragoza y reúne los requisitos para ser presentado por su autora para optar al Máster en Biología Molecular y Celular por la Universidad de Zaragoza

Que el trabajo de experimentación animal realizado en este Trabajo de Fin de Máster fue llevado a cabo por personal formado con la categoría de “formación del personal responsable de dirigir y diseñar los procedimientos con animales de experimentación animal, Categoría C”.

Zaragoza, a 20 de junio de 2019.

Fdo. Juan Ignacio Aguiló Anento

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen/Abstract.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. La tuberculosis.....	2
2.2. Vacunas contra la tuberculosis.....	4
2.2.1. Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).....	4
2.2.2. MTBVAC.....	5
2.2.2.1. ESAT6 y CFP10 en la protección mediada por MTBVAC.....	6
2.3. Métodos de diagnóstico en tuberculosis.....	8
2.3.1. Prueba de la tuberculina.....	8
2.3.2. Nuevas técnicas de diagnóstico <i>in vitro</i> de la infección tuberculosa: <i>Interferon gamma release assays</i> (IGRA).....	9
2.3.2.1. EspC como nuevo antígeno en el diagnóstico de tuberculosis.....	11
3. Hipótesis y objetivos.....	13
4. Materiales y métodos.....	15
4.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo empleados.....	15
4.2. Experimentación animal.....	16
4.3. Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.....	17
4.3.1. Extracción de DNA genómico en micobacterias.....	17
4.3.2. Extracción de RNA en micobacterias.....	18
4.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
4.3.4. Electroforesis de DNA y RNA.....	20
4.3.5. PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	20
4.3.6. Extracción de proteínas.....	21
4.3.7. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE) y Western Blot.....	22
4.3.8. Análisis de la inmunidad en esplenocitos.....	22
4.4. Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.....	24
4.4.1. Aislamiento de células blancas en sangre de ratón.....	24
4.4.2. Marcaje intracelular de IFN- γ	24
4.4.3. EliSPOT IFN- γ	25
5. Resultados.....	28
5.1. Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.....	28
5.1.1. Comprobación de la integración de los plásmidos pMV361: <i>cfp10</i> y pMV361: <i>cfp10 dss</i> en el genoma de MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i>	28
5.1.2. Estudio de la expresión del gen <i>cfp10</i>	29
5.1.3. Análisis de la expresión intracelular y extracelular de CFP10.....	31
5.1.4. Análisis de la inmunidad en esplenocitos.....	32

5.2. Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.....	33
5.2.1. Optimización de protocolos de aislamiento de células blancas de sangre de ratón.....	33
5.2.2. Análisis de la inmunidad en sangre de ratón mediante marcaje intracelular de IFN-γ.....	34
5.2.3. Análisis de la inmunidad en sangre de ratón mediante ELISPOT de IFN-γ.....	37
6. Discusión.....	42
7. Conclusiones/Conclusions.....	47
8. Bibliografía.....	50
9. Anexos.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 2.1. Infección por <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 2.2. Desarrollo global de nuevas vacunas de TB en proyecto.....	5
Figura 5.1. Amplificación obtenida en las PCRs realizadas para verificar la integración de los plásmidos pMV361: <i>cfp10</i> y pMV361: <i>cfp10 dss</i> en el genoma de MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i>	29
Figura 5.2. Control de calidad de las extracciones de RNA.....	30
Figura 5.3. Expresión de <i>cfp10</i>	30
Figura 5.4. Expresión y secreción de CFP10.....	31
Figura 5.5. Producción de IFN- γ tras estimulación durante 48 horas con PPD (5 μ g/mL) y CFP10 (2 μ g/mL) de esplenocitos de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC, MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i> , MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i> pMV361: <i>cfp10</i> y MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i> pMV361: <i>cfp10 dss</i>	33
Figura 5.6. Aislamiento de células blancas a partir de sangre de ratón.....	34
Figura 5.7. Procedimiento de selección de las poblaciones por citometría de flujo.....	36
Figura 5.8. Porcentaje de células CD3+CD4+IFN- γ + respecto a las células CD3+CD4+ tras la estimulación durante 24 horas con PPD (10 μ g/mL) o PepMix TM <i>M. tuberculosis</i> CFP10 (10 μ g/mL) en sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i>	37
Figura 5.9. Número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con PPD (10 μ g/mL) o PepMix TM <i>M. tuberculosis</i> CFP10 (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i>	38
Figura 5.10. Número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con CFP10 proteína (10 μ g/mL) o PepMix TM <i>M. tuberculosis</i> CFP10 (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ <i>esat6</i> Δ <i>cfp10</i>	39

Figura 5.11. Número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con CFP10 proteína, ESAT6 proteína y EspC proteína (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10.....40

Figura 5.12. Representación individual del número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con CFP10 proteína, ESAT6 proteína y EspC proteína (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10.....41

ABREVIATURAS

- ADC:** Albúmina, dextrosa y catalasa
- APC:** *Allophycocyanin*
- BCG:** Bacilo de Calmette-Guérin
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- CD:** *Cluster of differentiation*
- CFP10:** *10 kDa culture filtrate protein*
- C_T:** Ciclo umbral
- CTAB:** Bromuro de cetiltrimetilamonio
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico (ADN)
- D.O.:** Densidad óptica
- ESAT6:** *6 KDa early secretory antigen target*
- EspC:** *ESX-1 substrate protein C*
- ESX-1:** *ESAT6 system 1*
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- g:** Fuerza g
- HRP:** Peroxidasa de rábano
- Hyg:** Higromicina
- IFN- γ :** Interferón gamma
- IGRA:** *Interferon gamma release assays*
- IL:** Interleuquina
- kDa:** Kilodalton

- Km:** Kanamicina
- mA:** Miliamperios
- MAPc:** Complejo de ácido micólico, arabinogalactano y peptidoglicano
- MDR-TB:** Cepas de tuberculosis multirresistentes
- MDR/RR-TB:** Cepas de tuberculosis multirresistentes o rifampicina resistentes
- MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad
- MSIP:** Multiscreen_{HTS}IP
- O/N:** *Overnight* (durante toda la noche)
- pb:** Pares de bases
- PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PE:** Ficoeritrina
- PDIM:** *phthiocerol dimycocerosates*
- PPD:** Derivado proteico purificado
- PSA:** Persulfato amónico
- PT:** Prueba de la tuberculina
- PVDF:** Fluoruro de polivinilideno
- QFT-GIT:** QuantiFERON-TB Gold In Tube
- qRT-PCR:** PCR en tiempo real
- RD1:** Región de diferencia 1
- RQ:** Cantidad relativa
- RNA:** Ácido ribonucleico (ARN)

- SDS**: Dodecilsulfato sódico
- s.e.m.**: Error estándar de la media
- SFB**: Suero fetal bovino
- SFC**: *Spots-forming cells*
- ss**: Secuencia señal
- TB**: Tuberculosis
- TBE**: Tris Borato EDTA
- TE**: Tris EDTA
- TEMED**: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
- TMB**: 3,3',5,5'-Tetramethylbencidina
- TNF- α** : Factor de necrosis tumoral alpha
- UFC**: Unidades formadoras de colonias
- VIH**: Virus de la inmunodeficiencia humana
- (**v/v**): Relación volumen/volumen
- (**w/v**): Relación peso/volumen
- XDR-TB**: Cepas de tuberculosis extremadamente resistentes

1. RESUMEN

MTBVAC es una vacuna viva atenuada de *Mycobacterium tuberculosis* que actualmente se encuentra en ensayos clínicos. MTBVAC contiene los principales antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*, ESAT6 y CFP10, los cuáles están ausentes en BCG. Recientemente se ha descrito que ESAT6 y CFP10 podrían estar implicados en la mayor eficacia de MTBVAC respecto a BCG. En este trabajo, se llevó a cabo la caracterización molecular de distintas cepas de MTBVAC para dilucidar el papel de CFP10 en la protección mediada por MTBVAC. Sin embargo, las cepas utilizadas no mostraron complementación de CFP10 impidiendo continuar con los estudios.

Por otro lado, los métodos actuales de diagnóstico de TB conocidos como IGRA utilizan antígenos presentes en MTBVAC lo que dificulta la diferenciación entre vacunados con MTBVAC e infectados por *M. tuberculosis* ya que ambos casos generan respuesta contra estos antígenos. En este trabajo, se ha llevado a cabo la optimización de un ensayo tipo EliSPOT que permite evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón utilizando los antígenos ESAT6, CFP10 y EspC.

1. ABSTRACT

MTBVAC is a live attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine, currently under clinical development. MTBVAC contains the major immunodominant antigens of *M. tuberculosis*, ESAT6 and CFP10, which are absent from BCG. Recently, it has been described that ESAT6 and CFP10 could be involved in the greater efficacy of MTBVAC regarding BCG. In this project, molecular characterization of different strains of MTBVAC was carried out in order to study the role of CFP10 in the protection mediated by MTBVAC. Nevertheless, the strains used in this project did not show complementation therefore blocking the studies.

On the other hand, currently TB diagnosis methods known as IGRA use antigens that MTBVAC contains making difficult the differentiation between MTBVAC vaccination and *M. tuberculosis* infection since both cases generate response against these antigens. In this project, the optimization of an EliSPOT assay was carried out in order to evaluate the specific response of MTBVAC in mice's blood using ESAT6, CFP10 and EspC antigens.

2. ANTECEDENTES

2.1. La tuberculosis.

En 1882, Robert Koch descubrió el agente causante de la tuberculosis (TB). La tuberculosis es una enfermedad respiratoria infecciosa causada por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Las micobacterias son clasificadas como bacterias Gram-positivas, aunque presentan rasgos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La pared celular de *M. tuberculosis* está compuesta por 3 componentes: la membrana plasmática, el complejo MAPc (complejo de ácido micólico, arabinogalactano y peptidoglicano) unido covalentemente a la membrana plasmática y una cápsula rica en polisacáridos (Crick et al., 2001). Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos formados por 70-80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura. La característica estructura de la pared celular de las micobacterias es responsable de gran parte de sus propiedades como por ejemplo su ácido-alcohol resistencia.

Globalmente, 10 millones de personas desarrollaron TB en 2017. Actualmente, la TB continúa siendo una de las mayores causas de mortalidad, principalmente en países en vías de desarrollo. En 2017, la TB causó 1,3 millones de muertes de pacientes VIH-negativos y 300000 muertes de pacientes VIH-positivos. Aunque la TB afecte principalmente a países en vías de desarrollo, también se han reportado nuevos casos en países desarrollados. Por ejemplo, en el año 2017, 4600 nuevos casos fueron registrados en España (“WHO | Global tuberculosis report 2018,” n.d.).

Globalmente, el 3,5% de los nuevos casos de TB y el 18% de los casos tratados con anterioridad son MDR/RR-TB. Entre los casos de MDR-TB de 2017, aproximadamente el 8,5% son casos causados por cepas extremadamente resistentes (XDR-TB) (“WHO | Global tuberculosis report 2018,” n.d.).

El reservorio de *Mycobacterium tuberculosis* es el hombre (Comas et al., 2013). Aunque *M. tuberculosis* sea principalmente un patógeno pulmonar, también puede afectar a otras partes del cuerpo. La TB causa enfermedad pulmonar principalmente en adultos mientras que en niños el espectro de la enfermedad es diferente (Esposito et al., 2013).

La infección con *M. tuberculosis* puede evolucionar desde una infección asintomática en el huésped, en la cual la bacteria se encuentra aislada en granulomas (infección de TB latente), a una TB activa, la cual es transmisible y el paciente muestra síntomas que pueden incluir tos, fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso. Solamente la TB activa es contagiosa (Pai et al., 2016).

La infección comienza cuando *M. tuberculosis* entra a los pulmones vía inhalatoria, a continuación alcanza el espacio alveolar donde se encuentran los macrófagos alveolares. Los macrófagos alveolares constituyen el principal tipo celular infectado por *M. tuberculosis*. Los macrófagos alveolares internalizan la bacteria mediante fagocitosis (Pai et al., 2016). Una vez internalizada, *M. tuberculosis* bloquea la fusión del fagosoma con el lisosoma, asegurando su supervivencia (Russell, 2011). A continuación, gracias a la actividad del sistema de secreción ESX-1 (ESAT6 *system* 1), *M. tuberculosis* puede romper la membrana del fagosoma, provocando la liberación de los productos bacterianos, incluido el DNA bacteriano, en el citoplasma del macrófago (Houben et al., 2012) (Wel et al., 2007).

Tras la infección de los macrófagos alveolares en las vías aéreas, *M. tuberculosis* gana acceso al intersticio pulmonar, donde el proceso de infección evoluciona. La bacteria accede al parénquima pulmonar infectando las células epiteliales o mediante la migración al epitelio de macrófagos alveolares infectados. Una vez que la infección primaria está establecida, las células dendríticas infectadas (Wolf et al., 2008) o los monocitos inflamatorios (Samstein et al., 2013) transportan *M. tuberculosis* a los nódulos linfoides pulmonares para llevar a cabo la presentación antigénica a los linfocitos T. Este hecho conlleva el reclutamiento de un número elevado de células al sitio de infección, generándose el granuloma (Pai et al., 2016). Si la carga bacteriana es demasiado elevada, el granuloma puede no contener la infección (Lin et al., 2014) y la infección puede ser diseminada a otros órganos, incluyendo el cerebro. En esta fase, la bacteria puede entrar al torrente sanguíneo o re-infectar el tracto respiratorio. En esta fase de la infección, el huésped pasa de una infección de TB latente a TB activa (Pai et al., 2016).

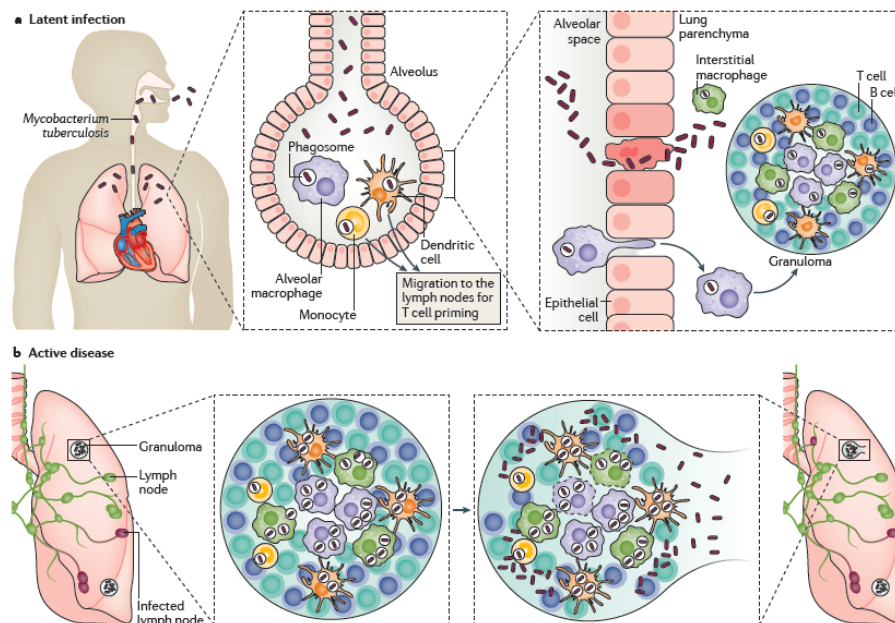


Figura 2.1. Infección por *M. tuberculosis*. (Pai et al., 2016)

2.2. Vacunas contra la tuberculosis.

2.2.1. Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

La actual vacuna contra la TB es BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, el agente etiológico de TB en ganado bovino (Brosch et al., 2007). BCG fue utilizada por primera vez en 1921, BCG fue administrada oralmente a un niño cuya madre había fallecido por tuberculosis un día antes de la vacunación. El niño no mostró efectos adversos debidos a la vacunación con BCG y no desarrolló TB diseminada, la forma más común de enfermedad tuberculosa en esa época, adquirida principalmente por el consumo de leche no pasteurizada de vacas infectadas (Kaufmann et al., 2017).

BCG fue desarrollada mediante subcultivos sucesivos de *M. bovis*, su atenuación es debida principalmente a la pérdida de la región RD1 que contiene genes que codifican para los principales factores de virulencia ESAT6 (6 kDa *early secretory antigenic target* codificado por *esat6*) y CFP10 (10 kDa *culture filtrate protein* codificado por *cfp10*), y otros genes implicados en la secreción de ESAT6 y CFP10 (Brosch et al., 2007) (Pym et al., 2002). Además, ESAT6 y CFP10 constituyen las proteínas más inmunogénicas de *M. tuberculosis*, y ESAT6 está incluido en la construcción de nuevas

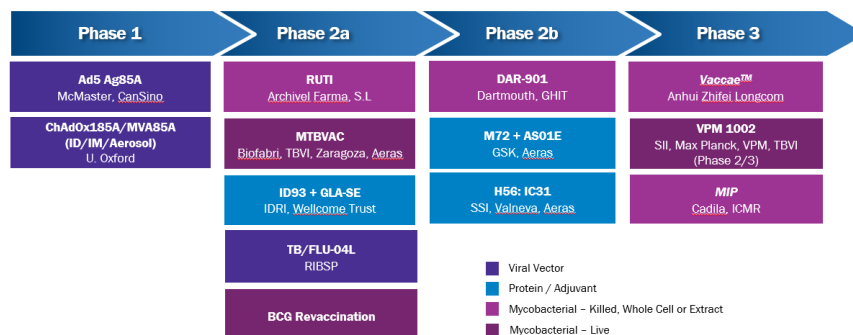
candidatas a vacunas de TB (Aagaard et al., 2011) (Gröschel et al., 2017) (Pym et al., 2003) (Aguilo et al., 2017).

Actualmente, BCG es la única vacuna con licencia contra la TB, administrada vía intradermal en el nacimiento. BCG proporciona protección contra las formas severas de TB (meningitis tuberculosa y TB diseminada) en niños. Sin embargo, proporciona una protección variable e inconsistente contra la TB pulmonar, la forma más común de TB en adultos y adolescentes y la causante de la propagación de la enfermedad (Fine, 1995). Por ello, el desarrollo de nuevas vacunas capaces de prevenir las formas respiratorias de TB podría tener un enorme impacto en la prevención de la transmisión y el control de la enfermedad (Marinova et al., 2013) (“WHO | Global tuberculosis report 2018,” n.d.).

2.2.2. MTBVAC.

En la actualidad, existe un total de 12 candidatas a posibles vacunas de TB en proyecto. Actualmente, la vacuna viva atenuada más avanzada en ensayos clínicos es la BCG recombinante VPM1002, la cual se encuentra en preparación para comenzar la fase III de ensayos clínicos (“WHO | Global tuberculosis report 2018,” n.d.). La otra vacuna candidata viva atenuada de *M. tuberculosis* es MTBVAC (Universidad de Zaragoza), siendo la primera vacuna de este tipo que ha entrado exitosamente en ensayos clínicos en la historia de la vacunología humana. Los objetivos de estas vacunas vivas atenuadas es reemplazar BCG en el nacimiento y prevenir las formas de TB respiratorias, las cuales transmiten la enfermedad, en adultos y adolescentes (Gonzalo-Asensio et al., 2017).

Global Clinical Pipeline



AERAS | Advancing Tuberculosis Vaccines for the World

Revised on 8/1/18
Please note: Information is self-reported by vaccine sponsors

Figura 2.2. Desarrollo global de nuevas vacunas de TB en proyecto. Fuente: AERAS (Advancing Tuberculosis Vaccines for the World).

MTBVAC fue construida a partir del aislado clínico Mt103 de *M. tuberculosis* (Arbues et al., 2013), perteneciente al Linaje 4 de *M. tuberculosis* que junto al Linaje 2 (cepas Beijing) representan los linajes más extendidos de transmisión respiratoria en humanos (Stucki et al., 2016). De acuerdo a los requisitos del Consenso de Ginebra para la construcción de vacunas vivas atenuadas de micobacterias (Kamath et al., 2005), MTBVAC fue construida mediante la generación de dos deleciones independientes genéticamente estables, sin marcadores de resistencia a antibióticos, en los genes *phoP* y *fadD26* que codifican para dos de los principales factores de virulencia (Arbues et al., 2013).

PhoP es un factor de transcripción que controla aproximadamente el 2% de la capacidad codificante del genoma de *M. tuberculosis*, incluyendo la producción de los lípidos inmunomoduladores de la pared celular y la secreción de ESAT6 por lo que los mutantes de *phoP* producen ESAT6 pero son incapaces de exportarlo (Frigui et al., 2008). La deleción de *fadD26* provoca la inhibición de la síntesis de los PDIM que son lípidos de virulencia de la envoltura de *M. tuberculosis* (Camacho et al., 1999).

MTBVAC ha completado con éxito la primera fase en ensayos clínicos para evaluar seguridad e inmunogenicidad en adultos voluntarios sanos en Suiza (Spertini et al., 2015) y ya ha sido probada en recién nacidos en países endémicos de TB (identificador del ensayo clínico: NCT02729571).

MTBVAC ha demostrado una mayor protección que BCG. Este hecho podría ser debido al genoma de MTBVAC (Aguilo et al., 2017). Mientras que BCG no contiene la región RD1 que codifica para principales factores de virulencia (Pym et al., 2002), MTBVAC presenta todo el repertorio de antígenos de *M. tuberculosis* reconocidos por la células T (Aguilo et al., 2017).

2.2.2.1. ESAT6 y CFP10 en la protección mediada por MTBVAC.

Recientemente, se ha visto que, en ratones C3H/HeNRj el número de CFUs de *M. tuberculosis* en los pulmones de ratones infectados (posteriormente a la vacunación) era similar en los ratones vacunados con BCG y los vacunados con MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$. Sin embargo, el número de CFUs era menor en los ratones vacunados con MTBVAC. Por lo tanto, la deleción de estos antígenos reducía la eficacia de MTBVAC

a niveles similares a los de BCG. Estos resultados sólo se observaron en ratones C3H/HeNRj (no se observaron ni en C57BL/6 ni en BALB/c). Además, solo los ratones C3H/HeNRj presentaron respuesta a ESAT6 y CFP10 indicando que el haplotipo presente en el MHC de estos ratones, H-2k, era el único haplotipo de los ratones estudiados capaz de reconocer ESAT-6 y CFP10 (Aguilo et al., 2017).

La ausencia de ESAT6 y CFP10 podría explicar la baja protección de BCG contra la tuberculosis pulmonar (Aguilo et al., 2017). ESAT6 y CFP10, y toda la maquinaria implicada en su secreción son altamente expresados en la fase temprana de la infección debido a que ESAT6 está implicado en el escape de *M. tuberculosis* del fagosoma de los macrófagos alveolares (Simeone et al., 2012). Por lo tanto, el hecho de que MTBVAC produzca una respuesta contra antígenos como ESAT6 y CFP10 altamente expresados en la fase temprana podría suponer una ventaja. Este hecho podría suponer un mejor reconocimiento de las células infectadas con *M. tuberculosis*, ya que sus MHC se deberían expresar en asociación con epítomos derivados de antígenos inmunodominantes como ESAT6 y CFP10 (Aguilo et al., 2017).

Además, MTBVAC es capaz de secretar CFP10 pero no ESAT6 puesto que presenta una delección en *phoP* implicado en la secreción de ESAT6 (Aguilo et al., 2017). Sin embargo, en *M. tuberculosis* ESAT6 y CFP10 son co-secretadas (Renshaw et al., 2002). Para su secreción está implicado el C-terminal de CFP10 que interacciona con Rv3781, un componente citosólico del sistema ESX-1 que a su vez interacciona con una proteína de membrana (Rv3780) (Champion et al., 2006). Recientemente, se ha visto que ESAT6 y CFP10 pueden ser secretados independientemente en determinadas condiciones (Gao et al., 2004) (Pang et al., 2013). Por ejemplo, si el sistema ESX-1 se encuentra alterado, CFP10 es secretado independientemente de ESAT6. Tal vez MTBVAC posea un sistema ESX-1 disfuncional puesto que presenta una delección en *phoP*, el cual está implicado en la regulación de distintos genes del sistema ESX-1 (Frigui et al., 2008) (Solans et al., 2014a) (Solans et al., 2014b).

El hecho de que en ausencia de ESAT6 y CFP10 la eficacia de MTBVAC se vea reducida sugiere la implicación de estos antígenos en la protección mediada por MTBVAC. Además, CFP10 es secretado por MTBVAC a diferencia de ESAT6 (Aguilo et al., 2017) lo que podría suponer un procesamiento antigénico diferente por parte del sistema inmune del huésped (Grotzke et al., 2010). Este hecho podría suponer que

ESAT6 y CFP10 indujeran respuestas diferentes en el huésped, y en consecuencia, que la protección mediada por cada uno de ellos fuese distinta. Por lo tanto, sería necesario estudiar de manera separada la protección mediada por ESAT6 y CFP10 en MTBVAC (Aguilo et al., 2017).

2.3. Métodos de diagnóstico en tuberculosis.

2.3.1. Prueba de la tuberculina.

Actualmente, la técnica habitual para el diagnóstico de TB es la prueba de la tuberculina (PT), también conocida como test de Mantoux. La prueba consiste en realizar una inyección intradérmica en la cara anterior del antebrazo de derivado proteico purificado (PPD). El PPD es una mezcla de proteínas purificadas a partir de un cultivo de *M. tuberculosis*. El principal inconveniente de esta prueba radica en que las proteínas utilizadas no son específicas de *M. tuberculosis*, sino que son compartidas con otras micobacterias no tuberculosas y *M. bovis*, lo que disminuye la especificidad de esta prueba (Arias Guillén, 2011).

El individuo infectado reacciona al PPD y muestra una respuesta de hipersensibilidad, y a las 48-72 horas aparece una induración en la zona de la inyección. A las 72 horas de la inyección se realiza la lectura midiendo el diámetro transversal de la induración según el eje longitudinal del antebrazo. El resultado se registra en milímetros. En el caso de no existir induración sino únicamente eritema, se interpreta como 0 mm (Arias Guillén, 2011).

Se considera positiva una induración cuando una persona no vacunada con BCG presenta una induración con un diámetro superior a 5 mm. El hecho de que el PPD presente proteínas de *M. tuberculosis* que son compartidas con *M. bovis* y otras micobacterias provoca falsos positivos en individuos vacunados con BCG o infectados con otras micobacterias. Para los pacientes vacunados, se considera que una induración de más de 15 mm de diámetro se trata de un resultado positivo para infección tuberculosa. No obstante, pacientes vacunados con BCG con induraciones de menos de 15 mm de diámetro pueden presentar infección por TB por lo que se tienen que tener en

cuenta otros factores como la frecuencia de contacto del paciente con personas infectadas o si se trata de pacientes VIH positivos (Arias Guillén, 2011).

2.3.2. Nuevas técnicas de diagnóstico *in vitro* de la infección tuberculosa: *Interferon gamma release assays* (IGRA).

En los últimos años han sido aprobadas técnicas de diagnóstico basados en la cuantificación *in vitro* de la respuesta inmune celular. Estos métodos son los denominados en la literatura anglosajona como *interferon gamma release assays* (IGRA) que permiten detectar la liberación de la citoquina interferón gamma (IFN- γ) en respuesta a antígenos de tuberculosis específicos (Domínguez y Ruiz-Manzano, 2006).

El IFN- γ es una citoquina implicada en el control de la infección tuberculosa, y su participación es imprescindible en la respuesta inmune protectora frente a dicho patógeno. El IFN- γ es producido principalmente por los linfocitos T CD4+, activando a los macrófagos infectados, con la consiguiente liberación de IL-1 y TNF- α , que limitan el desarrollo de la infección (Arias Guillén, 2011).

Actualmente, existen dos técnicas comercializadas para el diagnóstico *in vitro* de la infección tuberculosa: el QuantiFERON-TB-Gold In Tube (Qiagen, Australia) y el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec[®], Reino Unido) (Arias Guillén, 2011).

El QuantiFERON-TB-Gold In Tube (QFT-GIT) utiliza 3 antígenos: ESAT6, CFP10 y TB 7.7 (Arias Guillén, 2011). Como se explicó anteriormente ESAT6 y CFP10 son factores de virulencia de *M. tuberculosis* altamente inmunogénicos. TB 7.7. (codificado por *Rv2654c*) es el componente antitoxina de un sistema toxina-antitoxina de tipo II, también altamente inmunogénico. TB 7.7. se encuentra codificado en la región RD11, resultante de la inserción de un fago en *M. tuberculosis* por lo que está ausente en *M. bovis* BCG y en micobacterias no tuberculosas (Behr et al., 1999) (Aagaard et al., 2004). El kit contiene 3 tubos: el primero de ellos contiene los antígenos específicos (ESAT6, CFP10 y TB 7.7), el segundo de ellos contiene fitohemaglutinina que sirve como control positivo y un tercer tubo que no contiene reactivos utilizado como control negativo. La sangre del paciente es extraída (3 mL) directamente en los tubos y se lleva a cabo la incubación durante 18-22 horas en estufa a 37°C. A continuación, los tubos se centrifugan y el plasma obtenido se emplea para realizar el enzimoimmunoensayo

(ELISA) que permite detectar y cuantificar la concentración de IFN- γ liberada por los linfocitos del paciente (Arias Guillén, 2011). Se considera positivo los valores de IFN- γ superiores a 0,35 IU/mL y negativos los inferiores a este valor.

A diferencia del QFT-GIT, el T-SPOT.TB no utiliza el plasma obtenido de la sangre para realizar un ensayo ELISA. Esta técnica realiza un ensayo conocido como ELISpot. En primer lugar, se deben extraer los PBMCs del paciente mediante un gradiente de Ficoll-Paque. Las células obtenidas deben ser cuantificadas y se siembran en torno a 250000 células por pocillo. La placa contiene 4 pocillos que contienen: uno de ellos el antígeno ESAT6, otro el antígeno CFP10, y los otros 2 sirven como control positivo y negativo. Una vez sembradas las células en la placa, esta se incuba durante 18-22 horas a 37°C en estufa de CO₂. Los pocillos de la placa poseen en su fondo anticuerpos anti-IFN- γ que capturarán el IFN- γ producido por los linfocitos T incubados. Tras la incubación, se realiza el *immunospot* utilizando un anticuerpo secundario anti-IFN- γ marcado que permite cuantificar el número de células productoras de IFN- γ (número de *spots*) (Arias Guillén, 2011). Se considera un resultado positivo cuando el número de *spots* es superior a 8 y negativo cuando es inferior a 4. Cuando el número de *spots* se encuentra comprendido entre 4 y 8 no se puede obtener un resultado exacto, siendo necesario valorar otro tipo de pruebas como radiografía de tórax o cultivo de esputo (“WHO | Global tuberculosis report 2018,” n.d.)

El hecho de que los IGRA utilicen antígenos ausentes en BCG y específicos del complejo *M. tuberculosis* permite reducir el número de falsos positivos proporcionados por la PT debido a pacientes vacunados con BCG y pacientes infectados con micobacterias no tuberculosas. Por lo tanto, los IGRA pueden ser utilizados como prueba complementaria a la PT para obtener resultados con mayor exactitud (Arias Guillén, 2011) (Domínguez and Serra-Vidal, 2013).

Sin embargo, estos kits de diagnóstico utilizados actualmente no están preparados para ser utilizados con pacientes vacunados con nuevas vacunas en proyecto como MTBVAC. MTBVAC contiene los antígenos específicos utilizados en estos ensayos lo que conllevaría a falsos positivos puesto que el sistema inmune de los pacientes vacunados con MTBVAC mostraría respuesta frente a estos antígenos (Marinova et al., 2017).

En la fase Ia de los ensayos clínicos de MTBVAC en adultos en Lausanne (Suiza), los datos de EliSPOT mostraron que la respuesta a ESAT6 en pacientes vacunados se mantenía por debajo del umbral obtenido en pacientes infectados con *M. tuberculosis*. Sin embargo, se observó un aumento transitorio de la respuesta a CFP10 por encima del límite positivo en 2 de los 9 pacientes vacunados con la dosis intermedia de MTBVAC (5×10^4 UFC) y en 1 de los pacientes vacunados con la dosis alta de MTBVAC (5×10^5 UFC) en el día 18 tras la vacunación. En el día 270 (final del estudio) la respuesta a CFP10 había disminuido por debajo del umbral positivo de infección (Spertini et al., 2015). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en cabras vacunadas con SO2 (prototipo de MTBVAC) que mostraron una respuesta transitoria a ESAT6 y CFP10 en el 50% de los animales vacunados (Bezoz et al., 2015). A pesar de que el número de sujetos en la fase Ia era demasiado pequeño como para tener significación estadística, es necesaria una caracterización clínica de la respuesta inducida por MTBVAC a estos antígenos y a otros nuevos (Marinova et al., 2017).

Por lo tanto, es necesario optimizar los actuales métodos de diagnóstico (QuantiFERON/ELISpot TB) de tal manera que permitan distinguir entre vacunados con MTBVAC e infectados por *M. tuberculosis* (Marinova et al., 2017).

2.3.2.1. EspC como nuevo antígeno en el diagnóstico de tuberculosis.

El antígeno EspC (ESX-1 *substrate protein C*) (codificado por *Rv3615c*) es secretado junto a ESAT6, CFP10 y EspA en *M. tuberculosis* (Lou et al., 2017). *Rv3615c* se encuentra fuera de la región RD1. Sin embargo, la secreción de EspC es dependiente del sistema ESX-1 codificado en la región RD1. Recientemente, se ha visto que EspC es tan inmunodominante en *M. tuberculosis* como los antígenos ESAT6 y CFP10 lo que le convierte en un nuevo antígeno candidato en el diagnóstico de tuberculosis. EspC contiene epítomos reconocidos por células CD4+ y CD8+, lo que conlleva a una liberación de IFN- γ que puede ser detectada mediante IGRA. Por todas estas razones, EspC parece ser un nuevo candidato a antígeno en el diagnóstico de TB (Millington et al., 2011).

Además, el sistema ESX-1 es fuertemente regulado de manera positiva por *phoP*. Se ha visto que en mutantes para *phoP* de *M. tuberculosis* H37Rv la secreción del antígeno

EspC se ve disminuida (Sayes et al., 2018). MTBVAC posee una delección en *phoP* por lo que EspC podría ser un potencial candidato a antígeno para el diagnóstico de tuberculosis mediante IGRA puesto que permitiría distinguir entre vacunados con MTBVAC e infectados por *M. tuberculosis*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo ha sido dividido en dos proyectos para llevar a cabo su realización. El primero de ellos es “Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis” y el segundo “Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón”.

-Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.

Como se explicó anteriormente, tanto ESAT6 como CFP10 parecen estar fuertemente implicados en la protección mediada por MTBVAC. Sin embargo, el hecho de que CFP10 sea secretado mientras que ESAT6 no lo sea podría suponer que la respuesta, y en consecuencia, la protección mediada por estos antígenos fuese diferente (Aguilo et al., 2017). Para dilucidar el papel diferencial de ambos antígenos, se contaba previamente a la ejecución de este trabajo con cuatro cepas derivadas de MTBVAC: MTBVAC, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 dss. MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 (Aguilo et al., 2017) se trataba de una cepa mutante para ambos antígenos utilizada previamente en otros estudios para dilucidar el papel de ambos antígenos en la protección mediada por MTBVAC. La cepa MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 había sido complementada con *cfp10* “wild type” mientras que MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 dss había sido complementada con *cfp10 dss*, una variante de *cfp10* que presenta una delección en los últimos 7 aminoácidos implicados en la secreción del mismo. En este trabajo, se ha llevado a cabo la caracterización molecular de dichas cepas con los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobación de la integración de los plásmidos pMV361:cfp10 y pMV361:cfp10 dss en el genoma de MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10.
2. Estudiar la expresión del gen *cfp10* en las cepas anteriores mediante Real Time PCR (qRT-PCR).
3. Analizar las proteínas intracelulares y extracelulares de las cepas anteriores mediante Western-Blot.
4. Analizar la inmunidad en esplenocitos de ratones vacunados con las anteriores cepas.

-Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.

El hecho de que MTBVAC presente los antígenos utilizados en el diagnóstico de tuberculosis requiere la previa optimización de ensayos inmunológicos en animales para evitar falsos positivos debidos a la vacunación (Marinova et al., 2017). Por otro lado, la sangre es el compartimento inmunológico utilizado para la evaluación de vacunas en ensayos clínicos. En este trabajo, se llevó a cabo la optimización de ensayos inmunológicos en sangre de ratón, el mismo compartimento utilizado en humanos, para obtener así datos más translacionables. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es optimizar ensayos inmunológicos que permitan evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón. Para alcanzar este objetivo, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización de protocolos de aislamiento de células blancas a partir de sangre de ratón.
2. Optimización de ensayos inmunológicos tipo ICS (*IFN- γ Intracellular Staining*, marcaje intracelular de IFN- γ) para evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón.
3. Optimización de ensayos inmunológicos tipo EliSPOT IFN- γ para evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón utilizando antígenos usados en la clínica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo empleados.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la vacuna viva atenuada de *M. tuberculosis*, MTBVAC (Universidad de Zaragoza), y el mutante MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 (Aguilo et al., 2017). Este mutante presentaba resistencia a kanamicina e higromicina (Km^R e Hyg^R), pero fue cultivado sucesivamente en medio con kanamicina hasta perder la resistencia a higromicina previamente al desarrollo de este trabajo. A partir de esta nueva cepa MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 kanamicina resistente e higromicina sensible se llevó a cabo el desarrollo de este trabajo.

Además, se utilizó el plásmido pMV361 modificado con Hyg^R para la integración de dos genes diferentes en el genoma de MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10. En primer lugar, el gen *cfp10* (*esxB*-Rv3874). En segundo lugar, una variante del gen *cfp10* (*cfp10 dss*), la cual presenta una delección en los últimos 7 aminoácidos del extremo C-terminal, correspondientes a la secuencia señal (ss), implicados en la secreción del complejo ESAT6-CFP10 en *M. tuberculosis*. Las transformaciones de MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 con pMV361:*cfp10* y pMV361:*cfp10 dss* fueron llevadas a cabo en este laboratorio previamente al desarrollo de este trabajo. Tanto el gen *cfp10* como *cfp10 dss* fueron clonados en el plásmido pMV361 incluyendo su secuencia codificante, su correspondiente terminador de la transcripción y 1000 pb *upstream* a partir del inicio de transcripción con el objetivo de que la expresión de ambos genes estuviese regulada por su propio promotor. Las secuencias clonadas se recogen en la **Figura 9.1** del Anexo.

Los cultivos de las anteriores cepas requeridos para el desarrollo de este trabajo fueron realizados en medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementados con ADC (Difco) al 10% y Tween-80 (Sigma) al 0,05% (v/v) (7H9-ADC-Tween) o en medio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) suplementados con ADC al 10% (7H10 ADC) e incubados a 37°C. En los casos necesarios, los cultivos fueron suplementados con higromicina y kanamicina a la concentración de 20 μ g/mL. Las suspensiones bacterianas utilizadas para la vacunación fueron preparadas en PBS a partir de alícuotas de suspensiones bacterianas conservadas con glicerol al 5% y previamente cuantificadas mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) y diluciones seriadas.

4.2. Experimentación animal.

Todos los ratones utilizados durante el desarrollo de este trabajo fueron mantenidos en condiciones controladas. El trabajo experimental fue desarrollado de acuerdo con las directrices europeas y nacionales para la protección de animales de experimentación y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza (protocolo aprobado PI46/18). El trabajo experimental con animales fue llevado a cabo por el director de este trabajo, Juan Ignacio Aguiló y Santiago Uranga, personal formado con la categoría de “formación del personal responsable de dirigir y diseñar los procedimientos con animales de experimentación animal, Categoría C”.

Para la optimización del protocolo de aislamiento de células blancas a partir de sangre de ratón, se les extrajo sangre a ratones sin vacunar (100-200 μ L) mediante punción de la vena facial. Las extracciones de sangre se recogieron en tubos eppendorf con 2 μ L de heparina 10000 U/mL.

Para los estudios de inmunología llevados a cabo en este trabajo, ratones hembra C3H/HeNRj (Janvier Biolabs) fueron vacunados subcutáneamente (100 μ L) con cultivos de las distintas vacunas en PBS con 10^6 UFC entre las 7-8 semanas después de su nacimiento. Se llevaron a cabo 2 experimentos con animales, el primero realizado para llevar a cabo la caracterización molecular de vacunas de tuberculosis y el segundo para la evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.

Para el primer experimento se trabajó con 18 ratones C3H/HeNRj que fueron divididos en 4 grupos de 4 ratones que fueron vacunados subcutáneamente con MTBVAC, MTBVAC Δ sat6 Δ cfp10, MTBVAC Δ sat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 y MTBVAC Δ sat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 *dss*, respectivamente y un quinto grupo formado por 2 ratones que no fueron vacunados (grupo control). Los ratones fueron sacrificados a las 4 semanas y los bazos fueron extraídos para evaluar la inmunidad.

El segundo de ellos consistente en 12 ratones C3H/HeNRj, los cuáles se dividieron en 2 grupos de 5 ratones que fueron vacunados subcutáneamente con MTBVAC y MTBVAC Δ sat6 Δ cfp10, respectivamente, y un tercer grupo formado por 1 ratón que no fue vacunado (grupo control). Se les extrajo sangre (entre 100-200 μ L) mediante punción de la vena facial a los ratones a distintos tiempos para la evaluación de la

respuesta inmunológica. Las extracciones de sangre se recogieron en tubos eppendorf con 2 μ L de heparina 10000 U/mL. Finalmente, los ratones fueron sacrificados a las 8 semanas y los bazos fueron extraídos para corroborar los resultados de respuesta inmunológica obtenidos en sangre.

4.3. Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.

4.3.1. Extracción de DNA genómico de micobacterias.

Para llevar a cabo la extracción de DNA genómico de MTBVAC, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 dss se partió de cultivos de las anteriores cepas en 10 mL de 7H9-ADC-Tween. Se resuspendió el precipitado en 400 μ L de TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM) en tubos eppendorf tras la centrifugación del cultivo a 3200g durante 5 min. A continuación, se inactivaron los cultivos calentando a 85°C en un bloque térmico (bioblock Scientific). Se añadieron 50 μ L de lisozima 10 mg/mL y se incubó al menos durante 1 hora a 37°C. Se añadieron 75 μ L de la mezcla de 72,5 μ L de SDS 10% y 2,5 μ L de 10 mg/mL de proteinasa K, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 min a 65°C para eliminar las proteínas presentes en las muestras. A continuación se añadieron 100 μ L de NaCl (Merk) 5M, seguidamente se añadieron 100 μ L de solución CTAB/NaCl que fueron mezclados con vortex y se incubó durante 10 min a 65°C para facilitar la eliminación de los polisacáridos presentes en las muestras. Se añadieron 750 μ L de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se mezcló con vortex durante 10 segundos para desnaturalizar las posibles trazas de proteínas presentes en la muestra. A continuación, se recogió el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos tras una centrifugación a 18000g durante 5 min. Se añadieron 420 μ L de isopropanol (Merk) y se dejó a -20°C durante 30 min para precipitar los ácidos nucleicos. Se llevó a cabo una centrifugación a 18000g durante 5 min para eliminar el isopropanol. Por último, se añadió etanol 70% previamente enfriado para concentrar los ácidos nucleicos, se mezcló mediante inversión y posteriormente se centrifugó a 18000g durante 5 min. Por último, el precipitado obtenido fue resuspendido en 50 μ L de agua miliQ. Una vez extraído el DNA de las distintas cepas, se procedió a su cuantificación mediante el sistema Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermofisher Scientific).

4.3.2. Extracción de RNA de micobacterias.

Para llevar a cabo la extracción de RNA se partió de cultivos de 10 mL de las cepas MTBVAC, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 *dss* en 7H9-ADC-Tween con una D.O.₆₀₀ entre 0,3 y 0,5. A continuación, los cultivos fueron repartidos en tubos falcon de 15 mL y fueron centrifugados a 3200g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante obtenido y las células fueron resuspendidas en 500 μ L de buffer de lavado (15 mL: 13,425 mL de H₂O libre de RNAasas; 1,5 mL de NaCl 8% y 75 μ L de Tween-80) y se añadió 1 mL de RNA protect reagent (Qiagen). Seguidamente, se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente (22°C). A continuación, se centrifugó a 14000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado obtenido donde se encontraban las células se guardó a -80°C.

Una vez preparadas las muestras para llevar a cabo la extracción de RNA, las células fueron resuspendidas en 400 μ L de buffer de lisis (10 mL: 9,4 mL de H₂O libre de RNAasas, 67 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5,5 (Ambion), 500 μ L de SDS 10% y 5 μ L de EDTA 0,2 M). A continuación, se añadió 1 mL de fenol-cloroformo pH 4,5 (5:1, v/v). Las células resuspendidas fueron transferidas a tubos de 2 mL con 0,8 gramos de perlas de vidrio (RNA pro blue Kit) y sometidas a Fast Prep con 2 ciclos de 45 segundos a máxima velocidad. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 18000g durante 5 min a 4°C. Se recogió la fase acuosa de cada muestra la cual contenía el RNA de las micobacterias. A continuación, se añadieron 900 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v) previamente enfriado y se mezcló cuidadosamente por inversión. Se centrifugó a 18000g durante 5 minutos a 4°C. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se añadieron 900 μ L de isopropanol y 90 μ L de acetato de sodio 3 M de pH 5,5, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C O/N para la precipitación de los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos precipitados fueron recogidos tras una centrifugación a 18000g durante 30 min a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado con 0,5 mL de etanol al 70% y se mezcló cuidadosamente por inversión. Se centrifugó de nuevo a 18000g durante 5 min a 4°C. El precipitado obtenido se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 min y una vez seco, se resuspendió en 100 μ L en agua libre de RNAasas. Para finalizar la

purificación del RNA y eliminar las contaminaciones de DNA se utilizó el kit de purificación Qiagen RNeasy Plus Mini Kit. Una vez extraído el RNA de las distintas cepas, se procedió a su cuantificación mediante el sistema Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermofisher Scientific).

Para realizar un control de calidad del RNA extraído se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para verificar que el RNA no se había degradado y una PCR para comprobar si las extracciones estaban contaminadas con DNA.

4.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica PCR fue utilizada en este trabajo para verificar la integración de los plásmidos pMV361:*cfp10* y pMV361:*cfp10 dss* en el genoma de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*. Para ello, se realizaron 2 PCRs distintas que tenían en común el cebador directo pero cada una de ellas utilizaba un cebador reverso distinto. El cebador directo (RTPCRCFP10Forward) hibridaba en la región 4354101-4354120 pb. Sin embargo, en una de las PCRs se utilizaba un cebador reverso (CFP10Rv2) que hibridaba en la región 4354349-4354369 pb, obteniendo la amplificación de un fragmento de 269 pb. En la otra PCR, se utilizaba un cebador reverso (CFP10Rv1) que hibridaba en la región 4354310-4354329 pb, obteniendo la amplificación de un fragmento de 229 pb. En la **Figura 9.2** se muestran las regiones en las cuales se da la hibridación de los distintos cebadores utilizados respecto a *cfp10*.

Por otro lado, la técnica PCR también fue utilizada para comprobar que las extracciones de RNA realizadas no estaban contaminadas por restos de DNA y para amplificar los genes *cfp10* y *cfp10 dss* en las cepas complementadas para su posterior secuenciación por la empresa Stab Vida ubicada en Portugal (el producto de PCR obtenido fue purificado con el kit ExoSAP-IT™, Affymetrix antes de ser enviado para su secuenciación). Para comprobar que las extracciones de RNA no estaban contaminadas por trazas de DNA se llevó a cabo una amplificación de 440 pb del gen *Rv0440*, presente en el genoma de todas las cepas estudiadas en este trabajo.

Tanto las secuencias de los cebadores utilizados en las anteriores reacciones de PCR como los programas utilizados y las mezclas de reacción se encuentran recogidos en las tablas **Tabla 9.1**, **Tabla 9.2** y **Tabla 9.3** del Anexo, respectivamente.

4.3.4. Electroforesis de DNA y RNA.

La electroforesis de DNA fue utilizada en este trabajo para verificar la identidad de los productos de PCR obtenidos en las PCRs explicadas previamente y verificar la ausencia de degradación en las extracciones de RNA. Se utilizaron geles de agarosa del 0,8%-2% en 35 mL de tampón TBE 1X (90 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM de H₃BO₃, 2 mM EDTA) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las electroforesis se realizaron a voltajes comprendidos entre 90-100 voltios. El patrón de peso molecular utilizado fue Generuler™ 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), el tampón de carga utilizado para las electroforesis de DNA fue DNA Loading 6X (Invitrogen) y el tampón de carga utilizado para las electroforesis de RNA fue RNA Sample Loading Buffer (Sigma). Por último, para la visualización de los ácidos nucleicos en los geles se utilizó el sistema Doc Print (Vilber).

4.3.5. PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Para estudiar la expresión de *cfp10* en las cepas MTBVAC, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* *dss*, se llevó a cabo una qRT-PCR. En primer lugar, se llevó a cabo la retrotranscripción a partir de 500 ng de RNA de las extracciones de RNA de las distintas cepas (una vez verificado que el RNA no estaba degradado y no estaba contaminado por trazas de DNA). La retrotranscripción fue llevada a cabo con el kit PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara Bio).

El cDNA obtenido fue utilizado como DNA molde para realizar la qRT-PCR junto a los cebadores específicos (ver **Tabla 9.4** del Anexo) (Aguilo et al., 2017) y TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), Bulk (Takara Bio). Se utilizó el gen *sigA* (amplificado a partir de las mismas cepas) para normalizar los valores de C_T obtenidos en StepOne Plus Instrument (Applied Biosystems) para *cfp10*. Se realizaron 3 replicados de cada cepa para cada gen. En primer lugar, se calculó la media con los 3 valores obtenidos de C_T para cada gen en las diferentes cepas. A continuación, se procedió a normalizar el valor obtenido de C_T con la siguiente fórmula $\Delta C_T = C_{T, cfp10} - C_{T, sigA}$. Finalmente, el cambio de expresión fue calculado con la siguiente ecuación $2^{-\Delta \Delta C_T}$ (RQ). Los datos fueron representados como la cantidad relativa (RQ) utilizando

MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ como comparador, es decir, $RQ_j / RQ_{MTBVAC \Delta sat6 \Delta cfp10}$, siendo j cualquier cepa.

4.3.6. Extracción de proteínas.

Para la extracción de las proteínas extracelulares e intracelulares de MTBVAC, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10* y MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10 dss* se partió de cultivos crecidos en 7H9-ADC. Los cultivos fueron centrifugados y se realizaron 2 lavados del precipitado obtenido con 5-10 mL de PBS. A continuación, se resuspendió el precipitado obtenido y se incubó en medio 7H9 con 0,05% (v/v) Tween-80 y suplementado con 0,2% (w/v) de dextrosa y 0,085% (w/v) de NaCl para evitar las contaminaciones de albúmina procedentes del ADC en la fracción del sobrenadante. Después de 3 semanas de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 3200g durante 15 minutos (Aguilo et al., 2017).

Tras esta centrifugación, se utilizó el sobrenadante de las muestras para obtener las proteínas extracelulares y el precipitado para obtener las proteínas intracelulares. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados con un filtro de 0,2 μ m para eliminar cualquier residuo bacteriano. Las proteínas del sobrenadante (proteínas extracelulares) fueron precipitadas con 10% (v/v) de ácido tricloroacético (Sigma) durante toda la noche e incubadas en hielo. A continuación, se centrifugó a 3200g durante 60 minutos a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado con 5 mL de acetona previamente enfriada. A continuación, se decantó la acetona y se dejaron secar los precipitados obtenidos que fueron resuspendidos en 200 μ L de Tris/HCl 150 mM pH 8,8 (Aguilo et al., 2017).

Para la extracción de proteínas intracelulares, se resuspendió el precipitado en 1 mL de buffer de lisis de proteínas (PBS 1% tritón). Una vez resuspendido, la mezcla se pasó a unos tubos con bolas de vidrio y se sometió a Fast Prep con 2 ciclos de 45 segundos a máxima velocidad. A continuación, se centrifugó a 18000g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante (Aguilo et al., 2017).

4.3.7. Electroforesis desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) y Western Blot.

Una vez extraídas las proteínas intracelulares y secretadas, se llevó a cabo una electroforesis desnaturante. Para ello, se realizaron geles de poliacrilamida al 15% cuya composición se encuentra recogida en la **Tabla 9.5** del Anexo. Las muestras analizadas fueron mezcladas con tampón de carga 4X (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 1 Mm EDTA, 2,5% SDS, 25% 2-mercaptoetanol, 25% glicerol, 0,1 mg/mL de azul de bromofenol) e incubadas a 90°C durante 10 minutos para provocar la desnaturalización proteica. El patrón de peso molecular utilizado fue PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). El tampón de electroforesis utilizado estaba compuesto por 25 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM glicina y 3,5 Mm SDS. Cada gel corrió hasta que el colorante alcanzaba el final del gel con una intensidad de 25 mA.

A continuación, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel a una membrana PVDF (Amersham Biosciences). La inmunodetección fue llevada a cabo utilizando anticuerpos monoclonales de ratón anti-GroEL2 (1:2500, Abcam) y anticuerpos policlonales de conejo anti-CFP10 (1:5000, ThermoFisher Scientific). A continuación, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP (1:10000, Sigma). Para llevar a cabo la producción de la señal se utilizó el kit WesternBright Quantum HRP substrate (Advansta) y la señal fue detectada con el sistema de detección Quantum GelDoc (Vilber).

4.3.8. Análisis de la inmunidad en esplenocitos.

Con el objetivo de verificar que las cepas MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 y MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 se habían complementado correctamente se llevó a cabo un análisis de la inmunidad en esplenocitos. Se partió de muestras de bazos de ratones previamente vacunados con MTBVAC, MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$, MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 o MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 *dss* tal y como se explicó en el apartado 4.2. Experimentación animal en Materiales y métodos. En primer lugar, se añadieron los bazos a una placa de 6 pocillos con 5 mL de medio RPMI 1640 (Sigma). A continuación, los bazos se machacaron con el émbolo de una jeringa de 10 o 20 mL para extraer los esplenocitos. Los 5 mL obtenidos fueron pasados por un filtro Cell Strainer de 70 μ m a un tubo falcon de 50 mL. Seguidamente,

se llevó a cabo una centrifugación a 800g durante 5 minutos. El precipitado de células obtenido fue resuspendido en 1 mL de Red Blood Cells Lysing Buffer (Sigma) y se incubó durante 1-5 minutos para lisar los eritrocitos. Para parar la reacción de lisis de eritrocitos se añadieron 10 mL de RPMI 1640 (Sigma). Se llevó a cabo una segunda centrifugación a 800g durante 5 minutos y las células fueron resuspendidas en 1,5 mL de medio RPMI 1640 (Sigma) que contenía 10% (v/v) de SFB inactivado por calor, 1% (v/v) de L-glutamax (Sigma), 100 unidades/mL de penicilina, 100 unidades/mL de estreptomycin y 50 μ M de 2-mercaptoetanol (Sigma). La concentración de células fue determinada utilizando el sistema Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter (Sigma) y se sembraron entre $1-1,5 \times 10^6$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo curvo. Por último, se añadieron los antígenos que actuaban como estímulos que fueron 5 μ g/mL de PPD (Statens Serum Institute, SSI) o 2 μ g/mL de CFP10 (LIONEX GmbH, Braunschweig, Alemania) (Aguilo et al., 2017). El PPD (derivado proteico purificado) es una mezcla de antígenos que expresa *M. tuberculosis* y fue utilizado como control positivo. El antígeno CFP10 fue utilizado para evaluar la respuesta inmunitaria y verificar si se había dado la complementación mencionada anteriormente. Los esplenocitos fueron incubados junto a los antígenos durante 48 horas a 37°C al 5% CO₂.

Posteriormente, los sobrenadantes fueron recogidos para llevar a cabo la detección de citoquinas mediante ELISA. Se llevó a cabo la detección de IFN- γ mediante el kit ELISA IFN- γ (Mabtech). En primer lugar, se añadió el anticuerpo primario de captura en una placa Maxisorp (Nunc) de 96 pocillos y se incubó durante una noche. A continuación, la placa fue bloqueada incubándola en tampón PBS 0,05% Tween-20 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron las muestras de sobrenadante diluidas 1:10 y se incubaron durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario unido a biotina y fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario fue detectado incubándolo con una solución de estreptavidina unida a peroxidasa (30 minutos a temperatura ambiente) y se reveló usando el sustrato específico TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbencidina) (Sigma). La reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 0,5 M. Por último, la densidad óptica a 450 nm fue determinada en un lector de placas.

4.4. Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.

4.4.1. Aislamiento de células blancas de sangre de ratón.

Para realizar ensayos inmunológicos en sangre de ratón, era necesario optimizar un protocolo de aislamiento de células blancas en sangre de ratón. Se partió de muestras de 50 μL de sangre de ratones sin vacunar tal y como se indicó en el apartado 4.2. Experimentación animal de Materiales y Métodos. En el primer protocolo, la lisis de eritrocitos fue llevada a cabo añadiendo a las muestras de sangre 1 mL de Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma). Sin embargo, en el segundo protocolo, la lisis de eritrocitos fue llevada a cabo añadiendo 450 μL de agua miliQ y tras mezclar cuidadosamente, se añadieron 5 mL de PBS para neutralizar la presión osmótica provocada por el agua. A partir de este momento, ambos protocolos se desarrollaron de manera análoga. Se llevó a cabo un lavado con medio RPMI 1640 (Sigma) que contenía 10% (v/v) de SFB inactivado por calor, 1% (v/v) de L-glutamax (Sigma), 100 unidades/mL de penicilina, 100 unidades/mL de estreptomicina y 50 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma). Una vez realizado el lavado, las células aisladas eran resuspendidas en el anterior medio.

4.4.2. Marcaje intracelular de IFN- γ .

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmunológica en sangre de ratón, se partió de muestras de sangre de 50 μL de ratones vacunados con MTBVAC o MTBVAC Δesat6 Δcfp10 tal y como se indicó en el apartado 4.2. Experimentación animal de Materiales y métodos, 15 días después de la vacunación. En primer lugar, se llevó a cabo el aislamiento de células blancas en sangre de ratón utilizando el segundo protocolo explicado anteriormente en el apartado 4.4.1. Aislamiento de células blancas de sangre de ratón. Para conocer el número de células de cada pocillo, se realizó un cálculo teórico. Suponiendo que en sangre de ratón hay 6870 linfocitos/ μL (información proporcionada por laboratorios suministradores de animales), si se partió de muestras de 50 μL de sangre para cada pocillo, había un total aproximadamente de 3×10^5 linfocitos por pocillo. Las células fueron incubadas en una placa de 96 pocillos de fondo curvo junto a los antígenos PPD 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (control positivo) (Statens Serum Institute, SSI) o PepMixTM *M. tuberculosis* CFP10 (JPT) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas a 37 al 5% CO_2 , y

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brefeldin A (Sigma) fueron añadidos durante las últimas 4 horas de incubación (Aguilo et al., 2017). La Brefeldin A es un inhibidor del transporte vesicular por lo que al añadirse las citoquinas producidas por los linfocitos no pueden ser secretadas, permaneciendo en el interior de la célula.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó la placa para eliminar el sobrenadante. Se llevó a cabo el marcaje extracelular que permitiese seleccionar mediante citometría de flujo las células $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ que son las principales células que expresan $\text{IFN-}\gamma$. Las células fueron marcadas con anti- CD4-FITC (BD Biosciences), anti- CD3-PerCPVio700 (Miltenyi Biotec) y anti- CD8-PE (BD Biosciences) (Aguilo et al., 2017), diluidos 1:200, 1:100 y 1:200, respectivamente en medio RPMI 1640 (Sigma) que contenía 10% (v/v) de SFB inactivado por calor, 1% (v/v) de L-glutamax (Sigma), 100 unidades/mL de penicilina, 100 unidades/mL de estreptomina y 50 μM de 2-mercaptoetanol (Sigma). Se incubaron las células con la mezcla de los anticuerpos anteriores durante 20 minutos a 4°C . Se centrifugó la placa y se eliminó el sobrenadante. A continuación, las células fueron fijadas y permeabilizadas con el kit eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (ThermoFisher Scientific). La permeabilización de las células permite que el anticuerpo intracelular utilizado, en este caso anti- $\text{IFN-}\gamma\text{-APC}$ (BD Biosciences) (Aguilo et al., 2017) (diluído 1:250 en el tampón de permeabilización) entre en el interior de la célula y pueda marcar a la citoquina correspondiente ya que se ha inhibido el transporte vesicular con la Brefeldin A. A continuación, se llevaron a cabo 2 lavados con la solución de permeabilización. Por último, se añadieron 200 μL de PBS por pocillo y se incubó a 4°C para el análisis por citometría de flujo.

4.4.3. ELISpot $\text{IFN-}\gamma$.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmunológica en sangre de ratón, se partió de muestras de sangre de 50 μL de ratones vacunados con MTBVAC o $\text{MTBVAC } \Delta\text{esat6 } \Delta\text{cfp10}$ tal y como se indicó en el apartado 4.2. Experimentación animal de Materiales y métodos, a distintos tiempos tras la vacunación. Para realizar este ensayo se utilizó el kit Mouse $\text{IFN-}\gamma$ ELISpot^{BASIC}.

En primer lugar, se llevó a cabo la activación de las membranas de las placas MSIP con 15 μ L de etanol al 35% por pocillo durante 1 minuto. A continuación se realizaron lavados sucesivos con agua estéril. Se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS estéril (1:66) y se incubó durante toda la noche. El anticuerpo primario se une a la nitrocelulosa quedando así fijado al pocillo.

Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS estéril para eliminar el exceso de anticuerpo. A continuación, se añadieron 200 μ L del medio en el que las células blancas de sangre de ratón se encontraban resuspendidas (medio RPMI 1640 (Sigma) que contenía 10% (v/v) de SFB inactivado por calor, 1% (v/v) de L-glutamax (Sigma), 100 unidades/mL de penicilina, 100 unidades/mL de estreptomina y 50 μ M de 2-mercaptoetanol (Sigma)). Se incubó durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear la placa. A continuación, una vez llevado a cabo el aislamiento de las células blancas siguiendo el segundo protocolo explicado previamente, se eliminó el medio de las placas y se procedió a la incubación de las células junto al estímulo. Los estímulos utilizados fueron añadidos al pocillo de manera que la concentración final fuese 10 μ g/mL. Se incubaron las células junto al estímulo de 12-48 horas en una estufa a 37°C al 5% CO₂. El número de células por pocillo fue calculado de manera análoga al apartado anterior, por lo que había aproximadamente 300000 células por pocillo. La incubación de los linfocitos T junto al estímulo provoca la secreción de IFN- γ de aquellos linfocitos T que hayan mantenido un contacto previo con ese estímulo. Durante la incubación, el IFN- γ producido por los linfocitos T es capturado por el anticuerpo primario.

Tras la incubación, se eliminaron las células y se procedió a los lavados con PBS. Se añadió el anticuerpo secundario conjugado con biotina diluido 1:1000 en PBS suplementado con 0,5% de SFB y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se une a la citoquina capturada por el anticuerpo primario. Se realizaron lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para detectar el anticuerpo secundario, se utilizó una solución de estreptavidina-HRP (diluída 1:1000). La estreptavidina se unió a la biotina del anticuerpo secundario. Se realizaron lavados. Para revelar el ELISpot se utilizó una solución de TMB (sustrato de la HRP) distinto al utilizado en el ELISA. Este TMB tiene capacidad precipitante por lo que al reaccionar con la peroxidasa precipita. Esto permite que se produzcan los *spots* (puntos) que son cuantificados y permite determinar el número de células productoras de IFN- γ . La

reacción fue detenida con sucesivos lavados con agua destilada. La placa se dejó secar y por último, los *spots* fueron cuantificados en un lector de placas ELISpot. Para cuantificar los *spots* se utiliza el término *spot-forming cells* (SFC) que es usado como una medida cuantitativa del número de células secretoras de citoquinas.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis

5.1.1 Comprobación de la integración de los plásmidos pMV361:*cfp10* y pMV361:*cfp10 dss* en el genoma de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*.

Se llevó a cabo la extracción de DNA genómico de las cepas MTBVAC, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss* para verificar la integración de los plásmidos pMV361:*cfp10* y pMV361:*cfp10 dss* en el genoma de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* mediante PCR.

Como se explicó anteriormente en el apartado 4.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 4. Materiales y métodos, se realizaron 2 PCRs distintas. En la primera PCR, se utilizaron los cebadores RTPCR Δ CFP10Forward y CFP10Rv1. Tal y como se observa en la **Figura 5.1.A**, se dio amplificación en todas las cepas excepto para MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* puesto que en esta cepa está ausente el gen *cfp10*. En las otras cepas, se observó amplificación puesto que el cebador reverso CFP10Rv1 hibrida en un región central presente tanto en *cfp10* como en *cfp10 dss*. En la segunda PCR, se utilizaron los cebadores RTPCR Δ CFP10Forward y CFP10Rv2. En la **Figura 5.1.B** se observa amplificación para MTBVAC y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10*. No hubo amplificación para el mutante MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* puesto que en esta cepa está ausente el gen *cfp10*. La cepa MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss* tampoco presentó amplificación ya que se utilizó un cebador reverso (CFP10Rv2) que hibridaba en una región no presente en el gen *cfp10 dss*, concretamente en la región que codifica para los últimos 7 aminoácidos los cuales están deletionados en *cfp10 dss*. A continuación, se realizó una amplificación de *cfp10* y *cfp10 dss* de las cepas complementadas para su posterior secuenciación. Se comprobó que los productos de PCR obtenidos no contenían mutaciones indeseadas.

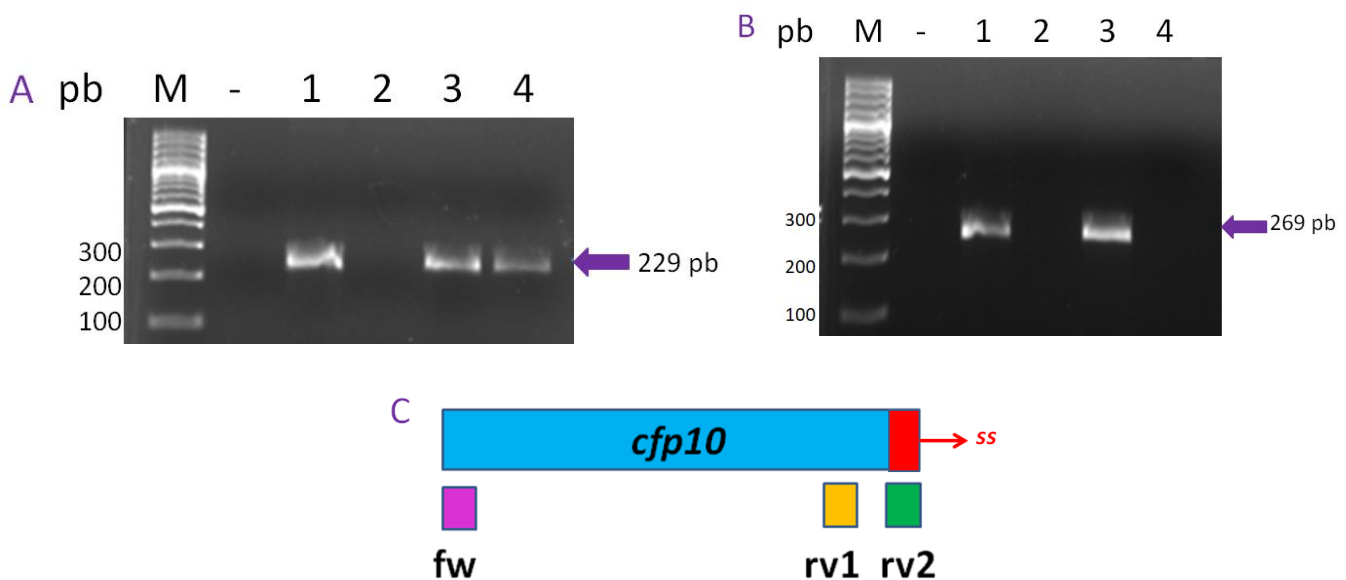


Figura 5.1. Amplificación obtenida en las PCRs realizadas para verificar la integración de los plásmidos pMV361:*cfp10* y pMV361:*cfp10 dss* en el genoma de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*. Carril M: marcador de peso molecular (en pb), carril -: control negativo, carril 1: MTBVAC, carril 2: MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, carril 3: MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y carril 4: MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*. (A) Amplificación obtenida en PCR con los cebadores RTPCRCFP10Forward y CFP10Rv1. (B) Amplificación obtenida en PCR con los cebadores RTPCRCFP10Forward y CFP10Rv2. (C) Esquema explicativo de las PCRs realizadas. Leyenda: gen *cfp10* (azul), secuencia señal (rojo), cebador RTPCRCFP10Forward (fucsia), cebador CFP10Rv1 (amarillo) y cebador CFP10Rv2 (verde).

5.1.2. Estudio de la expresión del gen *cfp10*.

Una vez verificada la integración de los plásmidos en el genoma de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, se llevó a cabo la extracción de RNA de las cepas MTBVAC, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*.

Se llevó a cabo la amplificación de 440 pb del gen *Rv0440*, presente en el genoma de todas las cepas estudiadas en este trabajo, y los productos de PCR obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa para verificar la ausencia de DNA en las extracciones de RNA. No se observó amplificación en ninguna de las muestras de RNA, por lo que todas las extracciones se consideraron libres de trazas de DNA (**Figura 5.2.A**).

Por otro lado, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa de las muestras de RNA para comprobar la ausencia de degradación. Como se aprecia en la **Figura 5.2.B**

hay 2 bandas intensas correspondientes a las subunidades mayor y menor del RNA ribosomal y su presencia es signo de una extracción de RNA óptima. Por lo tanto, las muestras de RNA no presentan degradación.

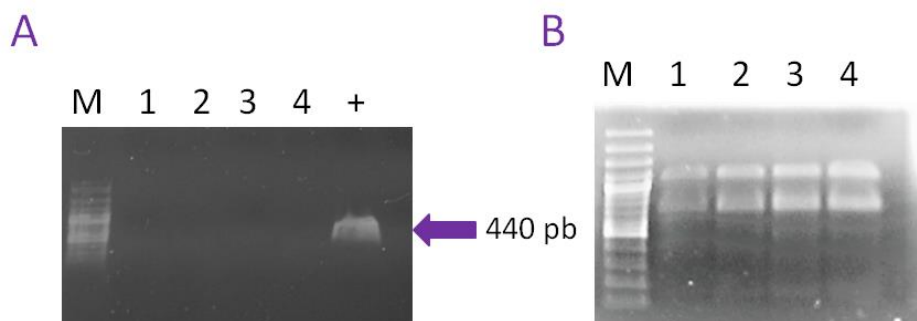


Figura 5.2. Control de calidad de las extracciones de RNA. Carril M: marcador de peso molecular, carril 1: MTBVAC, carril 2: MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, carril 3: MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10*, carril 4: MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* *dss* y carril +: control positivo (DNA de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10*). (A) Productos de PCR obtenidos de la amplificación de 440 pb de *Rv0440* en las muestras de RNA. (B) Electroforesis de RNA de las extracciones de RNA de las cepas de estudio.

Se llevó a cabo la retrotranscripción de las muestras de RNA de MTBVAC, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* *dss*. Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la PCR Real Time para estudiar la expresión de *cfp10*. La mayor expresión de *cfp10* fue observada en MTBVAC, mientras que para las cepas complementadas MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* *dss* también se observó expresión aunque en menor medida. Sin embargo, la expresión de las cepas complementadas fue suficientemente superior a la del mutante (**Figura 5.3**). Por lo tanto, las cepas estudiadas a excepción del mutante MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* expresaban *cfp10*.

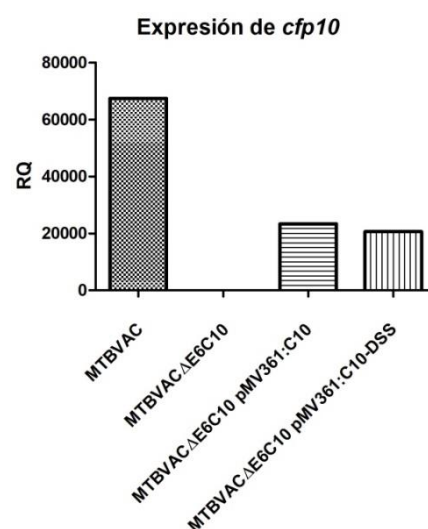


Figura 5.3. Expresión de *cfp10*. Expresión normalizada (usando *sigA*) de *cfp10* en las distintas cepas. Los datos son representados como la cantidad relativa (RQ) usando MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* como comparador.

5.1.3. Análisis de la expresión intracelular y extracelular de CFP10.

Para llevar a cabo el análisis de proteínas intracelulares y extracelulares se realizaron extracciones de proteínas a partir de cultivos de MTBVAC, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 y MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 *dss*.

Una vez extraídas las proteínas, se realizó un análisis de las mismas mediante Western-Blot. Se utilizó la proteína GroEL2 como control para verificar que las extracciones habían sido realizadas correctamente. GroEL2 es una chaperona que se expresa intracelularmente en *M. tuberculosis*, y también en MTBVAC. Como se aprecia en la **Figura 5.4**, GroEL2 aparece en todas las extracciones intracelulares pero no en las extracelulares, indicando que la extracción ha sido llevada a cabo con éxito y que no se ha dado lisis bacteriana lo que podría haber provocado la liberación del contenido intracelular al exterior contaminando las muestras de proteínas extracelulares. Respecto a la expresión de CFP10, solo se observó en MTBVAC. En la fracción intracelular de MTBVAC, se aprecia una ligera banda correspondiente a CFP10. Mientras que en la fracción extracelular, se observa una banda a la misma altura (CFP10) pero con mayor intensidad. Esto indica que MTBVAC expresa CFP10 pero que la mayor parte de CFP10 sintetizada en el interior celular es secretada inmediatamente al exterior. El mutante MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ no expresó CFP10 ni intracelular ni extracelularmente tal y como cabía esperar. Sorprendentemente, a pesar de la expresión de RNA, ninguna de las dos cepas complementadas (MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 y MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 *dss*) expresaron CFP10 ni intracelular ni extracelularmente.

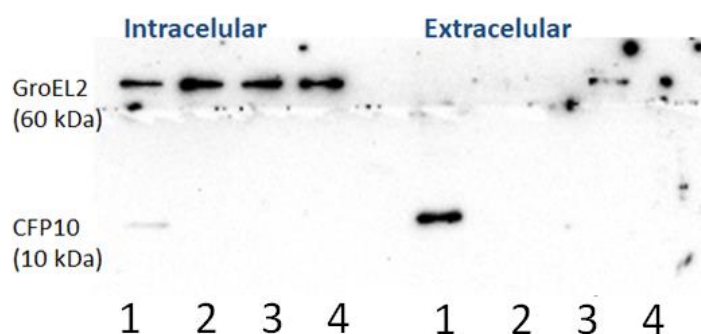


Figura 5.4. Expresión y secreción de CFP10. Detección de GroEL2 (control positivo) y CFP10. A la izquierda fracción intracelular, a la derecha fracción extracelular. Carril 1: MTBVAC, carril 2: MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$, carril 3: MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10, carril 4: MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:cfp10 *dss*.

5.1.4. Análisis de la inmunidad en esplenocitos.

Paralelamente a los experimentos anteriores, se partió de bazos de ratones C3H/HeNRj que fueron vacunados con MTBVAC, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10, MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 o MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 dss (tal y como se explicó en 4.2. Experimentación animal en 4. Materiales y métodos) para analizar inmunidad en esplenocitos puesto que el objetivo de este proyecto era evaluar la respuesta específica de CFP10 en la protección mediada por MTBVAC.

Los esplenocitos obtenidos fueron incubados durante 48 horas con PPD (utilizado como control positivo puesto que se trata de una mezcla de antígenos expresados por *M. tuberculosis*) y CFP10, y posteriormente se analizó la inmunidad mediante la detección de IFN- γ con kit ELISA. Los esplenocitos de ratón estimulados con PPD mostraron producción de IFN- γ independientemente de la cepa con la que hubiesen sido vacunados, indicando que la vacunación había sido correcta (**Figura 5.5**).

Sin embargo, únicamente los esplenocitos de los ratones vacunados con MTBVAC mostraron respuesta a CFP10. Los esplenocitos de los ratones vacunados con las cepas complementadas (MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 dss) mostraron niveles de respuesta a CFP10 similares a los ratones vacunados con MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 y a los ratones no vacunados (**Figura 5.5**). Estos resultados indicaban que las cepas MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 pMV361:cfp10 dss no habían sido complementadas correctamente con los plásmidos pMV361:cfp10 y pMV361:cfp10 dss, respectivamente, coincidiendo con los resultados de Western-Blot de ausencia de expresión de CFP10 en ambas cepas.

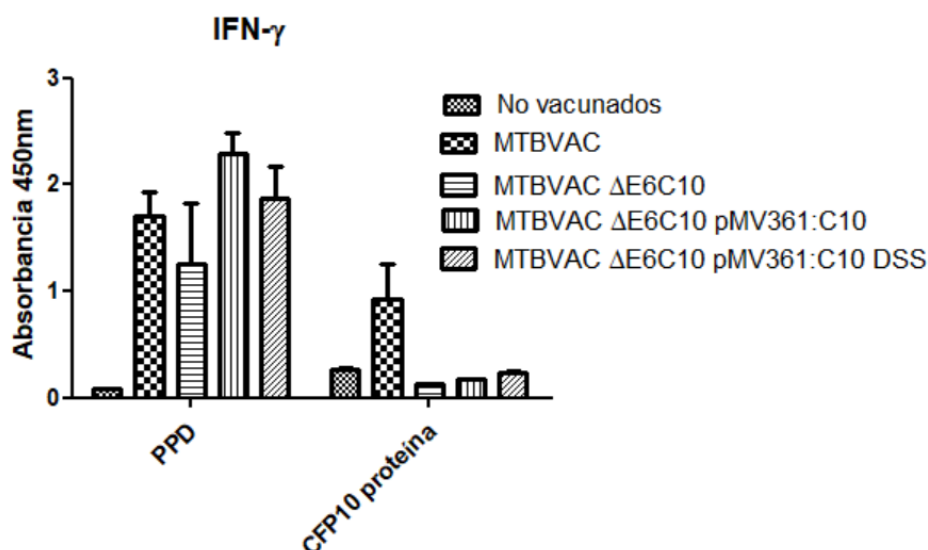


Figura 5.5. Producción de IFN- γ tras estimulación durante 48 horas con PPD (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CFP10 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de esplenocitos de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC, MTBVAC Δesat6 Δcfp10 , MTBVAC Δesat6 Δcfp10 pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δesat6 Δcfp10 pMV361:*cfp10* dss. La producción de IFN- γ está representada como absorbancia a 450 nm. Los datos son representados como media \pm s.e.m.

5.2. Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.

5.2.1. Optimización de protocolos de aislamiento de células blancas de sangre de ratón.

Para evaluar la respuesta inmunológica en sangre de ratón era necesario tener un protocolo puesto a punto que permitiese aislar células blancas de manera rápida y eficiente.

Para ello, 2 protocolos fueron realizados para determinar cuál de ellos era más adecuado para aislar células blancas a partir de sangre de ratón. En el primero de ellos, la lisis de eritrocitos era llevada a cabo mediante la incubación de la sangre con Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente. En el segundo, la lisis de eritrocitos era llevada a cabo con agua miliQ, y seguidamente se añadía PBS para evitar la ruptura de otros tipos celulares por presión osmótica. Tras los sucesivos lavados, las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de eritrocitos.

Tal y como se aprecia en la **Figura 5.6.**, el porcentaje de eritrocitos obtenido con el primer protocolo (15,61%) era mayor al obtenido con el segundo protocolo (6,35%). Además, en el aislamiento realizado se aprecia un número menor de restos celulares (puntos fuera de las regiones “eritrocitos” y R_0). Por lo tanto, el segundo protocolo proporciona un menor número de eritrocitos y de restos celulares. Por estas razones, se decidió utilizar el protocolo 2 para los posteriores aislamientos de células blancas de sangre de ratón.

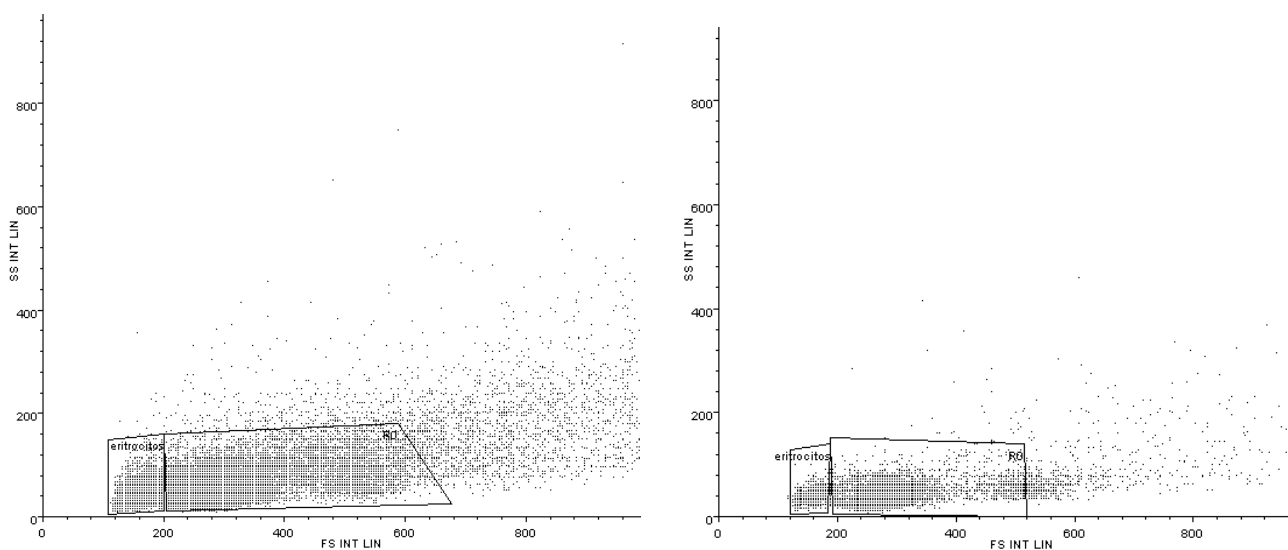


Figura 5.6. Aislamiento de células blancas a partir de sangre de ratón. A la izquierda, la extracción realizada con el primer protocolo (Red Blood Lysing Buffer). A la derecha, la extracción realizada con el segundo protocolo (agua miliQ + PBS). La región indicada como “eritrocitos” representa los eritrocitos de la muestra, la región R_0 representa las células blancas de la muestra, el resto de puntos observados fuera de esas regiones corresponden a restos celulares. El eje FS INT LIN representa el tamaño celular y el eje SS INT LIN representa la complejidad interna de la célula.

[5.2.2. Análisis de la inmunidad en sangre de ratón mediante marcaje intracelular de IFN- \$\gamma\$.](#)

Con el objetivo de optimizar ensayos inmunológicos que permitan evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón, se llevó a cabo un marcaje intracelular de IFN- γ . Se partió de muestras de sangre de ratón vacunados con MTBVAC o MTBVAC

Δesat6 Δcfp10 (tal y como se explicó en 4.2. Experimentación animal en 4. Materiales y métodos). Las muestras fueron obtenidas 15 días tras la vacunación. A partir de esas muestras, se llevó a cabo el aislamiento de células blancas y las células fueron incubadas durante 24 horas con PepMix™ *M. tuberculosis* CFP10 (mezcla de 23 péptidos de 15 aminoácidos superpuestos cada 11 aminoácidos derivados de CFP10) o PPD (control positivo), durante las últimas 4 horas se añadió la Brefeldin A que permitió realizar el marcaje intracelular.

Para poder reconocer las células productoras de IFN- γ , se llevó a cabo un marcaje extracelular utilizando anticuerpos anti-CD4-FITC, anti-CD3-PercPVio700 y anti-CD8-PE, cuya fluorescencia era recogida por los canales del citómetro; FL1, FL4 y FL2, respectivamente. Este marcaje extracelular permitió seleccionar las células CD3+CD4+ que son las principales productoras de IFN- γ . Para el marcaje intracelular se utilizó el anticuerpo anti-IFN- γ -APC, cuya fluorescencia es recogida por el canal FL6 del citómetro.

Tras realizar el marcaje de las células, se analizaron por citometría de flujo para identificar las células CD3+CD4+IFN- γ + (**Figura 5.7**). En primer lugar, las células fueron representadas por tamaño y complejidad interna (**Figura 5.7.A**) para eliminar los eritrocitos y restos celulares. A continuación, se hace el “gate” (R0) (definir una población) sobre esta población y se eligen los “singletes” (células individuales) (**Figura 5.7.B**), sobre los que de nuevo se hace el “gate” (R1). Después, sobre la población anterior se seleccionan las células CD3+ (FL4) correspondientes a los linfocitos T (**Figura 5.7.C**) y se hace el “gate” sobre estos (CD3+). Una vez seleccionados, los linfocitos T se representan CD4+ (FL1) respecto a CD8+ (FL2) para distinguir entre linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos, respectivamente (**Figura 5.7.D**). Se hace el “gate” sobre la población de linfocitos T CD4+ (CD4+) y, finalmente, se representa la complejidad respecto IFN- γ + (FL6) para seleccionar las células IFN- γ + y cuantificarlas (E). De esta manera, se obtiene el % de células CD3+CD4+ IFN- γ + respecto a las células CD3+CD4+.

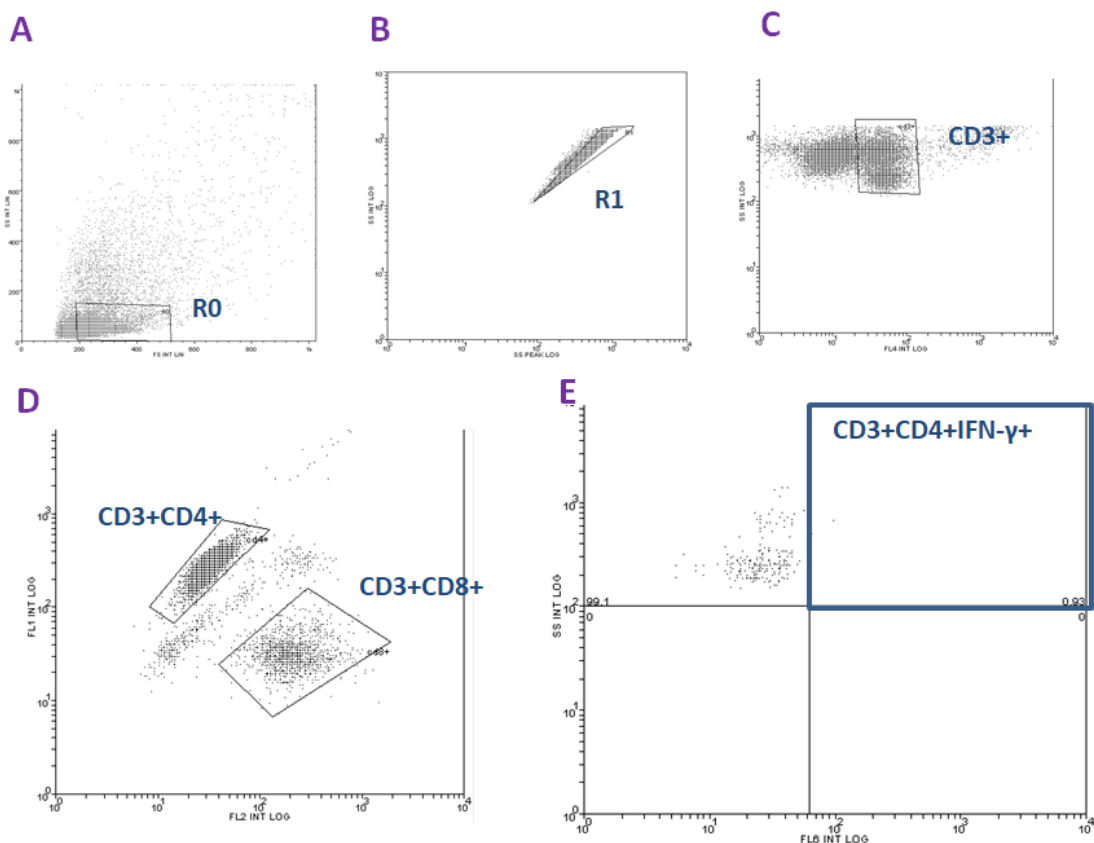


Figura 5.7. Procedimiento de selección de las poblaciones por citometría de flujo. (A) Representación complejidad interna (SS INT LIN) respecto al tamaño (FS INT LIN). (B) Representación de los “singletes”. (C) Representación complejidad interna (SS INT LOG) respecto a CD3+ (FL4). (D) Representación CD4+ (FL1) respecto a CD8+ (FL2). (E) Representación complejidad interna (SS INT LOG) respecto a IFN- γ + (FL6).

Siguiendo el procedimiento explicado anteriormente, se analizaron todas las muestras. Se observó respuesta a PPD tanto en los ratones vacunados con MTBVAC como los vacunados con MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10. Aunque la respuesta a PPD fue menor en las muestras de ratones vacunados con MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10, esto podría ser debido a que probablemente ESAT6 y CFP10 sean los principales antígenos inmunodominantes del sustrato genético C3H/HeNRj. El hecho de que se diese respuesta a PPD en ambos grupos indica que la vacunación había sido correcta. Sin embargo, ni los ratones vacunados con MTBVAC ni los vacunados con MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 mostraron respuesta a la mezcla de péptidos de CFP10, tal y como se aprecia en la **Figura 5.8**. Ante estos resultados, se decidió optar por un método con mayor sensibilidad para las próximas muestras de sangre.

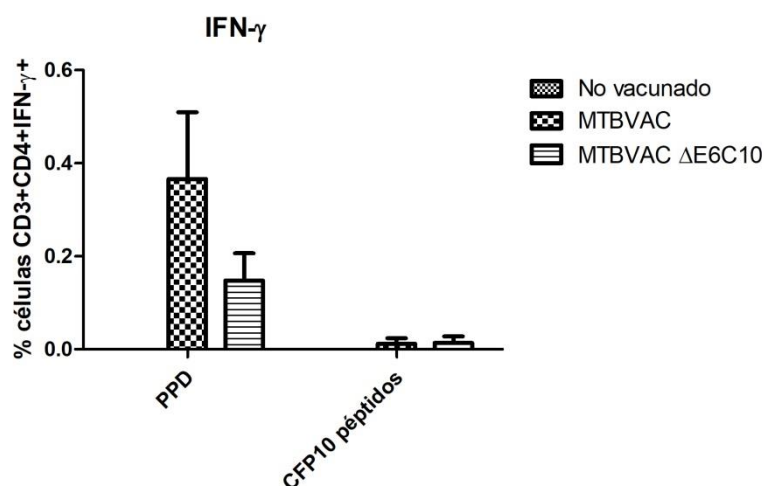


Figura 5.8. Porcentaje de células CD3+CD4+IFN- γ + respecto a las células CD3+CD4+ tras la estimulación durante 24 horas con PPD (10 μ g/mL) o PepMixTM *M. tuberculosis* CFP10 (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10. Los datos son representados como media \pm s.e.m.

5.2.3. Análisis de la inmunidad en sangre de ratón mediante EliSPOT de IFN- γ .

En vistas de los resultados obtenidos con el marcaje intracelular, se decidió pasar a una técnica con mayor sensibilidad como el EliSPOT. De nuevo, se partió de muestras de sangre de ratón vacunados con MTBVAC o MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 (tal y como se explicó en 4.2. Experimentación animal en 4. Materiales y métodos). Las muestras fueron tomadas entre las 4-8 semanas tras la vacunación.

En el primer EliSPOT realizado, tras aislar las células blancas de la sangre de ratón, se incubaron durante 24 horas con PepMixTM *M. tuberculosis* CFP10 o con PPD (control positivo). Se realizó el inmunoensayo y se reveló añadiendo el TMB especial EliSPOT obteniendo los *spots* que cada uno de ellos representaba una célula productora e IFN- γ .

El número de *spots* fue mucho menor en las muestras estimuladas con péptidos de CFP10 respecto a las estimuladas con PPD. Además, las muestras de sangre estimuladas con CFP10 mostraron resultados muy similares entre ellas, independientemente del grupo de vacunación (**Figura 5.9**). Este ensayo al igual que el marcaje intracelular de IFN- γ tampoco permitió evaluar la respuesta de MTBVAC en sangre de ratón.

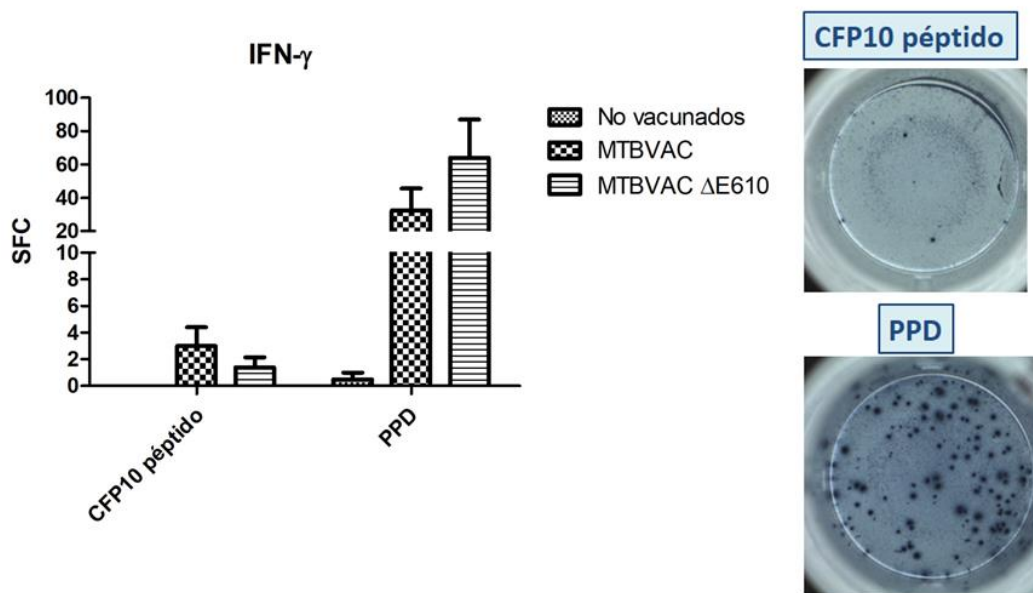


Figura 5.9. Número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con PPD (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y PepMixTM *M. tuberculosis* CFP10 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC $\Delta\text{esat6 } \Delta\text{cfp10}$. A la izquierda, los resultados obtenidos para cada grupo de vacunación. A la derecha, fotografía representativa de los resultados obtenidos en los pocillos. El número de células productoras de IFN- γ está representado como SFC (*spots forming cells*). Los datos son representados como media \pm s.e.m.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo el mismo ensayo EliSPOT pero utilizando la proteína entera de CFP10 para comprobar si la proteína entera proporcionaba una respuesta mayor que la mezcla de péptidos. Se procedió de manera análoga y las células fueron incubadas con PepMixTM *M. tuberculosis* CFP10 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o CFP10 proteína (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados obtenidos (**Figura 5.10**) mostraron un número mayor de *spots* en respuesta a CFP10 proteína respecto a la mezcla de péptidos en ratones vacunados con MTBVAC. Sin embargo, en ratones vacunados con MTBVAC $\Delta\text{esat6 } \Delta\text{cfp10}$ apenas se observaron *spots* ni en respuesta a CFP10 proteína ni a la mezcla de péptidos, indicando ausencia de respuesta, tal y como se esperaba puesto que al ser vacunados con un mutante de CFP10 el sistema inmune específico del sujeto no debería reconocer dicha proteína o mezcla de péptidos y no debería generar respuesta contra ella. Por lo tanto, la proteína CFP10 proporcionaba una mayor respuesta que la mezcla de péptidos indicando que la proteína CFP10 era más inmunogénica.

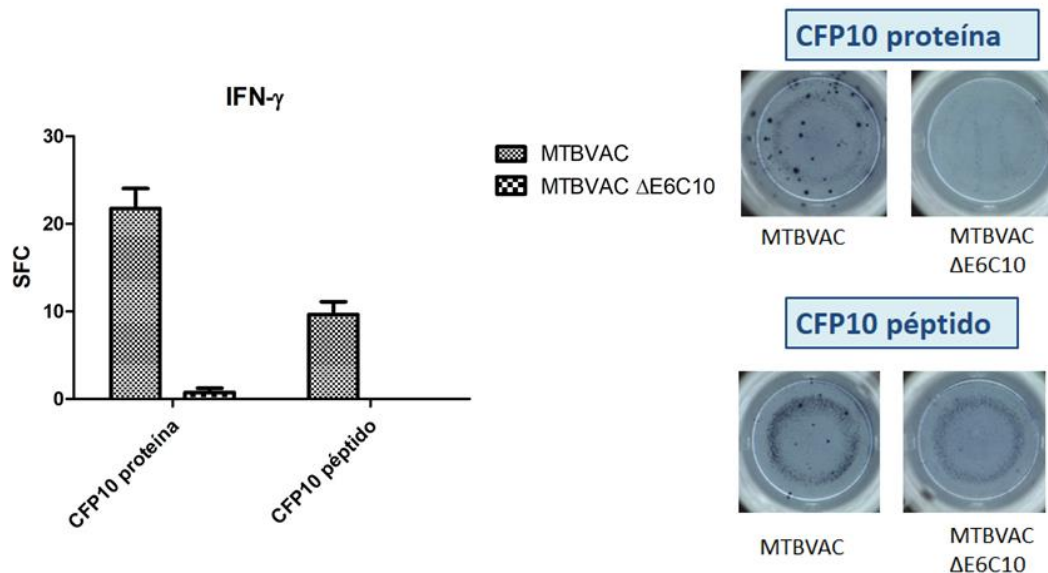


Figura 5.10. Número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con CFP10 proteína (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y PepMixTM *M. tuberculosis* CFP10 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δesat6 Δcfp10 . A la izquierda, los resultados obtenidos para cada grupo de vacunación. A la derecha, fotografía representativa de los resultados obtenidos en los pocillos. El número de células productoras de IFN- γ está representado como SFC (*spots forming cells*). Los datos son representados como media \pm s.e.m.

Una vez determinado que la proteína CFP10 proporcionaba una mayor respuesta que la mezcla de péptidos, se decidió llevar a cabo un ensayo mimetizando los ensayos realizados en la clínica. Además, se realizó un control negativo en el cuál se añadió RPMI en lugar de estímulo para el grupo de ratones vacunados con MTBVAC. Para ello, se incubaron las células blancas con las proteínas CFP10, ESAT6 o EspC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En la **Figura 5.11** se muestran los resultados obtenidos. Se observó un número mayor de *spots* en las muestras de ratones vacunados con MTBVAC respecto a los vacunados con MTBVAC Δesat6 Δcfp10 tanto en respuesta a ESAT6 como a CFP10. Sin embargo, el número de *spots* en respuesta a EspC fue similar en los ratones vacunados con MTBVAC y los vacunados con MTBVAC Δesat6 Δcfp10 .

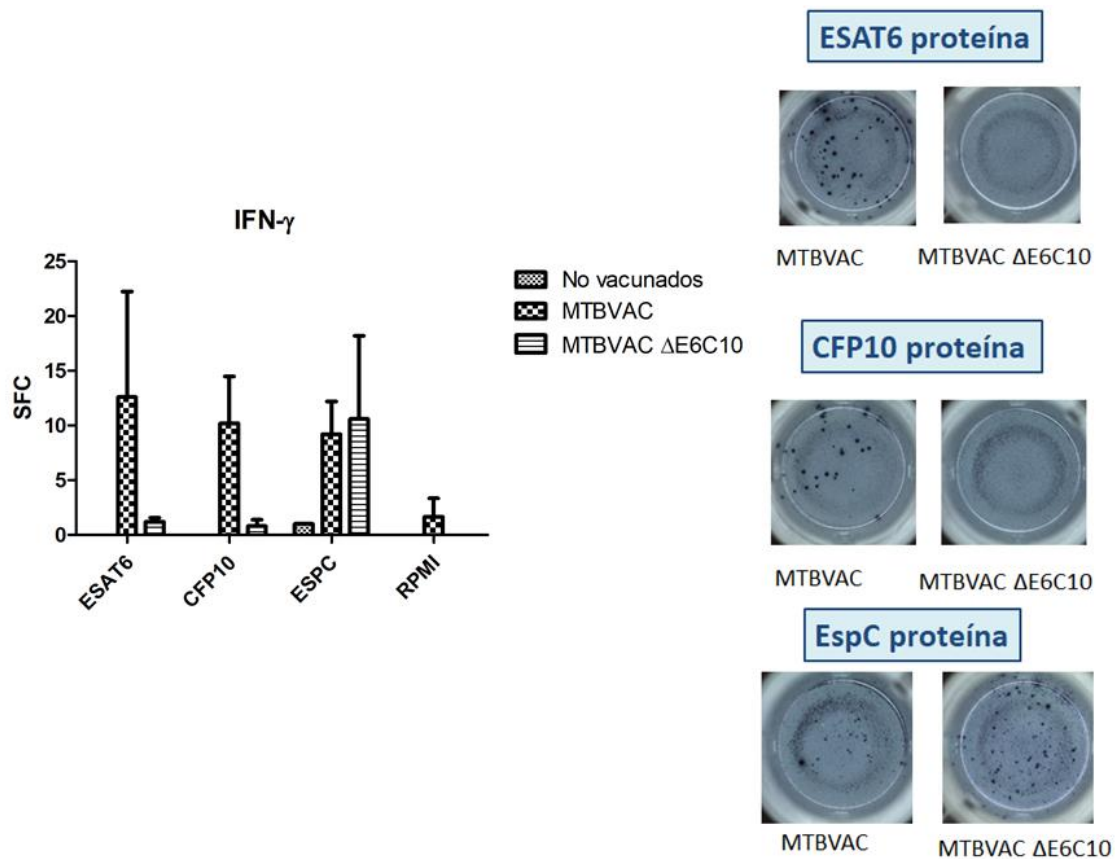


Figura 5.11. Número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con CFP10 proteína, ESAT6 proteína y EspC proteína (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10. Se realizó un control negativo con medio RPMI. A la izquierda, los resultados obtenidos para cada grupo de vacunación. A la derecha, fotografía representativa de los resultados obtenidos en los pocillos. El número de células productoras de IFN- γ está representado como SFC (*spots forming cells*). Los datos son representados como media \pm s.e.m.

Sin embargo, el número de células productoras de IFN- γ (*spots*) no fue homogéneo, sino que se observó variabilidad en todos los grupos. Se observó (**Figura 5.12**) un número de *spots* en respuesta a ESAT6 significativamente por encima de la media en un sujeto vacunado con MTBVAC (51 *spots*). También, se observó esto en respuesta a CFP10 para otro sujeto vacunado con MTBVAC (27 *spots*) aunque en menor medida. Se observó lo mismo en respuesta a EspC en un sujeto vacunado con MTBVAC (21 *spots*) y en otro sujeto vacunado con MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10 (41 *spots*).

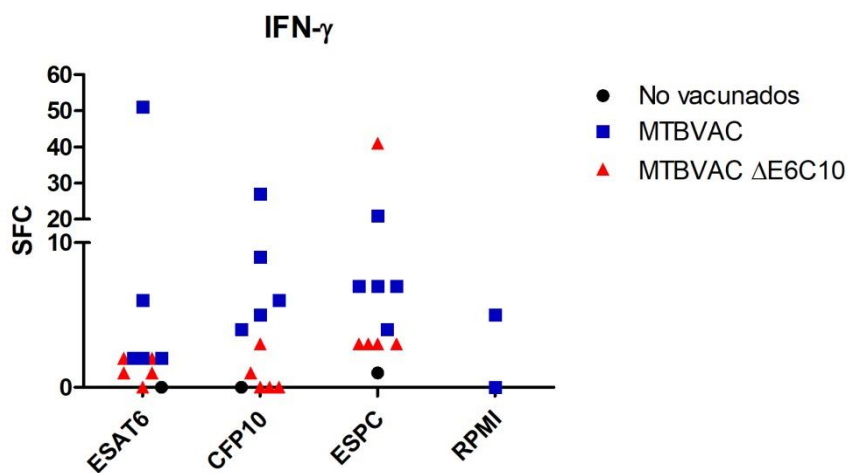


Figura 5.12. Representación individual del número de células productoras de IFN- γ tras estimulación durante 24 horas con CFP10 proteína, ESAT6 proteína y EspC proteína (10 μ g/mL) de sangre de ratones C3H/HeNRj vacunados con MTBVAC y MTBVAC Δ esat6 Δ cfp10. Se realizó un control negativo con medio RPMI. El número de células productoras de IFN- γ está representado como SFC (*spots forming cells*).

6. DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el desarrollo de este Trabajo de Fin de Máster, se dividió el trabajo en dos proyectos: “Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.” y “Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.”.

El objetivo del primer proyecto, “Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.”, fue la caracterización molecular de vacunas de tuberculosis. Para ello, se trabajó con las cepas MTBVAC, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10* y MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10 dss*. Se llevó a cabo la extracción de DNA de las anteriores cepas y se realizaron las 2 PCRs explicadas anteriormente. El hecho de que los cebadores reversos CFP10Rv1 y CFP10Rv2 hibridasen en una región presente en todas las cepas y en la región correspondiente a los 7 aminoácidos delecionados, respectivamente, permitió verificar y diferenciar la integración de los plásmidos pMV361:*cfp10* o pMV361:*cfp10 dss* en el genoma de MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$.

Para estudiar la expresión del gen *cfp10* se llevó a cabo la extracción de RNA de las anteriores cepas. Se realizaron controles para comprobar la calidad del RNA. La electroforesis de RNA permitió descartar la degradación del RNA extraído. Se realizó una PCR de un fragmento de 440 pb del gen *Rv0440* que codifica para la chaperona GroEL2, presente en el genoma de todas las cepas de estudio. Esta PCR permitió verificar la ausencia de DNA en las extracciones de RNA.

El estudio de la expresión del gen *cfp10* mostró que ambas cepas complementadas, MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10* y MTBVAC $\Delta sat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10 dss*, presentaban expresión del gen. Sin embargo, a pesar de que *cfp10* y *cfp10 dss* habían sido clonados con 1000 pb *upstream* para incluir su promotor, las cepas complementadas presentaron una menor expresión de *cfp10* que MTBVAC. Tal vez en MTBVAC, *cfp10* no sea regulado únicamente por su promotor y presente elementos *in trans* como *enhancers* implicados también en su regulación transcripcional. En las cepas complementadas los plásmidos se integran en la región *attB* lo que podría haber provocado la pérdida de esa regulación transcripcional *in trans* al encontrarse el gen en una región distinta a la de MTBVAC conllevando a niveles de transcripción más bajos.

El análisis de proteínas intracelulares y extracelulares mostró que MTBVAC secretaba CFP10 tal y como se esperaba (Aguilo et al., 2017). Sin embargo, las cepas MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10* y MTBVAC $\Delta esat6 \Delta cfp10$ pMV361:*cfp10 dss* no expresaron CFP10 ni intracelular ni extracelularmente a pesar de haber transcripción de *cfp10*. Una posible explicación para la ausencia de síntesis de CFP10 podría ser que los niveles de RNA no fuesen suficientes para producirse la traducción. Para solucionar este problema, se podría clonar el gen con un promotor más fuerte para aumentar sus niveles de transcripción. Sin embargo, al hacer esto se perdería la expresión *wild type* del gen. Otra solución podría ser clonar el gen en un plásmido replicativo para obtener un mayor número de copias pero también se perdería la regulación endógena al tener un origen de replicación propio. También se podría partir de MTBVAC, en lugar de partir del mutante, e introducir codones *stop* en *esat6* para estudiar el papel de CFP10, así de esta manera se mantendría su regulación endógena. Aunque esta solución tal vez podría afectar a la expresión de *cfp10* ya que *esat6* y *cfp10* están codificados en el mismo operón (Berthet et al., 1998). Otra posible explicación para la no expresión de CFP10 podría ser que fuese necesaria la presencia del gen *esat6* para la traducción de CFP10. Por lo tanto, al tratarse de mutantes de *esat6* no se pudiese dar la expresión de CFP10. Es evidente que ambas proteínas están relacionadas puesto que además de estar codificadas en el mismo operón (Berthet et al., 1998), ambas son co-secretadas en *M. tuberculosis* (Renshaw et al., 2002). Diferencialmente, en MTBVAC no son co-secretadas, únicamente es secretada CFP10 pero ESAT6 es expresada únicamente intracelularmente (Aguilo et al., 2017). Tal vez es necesario que para la expresión de CFP10 se exprese ESAT6 aunque sea únicamente intracelularmente, existiendo una dependencia entre ambas proteínas para su expresión.

Paralelamente, se llevaron a cabo estudios de inmunidad en esplenocitos puesto que el principal objetivo de este proyecto era evaluar la respuesta inmune. Se trabajó con ratones C3H/HeNRj puesto que previamente se había visto que el haplotipo de su MHC reconocía ESAT6 y CFP10 (Aguilo et al., 2017). Los análisis de inmunidad en esplenocitos mostraron la ausencia de complementación en las cepas, al igual que los resultados del Western-Blot, puesto que los esplenocitos de los ratones vacunados con las cepas complementadas no mostraron respuesta a CFP10. Por lo tanto, no se pudo continuar con los estudios para dilucidar el papel de CFP10 en la protección mediada por MTBVAC puesto que no se dio expresión de la proteína CFP10 en MTBVAC

Δesat6 Δcfp10 pMV361:cfp10 ni MTBVAC *Δesat6 Δcfp10 pMV361:cfp10 dss*. Esto también impidió que se pudiesen realizar análisis de inmunidad en sangre de ratón con estas cepas, lo cuál hubiese podido resultar interesante para evaluar el papel de CFP10 en la protección mediada por MTBVAC en sangre de ratón.

El objetivo del segundo proyecto, “Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.”, fue optimizar ensayos inmunológicos que permitan evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón.

Para obtener las células blancas de sangre de ratón era necesario poner a punto un protocolo de aislamiento de células blancas. Se probaron dos protocolos, en uno de ellos la lisis de eritrocitos era llevada a cabo mediante la incubación de la sangre con Red Blood Cells Lysing Buffer durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este tampón comercial contiene cloruro de amonio cuya adición provoca la pérdida del agua, y en consecuencia, la plasmólisis de los eritrocitos. En el otro protocolo, el cual fue elegido para los posteriores aislamientos, la lisis se realizó con agua miliQ seguido de la adición de PBS para neutralizar la presión osmótica del agua. El protocolo de lisis con agua miliQ demostró reducir el número de eritrocitos aproximadamente 2,5 veces respecto al protocolo de lisis con el tampón comercial. El agua miliQ es una solución hipotónica de tal manera que su adición hace que el agua entre al interior celular de los eritrocitos, provocando su lisis. Al añadir inmediatamente el PBS, la presión osmótica se neutraliza de tal manera que únicamente se rompen los eritrocitos cuyas membranas celulares son más frágiles. Si la incubación de agua fuese más prolongada provocaría la lisis del resto de células de la sangre. Además, las lisis llevadas a cabo con agua mostraron un número menor de restos celulares en la citometría de flujo. También, el hecho de que la adición de PBS deba realizarse seguidamente tras la adición de agua reduce el tiempo de espera en comparación con el protocolo de lisis del tampón comercial (15 minutos de incubación). Por todas estas razones, se eligió el protocolo de lisis con agua.

A pesar de que el marcaje intracelular de IFN- γ no sea una técnica utilizada en el diagnóstico, ha sido ampliamente utilizada para caracterizar la respuesta celular en ensayos clínicos como por ejemplo en la fase I de MTBVAC (Marinova et al., 2017) (Spertini et al., 2015). Sin embargo, el marcaje intracelular de IFN- γ realizado en este trabajo no permitió evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón. Este resultado podría ser debido a una ausencia de respuesta debido a que se realizó a un

tiempo muy temprano tras la vacunación. Otra razón podría ser la necesidad de una técnica más sensible como el EliSPOT. En análisis que requieren la detección de niveles bajos de respuesta, o la determinación de respuestas positivas o negativas puede ser preferible utilizar el EliSPOT ante el marcaje intracelular (Karlsson et al., 2003). Otra razón podría ser que el PepMix™ *M. tuberculosis* CFP10 no fuese lo suficientemente inmunogénico como para inducir una respuesta de IFN- γ .

Se decidió poner a punto un ensayo más sensible como el EliSPOT de IFN- γ . En primer lugar, se comparó la respuesta producida por el PepMix™ *M. tuberculosis* CFP10 con la proteína CFP10 entera. La proteína CFP10 mostró una mayor respuesta que la mezcla de péptidos en ratones vacunados con MTBVAC, demostrando ser más inmunogénica. Tal vez los péptidos de la mezcla de péptidos de CFP10 no sean inmunogénicos explicando la baja respuesta. Sin embargo, al utilizar la proteína entera, las células presentadoras de antígeno la fragmentan en péptidos que sí son inmunogénicos y los presentan en asociación al MHC-II provocando una mayor respuesta inmunológica.

Una vez determinado que la proteína entera presentaba una mayor respuesta, se decidió realizar un ensayo EliSPOT IFN- γ mimetizando los realizados en clínica. Se utilizaron los antígenos ESAT6, CFP10 y EspC. Actualmente, EspC no es utilizado en clínica pero se ha visto que es un antígeno inmunodominante como ESAT6 y CFP10 (Millington et al., 2011). Además, *phoP* parece estar implicado en la regulación de EspC (Sayes et al., 2018) pudiendo ser utilizado como un antígeno que permita diferenciar entre vacunados por MTBVAC (mutante de *phoP*) e infectados por *M. tuberculosis*. Los resultados mostraron respuesta a ESAT6 y CFP10 en ratones vacunados por MTBVAC pero no se observó respuesta en los vacunados con MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*. Este hecho tiene sentido porque los ratones al ser vacunados con MTBVAC establecieron contacto previo al estímulo con ESAT6 y CFP10, pero los vacunados con el mutante no presentaron contacto previo con estos antígenos lo que conllevó a una respuesta casi nula. Se podría haber esperado una respuesta nula a EspC para los dos grupos de vacunación ya que ambas cepas contienen la delección de *phoP*. Sin embargo, se obtuvo respuesta similar a EspC para las dos cepas lo que indicaría que EspC es expresado en las cepas y que tal vez su expresión no depende únicamente de *phoP* en MTBVAC.

Los resultados obtenidos en este EliSPOT mostraron variabilidad entre individuos, lo cual no era esperable debido a las condiciones controladas en las que se realizaron los experimentos. Se observaron individuos vacunados con MTBVAC que presentaron una respuesta a CFP10, ESAT6 y EspC superior a la media. Podría tratarse de una respuesta transitoria. Estos aumentos de respuestas transitorias también han sido observados en la fase clínica I de MTBVAC en humanos, y también en ensayos con cabras con el prototipo de MTBVAC SO2 (Marinova et al., 2017). No obstante, estos resultados deberían compararse con los de ratones infectados con *M. tuberculosis* y comprobar que se encuentran por debajo de ellos.

El ensayo EliSPOT IFN- γ con los antígenos ESAT6, CFP10 y EspC permitió evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón. Esto podría tener un enorme potencial en los ensayos clínicos de MTBVAC para distinguir entre vacunados con MTBVAC e infectados con *M. tuberculosis* ya que los actuales métodos de diagnóstico no lo permiten. Además, el ensayo EliSPOT es un ensayo económico lo que supone una gran ventaja para su puesta en marcha puesto que la TB afecta principalmente a países en vías de desarrollo. No obstante, estos resultados no son suficientes para su puesta en marcha. En primer lugar, se deberían realizar ensayos con un mayor número de sujetos para obtener resultados con significancia estadística. En segundo lugar, se deberían realizar ensayos con ratones infectados con *M. tuberculosis* con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en sujetos vacunados con MTBVAC e infectados y establecer límites para su diferenciación.

Este trabajo, además de tener una implicación científica, ha proporcionado una implicación ética. Habitualmente, el análisis de la inmunidad en ratones es llevado a cabo en bazo lo que conlleva que el animal deba ser sacrificado para realizar dichos análisis. Para realizar cinéticas de vacunación, se deben vacunar varios grupos de ratones que deben ser sacrificados a distintos tiempos lo que supone en un el uso de un gran número de animales. El hecho de que se utilice sangre permite realizar las extracciones en animales vivos, y por tanto, realizar cinéticas de vacunación sin necesidad de sacrificio lo que conllevaría a la reducción de animales utilizados, lo cual estaría en la línea de las directrices actuales de experimentación animal. Por otra parte, al utilizar la sangre se está analizando la respuesta en el mismo reservorio celular que en humanos permitiendo obtener resultados translacionables.

7. CONCLUSIONES

-Caracterización molecular de vacunas de tuberculosis.

1. Las PCRs realizadas en este trabajo permitieron verificar y diferenciar la integración de los plásmidos pMV361:*cfp10* o pMV361:*cfp10 dss* en el genoma de MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10*.
2. Las cepas complementadas, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*, expresaron el gen *cfp10*.
3. Las cepas complementadas, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*, no expresaron la proteína CFP10 ni intracelular ni extracelularmente.
4. Los ratones vacunados con las cepas complementadas, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*, mostraron ausencia de respuesta a CFP10.

Conclusión final: La ausencia de complementación en las cepas MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss* impidió continuar con los estudios para dilucidar el papel de CFP10 en la protección mediada por MTBVAC.

-Evaluación de la respuesta inmunológica de vacunas de tuberculosis en sangre de ratón.

1. El aislamiento de células blancas a partir de sangre de ratón utilizando agua miliQ en la lisis de eritrocitos permitió alcanzar niveles de eritrocitos suficientemente bajos para realizar los posteriores ensayos de inmunidad.
2. El marcaje intracelular de IFN- γ propuesto en este trabajo no permitió evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón.
3. El ensayo de EliSPOT IFN- γ con las proteínas ESAT6, CFP10 y EspC propuesto en este trabajo permitió evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón.

Conclusión final: En este trabajo se llevó a cabo la optimización de un ensayo tipo EliSPOT, utilizando ESAT6, CFP10 y EspC como estímulo, que permitió evaluar la respuesta específica de MTBVAC en sangre de ratón. No obstante, convendría continuar con los experimentos para comparar con ratones infectados con *M. tuberculosis*.

7. CONCLUSIONS

-Molecular characterization of tuberculosis vaccines.

1. PCRs proposed in this project allowed verifying and checking the integration of pMV361:*cfp10* y pMV361:*cfp10 dss* plasmids in MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* genome.
2. The complementation strains, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*, express *cfp10* gene.
3. The complementation strains, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*, did not express CFP10 protein neither intracellular nor extracellularly.
4. Mice vaccinated with the complementation strains, MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* y MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss*, showed no response to CFP10.

Final conclusion: The absence of complementation in the strains MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10* and MTBVAC Δ *esat6* Δ *cfp10* pMV361:*cfp10 dss* prevented to continue with the studies in order to elucidate the role of CFP10 in the protection mediated by MTBVAC.

-Evaluation of immunological response of tuberculosis vaccines in mice's blood.

1. The isolation of white cells from mice's blood using miliQ water in the erythrocytes lysis allowed reaching enough low erythrocytes levels to carry out the following immunological assays.
2. The IFN- γ intracellular staining proposed in this project did not allow evaluating the specific response of MTBVAC in mice's blood.

3. The IFN- γ EliSPOT assay with ESAT6, CFP10 and EspC proteins proposed in this project allowed evaluating the specific response of MTBVAC in mice's blood.

Final conclusion: In this project, an optimization of EliSPOT assay, using ESAT6, CFP10 and EspC as stimulus, was carried out to evaluate the specific response of MTBVAC in mice's blood. Nevertheless, it would be interesting to continue with these kinds of experiments in order to compare with mice infected with *M. tuberculosis*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, C., Brock, I., Olsen, A., Ottenhoff, T.H.M., Weldingh, K., Andersen, P., 2004. Mapping Immune Reactivity toward Rv2653 and Rv2654: Two Novel Low-Molecular-Mass Antigens Found Specifically in the Mycobacterium tuberculosis Complex. *J Infect Dis* 189, 812–819. <https://doi.org/10.1086/381679>
- Aagaard, C., Hoang, T., Dietrich, J., Cardona, P.-J., Izzo, A., Dolganov, G., Schoolnik, G.K., Cassidy, J.P., Billeskov, R., Andersen, P., 2011. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat. Med.* 17, 189–194. <https://doi.org/10.1038/nm.2285>
- Aguilo, N., Gonzalo-Asensio, J., Alvarez-Arguedas, S., Marinova, D., Gomez, A.B., Uranga, S., Spallek, R., Singh, M., Audran, R., Spertini, F., Martin, C., 2017. Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun* 8, 16085. <https://doi.org/10.1038/ncomms16085>
- Arbues, A., Aguilo, J.I., Gonzalo-Asensio, J., Marinova, D., Uranga, S., Puentes, E., Fernandez, C., Parra, A., Cardona, P.J., Vilaplana, C., Ausina, V., Williams, A., Clark, S., Malaga, W., Guilhot, C., Gicquel, B., Martin, C., 2013. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 31, 4867–4873. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.051>
- Arias Guillén, M., 2011. Advances in the Diagnosis of Tuberculosis Infection. *Arch Bronconeumol* 47, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2011.06.011>
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284, 1520–1523.
- Berthet, F.X., Rasmussen, P.B., Rosenkrands, I., Andersen, P., Gicquel, B., 1998. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology (Reading, Engl.)* 144 (Pt 11), 3195–3203. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3195>
- Bezous, J., Casal, C., Puentes, E., Díez-Guerrier, A., Romero, B., Aguiló, N., de Juan, L., Martín, C., Domínguez, L., 2015. Evaluation of the immunogenicity and diagnostic interference caused by M. tuberculosis SO2 vaccination against tuberculosis in goats. *Res. Vet. Sci.* 103, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.017>
- Brosch, R., Gordon, S.V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J.K., Golby, P., Garcia, J.N., Hewinson, R.G., Behr, M.A., Quail, M.A., Churcher, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Cole, S.T., 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5596–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700869104>
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., Guilhot, C., 1999. Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 34, 257–267.
- Champion, P.A.D., Stanley, S.A., Champion, M.M., Brown, E.J., Cox, J.S., 2006. C-Terminal Signal Sequence Promotes Virulence Factor Secretion in Mycobacterium tuberculosis. *Science* 313, 1632–1636. <https://doi.org/10.1126/science.1131167>
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K.E., Kato-Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., Yeboah-Manu, D., Bothamley, G., Mei, J., Wei, L., Bentley, S., Harris, S.R., Niemann, S., Diel, R., Aseffa, A., Gao, Q., Young, D., Gagneux, S., 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nat. Genet.* 45, 1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>
- Crick, D.C., Mahapatra, S., Brennan, P.J., 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis. *Glycobiology* 11, 107R–118R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.9.107R>

- Domínguez, J., Ruiz-Manzano, J., 2006. Prueba de la tuberculina: ¿es la hora del cambio? *Arch Bronconeumol* 42, 47–48. <https://doi.org/10.1157/13084393>
- Domínguez, J., Serra-Vidal, M., 2013. Nuevas técnicas in vitro en el diagnóstico de la infección tuberculosa. *Semin Fund Esp Reumatol* 14, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.semreu.2013.04.004>
- Esposito, S., Tagliabue, C., Bosis, S., 2013. Tuberculosis in Children. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 5. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2013.064>
- Fine, P.E.M., 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *The Lancet* 346, 1339–1345. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92348-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92348-9)
- Frigui, W., Bottai, D., Majlessi, L., Monot, M., Josselin, E., Brodin, P., Garnier, T., Gicquel, B., Martin, C., Leclerc, C., Cole, S.T., Brosch, R., 2008. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog.* 4, e33. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040033>
- Gao, L.-Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N., Brown, E.J., 2004. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol. Microbiol.* 53, 1677–1693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04261.x>
- Gonzalo-Asensio, J., Marinova, D., Martin, C., Aguilo, N., 2017. MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01803>
- Gröschel, M.I., Sayes, F., Shin, S.J., Frigui, W., Pawlik, A., Orgeur, M., Canetti, R., Honoré, N., Simeone, R., van der Werf, T.S., Bitter, W., Cho, S.-N., Majlessi, L., Brosch, R., 2017. Recombinant BCG Expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. *Cell Reports* 18, 2752–2765. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.057>
- Grotzke, J.E., Siler, A.C., Lewinsohn, D.A., Lewinsohn, D.M., 2010. Secreted Immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* Antigens Are Processed by the Cytosolic Pathway. *J Immunol* 185, 4336–4343. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000801>
- Houben, D., Demangel, C., Ingen, J. van, Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., Caleechurn, L., Bottai, D., Zon, M. van, Punder, K. de, Laan, T. van der, Kant, A., Vries, R.B., Willemsen, P., Bitter, W., Soolingen, D. van, Brosch, R., Wel, N. van der, Peters, P.J., 2012. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cellular Microbiology* 14, 1287–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x>
- Kamath, A.T., Fruth, U., Brennan, M.J., Dobbelaer, R., Hubrechts, P., Ho, M.M., Mayner, R.E., Thole, J., Walker, K.B., Liu, M., Lambert, P.-H., AERAS Global TB Vaccine Foundation, World Health Organization, 2005. New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine* 23, 3753–3761. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.001>
- Karlsson, A.C., Martin, J.N., Younger, S.R., Bredt, B.M., Epling, L., Ronquillo, R., Varma, A., Deeks, S.G., McCune, J.M., Nixon, D.F., Sinclair, E., 2003. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods* 283, 141–153.
- Kaufmann, S.H.E., Weiner, J., von Reyn, C.F., 2017. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases, Special Issue: Commemorating World Tuberculosis Day 2017* 56, 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.10.018>
- Lin, P.L., Ford, C.B., Coleman, M.T., Myers, A.J., Gawande, R., Ioerger, T., Sacchettini, J., Fortune, S.M., Flynn, J.L., 2014. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat. Med.* 20, 75–79. <https://doi.org/10.1038/nm.3412>

- Lou, Y., Rybniker, J., Sala, C., Cole, S.T., 2017. EspC forms a filamentous structure in the cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* and impacts ESX-1 secretion. *Mol. Microbiol.* 103, 26–38. <https://doi.org/10.1111/mmi.13575>
- Marinova, D., Gonzalo-Asensio, J., Aguilo, N., Martin, C., 2017. MTBVAC from discovery to clinical trials in tuberculosis-endemic countries. *Expert Review of Vaccines* 16, 565–576. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1324303>
- Marinova, D., Gonzalo-Asensio, J., Aguilo, N., Martin, C., 2013. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Expert Review of Vaccines* 12, 1431–1448. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.856765>
- Millington, K.A., Fortune, S.M., Low, J., Garces, A., Hingley-Wilson, S.M., Wickremasinghe, M., Kon, O.M., Lalvani, A., 2011. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5730–5735. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015153108>
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M., 2016. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2, 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Pang, X., Samten, B., Cao, G., Wang, X., Tvinnereim, A.R., Chen, X.-L., Howard, S.T., 2013. MprAB regulates the espA operon in *Mycobacterium tuberculosis* and modulates ESX-1 function and host cytokine response. *J. Bacteriol.* 195, 66–75. <https://doi.org/10.1128/JB.01067-12>
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., Cole, S.T., 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology* 46, 709–717. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x>
- Pym, A.S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., Griffiths, K.E., Marchal, G., Leclerc, C., Cole, S.T., 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat. Med.* 9, 533–539. <https://doi.org/10.1038/nm859>
- Renshaw, P.S., Panagiotidou, P., Whelan, A., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., Williamson, R.A., Carr, M.D., 2002. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J. Biol. Chem.* 277, 21598–21603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201625200>
- Russell, D.G., 2011. *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol Rev* 240, 252–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x>
- Samstein, M., Schreiber, H.A., Leiner, I.M., Susac, B., Glickman, M.S., Pamer, E.G., 2013. Essential yet limited role for CCR2⁺ inflammatory monocytes during *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell priming. *Elife* 2, e01086. <https://doi.org/10.7554/eLife.01086>
- Sayes, F., Blanc, C., Ates, L.S., Deboosere, N., Orgeur, M., Le Chevalier, F., Gröschel, M.I., Frigui, W., Song, O.-R., Lo-Man, R., Brossier, F., Sougakoff, W., Bottai, D., Brodin, P., Charneau, P., Brosch, R., Majlessi, L., 2018. Multiplexed Quantitation of Intraphagocyte *Mycobacterium tuberculosis* Secreted Protein Effectors. *Cell Rep* 23, 1072–1084. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.125>
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., Enninga, J., 2012. Phagosomal Rupture by *Mycobacterium tuberculosis* Results in Toxicity and Host Cell Death. *PLOS Pathogens* 8, e1002507. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002507>
- Solans, L., Aguiló, N., Samper, S., Pawlik, A., Frigui, W., Martín, C., Brosch, R., Gonzalo-Asensio, J., 2014a. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Infect. Immun.* 82, 3446–3456. <https://doi.org/10.1128/IAI.01824-14>

- Solans, L., Gonzalo-Asensio, J., Sala, C., Benjak, A., Uplekar, S., Rougemont, J., Guilhot, C., Malaga, W., Martín, C., Cole, S.T., 2014b. The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathogens* 10, e1004183. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004183>
- Spertini, F., Audran, R., Chakour, R., Karoui, O., Steiner-Monard, V., Thierry, A.-C., Mayor, C.E., Rettby, N., Jatou, K., Vallotton, L., Lazor-Blanchet, C., Doce, J., Puentes, E., Marinova, D., Aguilo, N., Martin, C., 2015. Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet Respir Med* 3, 953–962. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00435-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00435-X)
- Stucki, D., Brites, D., Jeljeli, L., Coscolla, M., Liu, Q., Trauner, A., Fenner, L., Rutaiwa, L., Borrell, S., Luo, T., Gao, Q., Kato-Maeda, M., Ballif, M., Egger, M., Macedo, R., Mardassi, H., Moreno, M., Tundo Vilanova, G., Fyfe, J., Globan, M., Thomas, J., Jamieson, F., Guthrie, J.L., Asante-Poku, A., Yeboah-Manu, D., Wampande, E., Ssengooba, W., Joloba, M., Henry Boom, W., Basu, I., Bower, J., Saraiva, M., Vaconcellos, S.E.G., Suffys, P., Koch, A., Wilkinson, R., Gail-Bekker, L., Malla, B., Ley, S.D., Beck, H.-P., de Jong, B.C., Toit, K., Sanchez-Padilla, E., Bonnet, M., Gil-Brusola, A., Frank, M., Penlap Beng, V.N., Eisenach, K., Alani, I., Wangui Ndung'u, P., Revathi, G., Gehre, F., Akter, S., Ntoumi, F., Stewart-Isherwood, L., Ntinginya, N.E., Rachow, A., Hoelscher, M., Cirillo, D.M., Skenders, G., Hoffner, S., Bakonyte, D., Stakenas, P., Diel, R., Crudu, V., Moldovan, O., Al-Hajoj, S., Otero, L., Barletta, F., Jane Carter, E., Diero, L., Supply, P., Comas, I., Niemann, S., Gagneux, S., 2016. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat. Genet.* 48, 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ng.3704>
- Wel, N. van der, Hava, D., Houben, D., Fluittsma, D., Zon, M. van, Pierson, J., Brenner, M., Peters, P.J., 2007. *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* 129, 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059>
- WHO | Global tuberculosis report 2018 [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed 6.6.19).
- Wolf, A.J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., Ernst, J.D., 2008. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.* 205, 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>

9. ANEXO

```
gtcgagttgaccgcgccctgaactctctgggagaagcctggactggaggtggcagcacaaggcgcttgccgctgcaacggcgatgggtgtctggctacaaccgctcaacacagggccaagaccgctgcatgaggcgacggcgcaagccggcgatcacaccag
gccatggccaagcgcgctgcctggcggagatgcgcgccaaccaatcaccagggcgctccttaacggccaaccaactcttctggatcaaacagatcccgatcgctgacggagatggattttcatccgtatgtggaaacagggcagccctggcaatggaggtctac
caggcggagacggcgttaaacagcgttttcgagaagctcagagccgatggcgtcgtatccttgatcccgccgagcgagcagacagcaaacccgatcttcggaaagccctccctgacagctcaaacccggttggccagttgcgcgcccggctaccagaccctcggc
caactggatgaatgagcggcccgatgacagcagctgaccagccgctgacagcagtgacgtcgttggcagcaggtggggcgcaaccggcgccgcaaccagccagcaggaagcccgccagatgggctcgtcggcaccagctccgctgtgaacctccctggct
ggatggatcagggcccgacgcccggcgctgcctggcggcgagtgcctacctggcgaggtggatggatggcagcagcggctgtctcagctgatcgaaagccggctggcccccctgggtgacggcgccgctcctgggagcggcgaggtggcgcc
gctccggtgggtggcggagcagtgggccaggtggcgaatccggcgctccaccagccggctcctggctgcgcgcccagccctgcgcgaggaggtgaaagagcagcagagagcagctggcgaagagagcagctggtagctccgtaatacaacagcaccg
gccaccggcgccggaagactgccaacattttgagcaggaaggtaaagagaaaagttagtcagcattggcagagatgaaagccgatgccgtaccctgcgcgagggcaggttaatttcgagcagatctccggcagactgaaaaccagatcgaccaggtgagtcga
cggcaggttcgctgagggccagtgccgcccggcgccggccgcccagggccggcccgcccgcccggcgctggtgcgcttccaagaagcagcaataagcagaagcaggaactcgacagatctcgacgaatattcgtcagggccggctccaatactcagggccagcaggaagcagc
agcagcggctgtcctcgcaaatggctctgacccgctaatcgaaaaagaaacggagcaaaaacccggcccggcaattccgacggctggttgatctgcaactagcgtacgatcgactgcccagcacaataaaaagaaagcctcagtcgaagactggcctttc
gtttat
```

```
gtcgagttgaccgcgccctgaactctctgggagaagcctggactggaggtggcagcacaaggcgcttgccgctgcaacggcgatgggtgtctggctacaaccgctcaacacagggccaagaccgctgcatgaggcgacggcgcaagccggcgatcacaccag
gccatggccaagcgcgctgcctggcggagatgcgcgccaaccaatcaccagggcgctccttaacggccaaccaactcttctggatcaaacagatcccgatcgctgacggagatggattttcatccgtatgtggaaacagggcagccctggcaatggaggtctac
caggcggagacggcgttaaacagcgttttcgagaagctcagagccgatggcgtcgtatccttgatcccgccgagcgagcagacagcaaacccgatcttcggaaagccctccctgacagctcaaacccggttggccagttgcgcgcccggctaccagaccctcggc
caactggatgaatgagcggcccgatgacagcagctgaccagccgctgacagcagtgacgtcgttggcagcaggtggggcgcaaccggcgccgcaaccagccagcaggaagcccgccagatgggctcgtcggcaccagctccgctgtgaacctccctggct
ggatggatcagggcccgacgcccggcgctgcctggcggcgagtgcctacctggcgaggtggatggatggcagcagcggctgtctcagctgatcgaaagccggctggcccccctgggtgacggcgccgctcctgggagcggcgaggtggcgcc
gctccggtgggtggcggagcagtgggccaggtggcgaatccggcgctccaccagccggctcctggctgcgcgcccagccctgcgcgaggaggtgaaagagcagcagagagcagctggcgaagagagcagctggtagctccgtaatacaacagcaccg
gccaccggcgccggaagactgccaacattttgagcaggaaggtaaagagaaaagttagtcagcattggcagagatgaaagccgatgccgtaccctgcgcgagggcaggttaatttcgagcagatctccggcagactgaaaaccagatcgaccaggtgagtcga
cggcaggttcgctgagggccagtgccgcccggcgccggccgcccagggccggcccgcccgcccggcgctggtgcgcttccaagaagcagcaataagcagaagcaggaactcgacagatctcgacgaatattcgtcagggccggctccaatactcagggccagcaggaagcagc
agcagcggcgaccggctaatcgaaaaagaaacggagcaaaaacccggcccggcaattccgacggctggttgatctgcaactagcgtacgatcgactgcccagcacaataaaaagaaagcctcagtcgaagactggcctttcgtttat
```

Figura 9.1. Secuencias clonadas en el plásmido pMV361; pMV361:*cfp10* (arriba) y pMV361:*cfp10 dss* (abajo). Legenda: origen de transcripción (rojo), secuencia codificante CFP10 (azul claro) y terminador de la transcripción (azul oscuro).

```
gtcgagttgaccgcgccctgaactctctgggagaagcctggactggaggtggcagcacaaggcgcttgccgctgcaacggcgatgggtgtctggctacaaccgctcaacacagggccaagaccgctgcatgaggcgacggcgcaagccggcgatcacaccag
gccatggccaagcgcgctgcctggcggagatgcgcgccaaccaatcaccagggcgctccttaacggccaaccaactcttctggatcaaacagatcccgatcgctgacggagatggattttcatccgtatgtggaaacagggcagccctggcaatggaggtctac
caggcggagacggcgttaaacagcgttttcgagaagctcagagccgatggcgtcgtatccttgatcccgccgagcgagcagacagcaaacccgatcttcggaaagccctccctgacagctcaaacccggttggccagttgcgcgcccggctaccagaccctcggc
caactggatgaatgagcggcccgatgacagcagctgaccagccgctgacagcagtgacgtcgttggcagcaggtggggcgcaaccggcgccgcaaccagccagcaggaagcccgccagatgggctcgtcggcaccagctccgctgtgaacctccctggct
ggatggatcagggcccgacgcccggcgctgcctggcggcgagtgcctacctggcgaggtggatggatggcagcagcggctgtctcagctgatcgaaagccggctggcccccctgggtgacggcgccgctcctgggagcggcgaggtggcgcc
gctccggtgggtggcggagcagtgggccaggtggcgaatccggcgctccaccagccggctcctggctgcgcgcccagccctgcgcgaggaggtgaaagagcagcagagagcagctggcgaagagagcagctggtagctccgtaatacaacagcaccg
gccaccggcgccggaagactgccaacattttgagcaggaaggtaaagagaaaagttagtcagcattggcagagatgaaagccgatgccgtaccctgcgcgagggcaggttaatttcgagcagatctccggcagactgaaaaccagatcgaccaggtgagtcga
cggcaggttcgctgagggccagtgccgcccggcgccggccgcccagggccggcccgcccgcccggcgctggtgcgcttccaagaagcagcaataagcagaagcaggaactcgacagatctcgacgaatattcgtcagggccggctccaatactcagggccagcaggaagcagc
agcagcggcgaccggctaatcgaaaaagaaacggagcaaaaacccggcccggcaattccgacggctggttgatctgcaactagcgtacgatcgactgcccagcacaataaaaagaaagcctcagtcgaagactggcctttcgtttat
```

Figura 9.2. Secuencia clonada en el plásmido pMV361:*cfp10*. Legenda: origen de transcripción (rojo), secuencia codificante CFP10 (azul claro), terminador de la transcripción (azul oscuro), región de hibridación del cebador directo RTPCRCFP10Forward (rosa), región de hibridación del cebador reverso CFP10Rv1 (morado) y región de hibridación del cebador reverso CFP10Rv2 (verde oscuro).

Tabla 9.1. Cebadores utilizados para PCR.

	USO	SECUENCIA
RTPCRCFP10Forward	Comprobación integración plásmido	5'-GCAGGAGGCAGGTAATTTTCG-3'
CFP10Rv1	Comprobación integración plásmido	5'-CTCGTCGGCCCTCGAGTATT-3'
CFP10Rv2	Comprobación integración plásmido	5'-GTCAGAAGCCCATTGCGAGG-3'
TB11	Amplificación de <i>Rv0440</i>	5'-GCAAGGCGGCGGCCAGCCGTT-3'
TB12	Amplificación de <i>Rv0440</i>	5'-GCCTCCGCCCTCGGATCAAC-3'
pMV361 CFP10Fw	Secuenciación <i>cfp10</i> y <i>cfp10 dss</i>	5'-ATGGCAGAGATGAAGACCGATG-3'
pMV361 CFP10Rv	Secuenciación <i>cfp10</i> y <i>cfp10 dss</i>	5'-CTTTCGACTGAGCCTTTCGTTT-3'

Tabla 9.2. Programas de PCR utilizados.

	Desnaturalización inicial	Desnaturalización cíclica	Hibridación	Extensión cíclica	Extensión final	Mantenimiento de muestras
Comprobación integración pMV361:<i>cfp10</i> y pMV361:<i>cfp10 dss</i>	94°C durante 1 min	94°C durante 30 s	60°C durante 45 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C
Amplificación <i>Rv0440</i>	94°C durante 1 min	94°C durante 30 s	60°C durante 45 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C
Secuenciación <i>cfp10</i> y <i>cfp10 dss</i>	94°C durante 1 min	94°C durante 30 s	58°C durante 45 s	72°C durante 2 min	72°C durante 5 min	4°C

30 ciclos

Tabla 9.3. Mezclas de reacción utilizadas en PCR.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
Agua miliQ	19,5
<i>MyTaq Reaction Buffer*</i> (Bioline)	2,5
Cebador directo 25 μM	0,35
Cebador reverso 25 μM	0,35
DNA molde	2
<i>MyTaq DNA Polymerase</i> (5 U/μL)(Bioline)	0,187

**MyTaq Reaction Buffer* contiene 5 mM dNTPs y 15 mM MgCl₂.

Tabla 9.4. Cebadores utilizados para qRT-PCR.

	USO	SECUENCIA
RTPCRCFP10Forward 5 μM	qRT-PCR <i>cfp10</i>	5'-GCAGGAGGCAGGTAATTTTCG-3'
RTPCRCFP10Reverse 5 μM	qRT-PCR <i>cfp10</i>	5'-CCTGGTCGATCTGGGTTTTC—3'
RTSigAFw 5 μM	qRT-PCR <i>cfp10</i> (normalizar)	5'-CCGATGACGACGAGGAGATC-3'
RTSigARv 5 μM	qRT-PCR <i>cfp10</i> (normalizar)	5'-CGGAGGCCTTGTCCTTTTC-3'

Tabla 9.5. Composición de los geles de poliacrilamida al 15% utilizados en electroforesis desnaturante de proteínas (SDS-PAGE).

COMPONENTES	GEL SEPARADOR (15%)	GEL CONCENTRADOR (4%)
Acrilamida/Bis 30%	2,5 mL	660 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,26 mL
H₂O	1,2 mL	3 mL
SDS 10%	50 µL	50 µL
PSA 10%	75 µL	150 µL
TEMED	7,5 µL	7,5 µL