



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación del potencial adyuvante de las
micropartículas de almidón a la vacunación con
BCG.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Bióloga
P R E S E N T A:**

Alejandra Elizabeth Barrera Rosales



**Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta
CONACyT. Instituto de Investigaciones Biomédicas**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ADYUVANTE DE LAS MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN A LA VACUNACIÓN CON BCG.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Barrera
Rosales
Alejandra Elizabeth
5591917901
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309021889

2. Datos del tutor

Dra.
Silvia Andrea
Moreno
Mendieta

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Dulce Adriana
Mata
Espinosa

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Beatriz
Ruiz
Villafán

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Romina María de la Paz
Rodríguez
Sanoja

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Mayra
Silva
Miranda

7. Datos del trabajo escrito.

Evaluación del potencial adyuvante de las micropartículas de almidón a la vacunación con BCG
64 páginas
2017

Para mi abuelita Amelia Martínez Maldonado, quien me ha enseñado que el optimismo siempre abre puertas y que la fuerza interior puede con todo. Eres la persona más fuerte que he conocido.

Para mis padres y hermano, que son la luz de mi vida.

RECONOCIMIENTO

Este proyecto se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con apoyo del proyecto PAPIIT IN209316 y en la sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, con apoyo de los proyectos de CONACyT, Frontera de la Ciencia 2015, código 115 e IMUNOCANEI contrato: 253053, agradezco a ambas sedes y al apoyo recibido por parte de los programas mencionados.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi amada familia, por su apoyo incondicional y por creer en mí tan fervientemente en cada paso que doy. A mi madrecita Dominga Rosales Martínez, por enseñarme que el amor es lo más importante en esta vida, por tu apoyo desde que escribí mis primeros garabatos y por estar día a día con mi hermano y conmigo preparándonos para la vida. A mi pasito Salvador Barrera Monroy, porque tú has sido mi más claro ejemplo de constancia, responsabilidad y dedicación, por enseñarme que todo lo puedo lograr si me esfuerzo y por enseñarme con amor que siempre debo mirar hacia adelante. A mi pechocho Eduardo Salvador Barrera Rosales, por ser el mejor regalo que la vida pudo darme, por todas las enseñanzas que me has dado y por todas tus palabras en cada momento.

A Alejandro Miguel Cisneros Martínez, por todo el apoyo intelectual que me has brindado, por enriquecernos mutuamente y crecer. Por la paz que me da el estar a tu lado y porque a partir de ti, veo de otro modo la vida. Gracias por todo tu amor, que ha sido fundamental en esta etapa de mi vida.

A Luz María Martínez Mejía y Miguel Cisneros Ramírez, la familia que elegí, les agradezco con todo el corazón por todo el apoyo que me han brindado, por su cariño incondicional y por cada consejo que me han dado. Su apoyo ha sido un pilar muy importante tanto en mi vida como en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos de la carrera, en especial a Angélica Arroyo Bahena, Carlos Antonio González Palma, Andrea Yasmin López Chávez y Armando Rodríguez Velázquez, por su amistad que hizo de la Facultad un lugar más acogedor y divertido.

A mis amigos del Bioterio, profe Agus, Geny, Fanny y Monse, les agradezco enormemente su amistad y su trato siempre amable y paciente, por hacer de mi servicio social una experiencia inolvidable.

A mis queridos macacos del Laboratorio de Origen de la Vida, les agradezco enormemente su amistad y sus palabras de aliento en momentos difíciles. A mi

querido Dr. Toño Lazcano, por todo tu apoyo siempre y por hacerme sentir parte del grupo.

A mi querida tutora, la Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta, de manera muy personal quiero agradecerle por todo su apoyo. Agradezco de verdad haberla encontrado, ya que su guía ha sido el punto clave de todo este proceso. Gracias por toda su paciencia en este camino y por seguirme guiando hacia el futuro.

A mis compañeros del Laboratorio C-034 del Instituto de Investigaciones Biomédicas: Zai, Nathaly, Joce, Alma, Daniel, Silvia, Carlos, Lupita, Lety, Aidé y Brenda por su compañía y preguntas que han sido muy importantes para este proyecto.

También quiero agradecer a mis compañeros del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por su compañía y apoyo en los largos procesos experimentales, sobre todo a Mayda, Bety, Carlitos, MaFer, Jaquie Barrios, Yadi, Octavio y León.

A la Dra. Dulce Mata Espinosa, que con tanta amabilidad y paciencia nos apoyó en el aprendizaje de los procesos experimentales.

Gracias a la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por permitirme estar en su laboratorio, por todas sus preguntas y valiosos comentarios.

A la Dra. Mayra Silva Miranda y la Dra. Beatriz Ruíz Villafán por sus comentarios y valiosas retroalimentaciones.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por permitirme trabajar y aprender en su laboratorio.

"La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que están asociados"

-Lynn Margulis

"La gente que evita el fracaso, también evita el éxito"

-Robert Kiyosaki

"La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso"

-Louis Pasteur.

Contenido

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1 TUBERCULOSIS	15
2.1.1 <i>Vacunación con BCG</i>	17
2.1.2 <i>Modelo Experimental de Tuberculosis Pulmonar Progresiva</i>	17
2.2 ADYUVANTES	19
2.2.1 <i>Clasificación</i>	21
2.2.2 <i>Micropartículas de polímeros</i>	21
2.2.2.1 <i>Micropartículas de almidón modificado</i>	24
2.3 MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN CRUDO COMO VEHÍCULO DE ANTÍGENOS	25
2.4 MICROPARTÍCULAS COMO REFUERZO Y ADYUVANTE DE LA VACUNA BCG	27
3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	30
3.1. JUSTIFICACIÓN	30
3.2. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL	30
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 DISEÑO DE GRUPOS Y VACUNACIÓN:	31
5.2 RETO CON M. TUBERCULOSIS 9005186 GENOTIPO LATINOAMERICANO-MEDITERRÁNEO (LAM)	33
5.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	34
5.3.1 <i>Determinación de carga bacteriana en pulmón</i>	35
5.3.2 <i>Determinación de área afectada por neumonía</i>	36
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36

6. RESULTADOS	37
6.1 PROTECCIÓN CONFERIDA CON LA VACUNA BCG Y LAS MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN	37
6.1.1 Curvas de supervivencia	37
6.1.2 Carga bacteriana en pulmón	38
6.1.3 Presencia de neumonía	41
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES Y PROSPECTIVAS	48
8.1 CONCLUSIONES	48
8.2 PROSPECTIVAS	48
9. BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO I: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	58

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. MPAs con y sin antígeno como refuerzo de la vacuna BCG.....	28
Fig. 2. MPAs como adyuvante de la vacuna BCG vía s.c.....	29
Fig. 3. Estrategia Experimental General.....	32
Fig. 4. Diluciones de UFC para conteo en placa.....	35
Fig. 5. Supervivencia a la infección con la cepa de virulencia muy alta 9005186 genotipo LAM de <i>M. tuberculosis</i>	37
Fig. 6. Carga bacilar en pulmones de ratones vacunados por vía s.c.....	39
Fig. 7. Carga bacilar en pulmones de ratones vacunados por vía i.n.....	40
Fig. 8. Comparación de la carga bacilar en pulmón por tiempo y vía de vacunación.....	40
Fig. 9. Porcentaje de neumonía en ratones vacunados por vía s.c. e i.n.....	41-42
Fig. 10. Comparación del porcentaje de neumonía por tiempo y vía de vacunación.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Polímeros generalmente utilizados para la fabricación de micropartículas.....	23
Tabla 2. Almidones modificados para la administración de antígenos.....	24
Tabla 3. Almidones modificados utilizados como adyuvantes.....	25
Tabla 4. Diseño experimental.....	32
Tabla 5. Diluciones para la determinación de unidades formadoras de colonias por pulmón.....	36
Tabla 6. Cepas y dosis utilizadas para la vacunación s.c. con BCG.....	45
Tabla 7. Comparación de cepas y dosis de vacunación por vía i.n.....	46

RESUMEN

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecto-contagiosa de importancia global que durante muchos años ha causado miles de muertes en todo el mundo. Tan solo el año pasado se reportaron según datos de la OMS 10 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes. Si bien la vacunación con BCG ha resultado imprescindible para controlar la enfermedad y disminuir el número de muertes producidas por esta causa, su eficacia protectora en el adulto es muy variable, por lo que resulta necesario buscar alternativas para optimizarla. Dentro de estas opciones se encuentra el uso de adyuvantes para reforzar y mejorar su eficacia protectora. En nuestro grupo de trabajo, se desarrolló un sistema para la administración de antígenos a base de micropartículas de almidón cuyo potencial inmunogénico se probó en animales sanos. De igual forma se demostró que el uso de las micropartículas como refuerzo intranasal posterior a la vacunación con BCG mejoran la eficacia protectora de la vacuna en ratones infectados con cepas de mediana y muy alta virulencia de *M. tuberculosis*, por lo que a partir de estos resultados se probó la eficacia de las micropartículas como adyuvante, al ser administradas de manera simultánea con la vacuna por vía subcutánea, en animales retados posteriormente con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* de mediana virulencia. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial adyuvante de las micropartículas de almidón, tanto por vía intranasal como subcutánea, a la vacunación con BCG en un modelo de protección basado en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva, en el que los ratones se retaron con la cepa de muy alta virulencia 9005186 genotipo LAM. En contraste con los resultados obtenidos con la cepa H37Rv, la coadministración de las micropartículas de almidón con BCG, no mejoró la eficacia protectora de la vacuna frente al reto con la cepa 9005186 de muy alta virulencia, por ninguna de las dos vías de administración evaluadas. Por otro lado se observó que la vía de administración de la vacuna por sí misma, sin importar la presencia de las micropartículas, tiene un impacto en la eficacia protectora de la misma. Por vía intranasal se observó, al menos en este modelo y en contraste con algunos reportes, que la vacuna BCG no brinda protección, mientras que por vía

subcutánea la vacuna protege igual sin importar la presencia o no de las micropartículas. Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio y los antecedentes de la línea de investigación, se recomienda continuar explorando las propiedades inmunoestimulantes de las micropartículas y especialmente su caracterización mediante ensayos *in vitro* con el fin de orientar los futuros experimentos *in vivo*.

Palabras clave: tuberculosis, micropartículas, adyuvante, almidón

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis* es de las infecciones bacterianas más importantes a nivel mundial. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con estos bacilos y a pesar que de estos portadores latentes solo un 10% padecerá la enfermedad activa, factores como la comorbilidad con enfermedades como la diabetes, la infección con VIH y el surgimiento de cepas multidrogo-resistentes e hipervirulentas contribuyen a que el nivel de protección de la vacuna BCG en adultos varíe del 0% al 80% (Martín, 2005). Circunstancia que demanda la búsqueda de estrategias alternativas para reforzar el efecto protector de esta vacuna, y que justo representa uno de los objetivos del Programa Mundial para el Control de la Tuberculosis (Global Tuberculosis Report, 2015; Behr *et al.*, 2014).

Una estrategia precisamente es el uso de adyuvantes, moléculas que se requieren para reforzar la inmunogenicidad de vacunas de subunidades preparadas con proteínas, péptidos o DNA, o que potencialmente pueden usarse también para mejorar la eficacia protectora de vacunas vivas atenuadas (Hogarth *et al.*, 2003). Actualmente existe una amplia variedad de adyuvantes en evaluación, sin embargo, existen preocupaciones relacionadas con la relación inversa entre su potencia y su inocuidad por lo que la posibilidad que estos

adyuvantes sean usados en humanos es baja. Por esta razón se buscan nuevos adyuvantes que sean más seguros y que sean de fácil aplicación (O'Hagan, 1998; Rydell *et al.*, 2005).

Es así como el uso de adyuvantes hechos de carbohidratos, representa múltiples ventajas derivadas especialmente de las propiedades de éstas moléculas tales como como biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad, además de un protocolo sencillo de producción (Petrovsky & Cooper, 2012; Moreno & Rodríguez, 2016). Previamente en el grupo de trabajo se desarrolló un sistema compuesto por un dominio de fijación al almidón (DFA_{tag}) y micropartículas de almidón (MPAs) que permite la inmovilización no covalente de antígenos y su posterior administración vía mucosas. El sistema fue probado inicialmente con el fragmento C de la toxina tetánica, administrado por vía oral, lográndose la inducción de anticuerpos específicos contra la toxina (Guillén *et al.*, 2014). Posteriormente, este sistema utilizado para administrar la proteína alfa cristalina (Acr) de *M. tuberculosis*, por las vías oral y nasal también permitió la inducción de anticuerpos específicos contra este antígeno que en su forma recombinante es pobremente inmunogénico. Adicionalmente se observó que el proceso de inmovilización y la presencia del almidón fueron factores determinantes para modular la respuesta hacia un fenotipo celular, sugiriendo un efecto adyuvante que no había sido descrito para micropartículas de almidón sin modificaciones químicas (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014). Estos resultados, dieron lugar a experimentos para evaluar el efecto inmunoestimulante del sistema utilizando un modelo de protección basado en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar. En este estudio se administró a ratones BALB/c vacunados con BCG, tres refuerzos intranasales con intervalo semanal tanto el sistema con la proteína inmovilizada (μ AcrDFA_{tag}) como las MPAs solas. Dos meses después del último refuerzo los animales fueron infectados con *M. tuberculosis* (se evaluaron tres cepas con diferentes niveles de virulencia) y dos meses después de la infección se evaluó la eficacia protectora de la vacuna y de los refuerzos. Para esto se analizó la supervivencia de los ratones, la carga bacilar y la presencia de neumonía en pulmón. Los ratones vacunados y reforzados vivieron por más tiempo y tuvieron menos carga bacilar y neumonía

en comparación con los que solo recibieron la vacuna sin refuerzos (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017). Dado que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo al que se reforzó con $\mu\text{AcrDFA}_{\text{tag}}$ y el grupo con refuerzo de MPAs se evidenció la importante contribución de las MPAs para reforzar la protección conferida por la vacuna por lo que se planteó la importancia de evaluar la eficacia de estas micropartículas ahora como adyuvante de BCG al ser administradas directamente con ésta.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de las MPAs para ejercer un efecto adyuvante cuando son administradas simultáneamente con la vacuna BCG (bacilo Calmette Guérin), tanto por vía intranasal como subcutánea, en un modelo de protección basado en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva, con el fin de probar si se puede optimizar el efecto protector de la vacuna contra micobacterias de muy alta virulencia.

2. ANTECEDENTES

2.1 TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa de importancia nacional y global, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo Gram-positivo perteneciente a la familia Mycobacteriaceae, que junto con *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium microti* conforman el grupo de bacterias causantes de la enfermedad pulmonar (TBP). En la actualidad, a más de un siglo del descubrimiento del bacilo por el Dr. Robert Koch, la infección con *M. tuberculosis* no ha podido erradicarse. Se estima, que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo (OMS, 2015), y que alrededor del 5 al 10% de estos portadores latentes desarrollará la TBP, muchos de los cuales será por bacterias resistentes. Es así como en el año 2015 según datos de la OMS, de los 10.4 millones de nuevos casos que se reportaron a nivel mundial, 480 000 personas

desarrollaron tuberculosis multirresistente y según el *Informe mundial sobre la tuberculosis*, en el año 2016 se registraron 1.8 millones de fallecimientos. Es decir, el número de personas que enferman y mueren a causa de la tuberculosis, ha ido en aumento, siendo una de las 10 causas principales de mortalidad en el mundo, causando más defunciones que la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el paludismo.

A nivel nacional, según información de la Plataforma Única de Tuberculosis, en el año 2015 se registraron 16,080 casos de TBP. De acuerdo al boletín epidemiológico de 2017, hasta la semana 29 se han reportado 8798 casos en el país, de los cuales en la CDMX se reportaron 368 casos (235 en hombres y 133 en mujeres). Estas cifras dejan en evidencia el aumento de casos reportados siendo que el número acumulado en el año 2016 fue de 9758.

La infección se transmite de persona a persona a través del aire, cuando las personas con la enfermedad tosen o estornudan, expulsan a los bacilos, los cuales pueden ser inhalados por otras personas. La enfermedad se caracteriza por afectar principalmente a los pulmones, sin embargo el bacilo se puede diseminar y afectar otros órganos como el hígado, bazo, cerebro, riñones, huesos, entre otros (Sharma *et al.*, 2005).

Como se mencionó previamente un 10% de las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen a lo largo de la vida un riesgo de padecer la enfermedad pulmonar. Sin embargo, este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmune se encuentra debilitado, como ocurre en casos de desnutrición, diabetes, tabaquismo, alcoholismo, falla renal o en quienes tienen infección con VIH (OMS, 2015; Narasimhan *et al.*, 2013).

La detección temprana del bacilo o de la enfermedad y la terapia profiláctica siguen siendo las herramientas más importantes para reducir el riesgo de progresión de la enfermedad entre los individuos de alto riesgo como personas que estuvieron en contacto con individuos infectados, personas con VIH y trabajadores de la salud, entre otros (Narasimhan *et al.*, 2013). Sin embargo, su control y erradicación se ha dificultado también por la existencia de cepas multidrogo-resistentes (MDR), que no responden al tratamiento con

isoniazida y rifampicina, que son los dos medicamentos de primera línea más eficaces contra la tuberculosis (Gandhi *et al.*, 2010; Caminero *et al.*, 2010).

2.1.1 VACUNACIÓN CON BCG

La vacunación con el bacilo Calmette-Guérin (BCG), desarrollada por Albert Calmette and Camille Guérin, en el Instituto Pasteur, en Francia entre los años 1905 y 1921, es una vacuna obtenida a partir de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, que protege contra las formas más severas de la enfermedad. En niños menores de 5 años ha reducido la mortalidad hasta en un 90%, sin embargo, su nivel de protección contra la TBP en el adulto, resulta hasta la actualidad muy variable (del 0 al 80%). Esto debido a factores como la comorbilidad con diabetes y SIDA, factores ambientales como el tabaquismo, la desnutrición, el hacinamiento y la pobreza, y entre los factores más importantes, la aparición de cepas multidrogo-resistentes (MDR) (Martín, 2005; Gupta *et al.*, 2007), lo cual ha contribuido al incremento de la morbilidad y mortalidad por esta enfermedad.

Dado que muchos prototipos de vacunas diseñados para reemplazar la vacuna BCG no han logrado pasar exitosamente las evaluaciones en fase clínica y preclínica, y que como tal BCG tiene las moléculas inmunoestimulantes más importantes para una adecuada activación del sistema inmune, es claro que la vacuna resulta irremplazable, por lo que de acuerdo a uno de los objetivos del programa mundial para el control de la enfermedad, se requiere desarrollar estrategias para reforzar su eficacia protectora (Global Tuberculosis Report, 2015; Behr *et al.*, 2015)

2.1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA

El grupo de investigación del Dr. Rogelio Hernández Pando, ha desarrollado un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones genéticamente idénticos de la cepa BALB/c, los cuales se infectan mediante la

vía intratraqueal, con el fin de asegurar que todas las bacterias lleguen al punto de infección principal, que es el pulmón, y se desarrolle la enfermedad crónica para ser estudiada a fondo.

Desde el punto de vista inmunológico, el modelo ha permitido demostrar que son los macrófagos y los linfocitos Th-1 los principales elementos que protegen contra del bacilo tuberculoso (Rook *et al.*, 1996; Hernández-Pando *et al.*, 1996). En la enfermedad, el bacilo infecta a los macrófagos ocurriendo dos posibles eventos: la eliminación del bacilo o la inactivación de los mismos por modificaciones morfo-funcionales muy importantes, pues el citoplasma celular se llena de bacterias y de numerosas vacuolas con contenido lipídico bacteriano, en particular lipoarabinomano, que se encuentra en la pared bacteriana y es muy eficiente para desactivar a los macrófagos (Hernández-Pando *et al.*, 1997).

En el modelo experimental la progresión de la enfermedad se evidencia en dos fases; la primera conocida como fase temprana, que corresponde al primer mes de infección y que histológicamente se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos y linfocitos T CD4⁺ de tipo 1 (Th1) en el intersticio alveolo-capilar, que forman granulomas pasadas dos semanas de la infección (Hernández-Pando *et al.*, 1996). En cuanto a citocinas, hay una mayor producción de interferón gamma (INF- γ), IL-2, así como de TNF- α e IL-1 β (Hernández-Pando *et al.*, 1996; Hernández-Pando *et al.*, 1997), los cuales controlan la infección de manera temporal.

La segunda fase (avanzada o progresiva), inicia en el día 21 post-infección, donde el número de micobacterias vivas en pulmones aumenta, así como las áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y de extensa fibrosis intersticial, lo cual finalmente lleva a la muerte por insuficiencia respiratoria (Hernández-Pando *et al.*, 1995). Inmunológicamente hay un aumento en la presencia y actividad de linfocitos T CD4⁺ de tipo 2 (Th2) y por lo tanto mayor producción de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) que son eficientes antagonistas y supresoras de la inmunidad celular,

contrarrestando así la protección conferida por las células Th1 y favoreciendo la progresión de la enfermedad (Hernández-Pando *et al.*, 1997).

A partir de este modelo con el perfil inmunológico de cada fase ya establecido, se han podido ajustar modelos de protección para la evaluación de vacunas, adyuvantes y tratamientos, cuyos efectos pueden ser caracterizados mediante análisis de supervivencia, carga bacteriana en pulmón, porcentaje de área afectada por neumonía y determinación de citocinas entre otros, por lo que resulta un modelo ideal para el objetivo del presente proyecto.

2.2 ADYUVANTES

La vacunación es la administración de microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos o inactivos, o una parte de estos (ya sean proteínas, péptidos o DNA, sintéticos o recombinantes) conocidos como subunidades, que funcionan como inmunógenos no patógenos que al ser inoculados, inducen una respuesta inmune protectora en el hospedero, frente a un agente infeccioso específico (Riese *et al.*, 2013; Lee & Nguyen, 2015).

Las vacunas de subunidades son especialmente aptas para su uso en personas inmunocomprometidas, debido a que sus efectos secundarios son menores en comparación con las vacunas de microorganismos atenuados, inactivos o las vacunas conjugadas. Sin embargo, su inmunogenicidad es muy baja por lo que requieren del uso de adyuvantes (Coffman *et al.*, 2012).

Los adyuvantes son moléculas o complejos de macromoléculas, que se administran simultáneamente con un antígeno (Ag) para aumentar su inmunogenicidad incrementando la potencia, la calidad y la duración (memoria) de la respuesta inmune (Coffman *et al.*, 2012). Se utilizan con el objetivo de disminuir la cantidad de Ag o el número de dosis, además de ampliar el objetivo poblacional (recién nacidos, adultos mayores inmunocomprometidos e inmunosuprimidos) y optimizar las vacunas ya existentes (Young and Dye,

2006). Cuando se trata de vacunas con un porcentaje variable de protección, también se requiere del uso de adyuvantes para mejorar su eficacia protectora (Hogarth *et al.*, 2003).

En la actualidad existen diversas polémicas sobre el uso de adyuvantes en la vacunación, dado que idealmente un adyuvante debe estimular la respuesta inmune tanto celular como humoral e inducir inmunidad de largo plazo (es decir, memoria inmunológica) sin inducir autoinmunidad o provocar efectos secundarios adversos (Batista-Duharte *et al.*, 2014). De esta manera, se espera que los adyuvantes permitan el desarrollo de vacunas inocuas y eficaces contra enfermedades para las que aún no hay vacunas, como la malaria y el VIH, así como para mejorar la eficacia de otras vacunas existentes (OMS, 2016).

Por cuestiones de inocuidad y costos, en la actualidad son pocos los adyuvantes aprobados para su uso en humanos. Algunos de estos son el hidróxido de aluminio, que se ha utilizado como adyuvante en vacunas humanas desde 1926, y las emulsiones aceite en agua, como la MF59 y ASO3 (Reynolds *et al.*, 1980; Garçon *et al.*, 2012; O'Hagan *et al.*, 2012). En los últimos 10 años se ha registrado una enorme cantidad de nuevos candidatos, sin embargo, la toxicidad es el principal factor que limita la introducción de estos nuevos productos al mercado, quedando muchos de ellos en las fases pre-clínica y clínica de evaluación (Simon *et al.*, 2006; Rhee *et al.*, 2012).

De forma preocupante, ninguno de los adyuvantes aprobados para uso en humanos es de administración vía mucosas, pese a las diversas ventajas que ofrece esta vía de vacunación. Entre ellas un protocolo de administración más sencillo en contraste con los administrados vía parenteral, un menor riesgo de transmisión de infecciones, mayor apego de los pacientes a los esquemas de vacunación y en algunos casos costos más bajos, además de la simulación del mecanismo de ingreso de muchos de los patógenos que entran vía oral o nasal (Lawson *et al.*, 2011; Rhee *et al.*, 2012).

Entre los adyuvantes que se evalúan para su uso por las vías oral y nasal, se encuentran las micropartículas de polímeros que por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y menor toxicidad resultan una alternativa más segura que otros adyuvantes evaluados por estas vías tales como las enterotoxinas

termolábiles mutadas de microorganismos como *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae*.

2.2.1 CLASIFICACIÓN

Según el mecanismo de acción, los adyuvantes se pueden clasificar en dos grandes grupos: inmunoestimulantes y vehículos. El mecanismo de acción de los inmunoestimulantes se basa en activar directamente a los receptores celulares y por consiguiente, la producción de citocinas. Dentro de este grupo podemos encontrar a las saponinas, el muramil dipéptido (MPD), DNA bacteriano (oligo CpG), lipopolisacáridos (LPS), monofosforil lípido A (MPL) y sus derivados sintéticos, lipopéptidos, entre otros (Reed *et al.*, 2009).

Por otro lado, el mecanismo de acción de los adyuvantes tipo vehículo es a través de un sistema de transporte y/o liberación de Ag, en el que la disponibilidad de este para las células presentadoras de antígeno (CPAs), se ve aumentada. Los adyuvantes dentro del grupo de los vehículos se pueden clasificar en emulsiones y sistemas particulados tales como liposomas, complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), partículas tipo virus (VLPs), micro y nanopartículas y dentro de éstas a las micropartículas de polímeros sintéticos y naturales (Guy 2007; Reed *et al.*, 2009).

2.2.2 MICROPARTÍCULAS DE POLÍMEROS

Dentro de los sistemas particulados podemos encontrar a las micropartículas de polímeros que pueden tener funciones de transporte, depósito y de activación de la respuesta inmune innata mediante receptores o de manera inespecífica induciendo la fagocitosis (O' Hagan, 1998; Batista-Duarte *et al.*, 2014). Estas micropartículas varían en tamaño, forma, hidrofobicidad, carga y presencia de grupos funcionales para el acoplamiento o inmovilización de las moléculas. También presentan características de solubilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad diversas, las cuales dependen

de su material y determinan su capacidad para modular la respuesta inmune (Moreno & Rodríguez, 2016). Los polímeros más frecuentemente utilizados para la fabricación de micropartículas se presentan en la Tabla 1.

Las propiedades físico químicas de las micropartículas de polímeros, tales como tamaño, forma, carga, material y estructura molecular son factores importantes que definen la vía de administración a utilizar y repercuten en el tipo de respuesta inmune obtenida y sus propiedades adyuvantes (Audran *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014).

Tabla 1. Polímeros generalmente utilizados para la fabricación de micropartículas.

	Material	Ventajas	Usos
SINTETICOS	Poliésteres alifáticos del ácido láctico y glicólico, como son el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y copolímeros (PLGA)	Biocompatibilidad. Biodegradabilidad Rápida cinética de degradación	-Liberación de ácidos nucleicos, péptidos y proteínas -Liberación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos
	Poli ϵ -caprolactona (PCL), que es un polímero semicristalino de ϵ -caprolactona	Biodegradabilidad. Biocompatibilidad. Alta permeabilidad. Cinética lenta de degradación	-Encapsulación y liberación de antibióticos -Liberación de antígenos y adyuvantes por vía oral
	Poli (ortho-éster) (POE) , polímero de ortoésteres tras la alquilación de los ácidos ortocarboxílicos	Biodegradabilidad. Biocompatibilidad	-Liberación de proteínas y ácidos nucleicos
NATURALES	Quitosán, un polisacárido catiónico formado por unidades de glucosamina con enlaces β (1-4), obtenido tras la desacetilación de la quitina.	Biocompatibilidad. Biodegradabilidad. Alta solubilidad. Mayor residencia en mucosa	-Liberación oral de antígenos y fármacos (como toxoides diftérico y tetánico o insulina) -Liberación de DNA y RNA
	Alginato, un copolímero no ramificado de ácido D-manurónico y L-gulurónico con enlaces β (1-4).	Biocompatibilidad. Baja inmunogenicidad. No se requieren solventes para su preparación y puede entrecruzarse	-Liberación oral y nasal de antígenos -Microencapsulación de proteínas, drogas y células
	Gelatina, que es la forma desnaturalizada del colágeno.	Biocompatibilidad. Biodegradabilidad. No inmunogénica. Alta solubilidad	-Liberación prolongada de citotóxicos, corticoides y antibióticos
	Celulosa, un homopolímero de unidades glucosa con uniones β (1-4).	Biocompatibilidad. Biodegradabilidad. Sus derivados poseen las mismas propiedades	-Liberación de analgésicos, antiinflamatorios y corticoides
	Derivados de la celulosa, como la Celulosa-Acetato-Butirato (CAB)	Biodegradabilidad. Ofrece amplia capacidad para modificaciones	-Liberación de citotóxicos
	Almidón modificado (malto-oligosacáridos entrecruzados), unidades de glucosas unidas por enlaces α -1,4 y ramificaciones en α -1,6	Permite el atrapamiento o unión covalente de la molécula de interés. Biodegradabilidad. No inmunogénico	-Liberación de antígenos vía mucosas
Dextrano, un homopolisacárido ramificado de glucosa, sintetizado por bacterias ácido-lácticas a partir de sacarosa, con enlaces α -1,6 entre glucosas y α -1,2, α -1,3 o α -1,4 en las ramificaciones.	Biocompatibilidad. Biodegradabilidad. Disponible en varios pesos moleculares. Puede funcionalizarse fácilmente	Liberación de fármacos Liberación de antígenos vía mucosas	

Adaptada de Campos *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2010; Suri *et al.*, 2013

2.2.2.1 MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN MODIFICADO

A pesar de los beneficios que brindan los polímeros naturales, algunos requieren de modificaciones para su uso como vehículo de antígenos. Tal es el caso del almidón, el cual puede ser modificado de manera química o física para permitir la unión covalente de los antígenos. Algunas modificaciones y usos de los almidones modificados se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Almidones modificados para la administración de antígenos.

Tipo de micropartícula	Características	Unión del Antígeno y Vía de Administración	Referencias
Spherex®	Fabricadas por polimerización en emulsión de almidón hidrolizado. Reticulado con epíclorhidrina. Diámetro de 20-45 µm en promedio.	*Atrapamiento Intranasal Intragástrica Subcutánea	Montgomery PC & Rafferty DE., 1998. O´Hagan DT <i>et al.</i> , 1993. Illum L. <i>et al.</i> , 1988 Björk E & Edman P, 1990
Aciladas	Fabricadas por polimerización de almidón acilado en una emulsión agua-en-aceite con TEMED. Diámetro de 1-3 µm en promedio.	*Conjugación covalente Intranasal Intragástrica Subcutánea Intramuscular	Artursson P <i>et al.</i> , 1984 Degling & Sjöholm, 2002 Degling & Stjärnkvist, 1995
Siliconadas	Fabricadas con almidón soluble de papa injertado con un polímero de silicona, tratadas químicamente con DMSO, en una emulsión de acetona con Tween 80. Diámetro de 4-5 µm, en promedio.	*Atrapamiento Intranasal Intragástrica Intraperitoneal	Heritage <i>et al.</i> , 1996 McDermott <i>et al.</i> , 1998 Heritage <i>et al.</i> , 1998 Heritage <i>et al.</i> , 1998b
Aminadas	Producidas por reticulación de maltotriosa con epíclorhidrina y aminadas posteriormente. Diámetro promedio de 80-170 µm.	*Atrapamiento Intramuscular	Constantin <i>et al.</i> , 2003
Hidroxietiladas	Preparadas por entrecruzamiento de hidroxietil-almidón (Voluven®) con cloruro de tereftaloilo. Diámetro de 4-15 µm.	*Encapsulación Intraperitoneal Subcutánea	Balasse <i>et al.</i> , 2008

Tomada y adaptada de Rydell *et al.*, 2005. TEMED: 1,1-*N,N,N,N*-tetrametiletildiamina; DMSO: Dimetilsulfóxido

Estas micropartículas de almidón modificado, utilizadas como vehículos o sistemas de liberación de antígenos también pueden presentar propiedades adyuvantes. En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos, en los que estas micropartículas administradas por vía parenteral y por mucosas (oral e intranasal) a ratones, pueden favorecer la inducción de respuesta inmune hacia el antígeno cargado.

Tabla 3. Almidones modificados utilizados como adyuvantes para vacunas.

Tipo de micropartículas	Tamaño (µm)	Vía de administración y Antígeno	Tipo de respuesta	Referencia
Poliacriladas	1 – 3	Oral-Albúmina sérica humana	Humoral	* Artursson <i>et al.</i> , 1984 * Degling W. <i>et al.</i> , 2002
Siliconadas	4 – 5	Intraperitoneal Intranasal-Albúmina sérica humana	Humoral	Heritage <i>et al.</i> , 1996 McDermott <i>et al.</i> , 1998
Spherex®	20 – 45	Parenteral-Dinitrofenil albúmina sérica bovina	Humoral	Montgomery & Rafferty, 1998
Hidroxiethyladas	4 - 15	Intraperitoneal y subcutánea-Albúmina sérica bovina	Humoral y celular	Balasse <i>et al.</i> , 2008

Adaptada de Rydell *et al.*, 2005.

2.3 MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN CRUDO COMO VEHÍCULO DE ANTÍGENOS

El almidón es un carbohidrato de origen botánico, conformado por dos polímeros de glucosa llamados amilosa (glucosas unidas por enlaces α -1,4) y amilopectina (unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 y ramificaciones en α -1,6.) que se organizan de forma compleja formando gránulos, los cuales poseen tamaños y formas diferentes dependiendo de su origen botánico. De manera nativa

es insoluble en agua, por lo que en el organismo se degrada a través de enzimas como la alfa amilasa, por lo tanto es biodegradable y biocompatible. Dadas sus propiedades como agente adhesivo, estabilizante, aglutinante, gelificante y lubricante (Beneke, Viljoen, & Hamman, 2009), entre otras, se le ha dado un amplio uso en la industria farmacéutica como excipiente, como expansor del volumen plasmático y para el recubrimiento de cápsulas y aglutinante en la preparación de tabletas (Pérez *et al.*, 2010; Masina *et al.*, 2016).

En el grupo de investigación de la Dra. Rodríguez Sanoja del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se evalúa la funcionalidad de las micropartículas de almidón como matriz para la inmovilización de antígenos y su posterior administración vía mucosas. Dado que estos gránulos no tienen modificación química alguna para permitir la unión de los antígenos se utiliza un dominio de fijación al almidón (DFA_{tag}) para su inmovilización. Este dominio permite la adsorción de las proteínas que se fusionan con él, sobre los gránulos de almidón (Guillén, 2014; Patente No. 347183).

Los primeros estudios que se realizaron para verificar la viabilidad de este sistema de inmovilización, como vehículo para la administración de antígenos por vía mucosas, se realizaron con el fragmento C de la toxina tetánica fusionada a este dominio (TcDFA_{tag}) e inmovilizada en el almidón, la cual fue administrada por vía oral y sin adyuvantes a ratones sanos. Los resultados de este estudio demostraron que era posible la inducción de anticuerpos específicos IgG frente al Ag tetánico, además del retraso de síntomas de tétanos en ratones que recibieron la toxina después de ser inmunizados con una dosis alta (75µg) del Ag inmovilizado en las micropartículas de almidón (µiTcDFA_{tag}) (Guillén *et al.*, 2014).

También se hicieron estudios con la proteína alfa cristalina (Acr) de *M. tuberculosis* fusionada con el DFA e inmovilizada en los gránulos de almidón (µAcrDFA_{tag}) para su administración por las vías oral e intranasal. Lo que se pudo observar es que el proceso de inmovilización en el almidón fue un factor determinante para modular la respuesta hacia un fenotipo Th1 (celular), al obtener los niveles más altos de IgG2a en suero y de INF-γ en sobrenadante de cultivo de células de bazo de los ratones a los que se administró la proteína inmovilizada (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014). Estos resultados evidenciaron el papel adyuvante

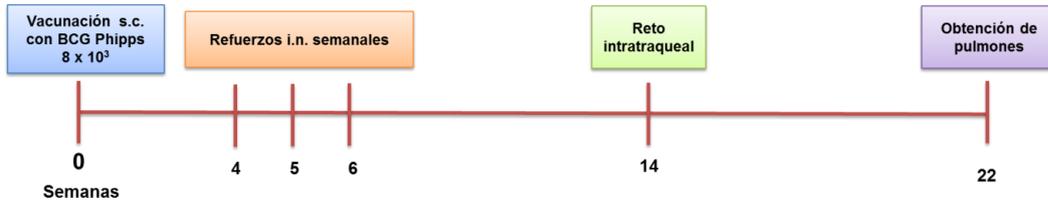
del sistema pues la fusión al DFA_{tag} contribuyó a la inmunogenicidad de Acr, mientras que la inmovilización contribuyó a la polarización de la respuesta. Por lo tanto, la evaluación y caracterización de esta propiedad inmunoestimulante del sistema completo (DFA_{tag} y micropartículas) es importante ya que hay múltiples ventajas derivadas del uso de partículas naturales sin modificaciones químicas para inmovilizar y administrar antígenos, tales como evitar el uso de reactivos o condiciones que pueden afectar la integridad, inocuidad e inmunogenicidad del antígeno (O´Hagan, 1998; Rajapaksa & Lo, 2010).

2.4 MICROPARTÍCULAS COMO REFUERZO Y ADYUVANTE DE LA VACUNA BCG

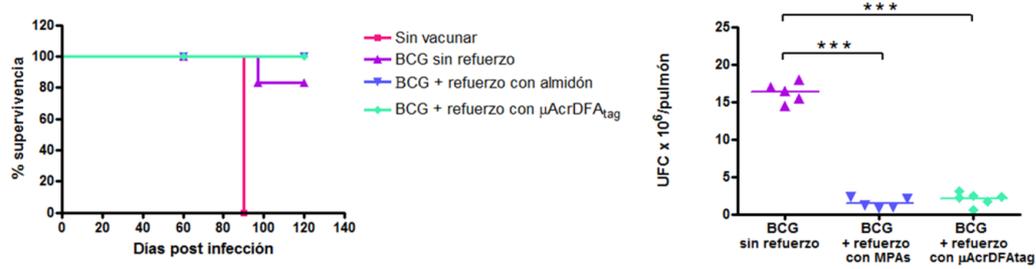
Con los primeros resultados de inmunogenicidad obtenidos se decidió evaluar la eficacia del sistema como refuerzo y adyuvante de la vacuna BCG en un modelo de protección basado en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva (MTPP), utilizando cepas de mediana y muy alta virulencia de *M. tuberculosis*.

En primer lugar se evaluó el uso de las MPAs con y sin antígeno como refuerzo de la vacuna BCG en ratones retados con una cepa de referencia de mediana virulencia (cepa H37Rv) y en ratones retados con cepas de virulencia muy alta, la cepa 9005186, genotipo Latinoamericano-Mediterráneo (LAM) y la 583, genotipo Beijing. En los dos primeros casos se observó que el refuerzo intranasal aplicado en tres ocasiones a intervalo semanal un mes después de la vacunación, mejoró la eficacia protectora conferida con la vacuna tal y como se vio reflejado en la mayor supervivencia y menor carga bacilar en pulmón de los ratones vacunados y reforzados en comparación con los ratones que solo recibieron la vacuna (Sol Pat Mx/a/2016/005434) (Fig. 1). Con la cepa 583 genotipo Beijing no se observó mayor supervivencia pero sí menor carga bacilar en los ratones que recibieron los refuerzos solo con las MPAs (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017).

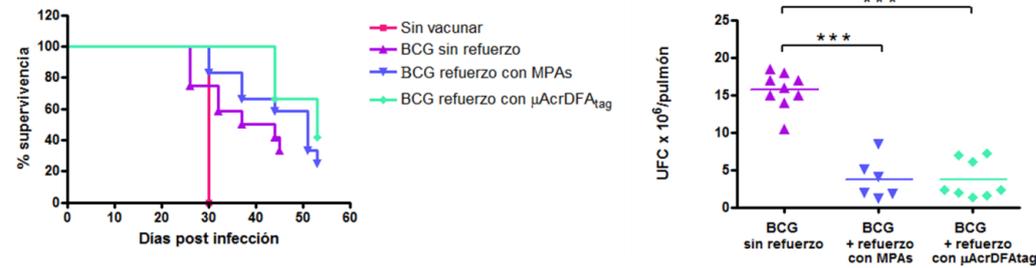
I. Esquema de vacunación y refuerzo



II. Reto con *M. tuberculosis* H37Rv



III. Reto con *M. tuberculosis* 9005186



VI. Reto con *M. tuberculosis* 583

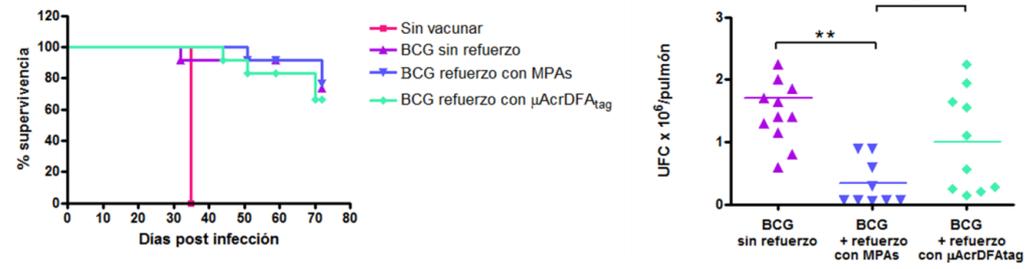


Fig. 1. MPAs con y sin antígeno como refuerzo de la vacuna BCG. **I.** Esquema de vacunación y refuerzo. **II.** Reto con *M. tuberculosis* H37Rv. **III.** Reto con *M. tuberculosis* 9005186. **IV.** Reto con *M. tuberculosis* 583. Se registró la supervivencia (izquierda) y se determinó carga bacilar en pulmón (derecha) y se comparó con grupos que solo recibieron vacuna sin refuerzo. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Dado que no se observaron diferencias entre los grupos reforzados (MPAs solas o con antígeno) se decidió explorar posteriormente el efecto de las MPAs como adyuvante de la vacuna BCG administradas simultáneamente por vía subcutánea. Se

utilizó el mismo modelo experimental y los ratones se retaron con la cepa de referencia H37Rv de virulencia moderada. Se observó que la adición de las MPAs mejoró la protección conferida por la vacuna tal y como lo indican los datos de supervivencia y carga bacilar en pulmones 2 y 4 meses después de la infección (Fig. 2) (Moreno-Mendieta *et al.*, datos no publicados). Estos resultados son los antecedentes directos del presente trabajo de tesis que justifican la importancia de la evaluación de la capacidad adyuvante de las MPAs en animales retados con cepas de virulencia muy alta, ya que realmente representa el tipo de infecciones de aislados clínicos. Por otra parte resulta de interés evaluar el uso de las MPAs administradas junto con la vacuna por otras vías como la vía intranasal, ya que es la vía de entrada del patógeno y es una vía ventajosa para la administración de vacunas incluyendo la vacuna BCG, ya que se ha reportado podría incluso mejorar su eficacia protectora, además de inducir una respuesta inmune local (Tree *et al.*, 2004; Lyadova *et al.*, 2001; Derrick *et al.*, 2014; Uranga *et al.*, 2016).

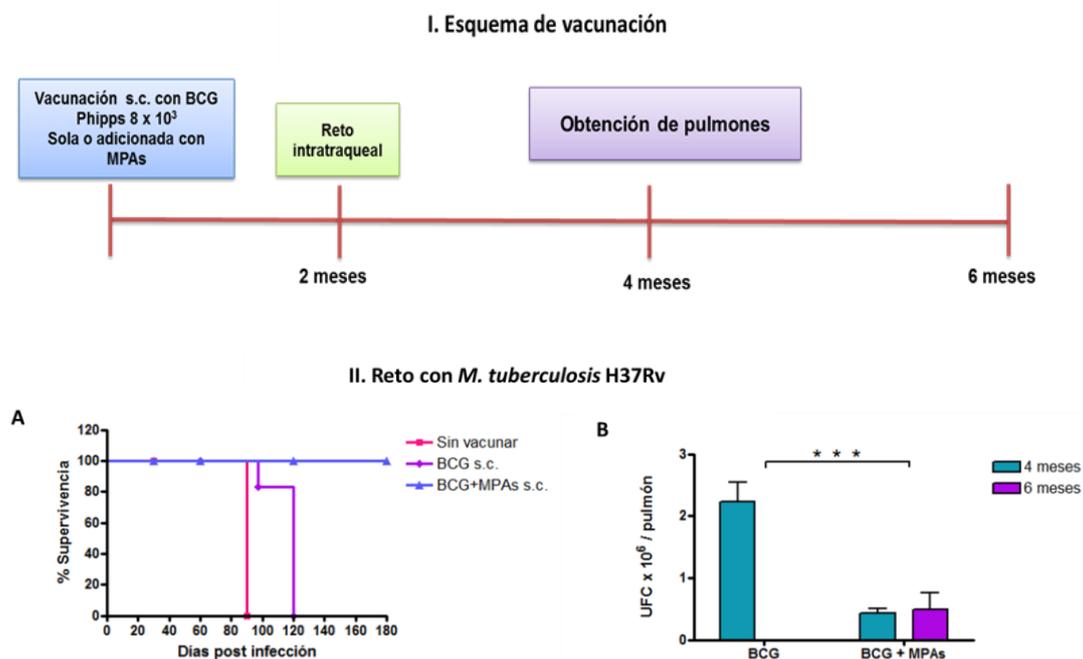


Fig. 2. MPAs como adyuvante de la vacuna BCG por vía s.c. **I.** Esquema de vacunación y refuerzo. **II.** Reto con *M. tuberculosis* H37Rv. Se registró la supervivencia (**A**), se determinó carga bacilar en pulmón (**B**) y se comparó con grupos que recibieron la vacuna sin MPAs. *** $p < 0.001$.

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

3.1. JUSTIFICACIÓN

Dado que la eficacia de la vacuna BCG para prevenir la enfermedad pulmonar en el adulto es muy variable, se buscan nuevas estrategias para mejorar los niveles de protección que se inducen con la vacunación, entre estas el uso de adyuvantes.

Las micropartículas de almidón sin modificaciones químicas representan una alternativa interesante ya que se ha demostrado su actividad adyuvante tanto en ratones sanos como en ratones retados con *M. tuberculosis*, y ofrecen múltiples ventajas ya que no se requieren reactivos ni protocolos complejos de preparación que afecten su biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad.

Por otra parte resulta necesaria la investigación y el desarrollo de adyuvantes naturales, seguros y de bajo costo, que sean aptos para su administración por varias vías especialmente las vías mucosas.

3.2. HIPÓTESIS

El uso de micropartículas de almidón en combinación con la vacuna BCG mejorará la eficacia protectora de ésta frente a la infección con una cepa de *M. tuberculosis* de virulencia muy alta.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial adyuvante de las micropartículas de almidón (MPAs) a la vacunación con BCG, en un modelo de protección basado en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva (MTPP).

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la eficacia protectora de la vacuna BCG adicionada con MPAs contra la infección con *M. tuberculosis* 9005186, genotipo LAM, mediante el registro de la supervivencia y análisis de la carga bacteriana en pulmón.

Evaluar el efecto de la administración de la BCG con las MPAs en el desarrollo de neumonía.

Determinar el impacto de la vía de administración subcutánea e intranasal en la eficacia protectora de BCG sola y adicionada con las MPAs.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos con el modelo de protección basado en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar se realizaron en la Sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), en condiciones de bioseguridad animal nivel 3 (ABSL-3 por sus siglas en inglés) y siguiendo los lineamientos de la Comisión para Investigación con Animales (CINVA) bajo protocolo aprobado PAT-1834-16/19-1 con vigencia hasta el año 2019.

5.1 DISEÑO DE GRUPOS Y VACUNACIÓN:

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad con peso aproximado de 22 gramos, proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ. Los ratones fueron alojados en condiciones controladas de temperatura, humedad, ciclos de luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Fueron vacunados utilizando las vías de administración intranasal (i.n.) y subcutánea (s.c.), distribuidos en grupos de 12 ratones como se muestra en la tabla 4.

Por la vía i.n. se administraron 20×10^3 UFC de BCG Phipps y $250 \mu\text{g}$ de MPAs en un volumen de $20 \mu\text{L}$ de solución salina isotónica (SSI), $10 \mu\text{L}$ por fosa mediante goteo con micropipeta. Sin uso de anestesia se inmovilizaron sujetándolos con la mano de la parte superior de la cabeza y la cola para rectificar la tráquea y promover la aspiración de la gota en cada narina (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

La vacunación por vía s.c. se realizó en la base de la cola (previa inmovilización del animal), utilizando una jeringa intradérmica de 1 c.c., con 20×10^3 UFC de BCG Phipps y $250 \mu\text{g}$ de micropartículas de almidón suspendidas en $100 \mu\text{L}$ de SSI. Como grupos controles se tuvieron un grupo de enfermedad sin vacuna, al que se le administró solo SSI y un grupo vacunado con BCG sin almidón.

La metodología general se resume en la figura 3.

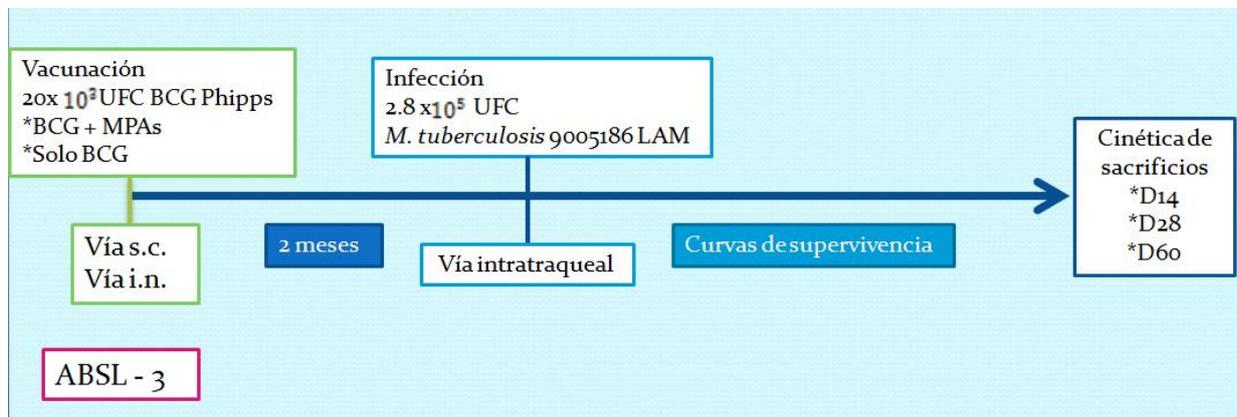


Fig. 3. Estrategia Experimental General. Ratones sanos BALB/c vacunados con BCG ó BCG+MPAs se infectaron con *M. tuberculosis* 9005186 y se sacrificaron 14, 28 y 60 días después para evaluar la protección de la vacuna con y sin MPAs. ABSL-3: Laboratorio de bioseguridad animal nivel 3.

Tabla 4. Diseño experimental.

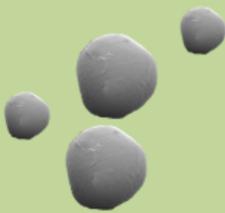
Grupo	# ratones por grupo	Días de sacrificio post-infección	#ratones por día de sacrificio
Control sin vacuna	24	14, 28 y 60	6*
BCG vía s.c.	24		
BCG + MPAs vía s.c.	24		
BCG vía i.n.	24		
BCG + MPAs vía i.n.	24		
TOTAL	120		

* 6 ratones se utilizan para la elaboración de las curvas de supervivencia



Preparación, titulación y verificación de pureza e identidad de BCG Phipps y *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM.

Las bacterias fueron cultivadas en medio Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit MI), enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC, Becton Dickinson, Cockysville, MD) e incubadas en constante agitación a 37°C y CO₂ 5% por 21 días. Su crecimiento fue monitoreado por análisis de densitometría. Cuando se encuentran en fase logarítmica (DO 600 nm = 0.6), las bacterias son cosechadas y lavadas tres veces con PBS- Tween 80 al 0.05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 119 USA) para evitar agregados bacterianos. Su pureza se confirma por cultivo en agar sangre de carnero y su morfología microscópica por tinción de Ziehl-Neelsen (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017).



Preparación de las micropartículas de almidón.

Se preparó un stock con una concentración final de 25mg/mL lista para mezclar con la vacuna. Tomando 10 µL de esta suspensión se tomaron los 250 µg de micropartículas para cada ratón. Para esto se pesaron 125 mg de almidón previamente esterilizado en seco a 120°C 15 min, se lavó 3 veces con 5 mL de agua destilada estéril cada vez 5 minutos en agitación suave. Entre cada cambio se centrifugó 5 min a 4000 rpm. Después del último lavado se resuspendió el pellet en 5 mL de Solución Salina Isotónica (Moreno-Mendieta, 2014).

5.2 RETO CON *M. TUBERCULOSIS* 9005186 GENOTIPO LATINOAMERICANO-MEDITERRÁNEO (LAM)

Dos meses después de la vacunación, se realizó la infección con la cepa de *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM. Los animales se anestesiaron con vapor de sevoflurano (100 µL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm para la inoculación intratraqueal (i.t.) con 2.85×10^5 UFC de la cepa de *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM. Para la infección se colocó al animal sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se sujetaron los incisivos con una liga de caucho, se introdujo por la tráquea una cánula de calibre 22 G x 1.0“w/ y punta roma de 1.25 mm. Tras la infección, los ratones quedaron hospedados en un sistema de

microaisladores con flujo constante y filtración de aire, garantizando que no hay intercambio de aire entre cajas ni con el medio exterior. Este procedimiento lo realizó el Dr. Jorge Barrios de la Sección de Patología Experimental del INCMNSZ en condiciones de bioseguridad animal nivel 3 (ABSL-3). Diariamente se registró el estado de los animales de los diferentes grupos para la construcción de las curvas de supervivencia.



M. tuberculosis 9005186 genotipo Mediterráneo-Latino Americano (LAM).

Es una cepa de virulencia muy alta obtenida de aislados clínicos en México durante los años 1995 a 2003 y cuya inmunopatogenicidad fue previamente caracterizada. Esta cepa causa la mortalidad de los animales infectados cinco semanas después de la infección intratraqueal. Esto, debido a su rápido crecimiento en pulmones, al gran número de áreas neumónicas que produce y a que promueve una mayor participación de la respuesta Th2 (Marquina *et al.*, 2008).

5.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tras la infección se realizó una cinética de sacrificios a los 14, 28 y 60 días, en la que cada ratón fue anestesiado con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 210 mg/kg y sacrificado por exsanguinación. De cada animal se expuso la cavidad torácica de donde se colectaron los pulmones. Tres pulmones izquierdos por grupo se perfundieron vía intratraqueal con etanol absoluto y se colectaron en tubos Falcon de 50 mL por al menos 72 horas, para su posterior análisis histológico. Seis pulmones derechos por grupo (cuando fue posible) se colocaron en criotubos de 2 mL y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento para determinar la carga bacilar. Todos los procedimientos se realizaron dentro de un gabinete de flujo laminar en condiciones de bioseguridad animal nivel 3 (ABSL-3).

5.3.1 DETERMINACIÓN DE CARGA BACTERIANA EN PULMÓN

El recuento de Unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. tuberculosis* se realizó siguiendo los protocolos de la Sección de Patología Experimental del INCMNSZ. Los pulmones derechos de los ratones se homogeneizaron con el equipo MP Biomedicals FastPrep-24, moliendo una vez en seco con una perla de cerámica y posteriormente agregando 1 mL de buffer PBS-5T (0.05% Tween 80 Sigma) estéril para moler de 3-5 veces más. Las muestras se sonicaron 45 segundos con el fin de disgregarlas y evitar sembrar cúmulos de bacterias y se procedió a hacer diluciones seriadas de cada homogeneizado para sembrar por goteo 10 μ L, por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco Labs) preparado con 0.5% de glicerol (Sigma Aldrich) y enriquecido con OADC (Figura 4). Las placas se incubaron durante 21 días a 37°C en incubadoras (Thermo Scientific) con CO₂ 5%, para el posterior conteo de colonias con el fin de determinar la cantidad total de UFC por pulmón.

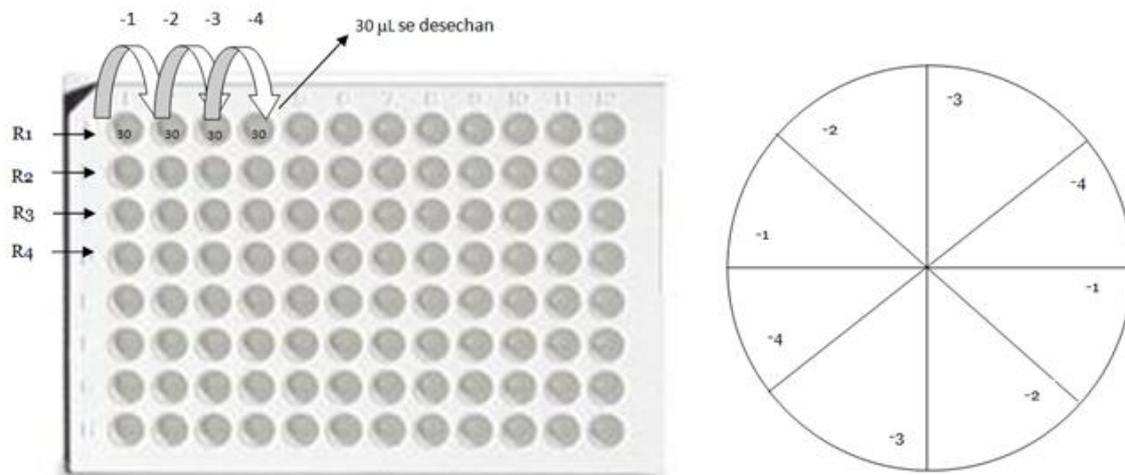


Fig. 4. Diluciones de UFCs para conteo en placa. **(A)** Cajas de 96 pozos con 270 μ L de PBS 5T (0.05% Tween 80 Sigma) por pozo y 30 μ L de muestra se utilizan para realizar las diluciones seriadas. **(B)** Distribución de las diluciones en placa, se siembran 10 μ L de muestra.

Pasados los 21 días, se registró el número de colonias en cada dilución y se procedió a realizar los cálculos para determinar los millones de UFC presentes por pulmón (Tabla 5).

Tabla 5. Diluciones para la determinación de unidades formadoras de colonia por pulmón.

Dilución	Sembrado	%	Dividido entre 1×10^6	Factor de multiplicación	Resultado en:
C	10 μ L	1	100	0.0001	Millones de UFC/pulmón
-1	10 μ L	0.1	1000	0.001	
-2	10 μ L	0.01	10000	0.01	
-3	10 μ L	0.001	100000	0.1	
-4	10 μ L	0.0001	1000000	1	

5.3.2 DETERMINACIÓN DE ÁREA AFECTADA POR NEUMONÍA

Pasadas mínimo 72 horas en etanol absoluto, los pulmones se diseccionaron por el hilio y se deshidrataron en pases sucesivos con etanol y xilol y se embebieron en parafina. Tras la deshidratación y fijación, se realizó la inclusión en bloques de parafina para hacer los cortes histológicos en el microtomo (Leica RM2145), con un grosor de 4 μ m. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E). Las áreas afectadas por la neumonía se midieron y analizaron mediante el sistema Leica QWin (Leica Microsystems Imaging Solutions ltd., Cambridge, UK, 25X). En cada caso se midió en μ m² el área total y zonas neumónicas de cada pulmón y se calculó el porcentaje de pulmón afectado por neumonía. También se examinó la presencia y tamaño de granulomas.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las curvas de supervivencia se utilizó el análisis de Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico (Log Rank Test). Los datos de UFC e histología se analizaron con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, expresando los resultados

como el promedio \pm DE. La comparación entre grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post-test Tukey. Las diferencias se consideraron significativas con $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 PROTECCIÓN CONFERIDA CON LA VACUNA BCG Y LAS MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN

6.1.1 CURVAS DE SUPERVIVENCIA

La eficacia protectora de la vacuna BCG administrada por las rutas subcutánea (s.c.) e intranasal (i.n.), sola o acompañada de las MPAs, se determinó en primera instancia comparando la supervivencia entre grupos.

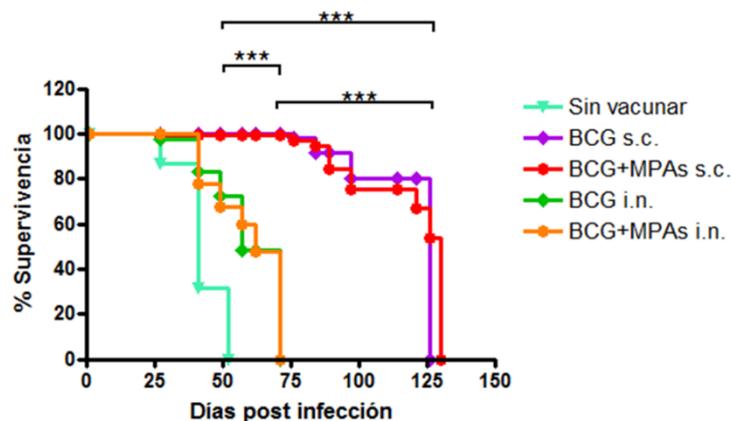


Fig. 5. Supervivencia a la infección con la cepa de virulencia muy alta 9005186 genotipo LAM de *M. tuberculosis*. Gráfica de Kaplan-Meier *** $P < 0.0001$.

En la fig. 5 podemos observar que cerca del 50% de los ratones vacunados vía i.n. sin importar la adición de las MPAs sobrevivió hasta el día 62, aproximadamente 20 días más que el grupo no vacunado ($P < 0.0001$). En cuanto a la vía de administración s.c., se puede observar que cerca del 80% de los ratones que recibieron solo la vacuna por esta vía llegaron al día 126 y cerca del 54% de los

vacunados que recibieron BCG más las MPAs sobrevivieron hasta el día 130. En comparación con el grupo no vacunado ambos grupos vacunados por vía s.c. tuvieron una supervivencia de hasta 80 días más ($P < 0.0001$). Con respecto a la vía de vacunación y sin importar la adición de las MPAs se observó una diferencia significativa entre los grupos pues como se muestra en la gráfica, los animales vacunados vía s.c. vivieron cerca de 70 días más que los vacunados por vía i.n ($P < 0.0001$).

6.1.2 CARGA BACTERIANA EN PULMÓN

Siguiendo la estrategia experimental detallada en la figura 3, dos meses después de la vacunación los animales se infectaron. A los 14, 28 y 60 días posteriores a la infección se realizaron sacrificios para determinar en cada caso la cantidad de UFC de *M. tuberculosis* por pulmón. En las figuras 6 y 7 se observa la carga bacilar de los animales vacunados por vía s.c. e i.n. respectivamente en comparación con el grupo sin vacunar.

En la figura 6A se puede observar que la carga bacilar promedio para el día 14 post-infección es de aproximadamente 194,000 UFC para los ratones que no recibieron vacuna, mientras que para los ratones vacunados solo con BCG fue de 20,000 UFC. Por otro lado, los animales vacunados con BCG más las MPAs tuvieron en promedio 5,000 UFC, mostrando en el día 14 una disminución de 15,000 UFC en comparación con el grupo administrado solo con BCG, sin embargo dicha reducción no resultó estadísticamente significativa mediante análisis de varianza. El día 28 post-infección (Fig. 6B), fue el tiempo de mayor incremento en el número de UFC observado para todos los grupos en la cinética realizada. El grupo que no recibió vacuna tuvo en promedio 3, 550,000 UFC, mientras que los grupos vacunados alcanzaron 38, 000 UFC (solo con BCG) y 160, 000 UFC (BCG más MPAs). El análisis estadístico tampoco arrojó diferencias entre los dos grupos vacunados. Para el día 60 (Fig. 6C) tiempo en el cual ya no había ratones del grupo sin vacunar, el número de UFC para el grupo vacunado solo con BCG fue en promedio de 270, 000 UFC, mientras que para el grupo vacunado con BCG más las MPAs fue de 186, 000 UFC. Desde el día 28 y hasta el día 60 el número de UFC para el grupo vacunado con

BCG más las MPAs, aumentó solo 26, 000 UFC. Al día 60 como en los tiempos anteriores, tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas, esto debido a la DE obtenida en todos los grupos y que como se observa en los diagramas de dispersión obedece a las diferencias en las respuestas individuales. La cinética comparada se presenta en la figura 8A.

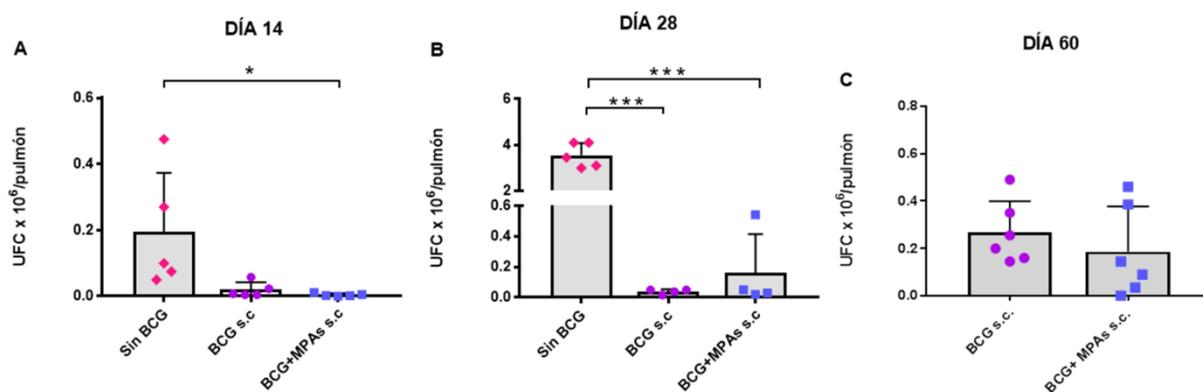


Fig. 6. Carga bacilar de pulmones de ratones vacunados por vía s.c., infectados con *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM y sacrificados a los días **(A)** 14, **(B)** 28 y **(C)** 60 después de la infección. Los diagramas de dispersión muestran los valores individuales y las barras la media del grupo +DE.
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

Con respecto a los animales vacunados vía i.n., se observó en todos los tiempos de la cinética un número mayor de UFC en pulmón en comparación con los animales vacunados vía s.c. En la figura 7A se muestra el número de UFC para el día 14 post-infección, siendo en promedio 194, 000 UFC para los ratones no vacunados, y 38, 000 y 253, 000 UFC para los grupos vacunados con BCG y con BCG más MPAs, respectivamente. Debido a la diferencia de respuesta en algunos animales del mismo grupo, estos resultados no fueron diferentes estadísticamente. Por su parte, 28 días después de la infección (Fig. 7B) se observa un aumento en el número de UFC del grupo vacunado solo con BCG (6, 410, 000 UFC) al punto de casi igualar el número de UFC para el grupo vacunado con BCG más MPAs (7, 175, 000 UFC) y superar el número de UFC del grupo no vacunado (3, 550, 000 UFC). Para el día 60 post-infección (Fig. 7C) ya no había animales del grupo no vacunado. En este tiempo se observa una disminución en el número de UFC de los grupos vacunados (808, 333 UFC para el grupo vacunado solo con BCG y 2, 940, 000 UFC para los vacunados con

BCG más MPAs), presentándose diferencia significativa entre los grupos ($P < 0.05$). En la figura 8B se muestra la cinética comparada en la que se muestra que al igual que los animales vacunados por vía s.c., los animales vacunados por vía i.n. también presentan el mayor número de UFC 28 días después de la infección.

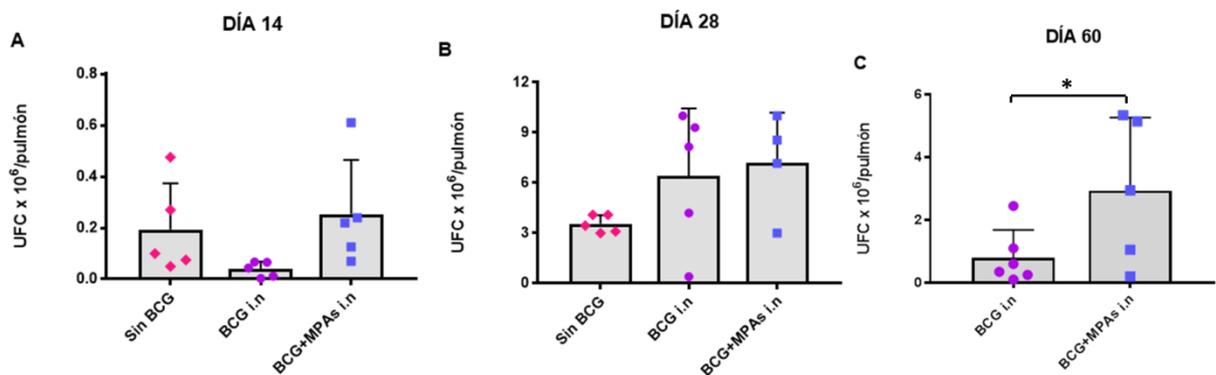


Fig. 7. Carga bacilar de pulmones de ratones vacunados por vía i.n., infectados con *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM y sacrificados a los días (A) 14, (B) 28 y (C) 60 después de la infección. Los diagramas de dispersión muestran los valores individuales y las barras la media del grupo +DE.

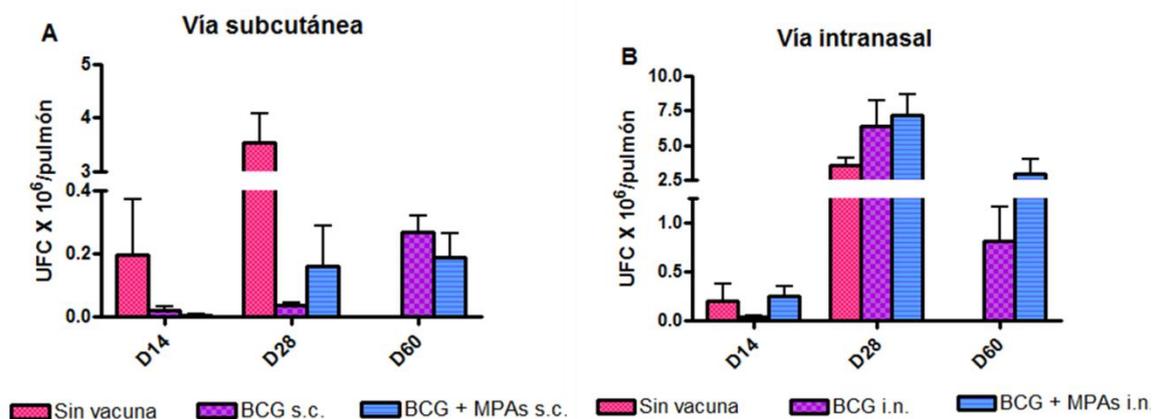
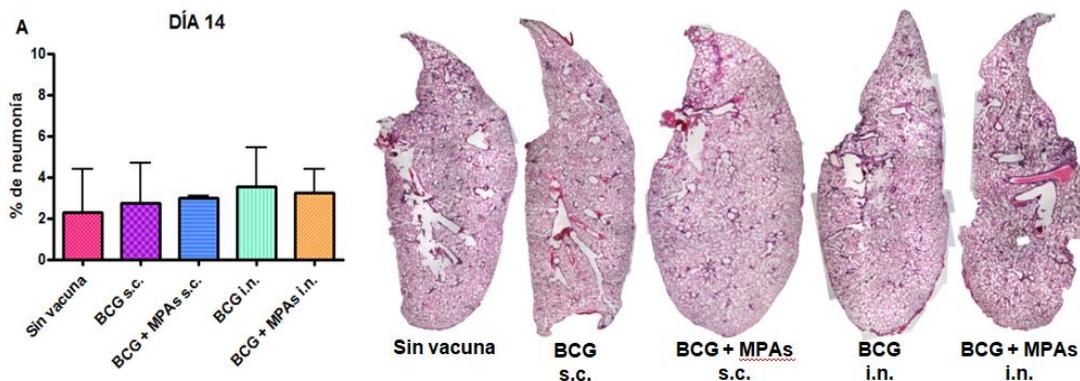


Fig. 8. Comparación de la carga bacilar en pulmón por tiempo y vía de vacunación. (A) Vía s.c. (B) vía i.n.

6.1.3 PRESENCIA DE NEUMONÍA

En cada tiempo de sacrificio se hizo el análisis histológico de los pulmones para observar el desarrollo de zonas neumónicas y comparar entre grupos sin vacunar y vacunados con y sin las MPAs. En la figura 9A, se puede observar tanto en la gráfica como en las fotografías de los cortes histológicos, que para el día 14 el porcentaje de neumonía es mínimo, siendo en promedio de 2 a 4% tanto para los grupos no vacunados como para los vacunados por ambas vías. Para el día 28 (Fig. 9B) se observa para el grupo no vacunado en promedio 19% de neumonía, mientras que para los grupos vacunados por vía s.c. los porcentajes son menores al 10% y para los grupos vacunados por vía i.n. son entre el 38 y 47% sin presentarse diferencias significativas entre el grupo vacunado solo con BCG y el vacunado con BCG más MPAs, por lo que se descarta que dicho efecto sea atribuido a las MPAs. Para el día 60 ya no había muestras del grupo no vacunado y el porcentaje de neumonía en los grupos vacunados aumentó sobre todo para los animales vacunados por la vía i.n. Los ratones vacunados por vía s.c. tuvieron en promedio 25% de neumonía, con un porcentaje menor (19%) en los administrados con BCG más las MPAs sin diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, para los animales vacunados vía i.n. el porcentaje de áreas neumónicas aumentó hasta un 61% para los vacunados solo con BCG, siendo ligeramente menor (54%) en los vacunados más las MPAs, sin embargo, tampoco se observan diferencias significativas.



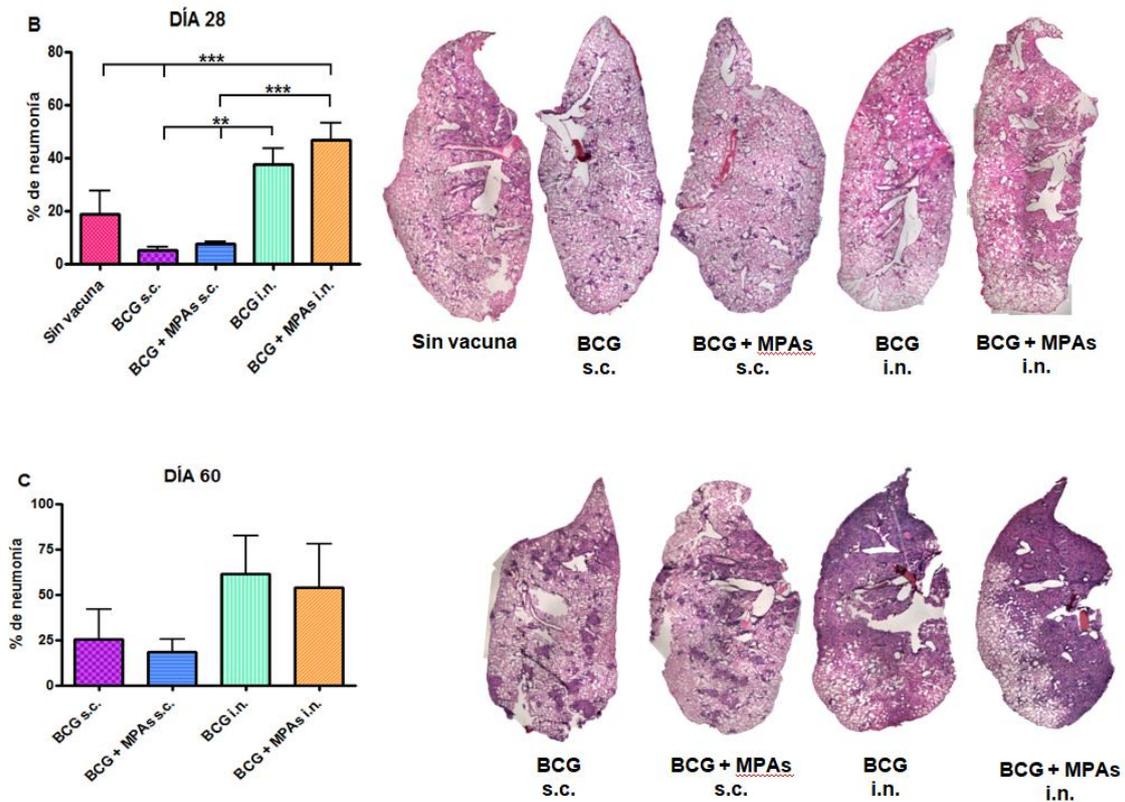


Fig. 9. Porcentaje de neumonía en ratones vacunados por las vías s.c. e i.n., infectados con *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM y sacrificados a los días (A) 14 (B) 28 y (C) 60 después de la infección. En cada tiempo se presenta un corte histológico representativo por grupo. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La comparación del porcentaje de neumonía en todos los grupos se presenta en la figura 10, donde se observan claramente las diferencias dependiendo de las vías de administración. Para el día 14, el porcentaje de neumonía es muy similar en todos los grupos. Sin embargo, para el día 28 se observa que los pulmones más afectados fueron los de los grupos vacunados por vía i.n. sin y con MPAs (38% y 47% respectivamente). Estos porcentajes se mantienen muy similares a los observados para el día 60, aumentando 23% para el grupo vacunado solo con BCG y 7% para el vacunado con BCG más las MPAs. Para la vía s.c. el mayor porcentaje se registra el día 60 aumentando solo 20% (BCG) y 12% (BCG más MPAs) en 32 días. Entre los grupos de vacunación experimentales (BCG vs. BCG más MPAs), no se observaron diferencias significativas en ninguna de las dos vías de administración.

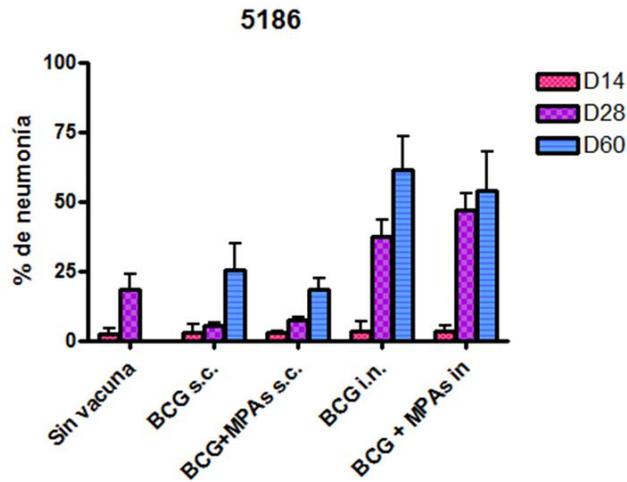


Fig. 10. Comparación del porcentaje de neumonía por tiempo y vía de vacunación.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado para evaluar la capacidad adyuvante de las MPAs administradas de manera simultánea con la vacuna BCG en ratones BALB/c vacunados por las vías subcutánea (s.c.) e intranasal (i.n.), con el fin de aumentar la eficacia protectora de la vacuna. Para la infección fue utilizada la cepa de *M. tuberculosis* 9005186 genotipo LAM, obtenida de un aislado clínico en México cuya inmunopatogenicidad fue caracterizada en el año 2008, determinándose su virulencia muy alta (Marquina *et al.*, 2008). En dicho estudio en el que se utilizaron ratones BALB/c no vacunados, se demuestra que la infección con la cepa 9005186, en comparación con la infección con la cepa H37Rv, se caracteriza por un rápido crecimiento bacteriano en pulmón (el doble que H37Rv desde el día 14) así como el desarrollo temprano y masivo de neumonía (más del doble que para H37Rv al día 28), ocasionando la mortalidad del 100% de los animales infectados al día 35 (Marquina *et al.*, 2008). La gran diferencia entre la virulencia de las cepas de *M. tuberculosis* es determinada principalmente por los componentes de la pared celular bacteriana (Källenius *et al.*, 2016) e influye en la capacidad protectora de la vacunación con BCG (López *et al.*, 2003) y en su caso con la capacidad protectora o reforzante que tengan otro tipo de vacunas y adyuvantes. Principalmente influye en una menor protección de la vacuna BCG la respuesta inmune del huésped a los

glicolípidos asociados a la pared de la micobacteria, los cuales juegan un papel crucial en la inmunomodulación inducida por *M. tuberculosis* provocando distintas respuestas inmunes y activando/reprimiendo diferentes cascadas (Karakousis *et al.*, 2004). Tal es el caso del lipoarabinomano que se ha comprobado resulta muy eficiente para desactivar a los macrófagos (Hernández-Pando *et al.*, 1997) actuando a varios niveles ya que puede eliminar los radicales libres de oxígeno, inhibir la actividad de la proteína quinasa C, que tiene un papel regulador en las diversas vías de transducción de señales implicadas en la activación de macrófagos y bloquear la activación transcripcional de genes inducibles por INF- γ (Chan *et al.*, 1991); así mismo el glicolípido fenólico (PGL, por sus siglas en inglés) se ha descrito está relacionado con la supresión de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-12 (Reed *et al.*, 2004), las cuales resultan esenciales para combatir las infecciones con *M. tuberculosis*. Por esta razón, resulta de importancia realizar estudios de protección vacunal utilizando esta y otras cepas muy virulentas pues son los microorganismos con los que la población se enfrenta verdaderamente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la vía de administración de la vacuna por sí misma, independientemente de la presencia o no de las MPAs, tiene un impacto en la eficacia protectora de la misma. Por vía s.c., la vacuna adicionada con las MPAs protegió de forma similar que la vacuna sola, lográndose una supervivencia de hasta 126 y 130 días respectivamente. Estos resultados difieren de los obtenidos en experimentos previos en los que utilizando 8000 UFC de BCG Phipps para vacunar se alcanzaron 57 días de supervivencia (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017) y muestran que aumentando la dosis de vacuna se puede aumentar la protección que ésta confiere. Resulta importante destacar que por vía s.c. se han utilizado diferentes cepas de BCG y dosis para vacunar con distintos resultados en la protección contra la infección con la cepa de mediana virulencia H37Rv (tabla 6). Se ha observado que la cepa de BCG Phipps brinda una protección rápida y a corto plazo, mientras que la cepa de BCG Pasteur brinda una protección más lenta y a largo plazo (Castillo-Rodal *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen antecedentes suficientes del efecto de cepa y dosis de vacuna y vía de administración frente a la infección con micobacterias muy virulentas, lo cual representa el principal aporte de este trabajo. Así como el hecho que se reporta por primera vez la cinética de crecimiento bacteriano en pulmón a los 14 y 28 días después de la infección

(previa vacunación), ya que de manera general en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva a partir del cual se adaptó el modelo experimental usado en este trabajo, se analiza la carga bacteriana en pulmón a los días 60 y 120 post-infección para evaluar la eficacia protectora de vacunas o adyuvantes.

Tabla 6. Cepas y dosis utilizadas para la vacunación s.c. con BCG.

Cepa de BCG	UFC de vacuna	UFC de H37Rv en pulmón (m) = meses post infección	Referencia
BCG Pasteur	1x10 ⁴	(2m) 5.52x10 ⁶	Castillo-Rodal <i>et al.</i> , 2006
BCG Phipps	1x10 ⁴	(2m) 5.32x10 ⁶	
BCG Phipps	8x10 ³	(2m)6x10 ⁶	García <i>et al.</i> , 2014
BCG Phipps	8x10 ³	(2m) 4x10 ⁶	Valdés <i>et al.</i> , 2014
BCG Moreau	8x10 ³	(2m) 5.65x10 ⁶	Tirado <i>et al.</i> , 2016
BCG Pasteur	1x10 ⁶	(4m) 10 ⁶	Pedroza-Roldán <i>et al.</i> , 2016

En cuanto a la vacunación por vía i.n., en las condiciones de este experimento y en contraste con reportes previos, la vacunación no brinda protección, con o sin las MPAs. Si bien la supervivencia de los ratones vacunados fue 20 días más que la de los animales sin vacunar, no se observó disminución de la carga bacilar en pulmón. Es posible que en este sentido, factores como las barreras físicas propias del aparato respiratorio superior, vellosidades y cilios epiteliales encargados de expulsar materiales extraños o microorganismos a través del moco (Kaliner *et al.*, 1986), hayan impedido la llegada tanto de la vacuna como de las MPAs a los macrófagos alveolares. También es factible un evento de competencia en la fagocitosis de MPAs y

las bacterias lo que conllevaría a que no todos los ratones recibieran la misma dosis de vacuna explicando la diferencia de UFC en pulmón entre animales.

Inicialmente parece que la adición de las MPAs va en detrimento de la respuesta protectora de la vacuna ya que el número de UFC es en promedio mayor que el grupo no vacunado a los 14 días, sin embargo, que al día 28 la carga bacteriana en pulmón haya sido mayor en los grupos vacunados coincidiendo con el aumento progresivo en la neumonía, más bien refleja la fuerte respuesta inflamatoria de los animales a la vacuna recibida por esta vía. Es importante destacar que en contraste con este estudio, algunos autores reportan que el uso de la vacuna BCG por vía i.n. aumenta la capacidad protectora de la vacuna en comparación con la vía s.c., esto debido principalmente a una mayor producción de TNF- α e INF- γ . Sin embargo, vale la pena resaltar que la mayoría de las cepas que utilizaron para la infección fueron cepas con mediana virulencia, además que no se reportaron los hallazgos a nivel histológico. En la tabla 7 se presenta una comparación de estos estudios con las cepas y dosis correspondientes para la vacunación e infección.

Tabla 7. Comparación de cepas y dosis de vacunación por vía i.n.

Cepa de BCG	Dosis de vacuna (UFC)	Vía de vacunación	Cepa para infección	Virulencia	Dosis de infección (UFC)	Vía de infección	Referencia
BCG Phipps	20×10^3	Intranasal	<i>M. tuberculosis</i> 9005186 LAM	Muy alta	2.8×10^5	Intratraqueal	Presente estudio
BCG Pasteur	$10^5, 10^6, 10^7$		H37Rv	Mediana	5×10^2	Aerosol	Tree <i>et al.</i> , 2004
BCG Pasteur	10^5		<i>M. bovis</i>	Mediana	2×10^3	Intravenosa	Lyadova <i>et al.</i> , 2001
BCG Pasteur	10^3		Erdman	Mediana	200	Aerosol	Derrick <i>et al.</i> , 2014
BCG Danish	2.5×10^7		H37Rv	Mediana	10^2	Intranasal	Uranga <i>et al.</i> , 2016

Por su parte, y respecto al uso de sistemas particulados para reforzar la vacunación con BCG, son escasos los reportes y se limitan al uso de nanopartículas de cera de carnauba amarilla cubiertas con el antígeno 85B de *M. tuberculosis* fusionado a la hemaglutinina de unión a heparina para inmunización i.n. (Stylianou *et al.*, 2014) y al uso de esporas recombinantes inactivadas de *Bacillus subtilis* también para administración i.n. como refuerzo después de la vacunación s.c. con BCG (Reljic *et al.*, 2013; Sibley *et al.*, 2014). En ambos casos se comprobó que el uso de las partículas como refuerzo de la vacuna BCG promueven una mayor producción de citocinas proinflamatorias como INF- γ , IL-2 y TNF- α , y una disminución de UFC en pulmón comparable con la obtenida con la sola vacuna. Se presume que además de la fagocitosis (partículas de 1 a 5 μm) o endocitosis (en el caso de nanopartículas), puede haber activación inespecífica del sistema inmune innato por el reclutamiento de células NK en los pulmones y la activación de vías de señalización mediada por la interacción de ligandos específicos con uno o más receptores tipo Toll (Chadwick *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012; Reljic *et al.*, 2013).

En el caso concreto del uso de las MPAs como refuerzo o adyuvante de la vacuna BCG, se ha observado que los resultados dependen de la cepa utilizada para la infección. Infectando con la cepa de referencia H37Rv el efecto de las MPAs es contundente tanto en el aumento significativo en la supervivencia como en la reducción de UFC en pulmón y se pudo observar que no hay desarrollo de neumonía por la adición de las mismas (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017). En contraste infectando con las cepas muy virulentas los resultados han sido diversos como es el caso de la cepa 9005186 pues usando las MPAs como refuerzo de la vacuna fue posible reducir de forma significativa la carga bacteriana en pulmón pero cuando estas se administraron directamente con la vacuna no se observaron efectos. Esto resalta la importancia y el efecto de la combinación de todos los factores como son cepa y vía de vacunación, cepa de infección y finalmente vía, dosis y estrategia (como refuerzo o adyuvante) de administración de las MPAs. En la actualidad se investiga el papel inmunoestimulante que tienen estas MPAs sobre macrófagos lo cual permitirá caracterizar los receptores involucrados y los mecanismos responsables de su actividad y en consecuencia orientarán el diseño de futuros experimentos *in vivo*.

8. CONCLUSIONES Y PROSPECTIVAS

8.1 CONCLUSIONES

- ❑ En contraste con la cepa de referencia H37Rv y de acuerdo a las condiciones de este experimento, la coadministración de MPAs con la vacuna BCG no mejora la eficacia protectora de la vacuna frente a la infección con la cepa 9005186 genotipo LAM ni en términos de supervivencia ni de carga bacilar en pulmón.
- ❑ La adición de las MPAs por vía i.n. no contribuye al desarrollo de la neumonía, lo cual resulta de suma importancia considerando las preocupaciones concernientes con la seguridad de los adyuvantes administrados por esta ruta.
- ❑ A diferencia de lo reportado por otros autores, no se observó que la vacunación intranasal con BCG sola o con las MPAs resultara en una mayor protección.
- ❑ La eficacia protectora de la vacuna BCG con las MPAs, se ve influida por la dosis y vía de administración de la vacuna y la hipervirulencia de la cepa utilizada para la infección.
- ❑ Si bien la administración de una mayor dosis de vacuna por vía s.c. aumentó la supervivencia de los ratones, la adición de las MPAs no tuvo ningún efecto, ni negativo ni positivo, sobre su eficacia protectora.

8.2 PROSPECTIVAS

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio y los antecedentes de la línea de investigación, se recomienda continuar explorando las propiedades inmunoestimulantes de las micropartículas y especialmente su caracterización con el fin de orientar futuros experimentos en el modelo de

protección vacunal basado en el modelo de tuberculosis pulmonar experimental. Particularmente resulta de interés:

- Investigar el efecto de la administración de cantidades diferentes de MPAs con distintas cepas de BCG que presentan niveles de protección diferentes (BCG Phipps vs BCG Pasteur o su combinación BCG Mix).
- Explorar la vía de administración i.n., solo para la administración de las MPAs como inmunoestimulante bien sea antes o después de la vacunación.
- Caracterizar el mecanismo adyuvante de las MPAs *in vitro*, en términos de células estimuladas y citocinas producidas pues esto permitirá conducir experimentos *in vivo* con la adecuada combinación de factores como son cepa y dosis de vacuna y cantidad y vía de administración de las MPAs.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Artursson, P., Edman, P., Laakso, T., & Sjöholm, I. (1984). Characterization of polyacryl starch microparticles as carriers for proteins and drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(11), 1507–1513. <https://doi.org/10.1002/jps.2600731103>
2. Balasse, E., Odot, J., Gatouillat, G., Andry, M. C., & Madoulet, C. (2008). Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1–2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.021>
3. Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.012>
4. Behr, M., Ellis, R., Ernst, J., Evans, T., Flynn, J. A., Hatherill, M., Schragar, L. (2015). Developing vaccines to prevent sustained infection with Mycobacterium tuberculosis: Conference proceedings. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, Maryland USA, November 7, 2014. *Vaccine*, 33(26), 3056–3064. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.061>

5. Beneke Carien E., Alvaro M. Viljoen and Josias H. Hamman. (2009). Polymeric Plant-derived Excipients in Drug Delivery, *Molecules*, *14*(7), 2602-2620.
6. Björk, E., & Edman, P. (1990). Characterization of degradable starch microspheres as a nasal delivery system for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, *62*(2-3), 187-192. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90232-S](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90232-S)
7. Campos E, Branquinho J, Carreira AS, Carvalho A, Coimbra P, Ferreira P & Gil MH. (2013) Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *Eur. Polym. J.* 49: 2005-2021.
8. Chadwick S, Kriegel C, Amiji M. 2010. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62:394-407.
9. Chan J., Fan X., Hunter S.W., Brennan P.J. & Bloom B.R. (1991) Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 59, 1755.
10. Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Góis JR & Gil MH. (2010) Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA J.* 1: 164-209.
11. Coffman RL, Sher A, Seder RA. (2012). Vaccine Adjuvants : Putting Innate Immunity to Work, *33*(4), 492-503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002.Vaccine>
12. Caminero, J. A., Sotgiu, G., Zumla, A., & Migliori, G. B. (2010). Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *10*(9), 621-629. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70139-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70139-0)
13. Constantin M, Fundueanu G, Cortesi R, Esposito E, Nastruzzi C. (2003). Aminated polysaccharide microspheres as DNA delivery systems. *Drug Deliv.*, *10*(3), 139-149. <https://doi.org/10.1080/10717540390215537>
14. Degling, L., & Stjärnkvist, P. (1995). Biodegradable microspheres XVIII: the adjuvant effect of polyacryl starch microparticles with conjugated human serum albumin. *Vaccine*, *13*(7), 629-636. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)00031-H](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)00031-H)

15. Degling L.W., & Sjöholm, I. (2002). Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*, *20*(27–28), 3355–3363. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00288-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00288-8)
16. Derrick, S. C., Kolibab, K., Yang, A., & Morris, S. L. (2014). Intranasal administration of Mycobacterium bovis BCG induces superior protection against aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, *21*(10), 1443–1451. <https://doi.org/10.1128/CVI.00394-14>
17. Gandhi, N. R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H. S., Zignol, M., van Soolingen, D., Bayona, J. (2010). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*, *375*(9728), 1830–1843. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60410-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60410-2)
18. García, M. D. L. A., Borrero, R., Lanio, M. E., Tirado, Y., Alvarez, N., Puig, A., Acosta, A. (2014). Protective effect of a lipid-based preparation from mycobacterium smegmatis in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/273129>
19. Garçon, N., Vaughn, D. W., & Didierlaurent, A. M. (2012). Development and evaluation of ASO3, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Review of Vaccines*, *11*(3), 349–366. <https://doi.org/10.1586/erv.11.192>
20. Global Tuberculosis Report, 2015
21. Goldblatt, D. (2000). Conjugate vaccines. *Clinical and Experimental Immunology*, *119*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01109.x>
22. Guillén, D., Moreno-Mendieta, S., Pérez, R., Espitia, C., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2014). Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydrate Polymers*, *112*, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.089>
23. Gupta, U. D., Katoch, V. M., & McMurray, D. N. (2007). Current status of TB vaccines. *Vaccine*, *25*(19), 3742–3751. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.112>
24. Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(7), 505–517. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1681>

25. Heritage, P. L., Brook, M. A., Underdown, B. J., & McDermott, M. R. (1998). Intranasal immunization with polymer-grafted microparticles activates the nasal-associated lymphoid tissue and draining lymph nodes. *Immunology*, 93(2), 249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00420.x>
26. Heritage, P. L., Loomes, L. M., Jianxiong, J., Brook, M. a, Underdown, B. J., & McDermott, M. R. (1996). Novel polymer-grafted starch microparticles for mucosal delivery of vaccines. *Immunology*, 88(1), 162–168. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-639.x>
27. Heritage, P. L., Underdown, B. J., Brook, M. A., & McDermott, M. R. (1998b). Oral administration of polymer-grafted starch microparticles activates gut-associated lymphocytes and primes mice for a subsequent systemic antigen challenge. *Vaccine*, 16(20), 2010–2017. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00085-1)
28. Hernández-Pando, R., Aguilar, L. D., Smith, I., & Manganeli, R. (2010). Immunogenicity and protection induced by a Mycobacterium tuberculosis sigE mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*, 78(7), 3168–3176. <https://doi.org/10.1128/IAI.00023-10>
29. Hernández-Pando, R., Orozco, E. H., Aguilar, L. D., Lopez Casilla, F., & Rook, G. (2004). INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL Rogelio Hernández Pando, Héctor Orozco E, Diana Aguilar L, Fernando López. *Mensaje Bioquímico*, XXVIII, 129–153.
30. Hernández-Pando, R., Orozco E, H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J., & Madrid-Marina, V. (1997). Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1alfa, tumour necrosis factor-alfa and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 90, 607–617. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00193.x>
31. Hernández-Pando, R., Orozcoe, H., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1456655&tool=pmc&rendertype=abstract>

32. Hogarth, P. J., Jahans, K. J., Hecker, R., Hewinson, R. G., & Chambers, M. A. (2003). Evaluation of adjuvants for protein vaccines against tuberculosis in guinea pigs. *Vaccine*, *21*(9–10), 977–982. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00548-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00548-0)
33. Ilium, L., Farraj, N., Critchley, H., & Davis, S. S. (1988). Nasal administration of gentamicin using a novel microsphere delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, *46*(3), 261–265. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(88\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(88)90087-7)
34. Kaliner M., Shelhamer J.H., Borson B., Nadel J., Patow C., Marom Z. Human respiratory mucus. 1986. *Am. Rev. Respir. Dis*;134:612–621.
35. Källenius G, Correia-Neves M, Buteme H, Hamasur B, Svenson SB. 2016. Lipoarabinomannan, and its related glycolipids, induce divergent and opposing immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* depending on structural diversity and experimental variations. *Tuberculosis*. 96, 120-130.
36. Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. 2004. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol*;6:105e16.
37. Keller-Stanislawski, B., Englund, J. A., Kang, G., Mangtani, P., Neuzil, K., Nohynek, H., Zuber, P. (2014). Safety of immunization during pregnancy: A review of the evidence of selected inactivated and live attenuated vaccines. *Vaccine*, *32*(52), 7057–7064. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.052>
38. Kumari A, Yadav SK & Yadav SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 75: 1-18.
39. Lawson, L. B., Norton, E. B., & Clements, J. D. (2011). Defending the mucosa: Adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Current Opinion in Immunology*, *23*(3), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.009>
40. Lee, S., & Nguyen, M. T. (2015). Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Network*, *15*(2), 51–57. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
41. López B, Aguilar LD, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*133:30–37. [20]

42. Liu W. & Chen, X. (2014). Surface charge of PLA microparticles in regulation of antigen loading, macrophage phagocytosis and activation , and ... *Particuology*, (May). <https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.02.006>
43. Lyadova, I. V., Vordermeier, H. M., Eruslanov, E. B., Khaidukov, S. V., Apt, A. S., & Hewinson, R. G. (2001). Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent *Mycobacterium bovis* and accelerates production of IFN- γ in their lungs. *Clinical and Experimental Immunology*, *126*(2), 274–279. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01667.x>
44. Martín, C. (2005). The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *European Respiratory Journal*, *26*(1), 162–167. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00109904>
45. Marquina-Castillo, B., García-García, L., Ponce-De-León, A., Jimenez-Corona, M. E., Bobadilla-Del Valle, M., Cano-Arellano, B., Hernandez-Pando, R. (2008). Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*, *128*(1), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x>
46. Masina, N., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C., Govender, M., Indermun, S., & Pillay, V. (2016). A review of the chemical modification techniques of starch. *Carbohydrate Polymers*, *157*, Ahead of Print. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.094>
47. Mcdermott, M. R., Heritage, P. L., & Bartzoka, V. (1998). Polymer-grafted starch microparticles for oral and nasal immunization, 256–262.
48. Montgomery P.C, Rafferty D. E. (1998). Induction of secretory and serum antibody responses following oral administration of antigen with bioadhesive degradable starch microparticles. *Oral Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1998.tb00725.x>
49. Moreno-Mendieta S. (2014). Micropartículas de almidón como vehículo para la administración de antígenos vía mucosa. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
50. Moreno-Mendieta *et al.*, (2017). Raw starch microparticles have adjuvant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. Submitted

51. Moreno-Mendieta, Silvia y Rodríguez-Sanoja, Romina. (2016). Uso de Micropartículas de Polímeros como Vehículo de Antígenos. *BioTecnología*. 20:35-54.
52. Moreno-Mendieta, S. A., Guillén, D., Espitia, C., Hernández-Pando, R., Sanchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2014). A novel antigen-carrier system: The Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1–2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.041>
53. Rook, G. A. W, Hernández-Pando R. (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol*. 1996. 50:259-284.
54. Narasimhan, P., Wood, J., Macintyre, C. R., & Mathai, D. (2013). Risk Factors for Tuberculosis. *Pulmonary Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/828939>
55. O'Hagan, D. T., G. S. Ott, E. De Gregorio, and A. Seubert. 2012. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 30: 4341-4348
56. O'Hagan, D. T. (1998). Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34(2–3), 305–320. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00045-3)
57. O'Hagan, D. T., Rafferty, D., Wharton, S., & Illum, L. (1993). Intravaginal immunization in sheep using a bioadhesive microsphere antigen delivery system. *Vaccine*, 11(6), 660–664. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(93\)90313-M](https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90313-M)
58. Organización Mundial de la Salud: WHO Report 2009: Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva: WHO; 2009.
59. Perez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Staerke*, 62(8), 389–420. <https://doi.org/10.1002/star.201000013>
60. Petrovsky Nikolai, and P. D. C. (2012). Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Review of Vaccines*, 10(4), 523–537. <https://doi.org/10.1586/erv.11.30>. Carbohydrate-based

61. Rajapaksa, T. E., & Lo, D. D. (2010). Microencapsulation of Vaccine Antigens and Adjuvants for Mucosal Targeting. *Current Immunology Reviews*, 6(February), 29–37. <https://doi.org/10.2174/157339510790231798>
62. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 30(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
63. Reljic, R., Sibley, L., Huang, J. M., Pepponi, I., Hoppe, A., Hong, H. A., & Cutting, S. M. (2013). Mucosal vaccination against tuberculosis using inert bioparticles. *Infection and Immunity*, 81(11), 4071–4080. <https://doi.org/10.1128/IAI.00786-13>
64. Reynolds, J. A., Harrington, D. G., Crabbs, C. L., Peters, C. J., & Di Luzio, N. R. (1980). Adjuvant activity of a novel metabolizable lipid emulsion with inactivated viral vaccines. *Infection and Immunity*, 28(3), 937–943.
65. Rhee, J. H., Lee, S. E., & Kim, S. Y. (2012). Mucosal vaccine adjuvants update. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 1(1), 50–63. <https://doi.org/10.7774/cevr.2012.1.1.50>
66. Riese, P., K. Schulze, T. Ebensen, B. Prochnow, and C. A. Guzman. (2013). Vaccine adjuvants: key tools for innovative vaccine design. *Curr. Top. Med. Chem.* 13: 2562-2580.
67. Rydell, N., Stertman, L., & Sjöholm, I. (2005). Starch microparticles as vaccine adjuvant. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2(5), 807–28. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.5.807>
68. Sharma, SK., Mohan A., Sharma A., Mitra DK. (2005). Miliary tuberculosis: New insights into an old disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 5(7), 415-430.
69. Sibley L, Reljic R, Radford DS, Huang JM, Hong HA, Cranenburgh RM, Cutting SM. 2014. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing MPT64 evaluated as a vaccine against tuberculosis in the murine model. *FEMS Microbiol Lett* 358. p 170–179.
70. Simon JK., Edelman E. (2006). Clinical evaluation of adjuvants. Immunopotentiators in Modern Vaccines. 1st ed. USA: Elsevier Acad Press; p. 319–42.

71. Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, Nguyen TV, Park SM, Shim BS, Song HH, Cheon IS, Jang JE, Choi JA, Choi YK, Stadler K, Cutting SM. 2012. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine* 30:3266–3277.
72. Stylianou E, Diogo GR, Pepponi I, van Dolleweerd C, Arias MA, Lochter C, Rider CC, Sibley L, Cutting SM, Loxley A, Ma JKC, Reljic R. 2014. Mucosal delivery of antigen-coated nanoparticles to lungs confers protective immunity against tuberculosis infection mice. *Eur. J. Immunol.* 44:440-449.
73. Suri S, Ruan G, Winter J & Schmidt CE (2013) Chapter I.2.19. Microparticles and Nanoparticles. In: Biomaterials Science (Third Edition). *Academic Press, Elsevier*. pp. 360-388.
74. Tree, J. A., Williams, A., Clark, S., Hall, G., Marsh, P. D., & Ivanyi, J. (2004). Intranasal bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine dosage needs balancing between protection and lung pathology. *Clinical and Experimental Immunology*, 138(3), 405–409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02648.x>
75. Tuyama, M., Corrêa-Antônio, J., Schlackman, J., Marsh, J. W., Rebelo, M. C., Cerqueira, E. O., Barroso, D. E. (2017). Invasive *Haemophilus influenzae* disease in the vaccine era in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(3), 196–202. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160391>
76. Uranga, S., Marinova, D., Martin, C., & Aguilo, N. (2016). Protective Efficacy and Pulmonary Immune Response Following Subcutaneous and Intranasal BCG Administration in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (115), 1–8. <https://doi.org/10.3791/54440>
77. Wikingsson, L. D., & Sjöholm, I. (2002). Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*, 20(27–28), 3355–3363. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00288-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00288-8)
78. Young, D., & Dye, C. (2006). The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell*, 124(4), 683–687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.013>

ANEXO I: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A. SUPERVIVENCIA.

Comparación de Curvas de Supervivencia	
Prueba de Rango Logarítmico (Log Rank)	
Chi cuadrado	190.1
df	4
Valor de P	P<0.0001
Resumen valor P	***
Difieren las curvas significativamente?	Si
Prueba de Rango Logarítmico para la tendencia	
Chi cuadrado	11.15
df	1
Valor de P	0.0008
Resumen valor P	***
Tendencia significativa?	Si

COMPARACIÓN DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA					
	Vacunados vía s.c.	Vacunados vía i.n.	Vía s.c. vs vía i.n.	Sin vacunar vs vía s.c.	Sin vacunar vs vía i.n.
Chi cuadrado	0.03228	0.00001869	82.71	97.25	14.45
df	1	1	1	1	1
Valor de P	0.8574	0.9966	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Resumen valor P	ns	ns	***	***	***
Difieren las curvas significativamente?	No	No	Si	Si	Si
Mediana supervivencia	126.0 BCG s.c.	57.00 BCG i.n.	126.0	41.00	41.00
	130.0 BCG+MPAs s.c.	62.00 BCG+MPAs i.n.	57.00	130.0	62.00
Radio	0.9692	0.9194	2.211	0.3154	0.6613
Radio del IC 95%	0.5200 a 1.418	0.4701 a 1.369	1.761 2.660	a -0.1339 a 0.7646	a 0.2120 a1.1 11

B. UFC.

Administración de BCG y BCG + MPAs vía subcutánea

Prueba de Bartlett para varianzas iguales	
Parámetro	Valor
Estadístico de Bartlett	29.48
Valor de P	P<0.0001
Resumen valor P	***
Difieren las varianzas significativamente? (P<0.05)	Si

ANÁLISIS DE VARIANZA UFC EN PULMÓN DIA14 POST-INFECCIÓN				
	SS	df	MS	
Tratamiento (entre columnas)	0.1107	2	0.05537	
Residual (en columnas)	0.1306	12	0.01088	
Total	0.2414	14		
Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
Sin BCG vs. BCG s.c.	0.1742	3.734	P> 0.05	-0.001831 a 0.3502
Sin BCG vs. BCG + MPAs s.c.	0.1894	4.060	P>0.05	0.01337 a 0.3654
BCG vs. BCG + MPAs s.c.	0.0152	0.3258	P>0.05	-0.1608 a 0.1912

ANÁLISIS DE VARIANZA UFC EN PULMÓN DIA28 POST-INFECCIÓN				
	SS	df	MS	
Tratamiento (entre columnas)	36.67	2	18.34	
Residual (en columnas)	1.314	10	0.1314	
Total	37.98	12		
Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
Sin BCG vs. BCG s.c.	3.512	20.43	P< 0.001	2.845 a 4.178
Sin BCG vs. BCG + MPAs s.c.	3.390	19.72	P< 0.001	2.723 a 4.057
BCG vs. BCG + MPAs s.c.	-0.1218	0.6718	P< 0.05	-0.8244 a 0.5809

Administración de BCG y BCG + MPAs vía intranasal

Prueba de Bartlett para varianzas iguales	
Parámetro	Valor
Estadístico de Bartlett	9.392
Valor de P	0.0091
Resumen valor P	**
Difieren las varianzas significativamente? (P<0.05)	Si

ANÁLISIS DE VARIANZA UFC EN PULMÓN DIA14 POST-INFECCIÓN			
	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	0.1229	2	0.06145
Residual (en columnas)	0.3106	12	0.02588
Total	0.4335	14	

Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
Sin BCG vs. BCG i.n.	0.1556	2.163	P> 0.05	-0.1159 a 0.4271
Sin BCG vs. BCG + MPAs i.n.	-0.05900	0.8200	P>0.05	-0.3305 a 0.2125
BCG vs. BCG + MPAs i.n.	-0.2146	2.983	P>0.05	-0.4861 a 0.05687

ANÁLISIS DE VARIANZA UFC EN PULMÓN DIA28 POST-INFECCIÓN			
	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	34.21	2	17.11
Residual (en columnas)	93.69	11	8.518
Total	127.9	13	

Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
Sin BCG vs. BCG i.n.	-2.860	2.191	P< 0.05	-7.846 a 2.126
Sin BCG vs. BCG + MPAs i.n.	-3.625	2.619	P< 0.05	-8.913 a 1.663
BCG vs. BCG + MPAs i.n.	-0.7650	0.5526	P< 0.05	-6.053 a 4.523

Administración de BCG y BCG + MPAs vías subcutánea e intranasal Día 60

Prueba de Bartlett para varianzas iguales	
Parámetro	Valor
Estadístico de Bartlett	34.15
Valor de P	P<0.0001
Resumen valor P	***
Difieren las varianzas significativamente? (P<0.05) Si	

ANÁLISIS DE VARIANZA UFC EN PULMÓN DIA60 POST-INFECCIÓN				
	SS	df	MS	
Tratamiento (entre columnas)	26.22	3	8.740	
Residual (en columnas)	25.89	19	1.363	
Total	52.11	22		
Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
BCG s.c vs BCG+MPAs s.c.	0.08083	0.1696	P > 0.05	-1.814 a 1.976
BCG s.c vs BCG i.n.	-0.5417	1.137	P > 0.05	-2.437 a 1.354
BCG s.c vs BCG+MPAs i.n.	-2.673	5.349	P < 0.01	-4.661 a -0.6856
BCG+MPAs s.c vs BCG i.n.	-0.6225	1.306	P > 0.05	-2.518 a 1.273
BCG+MPAs s.c vs BCG+MPAs i.n.	-2.754	5.510	P < 0.01	-4.742 a -0.7664
BCG i.n vs BCG+MPAs i.n.	-2.132	4.265	P < 0.05	-4.119 a -0.1439

C. Neumonía.

Administración de BCG y BCG + MPAs vía subcutánea e intranasal

ANÁLISIS DE VARIANZA NEUMONÍA EN PULMÓN DIA14 POST-INFECCIÓN			
Valor P	0.9752		
Resumen Valor P	ns		
Difieren los promedios significativamente? (P<0.05)	No		
Número de Grupos	5		
F	0.1127		
R cuadrada	0.04312		
	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	2.736	4	0.6841
Residual (en columnas)	60.72	10	6.072
Total	63.45	14	

Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
Sin vacuna vs BCG s.c.	-0.4500	0.3163	P>0.05	-7.071 a 6.171
Sin vacuna vs BCG + MPAs s.c.	-0.6800	0.4780	P>0.05	-7.301 a 5.941
Sin vacuna vs BCG i.n.	-1.250	0.8787	P>0.05	-7.871 a 5.371
Sin vacuna vs BCG + MPAs i.n.	-0.9500	0.6678	P>0.05	-7.571 a 5.671
BCG s.c. vs BCG + MPAs s.c.	-0.2300	0.1617	P>0.05	-6.851 a 6.391
BCG s.c. vs BCG i.n.	-0.8000	0.5623	P>0.05	-7.421 a 5.821
BCG s.c. vs BCG + MPAs i.n.	-0.5000	0.3515	P>0.05	-7.121 a 6.121
BCG + MPAs s.c. vs BCG i.n.	-0.5700	0.4007	P>0.05	-7.191 a 6.051
BCG + MPAs s.c. vs BCG + MPAs i.n.	-0.2700	0.1898	P>0.05	-6.891 a 6.351
BCG i.n. vs BCG + MPAs i.n.	0.3000	0.2109	P>0.05	-6.321 a 6.921

ANÁLISIS DE VARIANZA NEUMONÍA EN PULMÓN DIA28 POST-INFECCIÓN

Valor P	0.0002
Resumen Valor P	***
Difieren los promedios significativamente? (P<0.05)	Sí
Número de grupos	5
F	16.85
R cuadrada	0.8708

	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	4081	4	1020
Residual (en columnas)	605.4	10	60.54
Total	4687	14	

Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% para la diferencia
Sin vacuna vs BCG s.c.	13.46	2.996	P>0.05	-7.447 a 34.37
Sin vacuna vs BCG + MPAs s.c.	11.30	2.515	P>0.05	-9.607 a 32.21
Sin vacuna vs BCG i.n.	-18.98	4.225	P>0.05	-39.89 a 1.927
Sin vacuna vs BCG + MPAs i.n.	-28.13	6.262	P<0.01	-49.04 a -7.223
BCG s.c. vs BCG + MPAs s.c.	-2.160	0.4808	P>0.05	-23.07 a 18.75
BCG s.c. vs BCG i.n.	-32.44	7.221	P<0.01	-53.35 a -11.53
BCG s.c. vs BCG + MPAs i.n.	-41.59	9.258	P<0.001	-62.50 a -20.68
BCG + MPAs s.c. vs BCG i.n.	-30.28	6.741	P<0.01	-51.19 a -9.373
BCG + MPAs s.c. vs BCG + MPAs i.n.	-39.43	8.778	P<0.001	-60.34 a -18.52
BCG i.n. vs BCG + MPAs i.n.	-9.150	2.037	P>0.05	-30.06 a 11.76

ANÁLISIS DE VARIANZA NEUMONÍA EN PULMÓN DIA6o POST-INFECCIÓN

Valor P	0.0545
Resumen Valor P	ns
Difieren los promedios significativamente? (P<0.05)	No
Número de grupos	4
F	3.913
R cuadrada	0.5947

	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	3950	3	1317
Residual (en columnas)	2692	8	336.5
Total	6642	11	

Prueba de comparación múltiple de Tukey	Promedio de la diferencia	q	Valor P	IC 95% de la diferencia
BCG s.c. vs BCG + MPAs s.c.	6.690	0.6317	P>0.05	-41.28 a 54.66
BCG s.c. vs BCG i.n.	-35.91	3.391	P>0.05	-83.88 a 12.06
BCG s.c. vs BCG + MPAs i.n.	-28.61	2.701	P>0.05	-76.58 a 19.36
BCG + MPAs s.c. vs BCG i.n.	-42.60	4.022	P>0.05	-90.57 a 5.365
BCG + MPAs s.c. vs BCG + MPAs i.n.	-35.30	3.333	P>0.05	-83.27 a 12.67
BCG i.n. vs BCG + MPAs i.n.	7.300	0.6893	P>0.05	-40.67 a 55.27