



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departament de Genètica i de Microbiologia

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

**BASES DE LA IMMUNODULACIÓ  
MICOBACTERIANA PER AL CONTROL DE LA  
PROGRESSIÓ TUMORAL**

MARC BACH GRIERA

Bellaterra, 2022





## **TESI DOCTORAL**

Programa de Doctorat en Microbiologia  
Departament de Genètica i de Microbiologia  
Facultat de Biociències  
Universitat Autònoma de Barcelona  
2022

# **BASES DE LA IMMUNODULACIÓ MICOBACTERIANA PER AL CONTROL DE LA PROGRESSIÓ TUMORAL**

Marc Bach Grier

Memòria de tesi presentada per a obtenir el grau de Doctor en Microbiologia  
per a la Universitat Autònoma de Barcelona

Directora Tesi i Tutora

Doctorand

Dra. Esther Julián Gómez

Marc Bach Grier

Bellaterra, 2022





A la meva família







# ÍNDIX

ÍNDIX.....	I
ÍNDIX DE TAULES .....	V
ÍNDIX DE FIGURES.....	VI
RESUM.....	X
ABSTRACT .....	XII
ACRÒNIMS.....	XIV
1 . INTRODUCCIÓ .....	1
1.1 Càncer de bufeta .....	3
1.1.1 La bufeta urinària: Generalitats .....	3
1.1.2 Classificació del càncer de bufeta: Estadis i graus. ....	3
1.1.3 Epidemiologia.....	7
1.1.4 Factors de risc .....	8
1.1.5 Diagnòstic del càncer de bufeta.....	10
1.1.6 Tractament actual del NMIBC.....	11
1.2 <i>M. bovis</i> BCG i el NMIBC.....	13
1.2.1 Antecedents .....	13
1.2.2 Mecanisme d'acció del <i>M. bovis</i> BCG .....	13
1.2.2.1 Efecte directe del tractament del <i>M. bovis</i> BCG .....	13
1.2.2.2 Efecte indirecte del tractament del <i>M. bovis</i> BCG .....	14
1.2.3 Fracàs del tractament amb el <i>M. bovis</i> BCG: Recurrència i progressió a MIBC.....	15
1.2.4 Seguretat i toxicitat del <i>M. bovis</i> BCG.....	17
1.2.5 Alternatives al <i>M. bovis</i> BCG en el tractament del NMIBC .....	19
1.2.5.1 Antecedents .....	19
1.2.5.2 Utilització d'altres micobacteris per al tractament del NMIBC.....	19
1.2.5.3 <i>Mycobacterium brumae</i> .....	20
1.3 Implicació dels micobacteris en el control de mecanismes relacionats amb la carcinogènesi i en la modulació del microambient tumoral.....	21
1.3.1 Transició epiteli mesènquima (EMT) i progressió tumoral .....	22
1.3.2 Microambient tumoral en el context del càncer de bufeta.....	23
1.3.2.1 Microambient immunitari tumoral i <i>M. bovis</i> BCG .....	23
1.3.3 Macròfags i càncer de bufeta.....	27
1.3.3.1 Polarització i reversió de macròfags en càncer de bufeta .....	27
2 OBJECTIUS.....	30

3	CAPÍTOL 0. MATERIALS I MÈTODES. GENERALITATS .....	32
3.1	Soques micobacterianes i condicions del cultiu microbiològic .....	34
3.2	Preparació de les suspensions bacterianes .....	35
3.3	Línies cel·lulars tumorals. Tipologia i condicions de cultiu .....	36
3.4	Tractament de les cèl·lules tumorals amb els micobacteris .....	37
4	CAPÍTOL I. AVALUACIÓ DE LA SEGURETAT I TOXICITAT DEL <i>M. brumae</i> .....	40
4.1	MATERIALS I MÈTODES .....	42
4.1.1	Seguretat i toxicitat en el model animal murí .....	42
4.1.1.1	Infecció intravenosa .....	42
4.1.1.2	Instil·lacions intravesicals .....	43
4.1.1.3	Determinació d'UFC en diferents òrgans de ratolí (pulmó, melsa, fetge i ronyó) .....	43
4.1.1.4	Anàlisi histopatològica dels òrgans de ratolí .....	45
4.1.1.5	Determinació de paràmetres hematològics i bioquímics .....	46
4.1.2	Seguretat en el model animal de <i>G. mellonella</i> .....	46
4.1.2.1	Determinació d'UFC en l'hemolimfa de larves de <i>G. mellonella</i> .....	47
4.1.3	Anàlisi estadística .....	47
4.2	RESULTATS .....	48
4.2.1	INFECCIÓ INTRAVENOSA EN RATOLINS SCID .....	48
4.2.1.1	Anàlisi de la supervivència dels ratolins infectats per via intravenosa .....	48
4.2.1.2	Anàlisi de l'evolució del pes corporal dels ratolins infectats per via intravenosa .....	48
4.2.1.3	Recompte d'UFC del <i>M. brumae</i> i del <i>M. bovis</i> BCG en pulmons, melses i fetges, i el seu corresponent pes, en ratolins SCID .....	49
4.2.1.4	Anàlisi de paràmetres bioquímics i hematològics en ratolins SCID infectats amb el <i>M. brumae</i> i el <i>M. bovis</i> BCG .....	50
4.2.1.5	Anàlisi histopatològica de diferents òrgans i teixits dels ratolins SCID infectats per via intravenosa .....	53
4.2.2	INSTIL·LACIONS INTRAVESICALS EN RATOLINS BALB/c .....	55
4.2.2.1	Anàlisi de la supervivència dels ratolins BALB/c tractats amb diferents dosis de <i>M. brumae</i> viu i <i>M. brumae</i> $\gamma$ -irradiat .....	55
4.2.2.2	Anàlisi de l'evolució del pes corporal dels ratolins BALB/c tractats amb diferents dosis de <i>M. brumae</i> viu i <i>M. brumae</i> $\gamma$ -irradiat .....	55
4.2.2.3	Recompte d'UFC del <i>M. brumae</i> i del <i>M. bovis</i> BCG en pulmons, melses, fetges i ronyons, i el seu corresponent pes, de ratolins BALB/c .....	56
4.2.2.4	Anàlisi de paràmetres bioquímics i hematològics en ratolins BALB/c tractats intravesicalment amb el <i>M. brumae</i> .....	57
4.2.2.5	Anàlisi histopatològica de les bufetes dels ratolins BALB/c sotmesos a instil·lacions intravesicals .....	60
4.2.3	INFECCIÓ INTRAHEMOCOÈLICA DE LARVES DE <i>G. mellonella</i> .....	61

4.2.3.1	Anàlisi de la supervivència de larves de <i>G. mellonella</i> infectades amb diferents dosis de <i>M. brumae</i> i <i>M. bovis</i> BCG.....	61
4.2.3.2	Recòmpte d'UFC del <i>M. brumae</i> i del <i>M. bovis</i> BCG en l'hemolinfa de larves de <i>G. mellonella</i> .....	61
4.3	DISCUSSIÓ DE RESULTATS .....	62
5	CAPÍTOL II. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ, LA INVASIVITAT, LA CAPACITAT D'ANCORATGE INDEPENDENT I LA PRODUCCIÓ DE METAL·LOPROTEÏNASES EN LÍNIES TUMORALS INFECTADES AMB MICOBACTERIS.....	66
5.1	MATERIALS I MÈTODES .....	68
5.1.1	Avaluació de la migració col·lectiva mitjançant l'assaig del tancament de la ferida .....	68
	.....	69
5.1.2	Avaluació de la migració i la invasivitat cel·lular individual .....	69
5.1.3	Avaluació del creixement independent a l'ancoratge .....	71
5.1.4	Avaluació de la producció de metal·loproteïnases actives .....	73
5.1.5	Anàlisi estadística .....	73
5.2	RESULTATS.....	74
5.2.1	Anàlisi de la migració cel·lular col·lectiva en cèl·lules tumorals de bufeta infectades amb el <i>M. bovis</i> BCG i el <i>M. brumae</i> .....	74
5.2.2	Anàlisi de la migració cel·lular individual en cèl·lules tumorals de bufeta infectades amb micobacteris.....	75
5.2.3	Anàlisi de la invasivitat cel·lular en cèl·lules tumorals de bufeta infectades amb els micobacteris.....	77
5.2.4	Avaluació del creixement independent a l'ancoratge en les cèl·lules tumorals de bufeta infectades amb micobacteris .....	79
5.2.5	Anàlisi de la producció de metal·loproteïnases en les línies tumorals T24 i 5637 infectades amb ambdós micobacteris .....	80
5.3	DISCUSSIÓ DE RESULTATS .....	81
6	CAPÍTOL III. ESTUDI DE LA INFECCIÓ AMB MICOBACTERIS EN EL FENÒMEN DE POLARITZACIÓ DE MACRÒFAGS HUMANS I EL SEU FECTE ANTITUMORAL .....	86
6.1	MATERIAL I MÈTODES .....	88
6.1.1	Generació de macròfags no activats (M0) i polarització d'aquests en macròfags clàssicament activats (M1) i macròfags activats alternativament (M2) .....	88
6.1.2	Reversió de macròfags amb un fenotip M2 en macròfags amb un fenotip M1 .....	88
6.1.3	Recol·lecció de sobrenedants i generació de medi condicionat (MC) .....	90
6.1.4	Anàlisi de citocines.....	90
6.1.5	Assaig de la inhibició de la proliferació cel·lular .....	91
6.1.6	Citometria de flux.....	91
6.1.7	Assaigs de migració i invasivitat cel·lular .....	93
6.1.8	Anàlisi estadística .....	93
6.2	RESULTATS.....	94

6.2.1	Anàlisi de l'expressió de marcadors de superfície cel·lular associats a macròfags M0, M1 i M2 .....	94
6.2.2	Avaluació de la producció de citocines .....	98
6.2.3	Anàlisi de la inhibició de la proliferació cel·lular en cèl·lules tumorals de bufeta .....	100
6.2.4	Anàlisi de la migració i la invasivitat cel·lular de cèl·lules tumorals de bufeta exposades a diferents MC de macròfags infectats amb micobacteris .....	102
6.3	DISCUSSIÓ DE RESULTATS .....	105
7	. DISCUSSIÓ GENERAL DE RESULTATS.....	108
8	. CONCLUSIONS.....	112
9	. REFERÈNCIES.....	116
10	. ANNEX.....	136
11	AGRAÏMENTS .....	140

# ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.	Sistema d'estadiatge TNM en càncer de bufeta .....	4
Taula 2.	Factors de risc atribuïbles i probablement associats al càncer de bufeta. ....	9
Taula 3.	Sistema d'estratificació del risc de càncer de bufeta en pacients amb hematúria microscòpica. ....	10
Taula 4.	Estratificació del risc en NMIBC. ....	11
Taula 5.	Incidència de les complicacions induïdes pel <i>M. bovis</i> BCG en la teràpia intravesical pel tractament del NMIBC en humans.....	18
Taula 6.	Preparació medi de cultiu 7H10 i suplement d'OADC .....	34
Taula 7.	Línies cel·lulars utilitzades.....	36
Taula 8.	Anàlisi histopatològica d'òrgans i teixits.....	45
Taula 9.	Sistema de gradació de les lesions observades en l'anàlisi histopatològica.....	45
Taula 10.	Paràmetres bioquímics i hematològics analitzats .....	46
Taula 11.	Resultats dels paràmetres hematològics estudiats en els ratolins SCID tractats per via intravenosa. ....	51
Taula 12.	Resultats dels paràmetres bioquímics estudiats en els ratolins SCID tractats per via intravenosa. ....	52
Taula 13.	Resultats dels paràmetres hematològics estudiats en els ratolins BALB/C tractats per via intravesical. ....	58
Taula 14.	Resultats dels paràmetres bioquímics estudiats en els ratolins BALB/C tractats per via intravesical.....	59
Taula 15.	Condicions experimentals dels assaigs de migració i invasivitat cel·lular .....	69
Taula 16.	Percentatges del creixement independent a l'ancoratge en diferents línies cel·lulars de càncer de bufeta.....	80
Taula 17.	Generació de sobrenedants i medis condicionats durant els processos de diferenciació, polarització i reversió de la polarització de macròfags .....	90
Taula 18.	Panell d'anticossos i isotips utilitzats en l'estudi dels fenòmens de diferenciació, polarització i reversió de la polarització dels macròfags.....	92
Taula 19.	Condicions i tractaments emprats per a la diferenciació, polarització i reversió de macròfags. ....	94
Taula 20.	Percentatge d'expressió dosi-dependent dels marcadors de superfície CD80 i CD86 (fenotip M1), CD163 i CD206 (fenotip M2). ....	95
Taula 21.	Producció dosi-dependent de citocines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 p40 i TNF- $\alpha$ ,) en els diferents fenotips de macròfags generats.....	99
Taula 22.	Percentatges de la proliferació cel·lular .....	101

# ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1.	Representació gràfica de l'anatomia de la bufeta i els corresponents graus d'estadiatge del càncer de bufeta. ....	6
Figura 2.	Incidència estimada estandaritzada per edat (ASR) (Mundial) de càncer de bufeta al 2020.....	7
Figura 3.	Visió general de les orientacions de l'EUA respecte del tractament del NMIBC. ....	12
Figura 4.	Mecanisme d'acció del <i>M. bovis</i> BCG en el tractament del càncer de bufeta no múscul invasiu. ....	14
Figura 5.	Subclassificació de Nieder <i>et al</i> dels diferents tipus fracàs del <i>M. bovis</i> BCG en el tractament del NMIBC. ....	15
Figura 6.	Transició epiteli mesènquima (EMT).....	22
Figura 7.	Principals components del microambient tumoral del càncer de bufeta. ....	26
Figura 8.	Mecanismes de polarització, de reclutament i d'acció dels TAMs M2 en el càncer de bufeta. ....	28
Figura 9.	Esquema general referent a la preparació de suspensions bacterianes (inòculs o tractaments).....	35
Figura 10.	Diferenciació de monòcits THP-1 en macròfags no activats (M0). ....	38
Figura 11.	Esquema general del procediment emprat per a la preparació de les suspensions bacterianes (inòculs) i la infecció bacteriana dels cultius cel·lulars de les cèl·lules tumorals de bufeta o la línia cel·lular THP-1. ....	39
Figura 12.	Esquema general de l'estudi de la seguretat i toxicitat a partir de la infecció intravenosa amb micobacteris. ....	42
Figura 13.	Esquema general de l'estudi la seguretat i toxicitat en ratolins sotmesos a repetides instil·lacions intravesicals. ....	43
Figura 14.	Esquema del procediment utilitzat per al processament d'òrgans de ratolí i el posterior recompte d'UFCs.....	44
Figura 15.	Esquema general de l'estudi de seguretat en el model animal de larves de <i>G. mellonella</i> .....	47
Figura 16.	Determinació d'UFC en hemolimfa de larves de <i>G. mellonella</i> .....	47
Figura 17.	Corba de supervivència corresponent a la infecció intravenosa.....	48
Figura 18.	Pes corporal i pes relatiu en ratolins sotmesos a la infecció intravenosa.....	49
Figura 19.	Unitats formadores de colònies i pes d'òrgans en ratolins SCID.....	49
Figura 20.	Anàlisi histopatològica dels òrgans dels ratolins infectats per via intravenosa .....	53
Figura 21.	Anàlisi histopatològica d'altres òrgans de ratolins infectats per via intravenosa. ....	54
Figura 22.	Corba de supervivència corresponent a l'administració intravesical.....	55
Figura 23.	Pes corporal i pes corporal relatiu en ratolins sotmesos a repetides instil·lacions i ntravesicals. ....	56
Figura 24.	Unitats formadores de colònies i pes d'òrgans en ratolins BALB/c.....	56
Figura 25.	Anàlisi histopatològica de les bufetes urinàries dels ratolins BALB/c. ....	60

Figura 26.	Corba de supervivència corresponent a la infecció de larves de <i>G. mellonella</i> .....	61
Figura 27.	Creixement d'unitats formadores de colònies (UFC) en l'hemolimfa de larves de <i>G. mellonella</i> . .....	61
Figura 28.	Esquema de l'assaig d'avaluació de la migració cel·lular col·lectiva .....	68
Figura 29.	Esquema general dels assaigs de migració i invasivitat cel·lular.....	70
Figura 30.	Esquema de l'assaig d'avaluació del creixement independent a l'ancoratge.....	72
Figura 31.	Estudi de la migració cel·lular col·lectiva.....	75
Figura 32.	Estudi de la migració cel·lular individual en les línies tumorals de bufeta.....	76
Figura 33.	Estudi de la invasivitat cel·lular en dues línies tumorals de bufeta. ....	78
Figura 34.	Avaluació del creixement independent a l'ancoratge en les línies cel·lulars de càncer de bufeta T24, MB49 i J82. ....	79
Figura 35.	Avaluació de la producció de metal·loproteïnases actives. ....	80
Figura 36.	Esquema de la generació de macròfags M0 i la polarització en macròfags M1 i M2. ..	89
Figura 37.	Esquema de la reversió de la polarització de macròfags M2 mitjançant la infecció amb el <i>M. bovis</i> BCG i el <i>M. brumae</i> .....	89
Figura 38.	Morfologia dels diferents macròfags generats (M0, M1 i M2). ....	94
Figura 39.	Percentatge d'expressió de marcadors de superfície cel·lular associats als diferents fenotips de macròfags .....	96
Figura 40.	Gràfics de punts ( <i>dot-plots</i> ) representatius de les diferents combinacions d'anticossos utilitzats en l'anàlisi de la polarització i la reversió de macròfags.....	97
Figura 41.	Anàlisi de la producció de citocines .....	100
Figura 42.	Anàlisi de la inhibició de la proliferació cel·lular .....	101
Figura 43.	Assaigs de migració i invasivitat cel·lular en la línia tumoral de bufeta T24. ....	103
Figura 44.	Assaigs de migració i invasivitat cel·lular en la línia tumoral de bufeta J82.....	104







# RESUM

---

El càncer de bufeta és una patologia que durant els últims anys ha vist incrementada la seva incidència en la població europea. Afortunadament, les millores en la detecció han comportat una millora en el control oncològic d'aquesta i, per tant, en una reducció de les taxes de mortalitat. A grans trets, aquesta patologia es pot classificar en dos grans grups segons si el tumor ha aconseguit envair o no la capa muscular de la bufeta. D'aquesta manera, parlarem de càncer de bufeta no múscul invasiu (NMIBC), en el cas que el tumor no hagi envaït la capa muscular; o de càncer múscul invasiu (MBIC) en el supòsit que aquest ja hagi penetrat la capa muscular. Així mateix, el pronòstic i el tractament del pacient també dependrà del nivell de penetració d'aquest tumor, resultant menys favorable en el cas que es tracti d'un tumor invasiu. Afortunadament, el NMIBC representa la malignitat tumoral de bufeta més comuna amb al voltant del 75% dels diagnòstics totals. El tractament estàndard del NMIBC consisteix en una resecció transuretral del tumor de la bufeta, que confirma el diagnòstic, seguida d'una immunoteràpia que consisteix en un règim d'instil·lacions intravesicals del *Mycobacterium bovis* BCG amb la finalitat d'evitar la recurrència i la progressió d'aquest tumor.

No obstant això, el 50% de pacients sotmesos al tractament amb el *M. bovis* BCG pot presentar episodis de recurrència i de progressió de la malaltia. D'altra banda, al tractar-se d'un patògen atenuat, la seva administració pot comportar complicacions de caràcter local, en aproximadament un 50% dels casos, i de complicacions sistèmiques en aproximadament un 30% dels pacients sotmesos al tractament intravesical. A més, entre un 1-5% dels pacients pot desenvolupar complicacions severes com ara infeccions pulmonars o fins i tot sèpsia.

D'altra banda, el mecanisme d'acció del *M. bovis* BCG continua essent objecte d'estudi. Entre altres aspectes, manquen estudis sobre l'efecte que exerceix el *M. bovis* BCG sobre els processos de migració i invasivitat de les cèl·lules tumorals de la bufeta, així com en el potencial immunomodulador d'aquest micobacteri sobre determinats components cel·lulars del microambient tumoral com ara els macròfags.

En aquest treball ens hem proposat demostrar la seguretat i no toxicitat del *Mycobacterium brumae* com a alternativa al *M. bovis* BCG en el tractament del NMIBC, una vegada s'ha constatat en estudis previs la resposta immunitària antitumoral que presenta aquest micobacteri. Així doncs, vam infectar per via intravenosa ratolins immunodeprimits amb el *M. brumae* o el *M. bovis* BCG i vam estudiar un ampli rang de paràmetres hematològics i bioquímics, així com l'anàlisi histopatològica de múltiples òrgans. De la mateixa manera, es va analitzar la seguretat i la no toxicitat del *M. brumae* en el context de repetides instil·lacions intravesicals d'aquest micobacteri en ratolins immunocompetents. Per finalitzar, es va comprovar la seguretat d'aquest micobacteri en el model animal de larves de *Galleria mellonella*.

La segona part de l'estudi va consistir en l'avaluació del paper del *M. brumae* i el *M. bovis* BCG davant dels fenòmens de migració i invasivitat cel·lular, així com en el creixement independent a l'ancoratge, presentats per les cèl·lules tumorals de bufeta. A més, es va analitzar si la infecció pel *M.*

*brumae* i el *M. bovis* BCG exercien algun efecte sobre la producció de metal·loproteïnases per part de les cèl·lules tumorals de bufeta.

L'últim estudi d'aquesta tesi doctoral va posar èmfasi sobre el paper dels micobacteris en la modulació de la polarització de macròfags humans. Concretament, es van generar diferents fenotips de macròfags i es va avaluar si la infecció pel *M. brumae* i el *M. bovis* BCG era capaç de modular o polaritzar el fenotip d'aquests macròfags i, en el cas de tractar-se de macròfags polaritzats prèviament amb diferents estímuls, de revertir la polarització d'aquests. Per a comprovar la funcionalitat d'aquests fenotips, es va avaluar la seva capacitat d'inhibir la proliferació tumoral, així com la seva implicació en els fenòmens de migració i invasivitat cel·lular de diferents línies tumorals de bufeta.

# ABSTRACT

---

Bladder cancer is a disease that has increased its incidence in the European population in recent years. Fortunately, improvements in detection have led to an improvement in cancer control and, therefore, a reduction in mortality rates. Broadly speaking, this pathology can be classified into two major groups depending on whether or not the tumor has managed to invade the muscular layer of the bladder. Thus, we are talking about non-invasive non-muscular bladder cancer (NMIBC), when the tumor in the case of the tumor has not invaded the muscular layer; or invasive muscle cancer (MBIC) if it has already penetrated the muscle layer. The prognosis and treatment of the patient will also depend on the level of penetration of this tumor, being less favorable in the case of an invasive tumor. Fortunately, NMIBC represents the most common bladder tumor malignancy with about 75% of total diagnoses. The gold standard treatment for NMIBC is a transurethral resection of the bladder tumor, which confirms the diagnosis, followed by immunotherapy consisting of a regimen of intravesical instillations of *Mycobacterium bovis* BCG to prevent recurrence and the progression of this tumor.

However, 50% of patients undergoing treatment with *M. bovis* BCG may experience episodes of recurrence and progression of the disease. On the other hand, as it is an attenuated pathogen, its administration can lead to local complications in approximately 50% of cases, and systemic complications in approximately 30% of patients undergoing intravesical treatment. In addition, between 1-5% of patients may develop severe complications such as lung infections or even sepsis.

On the other hand, the mechanism of action of *M. bovis* BCG continues to be studied. Among other things, there is a lack of studies on the effect of *M. bovis* BCG on the processes of migration and invasiveness of bladder tumor cells, as well as the immunomodulatory potential of this mycobacterium on certain cellular components of the bladder, and the involvement of the tumor microenvironment considering the role of macrophages in such process.

In this work we have set out to demonstrate the safety and non-toxicity of *Mycobacterium brumae* as an alternative to *M. bovis* BCG in the treatment of NMIBC, once the antitumor immune response of this mycobacterium has been established. Thus, we intravenously infected immunocompromised mice with *M. brumae* or *M. bovis* BCG and studied/evaluated a wide range of hematologic and biochemical parameters, as well as histopathological analysis of multiple organs. Similarly, the safety and non-toxicity of *M. brumae* in the context of its intravesical administration to immunocompetent mice were analyzed. Finally, the safety of this mycobacterium was tested in the animal model of *Galleria mellonella* larvae.

The second part of the study consisted of the evaluation of the role of *M. brumae* and *M. bovis* BCG in the phenomena of cell migration and invasiveness, as well as the independent growth in the anchorage, presented by the bladder tumor cells. In addition, it was analyzed whether *M. brumae* and *M. bovis* BCG infection had any effect on the production of metalloproteinases by bladder tumor cells. The latest study in this doctoral dissertation is focused on the role of mycobacteria modulating the polarization of human macrophages. Specifically, different macrophage phenotypes were generated and it was assessed whether *M. brumae* or *M. bovis* BCG infection was able to modulate or polarize the

phenotype of these macrophages and, in the case of polarized macrophages, previously differentiated with different stimuli, reverse the polarization of this cellular subtype. To assess the functionality of these phenotypes, their ability to inhibit tumor proliferation was evaluated, as well as their involvement in the phenomena of migration and cell invasiveness of different bladder tumor cell lines.

# ACRÒNIMS

---

<b>APC</b>	Cèl·lula presentadora d'antigen ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
<b>AUA</b>	Associació Americana d'Urologia ( <i>American Urological Association</i> )
<b>BCG</b>	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG
<b>CIS</b>	<i>Carcinoma in situ</i>
<b>CTL</b>	Limfòcit T citotòxic ( <i>Cytotoxic T lymphocyte</i> )
<b>DC</b>	Cèl·lula dendrítica (Dendritic cell)
<b>DMEM</b>	Dulbecco Modified Eagles's Medium.
<b>DXM</b>	Dexametasona
<b>EAU</b>	Associació Europea d'Urologia ( <i>European Association of Urology</i> )
<b>ECM</b>	Matriu extracel·lular ( <i>Extracellular Matrix</i> )
<b>EMT</b>	Transició epitel·li mesènquima ( <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> )
<b>FACS</b>	Tampó FACS ( <i>Flow cytometry Staining Buffer</i> )
<b>FAP</b>	Fibronectina, Proteïna d'activació de fibroblasts ( <i>Fibroblast Activation Protein</i> )
<b>FBS</b>	Sèrum boví fetal ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>G1</b>	Grau 1 de diferenciació
<b>G2</b>	Grau 2 de diferenciació
<b>G3</b>	Grau 3 de diferenciació
<b>GLOBOCAN</b>	Observatori Global del Càncer ( <i>Global Cancer Observatory</i> )
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags ( <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>HG</b>	Carcinoma papil·lars urotelials d'elevat grau ( <i>High grade</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferó-gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INT</b>	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride
<b>LG</b>	Carcinoma papil·lar urotelial de baix grau ( <i>Low-grade</i> )
<b>M0</b>	Macròfag no activat
<b>M1</b>	Macròfag M1
<b>M2</b>	Macròfag M2

<b>MDSC</b>	Cèl·lula mieloide supressora
<b>MHC-I</b>	Complex d'histocompatibilitat MHC-I
<b>MHC-II</b>	Complex d'histocompatibilitat MHC-II
<b>MIBC</b>	Càncer de bufeta múscul invasiu ( <i>Muscle-invasive bladder cancer</i> ).
<b>MT</b>	Microambient tumoral
<b>MTT</b>	3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NK</b>	Cèl·lula Natural killer
<b>NMIBC</b>	Càncer de bufeta no múscul invasiu ( <i>Non-muscle invasive bladder cancer</i> ).
<b>OADC</b>	Àcid Oleic-Albúmina-Dextrosa-Catalasa
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>PBS</b>	Tampó fostat salí ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PD-L1</b>	Lligand 1 de mort programada ( <i>Programmed Death-ligand 1</i> )
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristat 13-acetat
<b>PUNLMP</b>	Neoplàsies papil·lars de baix potencial maligne ( <i>Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential</i> )
<b>RTU</b>	Resecció transuretral
<b>SUO</b>	Societat d'Urologia Oncològica ( <i>Society of Urological Oncology</i> )
<b>TAM</b>	Macròfag associat a tumor ( <i>Tumor-associated Macrophage</i> )
<b>TAN</b>	Neutròfil associat a tumor ( <i>Tumor-Associated Neutrophil</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de creixement transformant-beta
<b>T<sub>H</sub>1</b>	Resposta tipus T <sub>H</sub> 1
<b>T<sub>H</sub>2</b>	Resposta tipus T <sub>H</sub> 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosi Tumoral alfa ( <i>Tumoral Necrosis Factor alpha</i> )
<b>TNM</b>	Tumor Nòdul Metàstasi (Tumor Node Metastasis)
<b>Treg</b>	Cèl·lula T reguladora
<b>UFC</b>	Unitat Formadora de Colònies







# **1 . INTRODUCCIÓ**

---



## 1.1 CÀNCER DE BUFETA

### 1.1.1 LA BUFETA URINÀRIA: GENERALITATS

La bufeta urinària és un òrgan buit del sistema urinari localitzat en la excavació de la pelvis, de característiques múscul-membranoses, i que exerceix la funció d'emmagatzemar l'orina prèviament produïda i filtrada pels ronyons, connectats a la bufeta per mitjà dels urèters. Finalment, l'orina emmagatzemada a la bufeta és expulsada a l'exterior de l'organisme, per el conducte de la uretra, a través de la micció.

A nivell anatòmic, la bufeta urinària presenta diferents estructures i capes [1](Figura 1):

- **Lumen vesical:** Cavitat interior de la bufeta on resta emmagatzemada l'orina produïda per ambdós ronyons i impulsada via urèters.
- **Capa serosa:** Localitzada a la part més externa de la bufeta. Recobreix l'exterior de la bufeta per mitjà del peritoneu parietal. Conté el teixit gras que envolta la bufeta (greix perivesical).
- **Capa muscular:** Està constituïda per múscul llis i el múscul detrusor, encarregat d'expulsar l'orina una vegada es contrau. Aquesta capa comprèn 3 capes diferents:
  - Capa superficial: Composta per fibres musculars longitudinals.
  - Capa mitja: Composta per fibres musculars circulars.
  - Capa interna: Composta per fibres musculars longitudinals
- **Capa mucosa:** Localitzada a la part més interna de la paret de la bufeta. Es diferencien 2 capes:
  - Epiteli de transició urinari (uroteli): Es tracta d'un epiteli multiestratificat, de fins a 8 capes connectades a la membrana basal, que té la capacitat de contraure's o expandir-se en funció de si la bufeta rep o expulsa orina mitjançant el procés conegut com a micció.
  - Làmina pròpia: Capa constituïda per teixit conjuntiu.

### 1.1.2 CLASSIFICACIÓ DEL CÀNCER DE BUFETA: ESTADIS I GRAUS.

El sistema de classificació tradicional del càncer de bufeta està principalment basat en criteris patològics. D'aquesta manera, les guies de l'Associació Europea d'Urologia (EAU) diferencien entre el **càncer de bufeta no múscul invasiu (NMIBC)** i el **càncer de bufeta múscul invasiu (MIBC)**. Així mateix, el càncer de bufeta també pot classificar-se segons la tipologia de cèl·lules afectades com a:

- **Carcinoma transicional**, que representa més d'un 90% dels diagnòstics i s'inicia a l'epiteli transicional de la bufeta.
- **Carcinoma escamós o epidermoide**, que representa entre un 3-5% dels casos. En aquest cas, les cèl·lules escamoses s'originen al recobriment de la bufeta en resposta a la irritació i inflamació d'aquesta. Aquest càncer s'associa a determinades infeccions de la bufeta, a l'ús prolongat de catèters intravesicals i a l'exposició a determinats compostos químics com les amines aromàtiques.
- **L'adenocarcinoma** que engloba un 2% del total de casos de càncer bufeta [2][3]

## Introducció

D'altra banda, una vegada s'ha classificat la tipologia de càncer de bufeta cal establir el grau d'infiltració i de disseminació del tumor en qüestió. Per tant, determinar la localització del tumor, observar si aquest presenta invasió i comprovar si hi ha hagut disseminació d'aquest resulta imprescindible per a determinar l'estadi i el grau que presenta el tumor.

Amb aquesta finalitat, la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC) va aprovar un sistema d'estadiatge anomenat sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) per a unificar i simplificar la descripció de diferents tumors, incloent el tumors de bufeta. Aquest sistema té en compte el grau d'infiltració del tumor, la seva presència en ganglis limfàtics regionals i la disseminació d'aquest a altres regions del cos (**Figura 1**). Aquest sistema es va actualitzar al 2017 sense presentar canvis respecte els tumors de bufeta (**Taula 1**) [4].

**Taula 1. Sistema d'estadiatge TNM en càncer de bufeta**

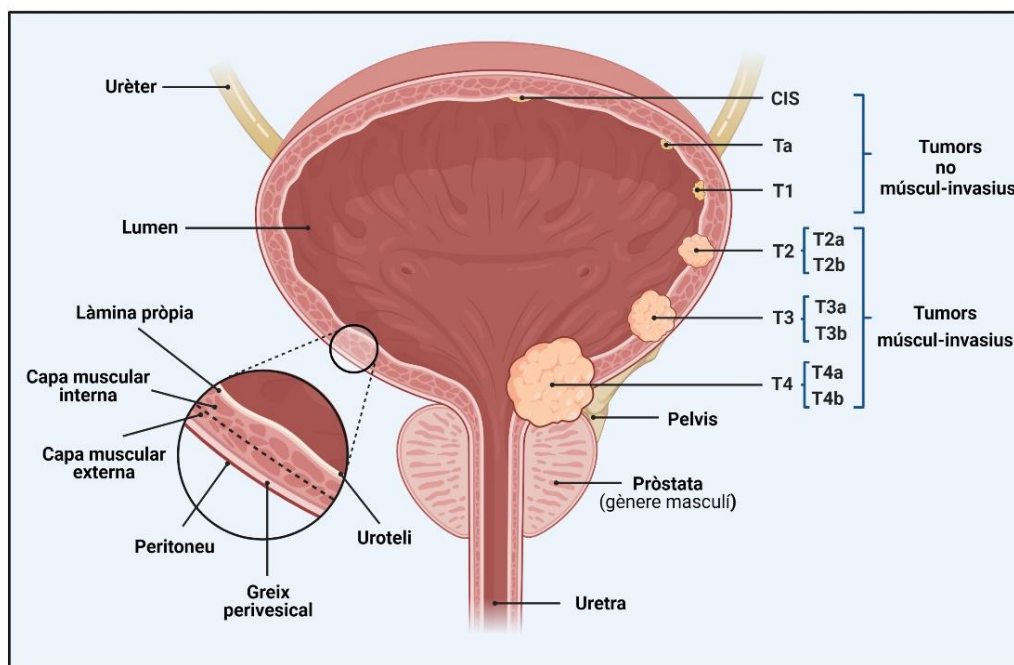
<b>T (tumor primari)</b> – S'utilitza per a descriure la mida i la localització del tumor. Alguns estadis es divideixen en subgrups (a/b) amb la finalitat de classificar el tumor amb més detall.	<b>TX</b>	El tumor primari no pot ser detectat.	
	<b>T0</b>	No hi ha evidència de tumor primari.	
	<b>Ta</b>	Carcinoma papil·lar no invasiu, localitzat a l'uroteli.	
	<b>CIS</b>	Carcinoma <i>in situ</i> (CIS), tumor de morfologia plana localitzat a la superfície de l'uroteli.	
	<b>T1</b>	El tumor envaeix el teixit conjuntiu subepitelial.	
	<b>T2</b>	<b>T2a</b>	– El tumor envaeix la capa muscular interna.
		<b>T2b</b>	– El tumor envaeix la capa muscular externa.
	<b>T3</b>	<b>T3a</b>	– El tumor envaeix microscòpicament el greix perivesical.
<b>T3b</b>		– El tumor envaeix macroscòpicament el greix perivesical.	
<b>T4</b>	<b>T4a</b>	– El tumor envaeix òrgans adjacents com l'úter, la vagina i la pròstata.	
	<b>T4b</b>	– El tumor envaeix la paret pelviana i/o la paret abdominal.	
<b>N (Nodule, Gangli limfàtic)</b> – Determinació de la disseminació del càncer als ganglis limfàtics regionals.	<b>NX</b>	No es detecta afectació als ganglis limfàtics regionals.	
	<b>N0</b>	Sense disseminació als ganglis regionals.	
	<b>N1</b>	El càncer s'ha disseminat a un únic gangli limfàtic regional de la pelvis.	
	<b>N2</b>	El càncer s'ha disseminat a dos o més ganglis limfàtics regionals de la pelvis.	
	<b>N3</b>	El càncer s'ha disseminat als ganglis limfàtics ilíacs comuns, situats darrere les principals artèries de damunt de la bufeta.	
<b>M (Metàstasi)</b> – Descriu la disseminació del càncer des d'una part del cos a una altre.	<b>M0</b>	No s'ha produït metàstasi.	
	<b>M1</b>	<b>M1a</b>	– La malaltia s'ha disseminat únicament als ganglis limfàtics externs a la pelvis.
		<b>M1b</b>	– La malaltia s'ha disseminat a altres parts de l'organisme.

A nivell histopatològic, el 1973 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va establir una classificació que proposava els 3 graus de diferenciació que pot presentar un carcinoma transicional segons el seu grau d'atípia cel·lular, d'activitat mitòtica i d'activitat necròtica, que permeten realitzar una bona predicció de les possibilitats de recurrència i progressió del tumor [5]. Els diferents graus postulats són:

- **Grau 1 (G1):** Es tracta de carcinomes ben diferenciats i que presenten un lleuger grau d'atípia i d'activitat mitòtica.
- **Grau 2 (G2):** Fa referència a carcinomes amb una moderada diferenciació.
- **Grau 3 (G3):** Inclou carcinomes poc diferenciats i que presenten activitat mitòtica, un marcat pleiomorfisme nuclear i una pèrdua de maduració des de la base fins a la superfície.

Tanmateix, l'any 2004 l'OMS i la Societat Internacional de Patologia Urològica va realitzar una actualització, establint una classificació complementària que diferenciava 3 graus segons les característiques morfològiques dels tumors no invasius, així com el seu potencial risc de creixement. D'aquesta manera els tumors es podien classificar en **neoplàsies papil·lars de baix potencial maligne (PUNLMP)**, corresponents a alguns carcinomes G1; en **carcinomes papil·lars urotelials de baix grau (LG)**, que comprenen alguns carcinomes G1 i alguns carcinomes G2 i en **carcinomes papil·lars d'elevat grau (HG)**, que inclouen la majoria de carcinomes G2 i la totalitat de carcinomes G3 [6]. Posteriorment, durant l'any 2016 es va publicar una última actualització sense canvis rellevants [7].

No obstant això, el fet de tractar-se de classificacions histopatològiques pot comportar limitacions en l'estadificació i gradació dels diferents tumors. Aquestes limitacions són causades per la variabilitat inter i intraobservacional inherent en el diagnòstic anatomopatològic, i per tant, poden conduir a errors en el correcte diagnòstic i/o maneig del procés tumoral. És per aquest motiu que les recomanacions actuals de la EAU advoquen a la combinació d'ambdós sistemes de gradació, facilitant així la seva utilització en la pràctica clínica [8].



**Figura 1. Representació gràfica de l'anatomia de la bufeta i els corresponents graus d'estadiatge del càncer de bufeta.**

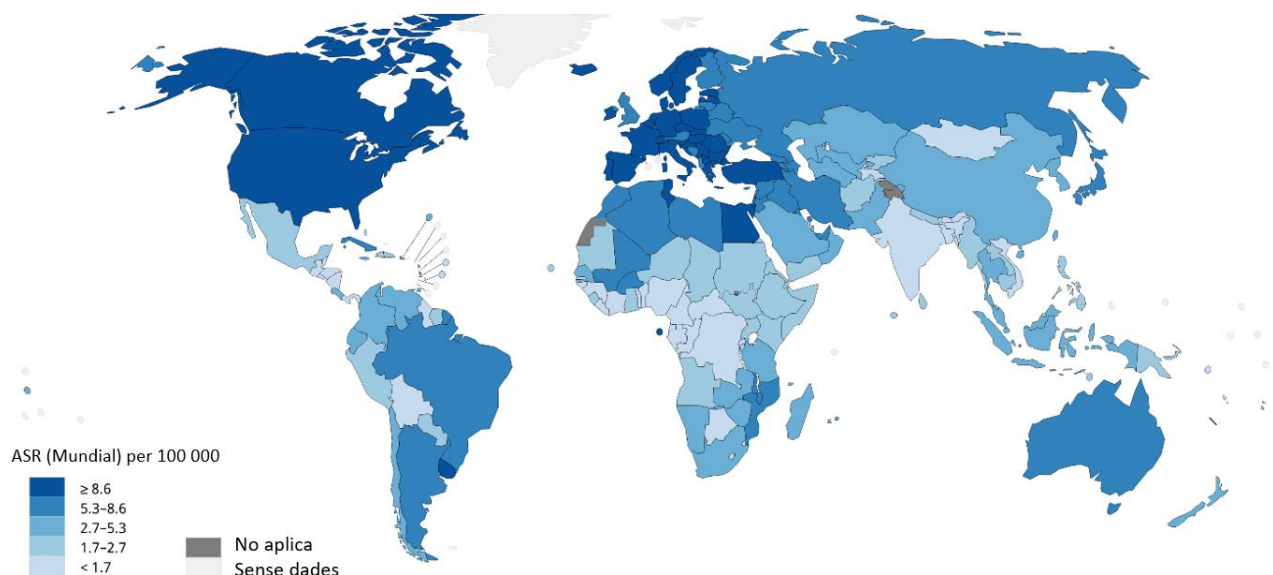
Adaptada de Biorender.

### 1.1.3 EPIDEMIOLOGIA

Segons les últimes dades presentades per l'Observatori Global del Càncer (GLOBOCAN), a l'any 2020, a nivell mundial, es van registrar 573.278 diagnòstics de càncer de bufeta i aproximadament unes 200.000 defuncions. D'aquesta manera, el càncer de bufeta representa el dotzè càncer més freqüent al món. Cal destacar que la incidència, degut a diferents factors comentats en el següent apartat, és fins a 4 vegades superior en homes respecte a la mostrada en les dones [9].

A l'Estat espanyol, segons els registres de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN, <https://redecn.org>) durant l'any 2020 es van registrar un total de 22.350 casos de càncer de bufeta, representant un 11% dels tumors més freqüents en homes i un 4% en dones. Comparant els 27 països de la Unió Europea, Espanya va presentar una major incidència de càncer de bufeta en homes (70.2 vs 58.9) i similar en el cas de les dones (13.5 vs 13.4). La majoria d'individus diagnosticats pertanyien a la cohort de majors de 65 anys i presentaven una taxa supervivència neta als 5 anys d'un 73.8% en homes i un 75.9% en dones (període 2008-2013). A nivell d'incidència global, els països situats al sud d'Europa (Grècia, Espanya i Itàlia), a l'oest d'Europa (Bèlgica i Països Baixos) i a l'Amèrica del nord acumulen les majors taxes d'incidència de càncer de bufeta (**Figura 2**) [10]. Tanmateix, la incidència continua creixent a nivell mundial, especialment en països desenvolupats i altament industrialitzats. De fet, s'ha observat una correlació positiva entre l'índex de desenvolupament humà i el producte interior brut amb un increment de la incidència del càncer de bufeta [11].

A nivell de la pràctica clínica, un 80% dels pacients diagnosticats amb càncer de bufeta el tumor es localitza a les capes més internes de la paret de la bufeta (capa mucosa). La resta, un 20 % aproximadament, presenten invasió del teixit muscular [12].



**Figura 2. Incidència estimada estandaritzada per edat (ASR) (Mundial) de càncer de bufeta al 2020.** Totes les edats i sexes. Adaptada de Sung et al, 2021.



### 1.1.4 FACTORS DE RISC

Els factors de risc atribuïbles al càncer de bufeta es poden diferenciar en 2 grans grups, aquells que venen determinats per una predisposició genètica i aquells que depenen d'exposicions a diferents agents externs, essent aquests últims evitables [13].

D'aquesta manera, els factors de risc que s'han atribuït amb el desenvolupament d'un tumor a la bufeta són el sexe/gènere masculí, una edat avançada, ètnia blanca, l'exposició ocupacional a determinats químics, l'exposició a radiacions a la pelvis, l'ús de fàrmacs com la ciclofosfamida, infeccions/inflamacions cròniques de la bufeta urinària, antecedents personals i/o familiars de càncer de bufeta i el consum de tabac [14]. La diabetis, la obesitat, la infecció pel virus del papil·loma humà i el consum de carn vermella també es podrien considerar possibles factors de risc associats al càncer de bufeta [15]. Tots aquests factors de risc queden resumits en la **Taula 2**. A continuació es descriuen alguns dels factors de risc més rellevants:

Tal com s'ha comentat, el càncer de bufeta és una malaltia que afecta predominantment a persones amb una edat avançada. Normalment, la malaltia afecta individus amb una **edat** compresa entre els 50-70 anys indicant que el curs de la malaltia requereix d'una exposició prolongada a determinats mutàgens que permeti superar el mecanismes supressors de tumors per així produir la carcinogènesi de les cèl·lules en qüestió [11].

Un dels factors que determinen el risc de contraure càncer de bufeta és el **sexe de l'individu**. Així doncs, la incidència i la mortalitat resulta fins a quatre vegades major en homes respecte la observada en dones [9]. Aquest fet pot atribuir-se a un major consum de tabac en el sexe masculí. De fet, en països on el tabaquisme es altament prevalent en el sexe femení, com en el cas del Líban, s'observen altes incidències de càncer de bufeta en aquest grup [16]. Altres factors causals hipotètics que podrien explicar una superior incidència del càncer de bufeta en el sexe masculí inclouen una major exposició a determinats productes químics, el consum d'alcohol i un major consum de carn vermella [17].

El principal factor de risc, de lluny, és el **tabac**. De fet, un 50-65% dels casos de càncer de bufeta estan relacionats amb el seu consum. D'altra banda, el tipus de tabac i el mode de consum n'augmenten i/o en disminueixen el risc. D'aquesta manera, s'ha observat que els fumadors que inhalen el tabac presenten més risc que aquells que no ho fan. Addicionalment, els fumadors de tabac negre presenten un major risc respecte els fumadors de tabac ros, degut a que el tabac negre presenta concentracions més altes d'amines aromàtiques (N-nitrosamina, 2-naftilamina i arilamines) i bifenils [18,19].

Un altre factor de risc evitable és l'**exposició laboral** a carcinògens com les amines aromàtiques, els hidrocarburs aromàtics policíclics i els hidrocarburs clorats. Aquests compostos són comunament utilitzats en la indústria de tints, de pintura, metalls, cautxú i de productes derivats del petroli. Es considera que les exposicions ocupacionals representen el 18% dels cassos de càncer de bufeta [20].

**L'esquistosomosi**, conseqüència de la infecció per *Schistosoma haematobium*, representa un altre factor de risc associat al desenvolupament de càncer de bufeta. De fet, el carcinoma de cèl·lules escamoses de la bufeta és la segona forma de càncer més freqüent a les regions de l'Orient Mitjà i del continent africà on l'esquistosomiasi és endèmica. Aquesta malaltia infecciosa afecta al voltant de 240 milions de persones a tot el món i l'activitat agrícola en representa la principal via de transmissió a través de l'exposició a aigua dolça contaminada [21]. S'ha demostrat que la infecció per *S. haematobium* afavoreix la colonització de determinats bacteris que generen compostos carcinògens com ara els compostos N-nitrosos. A més, la infecció produeix una inflamació que indueix la síntesi endògena de N-nitrosamines i radicals lliures d'oxigen que produeixen dany oxidatiu al ADN de l'hoste. Afortunadament, la infecció per *S. haematobium* es pot prevenir mitjançant l'ús d'un agent antihelmíntic anomenat praziquantel [22].

**Taula 2. Factors de risc atribuïbles i probablement associats al càncer de bufeta.**

<p><b>Comportamentals</b> Consum de tabac. Consum de carn vermella*.</p>
<p><b>Exposicions a químics ambientals</b> Consum d'aigua contaminada amb arsènic.</p>
<p><b>Genètics</b> Historial personal i/o familiar de càncer de bufeta, sobretot en edats primerenques.</p>
<p><b>Marcadors de risc</b></p>
<p><b>Infeccions/inflamacions cròniques</b> Esquistosomosi (<i>Schistosoma haematobium</i>). Càlculs renals i vesicals crònics. Infeccions cròniques del tracte urinari. Catèter vesical permanent.</p>
<p><b>Exposicions ocupacionals</b> Ramaderia (Àfrica i Orient Mitjà, elevat risc d'esquitomatosi). Exposició a amines aromàtiques (2-naftilamina, utilitzada en la producció de colorants químics i en plantes de processament de gas natural). Indústria (cablejat, neumàtics, cautxú, pintura, petroli i tèxtil). Indústries de serveis (perruqueria, pintura i conductors de camions).</p>
<p><b>Condicions mèdiques</b> Diabetis mellitus, infecció virus papil·loma humà, obesitat i receptors de transplantament de ronyó.</p>
<p><b>Iatrogènics</b> Preparacions herbàcies d' <i>Aristolochia</i> spp. Tomografia computeritzada en la infantesa i/o adolescència. Radioteràpia pèlvica. Ciclofosfamida (antineoplàsic-immunosupressor). Fenacetina (analgèsic, no disponible a l'Estat espanyol). Pioglitazona (antidiabètic, ús &gt;1 any)*.</p>
<p>*Probablement associat al càncer de bufeta. Adaptada de DeGeorge <i>et al</i>, 2017.</p>

### 1.1.5 DIAGNÒSTIC DEL CÀNCER DE BUFETA

La simptomatologia de sospita més comuna davant un possible cas càncer de bufeta es produeix a partir de la manifestació d'una hematúria macroscòpica. Tot i així, alguns pacients poden acabar manifestant càncer de bufeta a través d'una hematúria microscòpica ( $\geq 3$  eritròcits/camp, 400X), de presentar simptomatologia irritativa durant la micció o quan en una prova radiològica es detecta, de manera accidental, un tumor a la bufeta. En relació a la hematúria microscòpica, l'Associació Americana d'Urologia (AUA) proposa una classificació d'estratificació del risc de desenvolupar càncer de bufeta en tres grup diferenciats que inclou individus de baix risc, risc intermedi i alt risc basant-se en una sèrie de factors i supòsits detallats a la **Taula 3**. Tot i així, en el supòsit de manifestar una hematúria el risc de que aquesta manifestació clínica estigui associada a un procés tumoral de la bufeta és d'aproximadament un 4%, en el cas de que es tracti d'una hematúria microscòpica, i d'una probabilitat quatre vegades major (16.5%), quan la hematúria manifestada és de caràcter macroscòpic [23].

**Taula 3. Sistema d'estratificació del risc de càncer de bufeta en pacients amb hematúria microscòpica.**

<b>Baix risc</b> (el pacient compleix tots els criteris).	<b>Risc intermedi</b> (el pacient compleix almenys un dels següents criteris)	<b>Alt risc</b> (el pacient compleix almenys un dels següents criteris)
Edat dona (<50 anys); edat homes (<40 anys).	Edat dona (50-59 anys); edat home (40-59 anys).	Dona o home >60 anys.
Mai fumador/a o historial de consum de <10 paquets/any.	Historial de consum de 10-30 paquets any	Historial de consum de >30 paquets/any
3-10 eritròcits/camp en un únic anàlisi d'orina.	11-25 eritròcits/camp en un únic anàlisi d'orina.	>25 eritròcits camp en un únic anàlisi d'orina.
Sense factors de risc (taula xxx).	Factors de risc (taula xxx).	Història clínica d'hematúria macroscòpica.

Adaptada de Lenis *et al*, 2020.

En referència al diagnòstic del càncer de bufeta, la **citologia urinària**, els **ultrasons**, la **tomografia computada (TC)**, la **ressonància magnètica nuclear (RMN)** i l'**endoscòpia de la bufeta (citoscòpia)**, considerada la prova de referència, són les tècniques de diagnòstic més habituals, presentant totes elles una alta precisió en aquells casos de càncer de bufeta amb un estadi més avançat. Tot així algunes d'aquestes tècniques poden presentar limitacions que fan que en l'actualitat s'estudii noves tècniques de diagnòstic com ara biomarcadors específics com l'antigen de càncer de bufeta (BTA) i la proteïna de matriu nuclear 22 (NMP22); altres tècniques d'imatge com la tomografia per emissió de positrons (PET); noves tècniques d'imatge relacionades a la citoscòpia, com la endoscòpia amb fluorescència i el diagnòstic immunològic, a partir de la quantificació de determinades citocines i poblacions cel·lulars [24] [25].

### 1.1.6 TRACTAMENT ACTUAL DEL NMIBC

En primer lloc, tal i com es comenta en l'apartat 1.2 d'aquesta introducció, és necessari esmentar que la diversitat inherent dels tumors de càncer de bufeta no múscul invasiu fa que aquests presentin característiques morfològiques que en determinen el seu risc de progressió. Per aquest motiu, l'estratificació d'aquests tumors resulta molt important per al correcte maneig de la patologia, evitant així, el sobre-tractament [26]. A la **Taula 4** es presenta el sistema d'estratificació de risc en NMIBC, segons les guies de l'EAU, l'AUA i la Societat d'Urologia Oncològica (SUO), que fa referència als diferents estadis, graus i morfologies del tumors de bufeta. D'aquesta manera, els pacients amb NMIBC poden classificar-se en tres grups: els pacients **de risc baix**; els pacients **de risc intermedi** i els pacients **d'alt risc**.

**Taula 4. Estratificació del risc en NMIBC.**

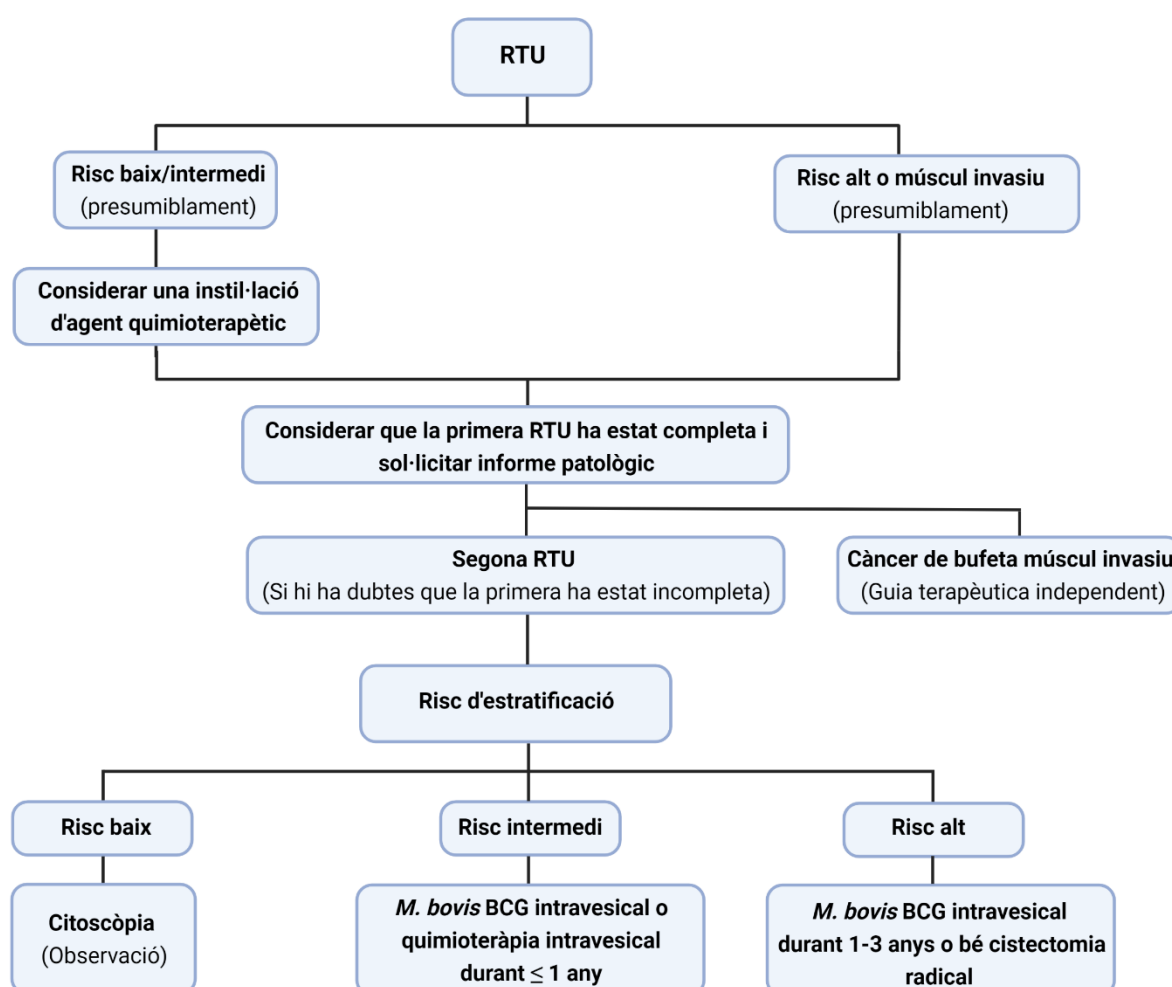
Grup de risc	Guia EUA	Guies AUA/SUO
<b>Baix risc</b>	Primari, solitari, Ta, LG, < 3 cm, no CIS	LG solitari Ta ≤ 3 cm, PUNLMP.
<b>Risc intermedi</b>	Tots els tumors que no queden inclosos en les categories de baix i alt risc.	Recurrència dins el 1r anys en tumors LG Ta LG Ta solitari > 3 cm, LG Ta multifocal, tumor HG Ta ≤ 3 cm, LG T1.
<b>Alt risc</b>	T1, HG, CIS, tumors G1 i G2, Subgrup de tumors d'alt risc: T1G3/HG associat a CIS concurrent, T1G3/HG múltiple o de grans dimensions i/o T1G3/HG recurrent, T1G3 amb CIS al uretra prostàtica, variants histològiques de carcinomes d'uroteli, invasió limfovascular.	HG T1, HG Ta recurrent, HG Ta > 3cm (o multifocal), CIS, fallada de <i>M. bovis</i> BCG en pacients HG, qualsevol variant histopatològica, invasió limfovascular, qualsevol pacient amb afectació prostàtica uretral.

Adaptada de Kamat *et al*, 2018.

Respecte al tractament, tal i com queda detallat en la **Figura 3**, aquest s'inicia amb la realització d'una resecció transuretral (RTU) del tumor. Aquesta intervenció consisteix en remoure el tumor i el seu posterior estudi citològic, seguida d'una única instil·lació intravesical d'un agent quimioterapèutic, normalment mitomicina C i gemcitabina A, o bé del *M. bovis* BCG en dependència al grup de risc al que pertanyi el pacient. Així, la instil·lació de l'agent quimioterapèutic es recomana, generalment, en pacients amb un risc baix-intermedi quedant reservat l'ús del *M. bovis* BCG per a pacients amb consideració d'alt risc, tot i que també pot ésser utilitzada com a alternativa en alguns pacients que presentin tumors amb un risc intermedi-alt. Aquest tractament consisteix en una instil·lació setmanal del *M. bovis* BCG durant 6 setmanes. En alguns pacients de risc intermedi-alt, les instil·lacions intravesicals del *M. bovis* BCG poden prolongar-se en el temps tot i que no existeix un consens, entre les diferents societats i associacions d'urologia, en la duració d'aquesta teràpia de manteniment [27,28]. Aquest manteniment es pot allargar entre 1 i 3 anys. Tot i així, no han quedat clars els beneficis que pot aportar una teràpia de manteniment de 3 anys respecte els que pot aportar el manteniment d'1 any [29].

En el cas d'una no tolerància o no resposta al tractament mitjançant el *M. bovis* BCG es pot plantejar la realització d'una cistectomia radical, consistent en una resecció completa de la bufeta urinària [30].

En l'actualitat existeixen estudis preclínic i diferents estudis en fase clínica sobre el tractament del NMIBC, com a alternativa en el suposat cas que la primera línia de tractament hagi fracassat, p.ex fracàs del tractament intravesical (*M. bovis* BCG i quimioterapèutics), toxicitat al *M. bovis* BCG, etc. i en l'escenari en que la cistectomia radical no es consideri una opció. Alguns d'aquests serien: L'ús d'inhibidors de punts de control del sistema de control immunitari (ICIs) com pembrolizumab i atezolizumab, ambdós inhibidors del lligand 1 de mort programada (PD-L1); la utilització de teràpies dirigides, com ara l'ús d'inhibidors de la diana de la rapamicina en cèl·lules de mamífer (mTOR); i en l'administració intravesical de determinats micobacteris no patogènics capaços de generar una resposta immunomoduladora i antitumoral similar al *M. bovis* BCG [28,31].



**Figura 3.** Visió general de les orientacions de l'EUA respecte del tractament del NMIBC.  
Adaptada de Shore *et al*, 2021.

## 1.2 *M. bovis* BCG i EL NMIBC

### 1.2.1 ANTECEDENTS

El *M. bovis* BCG va ser desenvolupat, en els seus inicis, com a una vacuna davant la tuberculosi causada pel *Mycobacterium tuberculosis*. L'any 1921, després de tretze anys d'estudi, el microbiòleg León Charles Albert Calmette i el veterinari Jean Marie-Camille Guérin, ambdós investigadors de l'Institut Pasteur de Lille, van aconseguir desenvolupar una vacuna viva atenuada, de posologia oral, a partir del mateix micobacteri que actuava com a agent etiològic de la tuberculosi bovina, concretament el *Mycobacterium bovis*. Aquesta atenuació es va aconseguir a partir de successius cultius, facilitant així la pèrdua gradual de la seva virulència original [32]. Més endavant, l'any 1929 es va observar, mitjançant autòpsies, que els pacients morts per tuberculosi mostraven baixos índexs de càncer [33]. Aquest fet va marcar l'inici de diverses investigacions en diferents models animals que confirmaren els efectes positius de la utilització del *M. bovis* BCG en diferents processos neoplàsics. L'any 1976, A. Morales i els seus col·laboradors van publicar una investigació on es confirmà l'eficàcia del *M. bovis* BCG en el tractament del NMIBC, mitjançant instil·lacions intravesicals d'aquest micobacteri. Així doncs, l'any 1990 l'Administració d'Aliments i Fàrmacs (FDA) va aprovar l'ús del *M. bovis* BCG per al tractament del NMIBC en humans. En l'actualitat, la teràpia intravesical mitjançant el *M. bovis* BCG representa el tractament estàndard en el maneig de pacients amb NMIBC d'alt risc [34,35].

### 1.2.2 MECANISME D'ACCIÓ DEL *M. bovis* BCG

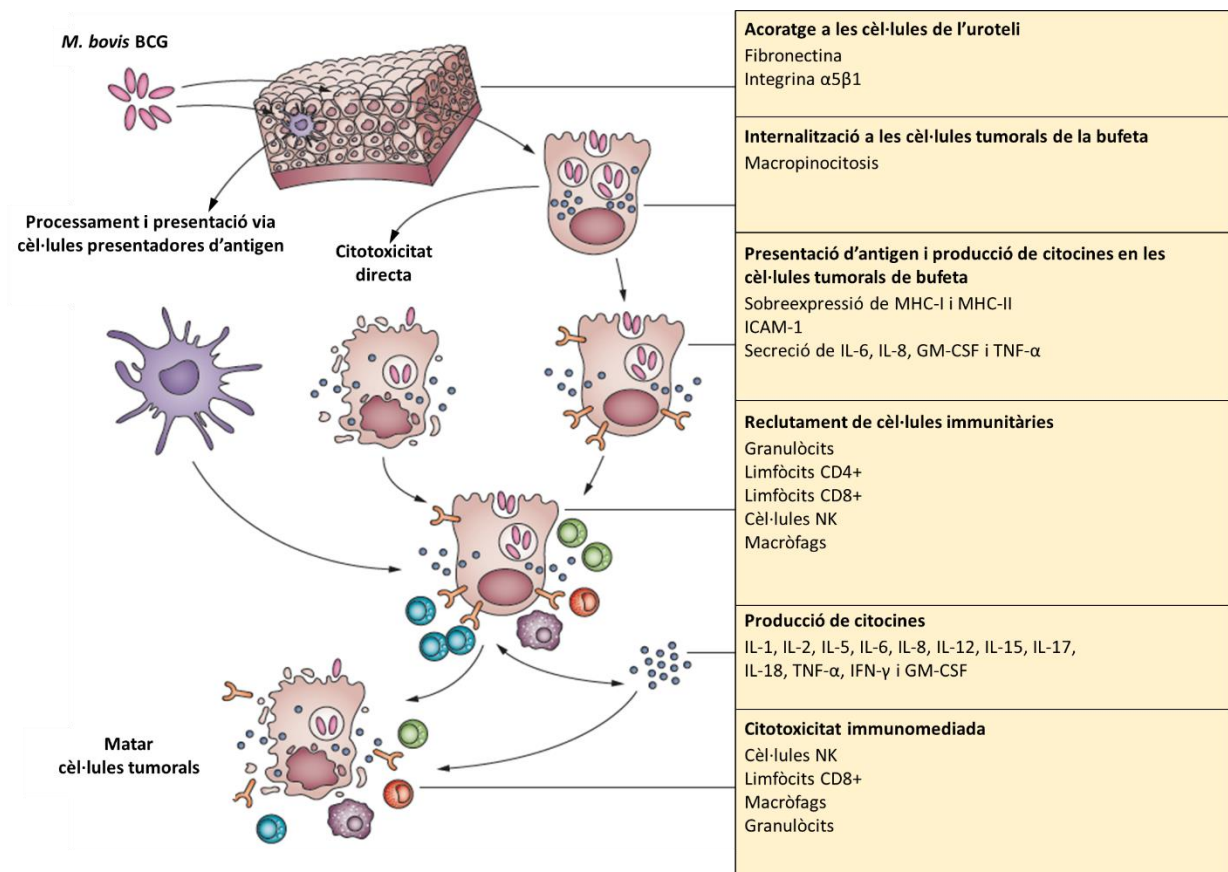
Tot i que en l'actualitat el mecanisme d'acció del *M. bovis* BCG continua essent objecte d'estudi, existeixen suficients evidències que permeten considerar que el *M. bovis* BCG és el responsable de desencadenar l'activació d'una resposta immunitària local i sistèmica del tipus inflamatòria, per part de l'hoste, que alhora presenta conseqüències directes en la viabilitat de les cèl·lules tumorals, és a dir citotoxicitat. Concretament, en la revisió bibliogràfica presentada per Redelman-Sidi *et al* [36] i en la publicada més recentment per Pettenati *et al* [37] queden descrits els diferents mecanismes d'acció que caracteritzen la immunoteràpia del *M. bovis* BCG (**Figura 4**).

#### 1.2.2.1 Efecte directe del tractament del *M. bovis* BCG

Els estudis d'aquest mecanisme suggereixen que la inducció de la resposta immunitària directe es produeix una vegada el *M. bovis* BCG és introduït a la bufeta urinària del pacient produint-se aleshores una interacció entre aquest micobacteri i les cèl·lules de l'epiteli urotelial o uroteli. Aquesta interacció es produeix a partir d'una glicoproteïna de membrana anomenada fibronectina (FAP), concretament la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que actua com a receptor de membrana de les cèl·lules epitelials de l'uroteli [38,39]. Aleshores, el *M. bovis* BCG resulta internalitzat a l'interior de les cèl·lules urotelials mitjançant un procés de macropinocitosis [40]. Experiments *in vitro* han mostrat que una vegada les cèl·lules tumorals de l'uroteli han interioritzat el *M. bovis* BCG s'indueix la producció de citocines com la IL-6, IL-8 i el factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) que participen en el reclutament de cèl·lules immunitàries, incloent cèl·lules T citotòxiques [41].

**1.2.2.2 Efecte indirecte del tractament del *M. bovis* BCG**

Així mateix, la resposta adaptativa es produeix quan els antígens del *M. bovis* BCG són processats i presentats a la superfície cel·lular de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) i les cèl·lules epitelials de l'uroteli. Aquesta presentació es produeix a partir del complex d'histocompatibilitat II (MHC-II) i la proteïna ICAM-1 expressats en la superfície de les cèl·lules epitelials de l'uroteli. En primer lloc, el MHC-II és reconegut per les cèl·lules T CD4+, activant-ne així la seva diferenciació. A més, la majoria de cèl·lules expressen el complex d'histocompatibilitat MHC-I (MHC-I), responsable de la infiltració de cèl·lules T CD8+ amb un marcat caràcter citotòxic i amb un paper central en la resposta immune adaptativa produïda pel *M. bovis* BCG [42,43]. Per tant, l'activació de les APC, principalment les cèl·lules dendrítiques i els macròfags, i la producció de determinades citocines i quimiocines, es tradueix amb el reclutament de granulòcits, cèl·lules T CD4+ i CD8+, de cèl·lules NK i de macròfags responsables d'activar una resposta del tipus T<sub>H1</sub> i T<sub>H2</sub> caracteritzada per la producció d'altres citocines com les interleucines (IL) IL-1β; la IL-2; la IL-5; la IL-6; la IL-8; la IL-12; la IL-15; la IL-17 i la IL-18, així com el factor de necrosi tumoral (TNF-α); el factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) i l'interferó gamma (IFN-γ), responsable d'activar els macròfags; els granulòcits; les cèl·lules NK; els neutròfils i les cèl·lules T CD8+ que, conjuntament, determinaran la resposta immunitària adaptativa enfront de les cèl·lules tumorals de la bufeta [41,44].

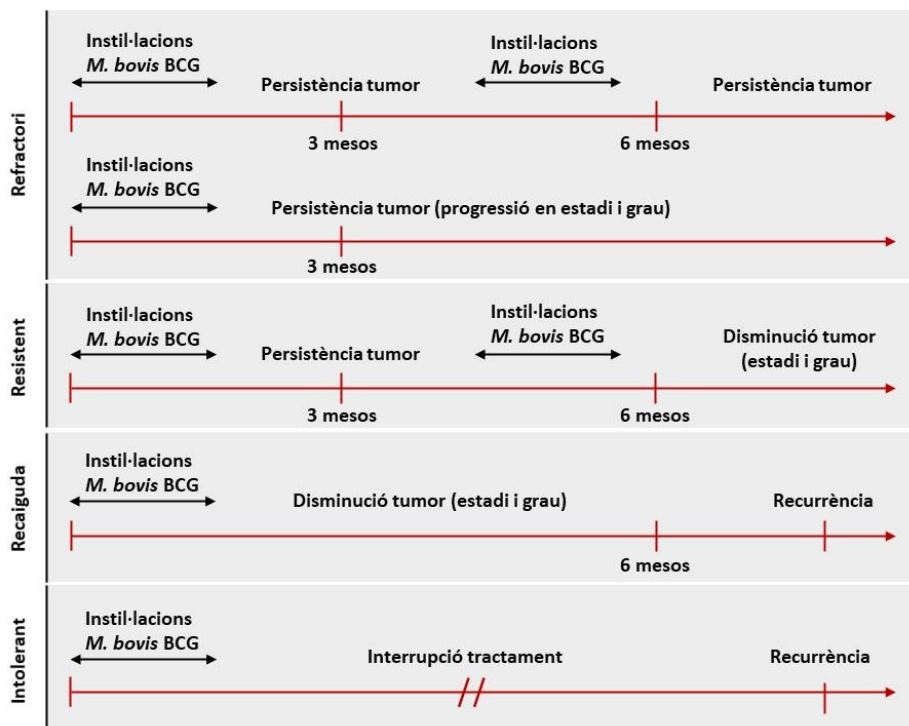


**Figura 4. Mecanisme d'acció del *M. bovis* BCG en el tractament del càncer de bufeta no múscul invasiu.**  
Adaptada de Redelman-Sidi *et al*, 2014.

### 1.2.3 FRACÀS DEL TRACTAMENT AMB EL *M. bovis* BCG: RECURRÈNCIA I PROGRESSIÓ A MIBC

Tal com es comenta a l'**apartat 1.6** d'aquesta introducció, la immunoteràpia a través d'instil·lacions intravesicals del *M. bovis* BCG representa el tractament d'elecció estàndard en pacients diagnosticats amb NMIBC, en concret aquells que presenten tumors de risc intermedi i de risc elevat. No obstant això, un nombre considerable de pacients tractats amb el *M. bovis* BCG pot experimentar recurrència i progressió del tumor. Concretament, en el grup de pacients amb tumors d'elevat risc, el risc de recurrència se situa a prop del 50%. D'altra banda, en referència a la progressió del tumor, aquest pot progressar a estadis múscul invasius i/o metastàtics en un 10-20% dels casos d'individus amb un diagnòstic inicial de NMIBC, empitjorant així el pronòstic del pacient [45,46].

D'aquesta manera, la EUA ha definit diverses categories que engloben els diferents escenaris respecte la fallada del tractament. Aquesta fallada, es defineix com a qualsevol aparició de la malaltia després d'una teràpia adequada, és a dir, d'almenys cinc instil·lacions en la el tractament inicial d'inducció i d'almenys dues per a cada cicle de manteniment, a excepció que es presenti una intolerància i/o toxicitat al *M. bovis* BCG, explicada en profunditat en l'**apartat 1.9** [46]. Aquestes categories van en sintonia a la classificació presentada per Nieder *et al* on es va proposar una subclassificació que categoritzava el fracàs de la teràpia en quatre escenaris diferents (**Figura 5**). D'aquesta manera ens referirem a un ***M. bovis* BCG refractori**, quan la malaltia persisteix o progressa dins els primers sis mesos de tractament; a un ***M. bovis* BCG resistent**, quan es produeix una recurrència tot i que l'estadi i el grau del tumor hagi disminuït respecte a l'inici del tractament; a un ***M. bovis* BCG de recaiguda**, quan hi ha una recurrència després de 6 mesos lliures de malaltia i al fracàs ***M. bovis* BCG intolerant**, quan es produeixen efectes secundaris greus que impedeixen seguir el tractament [47].



**Figura 5.** Subclassificació de Nieder *et al* dels diferents tipus fracàs del *M. bovis* BCG en el tractament del NMIBC. Adaptada de Kikuchi *et al*, 2021.



Davant de qualsevol d'aquests escenaris esmentats, tal com s'ha comentat en l'**apartat 1.6** d'aquesta introducció, el tractament curatiu més recomanat és la cistectomia radical malgrat comporti un empitjorament considerable en la qualitat de vida del pacient. D'altra banda, les alternatives conservatives, davant el fracàs del tractament estàndard, es limiten a una repetició del tractament amb el *M. bovis* BCG, a l'administració intravesical de quimioteràpics com la mitomicina C i/o gemcitabina A, en combinació o no amb instil·lacions del *M. bovis* BCG, i a l'ús de teràpies alternatives com la hipèrtermia induïda per radiofreqüència, la quimioteràpia conduïda per hipèrtermia o quimiohipèrtermia i l'administració electromotriu de quimioterapèutics [48].

#### 1.2.4 SEGURETAT I TOXICITAT DEL *M. bovis* BCG

Tot i l'eficàcia demostrada del *M. bovis* BCG en el tractament del NMIBC, resulta freqüent que l'administració intravesical vagi acompanyada de complicacions o efectes adversos. Concretament, en més del 50% de pacients es poden observar complicacions de caràcter local, i de fins al 30% quan es tracta de complicacions sistèmiques. A més, entre un 1-5% dels pacients pot desenvolupar complicacions severes com ara infeccions pulmonars o fins i tot sèpsia [49].

De fet, una vegada es realitza la RTU es considera prudent esperar unes dues setmanes abans realitzar la primera instil·lació intravesical del *M. bovis* BCG per tal d'evitar una disseminació sistèmica dels bacils a través de ferida resultant del procediment d'extracció del tumor [50]. No obstant això, l'elevat nombre d'instil·lacions durant el tractament d'inducció i de manteniment, que es pot allargar fins a 3 anys, comporta un risc d'infecció ja que, lògicament, s'incrementa la possibilitat de que es produeixi algun traumatisme durant l'administració del tractament. En relació a la seguretat i la toxicitat del *M. bovis* BCG, Van der Meijen *et al* van analitzar els efectes adversos locals i sistèmics de les instil·lacions del *M. bovis* BCG en 487 pacients mitjançant un assaig clínic multicèntric realitzat al 2003. En aquest assaig, es van avaluar les instil·lacions durant un curs d'inducció de 6 setmanes seguit de 3 instil·lacions de manteniment setmanals als 3, 6, 12, 18, 24, 30 i 36 mesos per determinar si la toxicitat del *M. bovis* BCG s'incrementava amb el temps. Al finalitzar l'estudi, un 15% dels pacients havien hagut d'aturar el tractament degut a la toxicitat provocada pel *M. bovis* BCG [51]. Per contra, en un assaig clínic multicèntric realitzat per Brausi *et al* publicat al 2014, amb la participació de 1316 pacients, el percentatge de pacients que van haver d'abandonar el tractament va disminuir fins al 8% [52].

Tal i com s'ha comentat, les **complicacions** que pot comportar l'administració intravesical del *M. bovis* BCG es poden classificar com a **locals** o **sistèmiques** i poden resultar lleus o fins i tot greus (**Taula 5**).

Per una banda, les complicacions locals poden ser resultat de la contaminació de l'orina, provocada per la proliferació del propi micobacteri, i poden ocórrer a qualsevol part del tracte genitourinari. En canvi, les complicacions sistèmiques es manifesten quan el *M. bovis* BCG és disseminat a d'altres parts de l'organisme a través del torrent sanguini, és a dir, per la via hematògena. Tot i així, la simptomatologia associada a la instil·lació del *M. bovis* BCG és majoritàriament de caràcter lleu, i per tant fàcilment manejable, ja aquesta es manifesta com a conseqüència de l'estimulació desitjada del propi sistema immunitari. Generalment, les complicacions lleus inclouen la febre, el malestar general i la irritació de la pròpia bufeta urinària. En referència a l'aparició de febre, s'ha observat correlació entre l'aparició de febre i una resposta antitumoral més favorable [53].

Respecte les complicacions sistèmiques, tot i ser relativament poc freqüents acostumen a presentar una major severitat. A més, poden ocórrer durant el tractament o fins i tot anys després d'haver-lo finalitzat [54]. En l'actualitat, el mecanisme mitjançant el qual es produeixen les complicacions sistèmiques, relatives a la teràpia del *M. bovis* BCG, encara està en investigació. Tot i així, la presència de bacils viables als teixits recolza la teoria de la propagació i disseminació sistèmica del micobacteri. També s'ha suggerit

que la resposta sistèmica pot ser conseqüència d'una reacció sistèmica d'hipersensibilitat de tipus IV al *M. bovis* BCG [55].

A nivell general, aquestes complicacions inclouen des d'una infecció disseminada del *M. bovis* BCG, febre persistent o fins i tot qualsevol afectació d'òrgans més enllà dels propis que conformen el sistema genitourinari. Algunes d'aquestes complicacions inclouen: els aneurismes micòtics, que poden desenvolupar-se entre els 7 i 77 mesos posteriors a la instil·lació inicial; les complicacions pulmonars, en forma de pneumonitis intersticial o tuberculosi miliar; la hepatitis granulomatosa; l'artritis reactiva d'aparició relativament primerenca; l'espondilitis tuberculosa; la sèpsia caracteritzada per manifestar-se en forma de calfreds, febre i també hipotensió [56]. El tuberculoma cerebral, la meningitis, determinades infeccions oculars i el síndrome de Guillain Barré representen altres conseqüències poc corrents atribuïbles a la teràpia intravesical pel *M. bovis* BCG [57].

A propòsit d'això, els factors de risc predisponents a desenvolupar una infecció sistèmica relacionada amb l'administració intravesical del *M. bovis* BCG no estan del tot establerts. S'ha suggerit que la ruptura de la barrera de l'uroteli, a causa d'un cateterisme urinari traumàtic; una instil·lació precoç una vegada realitzada la RTU; una infecció concurrent del tracte urinari; el tabaquisme; la presència de malalties concomitants, com ara la diabetis; així com la presència d'una immunosupressió subjacent i la vellesa del pacient poden augmentar el risc d'una infecció hematògena [58].

**Taula 5. Incidència de les complicacions induïdes pel *M. bovis* BCG en la teràpia intravesical pel tractament del NMIBC en humans.**

Complicacions genitourinàries	Òrgan o sistema d'òrgans	Incidència (%)	Complicacions sistèmiques	Òrgan o sistema d'òrgans	Incidència (%)
Cistitis		27-95	Febre (>38°C)	Sistèmic	2.9
Contractura vesical	Bufeta urinària	<1	Aneurismes micòtics	Vascular	0.7-4.6
Ulceració de la bufeta		1.5	Tuberculosis miliar	Pulmons	0.4
Lesions del penis <sup>1</sup>	Penis	5.9	Artritis reactiva		0.5-5.7
Epididimo-orquitis tuberculosa	Escrot	0.4	Espondilitis tuberculosa	Muscul-esquelètic	3.5
Prostatitis granulomatosa simptomàtica	Pròstata	10	Hepatitis granulomatosa	Fetge	0.7-5.7
Obstrucció uretral	Vies urinàries altes	0.3	Sepsis	Sistèmic	0.4
Pielonefritis, abscess renal o granuloma renal.	Ronyons	0.3-3.5			

<sup>1</sup>Les lesions del penis consisteixen en la formació de nòduls, pàpules, plaques o úlceres amb augment, o no, dels ganglis limfàtics inguinals. Adaptada de Green *et al*, 2018 i Liu *et al*, 2019.

## 1.2.5 ALTERNATIVES AL *M. bovis* BCG EN EL TRACTAMENT DEL NMIBC

### 1.2.5.1 Antecedents

A més dels problemes relacionats amb el fracàs del *M. bovis* BCG tractats a l'apartat 1.2.3 d'aquesta introducció, existeix una altra problemàtica associada al tractament del NMIBC. Aquesta manté relació amb els successius problemes de subministrament a nivell mundial associats a la producció industrial, com la contaminació de determinats lots, i al successiu increment de la incidència de la malaltia. De fet, al tractar-se d'un micobacteri de creixement lent la producció d'aquest resulta llarga i per tant, poc eficient. Segons els proveïdors, la producció d'un sol lot pot trigar fins a 3 o 4 mesos [59,60]. Així, l'escassetat internacional ha obligat a un racionament del *M. bovis* BCG que ha implicat un efecte pejoratiu en el tractament primari del NMIBC. En un intent de millorar els efectes de l'escassetat del *M. bovis* BCG, la comunitat científica internacional ha creat directrius per proporcionar un marc de racionament del *M. bovis* BCG segons criteris d'estratificació del risc, amb la designació dels estadis Tc1s i la malaltia difusa o multifocal d'alt grau Ta/T1 com a màxima prioritat. Per a aquells països amb un subministrament limitat del *M. bovis* BCG, s'han recomanat alternatives, com ara la reducció de les dosis terapèutiques a la meitat o a un terç dels vials, l'ús de quimioterapèutics intravesicals citotòxics o la cistectomia radical. Malauradament, les reduccions de dosi i l'ús de quimioterapèutics intravesicals resulten ser menys efectives que la dosi completa del *M. bovis* BCG. Tanmateix, els costos dels tractaments citotòxics com la mitomicina C superen en escreix els costos de la teràpia del *M. bovis* BCG [61].

### 1.2.5.2 Utilització d'altres micobacteris per al tractament del NMIBC

A causa de tota la problemàtica esmentada, l'ús d'altres bacteris, així com components d'aquests, ha estat i està essent investigada amb l'objectiu futur de substituir o complementar al *M. bovis* BCG en el tractament del càncer de bufeta. Concretament, la paret cel·lular dels micobacteris és rica en una varietat de lípids, glicolípid, lipoproteïnes, glicans i proteïnes exclusius que són reconeguts per diferents receptors del sistema immunitari [62]. Molècules com el lipoarabinomannan (LAM), els manòsids de fosfatidilinositol o les proteïnes de xoc tèrmic (HSP) són reconegudes pels receptors Toll-like (TLR) 2 i 4. En canvi, antígens com el mono i el dimicolat de trehalosa actuen com agonistes dels receptors de lectina del tipus C. Després de ser processats a l'interior de les cèl·lules, alguns antígens del micobacteri com ara els àcids micòlics o els micolats de trehalosa i glucosa són presentats a les cèl·lules T mitjançant receptors CD1. La senyalització, a través d'aquests receptors, pot induir a la producció de citocines i quimiocines afavorint així una resposta de perfil proinflamatori, i per tant antitumoral [31]. Tot i així, no totes les espècies de micobacteris comparteixen els antígens esmentats, i fins i tot l'estructura de cadascun d'aquests pot variar entre les diferents espècies. Encara que algunes d'aquestes molècules com el LAM, el dimicolat de trehalosa (TDM) o els àcids micòlics estan presents en tots els micobacteris, l'estructura d'aquests en determina la interacció amb el receptor immune corresponent i, en conseqüència l'envergadura de la resposta immunitària. Així, l'activitat antitumoral en el context de la immunoteràpia del càncer, en aquest cas del càncer de bufeta; s'ha estudiat i es segueix estudiant en

diferents espècies del gènere *Mycobacterium*. Algunes d'aquestes espècies queden descrites a continuació.

- *Mycobacterium smegmatis*: Estudis passats van demostrar l'efecte immunoterapèutic d'extractes de la paret cel·lular del *M. smegmatis* en diferents models de tumor [63]. En referència al càncer de bufeta, es van realitzar estudis sobre l'ús del *M. smegmatis*, mort per calor (*heat killed*), com a alternativa al *M. bovis* BCG en el tractament del NMIBC [64]. Més endavant, es va desenvolupar un *M. smegmatis* recombinant que expressava TNF- $\alpha$  humà [65]. En l'actualitat no es coneixen més estudis.
- *Mycobacterium kansasii*: Existeix un únic estudi on s'avalua la capacitat del *M. kansasii* de reduït tumors de càncer de bufeta [66]. En aquest cas, mitjançant l'ús de ratolins portadors de tumors ortotòpics de bufeta, es va observar una reducció dels tumors respecte els resultats obtinguts en diferents soques del *M. bovis* BCG. Tot i així, resulta molt freqüent l'aïllament del *M. kansasii* en infeccions pulmonars causades per aquest micobacteri no tuberculós [67]. Aquesta fet, impossibilita la seva utilització com a agent immunoterapèutic segur.
- *Mycobacterium indicus pranii*: Abans conegut amb el nom de *Mycobacterium w. HK*(heat-killed)MIP ha mostrat tenir un efecte citotòxic i proapoptòtic en diferents línies tumorals, entre elles la línia RT-112 i la EJ-28, ambdues de càncer de bufeta [68].
- *M. tuberculosis*: L'ús d'una soca genèticament atenuada de *M. tuberculosis* anomenada MTBVAC, candidata a vacuna contra la tuberculosi, va mostrar eficàcia terapèutica en un model murí de càncer de bufeta [69].
- *Mycobacterium phlei*: Una suspensió formada per paret cel·lular i àcids nucleics del *M. phlei*, anomenada MCNA, va mostrar efectivitat i seguretat en un assaig clínic de fase III en pacients on prèviament havia fracassat el *M. bovis* BCG [70,71].

### 1.2.5.3 *Mycobacterium brumae*

*M. brumae* és un micobacteri ambiental de creixement ràpid aïllat en mostres de sòl i aigües del riu Llobregat, descrit per primera vegada l'any 1993. A nivell estructural, la paret cel·lular del *M. brumae* es caracteritza per contenir, únicament,  $\alpha$ -àcids micòlics [72]. A dia d'avui no s'ha reportat cap cas d'infecció atribuïble al *M. brumae*.

El seu potencial antitumoral va ser descobert per primera vegada en l'estudi publicat per Noguera-Ortega *et al* [73]. En aquest estudi es van utilitzar diferents espècies de micobacteris i es va comparar el seu potencial antitumoral en set línies diferents de càncer de bufeta. Sorprenentment, *M. brumae* va resultar ser l'únic micobacteri capaç de presentar una inhibició del creixement de cèl·lules tumorals d'alt grau similar a la presentada pel *M. bovis* BCG. A més, en el cas de la línies cel·lulars T24 i J82 infectades amb el *M. brumae* es van observar nivells de producció d'IL-6 i IL-8 similars al produïts per la infecció del *M. bovis* BCG [73]. De la mateixa manera, utilitzant un model animal murí ortotòpic de càncer de bufeta, es va observar que els ratolins tractats amb el *M. brumae* presentaven una major supervivència que aquells que havien estat tractats amb el *M. bovis* BCG. L'anàlisi posterior de les bufetes va mostrar que les instil·lacions del *M. brumae* havien estimulat la infiltració de cèl·lules T i cèl·lules NK i NKT [74]. Per tant, el *M. brumae* pot representar una alternativa potencial al reemplaçament del *M. bovis* BCG

com a tractament estàndard davant el NMIBC ja sigui en el context del fracàs del *M. bovis* BCG en determinats pacients amb NMIBC o bé de manera genèrica donat el seu creixement ràpid, la seva seguretat i la seva capacitat immunomoduladora i antitumoral.

### 1.3 IMPLICACIÓ DELS MICOBACTERIS EN EL CONTROL DE MECANISMES RELACIONATS AMB LA CARCINOGENÈSI I EN LA MODULACIÓ DEL MICROAMBIENT TUMORAL

A nivell cel·lular, el desenvolupament del càncer resulta d'un procés complex que implica la mutació i selecció natural de cèl·lules que han adquirit capacitats de proliferació, de supervivència i d'invasivitat, entre d'altres, que resulten regulades per complexos mecanismes en les cèl·lules normals [75]. En concret, les característiques o capacitats que diferencien una cèl·lula normal d'una cèl·lula tumoral són en essència:

- La capacitat adquirida de **cronificar la senyalització proliferativa**, mitjançant la producció i alliberament de senyals que promouen el creixement;
- L'**evasió dels supressors del creixement cel·lular**, encarregats de regular la proliferació cel·lular;
- **La resistència a la mort cel·lular** o apoptosi, mitjançant l'increment de determinats oncogens;
- **La immortalitat replicativa**, atribuïda a l'habilitat d'allargar la longitud telomèrica de l'ADN;
- **La inducció de la vascularització** del tumor, amb l'objectiu de captar nutrients i oxigen per així garantir la viabilitat del tumor i alhora evacuar residus metabòlics com el diòxid de carboni;
- **L'activació dels processos d'invasivitat i metastasi**, a través de canvis a nivell cel·lular que permeten l'intravasió de les cèl·lules tumorals al torrent **sanguini**;
- **La reprogramació del metabolisme cel·lular**, incrementant l'expressió de transportadors de membrana implicats en el transport de la glucosa al citoplasma de la cèl·lula tumoral;
- **L'evasió del sistema immunitari**, mitjançant l'expressió de determinades proteïnes que inhibeixen les funcions de les cèl·lules efectores implicades en la resposta antitumoral [76].

En la biologia del càncer, els mecanismes d'invasivitat i metastasi de les cèl·lules tumorals inclouen la separació de les cèl·lules tumorals de l'epiteli, la degradació de la matriu extracel·lular circumdant, la migració i invasió d'aquestes a través de la membrana basal, la intravasació i supervivència a la circulació, la extravasació en un lloc secundari, la supervivència en forma de micrometastasi i, finalment, el creixement en metastasis obertes [77]. En realitat, els processos d'invasivitat i progressió dels tumor de bufeta són induïts per canvis en el microambient tumoral, comentat a l'**apartat 1.3.2**, que comporten un increment de l'expressió de la N-cadherina, acompanyada d'una disminució de l'expressió de la E-cadherina; una sobreexpressió de les metal·loproteïnases 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9), responsables de la degradació de la matriu extracel·lular; d'un increment de la expressió de factors angiogènics; i d'un augment de la síntesi de determinades prostaglandines [78]. De fet, diversos estudis han correlacionat les concentracions de MMP-2 i 9 en diferents mostres de plasma i sèrum amb el grau d'invasivitat que pot presentar el tumor de la bufeta [79,80]. Dit això, ambdós mecanismes, juntament a d'altres fenòmens biològics com la transició epiteli mesènquima, mantenen un lligam estret amb la recurrència del tumor i progressió del càncer de bufeta a estadis múscul invasius i, per tant relacionats amb un mal pronòstic de la malaltia [81,82].

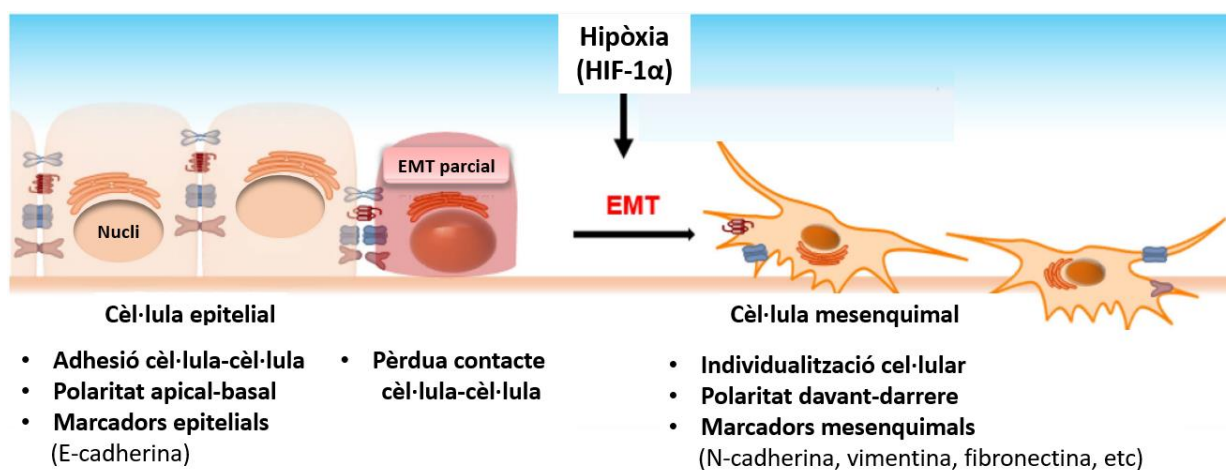
### 1.3.1 TRANSICIÓ EPITELI MESÈNQUIMA (EMT) I PROGRESSIÓ TUMORAL

La transició epitelial mesènquima (EMT) és un procés cel·lular, reversible, en el qual les cèl·lules epitelials perden les seves característiques morfològiques i fenotípiques a través de complexos canvis moleculars, transcriptòmics i epigenètics que fan que aquestes cèl·lules adquireixin un fenotip mesenquimal [83]. En altres paraules, la EMT és un procés fisiològic en el qual les cèl·lules epitelials adquireixen les característiques de motilitat i invasivitat característiques de les cèl·lules mesenquimals [84].

Tanmateix, la EMT resulta ésser un procés essencial per al correcte desenvolupament embrionari i està estretament relacionada amb el tancament de ferides, la regeneració tissular i en patologies com la fibrosi i, tal i com s'ha comentat, el càncer [85].

Cadascun dels fenotips mencionats es diferencia segons característiques morfològiques associades a determinades propietats específiques que determinen la funcionalitat de cadascun d'aquests. Les cèl·lules epitelials no presenten motilitat, resten unides entre elles i permeten la integritat dels teixits, essencial per al manteniment de la integritat corporal a través del seu contacte amb la matriu extracel·lular (ECM). D'altra banda, les cèl·lules mesenquimals presenten motilitat i mantenen una estreta associació amb els processos de migració i invasivitat cel·lular; en la resistència a la apoptosi, inhibint la via anoikis; i en la producció de components responsables de la degradació de la ECM [86,87].

D'aquesta manera, el procés de EMT s'inicia amb la de contacte entre cèl·lules (cèl·lula-cèl·lula), de la polaritat apical-basal i de l'expressió de determinades molècules d'adhesió com la E-cadherina. Aleshores, les cèl·lules epitelials transformades guanyen polaritat davant-darrera i es dissocien de les cèl·lules veïnes mitjançant l'expressió de marcadors mesenquimals. Així, la EMT augmenta la motilitat cel·lular que facilita la invasió i la metastasi durant el procés de progressió del càncer. La hipòxia és una de les forces impulsores que facilita la EMT. Durant la hipòxia, molts reguladors transcripcionals que regeixen les expressions d'E-cadherina són activats per El factor 1-alfa induïble per la hipòxia (HIF-1 $\alpha$ ). Com a resultat, es produeix una disminució de la E-cadherina i s'incrementa l'expressió de marcadors mesenquimals com la N-cadherina, la vimentina i la fibronectina, donant lloc a un fenotip mesenquimal que permet la motilitat i la invasivitat de les cèl·lules i, per tant, la seva dispersió del tumor primari (Figura 6).



**Figura 6. Transició epitelial mesènquima (EMT).**

Adaptada de Kao *et al*, 2016.

## Introducció

De fet, apart d'incrementar la motilitat cel·lular, la EMT manté una connexió amb la recurrència dels tumors i en la generació de resistència als tractaments, jugant així un paper molt important en la disseminació dels tumors, és a dir, la metàstasi del càncer [88]. A més, múltiples línies d'investigació han suggerit una associació entre la EMT i la invasivitat i la progressió tumoral en diverses malalties neoplàsiques, inclòs el càncer de bufeta [89]. En concret, s'ha observat que pacients que presentin una expressió alta de marcadors relacionats amb la EMT tenen més probabilitats de progressar i, per tant, presentar metàstasi. Així, la EMT manté una relació estreta en el procés de progressió del NMIBC a estadis de càncer múscul invasiu [90].

### 1.3.2 MICROAMBIENT TUMORAL EN EL CONTEXT DEL CÀNCER DE BUFETA

El microambient tumoral (MT) és un ecosistema complex on les cèl·lules tumorals coexisteixen amb diferents cèl·lules del sistema immunitari, cèl·lules endotelials, cèl·lules estromals (fibroblasts associats al càncer (CAFs) i perícits), adipòcits, vasos sanguinis, vasos limfàtics i components extracel·lulars (citocines, factors de creixement, hormones, matriu extracel·lular, etc) que, de manera conjunta, afavoreixen la supervivència, la divisió o proliferació, la progressió i la disseminació de les cèl·lules tumorals [91–93].

#### 1.3.2.1 Microambient immunitari tumoral i *M. bovis* BCG

Com ja s'ha comentat en l'apartat 1.2.2, el mecanisme d'acció del *M. bovis* BCG en el tractament del NMIBC es caracteritza per la inducció d'una potent resposta proinflamatòria local tipus T<sub>H</sub>1 que comprèn la producció de diferents citocines [37,94,95]. A més, aquesta resposta s'acompanya de la infiltració de diferents cèl·lules immunitàries com ara neutròfils, diferents cèl·lules mononuclears, cèl·lules NK i limfòcits T i B [96]. Tot i així, l'èxit o el fracàs de la immunoteràpia pel *M. bovis* BCG es veurà determinada per la composició del microambient immunitari i per tant, del microambient tumoral.

Així, és conegut que les cèl·lules tumorals tenen la capacitat de generar un microambient immunosupressiu i tolerogènic a través de múltiples mecanismes, com ara l'expressió del receptor PD-L1, que interacciona amb el receptor PD-1 dels limfòcits T, atenuant-ne la seva resposta efectora; i en la secreció de factors immunosupressors i anti-apoptòtics, com el factor de creixement transformant-beta (TGF- $\beta$ ), la prostaglandina E2 (PGE2), la interleucina-10 (IL-10) i la interleucina-6 (IL-6), entre d'altres [97–99]. Aquest microambient, de característiques protumorals, s'acompanya d'una sèrie de poblacions cel·lulars que componen el denominat microambient immunitari tumoral (**Figura 7**). Aquest ambient, es caracteritza per la infiltració de cèl·lules mieloides supressores (MDSCs), neutròfils, mastòcits, cèl·lules dendrítiques (DCs), macròfags associats a tumors (TAMs) i cèl·lules T reguladores (Treg) responsables disminuir la resposta immunitària antitumoral de l'hoste, per mitjà de l'activació d'una resposta antiinflamatòria del tipus T<sub>H</sub>2 que es caracteritza per promoure la vascularització i la progressió del tumor [100,101]. D'altra banda, en els tumors també hi poden residir altres poblacions cel·lulars amb activitat citotòxica com ara els limfòcits T citotòxics CD4+ i CD8+ (CTLs) i les cèl·lules Natural Killer (NK) [102,103]. Així doncs, la proporció de cadascuna de les poblacions cel·lulars, algunes amb propietats antitumorals i d'altres amb propietats protumorals, determinarà la presència de diferents estímuls que comportaran l'activació o inhibició d'aquestes poblacions cel·lulars, afavorint o no, la viabilitat, el



creixement, la progressió i la dispersió del tumor en qüestió. En aquest sentit, s'ha observat que en el càncer de bufeta el micro-ambient immuno-supressiu està relacionat amb un augment de l'expressió de PD-L1, de la presència de MDSCs i TAMs i de la producció de la PGE-2, entre d'altres [104–106].

Seguidament es detallen algunes de les principals poblacions cel·lulars que conformen el microambient immunitari del càncer de bufeta:

Els **neutròfils** representen les principals cèl·lules del sistema immune innat, jugant un paper molt important en l'inici de la resposta inflamatòria. No obstant això, una infiltració constant de neutròfils pot ocasionar una inflamació crònica que comporti la iniciació d'un procés tumoral [107]. Això és degut a que els neutròfils són cèl·lules plàstiques que poden presentar un fenotip inflamatori i antitumoral (neutròfils tipus N1) però també un fenotip antiinflamatori i, per tant, protumoral (neutròfils tipus N2) [108]. Precisament, s'ha observat que els neutròfils N2 afavoreixen la progressió del càncer mitjançant la secreció de TGF- $\beta$  [108]. En el context del MT del càncer de bufeta trobem els neutròfils associats a tumors (TANs), tant del tipus N1 com del tipus N2, estant aquests últims implicats en un augment de la invasivitat de les cèl·lules tumorals [109]. A més, estudis retrospectius de càncer en grans cohorts han observat una correlació entre recomptes grans de TANs i el procés desfavorable de la malaltia [110,111]. En referència al tractament del NMIBC, s'ha demostrat que la infecció de les cèl·lules de l'uroteli amb el *M. bovis* BCG es tradueix amb un increment de la producció de IL-8 i amb l'activació de neutròfils que expressen el lligand inductor de l'apoptosi associada al TNF (TRAIL) responsable d'induir l'apoptosi de les cèl·lules tumorals [112].

Els **limfòcits T CD4+** i **CD8+** representen unes cèl·lules molt rellevants en la resposta immunitària produïda pel *M. bovis* BCG. De fet, la seva activació acostuma a implicar la producció de citocines proinflamatòries del tipus T<sub>H</sub>1 com ara l'INF- $\gamma$ , la IL-2. Aquest fet resulta crucial en la resposta efectiva del *M. bovis* BCG. Per contra, els limfòcits CD4+ també poden generar una resposta del tipus T<sub>H</sub>2 caracteritzada per la producció d'IL-4 i IL-10. Una vegada infiltrades al tumor, les cèl·lules CD4+ són responsables d'estimular una resposta citotòxica mitjançant l'activació de macròfags i limfòcits CD8+ [113,114]

Les **cèl·lules T reguladores (Tregs)** són una subpoblació de cèl·lules T amb una marcada funció immunosupressora i que es caracteritzen per expressar el factor de transcripció *Forkhead box P3* (FoxP3). En càncer de bufeta múscul invasiu s'ha observat una correlació entre un increment de la recurrència del tumor i grans recomptes de Tregs que es tradueix amb una disminució de la supervivència [115]. Respecte el NMIBC, s'ha especulat que el *M. bovis* BCG podria modular la funció immunosupressora de les cèl·lules Treg, especialment si els nivells d'aquestes són baixos, reduint d'aquesta manera la taxa de recurrència de la malaltia [116].

Les **cèl·lules dendrítiques (DCs)** són una població de cèl·lules immunitàries amb un paper central en la generació de la resposta antitumoral efectiva ja que tenen la capacitat de presentar antígens a les cèl·lules T. En el context del MT, les DCs acostumen a presentar un fenotip immadur. No obstant, l'administració del *M. bovis* BCG indueix la maduració de les DCs responsables d'activar altres poblacions cel·lulars com les cèl·lules NKT i els limfòcits T [117].

## Introducció

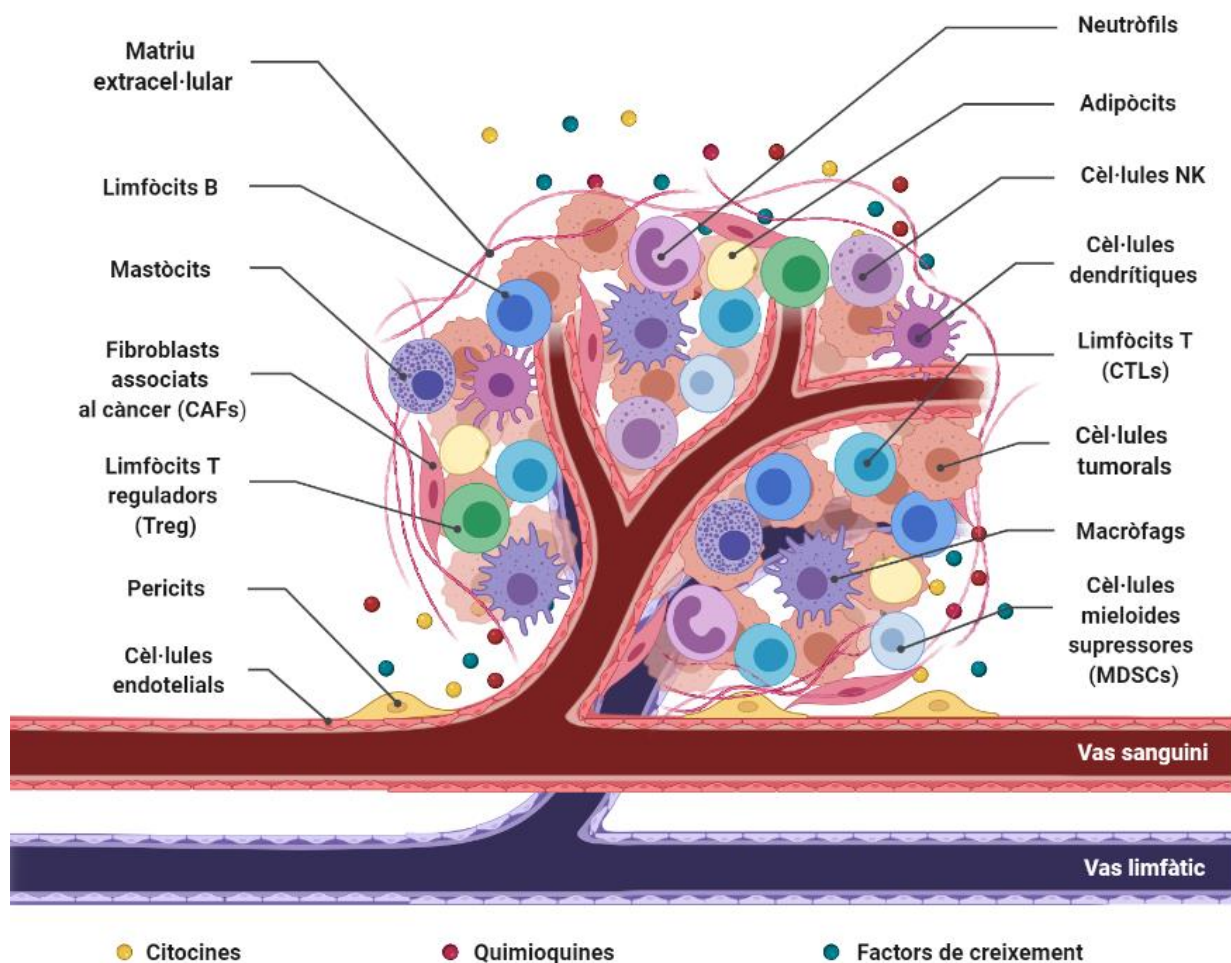
Les **cèl·lules NK** representen un subtipus de cèl·lules limfoides innates amb la característica única de reconèixer i eliminar cèl·lules infectades per virus i cèl·lules tumorals sense requerir d'una sensibilització prèvia. D'aquesta manera, les cèl·lules NK presenten una activitat citotòxica, a partir de la producció de granzims i perforines o induint la apoptosi, que s'acompanya de la producció de citocines com l'INF- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , el GM-CSF i de diferents quimioquines com la CCL1, la CCL2, la CCL3, la CCL4, la CCL5 i el CXCL8 que poden modular la funció d'altres cèl·lules immunològiques [118]. Tot i que s'ha observat la infiltració de cèl·lules NK citotòxiques en molts tipus de tumors, el seu rol encara no està del tot descrit i s'ha observat que acostuma ser insuficient per erradicar el tumor. De fet, les cèl·lules tumorals i la resta de cèl·lules associades al tumor secreten factors, com ara el TGF- $\alpha$ , la IL-6 i la PGE-2, que inhibeixen l'activació de les cèl·lules NK [119]. En el context del càncer de bufeta s'ha demostrat que la presència intratumoral de cèl·lules NK positives per CD56<sup>bright</sup> està relacionada amb una millora de la supervivència [120].

Els **mastòcits** són cèl·lules immunitàries granulocítiques que resideixen en teixits exposats a un ambient extern i que estan implicades en diferents processos fisiològics i patològics com ara les reaccions al·lèrgiques, la inflamació crònica i el càncer. A més, els mastòcits també tenen la característica d'adoptar un tipus de resposta proinflamatòria o antiinflamatòria depenent del l'estímul captat. D'aquesta manera els mastòcits poden promoure o inhibir la progressió tumoral [121]. Els mastòcits s'acumulen al MT degut a la secreció de determinats quimioattractants, per part de les cèl·lules tumorals, com ara el factor de cèl·lules mare (SCF) i la CCR15. Una vegada incorporats al MT, els mastòcits poden generar una resposta antitumoral, activant la producció de citocines IL-1, IL-4, IL-8, IL-6, MCP-3, MCP-4 i TNF- $\alpha$ , entre d'altres, i reclutant neutròfils, macròfags, eosinòfils i cèl·lules T i B; o bé una resposta pro-tumoral mitjançant la secreció de citocines immunosupressives com la IL-10 la realització de compostos angiogènics, com la IL-8, el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), el factor de creixement de fibroblasts-2 (FGF-2), el factor de creixement nerviós (NGF), la heparina, la triptasa, la quimasa i el TGF- $\beta$ ; i la producció de MMP-2 i MMP-9, ambdues implicades en la degradació de la ECM i per tant, facilitant la dispersió de les cèl·lules tumorals [122,123]. Per tant, les conseqüències de la seva presència en el MT segueix essent una incògnita i la seva associació en el pronòstic de la malaltia està difereix en el tipus de tumor, l'estadi i la localització en aquest. En aquest sentit, s'ha observat una correlació positiva entre la infiltració de mastòcits i un major pronòstic en càncer de mama i hepatocarcinoma però negativa en els cassos de càncer colorectal i càncer gastrointestinal, entre d'altres [124]. En el cas del càncer de bufeta, s'ha observat que en pacients que presenten tumors superficials l'eficàcia de la immunoteràpia pel *M. bovis* BCG es veu afavorida davant la infiltració de mastòcits IL-17<sup>+</sup> ja que aquests són capaços de secretar IL-8 i d'aquesta manera reclutar neutròfils que faciliten una bona resposta immunoefectora [125].

Les **cèl·lules mieloides supressores (MDSCs)** representen un grup heterogeni de cèl·lules del sistema immunitari que interacciona amb altres tipus de cèl·lules immunitàries com les cèl·lules T, les cèl·lules dendrítiques, els macròfags i les cèl·lules NK, regulant les seves funcions. En general, les MDSCs inhibeixen les funcions de les cèl·lules T i NK per mitjà de la producció de citocines T<sub>H</sub>2 com la IL-10 i el TGF- $\beta$  i de l'expansió de cèl·lules Treg [126]. En càncer de bufeta s'ha observat un increment de la

recurrència en pacients que presenten alts nivells de MDSCs a la bufeta després de l'administració del *M.bovis* BCG [127].

Els **macròfags associats a tumors (TAMs)**, tractats amb més detall als **apartats 1.11.3 i 1.11.4** d'aquesta introducció, representen la població de cèl·lules immunitàries innates més nombrosa del microambient immunitari tumoral. Aquests, exerceixen un paper central en la homeòstasi i progressió del tumor, així com en la resposta als tractaments i la metàstasi [128]. En similitud a les MDSC, una alta freqüència de TAMs es correlaciona amb una progressió de la malaltia i un mal pronòstic clínic, en la majoria de càncers. Diversos estudis han mostrat una associació desfavorable en el pronòstic de pacients amb càncer bufeta quan els tumors presenten una alta infiltració de TAMs [129–131].



**Figura 7. Principals components del microambient tumoral del càncer de bufeta.**  
Adaptada de Biorender.

### 1.3.3 MACRÒFAGS I CÀNCER DE BUFETA

En càncer de bufeta, l'estudi del MT resta poc investigat en comparació a la quantitat d'estudis realitzats en d'altres tumors sòlids. Tot i així, diferents estudis han posat de manifest la presència de TAMs en l'estroma i l'interior de tumors de bufeta [132,133]. De fet, la presència de d'un determinat fenotip de TAMs, tal i com succeix en d'altres tumors sòlids, està correlacionada amb una evolució clínica desfavorable. En concret, la presència de TAMs en pacients amb NMIBC va lligada a una major progressió del tumor i en un increment de la recurrència d'aquests [134,135]. En relació al tractament del NMIBC, s'ha observat una correlació positiva entre recomptes alts de macròfags M2 a l'estroma del tumor i el fracàs de la immunoteràpia per mitjà del *M. bovis* BCG [132].

#### 1.3.3.1 Polarització i reversió de macròfags en càncer de bufeta

Els macròfags, tal com s'ha descrit en d'altres poblacions de cèl·lules immunitàries, són cèl·lules que presenten plasticitat i, per tant, capaces de canviar de fenotip. Aquests canvis s'expliquen a partir del fenomen biològic anomenat polarització. D'aquesta manera, la polarització dels macròfags s'entén com a un procés on els macròfags assoleixen un fenotip funcional específic en resposta a diferents senyals o estímuls que el macròfag percep d'un determinat microambient [136]. En humans i ratolins s'han descrit diverses classes de macròfags en funció de la seva activitat biològica, de la producció de factors específics i de l'expressió de determinats marcadors de superfície cel·lular. Així doncs, s'han descrit dues subpoblacions principals de macròfags amb diferent funcionalitat; els macròfags inflamatoris o activats clàssicament, altrament anomenats macròfags M1; i els macròfags antiinflamatoris o activats alternativament, coneguts com a macròfags M2 [137].

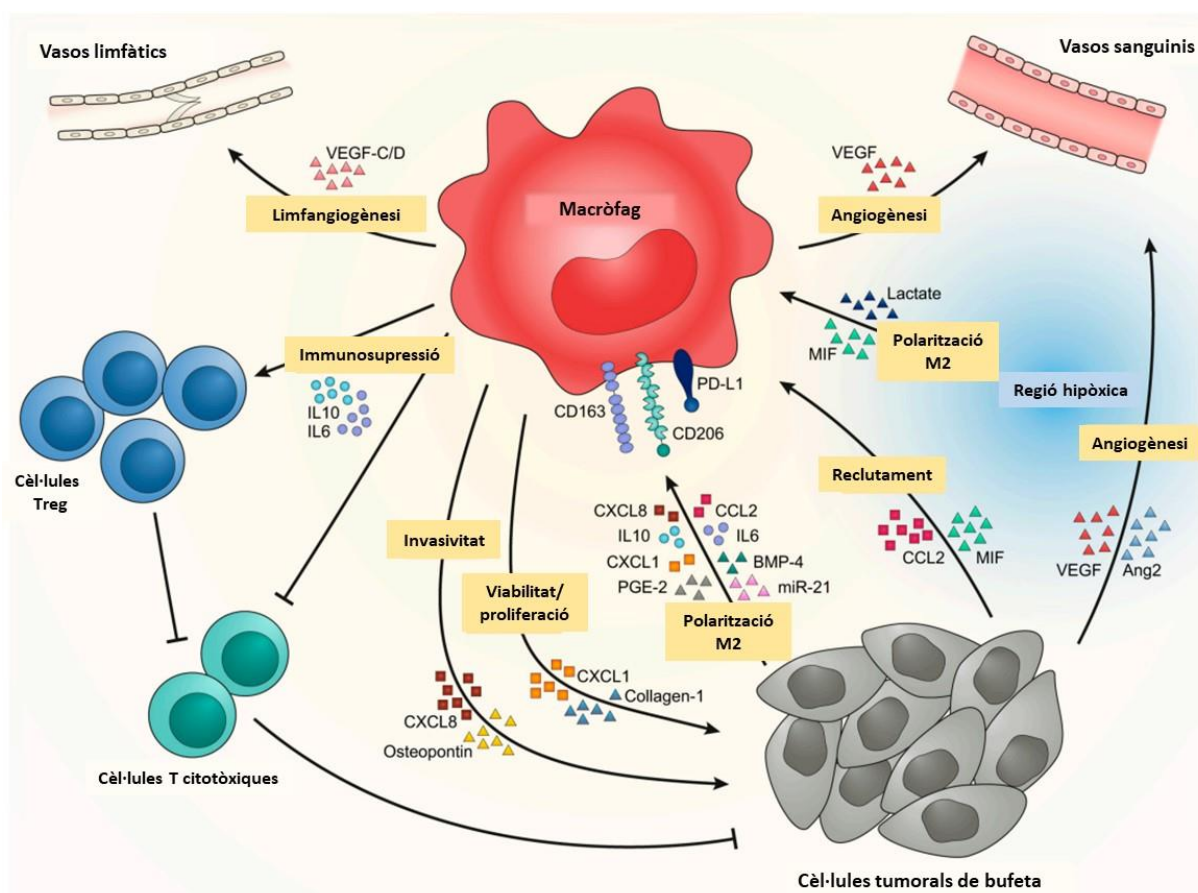
En el cas de la polarització dels **macròfags M1**, aquesta s'activa davant la presència de citocines com ara l'INF- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$  i la IL-12; de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs), com ara lipopolisacàrids bacterians (LPS); o d'altres agonistes dels receptors TLR que promouen, per part dels macròfags M1, una resposta immunitària del tipus T<sub>H</sub>1 que inclou la secreció de diferents molècules proinflamàtores i immunoestimuladores com ara la inducció de l'òxid nítric sintasa (iNOS), necessari per a la producció d'òxid nítric; i diferents citocines com la IL-6, la IL-12 i el TNF- $\alpha$ , responsables d'induir la infiltració de cèl·lules T a l'interior del tumor. Per tant, els macròfags M1 es caracteritzen per adoptar un paper clau en la defensa de l'hoste contra infeccions bacterianes, així com en la immunitat antitumoral [138,139].

Per contra, la polarització dels **macròfags M2** s'inicia davant d'un microambient caracteritzat per la presència de diferents citocines antiinflamàtores com ara la IL-4, la IL-5, la IL-10, la IL-13, el M-CSF, el TGF- $\beta$ 1 i la PGE-2. Aleshores, els macròfags M2 polaritzats inicien la secreció de diferents molècules immunosupressores del tipus T<sub>H</sub>2 com la IL-10, el TGF- $\beta$  i l'arginasa-1 (ARG-1), afavorint la polarització d'altres macròfags cap a un estat antiinflamatori i, per tant, protumoral [140]. Addicionalment, els macròfags M2 també estan implicats la resposta immunitària a infeccions per helmints, en els processos de cura de ferides i en la reparació dels teixits [141].

En referència a la vinculació entre els TAMs i la progressió dels tumors de bufeta (**Figura 8**), s'ha observat que les cèl·lules tumorals de bufeta afavoreixen la polarització de TAMs antiinflamatoris (TAMs M2) mitjançant la producció de determinades quimiocines, citocines, metabòlits i factors de creixement com

la CXCL9, CXCL1, el CCL2, el M-CSF i la IL-10, entre d'altres, augmentant així l'expressió de CD206, CD163 i PD-L1 en la superfície d'aquests macròfags. Com a conseqüència, els TAMs M2 activen la secreció de col·lagen-I i del CXCL1, incrementant la proliferació i la viabilitat cel·lular i, per tant, augmentant la progressió del tumor de bufeta [142–144]. A més, els TAMs M2 promouen la formació de vasos sanguinis i limfàtics mitjançant la producció de diferents molècules promotores i factors de creixement de l'angiogènesi i la limfangiogènesi, com ara el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) i el VEGF-C/D, respectivament [145]. Així mateix, els macròfags M2 també afavoreixen el procés de metàstasi a partir de l'estimulació dels processos de motilitat, d'invasivitat i d'extravasió de les cèl·lules tumorals mitjançant la producció d'osteopontina i del CXCL8 [146–148]. Addicionalment, aquest fenotip de macròfags té la capacitat de secretar citocines antiinflamatòries i molècules amb activitat inhibidòria, com el PD-L1, prevenint així l'acumulació de TAMs inflamatoris (TAMs M1) i per tant suprimint l'activitat dels limfòcits T CD8+ citotòxics [149,150]. De la mateixa manera, els TAMs M2 promouen la diferenciació de limfòcits T CD4+ en cèl·lules Treg, conegudes per la seva implicació en la resposta immunosupressora, a partir de la producció de IL-6 i IL-10 [151].

A causa dels motius anteriors, la plasticitat intrínseca dels macròfags pot ésser utilitzada com a eina per a conduir a una reversió del fenotip dels TAMs M2, reprogramant el fenotip protumoral inicial dels TAMs M2 en macròfags inflamatoris amb activitat antitumoral [152].



**Figura 8. Mecanismes de polarització, de reclutament i d'acció dels TAMs M2 en el càncer de bufeta.**  
Adaptada de Leblond *et al*, 2021.

## Introducció

Tal i com s'ha explicat al llarg d'aquesta introducció, el *M. bovis* BCG és l'actualitat el tractament estàndard d'elecció en pacients amb un diagnòstic de NMIBC. No obstant això, alguns pacients poden presentar episodis de recurrència i progressió del tumor durant el règim d'instil·lacions intravesicals o bé una vegada ha finalitzat aquest. A més, resulta rellevant esmentar que un percentatge elevat dels pacients pot presentar toxicitat al tractament i, per tant, desenvolupar efectes secundaris, sovint lleus, però en ocasions de gravetat. Una altre problemàtica assenyalada al llarg d'aquesta introducció és la relacionada amb la manca de producció i subministrament del *M. bovis* BCG a la que s'ha vist immersa la indústria farmacèutica al llarg dels últims anys i que ha generat un impacte considerable en els diferents sistemes de salut, i per tant, en la població afectada amb NMIBC. Així doncs, degut als inconvenients exposats, l'exploració de noves alternatives al tractament d'aquesta patologia es considera una prioritat. De fet, tal com indiquen els resultats obtinguts pel nostre grup en diferents estudis previs *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*, el *M. brumae* és responsable d'estimular una resposta immunològica i antitumoral similar a la mostrada pel *M. bovis* BCG o inclús superior en determinats escenaris. No obstant això, ens cal més informació per desxifrar si el *M. brumae* es comporta com a un agent biològic segur i no tòxic i entendre millor els mecanismes implicats en la seva resposta immunitària inflammatòria i antitumoral.

D'aquesta manera, els objectius d'aquesta tesi són els que es detallen a continuació:

## 2 . OBJECTIUS

---

Els objectius d'aquesta tesi han estat:

- I. Avaluar la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* en diferents models animals.
  - a. Mitjançant una injecció intravenosa en ratolins immunodeprimits SCID
  - b. Mitjançant repetides instil·lacions intravesicals en ratolins immunocompetents de la soca BALB/c..
  - c. Mitjançant una infecció intrahemocoèlica en larves de *Galleria mellonella*.
  
- II. Avaluar la capacitat del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG d'interferir en diferents fenòmens biològics relacionats amb processos de carcinogènesi com ara la migració i la invasivitat de les cèl·lules tumorals de bufeta, així com la seva capacitat de creixement independent a l'ancoratge a una superfície.
  
- III. Estudiar la capacitat del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG en l'activació dels processos de polarització i reversió de la polarització en macròfags i avaluar la resposta immunitària, la capacitat d'inhibir la proliferació tumoral i la inhibició de la migració i la invasivitat cel·lular, presentada per aquests macròfags, en diferents línies tumorals de bufeta.





## **3 . CAPÍTOL 0.**

### **MATERIALS I MÈTODES. GENERALITATS**

---



### 3. CAPÍTOL 0. MATERIAL I MÈTODES. GENERALITATS

#### 3.1 SOQUES MICOBACTERIANES I CONDICIONS DEL CULTIU MICROBIOLÒGIC

Per a l'estudi de la seguretat i l'avaluació del potencial immunomodulador dels micobacteris en el context del tractament del càncer de bufeta es van utilitzar les següents espècies de micobacteris:

- *Mycobacterium bovis* BCG soca Connaught (ATCC 35475).
- *Mycobacterium brumae* (ATCC 51384<sup>T</sup>).

Per al cultiu microbiològic d'ambdues espècies, es va utilitzar el medi sòlid Middlebrook 7H10 (Difco Laboratories, Estats Units) suplementat amb un 10% d'àcid Oleic-Albúmina-Dextrosa-Catalasa (OADC). La preparació d'aquest medi es va realitzar seguint el procediment detallat a la **Taula 6**. Una vegada preparat el medi suplementat, es va procedir a realitzar un cultiu pur de cadascun dels micobacteris. Aquests, es van cultivar a una temperatura de 37°C durant 3 setmanes (21 dies), en el cas del *M. bovis* BCG i d'1 setmana (7 dies) quan es tractava del *M. brumae*.

**Taula 6. Preparació medi de cultiu 7H10 i suplement d'OADC**

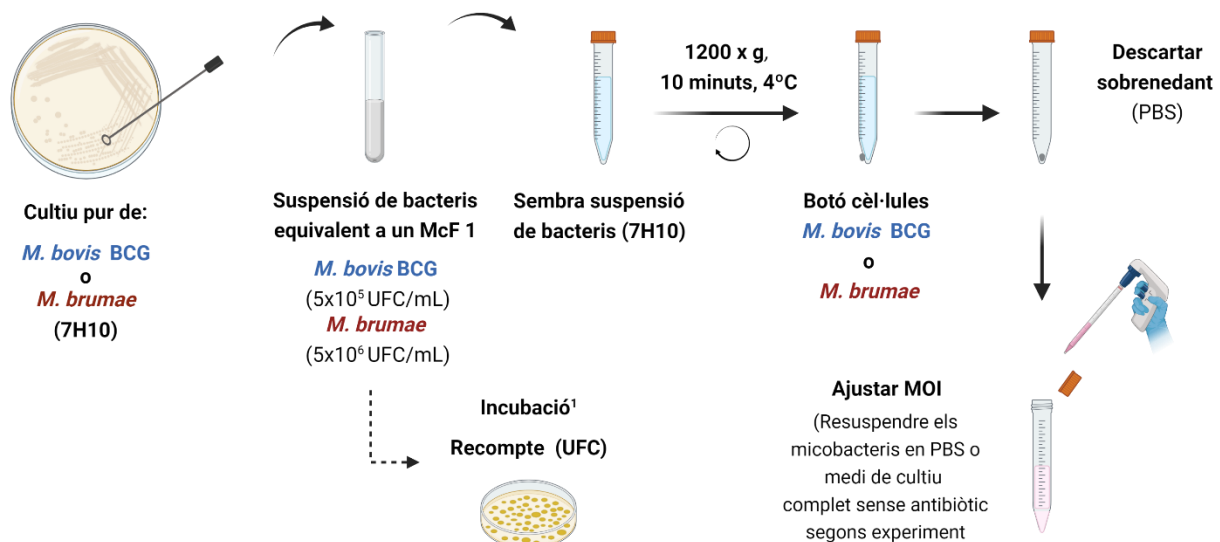
	Components	Volum/pes (Volum total 1L)	Consideracions
<b>Medi de cultiu 7H10</b>	<b>Aigua destil·lada</b>	900 mL	Dissoldre els 2 components (Agar 7H10 i glicerol) en un recipient de vidre termoresistent amb aigua destil·lada. Segellar el recipient i autoclavar (121°C, 10 min.). Deixar temperar a temperatura ambient.
	<b>Agar Middlebrook 7H10</b> (Difco, Estats Units)	19 g	
	<b>Glicerol</b> (Panreac, Espanya)	5 mL	
<b>OADC (Suplement)</b>	<b>Aigua destil·lada</b>	100 mL	Solució termolàbil. En primer lloc, dissoldre els components en un recipient independent. Seguidament, filtrar la solució a través d'un filtre de 0.22 µm (Millipore, Merck, Estats Units d'Amèrica). Incubar la solució a 37°C durant 24 hores per a garantir-ne l'esterilitat. En absència de contaminació afegir-la al medi cultiu temperat i aleshores dispensar el medi en plaques de petri de 90 mm (Sterilin, Estats Units)
	<b>Albúmina sèrica bovina fracció V</b> (BSA, Roche, Suïssa)	5 g	
	<b>Glucosa</b> (Panreac, Espanya)	2 g	
	<b>Clorur de sodi</b> (NaCl, Panreac, Espanya)	0.85 g	
	<b>Catalasa</b> (Sigma-Aldrich, Estats Units)	4 mg	
	<b>Àcid oleic</b> (Sigma-Aldrich)	0.05 g	

Abreviacions: OADC, Àcid Oleic-Albúmina-Dextrosa-Catalasa.

### 3.2 PREPARACIÓ DE LES SUSPENSIONS BACTERIANES

Totes les suspensions bacterianes (tractaments), realitzades a partir de cultius del *M. bovis* BCG (nivell de bioseguretat 2) i *M. brumae* (nivell de bioseguretat 1), es van preparar utilitzant les instal·lacions adequades i aprovades pel Comitè de Bioseguretat de la UAB, quan es tractava del *M. bovis* BCG.

Primerament, les cèl·lules del *M. bovis* BCG i *M. brumae* van ser resuspeses en tampó fosfat salí (PBS) fins aconseguir una terbolesa equivalent a un estàndard d'1.0 de l'escala de McFarland. Així s'aconsegua una concentració inicial de  $5 \times 10^5$  unitats formadores de colònies (UFC) per mil·lilitre (mL), en el cas del *M. bovis* BCG, i de  $5 \times 10^6$  UFC/mL quan es tractava del *M. brumae*. A partir de les concentracions inicials obtingudes, es preparaven les concentracions i volums finals necessàries per a cada condició o experiment. El diluent utilitzat va diferir en funció de l'objectiu d'estudi que presentava cada experiment: en el cas d'experiments *in vivo* es va utilitzar PBS i en el cas d'experiments que implicaven l'ús de cèl·lules tumorals de bufeta s'utilitzà el medi de cultiu cel·lular pertinent (**Figura 9**).



**Figura 9. Esquema general referent a la preparació de suspensions bacterianes (inòculs o tractaments).**

Abreviacions: MOI (Multiplicitat d'infecció); PBS (Tampó fosfat salí); i UFC (Unitats formadores de colònies).

<sup>1</sup> 37°C (7 dies en el cas del *M. brumae* i 21 dies en el cas del *M. bovis* BCG).

Adicionalment, en l'estudi de la toxicitat i seguretat del *M. brumae* es va incorporar un tractament o condició addicional, que va consistir en la irradiació d'algunes suspensions bacterianes del *M. brumae*. [153]. Així, en el suposat cas de que el *M. brumae* viu hagués mostrat indicis de patogenicitat disposàvem d'una variant atenuada d'aquest. Per a tal propòsit, les solucions de PBS i micobacteris van ser ajustades a una terbolesa similar a la de l'1.0 en l'escala de McFarland realitzant el mateix procediment explicat en aquest apartat. Aleshores, les suspensions de bacteris obtingudes es van dipositar en ampolles de vidre estanques i es van sotmetre a un procés de gamma-irradiació (5 kGy) a les instal·lacions d'Aragogamma S.L.

### 3.3 LÍNIES CEL·LULARS TUMORALS. TIPOLOGIA I CONDICIONS DE CULTIU

Una part molt rellevant dels experiments realitzats durant aquest treball es van realitzar utilitzant diverses línies cel·lulars de càncer de bufeta humana i de ratolí amb diferents grau de diferenciació, i una línia cel·lular monocítica humana (THP-1) (**Taula 7**). Tots els procediments realitzats, al tractar-se de línies cel·lulars de nivell de bioseguretat 2, van ser aprovats, prèviament, per el Comitè de Bioseguretat de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**Taula 7. Línies cel·lulars utilitzades**

Línia cel·lular	Grau de diferenciació	Descripció (Origen, tipus cel·lular, patologia)
<b>T24</b>	Grau 3 (G3)	Carcinoma transicional, cèl·lula humana epitelial de bufeta
<b>J82</b>	Grau 3 (G3)	Carcinoma transicional, cèl·lula humana epitelial de bufeta
<b>5637</b>	Grau 2 (G2)	Carcinoma transicional, cèl·lula humana epitelial de bufeta
<b>SW780</b>	Grau 1 (G1)	Carcinoma transicional, cèl·lula humana epitelial de bufeta
<b>MB49</b>	Grau 3 (G3)	Carcinoma epitelial de bufeta, ratolí C57BL/6
<b>THP-1</b>	N/A	Monòcit, leucèmia monocítica aguda humana
N/A (No aplica).		

Pel creixement i manteniment de les diferents línies cel·lulars es van utilitzar flascons de 25 cm<sup>3</sup> i 75 cm<sup>3</sup> (Nunclon, Dinamarca). En tots els tipus cel·lulars es va utilitzar el medi de cultiu corresponent, suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS, Corning, Estats Units) i una combinació, a l'1%, de penicil·lina (Laboratoris ERN, Espanya) i estreptomina (Laboratoris Reig Jofre, Espanya) (medi de cultiu complet). En particular, el medi de cultiu cel·lular emprat per al cultiu de les línies tumorals humanes de bufeta (T24, J82, 5637 i SW780) va ser el DMEM-F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium F-12, Gibco, Estats Units); el DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco, Estats Units), en el cas de la línia cel·lular murina MB49; i el RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Lonza, Suïssa) quan es tractava de la línia cel·lular THP-1. Tots els cultius cel·lulars es van mantenir en una atmosfera humidificada amb un 5% de CO<sub>2</sub> i a una temperatura de 37°C.

En el cas de cèl·lules tumorals d'origen epitelial (**T24, J82, 5637, SW70, MB49**), el creixement cel·lular es mantenia fins que la monocapa de cèl·lules ocupava un 80% de la superfície del flascó (aproximadament 2-3 dies de cultiu). Transcorregut aquest període, cada passatge de cèl·lules consistia en la retirada del medi de cultiu, seguit d'un rentat amb PBS 1X, equivalent al volum de medi de cultiu utilitzat, i de la tripsinització de les cèl·lules mitjançant l'addició d'una solució d'1 mL de tripsina-EDTA 1X (Biowest, França) en PBS. Aleshores, les cèl·lules resultants es resuspenien en medi de cultiu complet i es cultivaven, novament, en un flascó de cultiu cel·lular a la concentració cel·lular desitjada. En el cas de realitzar una infecció de les cèl·lules tumorals, el medi de cultiu cel·lular utilitzat no contenia antibiòtics.

## CAPÍTOL 0. Materials i Mètodes. Generalitats

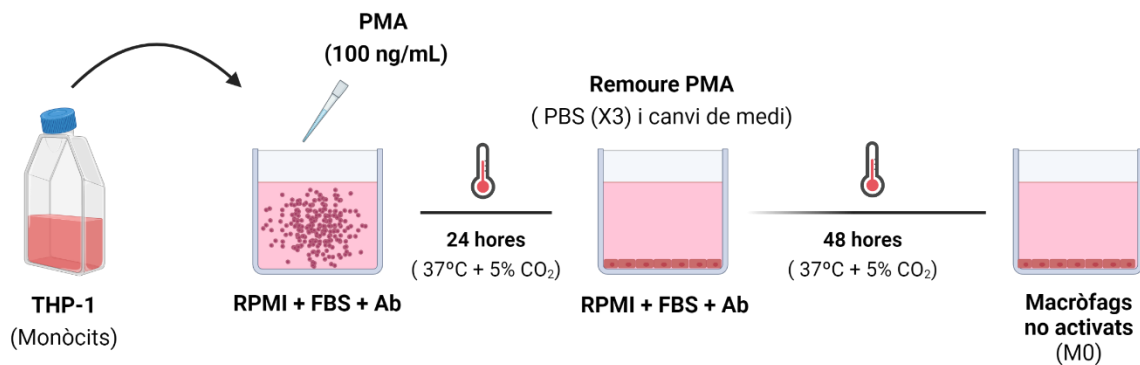
Respecte a la línia cel·lular **THP-1**, la tècnica de cultiu cel·lular utilitzada presentava lleugeres diferències respecte de la tècnica emprada per al manteniment de les línies tumorals epitelials. En primer lloc, al tractar-se de cèl·lules que presenten un creixement en suspensió, els flascons eren incubats en posició vertical. D'aquesta manera s'incrementava l'àrea de cultiu de les cèl·lules en qüestió. En segon lloc, i en relació amb la tipologia de creixement esmentada, el canvi de medi de cultiu requeria de la realització d'un cicle de centrifugació (300 x g, 5 minuts) que permetia la separació de les cèl·lules del propi medi del cultiu a descartar i, per tant, a reemplaçar. Finalment, el botó de cèl·lules obtingut en el procés de centrifugació es transferia en medi de cultiu complet nou i seguidament es cultivaven en un flascó de cultiu cel·lular en la concentració cel·lular desitjada fins al següent passatge (3 dies).

Per al recompte de la concentració cel·lular de les diferents suspensions de cèl·lules, es partia d'una dilució  $\frac{1}{2}$  de la suspensió cel·lular inicial, que consistia en 10  $\mu\text{L}$  de suspensió cel·lular i 10  $\mu\text{L}$  de blau de tripà (Gibco, Estats Units). Aleshores, 10  $\mu\text{L}$  de la suspensió problema eren dipositats, per capil·laritat, en una cambra de Neubauer. Seguidament, es comptaven les cèl·lules que havien exclòs el blau de tripà, i per tant viables, situades dins els límits de cadascun dels quadrants laterals de la cambra. Aplicant la corresponent fórmula s'obtenia la concentració cel·lular de la mostra [154].

### 3.4 TRACTAMENT DE LES CÈL·LULES TUMORALS AMB ELS MICOBACTERIS

Amb l'objectiu d'estudiar les bases de la immunomodulació produïda pels micobacteris per al control de la progressió tumoral, totes les línies cel·lulars de càncer de bufeta, així com la línia cel·lular THP-1, van ésser tractades o infectades amb diferents dosis de *M. bovis* BCG i de *M. brumae*. Per a la realització dels tractaments, es partia de les suspensions bacterianes obtingudes tal i com s'indica en l'**apartat 3.2** d'aquest capítol.

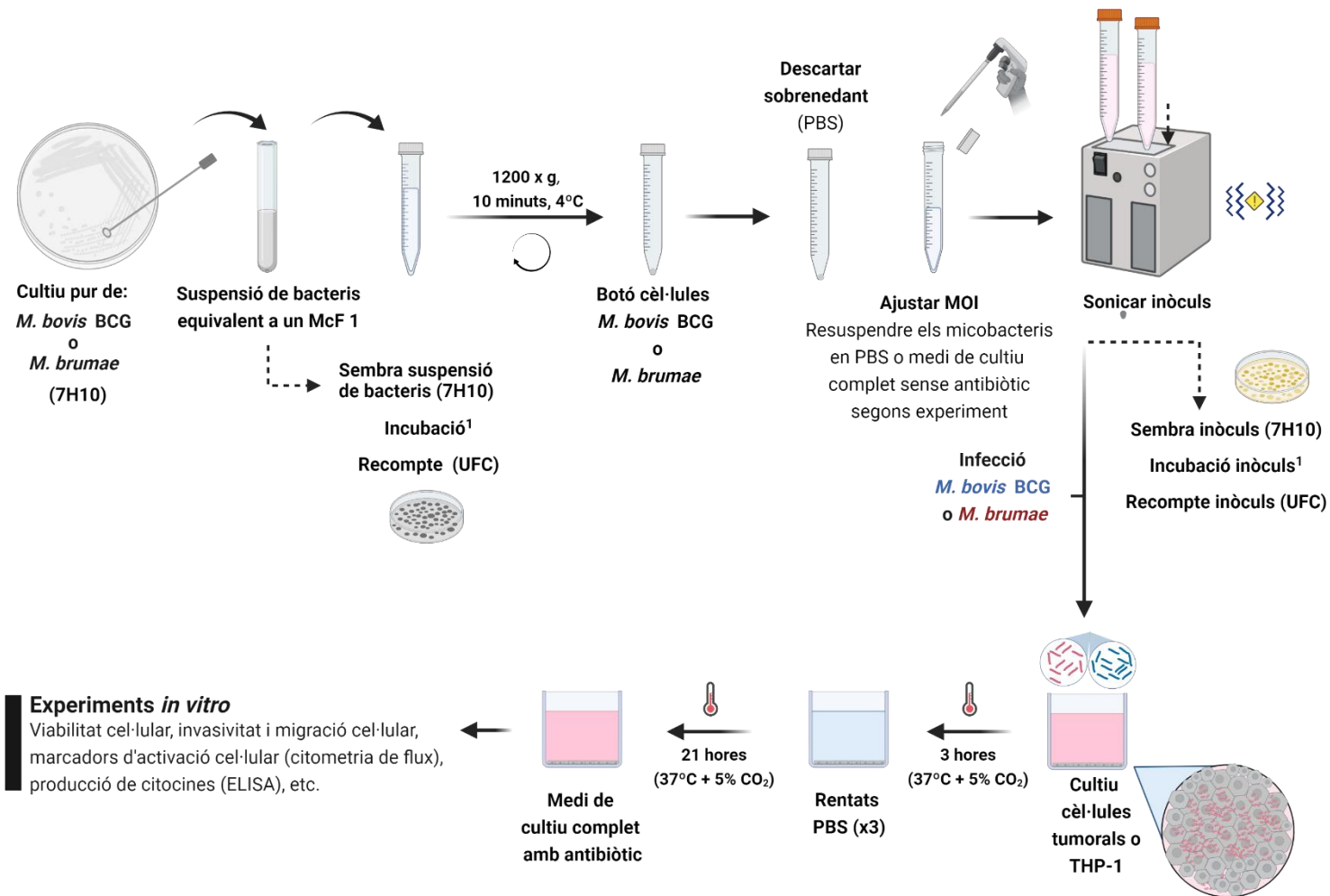
En el cas de les **línies cel·lulars de càncer de bufeta**, els experiments es van realitzar en plaques de cultiu cel·lular de 6 pous o 24 pous (Nunc, Dinamarca) en funció del disseny experimental plantejat. A l'inici de cada experiment, les cèl·lules es sembraven en medi de cultiu complet sense antibiòtic i s'incubaven durant 3 hores a 37°C, en una atmosfera humida i amb un 5% CO<sub>2</sub>, amb la finalitat de que totes les cèl·lules dispensades s'adherissin a la superfície de cadascun dels pous de la placa de cultiu cel·lular. En canvi, les **cèl·lules THP-1** s'havien de diferenciar prèviament en macròfags no activats (M0). Aquest procés de diferenciació s'obtenia mitjançant l'exposició d'aquests monòcits a una solució de Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA, Abcam, Regne Unit) a una concentració de 100 ng/mL. A les 24 hores, amb la finalitat de remoure el PMA, es realitzaven 3 rentats amb PBS i un canvi de medi de cultiu amb RPMI amb FBS i antibiòtics. Seguidament, les cèl·lules eren incubades durant 48 hores addicionals per obtenir finalment els macròfags M0 (**Figura 10**).



**Figura 10. Diferenciació de monòcits THP-1 en macròfags no activats (M0).**

Abreviacions: PMA (Forbol 12-miristat 13-acetat); RPMI (Roswell Park Memorial Institute); FBS (Sèrum boví fetal); i Ab (Antibiòtics).

En paral·lel, durant el període d'incubació (3 hores en el cas de les línies tumorals de bufeta i 72 hores quan es tractava de la línia THP-1) es preparaven els inòculs o tractaments del *M. bovis* BCG i del *M. brumae* necessaris per infectar o tractar les diferents línies cel·lulars sembrades amb la corresponent multiplicat d'infecció (MOI), o ratio, entre micobacteris i cèl·lules plantejada en cadascun dels experiments. Una vegada ajustada la concentració de micobacteris, es procedia a retirar el PBS mitjançant un programa de centrifugació a 1200 x g durant 10 minuts i a una temperatura de 4°C. Aleshores, el precipitat corresponent a cèl·lules del *M. bovis* BCG o el *M. brumae* era resuspès en el medi de cultiu, sense antibiòtic, corresponent a la línia tumoral sotmesa a estudi. Es realitzaven 3 cicles de sonicació de 30 segons, amb 10 segons d'aturada entre cadascun d'ells, obtenint així l'inòcul de la infecció. Aquest inòcul era dipositat sobre les cèl·lules tumorals en el seu volum i concentració adequats per a la reproducció de la MOI plantejada en el disseny experimental. Transcorregut el període d'infecció (3 hores), es procedia a la realització de 3 rentats de PBS. Seguidament, s'incorporava medi de cultiu complet amb antibiòtic i es procedia a una incubació addicional de 21 hores. A més, amb l'objectiu de confirmar un correcte ajustament de la MOI, els inòculs generats eren sembrats en plaques de 7H10. Aleshores, els inòculs sembrats eren incubats a 37°C durant 7 dies, en el cas del *M. brumae*, i 21 dies quan es tractava del *M. bovis* BCG. Per últim, es comptabilitzaven les UFC, de cadascun dels inòculs preparats, per a confirmar el correcte ajustament de la MOI (**Figura 11**).



**Figura 11. Esquema general del procediment emprat per a la preparació de les suspensions bacterianes (inòculs) i la infecció bacteriana dels cultius cel·lulars de les cèl·lules tumorals de bufeta o la línia cel·lular THP-1.**

Abreviacions: MOI (Multiplicitat d'infecció); PBS (Tampó fosfat salí); i UFC (Unitats formadores de colònies). <sup>1</sup> 37°C (7 dies en el cas del *M. brumae* i 21 dies en el cas del *M. bovis* BCG).



## 4 . CAPÍTOL I.

### AVALUACIÓ DE LA SEGURETAT I TOXICITAT DEL *M. brumae*

---



## 4. CAPÍTOL I. AVALUACIÓ DE LA SEGURETAT I TOXICITAT DEL *M. brumae*

L'estudi de la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* va ser realitzat utilitzant dos models animals diferents. Concretament, l'experimentació es va realitzar en dues soques murines diferents, una d'immunodeprimida i l'altre immunocompetent, i en larves de *Galleria mellonella*. En el cas de l'experimentació amb ratolins, tots els experiments havien estat prèviament aprovats per la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (número de procediment UAB: 3632 i 3633) i la Comissió d'Experimentació Animal de la Generalitat de Catalunya. D'aquesta manera, es va utilitzar el nombre mínim d'animals en conformitat amb la normativa vigent.

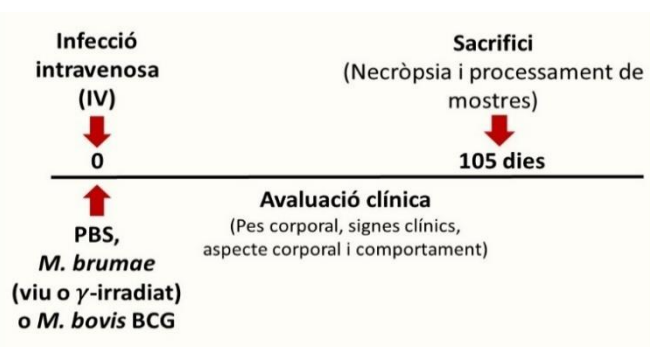
### 4.1 MATERIALS I MÈTODES

#### 4.1.1 SEGURETAT I TOXICITAT EN EL MODEL ANIMAL MURÍ

Abans d'iniciar els experiments, els ratolins van ésser aleatoritzats segons el seu pes. Els animals s'avaluaven diàriament tenint en compte el seu pes corporal, l'aspecte físic general, determinats signes clínics, el seu comportament i l'aspecte de les miccions i deposicions. Es va aplicar la eutanàsia en tots aquells animals que mostraven alteracions significatives, dels paràmetres enumerats, per així evitar un patiment innecessari. Tots els procediments es van realitzar sota anestèsia inhalatòria amb isoflurà.

##### 4.1.1.1 Infecció intravenosa

La infecció intravenosa es va dur a terme en ratolins immunodeprimits de 8 setmanes d'edat pertanyents a la soca C.B-17/IcrHan<sup>®</sup>Hsd-Prkdc<sup>scid</sup> (SCID, Envigo, Països Baixos) (8 ratolins femella / grup). Els ratolins van ser infectats per mitjà d'una única injecció intravenosa, a través de la vena lateral de la cua, de  $2 \times 10^6$  UFC del *M. bovis* BCG, *M. brumae* o del *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat en 0.1 mL de PBS o tractats únicament amb 0.1 mL de PBS, quan es tractà del grup control. A les 15 setmanes (105 dies), els ratolins supervivents van ésser sacrificats per ex-sanguinació sota una dosi letal d'anestèsia inhalatòria. Seguidament, els animals es van sotmetre a una necròpsia amb avaluació histopatològica. La sang recollida en el moment del sacrifici per punció intracardíaca va ésser processada per a l'avaluació de diferents paràmetres bioquímics i hematològics. A més, es van extreure asèpticament els fetges, les melses i els pulmons de cada animal, principals òrgans diana en infeccions provocades per infeccions micobacterianes, per a la posterior quantificació d'UFC i el seu anàlisi histopatològic (**Figura 12**).



**Figura 12.** Esquema general de l'estudi de la seguretat i toxicitat a partir de la infecció intravenosa amb micobacteris.

#### 4.1.1.2 Instil·lacions intravesicals

Es va procedir a l'avaluació de la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* mitjançant repetides instil·lacions intravesicals, tal com es procedeix en el tractament de càncer de bufeta superficial, seguint l'esquema indicat en la **Figura 13**. En aquest cas, l'estudi va ser realitzat en ratolins immunocompetents de 8 setmanes d'edat de la soca BALB/cOlaHsd (Envigo, Països Baixos) (8 ratolins femella / grup). Es van administrar, per via intravesical, dues dosis diferents del *M. brumae* o del *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat anomenades "dosi baixa" i "dosi alta", corresponents a  $2 \times 10^6$  UFC/ratolí en 0.1 mL de PBS, en el cas de la dosi baixa, o  $2 \times 10^9$  UFC en 0.1 mL de PBS quan es tractava de la dosi alta. Al grup control es van injectar 0.1 mL de PBS. Una vegada administrats, els tractaments van romandre a la bufeta durant 60 minuts. Aleshores, aquests eren remoguts exercint una pressió manual sobre la bufeta que derivava en el buidat d'aquesta [155]. Els animals es van tractar setmanalment durant 6 setmanes. Dues setmanes després, els animals van ser sacrificats. A continuació, es va realitzar una necròpsia sistemàtica. Els pulmons, les melses, els ronyons i els fetges van ser extrets asèpticament i processats amb la finalitat de quantificar les UFC. A més, les bufetes van ser extretes per a la realització d'una anàlisi histopatològica.



**Figura 13.** Esquema general de l'estudi la seguretat i toxicitat en ratolins sotmesos a repetides instil·lacions intravesicals.

#### 4.1.1.3 Determinació d'UFC en diferents òrgans de ratolí (pulmó, melsa, fetge i ronyó)

Una vegada sacrificats els diferents ratolins, els **pulmons**, la **melsa** i el **fetge** de cada ratolí van ser pesats. Seguidament, el lòbul superior del pulmó dret, una porció de la melsa i una porció del fetge de cada ratolí va ser pesat, altra vegada, i processat amb la finalitat d'avaluar la presència d'UFC corresponents al *M. bovis* BCG i al *M. brumae*. En el cas dels ratolins sotmesos a instil·lacions intravesicals, la presència de micobacteris també va ser avaluada en **ronyons** degut a la proximitat anatòmica que aquests presenten amb la bufeta urinària.

Les porcions de melsa va ser disgregades individualment en una placa de petri de 90 mm amb l'ajuda d'unes pinces metàl·liques estèrils. La suspensió d'esplenòcits resultant es va resuspendre i disgregar amb l'ajuda d'una xeringa amb agulla del calibre 23 (BD, Estats Units) en 5 mL de RPMI (**Figura 14A**). Per al processament de les porcions de pulmó, fetge i ronyons es van utilitzar homogeneïtzadors de vidre estèrils que contenien 1 mL de PBS cadascun. Ambdós procediments van ser realitzats en cadascun dels animals sotmesos a la infecció intravenosa i a les instil·lacions intravesicals. Tot seguit, amb l'objectiu de determinar les UFC per gram (UFC/g), els diferents homogeneïtzats de cada òrgan van ser diluïts en sèrie i cultivats en plaques de 7H10 a 37°C durant 1 o 3 setmanes en funció del micobacteri administrat (**Figura 14B**). La porció restant de cadascun dels òrgans esmentats va ser utilitzada per a l'anàlisi histopatològica.

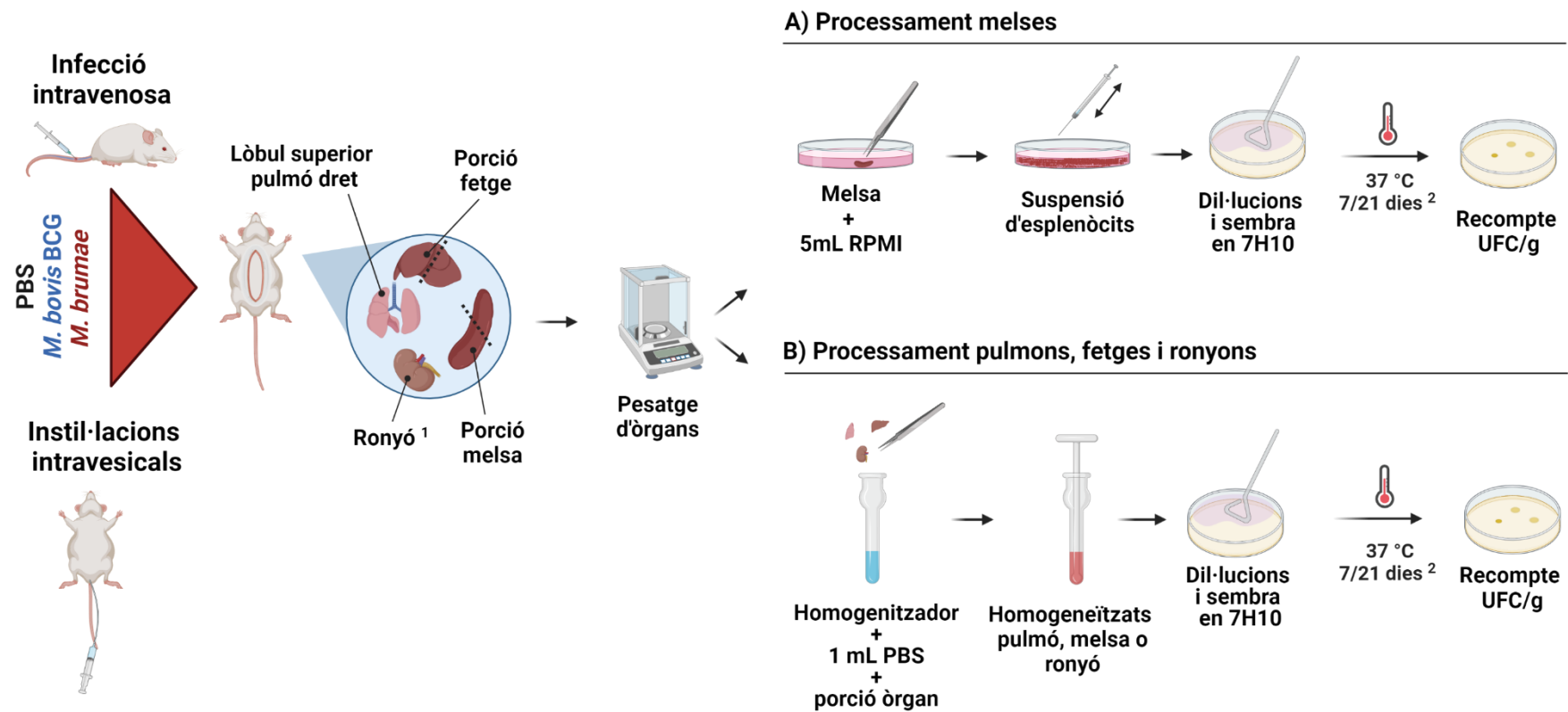


Figura 14. Esquema del procediment utilitzat per al processament d'òrgans de ratolí i el posterior recompte d'UFCs.

(A) Melses, (B) pulmons, fetges i ronyons de ratolins infectats o tractats intravesicalment. <sup>1</sup> Es van processar únicament ronyons de ratolins tractats intravesicalment. <sup>2</sup> 7 dies en el cas del *M. brumae* i 21 dies en el cas del *M. bovis* BCG.

**4.1.1.4 Anàlisi histopatològica dels òrgans de ratolí**

Durant la necròpsia dels ratolins infectats per via intravenosa, un ampli nombre d'òrgans i teixits representatius de cadascun dels sistemes biològics (**Taula 8**) van ser fixats en formaldehid (4%) i, seguidament, inclosos en blocs de parafina. Es va realitzar el mateix procediment per a les bufetes dels ratolins sotmesos a repetides instil·lacions intravesicals. A continuació, es van realitzar múltiples talls, de 2-3 µm de gruix, dels blocs de parafina de cadascuna de les mostres obtingudes i es van tenyir amb hematoxilina-eosina.

**Taula 8. Anàlisi histopatològica d'òrgans i teixits**

Òrgans i/o teixits analitzats	
Bufetes urinàries <sup>1</sup>	Melsa
Cava-aorta	Múscul
Cec	Nervi ciàtic
Cervell	Nòduls limfàtics
Còlon	Nòduls limfàtics submandibulars
Cor	Ovaris
Duodè	Pàncrees
Esòfag	Pell
Estómac	Pulmons
Fetge	Ronyons
Glàndules adrenals	Timus
Glàndules salivals	Tràquea
Ili	Úter
Jejú	Vagina
Medul·la espinal	

<sup>1</sup> Les bufetes urinàries van ésser analitzades tant en ratolins infectats per via intravenosa com en ratolins sotmesos a instil·lacions intravesicals.

Per a l'anàlisi del dany histològic que presentaven els diferents òrgans i teixits analitzats, es va implementar un sistema de gradació o puntuació segons la magnitud de les lesions observades (**Taula 9**). La determinació del grau de la lesió es va realitzar a partir de l'anàlisi de les diferents imatges dels talls histològics de cadascun del òrgans i teixits analitzats.

**Taula 9. Sistema de gradació de les lesions observades en l'anàlisi histopatològica**

GRAU	DESCRIPCIÓ
0	No s'observen lesions
1	Lesions molt lleus
2	Lesions lleugeres
3	Lesions moderades
4	Lesions intenses

#### 4.1.1.5 Determinació de paràmetres hematològics i bioquímics

En ambdós estudis de seguretat i toxicitat, intravenós i intravesical, les mostres de sang van ser obtingudes per mitjà d'una punció intracardíaca. En cada animal, la sang recuperada va dividir-se en dos tubs diferents: un tub que contenia EDTA per a l'anàlisi hematològic i un tub que contenia heparina i liti per a l'anàlisi bioquímic. El plasma, obtingut de la sang recol·lectada en tubs amb heparina i liti per mitjà d'una centrifugació prèvia (1200 x g, 15 minuts, 4°C, Heraeus Megafuge 11R), es va emmagatzemar a una temperatura de -80°C fins al seu anàlisi. Al contrari, la sang total recol·lectada en els tubs d'EDTA va processar-se d'immediat. Es van analitzar un ampli rang de paràmetres hematològics i bioquímics (**Taula 10**) mitjançant els analitzadors Olympus AU400 i l'ADVIA 120 (Siemens®), respectivament.

**Taula 10. Paràmetres bioquímics i hematològics analitzats**

Paràmetres hematològics	Paràmetres bioquímics
Basòfils	Albúmina
Eosinòfils	Alanina transaminasa (ALT)
Hematòcrit	Aspartat transaminasa (AST)
Limfòcits	Creatinina
Monòcits	Ferro
Neutròfils	Fosfatasa alcalina
Plaquetes	Glucosa
Recompte de glòbuls blancs (WBCB)	Potassi
Recompte de glòbuls vermells (RBC)	Proteïnes totals
	Sodi
	Urea

#### 4.1.2 SEGURETAT EN EL MODEL ANIMAL DE *G. mellonella*

Complementàriament, l'estudi de seguretat es va dur a terme en el model animal de *G. mellonella*. Les larves es van criar a una temperatura de 34°C, sent alimentades amb una dieta artificial que consistia en farina de blat de moro, farina de blat, cereals, llevat de cervesa, mel i glicerol. La inoculació dels micobacteris i el PBS es va realitzar mitjançant una injecció intrahemocoèlica, per mitjà d'una xeringa del calibre 22 (BD, Becton Dickinson, Estats Units)[156]. Es van inocular tres concentracions diferents del *M. bovis* BCG i del *M. brumae*:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  i  $1 \times 10^6$  UFC/larva en un volum de 0.01 mL de PBS. Es van utilitzar quinze larves per a cada grup i l'experiment va ésser reproduït fins a quatre vegades (n=60). Com a control, es va utilitzar un grup de larves injectades amb PBS. La supervivència es va avaluar en termes de moviment larvari i grau de melanització. Transcorreguts 6 dies (144 hores) de la infecció amb micobacteris, l'hemolimfa de les larves supervivents va ser recol·lectada i cultivada en plaques de 7H10 per tal de comptabilitzar el nombre total d'UFC presents en l'hemolimfa d'aquestes larves (**Figura 15**).



Figura 15. Esquema general de l'estudi de seguretat en el model animal de larves de *G. mellonella*

#### 4.1.2.1 Determinació d'UFC en l'hemolimfa de larves de *G. mellonella*

Respecte al model de *G. mellonella*, es va procedir a col·lectar l'**hemolimfa** de les larves supervivents, per mitjà d'un tall a la part més distal de l'abdomen, i aquesta va cultivar-se en plaques de 7H10 amb l'objectiu de comptabilitzar-ne les UFC per mil·lilitre (UFC/mL). Altra vegada, el període d'incubació s'allargà fins a 1 setmana, en el cas de tractar-se d'hemolimfa de larves infectades amb el *M. brumae*, i de 3 setmanes, en el cas d'haver inoculat les larves amb el *M. bovis* BCG (Figura 16).

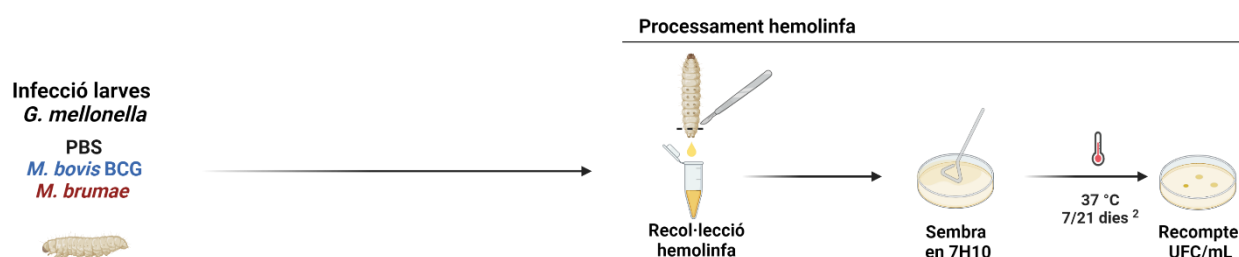


Figura 16. Determinació d'UFC en hemolimfa de larves de *G. mellonella*

#### 4.1.3 ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística de l'estudi histopatològic i dels recomptes d'UFC es va realitzar mitjançant el mètode unidireccional no paramètric de l'anàlisi de la variància per rangs (Prova Kruskal-Wallis H). Els valors de la mitjana i la desviació estàndard ( $\pm$  SD) del pes corporal i de la variació del pes (pes corporal relatiu) es van comparar entre els diferents grups de tractament mitjançant la prova d'ANOVA bidireccional (two-way ANOVA). Les dades de pes dels òrgans i els valors dels paràmetres hematològics i bioquímics es van expressar en termes de la mitjana i la seva corresponent desviació estàndard (SD). Aquests valors, es van comparar mitjançant la prova ANOVA unidireccional (One-way ANOVA). Respecte la supervivència dels ratolins i de les larves de *G. mellonella*, aquesta es va analitzar utilitzant la prova Log-Rank (Mantel-Cox) i es va representar mitjançant corbes de Kaplan-Meier. Tots els gràfics i l'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar mitjançant el programa GraphPad Prism (v.6.0c per a macOS; GraphPad Software, San Diego, CA, Estats Units). Es van considerar diferències significatives quan el valor de  $p < 0.05$ .

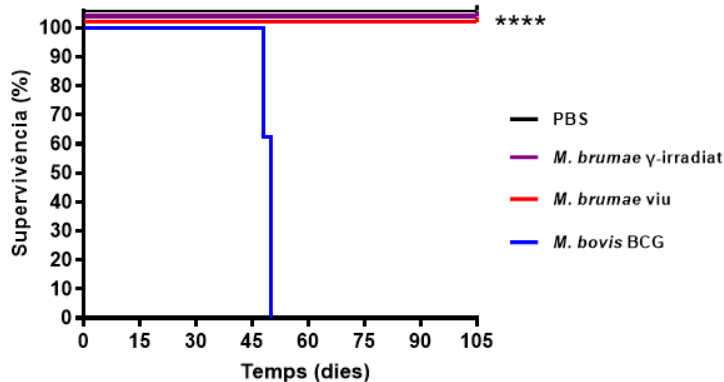


## 4.2 RESULTATS

### 4.2.1 INFECCIÓ INTRAVENOSA EN RATOLINS SCID

#### 4.2.1.1 Anàlisi de la supervivència dels ratolins infectats per via intravenosa

El primer model animal sotmès a estudi va consistir en la infecció de ratolins immunodeprimits (SCID) a través d'una única injecció intravenosa, d'una dosi coneguda, del *M. brumae*, viu o  $\gamma$ -irradiat, o del *M. bovis* BCG. Els experiments es van realitzar segons l'esquema mostrat a l'apartat 4.1.1.1 del material i mètodes (Figura 12). Al finalitzar l'estudi, 105 dies després de la infecció, tots els ratolins SCID infectats amb el *M. brumae* (viu i  $\gamma$ -irradiat) havien sobreviscut sense mostrar cap simptomatologia clínica rellevant durant la monitorització realitzada al llarg de l'estudi. No obstant, el grup de ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG començaren a manifestar signes clínics a partir de la quarta setmana després d'haver rebut la inoculació d'aquest micobacteri. D'aquesta manera, entre els dies 48 i 55 es van haver de sacrificar, practicant els punts de final humanitaris (eutanàsia), tots aquells ratolins que havien estat infectats amb el *M. bovis* BCG (Figura 17).



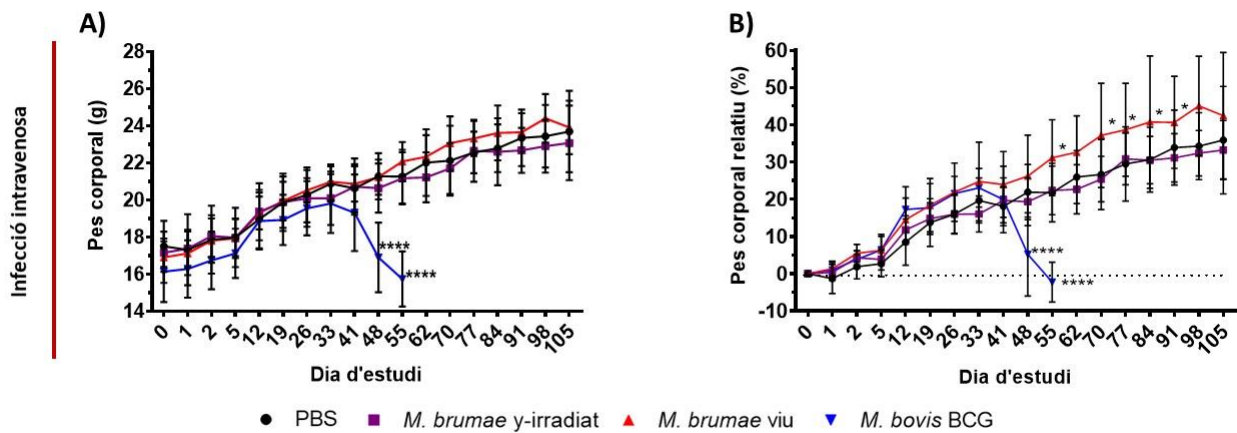
**Figura 17. Corba de supervivència corresponent a la infecció intravenosa.**

PBS (negre), *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat (lila), *M. brumae* viu (vermell) *M. bovis* BCG (blau).\*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Prova Log-Rank Mantel-Cox) (N= 8 ratolins/grup).

#### 4.2.1.2 Anàlisi de l'evolució del pes corporal dels ratolins infectats per via intravenosa

La monitorització del pes corporal va ser, entre d'altres, un dels paràmetres clínics monitoritzats al llarg de d'aquest estudi de seguretat i toxicitat del *M. brumae*. Aquests resultats, referents al pes; queden representats a la Figura 18. D'una banda, es poden observar les mitjanes de pes corporal de cadascun dels grups experimentals al llarg de l'estudi (Figura 18A). D'altra banda, a la Figura 18B es representa el pes corporal relatiu. Aquest concepte fa referència a la pèrdua o guany de pes corporal, expressada en percentatge, respecte al pes mitjà que tenia cadascun dels grups experimentals a l'inici de l'estudi. Respecte els resultats obtinguts, tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, els únics animals que van mostrar simptomatologia clínica van resultar ser els ratolins que havien estat infectats amb el *M. bovis* BCG. Aquesta simptomatologia es va reflectir, entre d'altres, en una pèrdua de pes corporal que va tenir inici a partir de la quarta setmana de l'estudi, arribant al seu màxim entre els dies 48 i 55 ( $p < 0.0001$ ). En el cas dels ratolins infectats amb el *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat, l'increment de pes corporal no va mostrar diferències significatives en comparació als altres grups experimentals. No obstant, els ratolins infectats amb el *M. brumae* viu van mostrar la primera diferència significativa corresponent al pes corporal relatiu a partir de la vuitena setmana (54 dies) respecte els ratolins que havien estat inoculats amb PBS (control). Així doncs, al dia 84 el conjunt de ratolins infectats amb el *M. brumae* viu van mostrar un

increment significatiu en el percentatge del seu pes, respecte al seu pes inicial (pes corporal relatiu), del  $40.73 \pm 17.75$ , mentre que els ratolins als que se l'hi havia injectat PBS mostraren un increment del pes corporal relatiu del  $30.64 \pm 8.7$  ( $p < 0.05$ ).

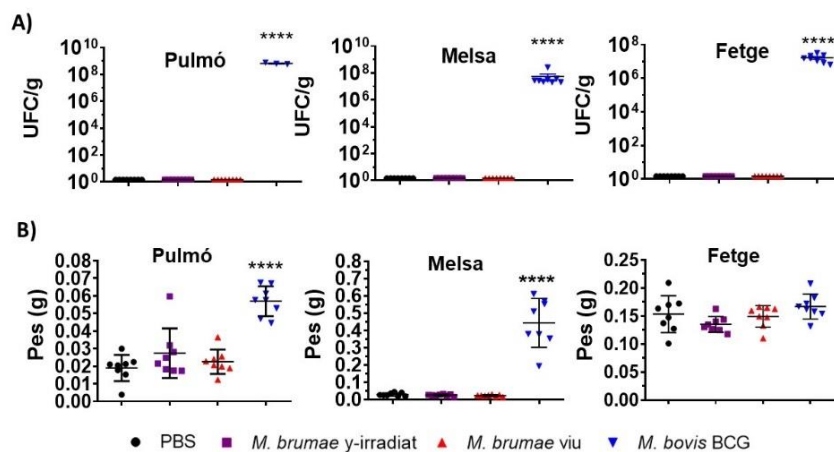


**Figura 18.** Pes corporal i pes relatiu en ratolins sotmesos a la infecció intravenosa.

Evolució del pes corporal (A) i percentatge de canvi del pes (pes corporal relatiu) (B) dels diferents grups de ratolins infectats per via intravenosa. PBS (negre), *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat (lila), *M. brumae* viu (vermell) *M. bovis* BCG (blau). Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Prova Two-way ANOVA).

#### 4.2.1.3 Recompte d'UFC del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG en pulmons, melses i fetges, i el seu corresponent pes, en ratolins SCID

El recompte d'UFC i el pesatge dels pulmons, melses i fetges dels ratolins infectats intravenosament es va realitzar seguint els procediments esmentats en l'apartat 4.1.1.3 del material i mètodes d'aquest capítol. Es va reportar creixement d'UFC del *M. bovis* BCG en els cultius microbiològics resultants dels òrgans homogeneïtzats (pulmons, melses i fetges) de ratolins SCID infectats amb aquest micobacteri. Al contrari, els òrgans procedents de ratolins que havien estat infectats per via intravenosa amb el *M. brumae* no van mostrar creixement d'UFC ( $p < 0.0001$ ) (Figura 19A). En referència al pes dels òrgans, es van reportar diferències significatives entre els pulmons i les melses procedents dels ratolins infectats intravenosament amb *M. bovis* BCG respecte als que havien estat inoculats amb PBS ( $p < 0.0001$ ). Tot i així, no es van observar diferències significatives entre els pesos dels fetges i el tractament administrat per via intravenosa en cadascun dels ratolins (Figura 19B).



**Figura 19.** Unitats formadores de colònies i pes d'òrgans en ratolins SCID.

(A) Unitats formadores de colònies (UFC) obtingudes en pulmons, melses i fetges. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Prova Kruskal-Wallis-H). (B) Pes dels pulmons, les melses i els fetges dels ratolins infectats per via intravenosa. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD.

\*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Prova One-way ANOVA). (N=8 ratolins/grup, excepte pulmó (N=3)).

#### 4.2.1.4 Anàlisi de paràmetres bioquímics i hematològics en ratolins SCID infectats amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG

Tal com s'indica en l'apartat 4.1.1 del material i mètodes, l'estudi de seguretat i toxicitat del *M. brumae* va finalitzar amb el sacrifici, via punció cardíaca i exsanguinació, dels diferents ratolins SCID que havien estat inoculats amb PBS o bé infectats amb el *M. brumae* (viu i  $\gamma$ -irradiat) o el *M. bovis* BCG. A continuació, la sang recuperada dels diferents grups experimentals va ser processada per a l'estudi d'un gran nombre de paràmetres bioquímics i hematològics.

En primer lloc, en referència als paràmetres hematològics, la sang obtinguda va mostrar recomptes significativament superiors de neutròfils i limfòcits en aquells ratolins que havien estat infectats amb el *M. bovis* BCG en comparació als registres obtinguts en la resta de grups experimentals. A més, es va observar un increment en el mateix sentit, tot i que no tant significatiu, en els recomptes de basòfils, monòcits i eosinòfils dels ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG (**Taula 11**). Els ratolins infectats amb el *M. brumae* no van mostrar diferències en cap paràmetre hematològic respecte del grup control o PBS.

D'altra banda, els resultats de l'anàlisi bioquímica del plasma obtingut, després de centrifugar la porció de sang dels diferents grups de ratolins va reportar valors significativament més elevats d'AST, ALT, potassi i urea en el grup de ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG respecte de la resta de grups inoculats amb PBS i *M. brumae* viu i  $\gamma$ -irradiat. A més, els valors de creatinina, ferro i glucosa també es van veure disminuïts significativament, en comparació amb la resta de grups, en aquells ratolins que havien rebut la injecció del *M. bovis* BCG. En canvi, no es van observar diferències significatives en el valors de fosfatasa alcalina entre els diferents grups experimentals (**Taula 12**).

**Taula 11. Resultats dels paràmetres hematològics estudiats en els ratolins SCID tractats per via intravenosa.**

Paràmetres	PBS <sup>1</sup>		<i>M. brumae</i> γ-irradiat <sup>1</sup>		<i>M. brumae</i> viu <sup>2</sup>		<i>M. bovis</i> BCG <sup>2</sup>		Valor <i>p</i>
	Mitjana ± SD	Rang	Mitjana ± SD	Rang	Mitjana ± SD	Rang	Mitjana ± SD	Rang	
<b>WBCB<sup>a</sup></b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	0.84 ± 0.23	(0.46 – 1.06)	1,14 ± 0,67	(0.65 – 2.55)	0.71 ± 0.23	(0.50 – 1.02)	11,40 ± 5.13	(5.00 – 5.13)	< 0.001
<b>RCB<sup>b</sup></b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	9.35 ± 0.47	(8.88 – 10.23)	9.84 ± 0.27	(9.40 – 10.25)	9.29 ± 0.29	(8.97 – 9.75)	12,70 ± 0,57	(11.41 – 12.80)	< 0.001
<b>Hematocrit</b> (%)	40.16 ± 1.84	(37.8 – 42.2)	41.67 ± 1.08	(40.00 – 43.20)	40.28 ± 1.06	(38.9 – 41.9)	42.38 ± 2.1	(40.00 – 42.50)	ns
<b>Plaquetes</b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	1008.14 ± 88.13	(855 – 1127)	1024.43 ± 110.32	(861 – 1220)	958 ± 211	(588 – 1161)	1502.83 ± 300.46	(1102 – 1920)	< 0.001
<b>Neutròfils totals</b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	0.48 ± 0.18	(0.18 – 0.66)	0.64 ± 0.39	(0.21 – 1.44)	0.39 ± 0.15	(0.21 – 0.58)	9.99 ± 4.77	(4.10 – 16.14)	< 0.0001
<b>Limfòctis totals</b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	0.19 ± 0.06	(0.14 – 0.31)	0.22 ± 0.12	(0.07 – 0.43)	0.14 ± 0.05	(0.07 – 0.21)	0.64 ± 0.17	(0.37 – 0.84)	< 0.0001
<b>Basòfils totals</b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	0.00 ± 0.00	(0.00 – 0.01)	0.00 ± 0.01	(0.00 – 0.01)	0.00 ± 0.00	(0.00 – 0.01)	0.03 ± 0.02	(0.01 – 0.07)	< 0.001
<b>Eosinòfils totals</b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	0.08 ± 0.05	(0.04 – 0.17)	0.14 ± 0.15	(0.04 – 0.46)	0.07 ± 0.03	(0.01 – 0.08)	0.31 ± 0.10	(0.19 – 0.46)	< 0.05*, < 0.01
<b>Monòcits totals</b> (x10 <sup>3</sup> cel/μL)	0.06 ± 0.02	(0.04 – 0.09)	0.08 ± 0.18	(0.03 – 0.18)	0.06 ± 0.03	(0.02 – 0.12)	0.18 ± 0.10	(0.07 – 0.31)	< 0.05#, < 0.01

Abreviacions: <sup>a</sup> WBCB (recompte de glòbuls blancs); <sup>b</sup> RCB (recompte de glòbuls vermells); ns (no significatiu); SD (desviació estàndard). <sup>1</sup>N=7, <sup>2</sup>N=6. Les dades s'expressen com la mitjana ± SD i el rang de cada paràmetre en els diferents grups experimentals de ratolins. Es van estudiar les diferències significatives entre els grups mitjançant la prova One-way ANOVA comparant amb el grup de ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG, excepte: \*(*M. brumae* γ-irradiat, *M. brumae* viu vs. *M.bovis* BCG) i # (PBS vs *M. bovis* BCG).

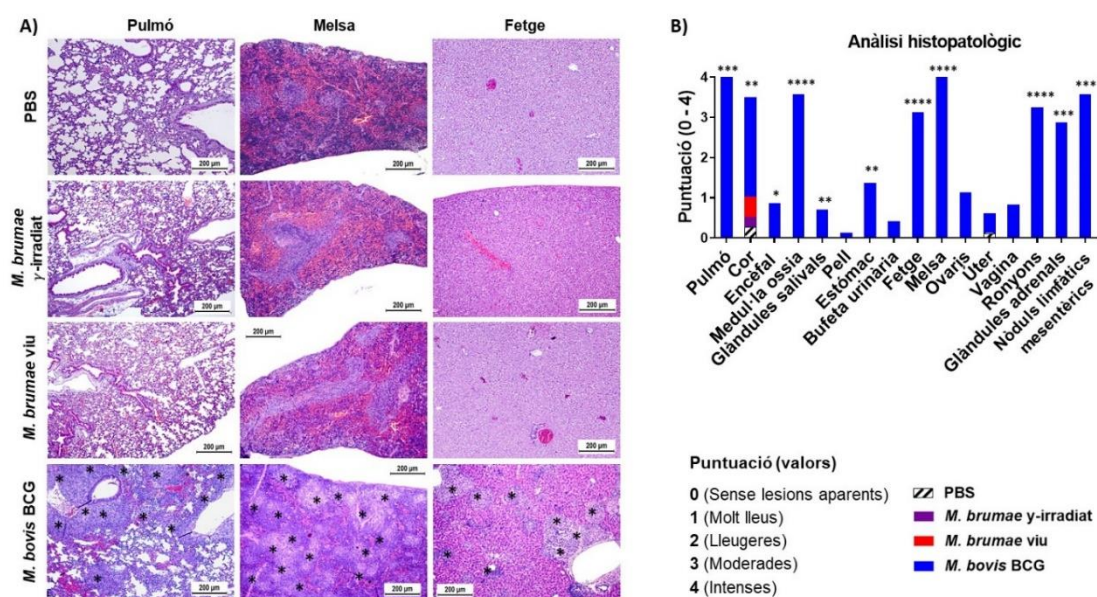
**Taula 12. Resultats dels paràmetres bioquímics estudiats en els ratolins SCID tractats per via intravenosa.**

Tractament	PBS		<i>M. brumae</i> γ-irradiat		<i>M. brumae</i> viu		<i>M. bovis</i> BCG		Valor p
	Mitjana ± SD	Rang	Mitjana ± SD	Rang	Mitjana ± SD	Rang	Mitjana ± SD	Rang	
ALT (U/L) <sup>a</sup>	17.86 ± 5.82	(11.30-30.80)	17.89 ± 6.39	(12.20 – 31.50)	16.74 ± 3.05 <sup>1</sup>	(14.00 – 22.60)	61.53 ± 3.81 <sup>3</sup>	(27.80 – 100.80)	< 0.001
AST (U/L) <sup>b</sup>	73.50 ± 38.43	(42.00 – 74.00)	51.29 ± 10.81	(42.00 – 74.00)	65.86 ± 17.30 <sup>1</sup>	(49.00 – 88.00)	326.00 ± 74.62 <sup>4</sup>	(249.00 – 428.00)	< 0.0001
Creatinina (mg/dL)	0.27 ± 0.01	(0.25 – 0.29)	0.27 ± 0.02	(0.24 – 0.28)	0.28 ± 0.01 <sup>1</sup>	(0.27 – 0.30)	0.23 ± 0.04 <sup>5</sup>	(0.17 – 0.28)	< 0.05, < 0.01*
Ferro (µg/dL)	224.11 ± 40.55	(158.40 – 274.10)	218.26 ± 43.96	(156.40 – 276.70)	203.37 ± 9.89 <sup>2</sup>	(188.10 – 214.50)	119.84 ± 31.02 <sup>5</sup>	(88.00 – 157.70)	< 0.01 <sup>#</sup> , < 0.001
Fosfatasa alcalina (mmol/L)	72.54 ± 4.71	(67.20 – 78.46)	77.69 ± 11.24	(68.17 – 100.46)	80.10 ± 7.99 <sup>1</sup>	(66.90 – 90.02)	76.70 ± 11.75 <sup>6</sup>	(68.39 – 85.00)	ns
Glucosa (mg/mL)	271.98 ± 26.89	(232.20 – 317.40)	285.51 ± 45.10	(233.70 – 352.00)	269.60 ± 44.31 <sup>1</sup>	(213.30 – 340.10)	121.37 ± 3.55 <sup>3</sup>	(118.20 – 125.00)	< 0.0001
Potassi (mmol/L)	4.64 ± 0.74	(3.61 – 5.90)	4.89 ± 0.70	(3.96 – 5.75)	4.27 ± 0.55	(3.65 – 5.10)	5.95 ± 0.66 <sup>5</sup>	(5.35 – 6.84)	< 0.05, < 0.01 <sup>&amp;</sup> , < 0.0001 <sup>^</sup>
Sodi (mmol/L)	147.00 ± 1.61	(143,70 – 148,80)	146.33 ± 1.32	(144.50 – 148.10)	148.88 ± 1.64	(146.50 – 151.10)	149.14 ± 1.86 <sup>5</sup>	(147.00 – 151.20)	< 0.05
Urea (mg/dL)	47.01 ± 7.83	(33.10 – 53.60)	44.21 ± 9.36	(34.20 – 60.50)	44.87 ± 8.61 <sup>1</sup>	(35.50 – 60.60)	68.65 ± 16.27 <sup>4</sup>	(55.60 – 92.20)	< 0.01
Albumina (g/dL)	2.87 ± 0.12	(2.72 – 3.10)	2.82 ± 0.09	(2.72 – 2.89)	2.82 ± 0.10 <sup>1</sup>	(2.71 – 3.00)	2.14 ± 0 <sup>7</sup>	–	ns
Proteïnes totals (g/dL)	4.88 ± 0.19	(4.57 – 5.20)	4.77 ± 0.18	(4.57 – 5.20)	4.84 ± 0.12 <sup>1</sup>	(4.69 – 5.04)	4.66 ± 0 <sup>7</sup>	–	ns

Abreujacions: <sup>a</sup>ALT (Alanina transaminasa); <sup>b</sup>AST (Aspartat transaminasa); ns (no significatiu); SD (desviació estàndard). Les dades s'expressen com la mitjana ± SD i el rang de cada paràmetre en els diferents grups experimentals de ratolins. <sup>1</sup>N=7; <sup>2</sup>N=6; <sup>3</sup>N=3; <sup>4</sup>N=4; <sup>5</sup>N=5; <sup>6</sup>N=2; i <sup>7</sup>N=1. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA comparant amb el grup del *M. bovis* BCG, excepte: \* (*M. brumae* γ-irradiat, *M. brumae* viu vs. *M. bovis* BCG) i <sup>#</sup> (PBS vs *M. bovis* BCG).

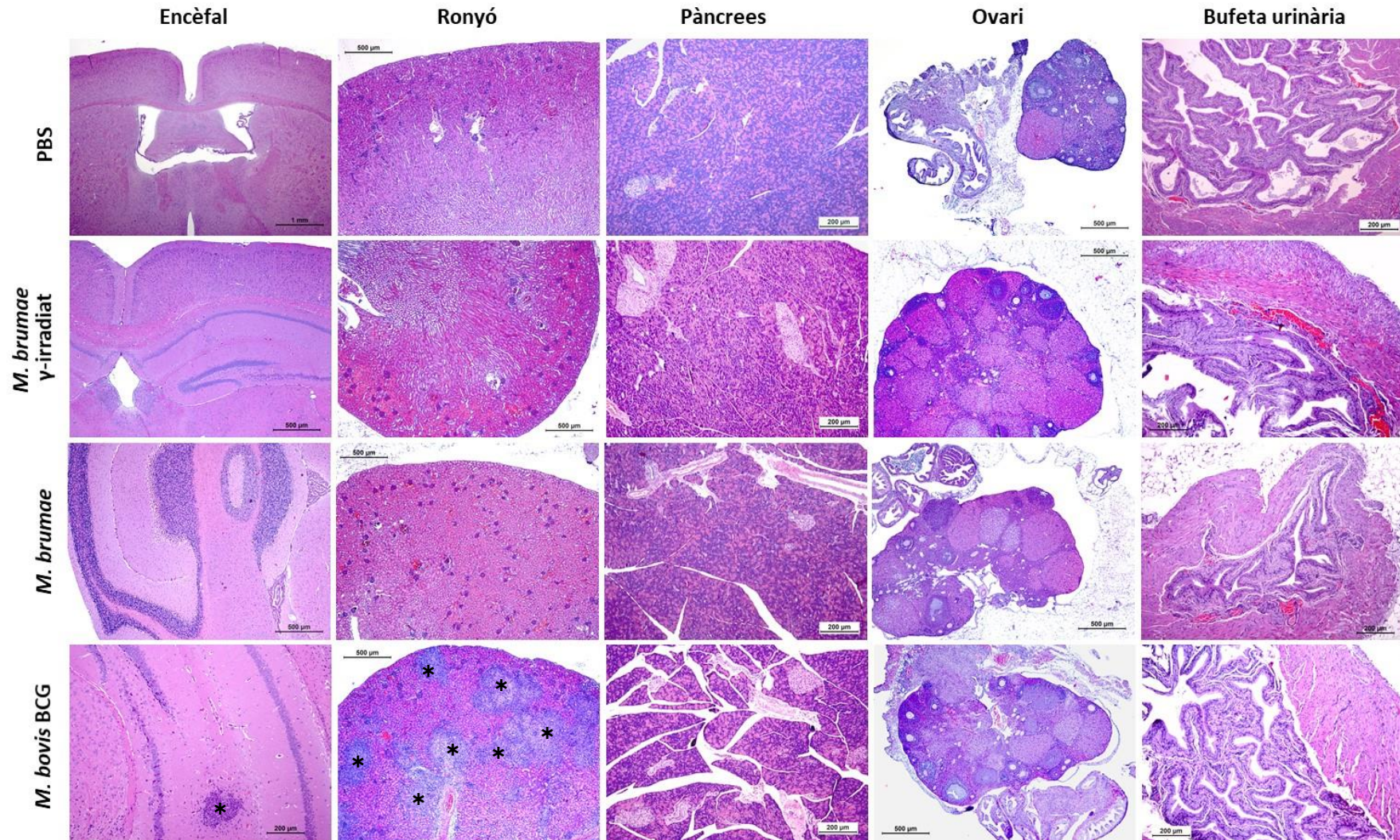
#### 4.2.1.5 Anàlisi histopatològica de diferents òrgans i teixits dels ratolins SCID infectats per via intravenosa

L'avaluació del dany histològic, conseqüència de la infecció micobacteriana, es va realitzar establint una puntuació segons el grau de lesió que presentaven els diferents òrgans i teixits analitzats (**Taula 8 de l'apartat 4.1.1.4.** del material i mètodes). Resumidament, els resultats obtinguts en aquesta anàlisi van demostrar la seguretat i no toxicitat del *M. brumae* en ratolins SCID. Respecte la infecció produïda pel *M. bovis* BCG, es van observar diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) en els ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG en comparació amb els òrgans i teixits dels ratolins que havien estat inoculats amb PBS o el *M. brumae*. Tal com s'esperava, les lesions observades en els ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG seguien el patró d'una infecció sistèmica multiorgànica, d'alta gravetat, produïda per micobacteris del complex tuberculosi (**Figura 20A**). Aquestes lesions, es presentaven en forma de múltiples granulomes coalescents de distribució parenquimàtica amb un component inflamatori compost per macròfags, cèl·lules epiteloïdes i neutròfils. De tots els òrgans i teixits analitzats en l'estudi, es van observar diferències estadísticament significatives en l'estómac, els ganglis limfàtics mesentèrics, el fetge, els ronyons, les glàndules suparenals, el cor, la medul·la òssia, la melsa, els pulmons, les glàndules salivars i l'encèfal entre els ratolins tractats amb el *M. bovis* BCG i els que s'havien tractat amb PBS (**Figura 20B**). Cal destacar la presència d'una mineralització a l'epicardi en alguns ratolins infectats o tractats amb PBS i amb *M. brumae* que no comportà cap rellevància clínica ni patològica. En canvi, no es van observar diferències significatives en les lesions observades en el duodè, el jejú, l'ili, el còlon, el cec, el pàncrees, els ovaris, l'úter, la vagina, la bufeta urinària, l'esòfag, la tràquea, el tim, el nervi ciàtic, la pell, el múscul, l'artèria aorta i la vena cava dels ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG i els que havien rebut la injecció intravenosa de PBS o *M. brumae*. En la **Figura 21** es poden observar imatges addicionals de talls histològics corresponents a l'encèfal, el ronyó, el pàncrees, l'ovari i la bufeta dels ratolins analitzats.



**Figura 20. Anàlisi histopatològica dels òrgans dels ratolins infectats per via intravenosa**

**(A)** Imatges representatives de la tinció amb hematoxilina-eosina dels pulmons, melses i fetges de ratolins infectats amb PBS, *M. brumae* (viu i  $\gamma$ -irradiat) i *M. bovis* BCG. (\*) Presència de lesions (granulomes). **(B)** Puntuació (0-4) segons el grau histopatològic de les lesions. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  (Prova Kruskal-Wallis-H).



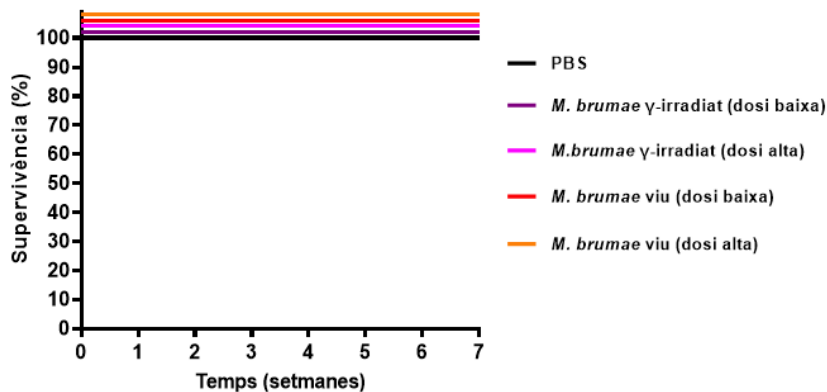
**Figura 21. Anàlisi histopatològica d'altres òrgans de ratolins infectats per via intravenosa.**

Imatges representatives de la tinció amb hematoxilina-eosina de l'encèfal, el ronyó, el pàncrees, l'ovari i la bufeta urinària de ratolins infectats, per via intravenosa, amb PBS, *M. brumae* γ-irradiat, *M. brumae*, i *M. bovis* BCG. (\*) Presència de lesions (granulomes).

## 4.2.2 INSTIL·LACIONS INTRAVESICALS EN RATOLINS BALB/C

### 4.2.2.1 Anàlisi de la supervivència dels ratolins BALB/c tractats amb diferents dosis de *M. brumae* viu i *M. brumae* $\gamma$ -irradiat

Un dels altres objectius establerts per aquest estudi va consistir en l'avaluació de la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* associada a repetides administracions intravesicals d'aquest micobacteri. Per tal d'aconseguir l'objectiu esmentat, l'administració intravesical dels diferents tractaments es va realitzar segons l'esquema esmentat a l'apartat 4.1.1.2 del material i mètodes (Figura 13). Resumidament, aquest estudi va consistir en l'administració intravesical de dues dosis, una considerada baixa i l'altra alta, del *M. brumae* viu o  $\gamma$ -irradiat en diferents grups de ratolins immunocompetents (BALB/c). En aquest cas, al finalitzar l'estudi tots els ratolins havien sobreviscut (Figura 22). Respecte a l'evolució clínica dels ratolins, cap animal va mostrar simptomatologia clínica durant el transcurs de l'estudi.



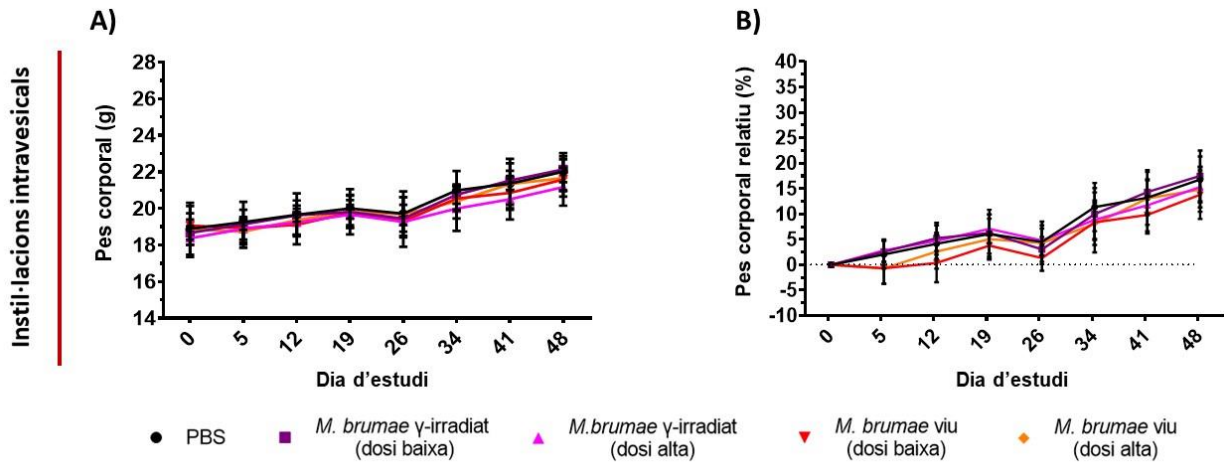
**Figura 22.** Corba de supervivència corresponent a l'administració intravesical.

PBS (negre), dosi petita (lila) o alta (rosa) del *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat i dosi petita (vermell) o alta (taronja) del *M. brumae* viu. (Prova Log-Rank Mantel-Cox) (N= 8 ratolins/grup).

### 4.2.2.2 Anàlisi de l'evolució del pes corporal dels ratolins BALB/c tractats amb diferents dosis de *M. brumae* viu i *M. brumae* $\gamma$ -irradiat

De la mateixa manera que es va procedir en l'experiment intravenós, tots els ratolins tractats amb repetides instil·lacions intravesicals van ser monitoritzats clínicament al llarg de l'estudi amb la finalitat de valorar l'estat de salut d'aquests durant els transcurso de l'estudi. Altra vegada, l'evolució del pes corporal dels ratolins va significar el paràmetre més rellevant alhora de decidir la necessitat de l'aplicació de criteris humanitaris de punt i final. Els resultats referents al pes corporal i al pes corporal relatiu es poden observar a la Figura 23. En referència als resultats obtinguts en aquest estudi, el registre de pesos va mostrar un increment dels pesos corporals al llarg de l'estudi que no va presentar diferències significatives entre els diferents grups experimentals (Figura 23A). De la mateixa manera, no es van observar diferències significatives en l'evolució del pes corporal relatiu dels ratolins mostrant variacions similars en l'increment dels pesos (Figura 23B).



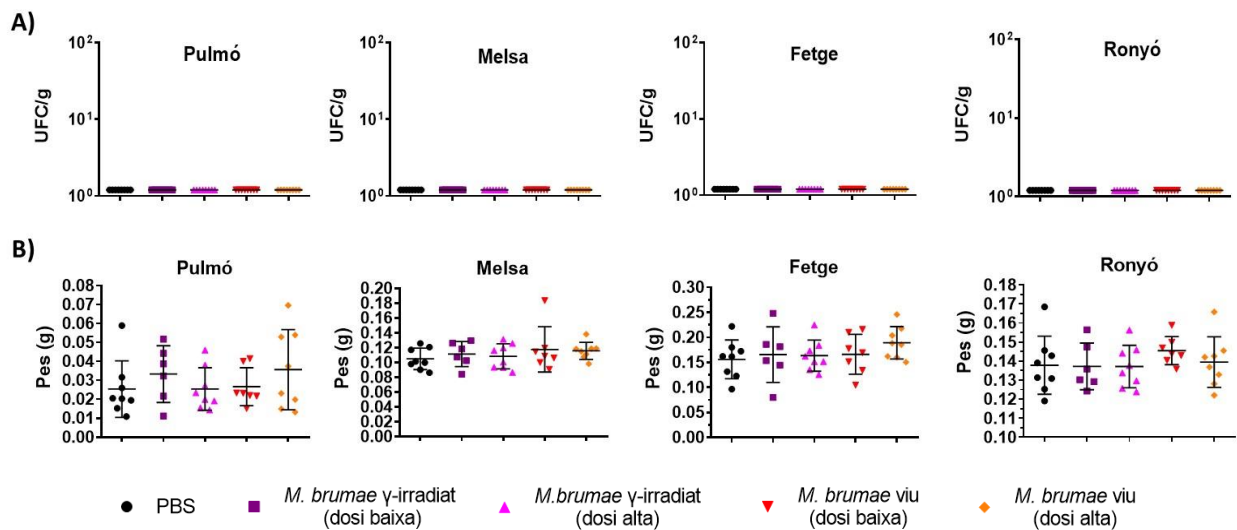


**Figura 23. Pes corporal i pes corporal relatiu en ratolins sotmesos a repetides instil·lacions intravesicals.**

Evolució del pes corporal (A) i percentatge de canvi del pes corporal (pes corporal relatiu) (B) dels diferents grups de ratolins tractats mitjançant instil·lacions intravesicals. PBS (negre), dosi petita (lila) o alta (rosa) del *M. brumae* γ-irradiat i dosi petita (vermell) o alta (taronja) del *M. brumae* viu. Les dades representen la mitjana ± SD (ProvaTwo-way ANOVA) (N=8 ratolins/grup).

#### 4.2.2.3 Recompte d'UFC del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG en pulmons, melses, fetges i ronyons, i el seu corresponent pes, de ratolins BALB/c

Altra vegada, es van sembrar les suspensions resultants de la homogeneïtzació del pulmó, la melsa, el fetge, i en aquest estudi concret, els ronyons de cadascun dels ratolins sotmesos a les instil·lacions intravesicals. Prèviament, s'havien registrat els pesos de cada un dels òrgans esmentats. En aquest cas, no es va detectar creixement del *M. brumae* viu i γ-irradiat en cap dels òrgans processats (Figura 24A). Respecte al pesatge dels pulmons, melses, fetges i ronyons tampoc es van observar diferències significatives entre els diferents registres de pes en els òrgans analitzats de cap dels grups experimentals (Figura 24B).



**Figura 24. Unitats formadores de colònies i pes d'òrgans en ratolins BALB/c.**

(A) Unitats formadores de colònies (UFC) obtingudes i (B) pesos de les melses, pulmons, fetges i ronyons de ratolins sotmesos a instil·lacions intravesicals. PBS (negre), dosi petita (lila) o alta (rosa) del *M. brumae* γ-irradiat i dosi petita (vermell) o alta (taronja) del *M. brumae* viu. Les dades representen la mitjana ± SD (Test One-way ANOVA). (N=8 ratolins/grup).

#### **4.2.2.4 Anàlisi de paràmetres bioquímics i hematològics en ratolins BALB/c tractats intravesicalment amb el *M. brumae***

En aquest apartat de l'estudi es va avaluar la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* en referència a la seva via d'administració en el context del tractament del càncer de bufeta no múscul invasiu. Tal i com s'ha comentat al llarg del capítol, es van administrar, per via intravesical, diferents dosis conegudes del *M. brumae*, viu o  $\gamma$ -irradiat, en ratolins immunocompetents de la soca BALB/c.

Referent als resultats observats en l'anàlisi hematològica, els recomptes de glòbuls blancs, de glòbuls vermells, l'hematocrit així com els recomptes totals de leucòcits (neutròfils, limfòcits, basòfils, eosinòfils i monòcits) es van mantenir molt similars, sense presentar diferències significatives, entre tots els ratolins que havien rebut, per via intravesical, el PBS i les diferents dosis del *M. brumae* viu i  $\gamma$ -irradiat **(Taula 13)**.

De la mateixa manera, els resultats obtinguts van mostrar que les instilacions intravesicals realitzades amb el *M. brumae* (viu i  $\gamma$ -irradiat) no havien comportat cap alteració, estadísticament significativa, en els diferents paràmetres bioquímics analitzats **(Taula 14)**.

Taula 13. Resultats dels paràmetres hematològics estudiats en els ratolins BALB/C tractats per via intravesical.

Tractament	PBS		<i>M. brumae</i> $\gamma$ -irradiat (dosi baixa)		<i>M. brumae</i> $\gamma$ -irradiat (dosi alta)		<i>M. brumae</i> viu (dosi baixa)		<i>M. brumae</i> viu (dosi alta)		Valor <i>p</i>
	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	
WBCB <sup>a</sup> (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	6.41 $\pm$ 1.58	(4.05 – 8.42)	6.59 $\pm$ 1.78	(4.78 – 9.28)	5.53 $\pm$ 1.35	(3.57 – 7.37)	4.4 $\pm$ 1.01 <sup>1</sup>	(2.7 – 5.28)	4.79 $\pm$ 1.51 <sup>2</sup>	(3.06 – 6.12)	ns
RCB <sup>b</sup> (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	9.34 $\pm$ 0.48	(8.6 – 9.87)	9.13 $\pm$ 0.41	(8.79 – 0.40)	9.62 $\pm$ 0.43	(9.02 - 10.15)	9.01 $\pm$ 0.34 <sup>1</sup>	(8.65 – 9.42)	9.12 $\pm$ 0.34 <sup>2</sup>	(8.68 – 9.42)	ns
Hematocrit (%)	41.07 $\pm$ 1.60	(39.4 – 43.3)	41.20 $\pm$ 2.33	(38.5 – 45.4)	42.3 $\pm$ 1.55	(40.9 – 44.4)	40.42 $\pm$ 1.82 <sup>1</sup>	(37.9 – 43)	40.17 $\pm$ 0.67 <sup>2</sup>	(39.3 – 40.9)	ns
Plaquetes (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	953 $\pm$ 103.48	(809 - 1076)	929 $\pm$ 150.04	(656 - 1073)	859.33 $\pm$ 253.51	(388 - 1155)	836 $\pm$ 265.49 <sup>1</sup>	(367 – 996)	854 $\pm$ 179.37 <sup>2</sup>	(595 – 989)	ns
Neutròfils totals (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	0.94 $\pm$ 0.38	(0.47 – 1.49)	0.98 $\pm$ 0.25	(0.7 – 1.39)	0.76 $\pm$ 0.29	(0.31 – 1.1)	0.53 $\pm$ 0.14 <sup>1</sup>	(0.39 – 0.68)	0.66 $\pm$ 0.256 <sup>2</sup>	(0.39 – 1.01)	ns
Limfòcits totals (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	4.97 $\pm$ 1.30	(3.05 – 6.27)	5.21 $\pm$ 1.40	(3.64 – 7.17)	4.35 $\pm$ 0.98	(2.8 – 5.07)	3.53 $\pm$ 0.93 <sup>1</sup>	(2.05 – 4.59)	3.56 $\pm$ 1.25 <sup>2</sup>	(2.47 – 4.83)	ns
Basòfils totals (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	0.01 $\pm$ 0.005	(0 – 0.01)	0.01 $\pm$ 0.005	(0.01 – 0.02)	0.008 $\pm$ 0.01	(0 – 0.03)	0.006 $\pm$ 0.06 <sup>1</sup>	(0 – 0.01)	0.005 $\pm$ 0.005 <sup>2</sup>	(0 – 0.01)	ns
Eosinòfils totals (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	0.17 $\pm$ 0.11	(0.07 – 0.37)	0.14 $\pm$ 0.04	(0.09 – 0.22)	0.15 $\pm$ 0.02	(0.12 - 18)	0.128 $\pm$ 0.02 <sup>1</sup>	(0.11 – 0.14)	0.325 $\pm$ 0.297 <sup>2</sup>	(0.11 – 0.76)	ns
Monòcits totals (x10 <sup>3</sup> cel/ $\mu$ L)	0.13 $\pm$ 0.09	(0.06 – 0.32)	0.11 $\pm$ 0.03	(0.06 – 0.13)	0.11 $\pm$ 0.04	(0.09 - 2)	0.054 $\pm$ 0.01 <sup>1</sup>	(0.09 – 0.2)	0.08 $\pm$ 0.04 <sup>2</sup>	(0.06 – 0.15)	ns

Abreviacions: <sup>a</sup>WBCB (Recompte de glòbuls blancs); <sup>b</sup>RCB (Recompte de glòbuls vermells); ns (No significatiu); i SD (Desviació estàndard). N=6 excepte en determinats paràmetres de grups experimentals que presentaven un volum insuficient de mostra: <sup>1</sup>N=5, <sup>2</sup>N=4. Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD i el rang de cada paràmetre en els diferents grups experimentals de ratolins. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova one-way ANOVA que comparava els grups experimentals *versus* amb el grup tractat amb PBS.

**Taula 14. Resultats dels paràmetres bioquímics estudiats en els ratolins BALB/C tractats per via intravesical.**

Tractament	PBS		<i>M. brumae</i> $\gamma$ -irradiat (dosi baixa)		<i>M. brumae</i> $\gamma$ -irradiat (dosi alta)		<i>M. brumae</i> viu (dosi baixa)		<i>M. brumae</i> viu (dosi alta)		valor <i>p</i>
	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	Mitjana $\pm$ SD	Rang	
ALT (U/L) <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 3.6 <sup>2</sup>	(9.3 – 19.49)	16.66 $\pm$ 5.1 <sup>3</sup>	(15.4 – 25.1)	13.08 $\pm$ 2.58 <sup>2</sup>	(10.04 – 16.5)	13.76 $\pm$ 6.43 <sup>5</sup>	(9 – 23.7)	14.87 $\pm$ 1.71 <sup>2</sup>	(10.04 – 16.5)	ns
AST (U/L) <sup>b</sup>	59.33 $\pm$ 18.33 <sup>2</sup>	(38 – 90)	75.6 $\pm$ 60.6 <sup>3</sup>	(42 – 183)	65 $\pm$ 16.7 <sup>2</sup>	(45 -94)	67.2 $\pm$ 26 <sup>3</sup>	(51 – 113)	82.71 $\pm$ 28.9 <sup>1</sup>	(45 - 94)	ns
Creatinina (mg/dL)	0.25 $\pm$ 0.03	(0.2 – 0.29)	0.28 $\pm$ 0.2 <sup>2</sup>	(0.26 – 0.30)	0.24 $\pm$ 0.06	(0.1 – 0.3)	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>1</sup>	(0.25 – 0.33)	0.26 $\pm$ 0.02	(0.1 – 0.3)	ns
Ferro ( $\mu$ g/dL)	145.9 $\pm$ 50.27 <sup>1</sup>	(67.3 – 207.1)	160.26 $\pm$ 61.1 <sup>3</sup>	(113.8 – 259.3)	133.06 $\pm$ 31.6 <sup>1</sup>	(70.9 – 159.7)	17.67 $\pm$ 21.17 <sup>1</sup>	(134.7 – 219.5)	165.07 $\pm$ 45.9 <sup>1</sup>	(70.9 – 159.7)	ns
Fosfatasa alcalina (mmol/L)	141.87 $\pm$ 12.71 <sup>1</sup>	(123.73 – 157.0)	138.02 $\pm$ 14.4 <sup>3</sup>	(112.8 – 148.65)	147.95 $\pm$ 11.4 <sup>2</sup>	(132.3 – 163.4)	146.74 $\pm$ 19.76 <sup>1</sup>	(133.8 – 174.33)	149.11 $\pm$ 15.95 <sup>1</sup>	(132.3 – 163.4)	ns
Glucosa (mg/mL)	247.75 $\pm$ 35.92	(207.7 – 297.6)	287.95 $\pm$ 60.0 <sup>2</sup>	(179.9 – 351.20)	256.63 $\pm$ 30.9 <sup>1</sup>	(224 – 294.2)	256.63 $\pm$ 30.93 <sup>1</sup>	(229.3 – 322.3)	257.23 $\pm$ 49.8 <sup>2</sup>	(224 – 294.2)	ns
Potassi (nmol/L)	4.76 $\pm$ 0.63	(3.95 – 6.01)	5.04 $\pm$ 0.92 <sup>2</sup>	(4.07 – 5.21)	4.9 $\pm$ 0.57 <sup>1</sup>	(4 – 5.74)	4.9 $\pm$ 0.57 <sup>1</sup>	(3.9 – 5.65)	4.69 $\pm$ 0.34 <sup>2</sup>	(4 – 5.74)	ns
Sodi (mmol/L)	145.58 $\pm$ 1.97	(142.8 – 149.3)	144.25 $\pm$ 1.58 <sup>2</sup>	(142.5 – 146.8)	144.66 $\pm$ 1.58 <sup>3</sup>	(143.5 – 148)	144.66 $\pm$ 1.58 <sup>1</sup>	(141.1 – 153.1)	146.9 $\pm$ 1.59 <sup>2</sup>	(143.5 – 148)	ns
Urea (mg/dL)	40.86 $\pm$ 5.94	(32.4 – 50.6)	39.63 $\pm$ 9.6 <sup>2</sup>	(30.1 – 54.8)	39.06 $\pm$ 7.36	(29.3 – 52.1)	39.06 $\pm$ 7.38 <sup>1</sup>	(28.2 – 60.9)	47.56 $\pm$ 9.59 <sup>1</sup>	(29.3 – 52.1)	ns
Albumina (g/dL)	2.59 $\pm$ 0.16 <sup>1</sup>	(2.3 – 2.75)	2.65 $\pm$ 0.04 <sup>3</sup>	(2.3- 2.75)	2.65 $\pm$ 0.04 <sup>3</sup>	(2.6 – 2.71)	2.65 $\pm$ 0.04 <sup>1</sup>	(2.33 – 2.61)	2.64 $\pm$ 0.06	(2.6 – 2.71)	ns
Proteïnes totals (g/dL)	4.54 $\pm$ 0.24 <sup>1</sup>	(4.15 – 4.89)	4.74 $\pm$ 0.34 <sup>3</sup>	(3.99 – 4.93)	4.74 $\pm$ 0.34 <sup>2</sup>	(4.44 – 5.4)	4.74 $\pm$ 0.34 <sup>1</sup>	(4.08 – 5.02)	4.6 $\pm$ 0.44	(4.44 – 5.4)	ns

Abreviacions: <sup>a</sup>ALT (Alanina transaminasa); <sup>b</sup>AST (Aspartat transaminasa); ns (No significatiu); i SD (Desviació estàndard). N=8 excepte en determinats paràmetres de grups experimentals que presentaven un volum insuficient de mostra: <sup>1</sup>N=7; <sup>2</sup>N=6; <sup>3</sup>N=5; <sup>4</sup>N=4; i <sup>5</sup>N=3. Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD i el rang de cada paràmetre en els diferents grups experimentals de ratolins. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA que comparava els grups experimentals *versus* amb el grup tractat amb PBS.

#### 4.2.2.5 Anàlisi histopatològica de les bufetes dels ratolins BALB/c sotmesos a instil·lacions intravesicals

Les bufetes urinàries dels ratolins sotmesos al tractament intravesical amb diferents dosis del *M. brumae* viu o  $\gamma$ -irradiat també van ser subjecte d'una anàlisi histològica. Es va utilitzar un sistema de puntuació (0-4) segons la presència o absència d'agregats cel·lulars en cadascuna de les bufetes urinàries analitzades. Curiosament, es van observar agregats cel·lulars a la làmina pròpia en algunes bufetes de cadascun dels grups experimentals. Al trobar-se en tots els grups, inclús en els ratolins tractats amb PBS, les troballes no es van atribuir a cap dels tractaments experimentals administrats. Tot i així, els resultats obtinguts en aquesta anàlisi no van mostrar diferències significatives entre cap dels grups experimentals. No obstant, les bufetes urinàries dels ratolins tractats amb la dosi alta del *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat van ser les que van mostrar un major grau d'inflamació en forma d'agregats cel·lulars que es localitzaven a la làmina pròpia. Contràriament, les bufetes dels ratolins tractats amb la dosi baixa del *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat van ésser les que van presentar un grau d'inflamació menor. Finalment, un únic ratolí tractat amb la dosi alta de *M. brumae* va presentar la puntuació màxima d'inflamació. En concret, aquest mostrà una cistitis crònica que arribà a afectar la capa muscular, fet que podria estar associat a una lesió traumàtica produïda a conseqüència de la repetició de les instil·lacions intravesicals i no específicament al tractament del *M. brumae* (Figura 25).

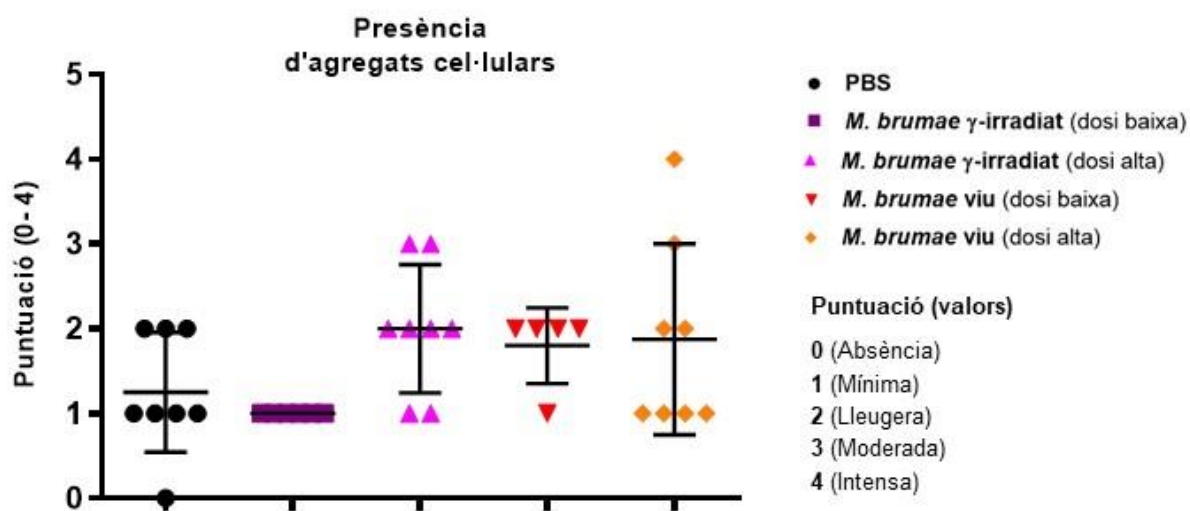


Figura 25. Anàlisi histopatològica de les bufetes urinàries dels ratolins BALB/c.

Presència d'agregats cel·lulars en l'anàlisi histopatològica de les bufetes urinàries després de les instil·lacions intravesicals. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD. Sense diferències significatives ( $p > 0.05$ ) (Prova Kruskal Wallis-H) (N=8 ratolins/grup).

### 4.2.3 INFECCIÓ INTRAHEMOCOÈLICA DE LARVES DE *G. mellonella*

#### 4.2.3.1 Anàlisi de la supervivència de larves de *G. mellonella* infectades amb diferents dosis de *M. brumae* i *M. bovis* BCG

L'últim model animal utilitzat en aquest estudi va contemplar la infecció de larves de *G. mellonella* a partir de diferents dosis del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG. Els experiments es van realitzar segons l'esquema mostrat a l'apartat 4.1.2 del material i mètodes (Figura 14).

Els resultats obtinguts en aquest estudi van mostrar que totes les larves infectades amb les diferents dosis del *M. brumae* van sobreviure fins al final de l'experiment (6 dies/144 hores). A diferència dels resultats observats en la infecció amb el *M. brumae*, la supervivència de les larves infectades amb una dosi d'  $1 \times 10^5$  UFC i d'  $1 \times 10^6$  UFC del *M. bovis* BCG es va mostrar significativament diferent respecte de les larves infectades amb PBS ( $p < 0.001$  i  $p < 0.0001$ , respectivament). Finalment, en el cas de les larves infectades amb la dosi més alta del *M. bovis* BCG ( $1 \times 10^6$  UFC), la taxa de supervivència de les larves de *G. mellonella* va disminuir, de manera dràstica, fins arribar a un 43% de larves vives al final de l'estudi (Figura 26).

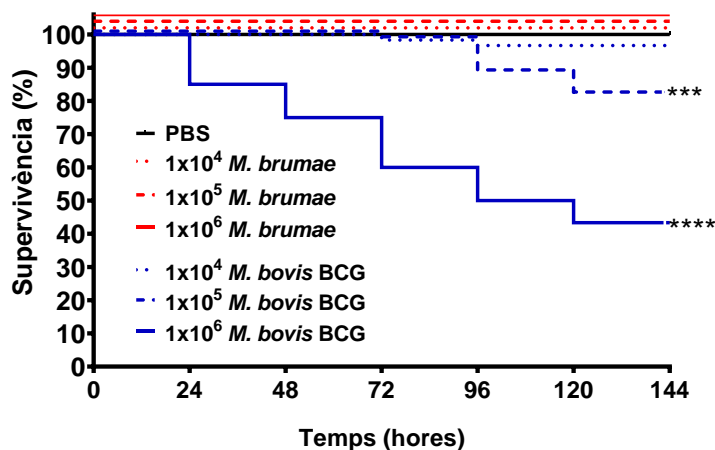


Figura 26. Corba de supervivència corresponent a la infecció de larves de *G. mellonella*.

Dosis:  $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$  ó  $1 \times 10^6$  UFC/larva del *M. brumae* i el *M. bovis* BCG. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (Prova Log-Rank Mantel-Cox)(N=60 larves/grup).

#### 4.2.3.2 Recompte d'UFC del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG en l'hemolimfa de larves de *G. mellonella*

L'estudi de seguretat del *M. brumae* en el model animal de larves de *G. mellonella* va finalitzar amb el cultiu microbiològic de l'hemolimfa de cadascuna de les larves infectades amb les diferents dosis del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG.

Els cultius microbiològics de l'hemolimfa procedents de les larves *G. mellonella* infectades amb diferents concentracions del *M. brumae* no van mostrar creixement d'UFC. No obstant, es va reportar un creixement d'entre  $1 \times 10^3$  i  $1 \times 10^4$  UFC/mL en els cultius microbiològics de l'hemolimfa de larves que havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) (Figura 27).

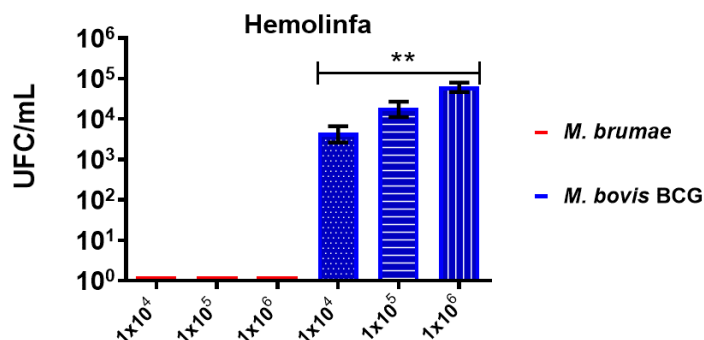


Figura 27. Creixement d'unitats formadores de colònies (UFC) en l'hemolimfa de larves de *G. mellonella*.

Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0.01$  (Test One-way ANOVA).

### 4.3 DISCUSSIÓ DE RESULTATS

En l'actualitat, la immunoteràpia intravesical mitjançant instil·lacions del *M. bovis* BCG segueix representant el tractament estàndard escollit per la pràctica clínica en el moment d'abordar pacients amb un diagnòstic de NMIBC d'alt risc i que, per tant, presenten un elevat risc de recurrència i progressió de la malaltia en qüestió [8,27]. No obstant això, tal com s'ha comentat en la introducció, existeix un nombre considerable de pacients amb NMIBC on la teràpia intravesical del *M. bovis* mostra un fracàs, a nivell de recurrència i progressió, fins i tot encara que el pacient sigui sotmès a una teràpia de manteniment amb aquest micobacteri [47,157]. D'altra banda, al tractar-se d'un patogen viu atenuat, existeix la possibilitat de patir efectes adversos negatius que poden arribar inclús a significar infeccions sistèmiques que comprometin la vida del pacient [158–160]. A més, l'elevat temps que comporta la seva producció, així com els problemes de subministrament global del *M. bovis* BCG representen alguns dels altres problemes responsables de generar un impacte negatiu en el sistema de salut, i per tant, en el tractament de pacients amb NMIBC [59,161,162]. Tanmateix, els tractaments alternatius actuals amb agents quimioterapèutics, tot i presentar una major tolerabilitat, tenen un cost molt elevat i no han mostrat una major eficàcia que el *M. bovis* BCG. Per tant, la relació efectivitat/cost d'aquests fàrmacs resulta inferior a la presentada pel *M. bovis* BCG [163,164]. Per tots aquests motius exposats, la comunitat científica continua centrant molts esforços en desenvolupar teràpies alternatives segures que siguin eficaces en el tractament del càncer de bufeta [165,166].

En referència a l'ús de micobacteris per al tractament del càncer de bufeta, cal remuntar-se a l'any 1976 quan Morales *et al* van observar una reducció en la recurrència dels tumors de bufeta presents en pacients que havien estat tractats mitjançant instil·lacions intravesicals del *M. bovis* BCG [34]. Des d'aleshores, tal com s'ha comentat en la introducció, algunes espècies de micobacteris han estat sotmeses a estudi per a l'avaluació del seu potencial antitumoral. Un exemple clar n'és el *M. brumae*, un micobacteri ambiental capaç d'estimular una resposta immunitària antitumoral similar a la del *M. bovis* BCG i del qual no s'ha reportat, a dia d'avui, cap infecció en plantes, animals i humans [73,153,167]. Tot i així, la seva seguretat i toxicitat no ha estat encara estudiades.

En la present tesi doctoral ens hem proposat avaluar la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* per a la seva utilització com un agent biològic immunomodulador de la resposta immunitària antitumoral.

Segons els resultats obtinguts en aquest treball, el *M. brumae* ha mostrat ser un agent biològic segur i no tòxic en la seva administració en organismes vius complexos com ara larves de *G. mellonella* i ratolins immunocompetents (BALB/c) o bé immunodeficients (SCID). De fet, tots els animals infectats intravenosament (ratolins SCID), per via intrahemocoèlica (larves de *G. mellonella*) i els animals sotmesos a diverses instil·lacions intravesicals, amb dosis de fins a  $2 \times 10^9$  UFC per instil·lació del *M. brumae* viu, van sobreviure fins al final de cadascun dels estudis realitzats. Tanmateix, tal com s'ha comentat, a dia d'avui no existeix cap estudi on s'hagi avaluat la seguretat i toxicitat del *M. brumae*. Per aquest motiu, els resultats obtinguts van haver de ser comparats amb animals (ratolins i larves) infectats amb el *M. bovis* BCG. A més, l'estudi intravenós i intravesical també va incloure el *M. brumae*  $\gamma$ -irradiat ja que prèviament havia mostrat certa eficàcia en el model ortotòpic murí de càncer de bufeta respecte els ratolins amb tumor que no havien rebut cap tractament [153]. Per consegüent, en el suposat cas de

## CAPÍTOL I. Discussió de Resultats

que el *M. brumae* viu hagués mostrat indicis de patogenicitat disposàvem d'una variant atenuada d'aquest.

En referència a la supervivència observada en els ratolins SCID infectats amb el *M. bovis* BCG, els resultats obtinguts en el present estudi van resultar molt similars a les corbes de supervivència mostrades en l'estudi de Zhang *et al.* [168]. En aquest estudi, Zhang i els seu col·laboradors van infectar ratolins SCID amb diferents soques del *M. bovis* BCG, entre elles la soca BCG-Frappier, genèticament molt propera a la soca Connaught del *M. bovis* utilitzada en el nostre estudi [169]. Els resultats van mostrar una mitjana de supervivència de 48 dies i, per tant, en sintonia a la supervivència observada en el nostre estudi de seguretat i toxicitat, on vam haver d'eutanasiar els ratolins entre els dies 48 i 55 després d'haver rebut la injecció. Respecte els ratolins infectats amb el *M. brumae* (viu i  $\gamma$ -irradiat), tots els ratolins havien sobreviscut al finalitzar l'estudi (**Figura 17**).

La davallada funcional dels ratolins infectats amb *M. bovis* BCG es va presentar per mitjà d'una pèrdua de pes corporal acompanyada de l'aparició de múltiples manifestacions clíniques i patològiques compatibles amb una infecció severa multi-orgànica. Aquestes, van confirmar-se a partir de les diferents troballes histopatològiques, juntament amb les alteracions de la majoria de paràmetres hematològics i bioquímics. Concretament, la infecció sistèmica pel *M. bovis* BCG va provocar, entre d'altres, la formació de granulomes hepàtics compostos principalment per cèl·lules de Kupffer i monòcits sanguinis i també, un augment de la producció d'AST i ALT en plasma, ambdós indicadors enzimàtics de lesió hepàtica. D'acord amb el coneixement actual, les cèl·lules de Kupffer són responsables de fagocitar els micobacteris, limitant-ne així la seva disseminació [170] i d'augmentar la producció d'AST i ALT [171,172]. A més, l'anàlisi histopatològica de pulmons i melses de ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG va mostrar, també, la presència de granulomes (**Figura 20**). Aquestes troballes coincideixen amb les observades en un altre estudi que va utilitzar la mateixa soca de *M. bovis* BCG (Connaught), mostrant la presència de granulomes en els òrgans esmentats de ratolins SCID [173]. D'altres estudis van infectar, per via intravenosa, ratolins SCID amb la soca Pasteur del *M. bovis* BCG, i van permetre observar granulomes en els fetges i melses dels ratolins però no en els pulmons d'aquests, atribuint aquest fet a la deficiència de la immunitat mitjançada per un dèficit de cèl·lules CD4+ característic d'aquesta soca de ratolins immunodeficients [174]. Tot i així, els resultats obtinguts en l'anàlisi histopatològica del nostre estudi van coincidir amb els resultats observats en els diferents cultius microbiològics de pulmons, melses i fetges d'aquests ratolins. En aquest cas, tots els òrgans processats de ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG van mostrar creixement d'aquest. Al contrari que la infecció pel *M. bovis* BCG, cap dels òrgans processats i cultivats va mostrar creixement d'UFC del *M. brumae* (**Figura 19A**). Això significa que l'organisme és capaç d'eliminar el *M. brumae* injectat, inclús si aquest es troba en situació d'immunodepressió com en el cas del model animal utilitzat en el nostre estudi.

Tal com s'ha esmentat anteriorment, els resultats de les anàlisis hematològica i bioquímica concordaven amb una infecció sistèmica clàssica produïda pel *M. tuberculosis* [175]. A més de l'alteració dels enzims hepàtics AST i ALT, mencionats anteriorment, els ratolins infectats amb els *M. bovis* BCG van mostrar un augment dels nivells de potassi i sodi en comparació als valors observats en ratolins infectats amb el *M. brumae* (viu i  $\gamma$ -irradiat) i als que havien estat inoculats amb PBS. Les troballes patològiques observades als ronyons i a les glàndules adrenals, responsables de regular l'excreció del potassi, podrien explicar



l'increment del potassi en la sang del ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG [176,177] Igualment, es va reportar una elevació de la urea que, conjuntament a una disminució de la creatinina i a la presència de lesions renals podrien haver comportat una fallada renal dels ratolins. En referència als nivells de glucosa i ferro en sang, aquests van mostrar-se baixos en tots els ratolins infectats amb el *M. bovis* BCG. De fet, les infeccions per micobacteris es caracteritzen per mostrar nivells baixos de ferro degut a les diferents estratègies que utilitza el micobacteri per a eliminar el ferro de l'hoste (**Taula 12**) [178,179]. En el mateix sentit, els paràmetres de l'anàlisi hematològica van indicar una resposta inflamatòria deguda a la infecció pel *M. bovis* BCG. Concretament, es va observar un augment dels recomptes de glòbuls blancs (WBC) i del glòbuls vermells (RBC) que no es va observar en el cas dels ratolins inoculats amb el *M. brumae* viu o  $\gamma$ -irradiat (**Taula 11**). El recompte de neutròfils va suggerir una neutrofilia típica d'etapes avançades d'una infecció tuberculosa. Aquesta neutrofilia, tal com s'ha especulat en *M. tuberculosis*, podria actuar com a Cavall de Troia, allotjant els bacils i promovent la divisió d'aquests micobacteris a l'interior dels neutròfils de l'hoste [180].

El tractament estàndard del NMIBC, tal com s'ha comentat a la introducció, s'inicia amb la realització d'una RTU del tumor, seguida d'una administració intravesical setmanal, durant 6 setmanes, d'una dosi de  $2 \cdot 8 \times 10^8$  UFC del *M. bovis* BCG viu [181]. Aquest procediment permet el lliurament de fàrmacs a l'uroteli, reduint així l'aparició d'efectes adversos en comparació a l'administració de fàrmacs per via oral o parenteral [182]. En el cas del *M. bovis* BCG, una vegada introduït a la bufeta urinària, el temps en qual roman a l'interior d'aquesta és d'entre 1-2 hores. Així doncs, resulta molt important que aquest procediment sigui dut a terme per personal degudament entrenat. De fet, una instil·lació traumàtica podria comportar una absorció sistèmica del *M. bovis* BCG i, per tant, complicacions de gravetat [183]. Dit això, la utilització d'un agent biològic segur incrementaria encara més els avantatges presentats per les instil·lacions intravesicals, disminuint de manera dràstica el risc de contraure una d'infecció sistèmica.

Relacionat amb les complicacions que pot comportar l'administració del *M. bovis* BCG per mitjà d'instil·lacions intravesicals, es va procedir a realitzar l'estudi de la seguretat i la toxicitat del *M. brumae* viu i  $\gamma$ -irradiat amb diferents dosis mitjançant l'ús d'aquesta via d'administració. Els resultats obtinguts no van mostrar cap diferència significativa en l'anàlisi dels paràmetres hematològics i bioquímics, ni tampoc en l'anàlisi histopatològica de la bufetes urinàries entre els diferents grups de ratolins BALB/c. Aquests resultats coincideixen amb els estudis anteriors, realitzats per el nostre grup, en un model murí ortotòpic de càncer de bufeta en el qual no es van observar la infiltració granulomatosa, típica de les infeccions per micobacteris patògens [74][184]. No obstant, en aquest estudi de seguretat i toxicitat, els ratolins avaluats no presentaven tumors i, a més, la presència de granulomes s'avaluava al finalitzar l'estudi i, en concret, dues setmanes després d'haver rebut la última dosi del *M. brumae* viu i  $\gamma$ -irradiat. Per tant, les troballes observades en aquest estudi no permeten descartar la possibilitat de que, de manera transitòria, s'hagués produït una infiltració de granulomes en les bufetes dels ratolins avaluats. A més, la supervivència dels ratolins va ser del 100% (**Figura 22**). Per tant, l'absència de simptomatologia clínica, de pèrdua de pes corporal, així com de bacils en els diferents òrgans processats (pulmons, fetges, melses i ronyons) dels ratolins sotmesos a les instil·lacions intravesicals corroboren la seguretat i la no toxicitat del *M. brumae* en el context d'aquesta via d'administració (**Figura 23 i 24**).

## CAPÍTOL I. Discussió de Resultats

Finalment, la seguretat del *M. brumae* també va ser comprovada mitjançant el model animal de larves de *G. mellonella*. Aquest, és un model animal àmpliament utilitzat en estudis de dosificació, toxicitat i d'eficàcia de diferents fàrmacs. Els avantatges que presenta aquest model animal són nombrosos. Així doncs, les larves de *G. mellonella* presenten un cost d'adquisició i manteniment baix, resulten fàcilment manipulables i es troben lliures de les restriccions legals i ètiques que implica l'experimentació animal amb vertebrats [185]. A més, nombrosos estudis confirmen que els determinants de la patogenicitat i la virulència microbiana són els mateixos en humans, ratolins i larves de *G. mellonella* [186]. A més d'això, el sistema immunitari dels insectes és estructuralment i funcionalment similar al sistema immunitari innat dels mamífers [187,188]. Concretament, s'ha observat que els hemòcits dels insectes, com ara *G. mellonella*, reconeixen i fagociten els patògens d'una manera similar als neutròfils dels vertebrats [189]. Amb tot això, estudis recents han demostrat la validesa d'aquest model animal en l'estudi d'infeccions produïdes per micobacteris així com, en l'avaluació de la seguretat de fàrmacs antimicobacterians [190–192]. En el nostre cas, els resultats observats en larves infectades amb el *M. brumae* van mostrar l'absència d' UFC d'aquest micobacteri quan es van realitzar cultius microbiològics de l'hemolimfa d'aquestes larves (**Figura 27**) demostrant així que el *M. brumae* és eliminat de l'organisme dins de les 144 hores posteriors a la infecció. A més, totes les larves infectades amb el *M. brumae* van sobreviure al final de l'experiment. Al contrari, les larves infectades amb el *M. bovis* BCG van mostrar taxes de supervivència inferiors i, a més, la presència d'aquest en l'hemolimfa. Aquests resultats, obtinguts en larves infectades amb el *M. bovis* BCG, s'assimilen als resultats mostrats en l'estudi dut a terme per Asai *et al* [192]. En concret, l'estudi d'Asai i els seus col·laboradors es va centrar en l'anàlisi proteòmic i molecular de la resposta immunitària innata en el context de la infecció de larves de *G. mellonella* amb una soca del *M. bovis* BCG luminescent. Tot i que en aquest estudi no es van injectar la mateixes dosis que les utilitzades en el nostre estudi, la supervivència de les larves infectades amb una dosi de  $1 \times 10^7$  UFC/larva va caure fins al 15% una vegada finalitzat l'estudi (168h). Addicionalment, es va estudiar la supervivència del *M. bovis* BCG en aquestes larves. De la mateixa manera que van mostrar els nostres resultats, el *M. bovis* BCG va aconseguir sobreviure a l'interior de les larves. Així doncs, els resultats obtinguts en el nostre estudi reforcen la hipòtesi de seguretat del *M. brumae* a més de demostrar la idoneïtat d'aquest model animal per a l'estudi de la patogenicitat dels micobacteris.

## **5.CAPÍTOL II**

**ESTUDI DE LA MIGRACIÓ, LA  
INVASIVITAT, LA CAPACITAT  
D'ANCORATGE INDEPENDENT I LA  
PRODUCCIÓ DE  
METAL·LOPROTEÏNASES EN LÍNIES  
TUMORALS INFECTADES AMB  
MICOBACTERIS**

---



## 5. CAPÍTOL II. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ, LA INVASIVITAT, LA CAPACITAT D'ANCORATGE INDEPENDENT I LA PRODUCCIÓ METAL·LOPROTEÏNASES EN LÍNIES TUMORALS INFECTADES AMB MICOBACTERIS

En aquest estudi es va avaluar la capacitat dels micobacteris d'interferir en diferents fenòmens biològics relacionats amb processos de carcinogènesi com ara la migració i la invasivitat de les cèl·lules tumorals de bufeta, així com la seva capacitat de creixement independent a l'ancoratge a una superfície. Per a dur a terme estudi es van infectar diferents línies cel·lulars de càncer de bufeta amb concentracions conegudes del *M. bovis* BCG i el *M. brumae*.

### 5.1 MATERIALS I MÈTODES

#### 5.1.1 AVALUACIÓ DE LA MIGRACIÓ COL·LECTIVA MITJANÇANT L'ASSAIG DEL TANCAMENT DE LA FERIDA

Es va partir de cultius cel·lulars de T24, 5637 i SW780 en medi de cultiu DMEM-F12 suplementat amb un 10% de FBS i antibiòtics (medi complet). Seguint les instruccions detallades a l'apartat 3.4 del material i mètodes del capítol 0, les cèl·lules van ésser transferides en plaques de cultiu cel·lular de 24 pous (Nunclon, Dinamarca) a una concentració final de  $2 \times 10^5$  cèl·lules/pou, en el cas de la T24 i la 5637, i de  $3 \times 10^5$  cèl·lules/pou en el cas concret de la línia SW780. Aleshores, les cèl·lules es van incubar 24 hores addicionals amb la finalitat d'obtenir una monocapa cel·lular confluent. Transcorregut aquest període, es van infectar amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG, a una MOI de 10:1, algunes de les cèl·lules tumorals segons el procediment descrit en l'apartat 3.4. La resta van mantenir-se en medi complet. Passades les 3 hores d'infecció, abans de procedir amb els rentats i es va crear una ferida artificial per mitjà d'una punta de pipeta de 10  $\mu$ L [193]. Es van realitzar 5 rentats amb PBS i es va afegir medi de cultiu sense FBS, en el cas de les línies T24 i 5637, i medi de cultiu suplementat amb 1% de FBS quan es tractava de la línia SW780. Les plaques es van mantenir a una temperatura de 37°C amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Es va monitoritzar el tancament de la ferida a diferents temps (0, 12 i 24h), a través de captures fotogràfiques mitjançant el microscopi Axio Observer A1 (Zeiss, Alemanya). El percentatge de l'àrea de tancament de la ferida respecte l'àrea inicial d'aquesta es va calcular per mitjà de l'ús del programari lliure ImageJ ver.2.0.0 i el complement MRI Wound healing Tool macro ([http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound\\_Healing\\_Tool](http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool)) (Figura 28).

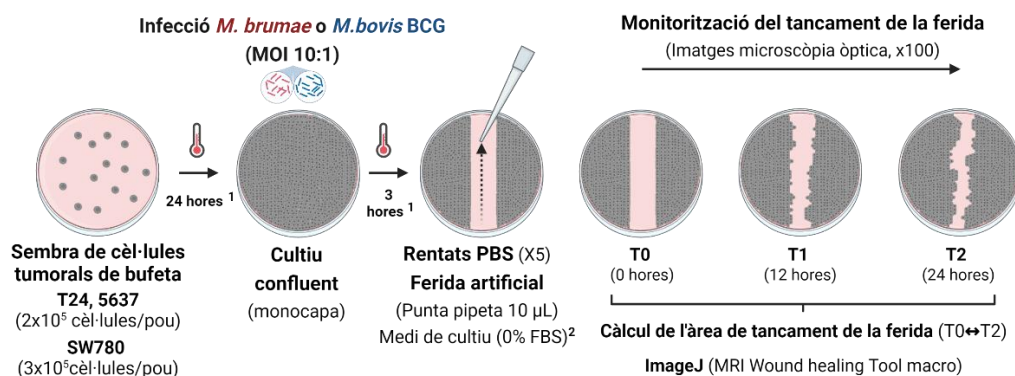


Figura 28. Esquema de l'assaig d'avaluació de la migració cel·lular col·lectiva

<sup>1</sup>Temperatura de 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. <sup>2</sup> 0% FBS en les línies T24 i 5637, 1% de FBS en el cas de la línia SW780. Abreviacions: MOI, Multiplicitat d'infecció; PBS, tampó fosfat salí; FBS, sèrum boví fetal.

### 5.1.2 AVALUACIÓ DE LA MIGRACIÓ I LA INVASIVITAT CEL·LULAR INDIVIDUAL

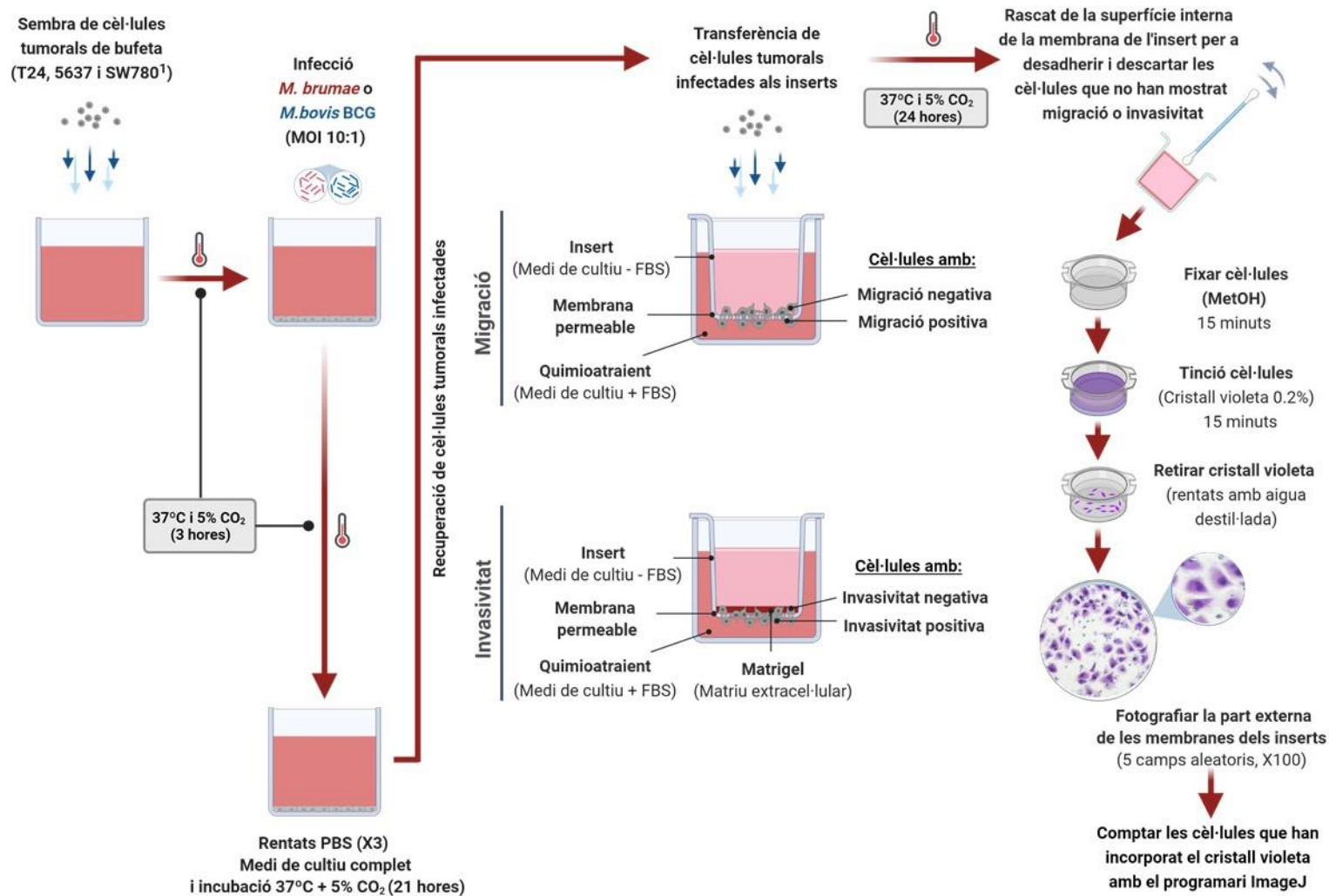
Existeixen diverses tècniques *in vitro* que permeten l'estudi de la migració i la invasivitat cel·lular. En aquest estudi, s'ha aconseguit mimetitzar ambdós fenòmens biològics per mitjà de l'ús d'inserts en plaques de cultius, també anomenats cambres de Boyden o *transwells*. Aquests inserts permeten la generació de dos microambients gràcies a la presència d'una membrana porosa semipermeable (8 µm/porus de diàmetre) situada a la part inferior de cada insert, que actua com a superfície d'adhesió i, de manera simultània, de barrera física permetent el pas de les cèl·lules tumorals mitjançant els múltiples porus que presenta. Addicionalment, s'incorpora un quimioatràient a l'interior de cada pou, en aquest cas medi de cultiu amb sèrum, que permet estimular el desplaçament de les cèl·lules i per tant, emular el fenomen de la migració cel·lular. En referència a l'estudi de la invasivitat cel·lular, la diferència respecte l'assaig de migració cel·lular, consisteix en simular l'estructura de la matriu extracel·lular mitjançant l'addició d'una preparació de membrana solubilitzada, anomenada Matrigel®, per damunt de la membrana de cada insert [194].

Respecte aquest estudi, es van avaluar els fenòmens de migració i invasivitat cel·lular en diferents línies cel·lulars de càncer de bufeta (T24, 5637 i SW780) sense tractar o bé que havien estat sotmeses, prèviament, a una infecció pel *M. brumae* o el *M. bovis* BCG (MOI 10:1) (procediment detallat a l'**apartat 3.4**). Concretament, el fenomen de la migració cel·lular va ser estudiat en les línies tumorals T24, 5637 i SW780 i la invasivitat en les línies T24 i 5637. Una vegada realitzat el tractament o infecció, les cèl·lules van ser transferides als diferents inserts (Falcon, Estats Units), en medi de cultiu sense FBS, i aquests col·locats en la corresponent placa de cultiu cel·lular (24 pous, Falcon, Estats Units), amb medi de cultiu complet, en els volums i concentracions detallats a la **Taula 15**. En el cas de l'avaluació de la invasivitat cel·lular, les membranes de cadascun dels inserts van ser prèviament recobertes per una capa de 40 µL de Matrigel® (3 mg/mL, Corning, Estats Units). Després d'un període d'incubació de 24 hores, es va procedir a descartar, mitjançant un rascat amb un escovilló, les cèl·lules que havien quedat adherides a la superfície interna de la membrana de cada insert i que per tant no havien migrat o envaït. A continuació, amb la finalitat de comptabilitzar la migració i la invasivitat cel·lular, es va procedir a la fixació, durant 15 minuts, utilitzant una solució de metanol (MetOH) i a la tinció, 15 minuts amb cristall violeta al 0.2%, de les cèl·lules que havien traspasat l'insert, i que per tant es trobaven adherides a la part externa de la membrana porosa d'aquest. Una vegada tenyits, es va realitzar fotografies aleatòries de 5 camps diferents cada insert, mitjançant microscòpia òptica (Nikon Eclipse TE-2000E), i a continuació es comptaven les cèl·lules presents mitjançant el programari lliure ImageJ ver.2.0.0. (**Figura 29**).

**Taula 15. Condicions experimentals dels assaigs de migració i invasivitat cel·lular**

Línia cel·lular	Tipologia assaig	Concentració cel·lular (Cèl·lules/insert)	Tractament MOI	Medi de cultiu (200 µL/insert)	Quimioatràient (800µL/insert)
T24	Migració	1.5x10 <sup>4</sup>	<i>M. bovis</i> BCG o bé <i>M. brumae</i> (MOI 10:1)	DMEM F12 sense FBS i antibiòtics	DMEM F12 amb FBS i antibiòtics
	Invasivitat	3x10 <sup>4</sup>			
5637	Migració	1.5x10 <sup>4</sup>	<i>M. bovis</i> BCG o bé <i>M. brumae</i> (MOI 10:1)	DMEM F12 sense FBS i antibiòtics	DMEM F12 amb FBS i antibiòtics
	Invasivitat	3x10 <sup>4</sup>			
SW780	Migració (-)	3x10 <sup>4</sup> (-)			

Abreviacions: FBS, sèrum boví fetal; MOI, multiplicitat d'infecció; (-) Experiment no realitzat.



**Figura 29. Esquema general dels assaigs de migració i invasiu cel·lular.**

Abreviacions: Ab, antibiòtics; FBS, sèrum boví fetal; MetOH, metanol; MOI, Multiplicitat d'infecció; PBS, Tampó fosfat salí. <sup>1</sup>SW780, en aquesta línia cel·lular només es va analitzar la migració cel·lular.

### 5.1.3 AVALUACIÓ DEL CREIXEMENT INDEPENDENT A L'ANCORATGE

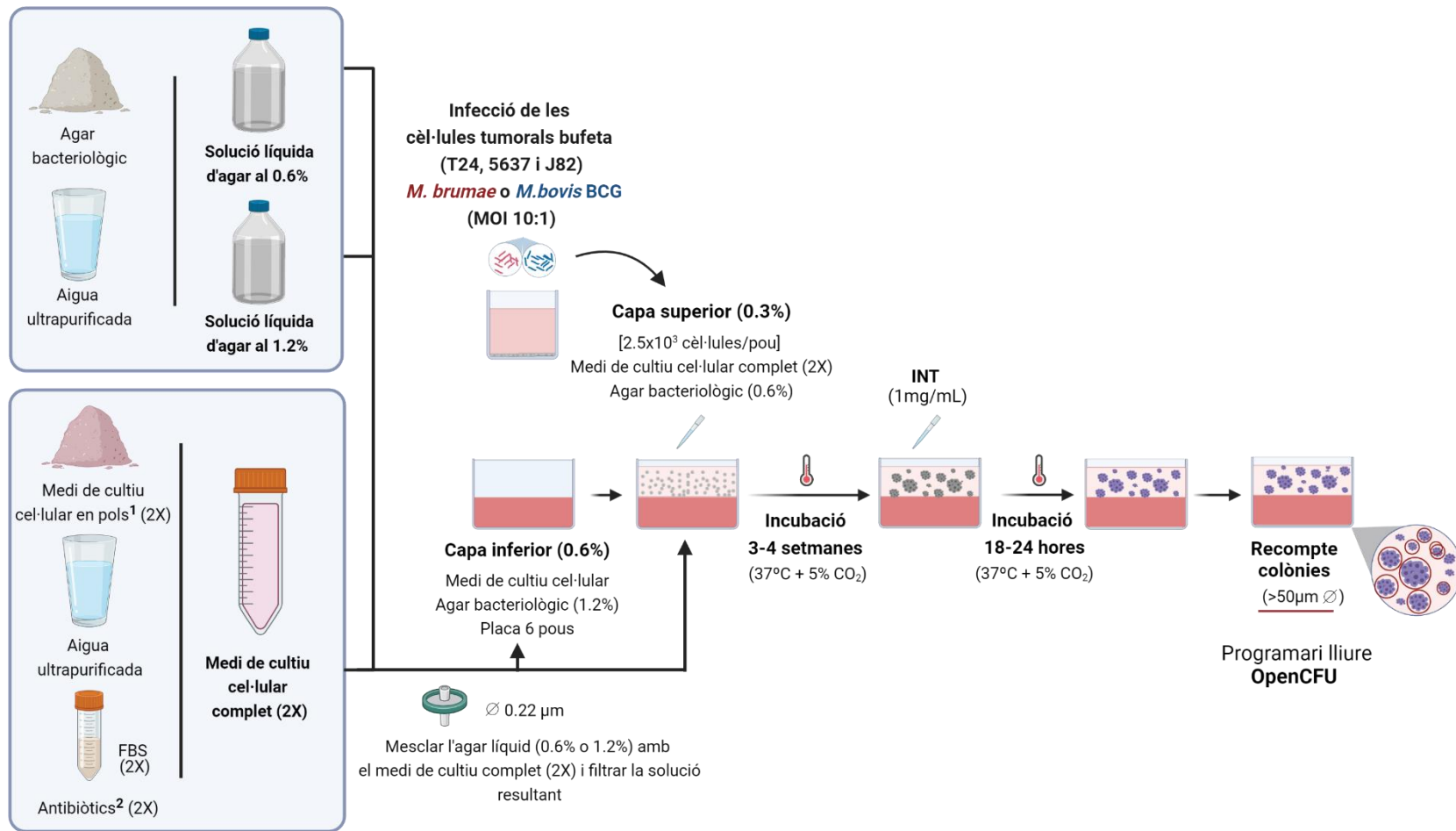
L'estudi del creixement independent a l'ancoratge es va realitzar per mitjà de la tècnica coneguda com a *Soft Agar Colony Formation Assay*. La metodologia utilitzada en aquest estudi es va recolzar, adaptant-se al nostre escenari, en el protocol descrit per Borowitz *et al* (2014) [195].

Així doncs, aquest estudi es va dur a terme utilitzant diferents línies cel·lulars humanes de càncer de bufeta (T24, J82) i una línia cel·lular murina tumoral de bufeta, concretament la MB49. El següent procediment queda resumit en la **Figura 30**. En primer lloc, les diferents línies cel·lulars van ésser infectades amb el *M. brumae* o el *M. bovis* BCG a una MOI de 10:1, seguint el procediment explicat en l'**apartat 3.4** del material i mètodes del capítol 0. Com a controls de l'experiment, es van utilitzar cèl·lules tumorals sense infectar o tractar.

En paral·lel, es va procedir a la preparació de la capa inferior de l'agar tou. Aquesta, consistia en una barreja de medi de cultiu complet doblement concentrat (2X), prèviament preparat utilitzant aigua ultrapurificada, medi de cultiu cel·lular en pols (DMEM o DMEM F12 segons la línia cel·lular (Gibco, Estats Units)), FBS, antibiòtics (penicil·lina i estreptomina) i agar bacteriològic (Scharlab, Espanya), dissolt prèviament en aigua ultrapurificada, a una concentració de l'1.2%. D'aquesta manera, al barrejar volums idèntics de medi de cultiu complet 2X i agar bacteriològic al 1.2% s'obtenia una solució líquida de medi de cultiu 1X i agar al 0.6%. Seguidament, es filtrava la solució, utilitzant una xeringa i un filtre de 0.22 µm, per dispensar-la en plaques de cultiu cel·lular de 6 pous (Nunc, Dinamarca) a raó d'1.5 mL/pou. En aquell moment, es deixaven les plaques a temperatura ambient amb la finalitat de que la solució líquida dispensada esdevingués en agar tou.

Aleshores, a partir d'un procés de tripsinització, es recuperaven les cèl·lules prèviament infectades o no i es procedia a preparar una suspensió, d'un volum final d'1.5 mL, de cèl·lules amb medi de cultiu cel·lular i agar bacteriològic al 0.3% a una concentració final de  $2.5 \times 10^3$  cèl·lules/pou. En aquest cas les cèl·lules es barrejaven en una solució, prèviament filtrada, de medi de cultiu complet 2X i agar bacteriològic al 0.6%. Immediatament, es sembrava aquesta suspensió de cèl·lules per damunt de la capa inferior d'agar tou preparada anteriorment, generant així, la capa superior de l'agar tou. A continuació, les cèl·lules s'incubaven durant 3 setmanes (a 37°C i un 5% de CO<sub>2</sub>), en el cas de les línies T24, 5637 i MB49, o 4 setmanes quan es tractava de la línia J82. Transcorregut el període d'incubació, es procedia a la tinció de les colònies resultants per mitjà de l'addició d'1 mL d'una solució d'1mg/mL, en aigua destil·lada, de 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT, igma-Aldrich, Estats Units) durant un període de 18 a 24 hores d'incubació addicionals. Finalment, les diferents plaques de cultiu eren escanejades amb l'aparell Canoscan Lide 400 (Canon, Japó). Aleshores, les imatges obtingudes de cadascun dels pous utilitzats eren analitzades a través del programari lliure OpenCFU ver.3.9. limitant el recompte únicament a les colònies que presentaven un diàmetre >50µm.





**Figura 30. Esquema de l'assaig d'avaluació del creixement independent a l'ancoratge.**

Abreviacions: FBS, sèrum boví fetal; INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride); MOI, Multiplicitat d'infecció. <sup>1</sup>Segons línia cel·lular: T24 i 5637, DMEM-F12; MB49, DMEM; <sup>2</sup>Penicil·lina i estreptomicina.

### 5.1.4 AVALUACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE METAL-LOPROTEÏNASES ACTIVES

L'activitat de les metal-loproteïnases (MMPs) secretades per les cèl·lules tumorals de bufeta, altrament coneguda com a activitat gelatinasa, va ser avaluada per mitjà de la tècnica estàndard de la zimografia o zimograma. En aquest cas, l'estudi es va realitzar en les línies cel·lulars de càncer de bufeta T24 i 5637 que van ésser infectades, o no, amb el *M. brumae* o el *M. bovis* BCG a una MOI de 10:1 seguint els procediments detallats en l'**apartat 3.4** del materials i mètodes del capítol 0. Com a controls positius de la secreció de MMPs actives, algunes cèl·lules van ser prèviament tractades amb una solució de PMA (100 ng/mL) [196]. Totes les cèl·lules de càncer de bufeta van ser cultivades en medi de cultiu sense FBS durant 72 hores. Transcorregut aquest període de temps s'obtenia el medi de cultiu condicionat (MC). Aleshores, els MC generats es transferien en tubs de micro-centrifuga. Seguidament, aquests es sotmetien a un procés de centrifugació (14.000 x g, 20 minuts), amb l'objectiu de remoure les restes cel·lulars. Finalment els diferents MC obtinguts eren emmagatzemats a una temperatura de -80°C fins a la seva anàlisi mitjançant una zimografia [197].

Per a dur a terme el zimograma, es van carregaven 40 µL de cadascuna de les mostres de MC obtingudes segons el procediment descrit anteriorment en gels SDS-PAGE, amb un 7.5% d'acrilamida i un 0.1% de gelatina (BioRad, Estats Units), preparats prèviament segons les instruccions del fabricant. Aleshores, els gels es van incubar durant tota una nit amb una solució tampó renaturalitzant (1X) (BioRad) amb l'objectiu d'afavorir l'activitat proteolítica de les MMPs. Addicionalment, amb la finalitat augmentar la sensibilitat de la tècnica, els gels s'incubaven, utilitzant la mateixa solució tampó, durant una altra nit. Transcorregut aquest període d'incubació, es va realitzar la tinció dels gels, durant 1 hora, utilitzant una solució al 0.1% de Commassie brilliant blue R-250 (BioRad). Seguidament, es va procedir a destenyir els gels mitjançant l'exposició a una solució de metanol (MetOH) i, àcid acètic pur i aigua destil·lada (4:1:5, respectivament) fins que s'observaven bandes clares, resultants de l'activitat gelatinasa o proteasa de les MMPs, sobre el fons blau fosc característic dels gels tenyits prèviament. Aleshores, es procedia a la captura d'imatges mitjançant l'equip ChemiDoc™ XRS+ (BioRad, Estats Units). La intensitat resultant de cadascuna de les bandes s'analitzava mitjançant el programa ImageJ ver.2.0.0. [198].

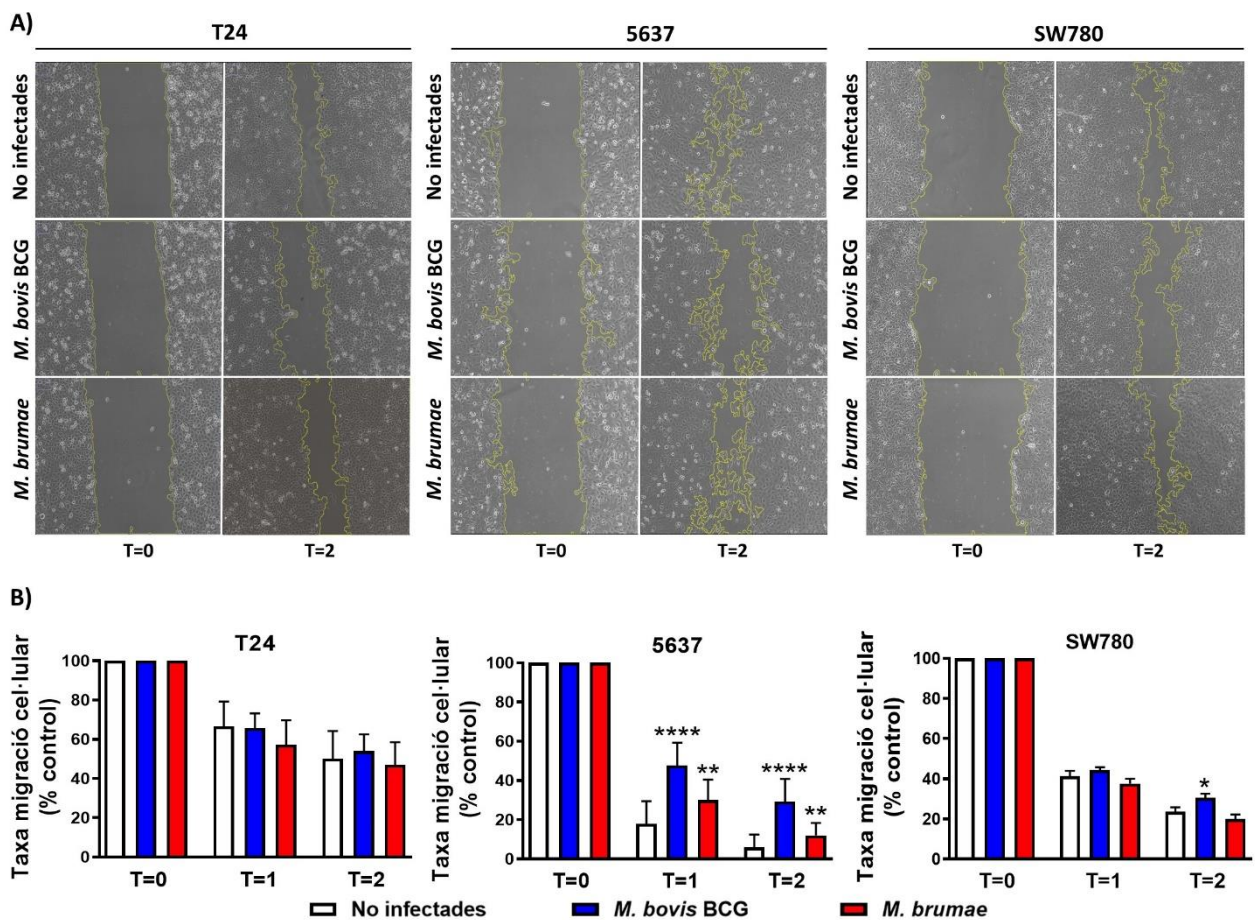
### 5.1.5 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Totes les comparacions estadístiques dels resultats es van realitzar mitjançant la prova t de Student i la prova U de Mann-Whitney. L'anàlisi estadística i els gràfics es van dur a terme mitjançant el programa estadístic GraphPad Prism (v.6.0c per a macOS; GraphPad Software, San Diego, CA, Estats Units). Per a la representació gràfica es van utilitzar els valors de la mitjana i la seva corresponent desviació estàndard ( $\pm$ SD). Els experiments es van realitzar en triplicats i es van repetir almenys tres vegades excepte en el cas de l'avaluació de la producció de metal-loproteïnases actives on es van realitzar dues zimografies en cada línia tumoral. Es van considerar diferències significatives quan el valor de  $p < 0.05$ .

## 5.2 RESULTATS

### 5.2.1 ANÀlisi DE LA MIGRACIó CEL·LULAR COL·LECTIVA EN CÈL·LULES TUMORALS DE BUFETA INFECTADES AMB EL *M. BOVIS* BCG I EL *M. BRUMAE*

L'objectiu d'aquest estudi va consistir en l'estudi fenotípic de la migració cel·lular col·lectiva en diferents línies tumorals de bufeta, amb diferent grau de diferenciació, que prèviament havien estat sotmeses a una infecció amb el *M. bovis* BCG o el *M. brumae* (Figura 31). En el cas de la línia cel·lular T24, es van observar lleugeres diferències entre les taxes de tancament de la ferida de les cèl·lules que havien estat infectades respecte de les cèl·lules que no havien estat infectades, tot i que sense diferències estadísticament significatives (Figura 31B). En el cas de la línia cel·lular 5637 sí que es van observar diferències significatives, quan es va avaluar el percentatge de tancament de la ferida, entre les cèl·lules infectades i les que no ho havien estat independentment del micobacteri utilitzat (Figura 31B). En aquest cas, 24 hores després d'haver realitzat la ferida, les cèl·lules no infectades presentaven un percentatge mitjà de tancament, respecte l'àrea inicial de la ferida, d'un 94.14; d'un 70.8%; quan les cèl·lules tumorals havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ); i d'un 87.94%, quan les cèl·lules havien estat exposades al *M. brumae* ( $p < 0.01$ ). Respecte l'anàlisi de la línia tumoral SW780, es van observar diferències significatives, únicament, entre les taxes de tancament de l'àrea de la ferida de les cèl·lules que havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG (69.52%,  $p < 0.05$ ) i les que no havien estat infectades amb cap micobacteri (76.5%) (Figura 31B).



**Figura 31. Estudi de la migració cel·lular col·lectiva.**

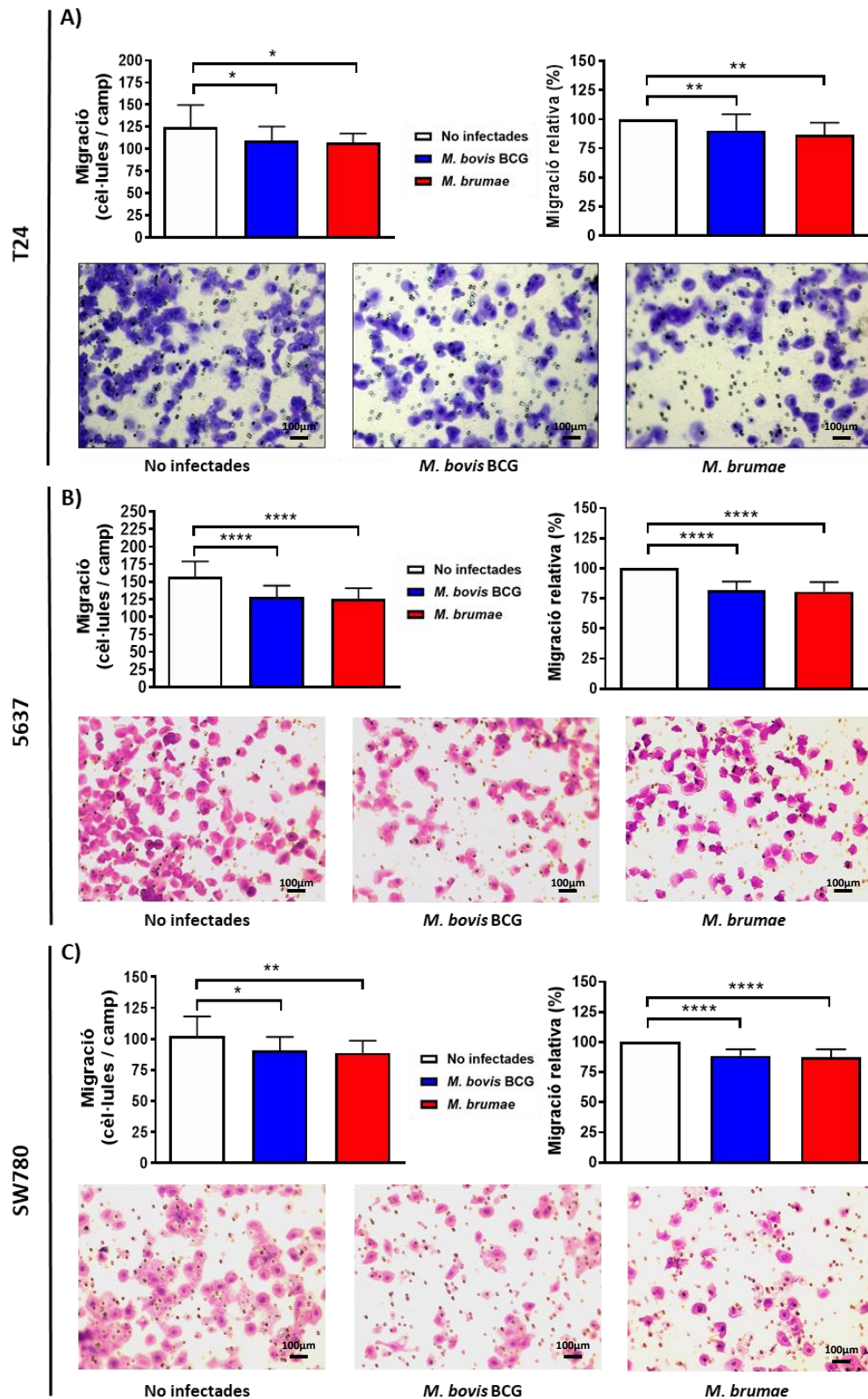
(A) Imatges representatives de l'assaig i de la superfície de la ferida en T24, 5637 i SW780. (B) Percentatge de tancament de la ferida respecte el control. T=0, temps inicial de la ferida; T=1, 16 hores després de la ferida i T=2, 24 hores després de la ferida. No infectades (blanc); infectades amb el *M. bovis* BCG (blau) i amb el *M. brumae* (vermell). En la **Figura 31A** es pot observar una imatge representativa de cadascuna de les línies cel·lulars estudiades durant l'estudi de la migració cel·lular col·lectiva així com l'àrea de ferida en cadascun dels temps establerts en l'experiment. Els resultats de la migració cel·lular es van representar en forma de diagrama de barres on s'expressava l'evolució entre l'àrea inicial de la ferida (T=0, 100%) i la seva l'àrea final passades les 24 hores (T=2) (**Figura 31B**). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de 3 experiments diferents. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  i \*\*\*\* $p < 0.0001$  (Prova t-Student).

### 5.2.2 ANÀLISI DE LA MIGRACIÓ CEL·LULAR INDIVIDUAL EN CÈL·LULES TUMORALS DE BUFETA INFECTADES AMB MICOBACTERIS

Per a l'avaluació del fenomen de migració cel·lular individual es van utilitzar inserts que presentaven una membrana porosa que permetia el pas de les cèl·lules, a través de l'addició d'un quimioatràient, de l'interior de l'insert a l'exterior d'aquest. El procediment utilitzat per a l'acompliment d'aquest experiment queda descrit en l'**apartat 5.1.2** del material i mètodes d'aquest capítol.

Es va observar una disminució en el nombre de cèl·lules que havien aconseguit traspasar la membrana porosa de l'insert, és a dir, que havien adoptat la capacitat de migrar, en totes les línies tumorals de bufeta avaluades (T24 (G3), 5637 (G2) i SW780 (G1)) infectades per ambdós micobacteris (*M. bovis* BCG i *M. brumae*), respecte de les cèl·lules no infectades. En la línia tumoral T24 s'observaren recomptes significativament inferiors, respecte als recomptes mostrats en les cèl·lules que no havien estat infectades, quan aquestes havien estat sotmeses a la infecció pel *M. bovis* BCG i el *M. brumae* ( $p < 0.05$ ) (gràfic de la part esquerra de la **Figura 32A**). En la línia tumoral 5637 s'observaren recomptes de cèl·lules molt similars entre la infecció pel *M. bovis* BCG o el *M. brumae* tot i que en aquest cas amb una diferència estadísticament superior, enfront a les cèl·lules no infectades, que la mostrada en la línia T24 ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 32B**). Per últim, en la línia tumoral SW780 la infecció també va mostrar una reducció dels recomptes de la migració de les cèl·lules respecte als mostrats per les cèl·lules no infectades tot i que amb diferències significatives diferents quan aquestes havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG ( $p < 0.05$ ) o amb el *M. brumae* ( $p < 0.01$ ) (**Figura 32C**).

Altrament, es van relativitzar els recomptes absoluts, obtinguts en les diferents línies cel·lulars i condicions, en valors de percentatge. És a dir, les dades s'expressaren en percentatges de migració cel·lular relativa respecte les cèl·lules que no havien rebut infecció (controls) representant aquestes el 100% de la migració. S'observà que amb la infecció amb el *M. brumae* els valors es situaren en un 13.48%, en el cas de la línia T24; d'un 19.31%, quan es tractà de la línia 5637; i d'un 12.72% quan s'infectà la línia tumoral SW780. Respecte la infecció amb *M. bovis* BCG, la línia T24 mostrà una reducció de la migració respecte les no infectades del 9.66%; la 5637 d'un 18.97% i la SW780 d'un 11.37%, respectivament (gràfic de la part dreta de la **Figura 32A, B, C**).



**Figura 32. Estudi de la migració cel·lular individual en les línies tumorals de bufeta**

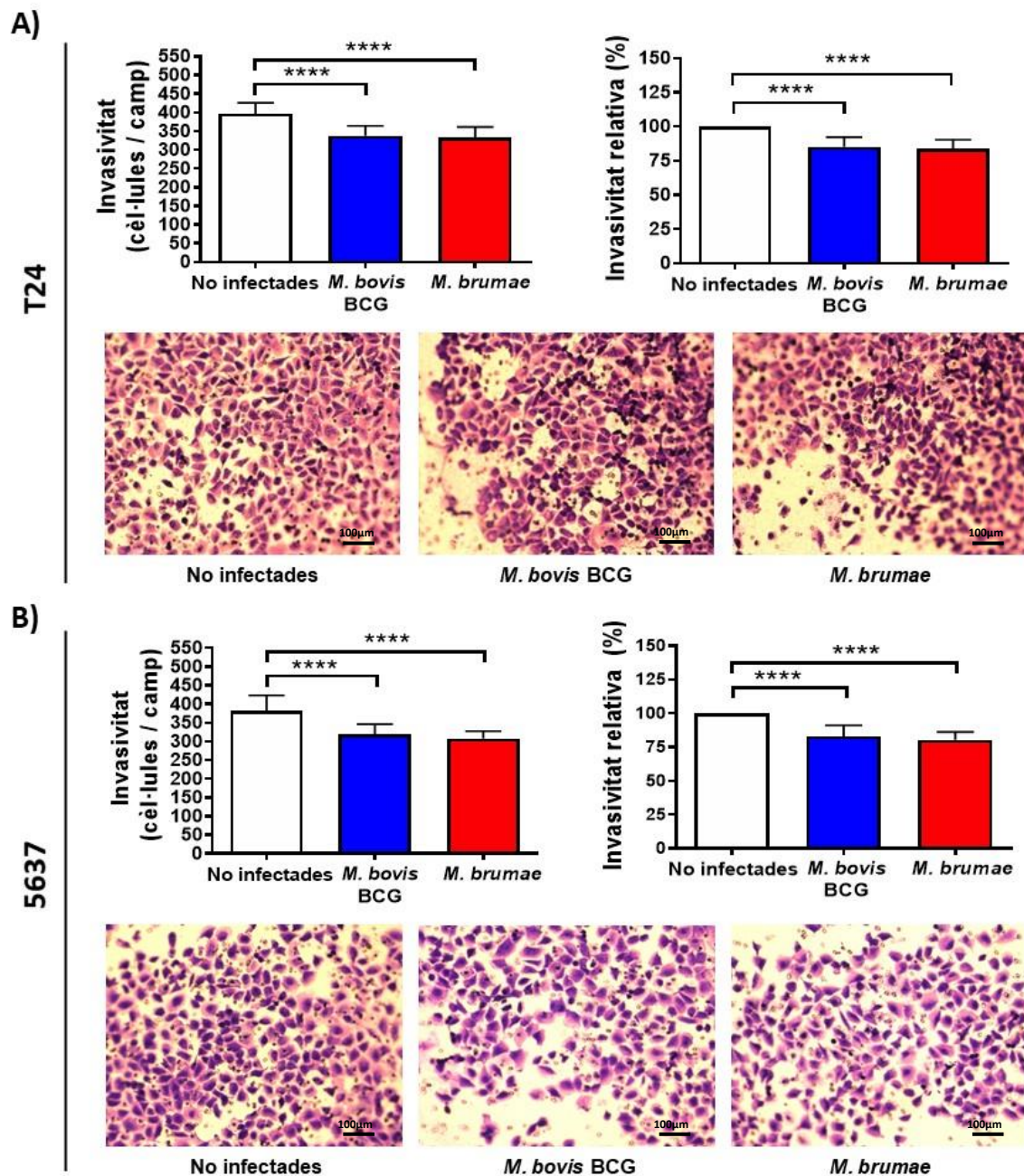
T24 **(A)**, 5637 **(B)** i SW780 **(C)**. La figura inclou gràfics referents als recomptes de cèl·lules que han migrat, la migració relativa (%) respecte les cèl·lules no infectades i imatges representatives dels camps analitzats que es van comptar ( $\times 100$ ,  $100\mu\text{M}$  dels 5 camps aleatoris/insert). No infectades (blanc); infectades amb el *M. bovis* BCG (blau); i infectades amb el *M. brumae* (vermell). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments diferents. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (Prova t-Student).

### 5.2.3 ANÀLISI DE LA INVASIVITAT CEL·LULAR EN CÈL·LULES TUMORALS DE BUFETA INFECTADES AMB ELS MICOBACTERIS

Un dels objectius d'aquest estudi va recaure en l'avaluació del paper dels micobacteris en la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals de bufeta. Concretament, la invasivitat va ser valorada en dues línies tumorals de bufeta amb diferent grau de diferenciació: la línia T24; de grau 3; i la línia 5637, de grau 2.

Els resultats obtinguts van mostrar que la infecció d'ambdues línies cel·lulars amb el *M. bovis* BCG i el *M. brumae* disminuïa de manera significativa la invasivitat cel·lular. En el cas de la línia T24, l'anàlisi de les imatges resultants dels assaigs van mostrar recomptes significativament menors, respecte les cèl·lules no infectades, de cèl·lules que havien traspassat, alhora, la matriu de Matrigel® i la membrana porosa de l'insert ( $p < 0.0001$ ). En concret, es van comptabilitzar una mitjana de 397 cèl·lules/camp ( $\pm 29.24$ ), en el cas de cèl·lules que no havien estat exposades a cap dels dos micobacteris utilitzats; de 337 cèl·lules/camp ( $\pm 26.85$ ), en el cas d'haver estat infectades amb el *M. bovis* BCG; i de 332 cèl·lules/camp ( $\pm 31.34$ ) quan les cèl·lules havien estat infectades amb el *M. brumae*. Una vegada relativitzats els diferents recomptes, obtinguts en l'anàlisi de les diferents imatges de microscòpia realitzades a cadascun dels inserts, s'obtenien els percentatges d'invasivitat presentat per la línia T24 en les condicions testades. Aquests, es van mostrar significativament menors tant en les cèl·lules que havien rebut la infecció amb el *M. brumae* ( $83.76 \pm 6.54$ ;  $p < 0.0001$ ) com en les que havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG ( $85.14 \pm 7.09$ ;  $p < 0.0001$ ) (**Figura 33A**).

Respecte la línia tumoral de bufeta 5637, els resultats observats van resultar similars. Així, la infecció del *M. bovis* BCG i del *M. brumae* va mostrar nombres significativament inferiors de cèl·lules 5637 respecte les no infectades ( $p < 0.0001$ ). En aquest cas, el recomptes cel·lulars van ésser lleugerament inferiors respecte el observats en la línia T24. Es va comptabilitzar una mitjana de 381.3 cèl·lules/camp ( $\pm 41.99$ ) en la condició control; de 318.3 cèl·lules/camp ( $\pm 27.3$ ) en el cas d'haver rebut el tractament del *M. bovis* BCG i de 307.9 cèl·lules/camp ( $\pm 19.5$ ) si havien estat infectades amb el *M. brumae*. En la mateixa línia, la invasivitat relativa també va mostrar diferències significatives ( $p < 0.0001$ ). Els percentatges reportats respecte el grup control (no infectades) van oscil·lar entre el 82.80 % ( $\pm 8.42$ ) en les cèl·lules infectades amb *M. bovis* BCG i de 80.4 % ( $\pm 5.73$ ) (**Figura 33B**).



**Figura 33. Estudi de la invasivitat cel·lular en dues línies tumorals de bufeta.**

**(A)** Gràfics relatius a la invasivitat (recompte de cèl·lules) i a la invasivitat relativa (%) de la línia cel·lular T24. Les cèl·lules no infectades representen el 100%. Imatges representatives de les cèl·lules que han presentat invasivitat (x100, \_ 100 µm). **(B)** Gràfics relatius a la invasivitat (recompte de cèl·lules) i a la invasivitat relativa (%) de la línia cel·lular 5637. Les cèl·lules no infectades representen el 100%. Imatges representatives de les cèl·lules que han presentat invasivitat (X100). No infectades (blanc); infectades amb el *M. bovis* BCG (blau); i infectades amb el *M. brumae* (vermell). Les dades s'expressen com la mitjana ± SD de com a mínim 3 experiments diferents. Valor p; \*\*\*\* $p < 0.0001$  (Prova t-Student).

### 5.2.4 AVALUACIÓ DEL CREIXEMENT INDEPENDENT A L'ANCORATGE EN LES CÈL·LULES TUMORALS DE BUFETA INFECTADES AMB MICOBACTERIS

L'anàlisi de la influència dels micobacteris en el creixement independent a l'ancoratge va ser analitzada en la línia MB49 (G3), d'origen murí, i en les línies T24 (G3) i J82 (G3), ambdues originàries d'epiteli humà. Per a l'avaluació d'aquest creixement es va posar a punt la tècnica coneguda com a l'assaig d'avaluació del creixement independent a l'ancoratge (*Soft agar colony formation assay*) que permet comptabilitzar la formació i el creixement de colònies de cèl·lules tumorals en una superfície semi-sòlida, consistent en dues capes d'agar de diferent concentració d'aquest. La metodologia seguida per a la realització d'aquest estudi queda descrita en l'apartat 5.1.3. del material i mètodes d'aquest capítol. Relatiu als resultats obtinguts, es va observar una disminució significativa en el percentatge de formació de colònies en les línies T24, MB49 i J82 infectades amb el *M. brumae* respecte les que no havien rebut el tractament (infecció) ( $p < 0.05$ ) (Figura 34B). Respecte la infecció amb el *M. bovis* BCG, s'observà una lleugera disminució en els recomptes de colònies tot i que aquesta únicament presentà significació estadística en la línia tumoral J82 ( $p < 0.05$ ) (gràfic inferior de la Figura 34B). Els percentatges referents a la formació de colònies en les diferents línies cel·lulars infectades respecte de les no infectades (representades com el 100%), es troben representats en la Taula 16.

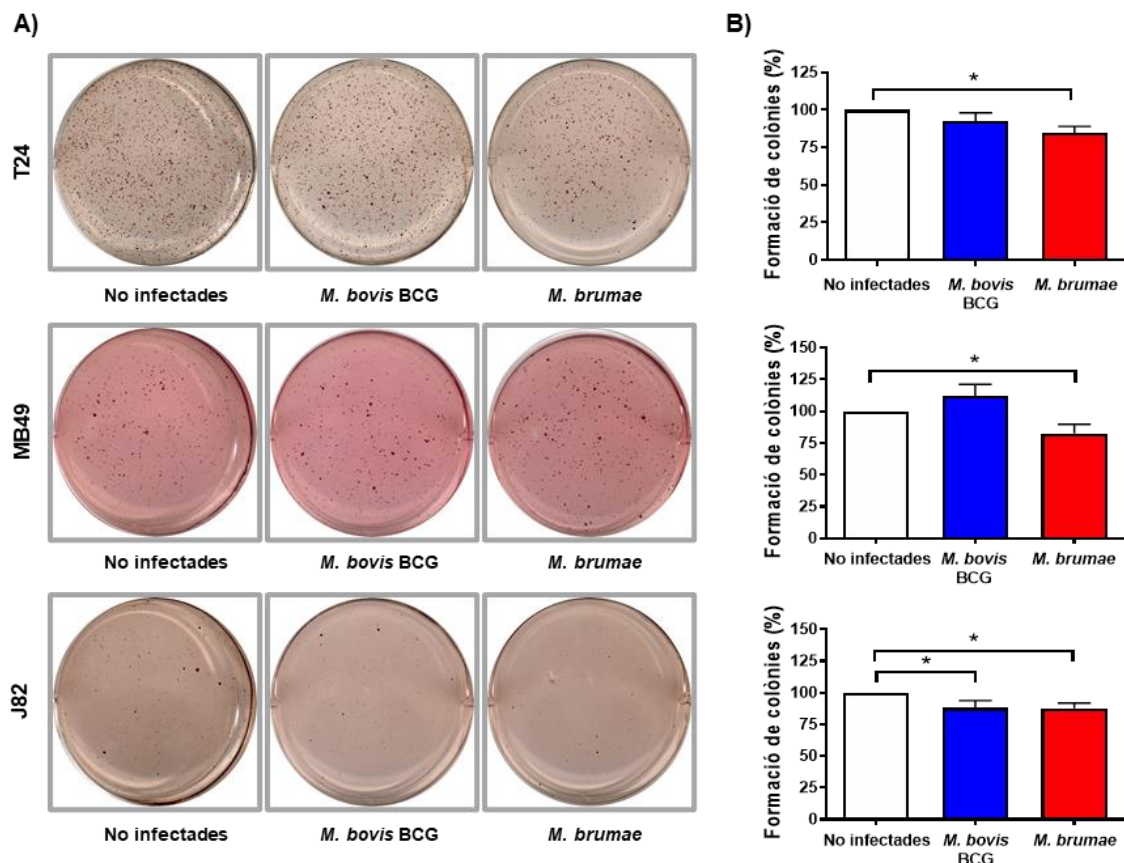


Figura 34. Avaluació del creixement independent a l'ancoratge en les línies cel·lulars de càncer de bufeta T24, MB49 i J82.

(A) Imatges representatives de cadascuna de les condicions utilitzades en els diferents assaigs d'avaluació del creixement independent a l'ancoratge. (B) Percentatge de formació de colònies respecte les cèl·lules no infectades representen (que s'expressen com el 100% de les colònies). No infectades (blanc), infectades amb el *M. bovis* BCG (blau) i el *M. brumae* (vermell). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de com a mínim 3 experiments diferents. \* $p < 0.05$  (Prova t-Student).



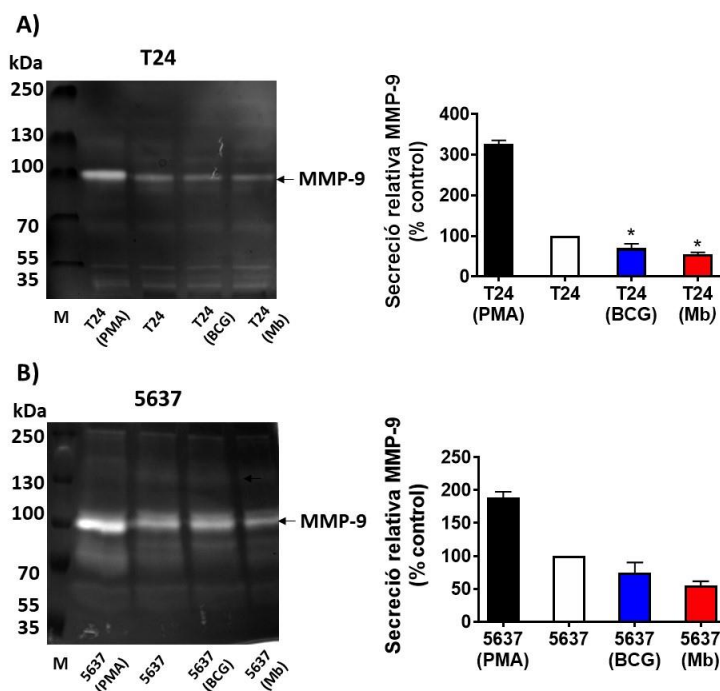
Taula 16. Percentatges del creixement independent a l'ancoratge en diferents línies cel·lulars de càncer de bufeta

Línia cel·lular	T24			MB49			J82		
	No infectades	BCG	<i>M. brumae</i>	No infectades	BCG	<i>M. brumae</i>	No infectades	BCG	<i>M. brumae</i>
Colònies(%) <sup>1</sup>	100	92.46	84.54	100	112	82.54	100	87.89	87.67
Diferència <sup>2</sup>	-	7.54	15.46	-	12	17.46	-	12.11	12.33
Valor <i>p</i>	-	ns	0.05	-	ns	0.05	-	0.05	0.05

<sup>1</sup>Formació de colònies (%). <sup>2</sup> Diferència entre % de formació de colònies no infectades i el % de colònies observat en la infecció. ns (no significatiu). Valor *p* obtingut amb la Prova t-Student). BCG (*M. bovis* BCG).

### 5.2.5 ANÀLISI DE LA PRODUCCIÓ DE METAL·LOPROTEÏNASES EN LES LÍNIES TUMORALS T24 I 5637 INFECTADES AMB AMBDÓS MICOBACTERIS

Per finalitzar l'estudi dels diferents fenòmens involucrats amb la progressió tumoral es va analitzar la producció de metal·loproteïnases actives mitjançant l'anàlisi en gels de zimografia. Tal i com es pot observar en els gels de la **Figura 35**, totes les condicions experimentals van revelar, tot i que amb diferent intensitat, una banda a l'altura dels 92 kDa corresponent a la metal·loproteïnasa-9 (MMP-9). El PMA es va utilitzar com a control positiu de la inducció de la producció de MMP-9. El gel de zimograma corresponent a la línia T24 mostra un patró de bandes amb diferent intensitat (**Figura 35A**). L'anàlisi d'aquesta intensitat, en termes de secreció relativa respecte el control sense PMA i infectar, ens indica que el PMA incrementa la producció de MMP-9 i que la infecció amb el *M. bovis* BCG o el *M. brumae* en disminueix significativament la seva producció ( $p < 0.05$ ) (**Figura 35A**). Es va repetir el mateix patró de bandes en la línia 5637 tot i que en l'anàlisi de la intensitat de les bandes, corresponents a la MMP-9, no es van reportar diferències significatives entre les cèl·lules que havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG o el *M. brumae* i les cèl·lules que no havien estat (**Figura 35B**).



**Figura 35. Avaluació de la producció de metal·loproteïnases actives.**

Imatge representativa d'un zimograma i secreció relativa (%) de metal·loproteïnasa-9 (MMP-9) en la línia cel·lular T24 (**A**) i 5637 (**B**). Cèl·lules tractades amb PMA (negre), cèl·lules sense tractament o infecció (blanc), cèl·lules infectades amb el *M. bovis* BCG (blau) i el *M. brumae* (vermell). BCG (*M. bovis* BCG); Mb (*M. brumae*); M (marcador de pes molecular). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de dos experiments diferents. Valor *p*; \* $p < 0.05$  (Prova t-student).

### 5.3 DISCUSSIÓ DE RESULTATS

Per a comprendre els mecanismes relacionats amb l'activitat antitumoral dels micobacteris, resulta primordial, en primer lloc, identificar i conèixer les característiques distintives que presenten les cèl·lules tumorals respecte les cèl·lules normals, és a dir, aquelles cèl·lules que presenten un fenotip i un genotip normal. En la publicació realitzada per Hanahan i Weinberg [76], s'enumeren aquelles característiques que defineixen a tota cèl·lula tumoral. Segons els autors, les cèl·lules tumorals comprenen vuit característiques biològiques que adquireixen durant el multiprocés que suposa la carcinogènesi. El coneixement d'aquestes característiques permet organitzar i, per tant racionalitzar, la complexitat que suposa una malaltia neoplàsica. D'aquesta manera, tota cèl·lula tumoral es caracteritza per mantenir una senyalització proliferativa constant; la capacitat d'evasió dels diferents mecanismes supressors del creixement cel·lular, la seva resistència a l'apoptosi; la immortalitat replicativa, la inducció a l'angiogènesi; l'activació de la invasivitat i per tant, de la metastasi; la reprogramació del metabolisme cel·lular; i la capacitat d'evadir la resposta immunitària de l'hoste.

Aquesta tesi s'ha centrat en l'avaluació, mitjançant l'estudi *in vitro*, de diferents fenòmens biològics implicats en el procés de carcinogènesi de les cèl·lules tumorals de bufeta en el context del seu tractament amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG.

En estudis anteriors, realitzats en el nostre grup, es va demostrar, àmpliament, la capacitat d'inhibició de la proliferació cel·lular i el potencial immunomodulador del *M. brumae* [73,74,153,199,200] Tanmateix, trobem a faltar estudis on s'analitzin els diferents fenòmens biològics relacionats amb la migració i la invasivitat de les cèl·lules tumorals de bufeta. Segons el nostre coneixement, aquest és el primer estudi on s'han avaluat els processos de migració cel·lular, invasió i de creixement independent a l'ancoratge en cèl·lules tumorals de bufeta tractades amb el *M. brumae*.

El nostre primer resultat rellevant ha estat una disminució de la capacitat de migració en cultius cel·lulars d'algunes línies tumorals de bufeta tractades amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG en comparació amb les cèl·lules que havien estat infectades. El procés de migració cel·lular implica la motilitat individual o col·lectiva de les cèl·lules i resulta essencial en els processos de reparació de ferides i per al manteniment de la integritat i la homeòstasi dels teixits. No obstant, la migració també juga un paper clau en la formació i dispersió dels tumors, inclosos els processos de bufeta [201,202]. En aquest estudi, la migració cel·lular individual es va avaluar mitjançant assaigs de migració amb inserts i la migració col·lectiva, mitjançant l'assaig d'avaluació del tancament de la ferida. Els resultats obtinguts en aquests assaigs van mostrar una inhibició de la motilitat individual i col·lectiva de les cèl·lules tumorals de bufeta. Concretament, les línies tumorals de bufeta T24, 5637 i SW780 havien estat infectades amb el *M. brumae* i el *M. bovis* van mostrar recomptes menors de cèl·lules que havien presentat motilitat respecte les que no havien estat infectades (**Figura 33**). En el cas de la migració o motilitat col·lectiva, la infecció amb el *M. brumae* va mostrar diferències significatives en la línia tumoral 5637. D'altra banda, la infecció amb el *M. bovis* BCG va mostrar una inhibició significativa de la migració col·lectiva en les línies tumorals 5637 i SW780 (**Figura 32**). Aquest fet es podria explicar a partir dels resultats obtinguts en l'estudi de Garden *et al* [203]. En aquest estudi, es va estudiar el fenomen de la migració col·lectiva mitjançant l'assaig de l'avaluació del tancament de la ferida. Concretament, es van infectar cèl·lules tumorals de bufeta, de la línia humana EJ, amb la soca Tice

del *M. bovis* BCG. Aleshores, es va postular que el *M. bovis* BCG Tice podria inhibir la migració cel·lular de les cèl·lules tumorals de bufeta mitjançant la unió del micobacteri, a través de la proteïna d'adhesió a la fibronectina (FAP) expressada en diverses espècies de micobacteris, amb el receptor de fibronectina o integrina  $\alpha 5\beta 1$ , present en la superfície de cèl·lules tumorals de l'uroteli [39,204]. Aquest mecanisme podria explicar també els resultats obtinguts amb el *M. brumae* perquè en estudis previs realitzats en el nostre laboratori han demostrat que el *M. brumae* també s'uneix a la fibronectina [200]. Respecte les diferències observades en la inhibició de la migració de les línies tumorals infectades pel *M. brumae* i el *M. bovis* BCG, aquestes es podrien explicar a partir de l'estudi realitzat per Bevers i els seus col.laboradors on va demostrar que les cèl·lules tumorals més desdiferenciades (G3>G1) mostren una major capacitat d'internalitzar el *M. bovis* BCG [205]. Aquest fet podria explicar els resultats obtinguts en el nostre estudi i reafirmar l'evidència de que el tractament amb el *M. bovis* BCG sigui més efectiu en pacients amb NMIBC d'alt risc. En referència a l'estudi de la migració cel·lular i el *M. bovis* BCG en d'altres tipus de cèl·lules tumorals, aquesta va ser avaluada en un estudi on es va analitzar l'efecte de la immunoteràpia amb el *M. bovis* BCG sobre la capacitat migratòria del carcinoma escamós de cap i coll [206]. Els resultats que van obtenir en aquest estudi van mostrar que aquest micobacteri era capaç de disminuir la migració de cèl·lules de la línia tumoral FaDu.

El segon bloc d'experiments realitzats en aquest capítol va incloure l'estudi de la invasivitat cel·lular així com l'avaluació del creixement independent de l'ancoratge de les cèl·lules tumorals. Els resultats obtinguts, tant en els assaigs d'invasivitat cel·lular com en l'avaluació del creixement independent a l'ancoratge de cèl·lules tumorals, aquests indiquen que la infecció amb micobacteris redueix el potencial invasiu de les cèl·lules tumorals de bufeta.

En referència als resultats obtinguts en els assaigs d'invasivitat cel·lular, aquests també van demostrar que el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG disminueixen la invasió cel·lular en les línies tumorals de bufeta T24 i 5637. En aquest cas, la línia tumoral SW780 no va mostrar invasivitat. En aquest sentit, Tsui i els seus col·legues van correlacionar la producció d'IL-6 amb una inhibició de la invasivitat cel·lular en la línia tumoral T24 [207]. Concretament, els resultats d'aquest estudi van revelar que la IL-6 modulava la transició epitelial mesènquima (EMT), explicada a la introducció, regulant de manera positiva l'expressió d'E-cadherines, característica de cèl·lules epitelials, i de manera negativa l'expressió de N-cadherines i vimentina, relacionades amb el fenotip mesenquimal i característic de les cèl·lules que presenten invasivitat. En aquest sentit, és conegut que una de les propietats antitumorals que caracteritzen el mecanisme d'acció del *M. bovis* BCG és la producció d'una resposta immunitària caracteritzada per la producció de citocines proinflamatòries com la IL-6, entre moltes d'altres, una vegada el micobacteri ha interactuat amb les cèl·lules tumorals de bufeta. De la mateixa manera, els resultats obtinguts en estudis anteriors del nostre grup ja havien mostrat la producció d'altres concentracions d'IL-6 quan les cèl·lules tumorals de bufeta havien estat infectades amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG [73,199,200,208,209].

Respecte l'avaluació del creixement independent a l'ancoratge resulta important remarcar que una característica que compleixen les cèl·lules tumorals és la capacitat d'evadir l'auto-estratègia de mort cel·lular programada o apoptosi quan aquestes es separen o es desplacen de la seva localització original. Per contra, l'evasió d'aquest fenomen d'apoptosi, conegut com a via anoikis, no s'observa en cèl·lules no tumorals i, per tant, la proliferació d'aquestes cèl·lules resulta dependent a l'ancoratge d'una matriu

## CAPÍTOL II. Discussió de Resultats

extracel·lular [210]. En el nostre estudi, el procés tumorigènic del creixement independent a l'ancoratge es va avaluar mitjançant l'assaig de formació de colònies de cèl·lules tumorals en agar tou. Els resultats van demostrar una disminució, en nombre i mida, de colònies de cèl·lules tumorals de bufeta quan aquestes havien estat infectades amb els micobacteris. En aquest cas, totes les línies tumorals de bufeta avaluades (T24, MB49 i J82) van mostrar recomptes significativament menors quan van ser infectades amb el *M. brumae* respecte les cèl·lules que no havien estat infectades (**Figura 34**). En canvi, les cèl·lules infectades amb el *M. bovis* BCG van mostrar recomptes significativament menors de creixement independent a l'ancoratge únicament en la línia cel·lular J82. Relacionat amb aquesta troballa, un estudi recent de Mahe i els seus col·legues va identificar un bucle de retroalimentació positiva entre l'expressió del receptor FGFR3, un receptor de tirosina quinasa fortament associat amb el desenvolupament i la progressió del càncer de bufeta, amb la regulació positiva dels nivells d'ARNm del proto-oncogen *MYC* i per tant, afavorint el creixement independent a l'ancoratge en les cèl·lules tumorals de bufeta [211]. El fet de que la infecció del *M. bovis* BCG en cèl·lules tumorals de bufeta com T24 i MB49 condueixi a una reducció de l'expressió del receptor FGFR3, com s'ha descrit anteriorment [212], podria explicar aquesta reducció del creixement dependent de l'ancoratge que hem observat en els nostres experiments. Respecte el *M. brumae* resulta necessari realitzar nous estudis per a corroborar si aquest és el mecanisme que induïx a la inhibició de la formació de colònies o bé elucidar quin mecanisme resulta ser.

Una vegada comprovat que tant el *M. brumae* com el *M. bovis* BCG eren capaços d'interferir en els processos de migració i invasivitat cel·lular, així com en el creixement independent a l'ancoratge de les línies tumorals de bufeta, ens va resultar interessant observar si la infecció amb els micobacteris produïa canvis en la producció de determinades molècules implicades en algun d'aquests fenòmens. Concretament, ens vam centrar en l'avaluació de la producció de metal·loproteïnases (MMPs).

Tal com s'ha comentat, la integritat de la matriu extracel·lular resulta fonamental per al manteniment de les cèl·lules epitelials. No obstant, s'ha observat que durant els processos d'invasivitat cel·lular, resultat de la transició epiteli mesènquima, es produeix un augment de la producció de determinades MMPs [213]. Així doncs, amb l'objectiu de conèixer el mecanisme subjacent pel qual els micobacteris inhibeixen la invasivitat de les cèl·lules tumorals de bufeta, es va avaluar la producció de la MMP-9. Els resultats obtinguts per zimografia en gel van revelar una menor producció de MMP-9 en línies cel·lulars infectades T24 i 5637 (**Figura 35**). Aquests resultats contrasten amb l'estudi realitzat per Kageyama i els seus col·legues on no van observar cap efecte sobre la producció de MMP en cèl·lules tumorals de bufeta infectades amb la soca Tokyo del *M. bovis* BCG [214]. Resulta important destacar que en el nostre experiment les cèl·lules tumorals de bufeta van ser cultivades amb medi de cultiu sense FBS, durant 72 h amb la finalitat de condicionar el metabolisme d'aquestes cèl·lules. Per tant, aquesta diferència en la metodologia utilitzada en el seu l'estudi podria explicar el fet que nosaltres fóssim capaços d'avaluar l'expressió de MMPs actives. A més, aquesta no és la primera vegada que el *M. bovis* BCG demostra una disminució de MMP-9. De fet, la producció de MMPs ja ha estat avaluada en altres línies tumorals, diferents al càncer de bufeta, infectades amb el *M. bovis* BCG. Un exemple és un estudi de l'efecte del *M. bovis* BCG en cèl·lules de carcinoma escamós de cap i coll, que va mostrar una expressió decreixent de la producció de MMP-9 quan aquestes cèl·lules havien estat infectades amb el *M. bovis* BCG [215]. Relacionat amb aquest fenomen, *M. indicus pranii*, va mostrar una inhibició de la reducció de la invasivitat

cel·lular en cèl·lules de melanoma B16F10 mitjançant una disminució de MMP-9 [216]. Segons un estudi publicat per Saitoh *et al*, aquest fenomen d'inhibició de la producció de MMPs podria estar relacionat amb una disminució de l'activitat telomerasa de les cèl·lules tumorals de bufeta resultant de la infecció pel *M. bovis* BCG [217].

D'aquesta manera, els resultats obtinguts en els experiments realitzats en aquest estudi demostren que tant el *M. brumae* com el *M. bovis* BCG han mostrat la capacitat de reduir la capacitat migratòria i invasiva de les cèl·lules tumorals analitzades així com la capacitat de creixement a l'ancoratge i la producció de MMP-9.



## **6.CAPÍTOL III.**

# **ESTUDI DE LA INFECCIÓ AMB MICOBACTERIS EN EL FENÒMEN DE POLARITZACIÓ DE MACRÒFAGS HUMANS I EL SEU FECTE ANTITUMORAL**

---





## 6. CAPÍTOL III. ESTUDI DE LA INFECCIÓ AMB MICOBACTERIS EN EL FENÒMEN DE POLARITZACIÓ DE MACRÒFAGS HUMANS I EL SEU EFECTE ANTITUMORAL

L'estudi dels diferents fenòmens biològics de diferenciació, polarització i reversió de la polarització en macròfags va implicar l'ús de diferents tècniques experimentals utilitzades en el camp de la microbiologia, la immunologia i la biologia del càncer. A més, es va avaluar la implicació d'aquests fenòmens en diferents processos implicats en la patogènesi del càncer de bufeta, com ara inhibició de la proliferació cel·lular i els fenòmens de la migració i la invasivitat de les cèl·lules tumorals. Tota la metodologia utilitzada, així com els resultats, queden detallats a continuació.

### 6.1 MATERIAL I MÈTODES

#### 6.1.1 GENERACIÓ DE MACRÒFAGS NO ACTIVATS (M0) I POLARITZACIÓ D'AQUESTS EN MACRÒFAGS CLÀSSICAMENT ACTIVATS (M1) I MACRÒFAGS ACTIVATS ALTERNATIVAMENT (M2)

La generació de macròfags no activats (M0) es va realitzar a partir de monòcits de la línia cel·lular THP-1 seguint la metodologia a l'apartat 3.4 dels materials i mètodes del capítol 0. Així doncs, inicialment es va partir de cultius de monòcits, a una concentració de  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou, exposats a una dosi concreta de PMA (100 ng/mL) durant un determinat període de temps (24h) i amb una incubació addicional de 48 hores amb medi de cultiu complet (**Figura 10**). Una vegada obtinguts els macròfags M0, es va procedir a l'activació d'aquests en dos fenotips diferents, anomenats macròfags M1 i M2, mitjançant l'exposició d'aquests a diferents estímuls. En el cas de la polarització al fenotip M1, els macròfags M0 van ésser cultivats durant 24 hores en RPMI suplementat amb FBS i antibiòtics que contenia una solució de proteïnes recombinats composta per interferó gamma (INF- $\gamma$ , 50 ng/mL, ProteinTech, Regne Unit) i lipopolisacàrid (LPS, 100 ng/mL, Sigma-Aldrich, Estats Units) [218]. Respecte a la polarització al fenotip M2, en aquest cas els macròfags diferenciats van ésser cultivats amb dexametasona (DXM, 50 ng/mL, Sigma-Aldrich, Estats Units) [219]. A més, els canvis morfològics adquirits durant els processos de diferenciació i polarització van ser avaluats fenotípicament, transcorregudes 24 hores, a partir de la realització d'imatges mitjançant microscòpia òptica (X100, Nikon Eclipse T2-2000-E, Japó). Obtinguts els macròfags M0, M1 i M2 es van comprovar diferents paràmetres com la producció de determinades citocines mitjançant immunoassaigs (ELISA), l'expressió de determinats marcadors d'activació cel·lular, mitjançant citometria de flux; així com la implicació d'aquests macròfags en processos com la proliferació cel·lular o la migració i invasivitat de les cèl·lules tumorals de bufeta (**Figura 36**).

#### 6.1.2 REVERSIÓ DE MACRÒFAGS AMB UN FENOTIP M2 EN MACRÒFAGS AMB UN FENOTIP M1

Amb l'objectiu d'estudiar el procés de reversió fenotípica de la polarització es va partir de macròfags M2, generats segons la metodologia explicada a l'apartat anterior, que van ser infectats, seguint el procediment explicat en l'apartat 3.4 del material i mètodes del capítol 0, amb diferents dosis de *M. bovis* BCG (0,1:1 i 1:1) i *M. brumae* (2:1 i 10:1). A més, es van utilitzar les mateixes dosis de micobacteris per infectar macròfags M0 com a controls de la infecció. D'altra banda, el control de la reversió es va realitzar exposant macròfags M2 a una solució d'INF- $\gamma$  i LPS idèntica a la utilitzada en la generació de macròfags M1. De la mateixa manera, el resultat de la reversió de la polarització va ser estudiat seguint la metodologia comentada en generació de macròfags M0, M1 i M2 (**Figura 37**).

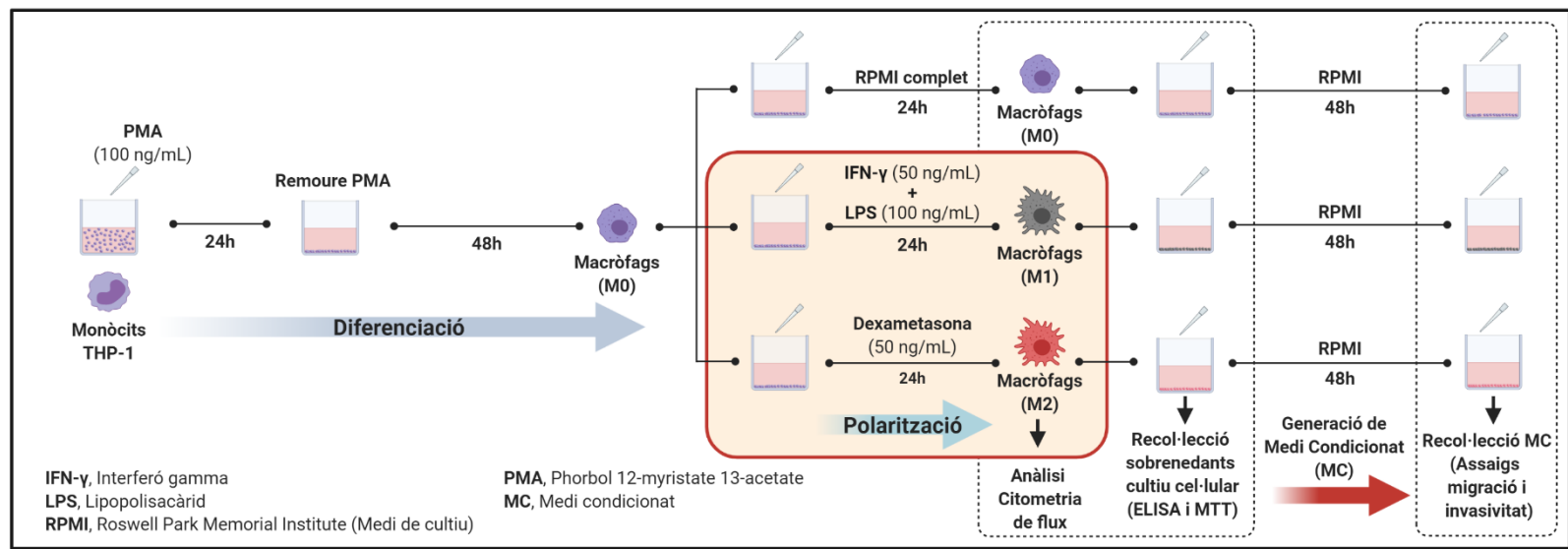


Figura 36. Esquema de la generació de macròfags M0 i la polarització en macròfags M1 i M2.

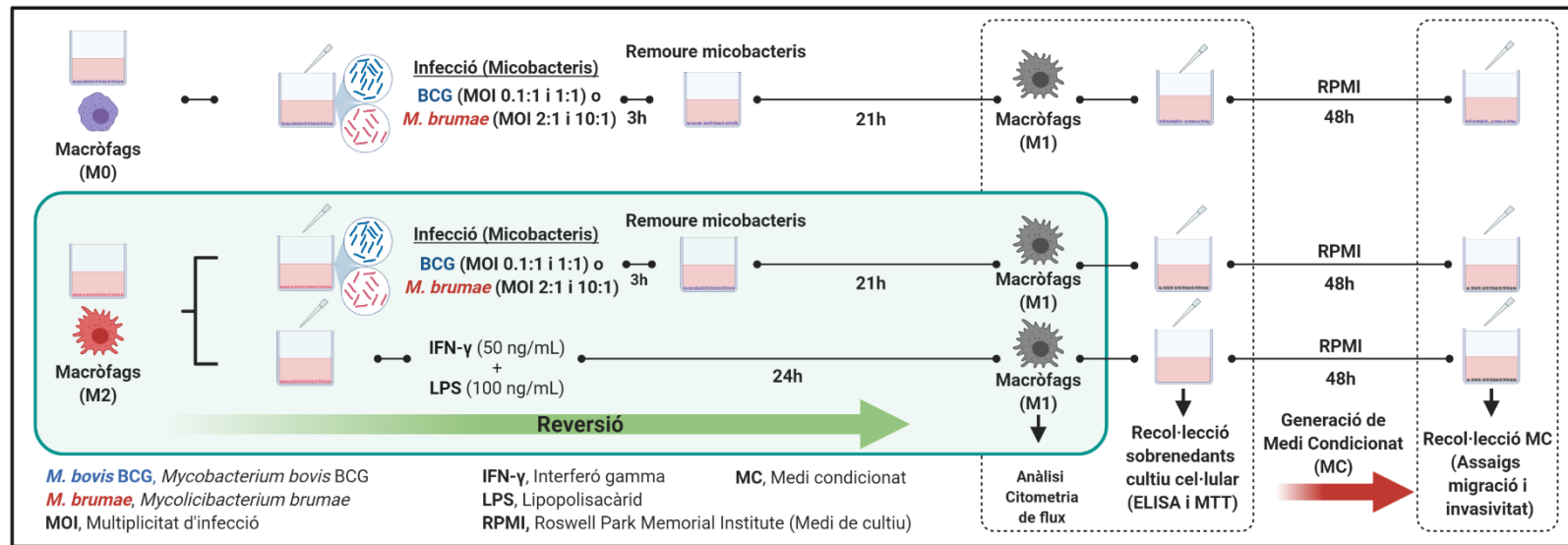


Figura 37. Esquema de la reversió de la polarització de macròfags M2 mitjançant la infecció amb el *M. bovis* BCG i el *M. brumae*.

### 6.1.3 RECOL·LECCIÓ DE SOBREDANTS I GENERACIÓ DE MEDI CONDICIONAT (MC)

A continuació es va procedir a la recol·lecció dels sobredants de cultiu cel·lular generats en tots els processos de diferenciació, polarització i reversió de la polarització de macròfags. Previ al seu emmagatzematge, tots els sobredants van ésser sotmesos a una centrifugació (250 x g, 10 minuts) per així descartar possibles restes cel·lulars. Per a la generació del medi condicionat, es va recórrer a una incubació addicional de 48 hores (37°C + 5% CO<sub>2</sub>) en 1mL de medi de cultiu sense FBS (RPMI-FBS). Transcorregut el període d'incubació, es va procedir a recol·lectar i centrifugar (1200 x g, 5 minuts, 4°C) el MC resultant. En ambdues situacions, els sobredants i els diferents MC recol·lectats, processats i emmagatzemats en tubs de micro-centrífuga, a una temperatura de -80°C fins al seu ús [220]. Els sobredants i els MC obtinguts queden resumits en la següent taula (**Taula 17**).

**Taula 17. Generació de sobredants i medis condicionats durant els processos de diferenciació, polarització i reversió de la polarització de macròfags**

Condicció	Estímul	Procés biològic	Sobredant	Medi condicionat
M0	PMA (100 ng/mL)	Diferenciació	✓	✓
M1	INF-γ+LPS (50+100 ng/mL)	Polarització	✓	✓
M2	Dexametasona (50 ng/mL)	Polarització	✓	✓
M2>M1	INF-γ+LPS (50+100 ng/mL)	Reversió	✓	✓
Condicció	Estímul	Procés biològic	Sobredant	Medi condicionat
M0-BCG	<i>M. bovis</i> BCG (MOI 0,1:1 i 1:1)	Polarització	✓	✓
M0- <i>M. brumae</i>	<i>M. brumae</i> (MOI 2:1 i 10:1)	Polarització	✓	✓
M2-BCG	Dexametasona i <i>M. bovis</i> BCG (MOI 0,1:1 i 1:1)	Reversió	✓	✓
M2- <i>M. brumae</i>	Dexametasona i <i>M. brumae</i> (MOI 2:1 i 10:1)	Reversió	✓	✓

### 6.1.4 ANÀLISI DE CITOCINES

La quantificació de citocines es va realitzar en els diferents sobredants de cultiu cel·lular, generats en els processos de diferenciació, polarització i reversió de la polarització dels macròfags. Concretament, la quantificació es va realitzar per mitjà de la tècnica d'immunoassaig coneguda com a ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Així, es van utilitzar diferents tests d'ús comercial. Es va avaluar la presència de les citocines IL-1β (Mabtech, Suècia); IL-6 (BD Biosciences, Estats Units); i les citocines IL-10, la IL12-p40 i el TNF-α (Mabtech, Suècia). L'absorbància resultant de cadascun dels assajos es va mesurar a una longitud d'ona de 450 nm o 530 nm, en funció del test comercial utilitzat, per mitjà del lector Infinite F200 (TECAN, Suïssa) i quantificar a través del programari Magellan (TECAN, Suïssa).

### 6.1.5 ASSAIG DE LA INHIBICIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

El reactiu escollit per a l'avaluació de la proliferació cel·lular va ser la sal de tetrazol soluble 3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Així doncs, es van sembrar i incubar durant 3 hores cèl·lules de les línies tumorals de bufeta T24, J82 i 5637 a una concentració de  $3 \cdot 10^4$  cèl·lules/pou, en plaques de 96 pous (Nuncclon, Dinamarca). Aleshores, les cèl·lules van ésser tractades, durant 72 hores, amb els diferents sobrenedants de cultiu cel·lular (50%,  $\frac{1}{2}$  sobrenedant :  $\frac{1}{2}$  medi de cultiu) generats amb anterioritat. Passades les 72 hores, es va descartar el sobrenedant de cada pou, es va afegir una solució al 10% de MTT en medi de cultiu cel·lular complet i aleshores es van incubar les cèl·lules durant 3 hores a 37°C. Seguidament, els cristalls de formazan resultants van ser dissolts mitjançant una solució d'isopropanol acídic (acidificat amb 0.1 N d'àcid clorhídric (HCl)). L'absorbància de la reacció resultant va ésser mesurada a 550 nm per mitjà del lector Infinite F200, utilitzant el programari I-Control (TECAN, Suïssa).

### 6.1.6 CITOMETRIA DE FLUX

L'estudi de l'expressió de marcadors de superfície cel·lular associats als fenòmens de diferenciació, polarització i reversió de la polarització dels diferents macròfags generats i modulats mitjançant l'ús de micobacteris, es va realitzar mitjançant la tècnica de citometria de flux. Amb aquesta finalitat, en primer lloc es van generar macròfags amb un fenotip M0, M1, M2 i es va procedir, en paral·lel, a la infecció de macròfags M0 i M2 amb diferents dosis del *M. bovis* BCG (MOI 0.1:1, 1:1) i del *M. brumae* (MOI 2:1, 10:1) segons la metodologia descrita en l'apartat 6.1.1 (Figura 36) i en l'apartat 6.1.2 (Figura 37) del material i mètodes d'aquest capítol, respectivament. Després del període d'incubació, es van retirar els sobrenedants, es va realitzar un rentat als pous amb 1 mL de PBS i, seguidament, es va afegir una solució de PBS i EDTA (5 mM, 400 µL/pou), refredada prèviament a 4°C, a cadascun dels pous de la placa inicial de 24 pous. Després d'un període d'incubació de 5 minuts en gel, els diferents macròfags van ser desadherits, utilitzant un rascador de cèl·lules (Cell scraper, SPL life sciences, Corea del Sud) i es van transferir a una placa de 96 pous amb fons rodó (U) (Sterilin, Regne Unit) a raó de 200 µL/pou, obtenint així duplicats respecte el número de mostres presents en la placa de 24 pous. Seguidament es va procedir a un programa de centrifugació (250 x g, 5 minuts, 4°C), per a tal d'obtenir un botó de cèl·lules (macròfags) al fons de cadascun dels pous de la placa i així poder descartar la solució d'EDTA en PBS. Aleshores, amb la finalitat de comprovar la viabilitat, els diferents macròfags van ésser tenyits amb una solució de 50 µL/pou del marcador de viabilitat Zombie Green™ Fixable Viability (1:750, Biolegend, Regne Unit) en PBS durant 30 minuts a 4°C en condicions de foscor. A continuació, es va procedir a diluir l'excedent del marcador de viabilitat, dispensat anteriorment, mitjançant l'addició 150 µL/pou de PBS per a continuació descartar-lo mitjançant la realització d'un programa de centrifugació (250 x g, 5 minuts, 4°C). Obtingut el botó de macròfags i descartada la solució de PBS i marcador de viabilitat, es va continuar amb el marcatge dels diferents marcadors de superfície mitjançant l'addició de 25 µL/pou d'una mixtura de solució tampó (FACS buffer, PBS+2% FBS) i d'anticossos monoclonals anti-humans conjugats, cadascun d'ells, amb el seu respectiu fluorocrom. Concretament, es van utilitzar els anticossos anti-CD80 (PerCP-eFluor™710) i anti-CD86 (PE-Cyanine7), com a marcadors del fenotip M1; i els anticossos anti-CD163 (APC) i anti-CD206 (PE), com a marcadors del fenotip M2 (veure taula 18). A

més, es van utilitzar, com a valors de referència, els respectius isotips control. Després d'un període d'incubació de 30 minuts, en condicions de foscor i a una temperatura de 4°C, es va realitzar un rentat mitjançant l'addició de 175 µL de FACS buffer/pou i un programa de centrifugació. Finalment, es va procedir a fixar els macròfags marcats amb una solució de 100 µL/pou de PBS i paraformaldehid (2%). Transcorreguts 20 minuts a temperatura ambient, es va realitzar un últim rentat que consistia en afegir 100 µL/pou de FACS buffer i a un altre cicle de centrifugació. Aleshores, els diferents macròfags marcats i fixats, es van resuspendre en 200 µL/pou de FACS buffer i transferir en tubs de citometria (BD Biosciences, Estats Units). Immediatament, les mostres es van emmagatzemar a una temperatura de 4°C fins al seu anàlisi, el dia següent, per citometria de flux.

L'anàlisi de citometria de flux es va realitzar mitjançant el citòmetre FACSCanto (BD Biosciences, Estats Units) equipat amb un làser blau (488nm) i un làser vermell (633nm). Les fluorescències del Zombie green, el PE-CD206, PerCP-eFluor™710-CD80 i el PE-Cyanine7-CD86 es van excitar amb el làser blau i es van mesurar en els detectors equipats amb els filtres de 530/30BP, 585/42BP, 670LP i 780/60BP respectivament. D'altra banda, la fluorescència de l'APC-CD163 es va excitar amb el làser vermell i es va detectar en el detector amb filtre 660/20BP. Les dades es van adquirir amb el programa FACSDiva v 5.0. i es van analitzar amb el programa FlowJo v10.0.7.(FlowJo, Estats Units) Per a l'estratègia d'anàlisi dels macròfags, en primer lloc, es van seleccionar les cèl·lules segons mida (FSC) i complexitat (SCC) amb la finalitat de descartar restes cel·lulars. A continuació es van seleccionar les cèl·lules individuals segons FCS-A i FCS-H i es van descartar les cèl·lules marcades amb el marcador de viabilitat (Zombie Green) amb l'objectiu d'escollir els macròfags viables. Les diferents poblacions de macròfags es van seleccionar segons l'expressió dels marcadors estudiats. Per establir la positivitat d'aquests es van utilitzar controls d'isotips. Els percentatges d'expressió de cada marcador de superfície analitzat es van calcular segons la suma d'expressió simple i/o doble de marcadors M1 o M2, respectivament. Per cada mostra es va adquirir un mínim de 10.000 events de la regió de macròfags vius a una velocitat mitjana.

**Taula 18. Panell d'anticossos i isotips utilitzats en l'estudi dels fenòmens de diferenciació, polarització i reversió de la polarització dels macròfags**

<b>Anticossos</b>	<b>Clon</b>	<b>Dilució de treball</b>	<b>Empresa</b>	<b>Referència comercial</b>
PerCP-eFluor™710-CD80	2D10.4	1:100	e-Bioscience	46-0809-42
PE-Cyanine7-CD86	IT2.2	1:100	e-Bioscience	25-0869-42
APC-CD163	GHI/61	1:100	e-Bioscience	17-1639-42
PE-CD206	19.2	1:100	e-Bioscience	12-2069-42
<b>Isotips control</b>	<b>Clon</b>	<b>Dilució de treball</b>	<b>Empresa</b>	<b>Referència comercial</b>
PerCP-eFluor™710-mouse IgG1 kappa	P3.6.2.8.1	1:100	Invitrogen	46-4714-82
PE-Cyanine7-mouse IgG2 kappa	P3.6.2.8.1	1:100	Invitrogen	12-4714-82
APC-mouse IgG1 kappa	P3.6.2.8.1	1:100	Invitrogen	17-4714-82
PE-mouse IgG1 kappa	P3.6.2.8.1	1:100	Invitrogen	25-4732-81
<b>Marcador de viabilitat</b>	<b>Clon</b>	<b>Dilució de treball</b>	<b>Empresa</b>	<b>Referència comercial</b>
Zombie Green™ Fixable Viability	N/A	1:750	Biolegend	423111
Abreviacions: N/A (No aplica).				

### 6.1.7 ASSAIGS DE MIGRACIÓ I INVASIVITAT CEL·LULAR

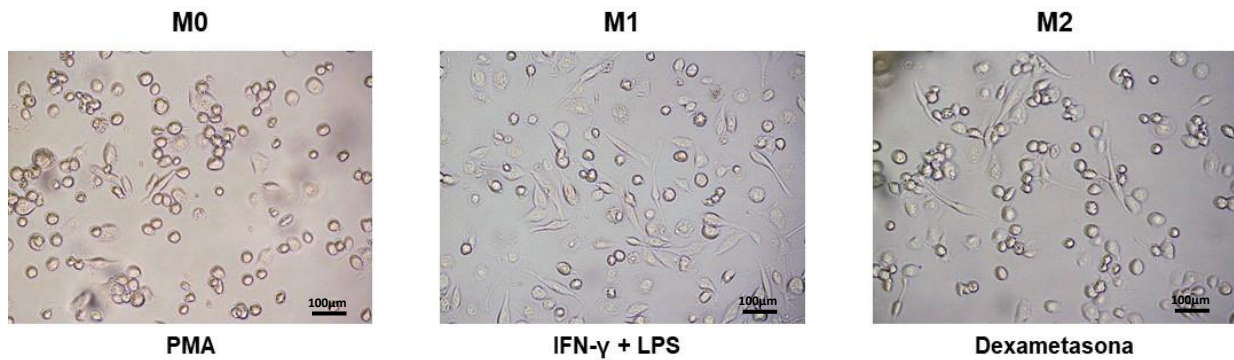
Per últim, s'utilitzaren els MC, pertinents als diferents fenotips de macròfag generats, per a lavaluació del seu paper en els fenòmens biològics de migració i invasivitat en les línies cel·lulars de càncer de bufeta T24 i J82. La metodologia utilitzada en aquest estudi es va realitzar segons el procediment explicat en l'apartat 5.1.2 del capítol II, aplicant lleugeres modificacions. D'aquesta manera, es van sembrar  $1.5 \times 10^4$  cèl·lules/insert, en el cas de l'assaig de la migració cel·lular; i un total de  $3 \times 10^5$  cèl·lules/insert, quan es realitzaren els assaigs d'invasivitat. A més, a l'incorporar la línia de càncer de bufeta J82, la concentració d'aquesta es va determinar en  $2 \times 10^4$  cèl·lules/insert, en el cas dels assaigs de migració i de  $4 \times 10^4$  cèl·lules/insert quan es tractà dels assaigs d'invasivitat cel·lular. En aquest estudi, els quimioatracients utilitzats per a promoure la migració i la invasivitat cel·lular de les cèl·lules tumorals de bufeta van ser els MC obtinguts en els diferents processos de diferenciació, polarització i reversió de la polarització dels macròfags. Concretament, es van utilitzar MC diluïts al 50% (1/2), en un volum total de 800  $\mu$ L. El diluent utilitzat va ser el medi de cultiu RPMI. Aleshores, després d'un període d'incubació de 24 hores, es va procedir a descartar, mitjançant un rascat amb un escovilló, les cèl·lules que havien quedat adherides a la superfície interna de la membrana de cada insert i que per tant no havien migrat o envaït. A continuació, amb la finalitat de comptabilitzar la migració i la invasivitat cel·lular, es va procedir a la fixació, durant 15 minuts, utilitzant una solució de metanol (MetOH) i a la tinció, 15 minuts amb cristall violeta al 0.2%, de totes les cèl·lules que havien traspassat l'insert, i que per tant es trobaven adherides a la part externa de la membrana porosa d'aquest. Una vegada tenyits els inserts, es van realitzar fotografies aleatòries de 5 camps, mitjançant microscòpia òptica (Nikon Eclipse TE-2000E), i a continuació es van comptar les cèl·lules presents mitjançant el programari lliure ImageJ ver.2.0.0.

### 6.1.8 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Tots els experiments es van realitzar almenys tres vegades. Cadascuna de les condicions estudiava es va realitzar, com a mínim, utilitzant triplicats. Les dades representen la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard (SD) dels diferents experiments independents. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova ANOVA unidireccional (One way ANOVA), comparant els macròfags M0 i M2 envers els seus respectius macròfags generats en els diferents processos de polarització i reversió (M0 vs M1, M0-BCG i M2-M. *brumae*; M2 vs M2>M2, M2-BCG i M2-M. *brumae*), seguida de la prova post-hoc de Dunnett. Els gràfics i l'anàlisi estadística es van realitzar mitjançant el programa GraphPad Prism versió 8.0.1 (San Diego, CA, Estats Units). Les dades de l'anàlisi de la citometria de flux es van obtenir en el programa FACSDiva ver. 5.0 i es van analitzar en el programa FlowJo V10.0.7 (FlowJo, Estats Units). Per a la representació gràfica es van utilitzar les mitjanes aritmètiques i la seva desviació estàndard ( $\pm$ SD). Es van considerar diferències significatives quan el valor de  $p < 0.05$ .

## 6.2 RESULTATS

L'últim estudi que es va dur a terme va consistir en l'estudi fenotípic dels fenòmens de polarització i reversió en macròfags infectats amb el *M. bovis* BCG i el *M. brumae*. En primer lloc es van generar els diferents fenotips necessaris per a la realització de tots els experiments de l'estudi. Els canvis morfològics resultants de cada fenotip queden representats en la **Figura 38**.



**Figura 38. Morfologia dels diferents macròfags generats (M0, M1 i M2).**

Imatges de microscòpia representatives de cadascun dels fenotips obtinguts (X100, — 100µm). Abreviacions: PMA (Forbol 12-miristat 13-acetat); IFN-γ (Interferó-gamma); LPS (Lipolisacàrid).

### 6.2.1 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE MARCADORS DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR ASSOCIATS A MACRÒFAGS M0, M1 I M2

Una vegada observades les diferències morfològiques dels diferents macròfags es va procedir a determinar l'expressió de determinats marcadors de superfície relacionats amb els diferents perfils fenotípics que pot mostrar un macròfag i que en determinen la seva funcionalitat. Alhora aquests macròfags van sotmetre's a una infecció de *M. bovis* BCG i *M. brumae* per observar possibles canvis en l'expressió d'aquests marcadors de superfície. La tècnica utilitzada per a valorar aquests canvis va ésser la citometria de flux. Les diferents condicions i/o tractaments utilitzats per a la generació, polarització i reversió de la polarització d'aquests macròfags queden resumits en la **Taula 19**.

**Taula 19. Condicions i tractaments emprats per a la diferenciació, polarització i reversió de macròfags.**

Tractaments	M0	M1	BCG	<i>M. brumae</i>	M2	M2>M1	M2-BCG	M2- <i>M. brumae</i>
PMA	+	+	+	+	+	+	+	+
IFN-γ + LPS	-	+	-	-	-	+	-	-
DXM	-	-	-	-	+	+	+	+
Infecció	-	-	+	+	-	-	+	+

Abreviacions: DXM (Dexametasona); IFN-γ (Interferó gamma); LPS (Lipolisacàrid); i PMA ( Forbol 12-miristat 13 acetat);

Els resultats obtinguts van revelar la capacitat del *M. bovis* BCG i del *M. brumae* de revertir el fenotip M2 disminuint els percentatges d'expressió de marcadors associats al fenotip M2 (CD163 i CD206) incrementant els percentatges d'expressió dels marcadors de superfície cel·lular associats al fenotip M1 (CD80 i CD86) (**Figura 39**).

### CAPÍTOL III. Resultats

Quan es van provar dues MOIs diferents (0.1 i 1:1, en el cas del *M. bovis* BCG i 2:1 i 10:1, en el cas del *M. brumae*) es va observar un efecte depenent de la dosi en tots els escenaris estudiats, tal com es pot observar en la **Taula 20**.

Si els resultats s'analitzen amb més detall, tot i observar-se una expressió constitutiva de CD86 en els macròfags no activats (M0), l'activació d'aquests macròfags M0 per mitjà de la infecció amb ambdós micobacteris va mostrar un augment significatiu de la seva expressió respecte els valors que aquests macròfags mostraven de forma basal ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 39A**). Quan es va comparar l'efecte de cada micobacteri, es va observar un percentatge significativament major en l'expressió del marcador de superfície CD80 en els macròfags M2 infectats amb el *M. brumae* (MOI 10:1) en comparació amb els macròfags M2 que havien estat infectats amb el *M. bovis* BCG (MOI 1:1) ( $64.13 \pm 9.22$  vs  $56.75 \pm 3.39$ ,  $p < 0.05$ ).

**Taula 20.** Percentatge d'expressió dosi-dependent dels marcadors de superfície CD80 i CD86 (fenotip M1), CD163 i CD206 (fenotip M2).

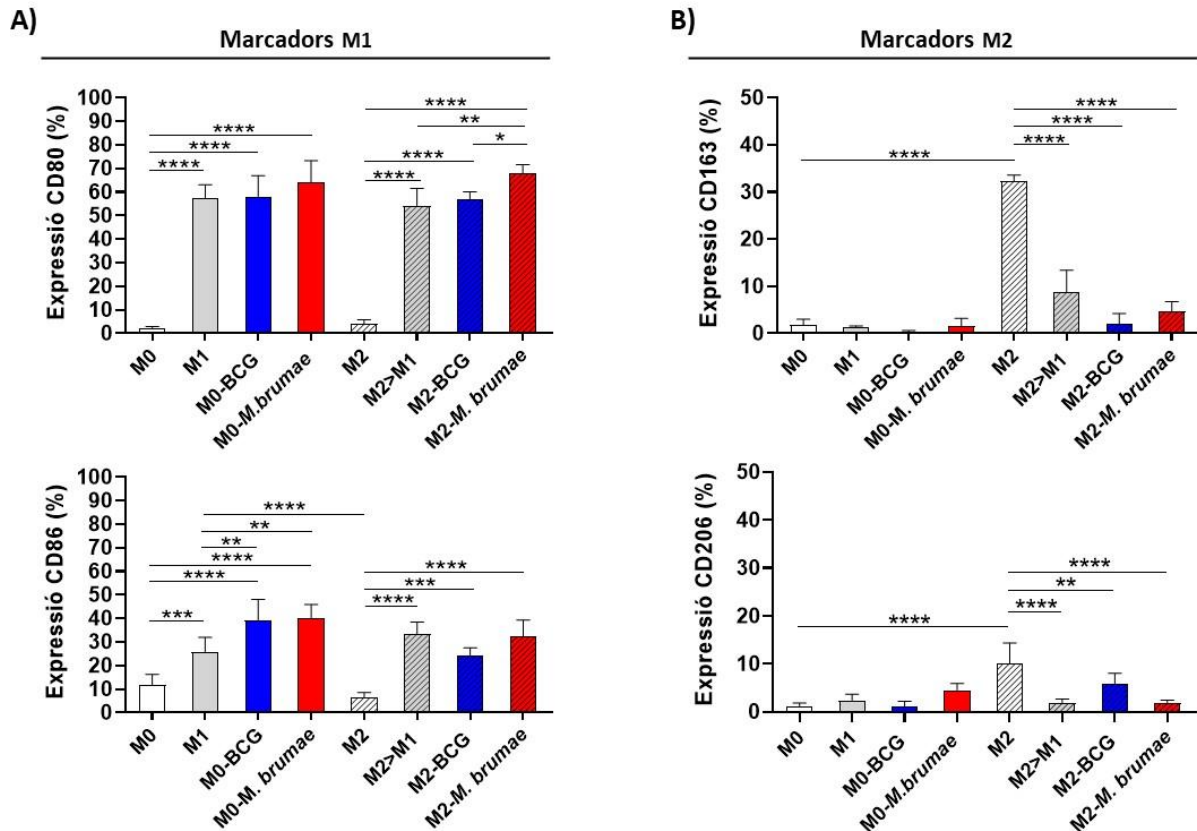
Condicions de cultiu	Marcadors de superfície			
	CD80	CD86	CD163	CD206
	(%) $\pm$ SD	(%) $\pm$ SD	(%) $\pm$ SD	(%) $\pm$ SD
<b>M0</b>	2.37 $\pm$ 0.60	11.90 $\pm$ 4.43	1.85 $\pm$ 1.15	1.00 $\pm$ 0.79
<b>M1</b>	57.53 $\pm$ 5.58	25.78 $\pm$ 6.21	1.23 $\pm$ 0.35	2.20 $\pm$ 1.50
<b>BCG (0.1:1)</b>	26.03 $\pm$ 4.64	16.98 $\pm$ 4.83	0.65 $\pm$ 0.63	0.60 $\pm$ 0.29
<b>BCG (1:1)</b>	58.13 $\pm$ 8.83	39.33 $\pm$ 8.75	0.35 $\pm$ 0.28	0.72 $\pm$ 0.79
<b><i>M. brumae</i> (2:1)</b>	38.45 $\pm$ 4.57	23.68 $\pm$ 10.26	2.38 $\pm$ 1.90	3.15 $\pm$ 0.62
<b><i>M. brumae</i> (10:1)</b>	64.13 $\pm$ 9.22	40.25 $\pm$ 5.71	1.50 $\pm$ 1.69	4.50 $\pm$ 1.40
<b>M2</b>	3.83 $\pm$ 2.03	6.45 $\pm$ 2.18	32.25 $\pm$ 1.34	10.13 $\pm$ 4.23
<b>M2&gt;M1</b>	54.08 $\pm$ 7.43	33.42 $\pm$ 5.07	8.70 $\pm$ 4.70	1.78 $\pm$ 0.86
<b>M2-BCG (0.1:1)</b>	26.20 $\pm$ 6.21	22.13 $\pm$ 6.37	8.48 $\pm$ 3.99	5.85 $\pm$ 1.18
<b>M2-BCG (1:1)</b>	56.75 $\pm$ 3.39	24.45 $\pm$ 3.11	1.92 $\pm$ 1.23	5.88 $\pm$ 2.19
<b>M2-<i>M. brumae</i> (2:1)</b>	34.43 $\pm$ 7.63	24.05 $\pm$ 1.68	7.60 $\pm$ 1.75	3.15 $\pm$ 0.62
<b>M2-<i>M. brumae</i> (10:1)</b>	68.15 $\pm$ 3.51	32.68 $\pm$ 7.02	4.65 $\pm$ 2.13	1.87 $\pm$ 0.59

Abreviacions: MOI (multiplicitat d'infecció) i SD (Desviació estàndard). Els macròfags M0 i M2 van ésser infectats amb 2 MOIs diferents de BCG (0.1:1 i 1:1) i *M. brumae* (2:1 i 10:1). Els percentatges d'expressió de cada marcador de superfície van ésser calculats segons la suma d'expressió simple i/o doble de marcadors M1 o M2, respectivament. Tots els valors queden representats com la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments independents.

Quan els macròfags M2 es van infectar amb micobacteris (M2-*M. brumae* i M2-BCG), es va observar un augment significatiu dels marcadors M1 (**Figura 39A**) juntament amb una disminució estadísticament significativa dels marcadors de superfície associats als macròfags M2 (**Figura 39B**). En aquest cas, l'expressió de CD163 i CD206 es va reduir significativament en macròfags M2 infectats amb el *M. bovis* BCG (M2-BCG) ( $1.92 \pm 1.23$ ,  $p < 0.0001$ ; i  $5.88 \pm 2.19$ ,  $p < 0.01$ , respectivament) i macròfags M2 infectats amb el *M. brumae* (M2-*M. brumae*) ( $4.65 \pm 2.13$ ,  $p < 0.0001$ ; i  $1.87 \pm 0.59$ ,  $p < 0.0001$ , respectivament).



El mateix va succeir quan es van comparar els controls de la reversió (M2>M1) amb els macròfags M2 sotmesos a la infecció per *M. brumae* ( $p<0.01$ ) (Figura 39A). En la Figura 40 s'observen els diferents gràfics de punts (*dot-plots*) relatiu a la expressió individual i conjunta dels marcadors de superfície CD80/CD86 i CD163/CD206.



**Figura 39. Percentatge d'expressió de marcadors de superfície cel·lular associats als diferents fenotips de macròfags**

(A) Expressió de marcadors CD80 i CD86 associats al fenotip de macròfags M1. (B) Expressió de marcadors CD163 i CD206 associats al fenotip de macròfags M2. M0 (blanc), M1 (gris), M0-BCG (blau), M0-*M. brumae* (vermell), M2 (blanc rallat), M2>M1 (gris rallat), M2-BCG (blau rallat) i M2-*M. brumae* (vermell rallat). MOIs (*M. bovis* BCG, 1:1; *M. brumae*, 10:1). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de com a mínim 3 experiments diferents. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA comparant els macròfags M0 i M2 envers els seus respectius macròfags generats en els diferents processos de polarització i reversió. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

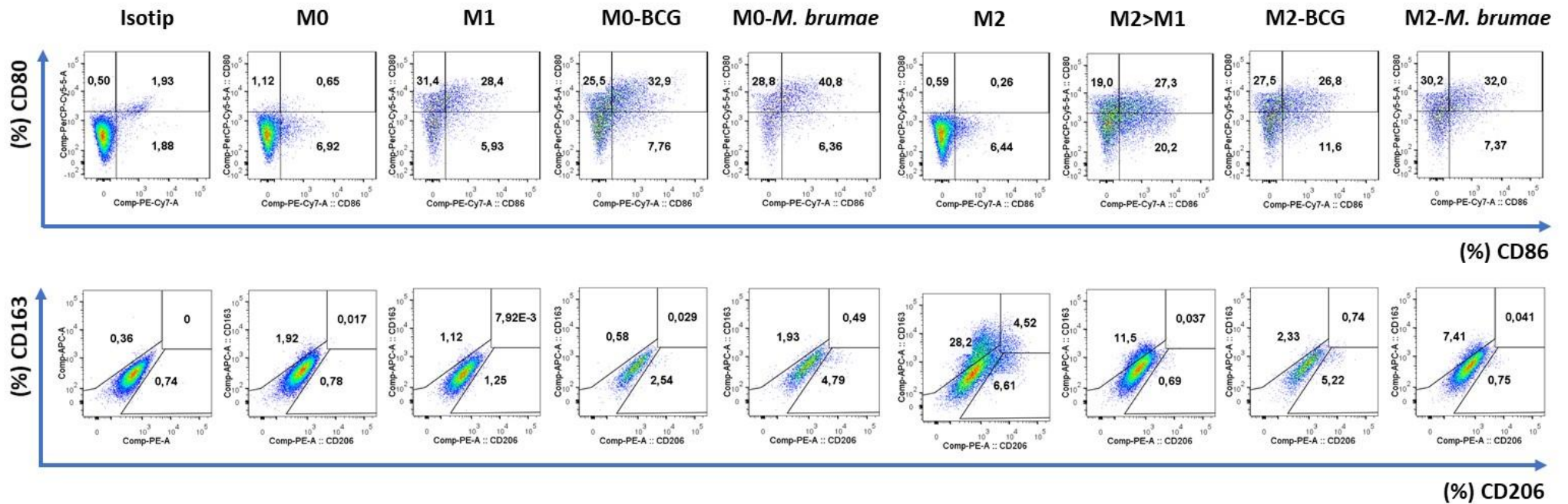


Figura 40. Gràfics de punts (*dot-plots*) representatius de les diferents combinacions d'anticossos utilitzats en l'anàlisi de la polarització i la reversió de macròfags.

Abreviacions: BCG (*M. bovis* BCG). Els gràfics de punts mostren l'expressió dels diferents anticossos utilitzats per a determinar l'expressió individual i conjunta de les parelles de marcadors de superfície CD80/CD86 i CD163 /CD206.

### 6.2.2 AVALUACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES

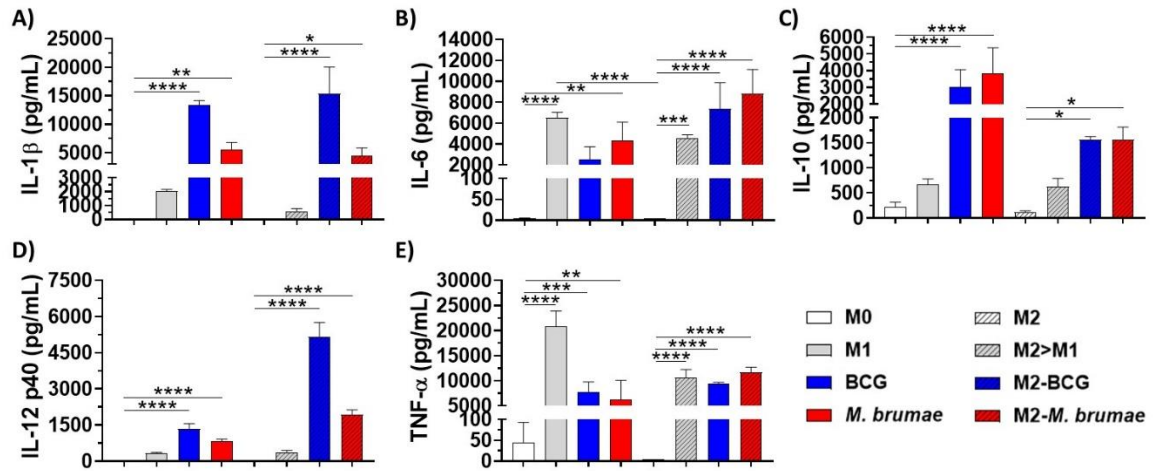
La infecció dels macròfags M0 i M2 amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG va desencadenar la producció de citocines de manera dosi-dependent (MOI 0.1:1 i 1:1, en el cas del *M. bovis* BCG; MOI 2:1 i 10:1, quan els macròfags s'infectaren amb el *M. brumae*) tal es pot observar en la **Taula 21**.

En tots els casos, els macròfags M0 i M2 van augmentar significativament la secreció, respecte als macròfags no infectats, de les citocines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 i IL-12-p40 i TNF- $\alpha$ , quan aquests van ser infectats amb el *M. brumae* (MOI 10:1) o el *M. bovis* BCG (MOI 1:1) (**Figura 41**). En el cas de la producció d' IL-6, IL-12 i TNF- $\alpha$ , la producció d'aquestes citocines va resultar significativament superior en els macròfags M2 infectats amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG respecte la quantitat de citocines detectada en el seu respectiu control (M2) (**Figura 41A, D, E**). La producció d'IL-1 $\beta$  va ser similar entre els macròfags M0 i M2 infectats per micobacteris (**Figura 41A**). Al contrari, la producció d'IL-10 es va reduir en la infecció per micobacteris en macròfags M2, en comparació amb la producció d'IL-10 observada en macròfags M0 després de la infecció amb ambdós micobacteris (**Figura 41C**).

Taula 21. Producció dosi-dependent de citocines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 p40 i TNF- $\alpha$ ,) en els diferents fenotips de macròfags generats.

Condicions de cultiu	Citocines				
	IL-1 $\beta$ (pg/mL $\pm$ SD)	IL-6 (pg/mL $\pm$ SD)	IL-10 (pg/mL $\pm$ SD)	IL-12 p40 (pg/mL $\pm$ SD)	TNF- $\alpha$ (pg/mL $\pm$ SD)
M0	19.65 $\pm$ 13.38	4.50 $\pm$ 0.99	225.84 $\pm$ 88.66	ND	44.98 $\pm$ 47.33
M1	2034.68 $\pm$ 127.42	6509.93 $\pm$ 521.69	667.17 $\pm$ 113.08	324.11 $\pm$ 38.45	20816.25 $\pm$ 3084.46
BCG (0.1:1)	1743.38 $\pm$ 514.95	281.99 $\pm$ 140.05	1047.45 $\pm$ 223.98	301.03 $\pm$ 51.62	6396.63 $\pm$ 1164.60
BCG (1:1)	13319.50 $\pm$ 828.31	2535.70 $\pm$ 1204.48	3032.50 $\pm$ 1024.00	1331.93 $\pm$ 223.37	9090.58 $\pm$ 700.33
<i>M. brumae</i> (2:1)	1340.15 $\pm$ 316.82	928.23 $\pm$ 607.37	1360.65 $\pm$ 100.54	242.75 $\pm$ 27.91	4086.80 $\pm$ 1259.36
<i>M. brumae</i> (10:1)	5585.28 $\pm$ 1234.78	4363.70 $\pm$ 1731.74	3820.55 $\pm$ 1544.68	826.18 $\pm$ 92.46	6213.98 $\pm$ 3896.52
M2	21.00 $\pm$ 7.78	ND	111.39 $\pm$ 33.43	ND	ND
M2>M1	549.28 $\pm$ 227.26	4576.15 $\pm$ 303.43	727.13 $\pm$ 48.87	381.17 $\pm$ 57.94	10578.13 $\pm$ 1658.88
M2-BCG (0.1:1)	1162.95 $\pm$ 694.41	415.84 $\pm$ 85.51	1243.68 $\pm$ 209.50	702.01 $\pm$ 398.34	1166.27 $\pm$ 643.62
M2-BCG (1:1)	15373.00 $\pm$ 4653.86	7364.50 $\pm$ 2515.07	1563.03 $\pm$ 62.85	5171.43 $\pm$ 583.04	9369.80 $\pm$ 306.96
M2- <i>M. brumae</i> (2:1)	1009.72 $\pm$ 460.55	1421.73 $\pm$ 341.15	1154.50 $\pm$ 51.53	469.70 $\pm$ 73.39	991.49 $\pm$ 620.94
M2- <i>M. brumae</i> (10:1)	4430.48 $\pm$ 1431.62	8830.15 $\pm$ 2295.42	1773.95 $\pm$ 7.85	1921.63 $\pm$ 205.90	11675.73 $\pm$ 1016.65

**Abreviacions:** BCG (*M. bovis* BCG); IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 beta); IL-6 (Interleucina 6); IL10 (Interleucina 10); IL-12 p40 (Interleucina 12 subunitat p40); TNF- $\alpha$  (factor de necrosi tumoral-alfa); MOI (Multiplicitat d'infecció); ND (No detectada); i SD (Desviació estàndard). Els macròfags M0 i M2 van ésser infectats amb dues MOIs diferents de *M. bovis* BCG (0.1:1 i 1:1) i *M. brumae* (2:1 i 10:1). Tots els valors queden representats com la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments diferents.



**Figura 41. Anàlisi de la producció de citocines**

Nivells de producció d' IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-12 p40 (D) i TNF- $\alpha$  (E). M0 (blanc), M1 (gris), M0-BCG (blau), M0-*M. brumae* (vermell), M2 (blanc rerrat), M2>M1 (gris rerrat), M2-BCG (blau rerrat) i M2-*M. brumae* (vermell rerrat). MOIs (*M. bovis* BCG, 1:1; *M. brumae*, 10:1). Abreviacions: BCG (*M. bovis* BCG). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments diferents. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA comparant els macròfags M0 i M2 envers els seus respectius macròfags generats en els diferents processos de polarització i reversió de la polarització \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001

### 6.2.3 ANÀLISI DE LA INHIBICIÓ DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR EN CÈL·LULES TUMORALS DE BUFETA

A més de l'anàlisi de la producció de citocines, els sobrenedants procedents de cadascun dels cultius dels macròfags van ser utilitzats per a testar la inhibició de la proliferació cel·lular en dues línies tumorals de bufeta de grau 3 (T24 i J82) i una línia de grau 2 (5637). Aquestes, van ser cultivades durant 72 hores amb cadascun dels sobrenedants obtinguts en els diferents processos de diferenciació, polarització i reversió de la polarització (veure **Taula 17** del material i mètodes del capítol III).

En tots els escenaris, exceptuant les cèl·lules tumorals que havien estat exposades als sobrenedants dels macròfags no activats (M0) i macròfags tractats amb dexametasona (M2), es va observar una disminució de la proliferació de les cèl·lules tumorals de bufeta (**Figura 42**). Els percentatges de la inhibició de la proliferació cel·lular es poden consultar a la **Taula 22**. Concretament, els percentatges d'inhibició majors, respecte les cèl·lules cultivades amb medi de cultiu complet, es van observar en les cèl·lules T24 tractades amb el sobrenedant de macròfags M0 i M2 infectats amb el *M. brumae* ( $50.38 \pm 12.62$ ;  $54.31 \pm 9.31$ ). D'altre banda, les línies cel·lulars tractades amb sobrenedants de macròfags M2 van mostrar percentatges d'inhibició molt menors respecte els observats en d'altres condicions (T24,  $88.86 \pm 10.71$ ; J82,  $89.98 \pm 2.63$ ; i 5637,  $84.02 \pm 3.87$ ). Tot i no mostrar diferències significatives, els percentatges de proliferació cel·lular van resultar menors en totes les cèl·lules tumorals de bufeta (T24, J82 i 5637) tractades amb sobrenedants de macròfags infectats amb *M. brumae* (M0 i M2-*M. brumae*) respecte aquells que s'originaven en macròfags infectats amb *M. bovis* BCG (M0 i M2-BCG) (**Figura 42A-C**). A més, en les línies tumorals J82 i 5637 es van observar diferències significatives entre el percentatge de la inhibició de la proliferació cel·lular observada en cèl·lules tractades amb sobrenedants de macròfags M0 i els percentatges mostrats en els macròfags M2, mostrant aquests últims uns percentatges major d'inhibició de la proliferació cel·lular (J82,  $p$ <0.05 i 5637  $p$ <0.0001) (**Figura 42B,C**).

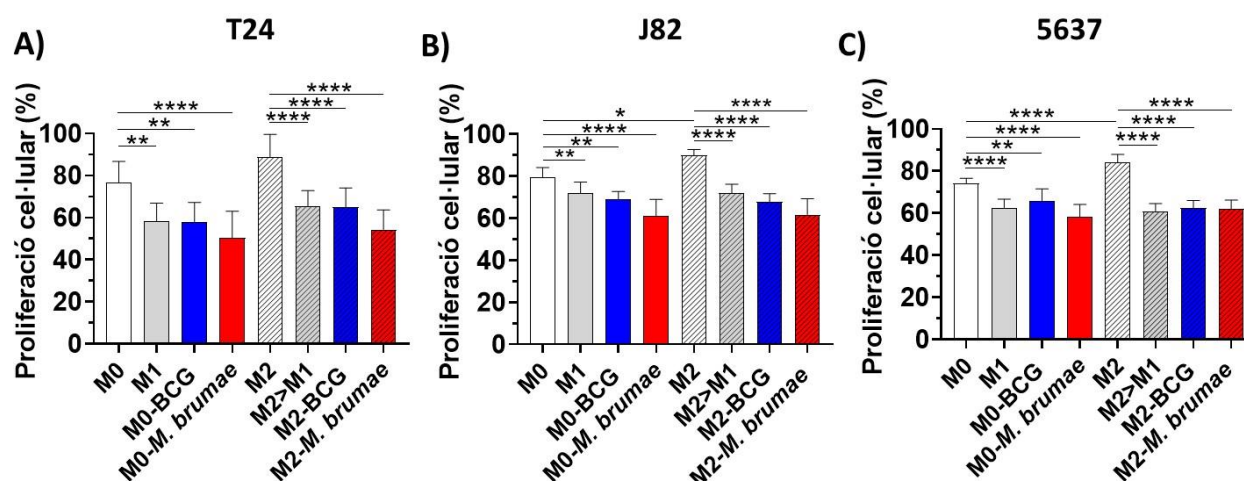


Figura 42. Anàlisi de la inhibició de la proliferació cel·lular

Proliferació cel·lular en línies tumorals de bufeta T24 (A), J82 (B) i 5637 (C) tractades amb sobrenedants dels diferents macròfags generats. Abreviacions: BCG (*M. bovis* BCG). M0 (blanc), M1 (gris), M0-BCG (blau), M0-*M. brumae* (vermell), M2 (blanc rerrat), M2>M1 (gris rerrat), M2-BCG (blau rerrat) i M2-*M. brumae* (vermell rerrat). Els percentatges fan referència a la inhibició del creixement respecte les cèl·lules sense infectar (100%). Les dades s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments diferents. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA comparant els macròfags M0 i M2 envers els seus respectius macròfags generats en els diferents processos de polarització i reversió (M0 vs M1, M0-BCG i M2-*M. brumae*; M2 vs M2>M2, M2-BCG i M2-*M. brumae*). Valor  $p$ ; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\*\* $p$ <0.0001.

Taula 22. Percentatges de la proliferació cel·lular

Sobrenedant	Línia cel·lular					
	T24		J82		5637	
	(% $\pm$ SD)	Valor $p$	(% $\pm$ SD)	Valor $p$	(% $\pm$ SD)	Valor $p$
<b>M0</b>	76.56 $\pm$ 10.13	ns <sup>1</sup>	79.55 $\pm$ 4,59	<0.05 <sup>1</sup>	74.11 $\pm$ 2.41	<0.0001 <sup>1</sup>
<b>M1</b>	58.23 $\pm$ 8.62	<0.01	71.9 $\pm$ 5,312	<0.01	62.55 $\pm$ 3.97	<0.0001
<b>M0-BCG</b>	58.02 $\pm$ 9.21	<0.01	68,84 $\pm$ 3,89	<0.01	65.83 $\pm$ 5.70	<0.01
<b>M0-<i>M. brumae</i></b>	50.35 $\pm$ 12.62	<0.0001	61,04 $\pm$ 7,93	<0.0001	58.31 $\pm$ 5.76	<0.0001
<b>M2</b>	88.86 $\pm$ 10.71	ns <sup>1</sup>	89.98 $\pm$ 2.63	<0.05 <sup>1</sup>	84.02 $\pm$ 3.87	<0.0001 <sup>1</sup>
<b>M2&gt;M1</b>	65.52 $\pm$ 7.31	<0.0001	71.91 $\pm$ 4.27	<0.0001	60.9 $\pm$ 3,65	<0.0001
<b>M2-BCG</b>	64.99 $\pm$ 9.06	<0.0001	67.69 $\pm$ 4.04	<0.0001	62.35 $\pm$ 3,60	<0.0001
<b>M2-<i>M. brumae</i></b>	54.31 $\pm$ 9.31	<0.0001	61.73 $\pm$ 7.55	<0.0001	61.76 $\pm$ 4.39	<0.0001

Abreviacions: BCG (*M. bovis* BCG); ns (no significatiu); i SD (Desviació estàndard). Els percentatges fan referència a la inhibició del creixement respecte les cèl·lules sense infectar (100%). Es van establir diferències significatives mitjançant la prova one-way ANOVA que comparava els macròfags M0 i M2 envers els respectius macròfags generats en els diferents processos de polarització i de reversió d'aquesta (M0 vs M1, M0-BCG i M0-*M. brumae*; M2 vs M2>M2, M2-BCG i M2-*M. brumae*).<sup>1</sup> M0 vs M2 o M2 vs M0.

#### 6.2.4 ANÀLISI DE LA MIGRACIÓ I LA INVASIVITAT CEL·LULAR DE CÈL·LULES TUMORALS DE BUFETA EXPOSADES A DIFERENTS MC DE MACRÒFAGS INFECTATS AMB MICOBACTERIS

Per finalitzar l'estudi de fenotípic dels fenòmens de polarització i reversió en macròfags es van realitzar diferents assaigs de migració i invasivitat cel·lular. Concretament, es va investigar l'efecte de l'ús de medis condicionats (MC), derivats dels diferents fenotips de macròfags generats durant l'estudi, en els processos de migració i invasivitat cel·lular de diferents línies tumorals de bufeta. En aquest cas, l'estudi va conduir-se en les línies tumorals de bufeta T24 i J82 de grau 3 de diferenciació.

El primer resultat rellevant observat va ésser l'increment significatiu de la migració en les cèl·lules de la línia tumoral T24 que havien estat tractades amb MC originari de macròfags M2, i per tant tractats amb DXM, en comparació a aquelles cèl·lules tumorals que havien estat tractades amb MC de macròfags no activats (M0) ( $p < 0.001$ ). A més, quan les cèl·lules T24 van ésser tractades amb MC de macròfags M0 i M2 que havien estat sotmesos a la infecció de *M. brumae* i *M. bovis* BCG, es va observar una davallada significativa dels recomptes de migració cel·lular en ambdós tractaments ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 43**).

Respecte la invasivitat avaluada en la línia tumoral T24, es va apreciar el mateix comportament en les cèl·lules tractades amb dexametasona (M2) i les cèl·lules no tractades (M0) ( $p < 0.001$ ). Altra vegada (com en el cas del fenomen de migració), el tractament mitjançant MC de macròfags M0 i M2, prèviament infectats amb ambdós micobacteris, es va traduir en recomptes significativament inferiors de cèl·lules T24 amb capacitat invasiva (**Figura 43**).

En el cas de la línia tumoral J82, la comparació entre els les cèl·lules tractades amb MC de macròfags M0 i MC de macròfags M2 també va resultar estadísticament significativa, mostrant recomptes superiors de cèl·lules que havien aconseguit migrar en el cas d'haver utilitzat MC de macròfags M2 ( $p < 0.05$ ). Els MC infectats amb ambdós micobacteris van produir el mateix efecte observat en la línia T24 i per tant els recomptes de cèl·lules van mostrar-se reduïts significativament en tots els escenaris (M0 i M2 *M. brumae* i *M. bovis* BCG) ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 44**).

Per últim, els resultats obtinguts en referència a la invasivitat de la línia tumoral J82 van mostrar recomptes superiors de cèl·lules tractades amb MC de macròfags M2, respecte les cèl·lules que havien estat en contacte amb MC de macròfags M0 ( $p < 0.01$ ). En aquest cas, totes les cèl·lules tractades amb MC procedents de macròfags M0 infectats amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG van mostrar una reducció significativa similar als recomptes de cèl·lules que havien presentat invasivitat ( $p < 0.0001$ ). En el cas d'haver tractat les cèl·lules J82 amb els MC de macròfags M2 infectats, tot i observar-se una reducció significativa en els recomptes de cèl·lules, aquests van ser lleugerament superiors en nombres absoluts respecte els recomptes observats en les cèl·lules tractades amb MC de macròfags M0 infectats amb ambdós micobacteris ( $p < 0.001$ ) (**Figura 44**).

T24

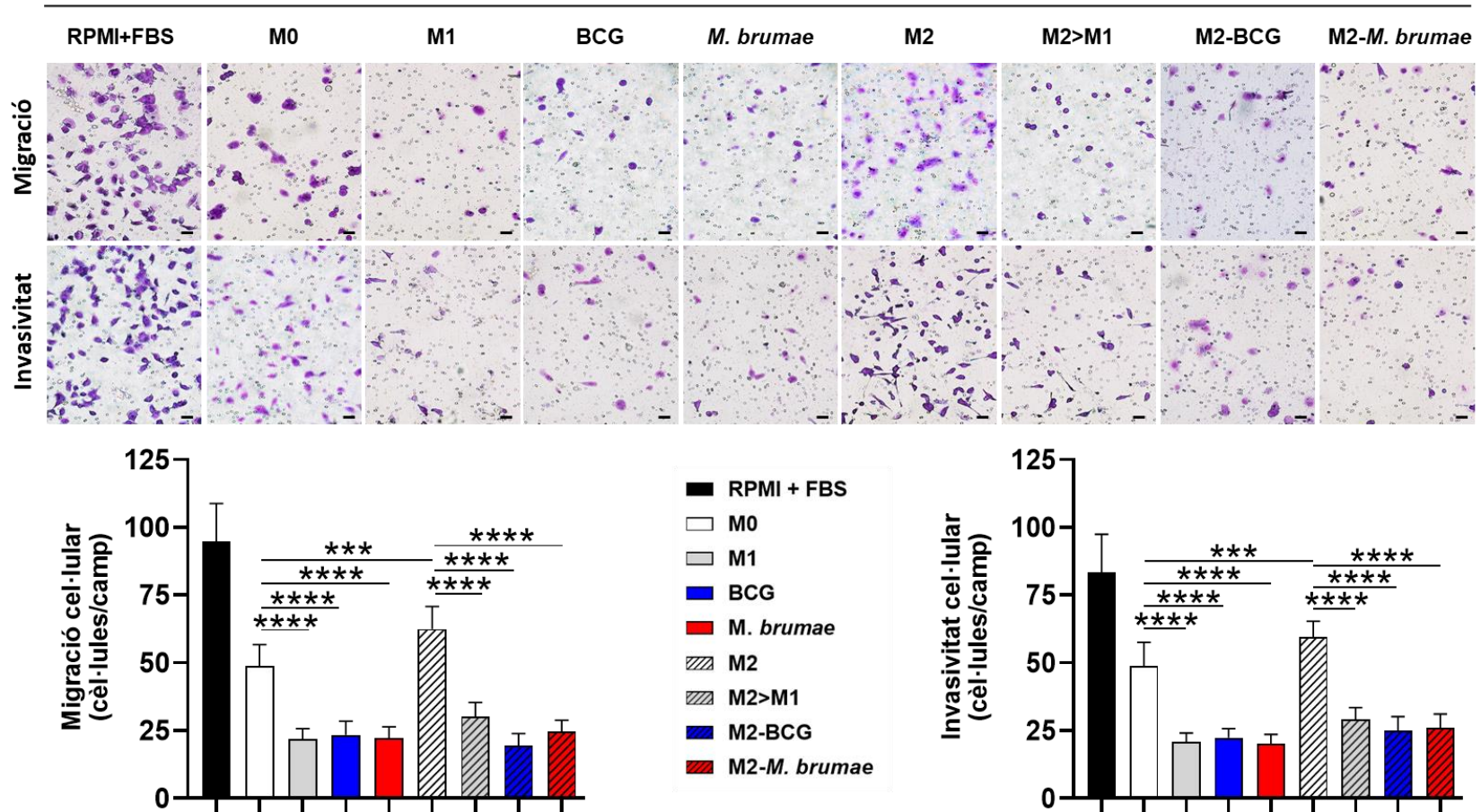


Figura 43. Assaigs de migració i invasiuïtat cel·lular en la línia tumoral de bufeta T24.

**A)** Imatges representatives (X100, 100µm) i **(B)** recomptes de de migració i invasiuïtat de les línies tumorals de bufeta. Els experiments es van realitzar utilitzant medis condicionats procedents de macròfags sotmesos als diferents processos de diferenciació, polarització i reversió realitzats al llarg de l'estudi. M0 (blanc), M1 (gris), M0-BCG (blau), M0-*M. brumae* (vermell), M2 (blanc ratllat), M2>M1 (gris ratllat), M2-BCG (blau ratllat) i M2-*M. brumae* (vermell ratllat) Els valors s'expressen com la mitjana ± SD de tres experiments independents. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA comparant els recomptes de cèl·lules resultants de la utilització, com a quimioatracient, de MC de macròfags M0 i M2 envers els MC dels macròfags generats en els diferents processos de polarització i de reversió de la polarització (M0 vs M1, M0-BCG i M2-*M. brumae*; M2 vs M2>M2, M2-BCG i M2-*M. brumae*).\*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



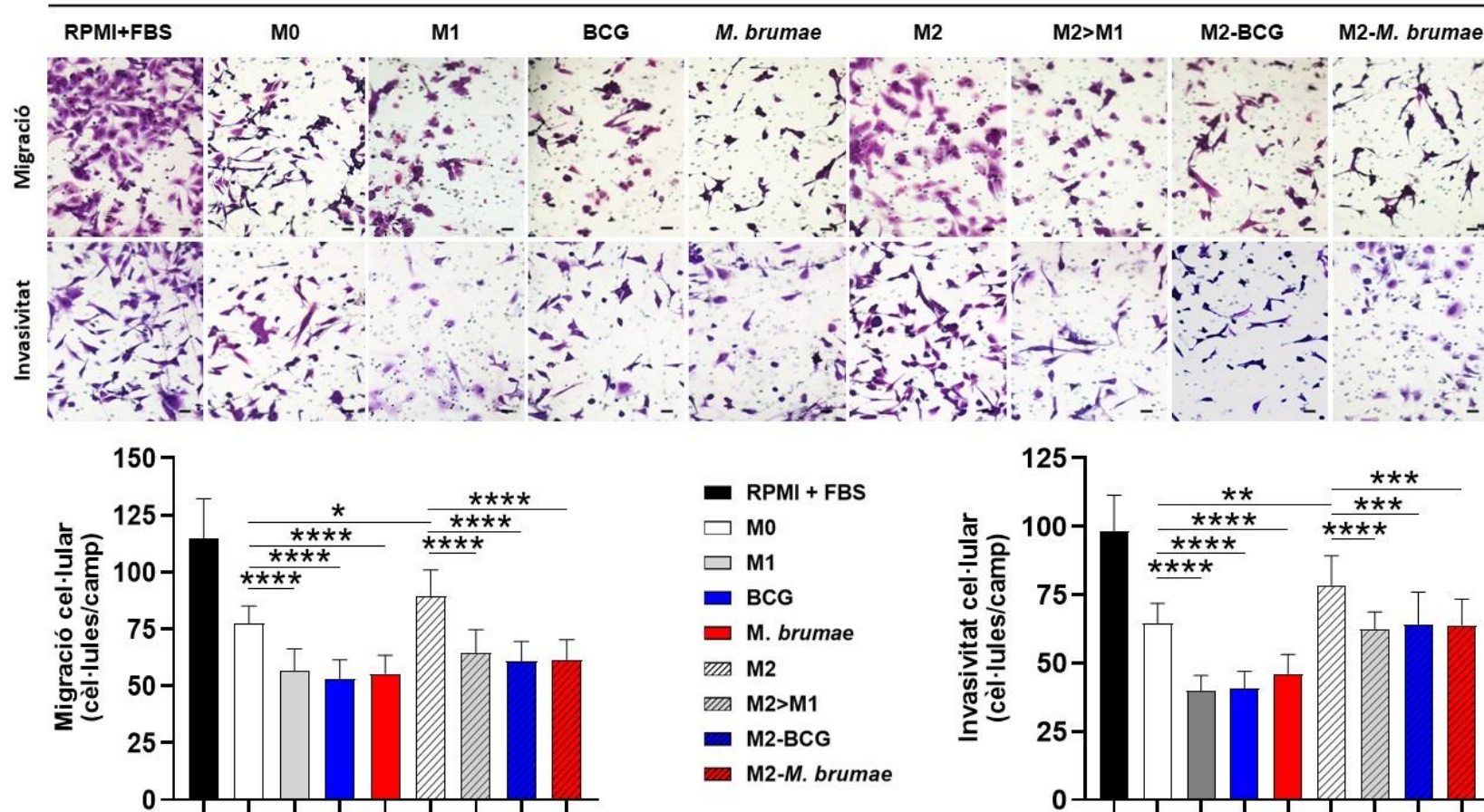


Figura 44. Assaigs de migració i invasivitat cel·lular en la línia tumoral de bufeta J82.

**A)** Imatges representatives (X100, — 100µm) i **B)** recomptes de de migració i invasivitat de les línies tumorals de bufeta. Els experiments es van realitzar utilitzant medis condicionats procedents de macròfags sotmesos als diferents processos de diferenciació, polarització i reversió realitzats al llarg de l'estudi. M0 (blanc), M1 (gris), M0-BCG (blau), M0-*M. brumae* (vermell), M2 (blanc rerrat), M2>M1 (gris rerrat), M2-BCG (blau rerrat) i M2-*M. brumae* (vermell rerrat) Els valors s'expressen com la mitjana ± SD de tres experiments independents. Es van establir diferències significatives mitjançant la prova One-way ANOVA comparant els recomptes de cèl·lules resultants de la utilització, com a quimioattractant, de MC de macròfags M0 i M2 envers els MC dels macròfags generats en els diferents processos de polarització i de reversió de la polarització (M0 vs M1, M0-BCG i M2-*M. brumae*; M2 vs M2>M2, M2-BCG i M2-*M. brumae*). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  i \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 6.3 DISCUSSIÓ DE RESULTATS

L'últim apartat d'aquesta tesi va fer èmfasi en l'avaluació del potencial immunodulador dels micobacteris en el microambient tumoral. Concretament, l'objectiu d'aquest estudi va consistir en observar si la infecció amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG era capaç de revertir la polarització de macròfags M2, aprofitant la plasticitat que els caracteritza, en macròfags M1 per a saber si aquests micobacteris poden actuar com a agents inductors d'aquest fenomen.

Tal com s'ha esmentat en l'apartat 1.3.2 de la introducció, els TAMs representen els principals components immunitaris del microambient tumoral. Aquests, mantenen un paper principal en el desenvolupament i la invasivitat del tumor [221,222]. No obstant això, els macròfags experimenten una diferenciació específica segons l'entorn i el tipus de teixit en el qual es localitzen podent-se classificar en dos estats de polarització diferents amb funcionalitats contraposades. D'aquesta manera podem distingir els macròfags del tipus M1 (M1), amb una funcionalitat proinflamatòria i antitumoral; i els macròfags del tipus M2 (M2), amb característiques pro-tissulars i antiinflamatòries [223]. Tanmateix, estudis actuals han demostrat que la població de TAMs es troba en un estat constant de transició entre els dos estats de polarització (TAMs M1 i TAMs M2)[224]. Tot i així, una estimulació adequada, per exemple deguda a una infecció bacteriana, pot modular les característiques protissulars i antiinflamatòries dels macròfags pro-tumorals (TAMs M2) en macròfags amb activitat proinflamatòria i tumoricida (TAMs M1) a causa de les propietats de plasticitat que presenten els macròfags [225,226].

En aquest estudi, vam ser capaços de generar macròfags no activats (M0), a partir de la diferenciació de monòcits de la línia THP-1; macròfags activats per la via clàssica (M1), mitjançant l'activació per mitjà de l'INF- $\gamma$  i el LPS; i de macròfags antiinflamatoris (M2), a través de l'activació d'aquests a través de la dexametasona, un potent glucocorticoide. Una vegada generats els diferents macròfags, es va procedir a la infecció dels macròfags M0 i M2 amb dues MOIs diferents del *M. brumae* i el *M. bovis* BCG.

Els nostres resultats van demostrar que la infecció pel *M. brumae* i el *M. bovis* BCG desencadenava un perfil M1 tant en macròfags no activats (M0) com en macròfags amb un fenotip antiinflamatori (M2). Els resultats obtinguts van mostrar un augment de l'expressió de marcadors de superfície M1 i en la producció de citocines proinflamatòries per part de tots els macròfags que havien estat exposats a la infecció per ambdós micobacteris. De fet, aquest fenomen de la polarització així com l'increment de diverses citocines proinflamatòries, ja es va observar en l'estudi realitzat per Liu *et al* [227]. La diferència respecte el nostre estudi és que Liu i els seus col·laboradors van realitzar l'estudi en la línia cel·lular murina RAW264.7. D'altra banda, existeixen alguns estudis que han utilitzat una estratègia similar per al tractament de diferents tipus de càncer. Un exemple és el de l'estudi realitzat per Lardone *et al* [228]. En aquest cas, l'estudi es va realitzar en el context del microambient tumoral del melanoma. Concretament, es van infectar macròfags M2, generats a partir de monòcits humans de sang perifèrica, amb el *M. bovis* BCG. Aleshores, es va analitzar l'expressió de marcadors relacionats amb el fenotip M2 observant que aquests disminuïen en macròfags que havien estat infectats amb el micobacteri.

Respecte a l'anàlisi d'expressió de marcadors de superfície cel·lular associats als diferents estats de polarització dels macròfags, els nostres resultats van mostrar un augment significatiu, dosi-dependent, en referència a l'expressió de marcadors M1, en aquest cas el marcador CD80 i el marcador CD86, en el

context de la infecció de macròfags M0 (**Taula 20**) (**Figura 39A**). En paral·lel, es va analitzar l'expressió dels marcadors CD163 i CD206, ambdós associats al fenotip M2. En aquest cas, els macròfags M2 van resultar ser els únics macròfags que van mostrar expressió d'aquests marcadors. Concretament, el marcador que va mostrar una expressió més significativa va ser el CD163+ (**Figura 39B**). Aquesta troballa resulta interessant, ja que s'ha observat que en pacients amb un diagnòstic de NMIBC d'alt risc (T1), que la presència de macròfags CD163+, prèvia al tractament, està associada amb un major risc de recurrència de la malaltia, d'invasió i de progressió a etapes metastàtiques [135,229]. Per tant, el fet d'haver aconseguit generar macròfags que expressessin aquest marcador ens resultava útil per avaluar si la infecció d'aquests macròfags M2 amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG era capaç de reduir la seva expressió i per tant, de revertir la polarització d'aquests macròfags a un fenotip M1, conegut per a la seva activitat proinflamatòria i antitumoral. Els resultats obtinguts d'aquest estudi *in vitro* segueixen la línia dels resultats obtinguts per Tan i els seus col·legues quan van demostrar la capacitat del *M. bovis* BCG, mitjançant una infecció intravenosa, d'activar macròfags amb un fenotip antitumoral (M1) en un model murí ortotòpic de càncer de bufeta [230].

En referència a la detecció de citocines produïdes pels diferents fenotips de macròfags, els resultats obtinguts en l'anàlisi d'aquestes van mostrar un augment significatiu dels nivells d'IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12 p40 en ambdós macròfags infectats amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG respecte els macròfags M0 i M2 que no havien estat infectats (**Figura 41**). De fet, resulta rellevant remarcar la producció de TNF- $\alpha$  ja que la seva producció està relacionada amb una disminució de l'expressió del marcador CD163, característic dels TAMs M2 [231]. Aquests resultats concorden amb la bibliografia existent [232]. La novetat és, que a diferència de l'estudi anterior, en el present estudi es van incorporar els macròfags M2. Tanmateix, vam observar un augment de la secreció d'IL-10, una citocina antiinflamatòria, en macròfags infectats amb M0 i M2. La producció d'IL-10 en macròfags infectats amb micobacteris no és una troballa poc freqüent i aquesta producció està relacionada amb un mecanisme d'evasió immunitària que presenten determinats micobacteris. Aquest mecanisme s'encarrega de suprimir les funcions efectores dels macròfags, com ara la citotoxicitat, i d'inhibir la producció de citocines proinflamatòries [233–235]. No obstant això, fins i tot amb l'increment de la producció d'IL-10 mencionat anteriorment, els nostres macròfags infectats amb micobacteris van continuar secretant elevats nivells de citocines proinflamatòries. Així doncs, tot i observar un augment de la producció de la IL-10, el balanç general de la resposta immunitària observada en el nostre estudi es decanta clarament a favor d'una resposta del tipus proinflamatori. D'aquesta manera, hem pogut constatar que tant els macròfags M0, com els macròfags M2, van adoptar una resposta proinflamatòria. En altres paraules, la infecció pel *M. brumae* i el *M. bovis* BCG va aconseguir polaritzar macròfags M0 en macròfags M1 i també revertir la polarització de macròfags M2 en macròfags M1.

D'altra banda, en aquest estudi ens vam proposar avaluar si els diferents fenotips generats tenien alguna implicació en el context de la modulació del MT del càncer de bufeta. En primer lloc, es va avaluar el grau d'inhibició de la proliferació que produïen aquests macròfags enfront diferents línies tumorals de bufeta mitjançant assaigs de proliferació cel·lular. Així doncs, vam utilitzar els sobrenedants d'aquests macròfags i els vam enfrontar a cultius cel·lulars de les línies tumorals de bufeta T24, J82 i 5637. Els

### CAPÍTOL III. Discussió de Resultats

resultats obtinguts van mostrar que els sobrenedants dels macròfags M0 i M2 infectats amb el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG disminuïen la proliferació cel·lular de totes les línies tumorals de bufeta avaluades (**Figura 42**). Aquests resultats es poden explicar a partir dels resultats obtinguts en la detecció prèvia de citocines ja que els sobrenedants utilitzats complien les mateixes condicions de cultiu que els utilitzats en l'anàlisi de citocines. Per tant, tal com hem observat, la inhibició de la proliferació observada estaria relacionada amb la capacitat immunoestimuladora que presenten els micobacteris, caracteritzada pel reclutament de citocines T<sub>H</sub>1 responsables de col·laborar amb l'activació dels mecanismes efectors microbicides, i per tant citotòxics, dels macròfags [236].

Per finalitzar amb l'estudi del potencial immunodulador del *M. brumae* i del *M. bovis* BCG, es va procedir a avaluar la implicació que tenia el fenotip de cadascun dels macròfags generats en els processos de migració i invasivitat cel·lular presentats per les cèl·lules tumorals de bufeta, concretament la línia T24 i la J82. Tal com s'ha comentat en la introducció, la migració i la invasivitat cel·lular juguen un paper clau en el procés de metàstasi de tumors sòlids, inclòs el càncer de bufeta. A més, aquests fenòmens biològics estan fortament condicionats per la composició del MT i, per tant, amb la presència de TAMs [237,238].

Així doncs, per a l'obtenció de resultats es van realitzar diferents assaigs de migració i invasivitat cel·lular. El resultat obtingut van mostrar una reducció significativa de la capacitat de migració i invasivitat cel·lular de les cèl·lules tumorals quan aquestes havien estat infectades amb el *M. brumae* o el *M. bovis* BCG (**Figura 43 i 44**). És important remarcar que les línies tumorals utilitzades en aquests assaigs presentaven un grau 3 de diferenciació. Aquest fet significa que els resultats obtinguts resulten summament rellevants degut a que aquestes línies provenen de pacients amb un diagnòstic de NMIBC d'alt risc i per tant susceptibles al tractament intravesical mitjançant instil·lacions del *M. bovis* BCG.

Amb tot això, podem confirmar que tant el *M. brumae* com el *M. bovis* BCG han estat capaços de polaritzar macròfags cap a un fenotip antitumoral (M1) i, en el cas dels macròfags M2 de modular aquesta polarització, també, cap a un fenotip inflamatori i antitumoral. Cal remarcar però, que els resultats obtinguts responen a un escenari *in vitro*. És per aquest motiu, que creiem necessari l'estudi d'aquests fenòmens en un context més proper a la realitat i, per tant, mitjançant l'estudi d'aquests en un model animal.

## **7. DISCUSSIÓ GENERAL DE RESULTATS**

---



## 7. DISCUSSIÓ GENERAL DE RESULTATS

---

Els resultats obtinguts en aquest estudi han demostrat que el *M. brumae* és un agent biològic segur i no tòxic. De fet, tots els models animals sotmesos al *M. brumae* van sobreviure fins al final de cadascun dels estudis. Tant l'estudi de la infecció intravenosa com l'estudi referent a les instil·lacions intravesicals en ratolins, es van dissenyar i executar tenint en compte el benestar dels animals utilitzats i seguint els principis de reducció, reemplaçament i refinament (3Rs) en el context de l'experimentació animal. Addicionalment, aquests estudis es van realitzar mitjançant l'aplicació dels principis de les bones pràctiques de laboratori i seguint la regulatòria marcada per la Conferència Internacional sobre l'Harmonització de requisits tècnics per al registre de productes farmacèutics d'ús humà (ICH) i secundada per l'Agència Europea de Medicaments (EMA) [239–241].

Respecte al model animal de *G. mellonella*, els resultats obtinguts en aquest estudi confirmen la utilitat d'aquest model animal en el context de l'estudi preliminar de patogenicitat i de la seguretat del *M. bovis* BCG i el *M. brumae*, respectivament. El fet que animals com *G. mellonella* no estiguin sotmesos al debat ètic i als principis de reducció, refinament i reemplaçament fan d'aquest model un perfecte pont entre els estudis realitzats mitjançant cultius cel·lulars i els estudis que comporten l'ús d'animals amb una fisiologia més complexa com ara els ratolins.

Així doncs, tenint en compte els resultats obtinguts prèviament en el nostre grup i els resultats obtinguts en aquest estudi, referents a la seguretat i no toxicitat del *M. brumae*, ens plantejem que un dels propers passos a seguir seria l'avaluació de la seguretat i toxicitat d'aquest prometedori micobacteri en una espècie de mamífer diferent a l'avaluada en aquests estudis, tal com indiquen les guies de l'ICH i, per tant, l'EMA [242].

Respecte a l'estudi sobre la capacitat del *M. brumae* i el *M. bovis* BCG davant dels fenòmens de migració i invasivitat cel·lular, de creixement independent a l'ancoratge i de producció de metal·loproteïnes per part de les cèl·lules tumorals de bufeta, els resultats obtinguts en aquest estudi han confirmat una relació entre la resposta proinflamàtoria originada, una vegada el micobacteri, en aquest cas el *M. brumae* i el *M. bovis* BCG, ha interaccionat amb les cèl·lules tumorals de la bufeta, amb l'activació de determinats mecanismes que es tradueixen en la disminució d'aquests fenòmens implicats de manera directa en la carcinogènesi de les cèl·lules tumorals de la bufeta. Així doncs, l'objecte d'aquest estudi s'ha centrat en l'avaluació fenotípica de cadascun d'aquests processos. Segons el nostre coneixement, aquest és el primer estudi en el qual s'han avaluat aquests processos en cèl·lules tumorals de bufeta infectades amb el *M. brumae*. Així doncs, un proper objectiu podria consistir en la posada a punt de models tridimensionals, que s'aproximin més a la realitat d'un procés tumoral, i de determinar quins són els mecanismes responsables dels canvis observats en aquests processos tumorals i de quin paper hi juguen els micobacteris.

## Discussió General de Resultats

L'última part d'aquesta tesi es va centrar en l'estudi del potencial immunodulador del *M. brumae* i el *M. bovis* BCG sobre macrògrafs no activats (M0) o bé en macròfags amb un fenotip tumoral (M2). Els resultats obtinguts van mostrar que els micobacteris eren capaços de polaritzar el fenotip d'ambdós tipus cap a un fenotip de macròfags antitumorals (M1). Aquests resultats ajuden a comprendre millor la capacitat antitumoral que presenta tant el *M. brumae* com el *M. bovis* BCG. D'aquesta manera, els resultats obtinguts obren un nou escenari en el coneixement de la immunoteràpia del càncer de bufeta i, consegüentment, en el tractament d'altres processos tumorals. De fet, tal com s'ha comentat, durant els últims anys s'ha obert l'horitzó del *M. bovis* BCG com a agent immunoterèptic en altres tipologies de càncer com ara el melanoma cutani [243,244]. Així doncs, un objectiu proper podria ser l'avaluació de les propietats immunoterapèutiques i antitumorals del *M. brumae* en càncers de pell com el melanoma.



## **8 . CONCLUSIONS**

---



## 8. CONCLUSIONS

---

1. El *M. brumae* ha demostrat ser un micobacteri segur i no tòxic en el model animal de ratolins immunodeprimits SCID. La inoculació intravenosa del *M. brumae* no ha produït alteracions en els paràmetres hematològics i bioquímics ni tampoc lesions en cap dels òrgans analitzats dels ratolins SCID.
2. El *M. brumae* ha demostrat ser un micobacteri segur i no tòxic en el model animal de ratolins immunocompetents BALB/c. Les repetides administrades intravesicals d'aquest micobacteri en ratolins immunocompetents de la soca BALB/c no han produït cap alteració en la histologia de les bufetes urinàries d'aquests ratolins ni en dels paràmetres hematològics i bioquímics analitzats.
3. La  $\gamma$ -irradiació del *M. brumae* ho demostrat no mostrar toxicitat. Tant el ratolins immunodeprimits SCID com els ratolins immunocompetents BALB/c no mostrar alteració dels paràmetres hematològics i bioquímics analitzats.
4. *M. brumae* ha demostrat ser un micobacteri segur en el model animal de larves de *G. mellonella*. La infecció intrahemocoèlica pel *M. brumae* no ha mostrat mortalitat en larves de *G. mellonella*. De fet, no es va reportar creixement de colònies en la hemolimfa de cadascuna de les larves infectades amb el *M. brumae*.
5. La infecció amb el *M. brumae* o el *M. bovis* BCG inhibeix els procés de migració cel·lular de les cèl·lules tumorals de bufeta.
6. La infecció amb el *M. brumae* o el *M. bovis* BCG inhibeix la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals de bufeta. Ambdós micobacteris han mostrat capacitat de reduir la producció de MMP-9 en cèl·lules de les línies tumorals 5637 i T24.
7. La infecció amb el *M. brumae* ha demostrat la capacitat d'inhibir el creixement independent de l'ancoratge en les línies tumorals de bufeta T24, MB49 i J82. Per contra, el *M. bovis* BCG només va inhibir el creixement independent de l'ancoratge en la línia tumoral de bufeta J82.
8. La infecció de macròfags no activats (M0) amb *M. brumae* i el *M. bovis* BCG resulta en la polarització d'aquests macròfags cap un fenotip inflamatori i antitumoral M1 augmentant l'expressió dels marcadors de superfície CD80 i CD86. A més, aquesta infecció és responsable de que aquests macròfags M1 incrementin la producció de citocines proinflamatòries.
9. Tant el *M. brumae* com el *M. bovis* BCG són capaços de revertir la polarització de macròfags M2 en macròfags M1, incrementant la producció i expressió de citocines proinflamatòries i dels marcadors CD80 i CD86, respectivament, i disminuint l'expressió dels marcadors CD163 i CD206.

## Conclusions

10. El *M. brumae* i el *M. bovis* BCG són capaços d'induir la producció de factors excretats per macròfags que inhibeixen la proliferació cel·lular de les línies tumorals de bufeta T24, J82 i 5637.
  
11. Tant el *M. brumae* com el *M. bovis* BCG han mostrat la capacitat de produir factors excretats per macròfags capaços d'inhibir els processos de migració i invasivitat cel·lular de les línies tumorals T24 i J82.

## 9 . REFERÈNCIES

---



## 9. REFERÈNCIES

---

1. Mahadevan, V. Anatomy of the lower urinary tract. *Surg. - Oxford Int. Ed.* **2019**, *37*, 351–358, doi:10.1016/J.MPSUR.2019.04.009.
2. Chalasani, V.; Chin, J.L.; Izawa, J.I. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *J. Can. Urol. Assoc.* **2009**, *3*, 193–198, doi:10.5489/cuaj.1195.
3. Zhu, S.; Yu, W.; Yang, X.; Wu, C.; Cheng, F. Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1–13, doi:10.3389/fonc.2020.00102.
4. Brierley, J.D.; Wittekind, C. *TNM classification of malignant tumours. UICC International Union Against Cancer*; Brierley, J.D., Ed.; 8th ed.; Wiley Blackwell: Chichester, [England, **2017**; ISBN 1-119-26356-5.
5. Mostofi, F.K. (Fathollah K.; Sobin, L.H.; Torloni, H. *Histological typing of urinary bladder tumours*; World Health Organization, **1973**; ISBN 0119506653.
6. Eble, J.N.; World Health Organization.; International Agency for Research on Cancer.; International Academy of Pathology. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*; 3th ed.; IARC Press, **2004**; ISBN 978-92-832-2415-0.
7. Moch, H.; Cubilla, A.L.; Humphrey, P.A.; Reuter, V.E.; Ulbright, T.M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* **2016**, *70*, 93–105, doi:10.1016/j.eururo.2016.02.029.
8. Babjuk, M.; Burger, M.; Capoun, O.; Cohen, D.; Compérat, E.M.; Dominguez Escrig, J.L.; Gontero, P.; Liedberg, F.; Masson-Lecomte, A.; Mostafid, A.H.; et al. European Association of Urology Guidelines on Non–muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur. Urol.* **2022**, *81*, 75–94, doi:10.1016/J.EURURO.2021.08.010.
9. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/CAAC.21660.
10. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/CAAC.21492.
11. Saginala, K.; Barsouk, A.; Aluru, J.S.; Rawla, P.; Padala, S.A.; Barsouk, A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med. Sci.* **2020**, *8*, 11–25, doi:10.3390/MEDSCI8010015.
12. Tran, L.; Xiao, J.F.; Agarwal, N.; Duex, J.E.; Theodorescu, D. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *21*, 104–121, doi:10.1038/s41568-020-00313-1.
13. Bachir, B.G.; Kassouf, W. Cause-effect? Understanding the risk factors associated with bladder cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2012**, *12*, 1499–502, doi:10.1586/era.12.140.
14. Cumberbatch, M.G.K.; Jubber, I.; Black, P.C.; Esperto, F.; Figueroa, J.D.; Kamat, A.M.; Kiemeny, L.; Lotan, Y.; Pang, K.; Silverman, D.T.; et al. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur. Urol.* **2018**, *74*, 784–795, doi:10.1016/J.EURURO.2018.09.001/ATTACHMENT/236C6D53-3DF0-4737-9005-23C118C6BCBD/MMC1.DOCX.
15. DeGeorge, K.C.; Holt, H.R.; Hodges, S.C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am. Fam. Physician* **2017**, *96*, 507–514.

## Referències

16. Temraz, S.; Haibe, Y.; Charafeddine, M.; Saifi, O.; Mukherji, D.; Shamseddine, A. The unveiling of a new risk factor associated with bladder cancer in Lebanon. *BMC Urol.* **2019**, *19*, 1–5, doi:10.1186/S12894-019-0445-9/TABLES/2.
17. Crippa, A.; Larsson, S.C.; Discacciati, A.; Wolk, A.; Orsini, N. Red and processed meat consumption and risk of bladder cancer: a dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 689–701, doi:10.1007/S00394-016-1356-0.
18. Burger, M.; Catto, J.W.F.; Dalbagni, G.; Grossman, H.B.; Herr, H.; Karakiewicz, P.; Kassouf, W.; Kiemeny, L.A.; La Vecchia, C.; Shariat, S.; et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* **2013**, *63*, 234–241, doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033.
19. Cumberbatch, M.G.; Rota, M.; Catto, J.W.F.; La Vecchia, C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur. Urol.* **2016**, *70*, 458–466, doi:10.1016/j.eururo.2015.06.042.
20. Reed, O.; Jubber, I.; Griffin, J.; Noon, A.P.; Goodwin, L.; Hussain, S.; Cumberbatch, M.G.; Catto, J.W.F. Occupational bladder cancer: A cross section survey of previous employments, tasks and exposures matched to cancer phenotypes. *PLoS One* **2020**, *15*, e0239338, doi:10.1371/journal.pone.0239338.
21. Jalloh, M.; Cassell, A.; Diallo, T.; Gaye, O.; Ndoye, M.; Mbodji, M.M.; Mahamat, M.A.; Diallo, A.; Dial, C.; Labou, I.; et al. Is Schistosomiasis a Risk Factor for Bladder Cancer? Evidence-Based Facts. *J. Trop. Med.* **2020**, *2020*, 1–6, doi:10.1155/2020/8270810.
22. Ishida, K.; Hsieh, M.H. Understanding Urogenital Schistosomiasis-Related Bladder Cancer: An Update. *Front. Med.* **2018**, *5*, doi:10.3389/fmed.2018.00223.
23. Lenis, A.T.; Lec, P.M.; Chamie, K.; Mshs, M.D. Bladder Cancer: A Review. *JAMA* **2020**, *324*, 1980–1991, doi:10.1001/jama.2020.17598.
24. Su, H.; Jiang, H.; Tao, T.; Kang, X.; Zhang, X.; Kang, D.; Li, S.; Li, C.; Wang, H.; Yang, Z.; et al. Hope and challenge: Precision medicine in bladder cancer. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 1806–1816, doi:10.1002/cam4.1979.
25. Zhu, C.-Z.; Ting, H.-N.; Ng, K.-H.; Ong, T.-A. A review on the accuracy of bladder cancer detection methods. *J. Cancer* **2019**, *10*, 4038–4044, doi:10.7150/jca.28989.
26. Kamat, A.M.; Matulay, J.T. Advances in risk stratification of bladder cancer to guide personalized medicine. *F1000Research* **2018**, *7*, 1137, doi:10.12688/F1000RESEARCH.14903.1.
27. Flaig, T.W.; Spiess, P.E.; Agarwal, N.; Bangs, R.; Boorjian, S.A.; Buyyounouski, M.K.; Chang, S.; Downs, T.M.; Efstathiou, J.A.; Friedlander, T.; et al. Bladder Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2020**, doi:10.6004/jnccn.2020.0011.
28. Shore, N.D.; Palou Redorta, J.; Robert, G.; Hutson, T.E.; Cesari, R.; Hariharan, S.; Rodríguez Faba, Ó.; Briganti, A.; Steinberg, G.D. Non-muscle-invasive bladder cancer: An overview of potential new treatment options. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2021**, *39*, 642–663, doi:10.1016/J.UROLONC.2021.05.015.
29. Huang, Z.; Liu, H.; Wang, Y.; Zhang, C.; Xu, T. Determining optimal maintenance schedules for adjuvant intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and network meta-analysis. *Curr. Med. Res. Opin.* **2017**, *33*, 1379–1387, doi:10.1080/03007995.2017.1326889.
30. Wan, J.C.M. Survival Outcomes of Early versus Deferred Cystectomy for High-Grade Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *Curr. Urol.* **2020**, *14*, 66–73,



- doi:10.1159/000499257.
31. Noguera-Ortega, E.; Julián, E. Mycobacteria-Derived Agents for the Treatment of Urological and Renal Cancers. In *Mycobacterium - Research and Development*; InTech, 2018.
  32. Lalvani, A.; Sridhar, S. BCG vaccination: 90 years on and still so much to learn .... *Thorax* **2010**, *65*, 1036–1038, doi:10.1136/THX.2010.140996.
  33. Pearl, R. Cancer and tuberculosis. *Am. J. Epidemiol.* **1929**, *9*, 97–159, doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A121646/2/9-1-97.PDF.GIF.
  34. Morales, A.; Eidinger, D.; Bruce, A.W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* **1976**, *116*, 180–3, doi:10.1016/s0022-5347(17)58737-6.
  35. Herr, H.W.; Morales, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J. Urol.* **2008**, *179*, 53–6, doi:10.1016/j.juro.2007.08.122.
  36. Redelman-Sidi, G.; Glickman, M.S.; Bochner, B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat. Rev. Urol.* **2014**, *11*, 153–62, doi:10.1038/nrurol.2014.15.
  37. Pettenati, C.; Ingersoll, M.A. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2018**, *1–11*, doi:10.1038/s41585-018-0055-4.
  38. Abou-Zeid, C.; Ratliff, T.L.; Wiker, H.G.; Harboe, M.; Bennedsen, J.; Rook, G.A.W. Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 3046–3051, doi:10.1128/IAI.56.12.3046-3051.1988.
  39. Sinn, H.W.; Elzey, B.D.; Jensen, R.J.; Zhao, X.; Zhao, W.; Ratliff, T.L. The fibronectin attachment protein of bacillus Calmette-Guerin (BCG) mediates antitumor activity. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 573–579, doi:10.1007/S00262-007-0397-X.
  40. Redelman-Sidi, G.; Iyer, G.; Solit, D.B.; Glickman, M.S. Oncogenic activation of Pak1-dependent pathway of macropinocytosis determines BCG entry into bladder cancer cells. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1156–1167, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1882.
  41. Mukherjee, N.; Julián, E.; Torrelles, J.B.; Svatek, R.S. Effects of Mycobacterium bovis Calmette et Guérin (BCG) in oncotherapy: Bladder cancer and beyond. *Vaccine* **2021**, *39*, 7332–7340, doi:10.1016/J.VACCINE.2021.09.053.
  42. Han, J.; Gu, X.; Li, Y.; Wu, Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, doi:10.1016/J.BIOPHA.2020.110393.
  43. Dhatchinamoorthy, K.; Colbert, J.D.; Rock, K.L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 469, doi:10.3389/FIMMU.2021.636568/BIBTEX.
  44. Vanneman, M.; Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 237–251, doi:10.1038/nrc3237.
  45. Ge, P.; Wang, L.; Lu, M.; Mao, L.; Li, W.; Wen, R.; Lin, J.; Wang, J.; Chen, J. Oncological Outcome of Primary and Secondary Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4–11, doi:10.1038/s41598-018-26002-6.
  46. Lebacle, C.; Lorient, Y.; Irani, J. BCG-unresponsive high-grade non-muscle invasive bladder cancer: what does the practicing urologist need to know? *World J. Urol.* **2021**, *39*, 4037–4046, doi:10.1007/S00345-021-03666-W/TABLES/1.
  47. Kikuchi, E.; Hayakawa, N.; Fukumoto, K.; Shigeta, K.; Matsumoto, K. Bacillus Calmette–

## Referències

- Guérin-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: Its definition and future therapeutic strategies. *Int. J. Urol.* **2020**, *27*, 108–116, doi:10.1111/iju.14153.
48. Tan, W.S.; Kelly, J.D. Intravesical device-assisted therapies for non-muscle-invasive bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2018**, *15*, 667–685, doi:10.1038/s41585-018-0092-z.
49. FitzGerald, J.M. Management of Adverse Reactions to Bacille Calmette-Guérin Vaccine. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *31*, S75–S76, doi:10.1086/314074.
50. Steg, A.; Adjiman, S.; Debre, B. BCG therapy in superficial bladder tumours-complications and precautions. In Proceedings of the European Urology; 1992.
51. Van der Meijden, A.P.M.; Sylvester, R.J.; Oosterlinck, W.; Hoeltl, W.; Bono, A. V. Maintenance Bacillus Calmette-Guérin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur. Urol.* **2003**, *44*, 429–434, doi:10.1016/S0302-2838(03)00357-9.
52. Brausi, M.; Oddens, J.; Sylvester, R.; Bono, A.; Van De Beek, C.; Van Andel, G.; Gontero, P.; Turkeri, L.; Marreaud, S.; Collette, S.; et al. Side effects of bacillus calmette-guérin (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: Results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose an. *Eur. Urol.* **2014**, doi:10.1016/j.eururo.2013.07.021.
53. Green, D.B.; Kawashima, A.; Menias, C.O.; Takashi, T.; Redelman-Sidi, G.; Bhalla, S.; Shah, R.; King, B.F. Complications of Intravesical BCG Immunotherapy for Bladder Cancer. *RadioGraphics* **2019**, 80–94, doi:10.1148/rg.2019180014.
54. Decaestecker, K.; Oosterlinck, W. Managing the adverse events of intravesical bacillus Calmette–Guérin therapy. *Res. Reports Urol.* **2015**, *7*, 157, doi:10.2147/RRU.S63448.
55. Liaw, F.; Tan, Y.Y.; Hendry, D. Systemic BCG-osis following intravesical BCG instillation for bladder carcinoma. *Clin. Case Reports* **2017**, doi:10.1002/ccr3.1129.
56. Liu, Y.; Lu, J.; Huang, Y.; Ma, L. Clinical Spectrum of Complications Induced by Intravesical Immunotherapy of Bacillus Calmette-Guérin for Bladder Cancer. *J. Oncol.* **2019**, *2019*, 1–11, doi:10.1155/2019/6230409.
57. Larsen, E.S.; Joensen, U.N.; Poulsen, A.M.; Goletti, D.; Johansen, I.S. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. *APMIS* **2020**, *128*, 92–103, doi:10.1111/apm.13011.
58. Pérez-Jacoiste Asín, M.A.; Fernández-Ruiz, M.; López-Medrano, F.; Lumbreras, C.; Tejido, Á.; San Juan, R.; Arrebola-Pajares, A.; Lizasoain, M.; Prieto, S.; Aguado, J.M. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Infection Following Intravesical BCG Administration as Adjunctive Therapy For Bladder Cancer. *Medicine (Baltimore)*. **2014**, *93*, 236–254, doi:10.1097/MD.000000000000119.
59. Messing, E.M. The BCG Shortage. *Bl. Cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2017**, *3*, 227, doi:10.3233/BLC-179018.
60. Golla, V.; Lenis, A.T.; Faiena, I.; Chamie, K. Intravesical Therapy for Non-muscle Invasive Bladder Cancer-Current and Future Options in the Age of Bacillus Calmette-Guérin Shortage. *Rev. Urol.* **2019**.
61. Harvey, M.; Chislett, B.; Perera, M.; Lawrentschuk, N.; Bolton, D.; Jack, G. Critical shortage in BCG immunotherapy: How did we get here and where will it take us? *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2022**, doi:10.1016/j.urolonc.2021.09.022.
62. Zlotta, A.R.; Van Vooren, J.P.; Denis, O.; Drowart, A.; Daffé, M.; Lefèvre, P.; Schandene, L.; De Cock, M.; De Bruyn, J.; Vandenbussche, P.; et al. What are the immunologically active

- components of bacille calmette-guerin in therapy of superficial bladder cancer? *Int. J. Cancer* **2000**, doi:10.1002/1097-0215(20000915)87:6<844::AID-IJC14>3.0.CO;2-5.
63. Lamensans, A.; Chedid, L.; Lederer, E.; Rosselet, J.P.; Gustafson, R.H.; Spencer, H.J.; Ludwig, B.; Berger, F.M. Enhancement of immunity against murine syngeneic tumors by a fraction extracted from non-pathogenic mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 3656–60, doi:10.1073/pnas.72.9.3656.
  64. Yarkoni, E.; Rapp, H.J. Immunotherapy of experimental cancer by intralesional injection of emulsified nonliving mycobacteria: comparison of *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium phlei*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Infect. Immun.* **1980**, *28*, 887–92, doi:10.1128/iai.28.3.887-892.1980.
  65. Young, S.L.; Murphy, M.; Zhu, X.W.; Harnden, P.; O'Donnell, M.A.; James, K.; Patel, P.M.; Selby, P.J.; Jackson, A.M. Cytokine-modified *Mycobacterium smegmatis* as a novel anticancer immunotherapy. *Int. J. Cancer* **2004**, doi:10.1002/ijc.20442.
  66. Hudson, M.A.; Ritchey, J.K.; Catalona, W.J.; Brown, E.J.; Ratliff, T.L. Comparison of the fibronectin-binding ability and antitumor efficacy of various mycobacteria. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3843–7.
  67. Maliwan, N.; Zvetina, J.R. Clinical features and follow up of 302 patients with *Mycobacterium kansasii* pulmonary infection: a 50 year experience. *Postgrad. Med. J.* **2005**, *81*, 530–3, doi:10.1136/pgmj.2004.026229.
  68. Subramaniam, M.; In, L.L.A.; Kumar, A.; Ahmed, N.; Nagoor, N.H. Cytotoxic and apoptotic effects of heat killed *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) on various human cancer cell lines. *Sci. Reports 2016 61* **2016**, *6*, 1–6, doi:10.1038/srep19833.
  69. Alvarez-Arguedas, S.; Uranga, S.; Martín, M.; Elizalde, J.; Gomez, A.B.; Julián, E.; Nardelli-Haeffliger, D.; Martín, C.; Aguilo, N. Therapeutic efficacy of the live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine, MTBVAC, in a preclinical model of bladder cancer. *Transl. Res.* **2018**, *197*, 32–42, doi:10.1016/j.trsl.2018.03.004.
  70. Packiam, V.T.; Pearce, S.M.; Steinberg, G.D. The role of mycobacterial cell wall nucleic acid complex in the treatment of bacillus Calmette-Guérin failures for non-muscle-invasive bladder cancer. *Ther. Adv. Urol.* **2016**, *8*, 29–37, doi:10.1177/1756287215607818.
  71. Li, R.; Amrhein, J.; Cohen, Z.; Champagne, M.; Kamat, A.M. Efficacy of *Mycobacterium Phlei* Cell Wall-Nucleic Acid Complex (MCNA) in BCG-Unresponsive Patients. *Bl. Cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2017**, *3*, 65, doi:10.3233/BLC-160084.
  72. Luquin, M.; Ausina, V.; Vincent-Levy-Frebault, V.; Laneelle, M.A.; Belda, F.; Garcia-Barcelo, M.; Prats, G.; Daffe, M. *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1993**, *43*, 405–413, doi:10.1099/00207713-43-3-405.
  73. Noguera-Ortega, E.; Secanella-Fandos, S.; Eraña, H.; Gasión, J.; Rabanal, R.M.; Luquin, M.; Torrents, E.; Julián, E. Nonpathogenic *Mycobacterium brumae* Inhibits Bladder Cancer Growth In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo. *Eur. Urol. Focus* **2016**, *2*, 67–76, doi:10.1016/j.euf.2015.03.003.
  74. Noguera-Ortega, E.; Rabanal, R.M.; Gómez-Mora, E.; Cabrera, C.; Luquin, M.; Julián, E. Intravesical *Mycobacterium brumae* triggers both local and systemic immunotherapeutic responses against bladder cancer in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–9, doi:10.1038/s41598-018-33253-w.
  75. Cooper, G.M.; Hausman, R.E. *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*; 2007; ISBN 0878932194.

## Referències

76. Hanahan, D.W.R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
77. Fidler, I.J. Critical determinants of metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **2002**, doi:10.1006/scbi.2001.0416.
78. Faba, O.R.; Palou-Redorta, J.; Fernández-Gómez, J.M.; Algaba, F.; Eiró, N.; Villavicencio, H.; Vizoso, F.J. Matrix Metalloproteinases and Bladder Cancer: What is New? *ISRN Urol.* **2012**, *2012*, 1–9, doi:10.5402/2012/581539.
79. Zeng, F.C.; Cen, S.; Tang, Z.Y.; Kang, X.L. Elevated matrix metalloproteinase-9 expression may contribute to the pathogenesis of bladder cancer. *Oncol. Lett.* **2016**, doi:10.3892/ol.2016.4187.
80. Wu, G.J.; Bao, J.S.; Yue, Z.J.; Zeng, F.C.; Cen, S.; Tang, Z.Y.; Kang, X.L. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 is associated with bladder cancer pathogenesis. *J. Cancer Res. Ther.* **2018**, doi:10.4103/0973-1482.163761.
81. Black, P.C.; Brown, G.A.; Inamoto, T.; Shrader, M.; Arora, A.; Siefker-Radtke, A.O.; Adam, L.; Theodorescu, D.; Wu, X.; Munsell, M.F.; et al. Sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitor requires E-cadherin expression in urothelial carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **2008**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1593.
82. Narter, K.F.; Sabuncu, K. Invasion Mechanisms of Bladder Cancer: A Molecular Review. *J. Urol. Surg.* **2016**, doi:10.4274/jus.1070.
83. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 212–226, doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001.
84. Nisticò, P.; Bissell, M.J.; Radisky, D.C. Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, 1–10, doi:10.1101/cshperspect.a011908.
85. Kalluri, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1417–1419, doi:10.1172/JCI39675.
86. Frisch, S.M.; Schaller, M.; Cieply, B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 21–29, doi:10.1242/jcs.120907.
87. Singh, M.; Yelle, N.; Venugopal, C.; Singh, S.K. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *182*, 80–94, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.
88. Chaffer, C.L.; San Juan, B.P.; Lim, E.; Weinberg, R.A. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2016**, doi:10.1007/s10555-016-9648-7.
89. Cao, R.; Yuan, L.; Ma, B.; Wang, G.; Qiu, W.; Tian, Y. An EMT-related gene signature for the prognosis of human bladder cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 605–617, doi:10.1111/jcmm.14767.
90. Liu, B.; Miyake, H.; Nishikawa, M.; Fujisawa, M. Expression profile of epithelial-mesenchymal transition markers in non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Correlation with intravesical recurrence following transurethral resection. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2015**, *33*, 110.e11–110.e18, doi:10.1016/j.urolonc.2014.08.012.
91. Hui, L.; Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **2015**, *368*, 7–13, doi:10.1016/j.canlet.2015.07.039.
92. Giraldo, N.A.; Sanchez-Salas, R.; Peske, J.D.; Vano, Y.; Becht, E.; Petitprez, F.; Validire, P.; Ingels, A.; Cathelineau, X.; Fridman, W.H.; et al. The clinical role of the TME in solid cancer. *Br. J. Cancer* **2019**, *120*, 45–53, doi:10.1038/s41416-018-0327-z.
93. Anderson, N.M.; Simon, M.C. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, R921–R925,

- doi:10.1016/j.cub.2020.06.081.
94. Gan, C.; Mostafid, H.; Khan, M.; Lewis, D. BCG immunotherapy for bladder cancer—the effects of substrain differences. *Nat. Rev. Urol.* **2013**, *10*, 580–588, doi:10.1038/nrurol.2013.194.
  95. Fuge, O.; Vasdev, N.; Allchorne, P.; Green, J.S. Immunotherapy for bladder cancer. *Res. reports Urol.* **2015**, *7*, 65–79, doi:10.2147/RRU.S63447.
  96. Song, D.; Powles, T.; Shi, L.; Zhang, L.; Ingersoll, M.A.; Lu, Y.J. Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches. *J. Pathol.* **2019**, *249*, 151–165, doi:10.1002/path.5306.
  97. Jiang, X.; Wang, J.; Deng, X.; Xiong, F.; Ge, J.; Xiang, B.; Wu, X.; Ma, J.; Zhou, M.; Li, X.; et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 1–17, doi:10.1186/s12943-018-0928-4.
  98. Shadpour, P.; Zamani, M.; Aghaalikhani, N.; Rashtchizadeh, N. Inflammatory cytokines in bladder cancer. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 14489–14499, doi:10.1002/jcp.28252.
  99. Crispin, P.L.; Kusmartsev, S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2020**, *69*, 3–14, doi:10.1007/s00262-019-02443-4.
  100. Seliger, B.; Massa, C. The Dark Side of Dendritic Cells: Development and Exploitation of Tolerogenic Activity That Favor Tumor Outgrowth and Immune Escape. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fimmu.2013.00419.
  101. Hinshaw, D.C.; Shevde, L.A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4557–4566, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
  102. Oh, D.Y.; Kwek, S.S.; Raju, S.S.; Li, T.; McCarthy, E.; Chow, E.; Aran, D.; Ilano, A.; Pai, C.C.S.; Rancan, C.; et al. Intratumoral CD4+ T Cells Mediate Anti-tumor Cytotoxicity in Human Bladder Cancer. *Cell* **2020**, *181*, 1612-1625.e13, doi:10.1016/J.CELL.2020.05.017.
  103. Bhardwaj, N.; Farkas, A.M.; Gul, Z.; Sfakianos, J.P. Harnessing Natural Killer Cell Function for Genitourinary Cancers. *Urol. Clin. North Am.* **2020**, *47*, 433, doi:10.1016/J.UCL.2020.07.002.
  104. Eruslanov, E.; Daurkin, I.; Vieweg, J.; Daaka, Y.; Kusmartsev, S. Aberrant PGE2 metabolism in bladder tumor microenvironment promotes immunosuppressive phenotype of tumor-infiltrating myeloid cells. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 848–855, doi:10.1016/j.intimp.2011.01.033.
  105. Eruslanov, E.; Neuberger, M.; Daurkin, I.; Perrin, G.Q.; Algood, C.; Dahm, P.; Rosser, C.; Vieweg, J.; Gilbert, S.M.; Kusmartsev, S. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int. J. Cancer* **2012**, doi:10.1002/ijc.26123.
  106. Zhou, T.C.; Sankin, A.I.; Porcelli, S.A.; Perlin, D.S.; Schoenberg, M.P.; Zang, X. A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: From mediator of immune escape to target for treatment. *Urol. Oncol.* **2017**, *35*, 14–20, doi:10.1016/j.urolonc.2016.10.004.
  107. Grecian, R.; Whyte, M.K.B.; Walmsley, S.R. The role of neutrophils in cancer. *Br. Med. Bull.* **2018**, *128*, 5–14, doi:10.1093/bmb/ldy029.
  108. Giese, M.A.; Hind, L.E.; Huttenlocher, A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* **2019**, *133*, 2159–2167, doi:10.1182/blood-2018-11-844548.
  109. Lin, C.Y.; Lin, W.Y.; Yeh, S.; Li, L.; Chang, C. Infiltrating neutrophils increase bladder cancer cell invasion via modulation of androgen receptor (AR)/MMP13 signals. *Oncotarget* **2015**, doi:10.18632/oncotarget.5638.
  110. Mandelli, G.E.; Missale, F.; Bresciani, D.; Gatta, L.B.; Scapini, P.; Cavegion, E.; Roca, E.; Bugatti, M.; Monti, M.; Cristinelli, L.; et al. Tumor Infiltrating Neutrophils Are Enriched in

## Referències

- Basal-Type Urothelial Bladder Cancer. *Cells* **2020**, doi:10.3390/cells9020291.
111. Liu, K.; Zhao, K.; Wang, L.; Sun, E. The prognostic values of tumor-infiltrating neutrophils, lymphocytes and neutrophil/lymphocyte rates in bladder urothelial cancer. *Pathol. Res. Pract.* **2018**, doi:10.1016/j.prp.2018.05.010.
  112. Simons, M.P.; O'Donnell, M.A.; Griffith, T.S. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2008**, *26*, 341–345, doi:10.1016/j.urolonc.2007.11.031.
  113. Kates, M.; Nirschl, T.; Sopko, N.A.; Matsui, H.; Kochel, C.M.; Reis, L.O.; Netto, G.J.; Hoque, M.; Hahn, N.M.; McConkey, D.J.; et al. Intravesical BCG Induces CD4+ T-cell expansion in an immune competent model of bladder cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0267.
  114. Lim, C.J.; Nguyen, P.H.D.; Wasser, M.; Kumar, P.; Lee, Y.H.; Nasir, N.J.M.; Chua, C.; Lai, L.; Hazirah, S.N.; Loh, J.J.H.; et al. Immunological Hallmarks for Clinical Response to BCG in Bladder Cancer. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 615091, doi:10.3389/fimmu.2020.615091.
  115. Parodi, A.; Traverso, P.; Kalli, F.; Conteduca, G.; Tardito, S.; Curto, M.; Grillo, F.; Mastracci, L.; Bernardi, C.; Nasi, G.; et al. Residual tumor micro-foci and overwhelming regulatory T lymphocyte infiltration are the causes of bladder cancer recurrence. *Oncotarget* **2016**, doi:10.18632/oncotarget.7024.
  116. Murai, R.; Itoh, Y.; Kageyama, S.; Nakayama, M.; Ishigaki, H.; Teramoto, K.; Narita, M.; Yoshida, T.; Tomita, K.; Kobayashi, K.I.; et al. Prediction of intravesical recurrence of nonmuscle-invasive bladder cancer by evaluation of intratumoral Foxp3 + T cells in the primary transurethral resection of bladder tumor specimens. *PLoS One* **2018**, doi:10.1371/journal.pone.0204745.
  117. Joseph, M.; Enting, D. Immune Responses in Bladder Cancer-Role of Immune Cell Populations, Prognostic Factors and Therapeutic Implications. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1270, doi:10.3389/fonc.2019.01270.
  118. Paul, S.; Lal, G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.01124.
  119. Domagala, J.; Lachota, M.; Klopotowska, M.; Graczyk-Jarzynka, A.; Domagala, A.; Zhytko, A.; Soroczynska, K.; Winiarska, M. The tumor microenvironment—A metabolic obstacle to NK cells' activity. *Cancers (Basel)*. 2020.
  120. Mukherjee, N.; Ji, N.; Hurez, V.; Curiel, T.J.; Montgomery, M.O.; Braun, A.J.; Nicolas, M.; Aguilera, M.; Kaushik, D.; Liu, Q.; et al. Intratumoral CD56bright natural killer cells are associated with improved survival in bladder cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36492, doi:10.18632/ONCOTARGET.26362.
  121. Maciel, T.T.; Moura, I.C.; Hermine, O. The role of mast cells in cancers. *F1000Prime Rep.* **2015**, doi:10.12703/P7-09.
  122. Derakhshani, A.; Vahidian, F.; Alihasanzadeh, M.; Mokhtarzadeh, A.; Lotfi Nezhad, P.; Baradaran, B. Mast cells: A double-edged sword in cancer. *Immunol. Lett.* **2019**, *209*, 28–35, doi:10.1016/j.imlet.2019.03.011.
  123. Komi, D.E.A.; Redegeld, F.A. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2020**, *58*, 313–325, doi:10.1007/s12016-019-08753-w.
  124. Rigoni, A.; Colombo, M.P.; Pucillo, C. The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* **2015**, doi:10.1007/s12307-014-0152-8.
  125. Dowell, A.C.; Cobby, E.; Wen, K.; Devall, A.J.; During, V.; Anderson, J.; James, N.D.; Cheng, K.K.; Zeegers, M.P.; Bryan, R.T.; et al. Interleukin-17-positive mast cells influence outcomes

- from BCG for patients with CIS: Data from a comprehensive characterisation of the immune microenvironment of urothelial bladder cancer. *PLoS One* **2017**, doi:10.1371/journal.pone.0184841.
126. Ostrand-Rosenberg, S.; Fenselau, C. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. *J. Immunol.* **2018**, doi:10.4049/jimmunol.1701019.
  127. Chevalier, M.F.; Trabanelli, S.; Racle, J.; Salomé, B.; Cesson, V.; Gharbi, D.; Bohner, P.; Domingos-Pereira, S.; Dartiguenave, F.; Fritschi, A.S.; et al. ILC2-modulated T cell-to-MDSC balance is associated with bladder cancer recurrence. *J. Clin. Invest.* **2017**, doi:10.1172/JCI89717.
  128. Hourani, T.; Holden, J.A.; Li, W.; Lenzo, J.C.; Hadjigol, S.; O'Brien-Simpson, N.M. Tumor Associated Macrophages: Origin, Recruitment, Phenotypic Diversity, and Targeting. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.788365.
  129. Wang, B.; Liu, H.; Dong, X.; Wu, S.; Zeng, H.; Liu, Z.; Wan, D.; Dong, W.; He, W.; Chen, X.; et al. High CD204+ tumor-infiltrating macrophage density predicts a poor prognosis in patients with urothelial cell carcinoma of the bladder. *Oncotarget* **2015**, doi:10.18632/oncotarget.3887.
  130. Ugel, S.; De Sanctis, F.; Mandruzzato, S.; Bronte, V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 3365–3376, doi:10.1172/JCI80006.
  131. Takeuchi, H.; Tanaka, M.; Tanaka, A.; Tsunemi, A.; Yamamoto, H. Predominance of M2-polarized macrophages in bladder cancer affects angiogenesis, tumor grade and invasiveness. *Oncol. Lett.* **2016**, doi:10.3892/ol.2016.4392.
  132. Lima, L.; Oliveira, D.; Tavares, A.; Amaro, T.; Cruz, R.; Oliveira, M.J.; Ferreira, J.A.; Santos, L. The predominance of M2-polarized macrophages in the stroma of low-hypoxic bladder tumors is associated with BCG immunotherapy failure. *Urol. Oncol.* **2014**, *32*, 449–57, doi:10.1016/j.urolonc.2013.10.012.
  133. Fu, H.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Liu, Z.; Zhang, J.; Xie, H.; Fu, Q.; Dai, B.; Ye, D.; Xu, J. Identification and validation of stromal immunotype predict survival and benefit from adjuvant chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **2018**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2687.
  134. Boström, M.M.; Irjala, H.; Mirtti, T.; Taimen, P.; Kauko, T.; Ålgars, A.; Jalkanen, S.; Boström, P.J. Tumor-associated macrophages provide significant prognostic information in urothelial bladder cancer. *PLoS One* **2015**, doi:10.1371/journal.pone.0133552.
  135. Yang, G.; Zhang, L.; Liu, M.; Liu, Q.; Duan, X.; Bo, J. CD163+ macrophages predict a poor prognosis in patients with primary T1 high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World J. Urol.* **2019**, *37*, 2721–2726, doi:10.1007/s00345-018-02618-1.
  136. Sica, A.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 787–95, doi:10.1172/JCI59643.
  137. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.-A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440, doi:10.1002/jcp.26429.
  138. Sica, A.; Erreni, M.; Allavena, P.; Porta, C. Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 4111–4126, doi:10.1007/s00018-015-1995-y.
  139. Vitale, I.; Manic, G.; Coussens, L.M.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Macrophages and Metabolism

## Referències

- in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 36–50, doi:10.1016/j.cmet.2019.06.001.
140. Schneider, A.K.; Chevalier, M.F.; Derré, L. The multifaceted immune regulation of bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 613–630, doi:10.1038/s41585-019-0226-y.
  141. Kim, S.Y.; Nair, M.G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol. Cell Biol.* **2019**, *97*, 258–267, doi:10.1111/imcb.12236.
  142. Prima, V.; Kaliberova, L.N.; Kaliberov, S.; Curiel, D.T.; Kusmartsev, S. COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, doi:10.1073/pnas.1612920114.
  143. Qiu, S.; Deng, L.; Liao, X.; Nie, L.; Qi, F.; Jin, K.; Tu, X.; Zheng, X.; Li, J.; Liu, L.; et al. Tumor-associated macrophages promote bladder tumor growth through PI3K/AKT signal induced by collagen. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 2110–2118, doi:10.1111/cas.14078.
  144. Kong, X.; Zhu, M.; Wang, Z.; Xu, Z.; Shao, J. Characteristics and Clinical Significance of CD163+/CD206+M2 Mono-macrophage in the Bladder Cancer Microenvironment. *TURKISH J. Biol.* **2021**, doi:10.3906/biy-2104-17.
  145. Miyata, Y.; Kanda, S.; Ohba, K.; Nomata, K.; Hayashida, Y.; Eguchi, J.; Hayashi, T.; Kanetake, H. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 800–6, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1284.
  146. Xu, S.-T.; Guo, C.; Ding, X.; Fan, W.-J.; Zhang, F.-H.; Xu, W.-L.; Ma, Y.-C. Role of osteopontin in the regulation of human bladder cancer proliferation and migration in T24 cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 3701–7, doi:10.3892/mmr.2015.3202.
  147. Ahmed, M.; Sottnik, J.L.; Dancik, G.M.; Sahu, D.; Hansel, D.E.; Theodorescu, D.; Schwartz, M.A. An Osteopontin/CD44 Axis in RhoGDI2-Mediated Metastasis Suppression. *Cancer Cell* **2016**, doi:10.1016/j.ccell.2016.08.002.
  148. Wu, H.; Zhang, X.; Han, D.; Cao, J.; Tian, J. Tumour-associated macrophages mediate the invasion and metastasis of bladder cancer cells through CXCL8. *PeerJ* **2020**, doi:10.7717/peerj.8721.
  149. Wynn, T.A.; Chawla, A.; Pollard, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **2013**, *496*, 445–455, doi:10.1038/nature12034.
  150. Noy, R.; Pollard, J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **2014**, *41*, 49–61, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010.
  151. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 677–86, doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
  152. Yuan, R.; Li, S.; Geng, H.; Wang, X.; Guan, Q.; Li, X.; Ren, C.; Yuan, X. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, doi:10.1016/j.intimp.2017.05.014.
  153. Noguera-Ortega, E.; Rabanal, R.M.; Secanella-Fandos, S.; Torrents, E.; Luquin, M.; Julián, E. Irradiated Mycobacteria Enhance Survival in Bladder Tumor Bearing Mice Although Less Efficaciously than Live Mycobacteria. *J. Urol.* **2016**, *195*, 198–205, doi:10.1016/j.juro.2015.07.011.
  154. Secanella-Fandos, S. Funcionalitat dels micobacteris ambientals de creixement ràpid com a agents antitumorals. **2012**, 1–280.
  155. Reis, L.O.; Sopena, J.M.G.; Fávoro, W.J.; Martin, M.C.; Simão, A.F.L.; Reis, R.B. dos; Andrade, M.F. de; Domenech, J.D.; Cardo, C.C. Anatomical features of the urethra and urinary bladder



- catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. *Acta Cir. Bras.* **2011**, *26 Suppl 2*, 106–10, doi:10.1590/s0102-86502011000800019.
156. Asai, M.; Li, Y.; Khara, J.S.; Gladstone, C.A.; Robertson, B.D.; Langford, P.R.; Newton, S.M. Use of the invertebrate galleria mellonella as an infection model to study the mycobacterium tuberculosis complex. *J. Vis. Exp.* **2019**, doi:10.3791/59703.
  157. Kamat, A.M.; Gontero, P.; Palou, J. How Should I Manage a Patient with Tumor Recurrence Despite Adequate Bacille Calmette-Guérin? *Eur. Urol. Oncol.* **2019**, doi:10.1016/j.euo.2019.06.013.
  158. Smith, D.M. BCG-osis following intravesical BCG treatment leading to miliary pulmonary nodules, penile granulomas and a mycotic aortic aneurysm. *BMJ Case Rep.* **2016**, *2016*, bcr2016215635, doi:10.1136/bcr-2016-215635.
  159. Marques, M.; Vazquez, D.; Sousa, S.; Mesquita, G.; Duarte, M.; Ferreira, R. Disseminated Bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection with pulmonary and renal involvement: A rare complication of BCG immunotherapy. A case report and narrative review. *Pulmonology* **2020**, *26*, 346–352, doi:10.1016/j.pulmoe.2019.10.001.
  160. Lilburn, P.; Bazin, P.; Beveridge, A.; Goeman, E.; Goldberg, H. Disseminated BCG-osis and the Importance of Performing Post-Mortem Examinations. *J. Lung Heal. Dis.* **2020**, *4*, 4–7, doi:10.29245/2689-999X/2020/2.1161.
  161. Williams, S.B.; Howard, L.E.; Foster, M.L.; Klaassen, Z.; Sieluk, J.; De Hoedt, A.M.; Freedland, S.J. Estimated Costs and Long-term Outcomes of Patients With High-Risk Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated With Bacillus Calmette-Guérin in the Veterans Affairs Health System. *JAMA Netw. open* **2021**, *4*, e213800, doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.3800.
  162. Ourfali, S.; Ohannessian, R.; Fassi-Fehri, H.; Pages, A.; Badet, L.; Colombel, M. Recurrence Rate and Cost Consequence of the Shortage of Bacillus Calmette-Guérin Connaught Strain for Bladder Cancer Patients. *Eur. Urol. Focus* **2021**, *7*, 111–116, doi:10.1016/j.euf.2019.04.002.
  163. Prasanna, T.; Craft, P.; Balasingam, G.; Haxhimolla, H.; Pranavan, G. Intravesical Gemcitabine versus Intravesical Bacillus Calmette-Guérin for the Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: An Evaluation of Efficacy and Toxicity. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 260, doi:10.3389/fonc.2017.00260.
  164. Wymer, K.M.; Sharma, V.; Saigal, C.S.; Chamie, K.; Litwin, M.S.; Packiam, V.T.; Mossanen, M.; Pagliaro, L.C.; Borah, B.J.; Boorjian, S.A. Cost-Effectiveness Analysis of Pembrolizumab for Bacillus Calmette-Guérin-Unresponsive Carcinoma In Situ of the Bladder. *J. Urol.* **2021**, *205*, 1326–1335, doi:10.1097/JU.0000000000001515.
  165. Guallar-Garrido, S.; Julián, E. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update. *ImmunoTargets Ther.* **2020**, *Volume 9*, 1–11, doi:10.2147/ITT.S202006.
  166. Shore, N.D.; Palou Redorta, J.; Robert, G.; Hutson, T.E.; Cesari, R.; Hariharan, S.; Rodríguez Faba, Ó.; Briganti, A.; Steinberg, G.D. Non-muscle-invasive bladder cancer: An overview of potential new treatment options. *Urol. Oncol.* **2021**, *39*, 642–663, doi:10.1016/j.urolonc.2021.05.015.
  167. Jiménez, M.S.; Julián, E.; Luquin, M. Misdiagnosis of Mycobacterium brumae infection. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 1190–1; author reply 1191-2, doi:10.1128/JCM.01540-10.
  168. Zhang, L.; Ru, H.W.; Chen, F.Z.; Jin, C.Y.; Sun, R.F.; Fan, X.Y.; Guo, M.; Mai, J.T.; Xu, W.X.; Lin, Q.X.; et al. Variable virulence and efficacy of BCG vaccine strains in mice and correlation with genome polymorphisms. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 398–405, doi:10.1038/mt.2015.216.

## Referències

169. Bottai, D.; Brosch, R. The BCG strain pool: Diversity matters. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 201–203, doi:10.1038/mt.2016.18.
170. Llorente, C.; Schnabl, B. Fast-Track Clearance of Bacteria from the Liver. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 1–2, doi:10.1016/j.chom.2016.06.012.
171. Wang, H.; Wei, W.; Shen, Y.X.; Dong, C.; Zhang, L.L.; Wang, N.P.; Yue, L.; Xu, S.Y. Protective effect of melatonin against liver injury in mice induced by Bacillus Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 2690–2696, doi:10.3748/wjg.v10.i18.2690.
172. Jackson G. Egen, Antonio Gigliotti Rothfuchs, Carl G. Feng, Nathalie Winter, Alan Sher, and R.N.G. Macrophage and T Cell Dynamics During the Development and Disintegration of Mycobacterial Granulomas. *Immunity* **2008**, *28*, 271–284, doi:10.1371/journal.pone.0178059.
173. Torsten Goldmann, Gernot Zissel, R.S.G.M.S.V.M. Iler-Q. Formation of granulomas in the lungs of severe combined immunodeficient mice after infection with bacillus calmette-guerin [2]. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 1890–1891, doi:10.1016/S0002-9440(10)64147-8.
174. North, R.J.. I.A.A. Granuloma formation in severe combined immunodeficient (SCID) mice in response to progressive BCG infection: Tendency not to form granulomas in the lung is associated with faster bacterial growth in this organ. *Am. J. Pathol.* **1993**, *142*, 1959–1966.
175. Morris, C.D.W.; Bird, A.R.; Nell, H. The haematological and biochemical changes in severe pulmonary tuberculosis. *Q. J. Med.* **1989**, *73*, 1151–9, doi:10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068405.
176. An, J.N.; Lee, J.P.; Jeon, H.J.; Kim, D.H.; Oh, Y.K.; Kim, Y.S.; Lim, C.S. Severe hyperkalemia requiring hospitalization: predictors of mortality. *Crit. Care* **2012**, *16*, R225, doi:10.1186/cc11872.
177. Upadhyay, J.; Sudhindra, P.; Abraham, G.; Trivedi, N. Tuberculosis of the adrenal gland: A case report and review of the literature of infections of the adrenal gland. *Int. J. Endocrinol.* 2014.
178. Cherayil, B.J. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol. Res.* **2011**, *50*, 1–9, doi:10.1007/s12026-010-8199-1.
179. Silva-Gomes, S.; Vale-Costa, S.; Appelberg, R.; Gomes, M.S. Iron in intracellular infection: to provide or to deprive? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*, 1–11, doi:10.3389/fcimb.2013.00096.
180. Leisching, G.R. Susceptibility to Tuberculosis Is Associated With PI3K-Dependent Increased Mobilization of Neutrophils. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.01669.
181. Danielsson, G.; Malmström, P.-U.; Jahnsen, S.; Wijkström, H.; Nyberg, T.; Thulin, H. Bladder health in patients treated with BCG instillations for T1G2-G3 bladder cancer – a follow-up five years after the start of treatment. *Scand. J. Urol.* **2018**, *52*, 377–384, doi:10.1080/21681805.2018.1538162.
182. Tyagi, P.; Tyagi, S.; Kaufman, J.; Huang, L.; de Miguel, F. Local drug delivery to bladder using technology innovations. *Urol. Clin. North Am.* **2006**, *33*, 519–30, x, doi:10.1016/j.ucl.2006.06.012.
183. Vahr, S.; De Blok, W.; Love-Retinger, N.; Thoft Jensen, B.; Turner, B.; Villa, G.; Hrbáček, J. *Evidence-based Guidelines for Best Practice in Urological Health Care Intravesical instillation with mitomycin C or bacillus Calmette-Guérin in non-muscle invasive bladder cancer*; European Association of Urology Nurses, 2015; ISBN 978-90-79754-76-2.
184. Jallad, S.; Goubet, S.; Symes, A.; Lerner, T.; Thomas, P. Prognostic value of inflammation or

- granuloma after intravesical BCG in non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* **2014**, *113*, E22-7, doi:10.1111/bju.12334.
185. Piatek, M.; Sheehan, G.; Kavanagh, K. Galleria mellonella: The Versatile Host for Drug Discovery, In Vivo Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1545, doi:10.3390/antibiotics10121545.
  186. Browne, N.; Heelan, M.; Kavanagh, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* **2013**, *4*, 597–603, doi:10.4161/viru.25906.
  187. Cytryńska, M.; Zdybicka-Barabas, A.; Jakubowicz, T. The involvement of protein kinase A in the immune response of Galleria mellonella larvae to bacteria. *Acta Biochim. Pol.* **2007**, *54*, 167–174, doi:10.18388/abp.2007\_3283.
  188. Wojda, I. Immunity of the greater wax moth Galleria mellonella. *Insect Sci.* **2017**, *24*, 342–357, doi:10.1111/1744-7917.12325.
  189. Senior, N.J.; Titball, R.W. Isolation and primary culture of Galleria mellonella hemocytes for infection studies. *F1000Research* **2021**, *9*, 1392, doi:10.12688/f1000research.27504.2.
  190. Li, Y.; Spiropoulos, J.; Cooley, W.; Khara, J.S.; Gladstone, C.A.; Asai, M.; Bossé, J.T.; Robertson, B.D.; Newton, S.M.; Langford, P.R. Galleria mellonella—a novel infection model for the mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* **2018**, *9*, 1126–1137, doi:10.1080/21505594.2018.1491255.
  191. Asai, M.; Li, Y.; Khara, J.S.; Robertson, B.D.; Langford, P.R.; Newton, S.M. Galleria mellonella: An Infection Model for Screening Compounds Against the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.02630.
  192. Asai, M.; Sheehan, G.; Li, Y.; Robertson, B.D.; Kavanagh, K.; Langford, P.R.; Newton, S.M. Innate Immune Responses of Galleria mellonella to Mycobacterium bovis BCG Challenge Identified Using Proteomic and Molecular Approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, doi:10.3389/fcimb.2021.619981.
  193. Stamm, A.; Strauß, S.; Vogt, P.; Scheper, T.; Pepelanova, I. Positive in vitro wound healing effects of functional inclusion bodies of a lipooxygenase from the Mexican axolotl. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17*, 57, doi:10.1186/s12934-018-0904-0.
  194. Pijuan, J.; Barceló, C.; Moreno, D.F.; Maiques, O.; Sisó, P.; Martí, R.M.; Macià, A.; Panosa, A. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 107, doi:10.3389/fcell.2019.00107/BIBTEX.
  195. Borowicz, S.; Van Scoyk, M.; Avasarala, S.; Karuppusamy Rathinam, M.K.; Tauler, J.; Bikkavilli, R.K.; Winn, R.A. The Soft Agar Colony Formation Assay. *J. Vis. Exp.* **2014**, doi:10.3791/51998.
  196. ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; MONTERREY, J.; RATH, M.; NIEDZWIECKI, A. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in adult human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1787–1798, doi:10.3892/ijo.2013.2113.
  197. Tajhya, R.B.; Patel, R.S.; Beeton, C. Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1579*, 231–244, doi:10.1007/978-1-4939-6863-3\_12.
  198. Rubio, L.; Bach, J.; Marcos, R.; Hernández, A. Synergistic role of nanoceria on the ability of tobacco smoke to induce carcinogenic hallmarks in lung epithelial cells. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 2623–2635, doi:10.2217/nnm-2017-0205.
  199. Secanella-Fandos, S.; Luquin, M.; Julián, E. Connaught and russian strains showed the highest direct antitumor effects of different bacillus calmette-guérin substrains. *J. Urol.* **2013**, *189*, 711–718, doi:10.1016/j.juro.2012.09.049.
  200. Noguera-Ortega, E.; Blanco-Cabra, N.; Rabanal, R.M.; Sánchez-Chardi, A.; Roldán, M.;

## Referències

- Guallar-Garrido, S.; Torrents, E.; Luquin, M.; Julián, E. Mycobacteria emulsified in olive oil-in-water trigger a robust immune response in bladder cancer treatment. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27232, doi:10.1038/srep27232.
201. Trepát, X.; Chen, Z.; Jacobson, K. Cell migration. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 2369–92, doi:10.1002/cphy.c110012.
202. Pang, K.; Zhang, Z.; Hao, L.; Shi, Z.; Chen, B.; Zang, G.; Dong, Y.; Li, R.; Liu, Y.; Wang, J.; et al. The ERH gene regulates migration and invasion in 5637 and T24 bladder cancer cells. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 225, doi:10.1186/s12885-019-5423-9.
203. Garden, R.J.; Liu, B.C.S.; Redwood, S.M.; Weiss, R.E.; Droller, M.J. Bacillus Calmette-Guérin abrogates in vitro invasion and motility of human bladder tumor cells via fibronectin interaction. *J. Urol.* **1992**, *148*, 900–905, doi:10.1016/S0022-5347(17)36774-5.
204. Secott, T.E.; Lin, T.L.; Wu, C.C. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 2670–2675, doi:10.1128/IAI.70.5.2670-2675.2002.
205. Bevers, R.F.M.; de Boer, E.C.; Kurth, K.H.; Schamhart, D.H.J. BCG-induced interleukin-6 upregulation and BCG internalization in well and poorly differentiated human bladder cancer cell lines. *Eur. Cytokine Netw.* **1998**, *9*, 181–6.
206. Peraza Cruces, K.; Sánchez Rodríguez, C.; Gutiérrez Guédez, L.; Sanz Fernández, R. Efecto de la inmunoterapia con el bacilo de Calmette-Guérin sobre la capacidad migratoria e invasiva del cáncer escamoso de cabeza y cuello en un modelo in vitro 3D. *Rev. del Lab. Clin.* **2015**, *8*, 3–7, doi:10.1016/j.labcli.2015.01.001.
207. Tsui, K.H.; Wang, S.W.; Chung, L.C.; Feng, T.H.; Lee, T.Y.; Chang, P.L.; Juang, H.H. Mechanisms by which interleukin-6 attenuates cell invasion and tumorigenesis in human bladder carcinoma cells. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/791212.
208. Noguera Ortega, E.; Julián Gómez, E. Improving bladder cancer treatment: a new formulation containing an environmental mycobacterium, Universitat Autònoma de Barcelona, 2015.
209. Guallar-Garrido, S.; Ez, V.; Sánchez-Chardi, A.; Luquin, M.; Julián, E. Each mycobacterium requires a specific culture medium composition for triggering an optimized immunomodulatory and antitumoral effect. *Microorganisms* **2020**, doi:10.3390/microorganisms8050734.
210. Guadamillas, M.C.; Cerezo, A.; Del Pozo, M.A. Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 3189–97, doi:10.1242/jcs.072165.
211. Mahe, M.; Dufour, F.; Neyret-Kahn, H.; Moreno-Vega, A.; Beraud, C.; Shi, M.; Hamaidi, I.; Sanchez-Quiles, V.; Krucker, C.; Dorland-Galliot, M.; et al. An FGFR3/MYC positive feedback loop provides new opportunities for targeted therapies in bladder cancers. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, e8163, doi:10.15252/emmm.201708163.
212. Langle, Y. V.; Belgorosky, D.; Prack McCormick, B.; Sahores, A.; Góngora, A.; Baldi, A.; Lanari, C.; Lamb, C.; Eiján, A.M. FGFR3 Down-Regulation is Involved in bacillus Calmette-Guérin Induced Bladder Tumor Growth Inhibition. *J. Urol.* **2016**, *195*, 188–197, doi:10.1016/j.juro.2015.06.093.
213. Das, A.; Monteiro, M.; Barai, A.; Kumar, S.; Sen, S. MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14219, doi:10.1038/s41598-017-14340-w.
214. Kageyama, Y.; Kawakami, S.; Fujii, Y.; Kihara, K.; Oshima, H. Bacillus Calmette-Guérin

- enhances production and secretion of type IV collagenases in peripheral blood mononuclear cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 281–8, doi:10.1111/j.1349-7006.1997.tb00379.x.
215. Sánchez-Rodríguez, C.; Cruces, K.P.; Riestra Ayora, J.; Martín-Sanz, E.; Sanz-Fernández, R. BCG immune activation reduces growth and angiogenesis in an in vitro model of head and neck squamous cell carcinoma. *Vaccine* **2017**, *35*, 6395–6403, doi:10.1016/j.vaccine.2017.10.008.
  216. Halder, K.; Banerjee, S.; Ghosh, S.; Bose, A.; Das, S.; Chowdhury, B.P.; Majumdar, S. Mycobacterium indicus pranii (Mw) inhibits invasion by reducing matrix metalloproteinase (MMP-9) via AKT/ERK-1/2 and PKC $\alpha$  signaling: A potential candidate in melanoma cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2017**, *18*, 850–862, doi:10.1080/15384047.2015.1078024.
  217. Saitoh, H.; Mori, K.; Kudoh, S.; Itoh, H.; Takahashi, N.; Suzuki, T. BCG effects on telomerase activity in bladder cancer cell lines. *Int. J. Clin. Oncol.* **2002**, *7*, 165–170, doi:10.1007/s101470200024.
  218. Genin, M.; Clement, F.; Fattaccioli, A.; Raes, M.; Michiels, C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 1–14, doi:10.1186/s12885-015-1546-9.
  219. Sanjurjo, L.; Aran, G.; Téllez, É.; Amézaga, N.; Armengol, C.; López, D.; Prats, C.; Sarrias, M.-R. CD5L Promotes M2 Macrophage Polarization through Autophagy-Mediated Upregulation of ID3. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.00480.
  220. Song, W.; Thakor, P.; Vesey, D.A.; Gobe, G.C.; Morais, C. Conditioned medium from stimulated macrophages inhibits growth but induces an inflammatory phenotype in breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 247–254, doi:10.1016/j.biopha.2018.06.126.
  221. Mantovani, A.; Schioppa, T.; Porta, C.; Allavena, P.; Sica, A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 315–322, doi:10.1007/s10555-006-9001-7.
  222. Chanmee, T.; Ontong, P.; Konno, K.; Itano, N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. **2014**, *6*, 1670–1690, doi:10.3390/cancers6031670.
  223. Liu, J.; Geng, X.; Hou, J.; Wu, G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int.* 2021.
  224. Pan, Y.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 583084, doi:10.3389/fimmu.2020.583084.
  225. Biswas, S.K.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 889–96, doi:10.1038/ni.1937.
  226. Bercovici, N.; Guérin, M. V.; Trautmann, A.; Donnadieu, E. The Remarkable Plasticity of Macrophages: A Chance to Fight Cancer. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1563, doi:10.3389/fimmu.2019.01563.
  227. Liu, Q.; Tian, Y.; Zhao, X.; Jing, H.; Xie, Q.; Li, P.; Li, D.; Yan, D.; Zhu, X. NMAAP1 Expressed in BCG-Activated Macrophage Promotes M1 Macrophage Polarization. *Mol. Cells* **2015**, *38*, 886–94, doi:10.14348/molcells.2015.0125.
  228. Lardone, R.D.; Chan, A.A.; Lee, A.F.; Foshag, L.J.; Faries, M.B.; Sieling, P.A.; Lee, D.J. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette–Guérin Alters melanoma microenvironment Favoring antitumor T cell responses and improving M2 Macrophage Function. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–14, doi:10.3389/fimmu.2017.00965.
  229. Xue, Y.; Tong, L.; Liu, F.; Liu, A.; Zeng, S.; Xiong, Q.; Yang, Z.; He, X.; Sun, Y.; Xu, C. Tumor-infiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with

## Referències

- prognosis in bladder cancer. *Oncol. Rep.* **2019**, doi:10.3892/or.2019.7196.
230. Tan, Q.L.; Zhou, C.Y.; Cheng, L.; Luo, M.; Liu, C.P.; Xu, W.X.; Zhang, X.; Zeng, X. Immunotherapy of Bacillus Calmette-Guérin by targeting macrophages against bladder cancer in a NOD/scid IL2Rg<sup>-/-</sup> mouse model. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *22*, 362–370, doi:10.3892/mmr.2020.11090.
231. Etzerodt, A.; Rasmussen, M.R.; Svendsen, P.; Chalaris, A.; Schwarz, J.; Galea, I.; Møller, H.J.; Moestrup, S.K. Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor- $\alpha$  in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 778–88, doi:10.1074/jbc.M113.520213.
232. da Sousa-Vasconcelos, P.S.; Da Seguius, W.S.; De Souza Luz, E.; De Pinho, R.T. Pattern of cytokine and chemokine production by THP-1 derived macrophages in response to live or heat-killed mycobacterium bovis bacillus calmette-guérin moreau strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 809–813, doi:10.1590/0074-02760140420.
233. Redford, P.S.; Murray, P.J.; O’Garra, A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunol.* **2011**, doi:10.1038/mi.2011.7.
234. Sousa-Vasconcelos, P. da S.; Seguius, W. da S.; Luz, E. de S.; Pinho, R.T. de Pattern of cytokine and chemokine production by THP-1 derived macrophages in response to live or heat-killed Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin Moreau strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 809–13, doi:10.1590/0074-02760140420.
235. Bouzeyen, R.; Haoues, M.; Barbouche, M.R.; Singh, R.; Essafi, M. FOXO3 Transcription Factor Regulates IL-10 Expression in Mycobacteria-Infected Macrophages, Tuning Their Polarization and the Subsequent Adaptive Immune Response. *Front. Immunol.* **2019**, doi:10.3389/fimmu.2019.02922.
236. Rovina, N.; Panagiotou, M.; Pontikis, K.; Kyriakopoulou, M.; Koulouris, N.G.; Koutsoukou, A. Immune Response to Mycobacterial Infection: Lessons from Flow Cytometry. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 1–9, doi:10.1155/2013/464039.
237. Bravo-Cordero, J.J.; Hodgson, L.; Condeelis, J. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 277–83, doi:10.1016/j.ceb.2011.12.004.
238. Huang, C.P.; Liu, L.X.; Shyr, C.R. Tumor-associated macrophages facilitate bladder cancer progression by increasing cell growth, migration, invasion and cytokine expression. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 2715–2724, doi:10.21873/anticancerres.14243.
239. Good laboratory practice compliance | European Medicines Agency.
240. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Questions and answers on the withdrawal of the “Note for guidance on single dose toxicity.” **2010**.
241. ICH Topic S 7 A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON SAFETY PHARMACOLOGY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS DATE FOR COMING INTO OPERATION. **2001**.
242. Step ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. **2009**.
243. Benitez, M.L.R.; Bender, C.B.; Oliveira, T.L.; Schachtschneider, K.M.; Collares, T.; Seixas, F.K. Mycobacterium bovis BCG in metastatic melanoma therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 7903–7916, doi:10.1007/s00253-019-10057-0.
244. Kremenovic, M.; Schenk, M.; Lee, D.J. Clinical and molecular insights into BCG immunotherapy for melanoma. *J. Intern. Med.* **2020**, *288*, 625–640, doi:10.1111/joim.13037.







## **10 . ANNEX**

---



***Mycolicibacterium brumae* is a Safe and Non-Toxic  
Immunomodulatory Agent for Cancer Treatment**

**Marc Bach-Griera** , Víctor Campo-Pérez, Sandra Barbosa, Sara Traserra,  
Sandra Guallar-Garrido, Laura Moya-Andérico, Paula Herrero-Abadía, Marina Luquin,  
Rosa Maria Rabanal, Eduard Torrents i Esther Julián

Vaccines 2020, 8, 198, doi:10.3390/vaccines8020198



# 11 AGRAÏMENTS

---

Aquest projecte ha rebut el finançament del Ministeri d'Economia i Competitivitat (SAF2015-63867-R); del Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats (RTI2018-098777-B-I00); dels Fons FEDER; de la Generalitat de Catalunya (2017SGR-229); de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Beca PIF codi 40920); i de la Sociedad Española de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (Ayudas SEIMC). Les figures d'aquesta tesi han estat realitzades amb l'aplicació BioRender.com

Arribat aquest moment, m'agradaria reconèixer i agrair a totes les persones que m'han ajudat en tot aquest període que ha comportat la elaboració d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Esther Julián. Ella em va oferir la possibilitat d'entrar en aquest projecte. Així mateix, l'Esther ha estat la meva mentora durant tot aquest temps. Durant tots aquests anys m'ha guiat, aconsellat i m'ha ajudat a prendre decisions. A més, en tot moment ha empatitzat amb els problemes i entrebancs que m'he anat trobant durant tots aquests anys. Al principi de la tesi, quan vaig començar al laboratori, també estava treballant al servei d'urgències de l'Hospital Universitari de Vic. Aquest fet comportava que havia de compaginar les dues feines. Tant l'Esther com la meva cap de l'Hospital, la Dolors Viñas, m'ho van fer tot molt més fàcil.

També vull donar les gràcies a la Dra. Marina Luquin. De fet, a la Marina ja la coneixia d'abans. Anys enrere havia estat la supervisora del meu Treball de Fi de Grau. Directe o indirectament, ella ha estat una de les persones responsables de que decidís endinsar-me en el fascinant món de la microbiologia. Gràcies Marina per a compartir la teva saviesa i per encomanar aquesta tranquil·litat que et caracteritza a tothom que t'envolta.

A continuació voldria mostrar el meu agraïment a tots/es els/les companys/es del laboratori. Voldria començar per la Dra. Estela Noguera. L'Estela va ser la responsable d'ensenyar-me totes les tècniques que es realitzaven al lab, incloses les instil·lacions intravesicals. Recordo aquelles jornades a la sala de cultius quan sortíem a les tantes. Tampoc em vull oblidar de la Dra. Marta Llorens. La Marta era la meva predecessora, és a dir, ocupava la plaça PIF que més tard vaig aconseguir. Ella em va ajudar a programar els seminaris de microbiologia del Grau de Biologia. Em va ajudar molt. Seguidament parlaré de la Dra Sandra Guallar. La Sandra i jo vam començar la tesi junts. Això significa que vam treballar colze a colze durant molt de temps. Junts vam fer el curs d'experimentació animal. Recordo els primers dies a l'estabulari, quan l'Estela em ensenyava a instil·lar. Més endavant, quan l'Estela ja havia marxat als EUA, ens va tocar enfrontar-nos tots sols als ratolins. Ens vam ajudar molt, treballàvem en equip. Just en aquells moments, en Víctor i la Paula havien començat el Màster de Microbiologia Aplicada i feien el pràcticum al nostre lab. Un any després, s'havien convertit en uns companys excepcionals de doctorat. Gracias Víctor por tus consejos y tus llamadas de apoyo mientras regresabas del IBEC. Paula, gracias por todo. Gracias por compartir tus conocimientos y por tu predisposición para cuadrar los experimentos cuando coincidían nuestros experimentos. Además, mil gracias por cuidar de mis células siempre que te lo preguntaba. Tots ells, també han estat amics. Les tardes de tapes i cerveses per Cerdanyola són

## Agraïments

inoblidables. Tampoc em vull oblidar de tots els estudiants de grau i màster que han passat per el laboratori. Alba, Alejandro ,Amanda, Anna, Enric, Farny, Irati, Natali, Núria, Marina's, i a tothom que em deixo, moltes gràcies per ajudar-me quan us he necessitat. Capítol a part mencionar a l'Arnau. A l'Arnau el vaig tenir com a estudiant mentre conduïa els seminaris de Microbiologia Clínica. Avui és un company més del laboratori. Molta força amb el doctorat. Gràcies a la Cris i la Judit. Sense elles això tampoc hauria estat possible. Han estat i són un puntal del laboratori.

No em vull oblidar dels companys de la 4ta planta. Maria, Jordi, Miquel, Eloi, Marc, Jesús, Susana, Denis, Joan, Núria, Eli, Jennifer, Denis i un llarg etcètera. Moltes gràcies per tot. Heu estat un companys genials. Quan torni per la Facultat ja farem un cafè. Durant aquest temps també he fet amics. A en Ferran el vaig conèixer mentre ell acabava el doctorat. Ara som amics. A més, gràcies a ell també vaig conèixer a la Carme. Sempre m'he trobat molt còmode amb vosaltres. Sou molt bona gent.

Els companys de Genètica de la 2a planta també es mereixen un agraïment. Jana, Laura, Alba, Lourdes, Mingui, Cristian, Glòria, Irene, Sandra i Dra Alba Hernández, gràcies per el vostre altruisme i per ajudar-me sempre que ho he necessitat. De fet, els scratches, els invasions i els zimogrames no haguéssin sortit sense la vostra incondicional ajuda.

Per acabar amb els companys del Departament de Genètica i de Microbiologia, haig de reconèixer i agrair la tasca del personal administratiu de la secretaria. Maite, Maria Josep, David, Dori i Helena. Sou imprescindibles.

Durant el mes de Març del 2019 vaig tenir la oportunitat de fer una estància curta a Porto. Concretament, al Immune regulation group dirigit per la Dra. Margarida Saraiva. Allà, em vaig sentir com a casa. M'agradaria mostrar el meu agraïment a totes les persones que vaig conèixer. Porto és molt bonic i la seva gent també. Diogo, Kaori, Jeremy, Raquel i Margarida, eu tenho uma lembrança muito boa de você. Amb vosaltres vaig tenir el meu primer contacte amb un citòmetre de flux. Gràcies també a la SEIMC per finançar aquesta estància.

Parlant de la citometria de flux, no em voldria descuidar de dedicar unes paraules d'agraïment a la Manu. La Manu em va ajudar moltíssim amb la posada apunt dels experiments de citometria. És una persona molt entregada, molt pacient. És una gran professional i una autèntica experta en aquest camp.

En referència al personal dels serveis científicotècnics de la UAB, m'agradaria donar les gràcies a les veterinàries del SIAL. Gràcies Sandra i Sara. També vull agrair la feina realitzada per tot el personal de l'estabulari de la UAB. Estimeu la vostra feina i això es palpa en l'atmosfera del servei. No em puc oblidar del servei de Microscòpia de l'INC. Gràcies a ells vaig poder fotografiar els macròfags.

Tampoc em puc oblidar dels meus amics de tota la vida. Tot i no conèixer l'àmbit de la meva investigació, han tingut la paciència d'escoltar les meves dissertacions i de recolzar-me en els moments que ho he precisat.

Respecte a la meva família, m'agradaria dedicar unes paraules a la meva mare. La mare estava molt orgullosa de tenir uns fills investigadors. De fet, tenia molt clar quina era la finalitat de la meva línia d'investigació. Ella deia que el seu somni era veure la defensa d'aquesta tesi. Malauradament, un càncer es va interposar en aquest camí i aquest somni no s'ha pogut fer realitat. Mare, et dedico aquesta tesi.

Espero haver dipositat un gra de coneixement en la lluita contra el càncer. També vull agrair el suport del meu pare. Els teus consells sempre han estat molt encertats. A la Montse, la meva germana bessona, que sempre s'ha preocupat per com m'estava anant tot. Tot i la distàncies física que ens separàven, sempre ha estat a prop. També vull donar les gràcies a en Marc. Em va ajudar a posar ordre a tot aquest treball. Gràcies cunyat. I per finalitzar, vull donar les gràcies al meu germà gran, en Jordi. Ell sempre ha estat un referent per a mi. Seguint els seus passos, vaig decidir estudiar Biologia. Més endavant, el meu germà es va proposar de fer un doctorat. En aquells moment vivíem junts. Així, cada dia, quan el meu germà arribava a casa, mentre sopàvem, m'explicava les tècniques que havia posat a punt, quins experiments havia realitzar i quines troballes havia descobert. Va arribar el dia que es va doctorar. Jo en aquells moments estava cursant un màster de microbiologia enfocat en l'àmbit de la indústria farmacèutica. Tot i així, uns mesos abans, m'havia inscrit al Màster Oficial de Microbiologia Aplicada de la UAB. Em van admetre. Ell em va convèncer de cursar aquest Màster i, per tant, de tastar el món de la recerca. Durant tot aquest temps m'ha estat aconsellant. Ell entenia que significava fer un doctorat.

Aquesta fita s'aproxima. Mentiria si digués que aquest camí ha estat fàcil. Tot el que he viscut durant aquest període m'ha fet créixer. Quan vaig començar la carrera de Biologia, mai hagués pensat que hagués pogut tenir la possibilitat de realitzar una tesi doctoral. Em quedo amb les coses boniques que m'han passat durant aquest temps i amb la petita esperança que aquesta tesi serveixi per a aportar, ni que sigui de manera ínfima, coneixement i solucions a la problemàtica que suposa el càncer.