



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE INTERLEUCINA-17 EN LA RESPUESTA INMUNE
CONTRA LA INFECCIÓN AGUDA POR CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* CON DIFERENTE
PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARÍA GUADALUPE GARCÍA PATIÑO

DIRECTORA DE TESIS
DRA. PAULA LICONA LIMÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y DEL DESARROLLO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNAM

MÉXICO, D. F. ENERO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM).

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado al proyecto número 255287 y por la beca otorgada a la alumna con número de becario 288933.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM por el apoyo a los proyectos con claves IA202116-PAPIIT, IA201116-PAPIIT e IN209919-PAPIIT y por la beca para Obtención de Grado otorgada a la alumna como parte del apoyo al proyecto con clave IN209919-PAPIIT.

A la Fundación Miguel Alemán A. C. por el apoyo otorgado al presente proyecto.

A la Dra. Paula Licon Limón.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto De Fisiología Celular, UNAM.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Rodolfo García Contreras

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Enrique Ortega Soto

Departamento De Inmunología, Instituto De Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A los miembros del jurado:

Dra. Agnès Fleury

Dra. Laura Bonifaz Alfonso

Dr. José Carlos Crispín Acuña

Dr. Ricardo Valle Ríos

A la Dra. Ma. Cleofas Marcial Medina, por su contribución en el desarrollo de algunos experimentos de carga bacteriana.

A la Unidad Universitaria de Bioterio (UUB) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y a su personal, especialmente a la M.V.Z. Claudia Verónica Rivera Cerecedo, al M.V.Z. Héctor Alfonso Malagón Rivero y a la M. en I.B.B. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez.

Al Biól. José Luis Ramos Balderas por el apoyo técnico.

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto De Fisiología Celular, UNAM.

Al Dr. Rafael Franco Cendejas

Laboratorio de Infectología, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

Al Dr. José Carlos Crispín Acuña

A la Dra. Florencia Rosetti Scuiutto

Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
“Salvador Zubirán”

Al Dr. Samuel Huber

Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf.

A la Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso

A la Q. F. B. Brenda Hernández Rico

A la M. en C. Silvia Araceli Tepale Segura

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Al Dr. Vadim Pérez Koldenkova

Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA-IMSS). Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Al Dr. Ruaidhrí Jackson

Department of Immunology. Blavatnik Institute, Harvard Medical School.

Al Dr. Julián Valdés

Departamento Biología Celular y del Desarrollo. Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la M. en C. Jessica Lakshmi Prieto Chávez

Centro de Instrumentos – Citometría de Flujo. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit)

A la histotecnóloga Lic. Sandra Daniela Rodríguez Montaña

Unidad de Histología. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y a todo su personal, especialmente a la Dra. Yazmin Ramiro Cortés.

Al Dr. Alejandro Sánchez Flores

Instituto de Biotecnología, UNAM

Al Dr. Augusto César Poot Hernández

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. María del Rosario Morales Espinosa

Dr. Luis Fernando Espinosa Camacho

Laboratorio de Genómica Bacteriana. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM.

A la M. en C. Tzipe Govezensky

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Espero no olvidar a nadie.

A la Dra. Paula Licona. Por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio y por todo el apoyo que siempre me ha proporcionado. Por ser una gran mentora en esta etapa de adquisición de conocimientos.

A los miembros del comité tutor: el Dr. Rodolfo y el Dr. Ortega, por apoyo y guía durante la realización de este trabajo.

A todos los ratones empleados en los protocolos experimentales durante el curso de mis estudios de doctorado.

Al apoyo más grande, constante, duradero, sincero y desinteresado que he tenido en la vida: mi mamá, Ma. Matilde Patiño Hernández. No tengo manera de agradecerte tu amor, tu esfuerzo, tus sacrificios, tu disciplina, tu fortaleza, tu dedicación, tu empatía, tu alegría, y todo, absolutamente todo lo que haces por mí y por toda nuestra familia. Te amo con todo mi ser, mo.

A mis chamuquitos, Isa ✨ y Raúl 🐱🐱. Por contribuir enormemente a mi motivación y por ser tan valientes ante las situaciones adversas. Los adoro con todo mi ser.

A mi otro gran apoyo constante y desinteresado motivado por el amor, a mi pochito Gutschav. Gracias por todo, gracias por tanto. Te amo con todo mi ser y mis acciones.

A la familia que conocí o reencontré en el 125 norte, al Diegxo, a mi compa el Enriqxo, a mi compa el Euge, a la Fercha, a mi comadrita Ivonne, a Joseph Lewis y a la Ofita. Gracias por su apoyo académico y personal, por los maravillosos momentos dentro y fuera del lab. Gracias por ser excelentes amigos y por ser unos colegas tan admirables y dedicados. Los quiero mucho y les tengo una profunda admiración.

A los miembros de mi familia que indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo: mi abuelita, mi tío Roberto, mi tía Emilia, mi tío Rogelio (QEPD), a García y a todos de quienes he recibido apoyo en cualquier momento.

A Rosa. Gracias por ser una gran compañía en las mañanas de experimentos largos. Mi cariño, agradecimiento y admiración.

A los miembros pasados y presentes del laboratorio: a Ara, a Raffie, a Emma, a la Dianechi peleonera, a Danny-boy, a Cleo, a Blanca, a Andrés, a Christopher y con especial admiración a Ari-Gaby. Gracias por los granitos de arena que aportaron a este proyecto para enriquecerlo.

A los alumnos de los alumnos del 125 norte, a Estrella, a Ely, a Ale, y muy especialmente a Víctor “maxi-mini-Diegxo” y a Dafne Mireles, por dejarme ver que los alumnos tienen mucho que enseñar y darme la alegría de compartir mis conocimientos.

A los labs vecinos y a sus miembros, que compartieron algún equipo o reactivo con nosotros especialmente a Nalle, con quien también compartí grandes momentos fuera del lab.

A todos mis amigos de los que siempre he recibido tiempo para escucharme, el mejor de los consejos que pueden darme y muchas muestras de cariño: a Ely, a Daf, a Sil, a Alex, a Clem, a Gi y a Mike, a Ileana.

A todas las personas que me proporcionaron apoyo académico y técnico con la mayor disposición en todo momento y que se encuentran enlistadas en la sección de Agradecimientos Académicos. De verdad me siento muy agradecida con todos y cada uno de ustedes.

A todos los profesores que me han legado tanto conocimiento, especialmente a aquellos con los que tuve oportunidad de tomar clase durante mis estudios de posgrado: la Dra. Lety Moreno y la M. en C. Damaris Ilhuicatzí-Alvarado, al Dr. Israel Castillo, al Dr. José Ángel Gutiérrez, a la Dra. María del Rosario Morales, al Dr. Fernando Espinoza, al Dr. Jorge Contreras y al Dr. Gonzalo Castillo.

Al Dr. Ruaidhrí Jackson, por la oportunidad brindada para ser parte de su laboratorio y por aportar tanto a mi aprendizaje en tan poco tiempo.

A todos los miembros del laboratorio del Dr. Ruaidhrí Jackson: Ro, Keren, Trish, Ademi, Quentin, Lillian, Harry, Olivia, Amy, Owen y Camren.

A veces, agradecer también es una forma de disculparse.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABREVIATURAS.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	7
3.1. INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN SANITARIA CAUSADAS POR MICROORGANISMOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.....	7
3.2. <i>Acineobacter baumannii</i>	8
3.3. INFECCIONES EN PIEL Y TEJIDO BLANDO POR <i>A. baumannii</i>	8
3.4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN <i>A. baumannii</i>	10
3.5. PLASTICIDAD GENÓMICA Y DIVERSIDAD EN <i>A. baumannii</i>	13
3.6. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS ACTIVADOS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR <i>A. baumannii</i>	14
3.7. INTERLEUCINA 17 (IL-17)	16
3.8. FUENTES CELULARES DE IL-17.....	17
3.9. PRODUCCIÓN DE IL-17 EN PIEL.....	20
3.10. CÉLULAS BLANCO Y EFECTOS DE IL-17.....	21
3.11. IL-17 EN LA INFECCIÓN POR <i>A. baumannii</i>	24
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1. ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR <i>A. baumannii</i> EN UN MODELO DE INFECCIÓN SUBCUTÁNEA.....	27

6.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE <i>Il17a</i> EN PIEL INFECTADA POR <i>A. baumannii</i> MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR).....	28
6.3. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IL-17, IL-17F E IL-17A/IL-17F EN PIEL INFECTADA POR <i>A. baumannii</i>	29
6.4. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO A DIFERENTES TIEMPOS POST-INFECCIÓN.....	30
6.5. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES INMUNOLÓGICAS PRESENTES EN PIEL DE RATONES INFECTADOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	30
6.6. INMUNOFLUOROTINCIONES DE PIEL DE RATÓN.....	32
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
6.8. RESUMEN GRÁFICO.....	33
7. RESULTADOS	34
7.1. LA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DE IL-17 SE INDUCEN EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR <i>A. baumannii</i> A578.....	34
7.2. IL-17 NO ES ESENCIAL PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR <i>A. baumannii</i>	38
7.3. <u>DURANTE LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA CAUSADA POR LA CEPA A578 DE <i>A. baumannii</i> SE GENERA UNA LESIÓN DE MENOR TAMAÑO EN AUSENCIA DE IL-17</u>	40
7.4 LA AUSENCIA DE IL-17 RETARDA LA RESOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR LA CEPA A578 DE <i>A. baumannii</i>	44
7.5. NEUTRÓFILOS, LINFOCITOS T CD8 ⁺ Y CÉLULAS TCR $\gamma\delta$ PRODUCEN IL-17 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR <i>A. baumannii</i> ATCC 17978, MIENTRAS QUE LINFOCITOS TCR $\alpha\beta$ ⁺ CONTRIBUYEN A LA PRODUCCIÓN DE IL-17 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR <i>A. baumannii</i> A578.....	48
7.6. LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR <i>A. baumannii</i> INDUCE EL RECLUTAMIENTO DE NEUTRÓFILOS AL SITIO DE INFECCIÓN.....	60
8. DISCUSIÓN	68

9. CONCLUSIONES PRELIMINARES.....	94
10. PERSPECTIVAS.....	96
11. RESUMEN GRÁFICO.....	97
12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	98
13. REFERENCIAS.....	123

1. RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un patógeno asociado a la atención sanitaria considerado una grave amenaza para la salud humana debido a la resistencia a antibióticos que se presenta en un elevado porcentaje de los aislados clínicos. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha perfilado a *A. baumannii* como un patógeno para el que es prioridad crítica desarrollar nuevos tratamientos menos susceptibles a la resistencia a antibióticos. Entre las manifestaciones clínicas que causa este patógeno se encuentran la neumonía, la bacteremia y las infecciones de la piel.

La resolución de una infección no solo depende del efecto del antibiótico sobre el patógeno, sino también de los mecanismos de defensa montados por el hospedero para combatir al patógeno. No obstante, los mecanismos de defensa que se presentan como consecuencia de las infecciones en piel por *A. baumannii* no han sido estudiados.

La interleucina 17 (IL-17) es una citocina de la que se ha reconocido su importancia en el mantenimiento y defensa de las barreras corporales contra patógenos extracelulares a través de la modulación positiva del reclutamiento de neutrófilos y la producción de péptidos antimicrobianos. Estos mecanismos de defensa han sido identificados en respuesta a la infección por *A. baumannii* en modelos de infección como neumonía.

Mediante el desarrollo de un modelo murino de infección subcutánea por dos cepas distintas de *A. baumannii*, ATCC 17978 y A578, entre cuyas características fenotípicas destaca la diferente susceptibilidad a antibióticos, evaluamos la participación y contribución de IL-17 al control y resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii*.

Pese a que no observamos inducción significativa de la transcripción y la traducción de IL-17 en respuesta a la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978, identificamos la inducción significativa de ambos procesos en respuesta a la infección subcutánea por *A. baumannii* A578. Aunque es necesario realizar experimentos adicionales, nuestros resultados preliminares sugieren que durante las primeras 12 horas postinfección, diferentes poblaciones celulares contribuyen a la producción de IL-17 en el sitio de infección. Entre las poblaciones celulares productoras de IL-17 luego de la infección por *A. baumannii* hemos identificado neutrófilos, linfocitos TCR $\alpha\beta^+$ y células TCR $\gamma\delta$. Nuestros resultados también sugieren que los porcentajes y números de las diferentes poblaciones celulares que contribuyen a la producción de IL-17 tras la infección por *A. baumannii*, difieren entre los grupos de ratones infectados con cada una de las dos diferentes cepas bacterianas y entre los diferentes tiempos de infección evaluados. Sin embargo, corroboramos que la presencia de IL-17 no es esencial para el control de la infección subcutánea por *A. baumannii*, ya que, ratones deficientes de IL-17 sobreviven a la infección.

Adicionalmente corroboramos que la patología inducida por la cepa A578 es más severa en comparación con la observada durante la infección por ATCC 17978.

Nuestros hallazgos sugieren que la interacción de patógeno hospedero presenta diferencias entre cepas distintas de patógenos, pese a pertenecer a una misma especie.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a health care-associated pathogen considered a serious threat to human health due to the high antibiotic resistance rates found in a high percentage of clinical isolates. Because of this, the World Health Organization (WHO) has identified *A. baumannii* as a pathogen for which developing new treatments, less susceptible to antibiotic resistance, is a critical priority. Among the clinical manifestations caused by this pathogen are pneumonia, bacteremia, and skin infections.

The resolution of an infection depends not only on the effect of the antibiotic on the pathogen, but also on the defense mechanisms by the host to combat such pathogen. Nevertheless, the immunological mechanisms against skin infections caused by *A. baumannii* have not been studied.

Interleukin 17 (IL-17) is a cytokine that has been recognized for its important role in the maintenance and defense of corporal barriers against extracellular pathogens through the upregulation of neutrophil recruitment and the production of antimicrobial peptides. These defense mechanisms have been identified in response to *A. baumannii* infection in models such as pneumonia.

Through the development of a murine model of subcutaneous infection using two different strains of *A. baumannii*, ATCC 17978 and A578, whose phenotypic characteristics include differential susceptibility to antibiotics, we evaluated the involvement and contribution of IL-17 to the control and resolution of the subcutaneous infection by *A. baumannii*.

Despite of the fact that we did not observe significant induction of the transcription nor the translation of IL-17 in response to the subcutaneous infection by *A. baumannii* ATCC 17978, we identified significant induction of both processes, transcription and translation of IL-17, in response to the subcutaneous infection by *A. baumannii* A578. Although additional experiments are required, our preliminary results suggest that within the first 12 hours postinfection diverse cell populations, such as neutrophils, TCR $\alpha\beta$ ⁺ lymphocytes, and TCR $\gamma\delta$ cells contribute to the production of IL-17 at the site of infection. Our results also suggest that the percentages as well as the numbers of different cell populations which contribute to the production of IL-17 after the infection by *A. baumannii*, vary between the groups of mice infected either with ATCC 17978 or with A578, as well as between the different evaluated postinfection-timepoints. Nevertheless, we confirmed that IL-17 is not essential for the control of the subcutaneous infection caused by *A. baumannii*, since IL-17-deficient mice survive the infection.

Additionally, we confirmed that the pathology induced by the A578 strain is more severe compared to that observed during infection by the ATCC 17978 strain.

Our findings suggest that the host-pathogen interaction presents some significant differences between infections caused by different strains of pathogens, despite belonging to the same species.

2. ABREVIATURAS

Abreviatura	Español	Inglés
3' UTR	región 3' no traducida	3' <i>untranslated region</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ACB	complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i> complex
AIRE	regulador autoinmune	<i>autoimmune regulator</i>
ANOVA	prueba de análisis de varianza	analysis of variance
ARE-BP	proteínas de unión a elementos ricos en adenilato-uridilato	<i>adenylate-uridylyte-rich element-binding proteins</i>
ARN	ácido ribonucleico	ribonucleic acid
ARNm	ácido ribonucleico mensajero	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo	American Type Tissue Collection
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. canis</i>	<i>Brucella canis</i>	<i>Brucella canis</i>
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>
C/EBP	proteína de unión a la secuencia potenciadora CCAAT	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
cADN	ácido desoxirribonucleico complementario	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CCL	ligado de quimiocina con motivo C-C	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	cúmulo de diferenciación	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm ²	centímetros cuadrados	<i>square centimeters</i>
CTLA-8	antígeno 8 de linfocitos T citotóxicos	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8</i>
CXCL	ligando de quimiocina con motivo C-X-C	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DETCs	células T dendríticas epiteliales	<i>dendritic epithelial T cells</i>
DLNs	ganglios linfáticos drenantes	<i>draining lymph nodes</i>
dNTPs	2'-deoxinucleótidos trifosfato	2'-deoxynucleotide triphosphates
DTT	ditiotreitól	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eGFP	proteína verde fluorescente mejorada	enhanced green fluorescent protein

EGFR	receptor del factor de crecimiento epidermal	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima	<i>enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>
ENA-78	péptido epitelial activador de neutrófilos (78 aminoácidos)	<i>epithelial neutrophil-activating peptide (78 amino acids)</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter spp</i>	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter spp</i>
EUCAST	comité europeo de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FcεRIα	cadena alfa del receptor de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas E	<i>alpha chain of the receptor for the Fc region of immunoglobulin E</i>
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América	Food and Drug Administration
Fig.	figura	<i>figure</i>
g	gramo	<i>gram</i>
g	fuerza g	<i>g-force</i>
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
i.p.	intraperitoneal	<i>intraperitoneal</i>
IFN-γ	interferón gamma	<i>interferon gamma</i>
IGF-1	factor de crecimiento 1 similar a la insulina	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	interleucina	interleukin
IL-17A/F KO	ratones B6.Cg- <i>Il17a/Il17f^{tm1.1Impr} Thy1a/J</i> deficientes de IL-17A e IL-17F	<i>B6.Cg-Il17a/Il17f^{tm1.1Impr} Thy1a/J mice</i>
ILC	células linfoides innatas	<i>innate lymphoid cells</i>
IMF	intensidad media de fluorescencia	<i>mean fluorescence intensity</i>
iNKTs	células asesinas naturales T invariantes	<i>invariant natural killer T cells</i>
IRES	sitio interno de entrada al ribosoma	<i>internal ribosome entry site</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KC	quimiocina derivada de queratinocitos	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>
kDa	kilodáltones	<i>kilodaltons</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	medio de lisogenia	<i>lysogeny broth</i>
Lin	linaje	<i>lineage</i>

LPS	lipopolisacárido	lipopolysaccharide
LTi-like	células tipo células inductoras de tejido linfoide	<i>lymphoid tissue inducer cells</i>
LTis	células inductoras de tejido linfoide	<i>lymphoid tissue inducer cells-like</i>
Ly6G	locus G del complejo 6 del antígeno linfocitario	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAIT	linfocitos T invariantes asociados a la mucosa	<i>mucosal-associated invariant T cells</i>
MAPK	proteínas cinasa activadas por mitógeno	<i>mytogen-activated protein kinases</i>
MATE	expulsión multifármacos y compuestos tóxicos	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MCP	proteína quimioatrayente de monocitos	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MDR	multidrogorresistente	<i>multidrugresistant</i>
MFS	facilitadores principales	<i>major facilitator superfamily</i>
mg	miligramo	<i>milligram</i>
MIP	proteína inflamatoria de macrófagos	<i>macrophage inflammatory protein</i>
mL	mililitro	<i>milliliter</i>
mM	milimolar	<i>millimolar</i>
MMP	metaloproteasa de matriz extracelular	<i>matrix metalloprotease</i>
moDCs	células dendríticas derivadas de monocitos	<i>monocyte-derived dendritic cells</i>
Mφs	macrófagos	<i>macrophages</i>
N.D.	no detectado	<i>non-detected</i>
NDLNs	ganglios linfáticos no drenantes	<i>non-draining lymph nodes</i>
NKs	células asesinas naturales	<i>natural killer cells</i>
nTh17	células T cooperadoras 17 naturales	<i>natural T helper cells</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud	<i>World Health Organization</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBP	proteínas de unión a penicilina	<i>penicillin binding protein</i>
PBS	solución salina amortiguada con fosfatos	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDR	pandrogorresistente	<i>pandrug-resistant</i>
pg	picogramo	<i>picogram</i>
pH	potencial de hidrógeno	<i>hydrogen potential</i>
poli I:C	ácido poliinosínico-policitidílico	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
RNAseq	secuenciación de ácido ribonucleico	<i>ribonucleic acid-sequencing</i>
RND	resistencia-nodulación-división	<i>resistance-nodulation-division</i>
RORγt	la isoforma específica de timo del receptor gamma huérfano relacionado con el receptor del ácido retinóico	<i>thymus-specific isoform of the retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma</i>

RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute	Roswell Park Memorial Institute <i>medium</i>
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SFB	suero fetal bovino	<i>fetal bovine serum</i>
SMR	resistencia pequeña a multifármacos	<i>small multidrug resistance</i>
sp.	especie	<i>species</i>
spp.	especies	<i>several species</i>
Supl.	suplementaria	<i>supplementary</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Tripanosoma cruzi</i>	<i>Tripanosoma cruzi</i>
TCR	receptor de linfocitos T	<i>T-cell receptor</i>
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	linfocito T cooperador	<i>T helper cell</i>
TLR	receptor tipo <i>toll</i>	<i>toll like receptor</i>
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF	factor asociado al receptor de TNF	<i>TNF receptor associated factor</i>
UFCs	unidades formadoras de colonias	<i>forming coloy units</i>
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	silvestre	<i>wild type</i>
XDR	extensivamente/extremadamente drogorresistente	<i>extensively drug-resistant</i>
α -GalCer	alfa-galactosilceramida	<i>alpha-Galactosylceramide</i>
μ g	microgramo	<i>microgram</i>
μ L	mililitros	<i>microliter</i>
μ m	micrómetro	<i>micrometer</i>
μ M	micromolar	<i>micromolar</i>

3. INTRODUCCIÓN

3.1. INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN SANITARIA CAUSADAS POR MICROORGANISMOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), las infecciones asociadas a la atención sanitaria, también llamadas infecciones adquiridas en el entorno sanitario, infecciones nosocomiales o infecciones hospitalarias; son aquéllas que se presentan en un paciente durante la atención médica e incluyen las infecciones que ocurren tras el alta hospitalaria, que no estaban presentes ni en periodo de incubación al tiempo de la admisión e infecciones ocupacionales que afectan al personal que proporciona servicios de atención a salud. Las infecciones asociadas a la atención sanitaria son el efecto adverso más común en la atención sanitaria y se presentan con mayor frecuencia en países de ingresos económicos bajos y medios, en comparación con los países de ingresos altos [1].

Debido a las complicaciones para recolectar datos relacionados con las infecciones asociadas a la atención sanitaria, en parte por la falta de criterios uniformes para el diagnóstico de las mismas, no es posible conocer su prevalencia ni su impacto [2, 3], aunque la OMS reporta una prevalencia de 7 % en países desarrollados y de hasta 10 % en países en vías de desarrollo [4].

Entre las consecuencias negativas de las infecciones asociadas a la atención sanitaria, se encuentran la prolongación en la atención médica hacia el paciente, deterioro en la salud del mismo, alteraciones socioeconómicas, contribución en el aumento de la resistencia a antimicrobianos e incremento en la tasa de mortalidad [4].

Una condición prevalente en los establecimientos de atención a la salud es el empleo de antibióticos [5]. La presión de selección que genera la presencia de éstos en el entorno sanitario y, en menor medida, el contacto entre pacientes y personal que brinda los servicios, favorecen la presencia y diseminación de resistencia entre microorganismos, algunos de los cuales suelen ser causantes de infecciones asociadas a la atención sanitaria [5-8].

Durante 2015 y 2017, el sistema más grande de seguimiento de infecciones asociadas a la atención sanitaria de los Estados Unidos de América, denominado Red Nacional de Seguridad Sanitaria (*National Healthcare Safety Network*) de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC; *Centers for Disease Control and Prevention*) reportó resistencia a múltiples antibióticos en las especies de patógenos que con mayor frecuencia se identificaron como agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención sanitaria, en porcentajes que van desde 1.9 % hasta 43.1 % [9].

Los microorganismos resistentes a antibióticos identificados con mayor frecuencia como causantes de infecciones asociadas a la atención sanitaria han sido incluidos en un grupo denominado ESKAPE, designado de esta manera por el acrónimo de las especies bacterianas que se incluyen en él (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp*) y porque, debido a los múltiples mecanismos de resistencia que presentan, dichas bacterias escapan a la acción de diversos antibióticos. Esto último dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por el grupo ESKAPE, así como la contención de los brotes que provocan [7, 10].

3.2. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo pleomórfico Gram negativo (Fig. 1 [11-13]), aerobio estricto, no fastidioso (es decir que no requiere condiciones ambientales o nutricionales estrictas para su crecimiento) [14, 15], positivo para catalasa y negativo a oxidasa, no fermentador y de motilidad variable, que pertenece a la familia Moraxellaceae. Este patógeno oportunista extracelular es causante de un amplio rango de infecciones, principalmente asociadas a la atención sanitaria y, en menor medida, de infecciones adquiridas en la comunidad [14, 16].

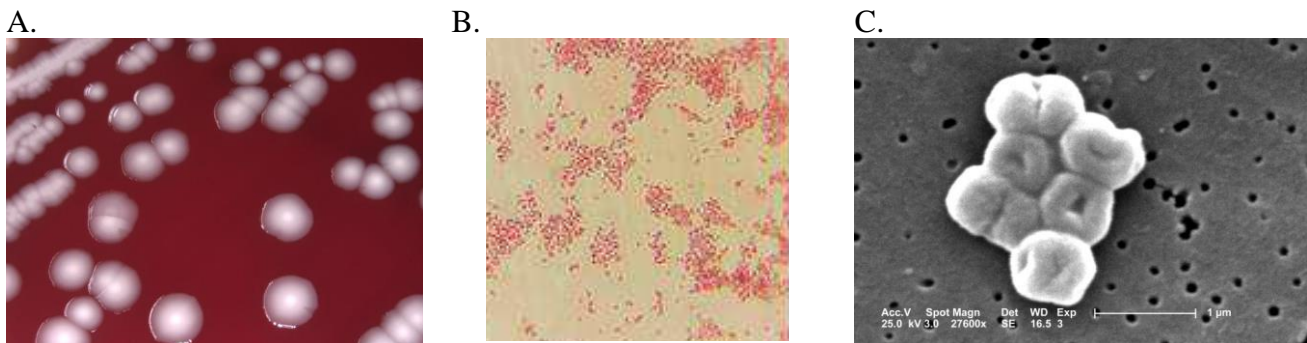


Figura 1. A. Amplificación 10X de colonias de *A. baumannii* obtenidas tras 48 horas de incubación a 37 °C en agar sangre de carnero. [11]. B. Amplificación 1000X de tinción Gram realizada a un cultivo de *A. baumannii* en fase de crecimiento exponencial [12]. C. Microscopía electrónica de barrido que muestra la amplificación 27600X de un cúmulo de *A. baumannii* [13].

El género al que pertenece *A. baumannii* actualmente incluye más de 70 especies [17-19], 4 de ellas (*Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis*) son muy parecidas fenotípicamente y se han designado con el término “complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*” (Complejo ACB) [14, 20]. Este complejo incluye a las especies del género que, mayormente, son causantes de infecciones asociadas a la atención sanitaria, siendo *A. baumannii* el patógeno identificado con mayor frecuencia de entre las especies del complejo ACB [14, 21].

3.3. INFECCIONES EN PIEL Y TEJIDO BLANDO POR *A. baumannii*

Entre las infecciones que puede causar *A. baumannii* se encuentran neumonía, septicemia, infecciones de la piel y tejido blando, osteomielitis, infecciones en el tracto urinario, endocarditis y meningitis, y se presentan con mayor frecuencia en personas inmunocomprometidas, que cursan con comorbilidades crónicas o que se someten a procedimientos invasivos [22-24]. De entre éstas, la que con mayor frecuencia causa *A. baumannii* es la neumonía, a menudo asociada al uso de ventiladores [25], seguida de infecciones en piel y tejido blando [26, 27].

Diferentes trabajos [28-32] han identificado a *A. baumannii* como un patógeno oportunista de relevancia en el contexto de infecciones en piel y tejido blando que se presentan en heridas quirúrgicas,

quemaduras, lesiones y en menor medida, en infecciones adquiridas en la comunidad [33-35]. Desafortunadamente, gran parte de la información que se tiene sobre las infecciones en piel y tejido blando por *A. baumannii* se limita a cuestiones epidemiológicas o al estudio de casos, [36-38] sin ahondar sobre los mecanismos moleculares que se producen durante el curso de la infección. Adicionalmente, algunas especies de *Acinetobacter* se han identificado como colonizadores de la piel de acuerdo con lo reportado en estudios realizados en individuos sanos, así como en pacientes hospitalizados sin procedimientos invasivos y en personal empleado en establecimientos de atención a la salud [21, 39-40].

La incidencia de infecciones en piel y tejido blando por *A. baumannii* se ha visto favorecida, en parte, a que la resistencia a múltiples antibióticos de este patógeno ha ido en aumento [41]. *A. baumannii* se ha identificado como el agente causal de diferentes tipos de infecciones en la piel, tales como celulitis [42], abscesos [43, 44], foliculitis [45] y fascitis necrosante [46, 47]. Estas distintas infecciones afectan diferentes estratos de la piel, e incluyen infecciones que afectan capas superficiales, hasta infecciones profundas que posteriormente dan lugar a osteomielitis o a bacteremia [37, 48, 49].

Un estudio de vigilancia epidemiológica realizado entre 1998 y 2004 por los laboratorios JMI, reportó a *Acinetobacter spp.* entre los principales 10 microorganismos causantes de infecciones en piel y tejido blando, tanto en América Latina como en Europa [38]. Mientras que un estudio realizado en 2006 en el que participaron 104 unidades de atención a quemados de los Estados Unidos de América reportó una prevalencia del 9 % de *Acinetobacter sp.* [50]. En países como China y Singapur, *A. baumannii* ha sido identificada como la principal bacteria responsable de infecciones en lesiones por quemadura (agente etiológico de hasta 88.89 % y 23.4 %, respectivamente, de las lesiones infectadas estudiadas) [51-53] y, de manera alarmante, un gran porcentaje de las cepas de *A. baumannii* que se han aislado de pacientes con quemaduras, presentan resistencia a antibióticos (53 %) [52, 54, 55]. Entre los factores de riesgo para que los pacientes quemados adquieran infección por *A. baumannii* resistente a antibióticos se encuentran quemaduras superiores al 30 % de la superficie corporal total, escisión tardía de la quemadura, internamiento posterior al primer día de la quemadura, estancias prolongadas en unidad de cuidados intensivos y exposición a procedimientos invasivos, así como el uso previo de antibióticos [52].

La infección por *A. baumannii* en pacientes con quemaduras dificulta la cicatrización y favorece la pérdida de injertos [52]. En el caso de estos pacientes, las infecciones causadas por *A. baumannii* no sólo se limitan a la zona de la piel afectada, sino que suelen presentar neumonía, bacteremia, así como infecciones del tracto urinario [51]. Cabe señalar que la presencia de *A. baumannii* como colonizador en el área lesionada ha sido reportada tanto de forma independiente como sin hacer distinción respecto a su condición de patógeno [51, 53].

Otros grupos severamente afectados por infecciones en piel y tejido blando cuyo agente etiológico es *A. baumannii*, son los sobrevivientes de desastres naturales como terremotos [56, 57] desastres causados por el hombre, como ataques terroristas [58] o incursiones militares preferentemente en Oriente Medio [49, 59-62]. Durante 2002 y 2004 se reportó una alta incidencia de infecciones en piel y tejido blando causadas por *A. baumannii* en el personal militar con inclusiones en Irak, Kuwait y Afganistán [59-62]. De las infecciones causadas por *A. baumannii* durante dicho periodo, el 17.0 % se reportó como infecciones en piel y tejido blando [49].

De manera general, la mortalidad de las infecciones en piel y tejido blando causadas por *A. baumannii* llega a ser de hasta el 30 % [37] y en México, de las infecciones causadas por *A. baumannii*, entre 23.2-38.9 % se reportan en piel y tejido blando [63-65].

Pese a que *A. baumannii* se encuentra dentro de los primeros agentes etiológicos causantes de infecciones en piel y tejido blando asociadas a la atención sanitaria [38], a la fecha no se han realizado estudios sobre la respuesta inmunológica de piel en respuesta a esta infección.

3.4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *A. baumannii*

La importancia clínica de *A. baumannii* radica en el incremento en la prevalencia de este patógeno y, sobre todo, en su capacidad de expresar resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos [37].

De manera general, la resistencia a antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios) se presenta cuando los microorganismos adquieren la habilidad de crecer o sobrevivir en concentraciones de agentes empleados para matarlos o para inhibir su crecimiento a las que previamente no lograban sobrevivir o crecer [66-68]. Pese a que esta situación es un fenómeno natural de la evolución [69], en el ámbito clínico implica un grave problema de salud [70].

En la clínica, la condición de resistencia para un patógeno puede definirse con referencia a la población de microorganismos previa a la exposición a un fármaco antimicrobiano, pero también con relación a la capacidad de un paciente para controlar la infección bajo un tratamiento antimicrobiano dado [71]. En consistencia con esto último, el comité europeo de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (EUCAST, del inglés *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), considera resistentes a determinado antibiótico, a los microorganismos para los que, incluso a exposición incrementada, en dosis o tiempo, el antibiótico en cuestión tiene una alta probabilidad de resultar en falla terapéutica [72, 73]. Adicionalmente, en el ámbito clínico, con el fin de hacer referencia a la capacidad de los microorganismos para tolerar el efecto de los antibióticos, no solo se emplea el término “resistente”, sino también se utiliza un término más amplio en el que se incluye a los microorganismos resistentes; este término es el de “microorganismos no susceptibles”. Un microorganismo, no susceptible es aquél que, con base en los puntos de corte de importancia clínica establecidos por la EUCAST, por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) o por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*), muestra no- susceptibilidad, susceptibilidad intermedia (susceptibilidad dependiente de la dosis) o resistencia durante las pruebas *in vitro* [74], criterios que difieren para cada prueba y microorganismo y que consideran la extrapolación al uso terapéutico de los antimicrobianos [72, 74].

De manera general, se considera multidrogorresistente (MDR) a aquel microorganismo que muestra resistencia a más de un agente antimicrobiano tras la evaluación del efecto de éstos *in vitro*. Sin embargo, ésta no es la única definición para el término MDR, ya que éste también suele emplearse para hacer referencia a un microorganismo de importancia clínica que presenta resistencia a un determinado antimicrobiano que es considerado clave para el tratamiento de las infecciones causadas por dicho patógeno, aunque adicionalmente, estos microorganismos suelen mostrar resistencia a otros antimicrobianos [74].

Para referirse a microorganismos que presentan resistencia a antibióticos de diversas categorías, algunos autores emplean los términos “extremadamente/extensivamente drogorresistente” o XDR y “pandrogorresistente” o PDR [74, 75]. Pese a que no existe un consenso sobre la definición de cada uno

de ellos y en ocasiones suelen emplearse indistintamente [75], se ha propuesto designar con estos distintos términos a cepas de patógenos, entre ellos, *A. baumannii* con base en el perfil de resistencia a antibióticos de diferentes categorías (Tabla 1) de acuerdo con su importancia epidemiológica [74]. De esta manera, Magiorakos y colaboradores [74], sugieren que las cepas de *A. baumannii* se consideren MDR cuando son no susceptibles a al menos un agente de tres de las diferentes categorías de antibióticos mostradas en la tabla 1; que se designen XDR cuando son no susceptibles a, al menos, un agente de todas las categorías de antibióticos, excepto 2 de las mostradas en la tabla 1; y que se consideren PDR cuando son no susceptibles a todos los agentes incluidos en la tabla 1.

Tabla 1. Agentes antimicrobianos de relevancia clínica para clasificar cepas de *A. baumannii* como MDR, XDR o PDR. Basada en Magiorakos y colaboradores, 2012.

Categoría de Antimicrobianos	Antimicrobiano
Aminoglucósidos	Gentamicina
	Tobramicina
	Amicacina
	Netilmicina
Carbapenémicos antipseudomonales	Imipenem
	Meropenem
	Dotipenem
Fluoroquinolonas antipseudomonales	Ciprofloxacino
	Levofloxacino
Penicilinas antipseudomonales + inhibidores de β -lactamasas	Piperacilina-tazobactam
	Ticarcilina-ácido clavulánico
Cefalosporinas de espectro extendido	Cefotaxima
	Ceftriaxona
	Ceftazidima
	Cefepima
Inhibidores de la vía de los folatos	Trimetoprim-sulfametoxazol
Penicilinas + inhibidores de β -lactamasas	Ampicilina- sulbactam
Polimixinas	Colistina
	Polimixina
Tetraciclinas	Tetraciclina
	Doxiciclina
	Minociclinas

La multidrogorresistencia que se presenta en patógenos representa un problema de salud muy grave. En febrero de 2017, la OMS publicó una lista de patógenos resistentes a antibióticos para los que es prioridad desarrollar nuevas alternativas de tratamiento. Esta lista considera la mortalidad, la prevalencia de la resistencia a antibióticos de los agentes etiológicos, su presencia en el entorno asociado a la atención sanitaria y en la comunidad, así como la capacidad para prevenir las infecciones por dicho microorganismo y el éxito de los tratamientos disponibles en la actualidad. Encabezando la lista, que incluye 12 familias de bacterias, con prioridad en grado crítico para desarrollar nuevos tratamientos, se encuentra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, para la que las únicas opciones de tratamiento son la colistina y la tigeciclina o la combinación de múltiples antibióticos [76, 77]. Sin embargo, estos

antibióticos usados como tratamiento de último recurso representan una elevada toxicidad para el hospedero, menor eficacia contra la bacteria o, en el caso de múltiples combinaciones, costos elevados [36]; aunado a esto, a la fecha y aunque en bajas frecuencias (3 y 25 %) se ha identificado resistencia tanto a colistina como a tigeciclina en aislados clínicos de *A. baumannii* [78].

La prevalencia de microorganismos con resistencia a múltiples antibióticos representa una grave amenaza para la salud humana, tiene un impacto económico debido a la necesidad de utilizar antibióticos más costosos y a la prolongación del internamiento de los pacientes, además, debido a la falta de tratamientos exitosos, afecta la calidad de vida de los pacientes e incrementa sustancialmente la mortalidad [1]. Por todo lo anterior, es necesario encontrar tratamientos alternativos para combatir exitosamente las infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a múltiples antibióticos.

Entre los aislados de *A. baumannii*, el primer reporte de resistencia a antibióticos data de 1960 y desde entonces, se ha registrado un incremento en la resistencia, de forma tal que a la fecha se tiene documentada la presencia de pandrogorresistencia en cepas de *A. baumannii* causantes de infecciones nosocomiales [79, 80]

En México, la resistencia a múltiples antibióticos para los aislados de *A. baumannii*, se reportó en porcentajes superiores al 75 % por estudios publicados entre 2012 y 2018 [81, 82]. Entre los años 2005 y 2015, los aislados de *A. baumannii* en México, mostraban un incremento sostenido en la resistencia a amikacina, ceftazidima, carbapenémicos y fluoroquinolonas [83].

Adicionalmente a la resistencia adquirida por diferentes mecanismos de transferencia horizontal de genes [84] y por mutaciones en su genoma [85, 86], *A. baumannii* es un patógeno que posee resistencia intrínseca, definida ésta como la resistencia que no se adquiere por procesos de transferencia horizontal de genes, sino que es resultado de la adaptación de los microorganismos a su ambiente natural [87, 88]. Entre las categorías de antibióticos hacia las que *A. baumannii* se reporta como intrínsecamente resistente, se encuentran las aminopenicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, vancomicina, fosfomicina, y sulfonamidas. Esta resistencia intrínseca, se debe principalmente a la composición de la pared de *A. baumannii* y a la presencia de bombas de eflujo [89].

Mientras que algunos de los elementos genéticos adquiridos por transferencia horizontal en *A. baumannii* contribuyen a la resistencia a antibióticos como los carbapenémicos [84], aminoglucósidos [90] y cefalosporinas de tercera generación [91]. En tanto que para mecanismos involucrados en la resistencia a antibióticos como carbapenémicos, tetraciclinas y colistina se ha identificado la contribución de mutaciones en el genoma de *A. baumannii* [85, 86].

Los mecanismos de resistencia a antibióticos que se han identificado en *A. baumannii* se pueden agrupar en tres categorías: 1) expresión de enzimas inactivadoras de fármacos, 2) disminución del acceso a la estructura blanco y 3) modificación en los blancos o en funciones celulares (Fig. 2.2. [89]) [77, 89].

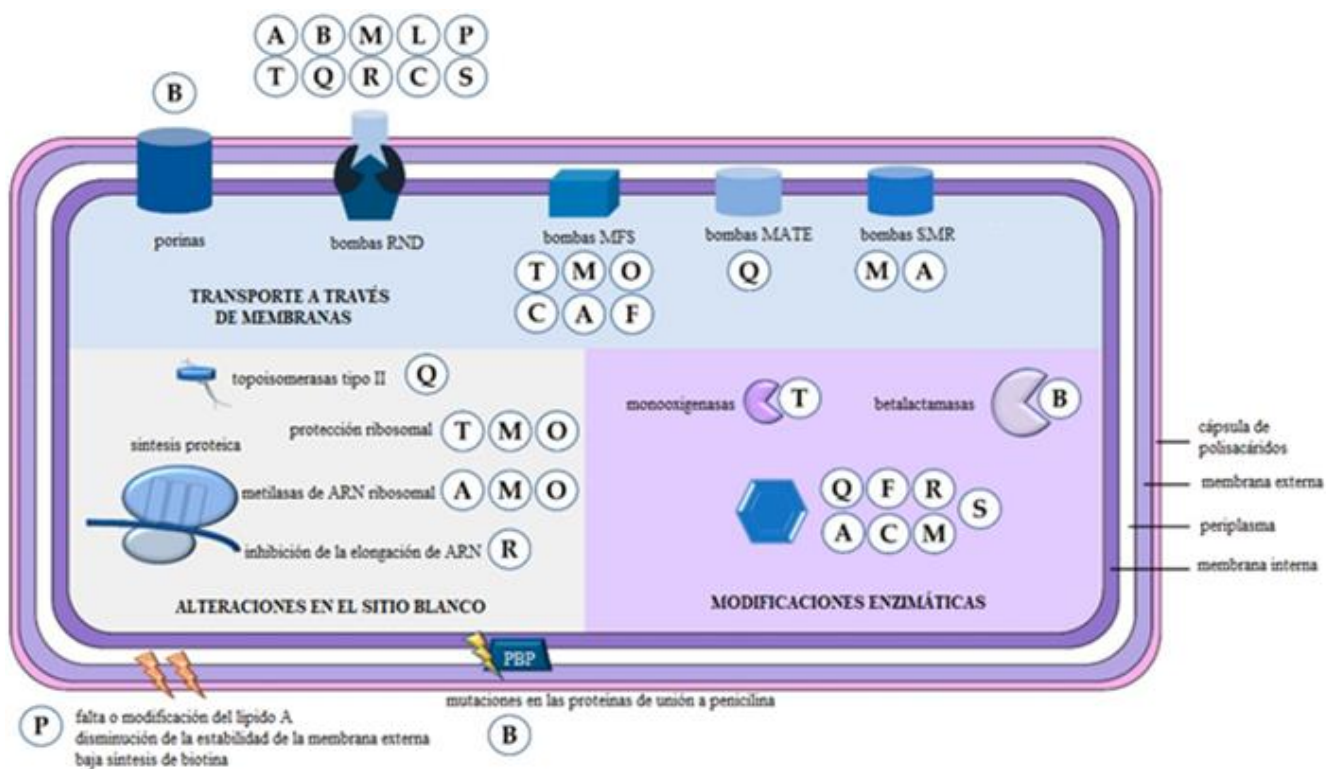


Figura 2. Principales mecanismos de resistencia reportados en *A. baumannii*. Los mecanismos que median la resistencia a antibióticos en *A. baumannii* pueden agruparse en tres categorías. 1) expresión de enzimas inactivadoras de fármacos, 2) disminución del acceso a la estructura blanco y 3) modificación en los blancos o en funciones celulares. Se muestran los antibióticos hacia los que se genera resistencia por los mecanismos de cada categoría A = aminoglucósidos; B = betalactámicos C = cloranfenicol; F = fosfomicina; L = lincosamidas; M = macrólidos; O = oxazolidinonas; P = polimixinas; PBP = proteínas de unión a penicilina; Q = fluoroquinolonas; R = rifamicinas, S = diaminopirimidinas/sulfonamidas; T = tetraciclinas. Modificado de Kyriakidis y colaboradores, 2018 [89].

3.5. PLASTICIDAD GENÓMICA Y DIVERSIDAD EN *A. baumannii*

A. baumannii es un patógeno con un genoma altamente plástico, es decir que, esta bacteria tiene una elevada capacidad de incorporar en su genoma genes no esenciales que le confieren ventajas adaptativas [92, 93]. Como consecuencia de ello, existe una alta variabilidad genética entre los aislados clínicos que circulan actualmente [93, 94].

Entre las ventajas adaptativas que puede adquirir *A. baumannii* a través de la incorporación de genes accesorios a su genoma, se encuentra la resistencia a antibióticos, misma que en la actualidad representa un alto riesgo para la salud humana [95, 96].

Las cepas de *A. baumannii* que circulan en el entorno hospitalario en la actualidad presentan resistencia a mayor número de antibióticos en comparación con cepas de referencia que suelen emplearse en trabajos de investigación [97, 98]. De manera destacable, lo anterior se ha demostrado para aislados clínicos recuperados de pacientes afectados por infecciones en la piel [98].

Algunas de las estructuras bacterianas involucradas en conferir resistencia a antibióticos en *A. baumannii* impactan en cómo se llevan a cabo los mecanismos de interacción patógeno-hospedero [99-105] sin embargo, la plasticidad del genoma de *A. baumannii* no solo le permite incorporar genes que le confieren resistencia a antibióticos. Genes relacionados con procesos metabólicos, regulación transcripcional y otros procesos de adaptación al medio, como determinantes de virulencia, también pueden incorporarse con facilidad al genoma de *A. baumannii*, cuyos productos también están involucrados en la interacción con el hospedero [92, 105-107]. La presencia de estresores como antibióticos en el ambiente hospitalario, permite la selección de cepas mejor adaptadas a la supervivencia en presencia de estos compuestos, características que, colateralmente impactan en la manera en que se lleva a cabo la interacción patógeno-hospedero [105, 108, 109].

Tomando en cuenta lo anterior, algunos trabajos experimentales se han llevado a cabo empleando tanto aislados de circulación actual, como cepas de referencia, que suelen ser cepas aisladas hace varias décadas y cuya virulencia y resistencia difiere en gran medida de los aislados clínicos actuales [110, 111], identificando diferencias importantes en las respuestas inducidas en el hospedero, entre las que se encuentran, la producción diferencial de citocinas proinflamatorias [110, 112], o la capacidad de la bacteria para sobrevivir en el interior de células del sistema inmunológico [111]. Estos resultados destacan la importancia de llevar a cabo estudios de investigación sobre *A. baumannii*, empleando cepas de reciente aislamiento de relevancia clínica [113], sobre todo en estudios relacionados con interacciones patógeno-hospedero.

3.6. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS ACTIVADOS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *A. baumannii*

Considerando que, la resolución de una infección y el éxito de los tratamientos resulta de la colaboración entre la actividad de los antibióticos y la respuesta inmunológica del hospedero [114], es indispensable conocer cómo se lleva a cabo la respuesta inmunológica durante las infecciones causadas por *A. baumannii*, que se presentan, sobre todo en individuos inmunocomprometidos o con morbilidades asociadas [115-117]. Desafortunadamente, a la fecha, la respuesta inmunológica contra las infecciones causadas por *A. baumannii* se ha estudiado poco y el desconocimiento de los efectores inmunológicos y los mecanismos a través de los que actúan en el combate contra *A. baumannii*, dificulta la prescripción de tratamientos efectivos contra determinadas cepas e incluso frena el desarrollo de terapias alternativas, como las inmunoterapias, para el combate de infecciones, sobre todo las causadas por *A. baumannii* resistente a múltiples antibióticos [41, 118].

Los estudios sobre la respuesta inmunológica, así como lo de interacción hospedero-patógeno durante la infección por *A. baumannii* se han realizado sobre todo en modelos de infección pulmonar, septicemia o bacteremia [119-121], pero no en infecciones en piel o tejido blando.

Algunos de los mecanismos inmunológicos que se inducen en respuesta a la infección por *A. baumannii*, establecen que los neutrófilos juegan un papel indispensable en el control de la infección [119]. Lo anterior se demostró en un modelo de infección intranasal en el que se llevó a cabo la eliminación de neutrófilos, lo que tornó letales inóculos de bacteria que no lo son para un hospedero sin depleción neutrofílica [119].

Otros trabajos han corroborado la participación de neutrófilos en la infección por *A. baumannii*. En algunos modelos de neumonía [120], así como en un modelo de infección en herida por *A. baumannii* [122], se observó el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección y la participación de éstos en el control de la carga bacteriana [120, 123]. En este sentido, la rápida producción de quimiocinas atrayentes de neutrófilos, como el ligando 1 de quimiocina con motivo C-X-C (CXCL, del inglés *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*), también llamado quimiocina derivada de queratinocitos (KC, del inglés *keratinocyte-derived chemokine*); CXCL2, también llamado proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2, del inglés *macrophage inflammatory protein*) y el ligando 2 de la quimiocina con motivo C-C (CCL2, del inglés *chemokine (C-C motif) ligand 2*) / proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*) es determinante para el control de la infección [100, 119]. Se sabe que la magnitud del reclutamiento de los neutrófilos al sitio de infección está influenciada por factores propios de diferentes cepas bacterianas, lo que quedó demostrado por un estudio llevado a cabo por Dikshit y colaboradores donde el porcentaje de neutrófilos reclutados al pulmón, tras la infección por la cepa tipo, es mayor en comparación con el porcentaje reclutado posterior a la infección por un aislado clínico [110].

Otro de los mecanismos inmunológicos que se han observado en respuesta a *A. baumannii* es la producción de citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor alpha*), siendo los macrófagos (M ϕ s), fuente importante de dichas citocinas [124].

Un mecanismo inmunológico más, observado en respuesta a la infección por *A. baumannii*, que tiene la peculiaridad de presentar actividad bactericida contra esta bacteria, es la producción de péptidos antimicrobianos, como β -defensinas y proteínas S100, por diferentes tipos de epitelio [125, 126].

Para algunas de las estructuras involucradas en la resistencia a antibióticos en bacterias, como las porinas, las bombas de expulsión y las proteínas de unión a penicilina, se ha demostrado su capacidad para interactuar directamente con elementos del hospedero e incluso activar algunos mecanismos de la respuesta inmunológica [99-104], impactando no solo en la capacidad de los microorganismos para sobrevivir en presencia de antimicrobianos, sino en la habilidad del hospedero para controlar e incluso resolver la infección [110].

En el caso de *A. baumannii*, la porina OmpA, además de estar involucrada en resistencia a antibióticos como cloranfenicol y aztreonam [101], se ha observado que, empleándola para estimular células dendríticas *in vivo*, las activa confiriéndoles la capacidad de producir interferón γ (IFN- γ) [99]. Por otro lado, debido a la característica de inmunodominancia de las porinas, algunas de ellas, se han empleado para realizar inmunizaciones protectoras contra cepas MDR [103, 104].

Moffatt y colaboradores [127] encontraron que la estimulación de M ϕ s con una cepa de *A. baumannii* resistente a colistina, carente de lipopolisacárido (LPS), resulta en una menor producción de TNF- α , en comparación con la estimulación de las mismas células con una cepa bacteriana sensible a colistina. En este trabajo también se reportó que la cepa sensible a colistina estimula a los M ϕ s a través del receptor tipo *toll* (TLR, *toll like receptor*) 4, mientras que la cepa resistente lo hace a través de TLR2; y si bien la cepa carente de LPS, es resistente a colistina, resulta más sensible a la catelicidina LL37 [127].

Un hallazgo destacable de un estudio llevado a cabo por Gebhardt y colaboradores [105] sugiere que algunas estructuras involucradas en resistencia a antibióticos en *A. baumannii* también favorecen la capacidad de proliferación de la bacteria dentro del hospedero [105]. En este estudio los autores sugieren que estos genes confieren capacidad de adaptación ante los estresores que representan los antibióticos o

los mecanismos de defensa del hospedero. En este mismo trabajo se reportó que genes identificados como reguladores transcripcionales putativos que impactan en la sensibilidad a antibióticos en *A. baumannii*, también son requeridos para el crecimiento dentro del hospedero [105]. Adicionalmente, trabajos como los realizados por Gesinger y colaboradores, [108] así como el de Roux y colaboradores [113], reportaron una correlación directa entre la virulencia de cepas de *A. baumannii* y la capacidad de éstas para sobrevivir en presencia de antibióticos [108, 109].

Dada la expresión diferencial de estructuras inmunomoduladoras en cepas resistentes y sensibles a antibióticos la respuesta inmunológica del hospedero durante la infección con una cepa sensible podría ser distinta de la respuesta contra una cepa que posee resistencia a antibióticos.

3.7. INTERLEUCINA 17 (IL-17)

La interleucina 17A (inicialmente conocida como antígeno 8 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-8, inglés *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8*), es también llamada interleucina 17 (IL-17), forma en la que será designada a partir de aquí en este texto, es una proteína homodimérica de entre 30 – 35 kDa (Fig. 2.3. [128]). Es considerada una citocina proinflamatoria dada su capacidad para inducir la expresión de mediadores inflamatorios (otras citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) [129, 130]. Esta molécula es la citocina prototipo de las citocinas de la familia de la IL-17, también conformada por las citocinas IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, mismas que comparten la presencia de cisteínas en el extremo C-terminal que permiten el plegamiento de estas proteínas en una estructura denominada nudo de cisteínas, característica de las citocinas de la familia de IL-17. De entre ellas, las que poseen mayor homología, tanto en humano como en ratón, son IL-17 e IL-17F. Estas citocinas presentan 50 % de identidad a nivel secuencia de aminoácidos, además de encontrarse codificados en el mismo cromosoma, unirse al mismo receptor y ser secretados por las mismas fuentes celulares [129, 131, 132].

IL-17 se ha asociado al desarrollo y establecimiento de múltiples patologías autoinmunes. En psoriasis, artritis reumatoide, lupus y esclerosis múltiple se ha detectado una elevada producción de IL-17, aunque, por otro lado, también se ha evidenciado su participación en la respuesta contra diversos patógenos extracelulares, sobre todo bacterias y hongos [133, 134].

Para ejercer sus efectos biológicos, la IL-17 actúa en forma de heterodímero (IL-17A/IL-17A), aunque también los monómeros de IL-17 pueden heterodimerizarse con IL-17F (IL-17A/IL-17F) mediante enlaces disulfuro para ambos casos, pudiendo, de esta manera, unirse a su receptor conformado por las cadenas de los receptores IL-17RA e IL-17RC [135].



Figura 3. Representación estructural tridimensional de la citocina IL-17 empleando el modelo de listones. Se muestra la estructura terciaria (homodímero) compuesta por la cadena A, en verde, y la cadena B, en color anaranjado. Se señalan los extremos amino terminal (N) y carboxilo terminal (C) de las cadenas. Modificado de Liu, S. 2013 [128].

3.8. FUENTES CELULARES DE IL-17

La producción de IL-17 ha sido corroborada en múltiples poblaciones celulares de origen hematopoyético distribuidas en diferentes órganos y tejidos (Fig. 4 [136]) [136] (Tabla suplementaria 1), sobre todo en barreras corporales donde no solo participa en su defensa contra patógenos extracelulares [137, 138] sino también en el mantenimiento de la integridad de estas barreras [139].

Una de las fuentes celulares de IL-17 más estudiadas hasta el momento, es una subpoblación de linfocitos T cooperadores (Th, del inglés *T helper*) $CD4^+$, designada como linfocitos Th17, precisamente por su habilidad para producir IL-17 [140-144]. Sin embargo; la capacidad de producir esta citocina ha sido identificada en muchas otras subpoblaciones inmunológicas de origen hematopoyético, como linfocitos $TCR\gamma\delta$, células linfoides innatas (ILCs, del inglés *innate lymphoid cells*) y linfocitos T $CD8^+$, entre otras; lo anterior en respuesta a diversos estímulos y en diversas condiciones, tanto fisiológicas como patológicas [145, 146].

La producción de IL-17 por linfocitos Th17 se ha identificado tanto en humanos como en ratones, en diferentes condiciones inflamatorias como en algunos modelos de patologías autoinmunes para encefalitis experimental y artritis inducida por colágeno, así como en respuesta a la infección por patógenos bacterianos extracelulares como *K. pneumoniae* [147, 144]. La diferenciación de linfocitos T naïve hacia la subpoblación efectora Th17 requiere de la acción de la combinación de algunas citocinas

como IL-1 β e IL-6, IL-23 e IL-1 β o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *transforming growth factor beta*) e IL-21 [148-150]. Estas citocinas permiten la expresión de la isoforma específica de timo del receptor gamma huérfano relacionado con el receptor del ácido retinoico (ROR γ t, del inglés *thymus-specific isoform of the retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*) lo que finalmente permite la producción de IL-17 por linfocitos Th17 [149, 151].

Los linfocitos Th17 no son las únicas células del sistema inmunológico adaptativo capaces de producir IL-17. La producción de IL-17 se ha corroborado en una subpoblación de linfocitos T CD8⁺, a la que se ha designado como Tc17. Células Tc17 fueron originalmente identificadas en piel de pacientes con psoriasis [152], posteriormente se identificaron en lesiones cerebrales de pacientes con esclerosis múltiple [153], en bronquios de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica [154], diabetes tipo I [155] y en la efusión pleural y sangre de pacientes con tuberculosis [156, 157]. Células Tc17 también se han identificado en ratones luego de la infección por el virus de la influenza tipo A [158]. La diferenciación de linfocitos T CD8⁺ hacia células productoras de IL-17 depende de la presencia de TGF- β junto con IL-6 o IL-21. Estas células son positivas para el factor transcripcional ROR γ t y la estabilización del fenotipo productor de IL-17 se consigue en presencia de IL-23 [159].

Una tercera población celular de la respuesta inmune adaptativa capaz de producir IL-17 son los linfocitos B. En 2013, Bermejo y colaboradores [160] evidenciaron la producción de IL-17 por células B estimuladas con transialidasa de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Otros tipos celulares que pueden ser fuente de IL-17, incluyen los linfocitos TCR γ δ ⁺, ILC3, células asesinas naturales (NKs, del inglés *natural killer cells*), células asesinas naturales T invariantes (iNKTs, del inglés *invariant natural killer T cells*), linfocitos T invariantes asociados a la mucosa (MAIT, del inglés *mucosal-associated invariant T cells*), células inductoras de tejido linfoide (LTis, del inglés *lymphoid tissue inducer cells*), células tipo LTis (LTi-like), neutrófilos, M ϕ s, células cebadas, monocitos, células de Langerhans e incluso células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs, del inglés *monocyte-derived dendritic cells*) [153, 161-166].

Las células TCR γ δ ⁺ capaces de producir IL-17 expresan el receptor para quimiocinas CCR6 [167] y corresponden a las subpoblaciones con las siguientes regiones variables de la cadena γ : V γ 4⁺, V γ 6⁺ y algunas subpoblaciones de V γ 1⁺ [168]. TGF- β 1 y ROR γ t son esenciales para el desarrollo de células TCR γ δ ⁺ productoras de IL-17 [151, 169, 1170]. Diversos estímulos, que actúan de manera conjunta, han sido identificados como inductores de la producción de IL-17 por células TCR γ δ ⁺, incluyendo a las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-23, TGF- β ; la estimulación a través de TLR2 y de la lectina 1 tipo C asociada a células dendríticas (delectina 1) [151, 169-171]. *In vitro*, la estimulación a través de IL-1 β e IL-23 ha mostrado ser suficiente para la inducción de IL-17 en células TCR γ δ ⁺ [169].

Células TCR γ δ ⁺ productoras de IL-17 han sido identificadas en múltiples modelos murinos de patologías autoinmunes, incluida la encefalitis autoinmune experimental, modelos de artritis, colitis, diabetes tipo I y psoriasis [168, 172-174]. En autoinmunidades humanas, la presencia de linfocitos TCR γ δ ⁺ productores de IL-17 se ha identificado en patologías como la esclerosis múltiple, la espondiloartritis, psoriasis y artritis psoriásica [168, 173, 175]. En infecciones, la participación de éstas se ha demostrado en modelos de infección por *Mycobacterium tuberculosis* y en infección hepática por *Listeria monocytogenes*, en infecciones intraperitoneales tanto por *Escherichia coli* como por *S. aureus* y en infecciones por *Bordetella pertussis* y *Candida albicans* [168, 176, 177]. Linfocitos TCR γ δ ⁺ humanos productores de IL-17 se han identificado en sangre de pacientes con meningitis bacterianas [178] y en sangre de pacientes que cursan con tuberculosis [179].

Algunas ILCs también pueden expresar IL-17. Estas células se han clasificado en tres grupos: el grupo 1 que incluye ILC1s y NKs, el grupo 2 que incluye a ILC2s y el grupo 3 conformado por ILC3s y LTis. Tanto las células incluidas en el grupo 1 como en el grupo 3, han mostrado ser capaces de producir IL-17 [169, 180].

Tanto las LTis, como las LTi-like expresan constitutivamente ROR γ t, factor que promueve la expresión de IL-17. Las LTis expresan constitutivamente IL-17 durante el desarrollo fetal y en etapas posteriores la expresan al ser estimuladas con IL-23 o con zimósán [145, 181]. Las ILC3s productoras de IL-17 han sido identificadas en la defensa contra infecciones por hongos, como *C. albicans* [182, 183].

El otro grupo de ILCs productor de IL-17 es el grupo 1. Pasos y colaboradores [184] observaron la producción de IL-17 por NKs en un modelo de infección por *Toxoplasma gondii*. En otro modelo murino se observó que la exacerbación del fenotipo de asma, inducido por ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), es dependiente de la producción de IL-17 por NKs e independiente de la producción de IL-23 [185]. Por otro lado, en humanos, Pandya y colaboradores [186], lograron identificar la presencia de células NKs productoras de IL-17, que designaron como NK17, en sangre periférica de voluntarios sanos [169, 186].

También en las iNKTs, del grupo 1 de los ILCs, se ha evidenciado la producción de IL-17 [169]. Estas células dependen de ROR γ t durante su desarrollo y expresan constitutivamente IL-23R [187]. Michel y colaboradores [178] identificaron la producción de IL-17 por iNKTs, luego del tratamiento intranasal de ratones con α -galactosilceramida (α -GalCer), PBS-57 e *in vitro* luego de la estimulación con glicolípidos de *Sphingomonas wittichii* y de *Borrelia burgdorferi* [188]. Otros modelos en los que se corroboró la producción de IL-17 por iNKTs fue luego de la estimulación sistémica con *S. aureus* o *E. coli* inactivadas por calor [169, 189].

Los neutrófilos son células de rápida acción, con la capacidad para realizar diversas actividades microbicidas [190]. Estas células se asocian a la presencia de IL-17, pero generalmente como células cuya respuesta es favorecida por la presencia de dicha citocina; sin embargo, diversas investigaciones han corroborado que estas células polimorfonucleares son, a su vez, fuente importante de IL-17 [145, 162] y que incluso pueden responder a ella en forma autócrina [191]. Tanto en ratón, como en humano, se ha evidenciado la presencia de neutrófilos productores de IL-17. En el caso de ratón, entre las condiciones en las que se han detectado neutrófilos positivos para IL-17 se encuentran, la estimulación *ex vivo* con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos [192], un modelo murino de daño a riñón por isquemia-reperfusión [193], un modelo de artritis reumatoide inducida por suero de ratones K/BxN [194], un modelo de neutrofilia en vías aéreas inducida por LPS [195], en ratones administrados con *Aspergillus fumigatus* [191, 196], en infección pulmonar por *B. pertussis* [197] o por *Legionella pneumophila* [198] e incluso en la infección peritoneal por *E. coli* [199].

En humanos, la presencia de neutrófilos positivos para la expresión de IL-17 ha sido corroborada en tejido tumoral de pacientes con cáncer gástrico [200], en sangre periférica de pacientes con asma alérgica, sobre todo en aquellos pacientes con alergia a hongos [201] y tras la infección con *L. pneumophila* [198].

La producción de IL-17 por M ϕ s ha sido demostrada en algunos trabajos [145, 181], por ejemplo, en el desarrollado por Da Silva y colegas [202], donde se identificaron M ϕ s IL-17⁺ tras su estimulación con quitina. También se han identificado estas células en la infección por *Plasmodium berghei* [203] y en un

modelo murino de asma alérgica [204]. En humanos, la producción de IL-17 por Mφs ha sido identificada en pacientes con cáncer de próstata [2055].

Algunas investigaciones han identificado la presencia de IL-17 en células cebadas estimuladas con ácido lipoteicoico [206]. En humanos, células cebadas positivas para IL-17 fueron identificadas en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, aunque se ha reportado que no son una fuente importante de esta citocina [207, 208]. Sin embargo, en fechas más recientes, Noordenbos y colaboradores [209], fueron incapaces de detectar ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de esta citocina en células cebadas provenientes de amígdalas humanas y de sinovio, pese a la presencia de la proteína dentro de las mismas. En este mismo trabajo se detectó la internalización por endocitosis de IL-17 por las células cebadas y la posterior liberación de la misma en forma bioactiva [209]. Células cebadas positivas para IL-17 han sido identificadas en otras patologías humanas, como en psoriasis [210], inflamación de las vías aéreas [211] y en diversos tipos de cáncer [212, 213], sin embargo, es necesario interpretar con cautela tales resultados, considerando los resultados publicados en 2016 por Noordenbos [209].

En otras subpoblaciones innatas, la producción de IL-17 no ha sido estudiada tan profundamente pero sí se ha detectado la presencia de la citocina en estas poblaciones celulares en algunas condiciones patológicas o tras la estimulación *in vitro* de las células. Por ejemplo, monocitos productores de IL-17 han sido identificados en pacientes que cursan con histiocitosis de células de Langerhans [164]; también en cromoblastomicosis, se han identificado células de Langerhans positivas para IL-17 [165], mientras que la producción de IL-17 se ha observado en moDCs tras su estimulación con *Brucella canis* [166].

3.9. PRODUCCIÓN DE IL-17 EN PIEL

Siendo una barrera corporal, la piel es un sitio en el que la presencia de IL-17 ha sido identificada en condiciones homeostáticas [214], así como inflamatorias de origen diverso [210, 215, 216, 217] (Tabla suplementaria 1).

A la fecha, múltiples trabajos han identificado que la producción de IL-17 por linfocitos Th17 presentes en la piel, contribuye a la patogénesis de psoriasis [210, 216-218], dermatitis atópica [217], dermatitis alérgica por contacto [219], dermatosis neutrofílica febril aguda, pioderma gangrenoso [220] y la enfermedad de Behçet [221].

Otra subpoblación de linfocitos presente en piel en la que se ha demostrado la producción de IL-17 son las células Tc17 [222], mismas que en condiciones homeostáticas producen IL-17 como consecuencia de su estimulación con IL-1 α e IL-1 β inducidas por la presencia del comensal *Staphylococcus epidermidis*. La producción de IL-17 por esta población celular induce la producción de los péptidos antimicrobianos S100A8 y S100A9, mismos que contribuyen a la defensa contra *C. albicans* [222]. Por otro lado, la producción de IL-17 por linfocitos T CD8⁺, ha sido identificada en la piel de pacientes con psoriasis y en menor medida en pacientes con dermatitis atópica [223].

Otras subpoblaciones de linfocitos presentes en piel y que en diferentes condiciones han sido identificadas como productoras de IL-17, son los linfocitos TCR $\gamma\delta$, principalmente de las subpoblaciones V γ 4 epidermales y V γ 6 dermales que se caracterizan por tener una expresión intermedia o baja de

receptor TCR y cuya producción de IL-17 se induce a través de la estimulación con IL-1 β e IL-23 [224-228]. Una tercera subpoblación de linfocitos TCR $\gamma\delta$ que producen IL-17 es la subpoblación V γ 5⁺, también denominadas células T dendríticas epiteliales (DETCs, del inglés *dendritic epithelial T cells*) en las que la producción de IL-17 es dependiente de la presencia de IL-23, IL-1 y de la estimulación de TLR-2 [229].

La producción de IL-17 por células TCR $\gamma\delta$ en piel se ha detectado en hipersensibilidad por contacto [230], en respuesta a patógenos que infectan la piel, como *S. aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* [226, 231] y en modelos de psoriasis en los que promueve el reclutamiento de neutrófilos [232].

También la producción de IL-17 ha sido detectada en piel por MAIT, más específicamente para la subpoblación CD4⁻ CD8⁻, en la que la producción de IL-17 depende de la presencia de la microbiota y de las citocinas IL-1 β e IL-18 [233].

En condiciones homeostáticas, la producción de IL-17 por ILC3s ha sido identificada en la piel de ratones, pero también durante la reparación de heridas, proceso en el que las ILC3s se reclutan al sitio de lesión como consecuencia de la activación de queratinocitos a través de la vía de Notch1 [234]. Adicionalmente, la producción de IL-17 por ILC3s se ha detectado en la piel durante patologías como modelos de dermatitis atópica [235].

Entre los granulocitos, tanto neutrófilos como células cebadas han sido identificadas entre las células IL-17⁺ en piel de pacientes con psoriasis [210]. Interesantemente, en algunas de estas células IL-17⁺ se ha observado la liberación de trampas extracelulares al medio [210].

3.10. CÉLULAS BLANCO Y EFECTOS DE IL-17

Las células blanco sobre las que puede actuar IL-17 también son diversas (Fig. 4 [136]), ya que sus receptores, IL-17RA/RC se expresan en múltiples tipos celulares. El receptor IL-17RA se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tejidos y tipos celulares [236], con una elevada expresión en células de origen hematopoyético, mientras que la subunidad IL-17RC tiene expresión más restringida, presentando alta expresión en células endoteliales, epidermales, mesenquimales, musculares, adipocitos y condrocitos, lo que las hace excelentes blancos de IL-17. Durante procesos inflamatorios IL-17 ejerce sus efectos, principalmente sobre endotelio, células del sistema inmunológico, fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, sinoviocitos y osteoblastos [136, 215, 237].

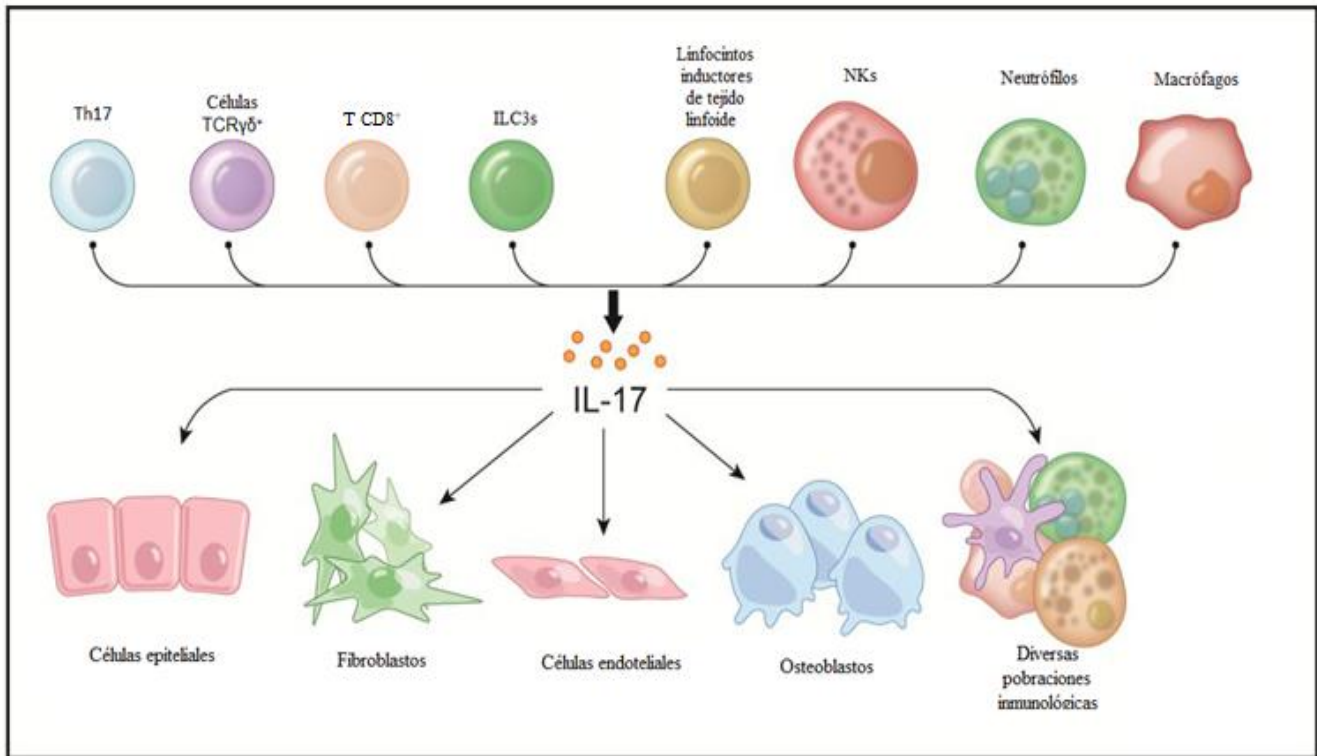


Figura 4. Principales fuentes y blancos celulares de IL-17. Tanto en condiciones de homeostasis como en diferentes condiciones inflamatorias diversas células de origen hematopoyético producen IL-17. Diversas poblaciones celulares, al expresar el receptor de IL-17 IL-17RA/RC, son blanco sobre el que esta citocina induce sus efectos. Los blancos celulares de IL-17 son principalmente células no hematopoyéticas, como células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos, aunque IL-17 puede actuar sobre diversas poblaciones, incluidas células de origen hematopoyético. Modificado de Abusleme, L., y Moutsopoulos, N. M. (2017) [136].

Para llevar a cabo sus efectos sobre las diferentes poblaciones celulares, el homodímero IL-17A/IL-17A, o el heterodímero IL-17A/IL-17F, se une a la subunidad IL-17RA, lo que favorece la unión de la subunidad IL-17RC [238, 239], esto permite el reclutamiento de la proteína adaptadora Act1 al motivo SEFIR del receptor [240, 241] y el posterior reclutamiento y ubiquitinación de los factores asociados al receptor de TNF (TRAF, del inglés *TNF receptor associated factors*), como TRAF6, lo que culmina con la activación de vías de las proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPKs, del inglés *mytogen-activated protein kinases*), del factor nuclear NFκB (NFκB, del inglés *Nuclear Factor Kappa B*) o de la proteína β de unión a la secuencia potenciadora CCAAT (C/EBPβ, del inglés *CCAAT/enhancer binding proteins*) y C/EBPδ [240, 242, 243].

Igual que muchas otras citocinas, IL-17 es una molécula pleiotrópica, misma que a través de la estimulación de su receptor en las células blanco, induce la producción de quimiocinas, péptidos antimicrobianos, factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias, metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) y proteínas de fase aguda; todo lo anterior tiene como efecto la expansión y reclutamiento de células inmunitarias y la promoción de respuestas contra patógenos; desafortunadamente, la inflamación crónica mediada por esta citocina contra blancos inocuos propios del hospedero, también tiene como efecto la destrucción de tejido, condición en la que se presentan patologías autoinmunes [244].

IL-17 es una citocina con alta relevancia en la defensa contra patógenos de barreras epiteliales y mucosas. Se ha demostrado su participación en la respuesta contra infecciones de la piel causadas por *S. aureus* y *C. albicans* y contra infecciones en mucosas causadas por *K. pneumoniae* y *Citrobacter rodentium*. En estos sitios de barrera, promueve la producción de sustancias antimicrobianas tras estimular células epiteliales, neutrófilos y Mφs, induciendo la producción de β-defensinas, proteínas S100/calgranulinas, catelicidinas, lipocalinas y lactoferrinas [215, 245].

IL-17 promueve la infiltración celular al estimular células epiteliales e inducir la producción de quimiocinas (CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2α, CXCL5/péptido epitelial de 78 aminoácidos activador de neutrófilos (ENA-78, del inglés *epithelial neutrophil-activating peptide 78*), CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1), citocinas (IL-6, IL-1β, TNF-α), factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés, *granulocyte colony-stimulating factor*) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*); y de MMP1, MMP3, MMP9, MMP13 (Fig. 5. [215]) [162, 215, 246]. IL-17 es una citocina que favorece ampliamente las respuestas mediadas por neutrófilos y es a través de la inducción de G-CSF que IL-17 es capaz de incrementar la expansión de las células progenitoras de granulocitos en la médula ósea y bazo [247]. También mediante la inducción de G-CSF así como de GM-CSF, IL-17 favorece la supervivencia de neutrófilos [248], mientras que es, principalmente, a través de la inducción de CXCL1 y CXCL2 que induce el reclutamiento de neutrófilos [249. 250].

La piel es uno de los órganos de barrera con amplia exposición al exterior [251]. En éste, IL-17 juega un papel importante tanto en estado basal [222, 252] como tras el encuentro con patógenos y en el desarrollo y progresión de patologías autoinmunes, como psoriasis (patología inflamatoria crónica de la piel, caracterizada por la proliferación incrementada y la diferenciación aberrante de queratinocitos) [253, 254]. La expresión en piel de IL-17 en condiciones de homeostasis, se induce en respuesta a la presencia de microorganismos comensales. [222, 255]. Estos niveles basales de IL-17 en condiciones de homeostasis, regulan positivamente la claudina 4, incrementando la fuerza de las uniones estrechas en el estrato córneo de piel, favoreciendo la función de barrera de la piel, de forma tal que cuando posteriormente, la piel sufre daño mecánico o se enfrenta a patógenos, la presencia de IL-17 en las previas condiciones homeostáticas, es quien favorece la reparación de lesiones e incrementa la respuesta a patógenos como *C. albicans* [222, 255].

La participación de IL-17 en la resolución de infecciones de la piel, se ha evidenciado en la respuesta contra diferentes patógenos, tanto fúngicos como bacterianos [143, 229, 256]. En el caso de la infección mucocutánea por *C. albicans*, IL-17 induce la expresión de los péptidos antimicrobianos S100A9 y β-defensina 3 que participan en el control de la levadura [257]; mientras que el control de *S. aureus* durante la infección cutánea, depende del reclutamiento de neutrófilos mediado por IL-17 [229], lo que sugiere que IL-17 participa en el control de patógenos cutáneos mediante diferentes mecanismos.

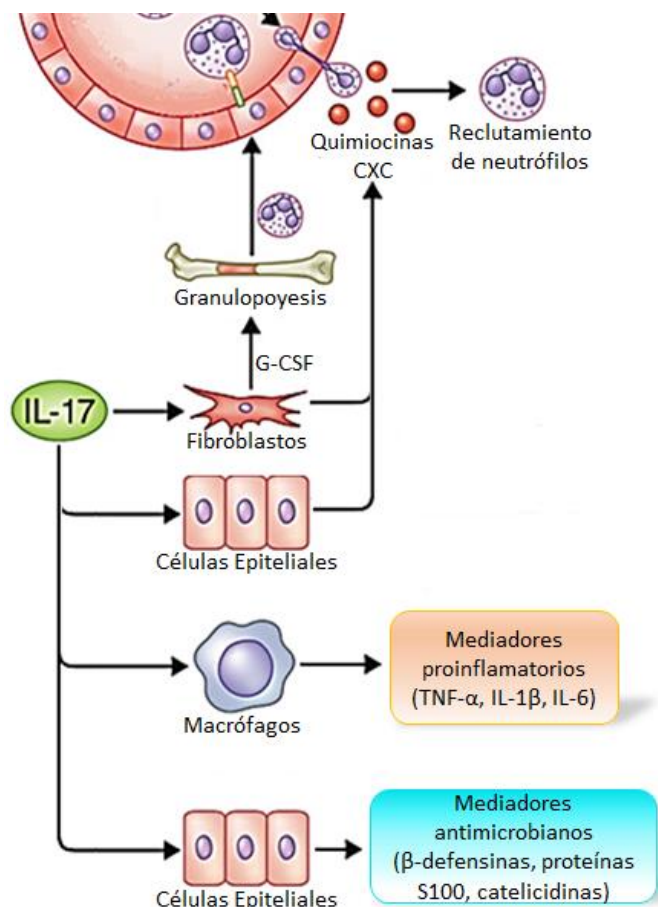


Figura 5. Principales efectos de IL-17 sobre sus blancos celulares. La señalización de IL-17 tras a la unión a su receptor en sus blancos celulares tanto de origen hematopoyético, como no hematopoyético, induce procesos inflamatorios y antimicrobianos. Al actuar sobre fibroblastos, IL-17 favorece la a granulopoyesis a través de la regulación al alta de G-CSF. Adicionalmente favorece el reclutamiento celular mediante la inducción y regulación al alta de quimiocinas. En células epiteliales, es capaz de inducir la producción de péptidos antimicrobianos, mientras que su acción sobre algunas células de origen hematopoyético amplifica la respuesta inflamatoria al inducir la producción de otras citocinas. Modificado de Zenobia, C. y Hajishengallis, G. (2015) [215].

3.11. IL-17 EN LA INFECCIÓN POR *A. baumannii*

Algunos de los mecanismos inmunológicos que se inducen en respuesta a la infección por *A. baumannii*, como el reclutamiento de neutrófilos —células esenciales en la resolución de la infección por este patógeno— mediado por la producción de CXCL1, CXCL2 y CCL2; la producción de citocinas proinflamatorias como $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y la producción de péptidos antimicrobianos (Fig. 6. [258]), en distintas condiciones fisiológicas o patológicas pueden ser inducidos o favorecidos por efecto de IL-17 [215]. Sin embargo, no existen estudios que aborden la participación de IL-17 sobre la inducción o modulación de estos mecanismos durante la infección por *A. baumannii*.

A la fecha, se tiene poca información respecto a la participación de IL-17 en respuesta a la infección por *A. baumannii*. En modelos de infección sistémica o de neumonía por *A. baumannii* se ha evidenciado la inducción de IL-17 en respuesta a la infección [259, 260]. En un estudio realizado por Qiu y

colaboradores, enfocado en evaluar la protección ante un reto secundario por *A. baumannii* intranasal [259], se pudo detectar la presencia de IL-17 en el lavado bronqueoalveolar, tanto tras la infección primaria, como luego del reto secundario [259]. Mientras que Breslow y colaboradores detectaron la presencia de IL-17 en exudado peritoneal tras la infección intraperitoneal con *A. baumannii* [260]. Desafortunadamente, ninguno de estos estudios profundiza sobre el papel que esta citocina pudiera tener en el control de la infección.

Como ya se mencionó, la piel es un órgano en cuya defensa contra agentes infecciosos extracelulares la participación de IL-17 es relevante e incluso, en algunos casos, esencial para el control y resolución de la infección [229]; sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, la respuesta inmunológica montada contra la infección cutánea por *A. baumannii* no ha sido estudiada y mucho menos se ha evaluado la contribución de IL-17 a dicha respuesta.

Tomando en cuenta todo lo anterior, consideramos que es necesario determinar si IL-17 se induce en respuesta a la infección en piel por *A. baumannii* y conocer cuál es su papel en la respuesta a la infección por distintas cepas, sin dejar de lado la alta plasticidad del genoma de esta bacteria y el incremento en la adquisición de mecanismos de resistencia a antibióticos en las cepas que se recuperan actualmente de las unidades que prestan servicios sanitarios [41], mediados por estructuras que pueden afectar las interacciones patógeno-hospedero [99-101].

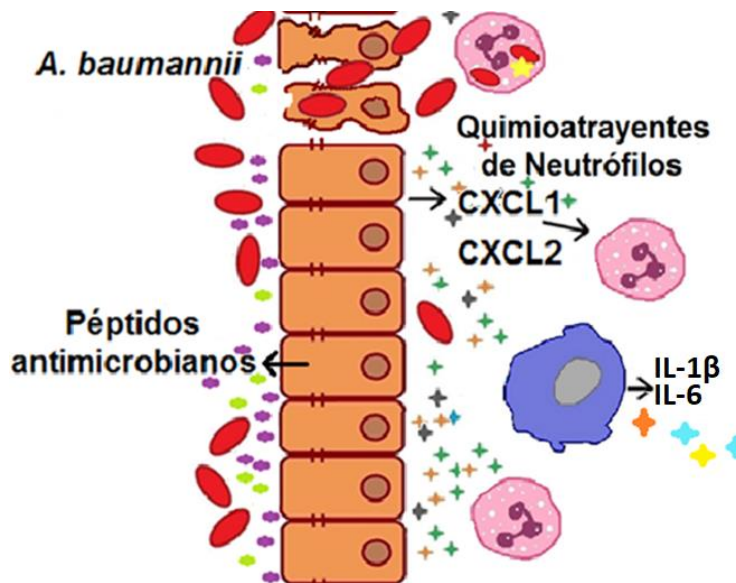


Figura 6. Mecanismos inmunológicos activados en respuesta a la infección por *A. baumannii*. Las células epiteliales producen péptidos antimicrobianos en respuesta a la infección por *A. baumannii*, mismos que resultan bactericidas para este patógeno. En respuesta a la infección, tanto células epiteliales como células hematopoyéticas producen quimiocinas como CXCL1 y CXCL2 que permiten el reclutamiento de poblaciones celulares inmunológicas al sitio de infección, mismas que amplifican la respuesta inflamatoria mediante la producción de citocinas como IL-1 β e IL-6. Modificado de García-Patiño y colaboradores [258].

4. HIPÓTESIS

La infección cutánea por *A. baumannii* inducirá la expresión de IL-17, lo que contribuirá al control y a la eliminación de la bacteria.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar la participación de IL-17 y caracterizar su papel en la respuesta a la infección por dos cepas distintas de *A. baumannii* en un modelo murino de infección cutánea aguda.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Establecer el modelo murino cutáneo de infección por *A. baumannii*.
- II. Identificar la inducción de IL-17 en respuesta a la infección aguda por la infección de dos cepas distintas de *A. baumannii*.
- III. Identificar y caracterizar las poblaciones inmunológicas celulares productoras de IL-17 que pueden responder con la producción de esta citocina a la infección por cada una de las cepas de *A. baumannii* a diferentes tiempos post infección.
- IV. Evaluar la contribución de la presencia de IL-17 sobre el reclutamiento celular al sitio de infección.
- V. Cuantificar la carga bacteriana a nivel local y sistémico tras la infección por cada una de las cepas bacterianas a diferentes tiempos post infección en ratones con fenotipo silvestre, así como en ratones deficientes de IL-17.

6. METODOLOGÍA

6.1. ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *A. baumannii* EN UN MODELO DE INFECCIÓN SUBCUTÁNEA

Debido a las diferencias reportadas previamente entre cepas de referencia y aislados clínicos de circulación actual [110-112], para llevar a cabo la infección en ratón, se emplearon dos distintas cepas de *A. baumannii*. La cepa de referencia ATCC 17978 adquirida de la compañía American Type Culture Collection con fenotipo susceptible a múltiples antibióticos y la cepa MDR A578, aislada en 2015 de un paciente interno del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra” de la Ciudad de México, proporcionada por el Dr. Rafael Franco Cendejas y por el Dr. Rodolfo García Contreras. El perfil de resistencia a diferentes antibióticos para las cepas ATCC 17978 y A578 se muestra en la Tabla 2 [261].

Tabla 2. Perfil de Resistencia de las cepas ATCC 17978 y A578 de *A. baumannii*. Basado en Cruz-Muñiz y colaboradores, 2016, a su vez basado en los puntos de corte con base en la guía de los CLSI 2015. [261]

Categoría	Antibiótico	Sensibilidad	
		ATCC 17978	A578
Aminoglucósidos	Amikacina	Sensible	Resistente
	Gentamicina	Sensible	Resistente
Cefalosporinas	Ceftazidima	Sensible	Resistente
	Cefepima	Intermedia	Resistente
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	Sensible	Resistente
	Levofloxacino	Sensible	Resistente
Ureidopenicilinas (β-lactámicos)	Piperacilina/tazobactam	Sensible	Resistente
Carbapenémicos (β-lactámicos)	Imipenem	Sensible	Sensible
	Meropenem	Sensible	Sensible
	Doripenem	Sensible	Resistente
Polimixinas	Colistina	Sensible	Sensible

La infección se realizó vía subcutánea a fin de superar la barrera protectora que representan la epidermis y la dermis, inoculando ratones mayores a 8 semanas de edad de las cepas C57BL/6, C57BL/6-*Il17a^{tm1Bcgen}/J* (The Jackson Laboratory) [262] reporteros para la expresión de IL-17, proporcionados por el Dr. José Carlos Crispín Acuña (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. Salvador Zubirán) o B6.Cg-*Il17a/Il17^{tm1.1Impr} Thy1a/J* [263] deficientes en IL-17 e IL-17F (denominados en este trabajo como IL-17A/F KO), proporcionados por el Dr. Samuel Huber (Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf).

En los ratones *Il17a^{tm1Bcgen}/J* la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP, del inglés enhanced green fluorescent protein) se expresa como reportera de la actividad de *Il17a*. En estos ratones de fondo C57BL/6N, la secuencia IRES-EGFP-SV40-poliA se localiza luego del codón de paro de *Il17a* [262].

Los ratones B6.Cg-*Il17a/Il17f^{tm1.1lmp} Thy1a/J* son deficientes tanto de *Il17a* como de *Il17f*. Para la obtención de estos ratones, una región de 43 kilobases que comprende los exones 2 y 3 de ambos genes se eliminó mediante recombinación homóloga en células troncales embrionarias Bruce 4 [263]

Para evaluar la patogenicidad, así como realizar la cuantificación de la carga bacteriana, la cuantificación de las proteínas IL-17, IL-17A/IL-17F e IL-17F y evaluar la transcripción de *Il17a*, la infección se realizó en el dorso en el área de la base de la cola en ratones de las cepas C57BL/6 o IL-17A/F KO. Para ello, dos días antes de realizar la infección se rasuró el dorso de los ratones con una cortadora de pelo eléctrica. Para inocular las bacterias, los ratones se introdujeron en un dispositivo de restricción de movimientos para roedores y 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFCs) de la cepa sensible ATCC 17978 o de la cepa resistente a antibióticos A578 en la fase exponencial de crecimiento, resuspendidas en 200 μ L de solución amortiguadora salina (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*,) fueron inoculadas subcutáneamente, cerca de la base de la cola. Al grupo control se le administraron, vía subcutánea, 200 μ L de PBS estéril, del mismo lote que el utilizado para resuspender el inóculo bacteriano. Tras la infección, para ser empleados como marcadores de enfermedad [264], se determinaron el peso corporal de los ratones y el área de la lesión con ayuda de un Vernier.

6.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE *Il17a* EN PIEL INFECTADA POR *A. baumannii* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR)

Ratones inoculados vía subcutánea con 2×10^9 UFCs de la cepa ATCC 17978 o de la cepa A578 de *A. baumannii*, fueron sometidos a eutanasia luego de 2, 4, 12, 24, 48 o 72 horas de haber sido infectados. De cada uno de ellos se obtuvo el fragmento de piel infectada que se incubó en 500 μ L de medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI) al 10 % de suero fetal bovino (SFB) con Liberasa T® (Roche) [2.5 μ g/mL] y desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (Sigma) [0.125 μ g/mL], durante 45 minutos a 37 °C. La piel se fragmentó con tijeras de disección y se incubó nuevamente durante 45 minutos a 37 °C con agitación de 250 rpm en el mismo medio en el que se había incubado con anterioridad. Para detener la digestión enzimática, se adicionaron 2.5 mL de RPMI 10 % de SFB con EDTA 5 mM. El tejido grueso se separó mediante filtración por malla y la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 mL de RPMI con desoxirribonucleasa I de páncreas bovino [0.125 μ g/mL], incubando en hielo durante 5 minutos. La suspensión celular se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se recuperaron en 500 μ L de TRIzol®.

Para extraer el ARNm de los tejidos disgregados, el homogenizado se atemperó a temperatura ambiente y a cada muestra se le adicionó cloroformo (1/5) incubando durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 x g a 4 °C y se conservó la fase acuosa. La fase acuosa se incubó con isopropanol a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarse durante 10 minutos a 12000 x g a 4 °C y recuperar el botón de ARN. Se realizó un lavado con etanol al 75% centrifugando

durante 5 minutos a 7500 x g a 4 °C. Se permitió la evaporación del etanol y cada muestra se recuperó en agua libre de ARNasas. Se determinó la pureza del ARNm evaluando la proporción A260/A280 y la concentración del ARNm obtenido mediante la absorbancia A260 en un espectrofotómetro para microvolúmenes NanoDrop 2000c® (Thermo Scientific).

Obtenido el ARN, se sintetizó el ADN complementario (cADN) al mismo, de la siguiente manera. Para cada muestra se tomó el volumen correspondiente a 1 µg de ARN y se llevó a un volumen de 56 µL con agua, se adicionaron 2 µL de 2'-deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) [10 mM] y 2 µL de oligo (dT) [0.5 µg/µL]. Las muestras se calentaron 5 minutos a 65 °C, enfriándose inmediatamente después en hielo. A cada muestra se agregaron 6 µL de ditioneitol (DTT) [0.1 M] y 12 µL First Strand Buffer® (Invitrogen) [5x]. Cada muestra se incubó durante 2 minutos a 42 °C. A cada muestra se le adicionó 1 µL de enzima Super Script II® (Invitrogen) [200 U/µL] y se permitió la síntesis de cADN en las siguientes condiciones: 50 minutos a 42 °C y 15 minutos a 70 °C.

La cuantificación relativa del ARN mensajero de *Il17a* se realizó, empleando los siguientes oligonucleótidos: 5'-ccctcagactacctcaacc-3' y 5'-agcttcccagatcacagag-3'; mientras que para la cuantificación del mensajero de *Il17f* se emplearon los oligonucleótidos: 5'-ggagaaccagcatgaagtg-3' y 5'-aagtccaacataaagtag-3'. Para realizar la amplificación, se mezclaron 1 µL de cADN, con 5 µL de la enzima iTaq® Universal SYBR® Green (Bio-Rad), 1 µL de cada oligonucleótido [10 mM] en un volumen final de 10 µL. La amplificación se llevó a cabo calentando la reacción 3 minutos a 95 °C, realizando posteriormente 40 ciclos de amplificación de calentamiento a 95 °C 3 segundos y 65 °C 30 segundos empleando un equipo CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System® (Bio Rad).

6.3. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IL-17, IL-17F E IL-17A/IL-17F EN PIEL INFECTADA POR *A. baumannii*

Para determinar la concentración de IL-17 en piel, tras la infección por *A. baumannii* de la cepa ATCC 17978 o de la cepa A578, a diferentes tiempos postinfección, 2, 4, 12, 24, 48 o 72 horas, se realizó eutanasia a ratones infectados con cada una de las dos cepas bacterianas. Se recuperó y pesó el fragmento de piel donde previamente se llevó a cabo la inoculación. El fragmento recuperado de cada ratón se recuperó en 500 µL de solución de extracción (NaCl [0.4 M], polisorbato 20 [0.05 %], albúmina sérica bovina [0.5 %]) con inhibidor de proteasas *cOmplete*® (Merck) (extracto de páncreas [0.15 mg/mL], pronasa [0.0015 mg/mL], termolisina [0.0008 mg/mL], quimiotripsina [0.0015 mg/mL], tripsina [0.0002 mg/mL], papaína [1 mg/mL]).

Cada muestra se disgregó mecánicamente en la solución de extracción, mediante un homogenizador de tejido eléctrico Ultra-turrax® (IKA) mediante pulsos de 10 segundos. Las muestras se mantuvieron a -70 °C hasta realizar el ensayo de cuantificación.

La concentración de IL-17 en cada una de las muestras de piel infectadas por distintos intervalos de tiempo, se llevó a cabo mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) ELISA MAX® (Biolegend) para IL-17, LEGEND MAX Mouse IL-17F ELISA Kit® (Biolegend) para IL-17F o ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-17A/F® (Biolegend) para IL-17A/IL-17F, siguiendo las recomendaciones de los proveedores.

De manera general, para IL-17 e IL-17A/IL-17F, el anticuerpo de captura se inmovilizó en pozos de una placa para ELISA durante toda la noche a 4 °C. Concluida la incubación, se retiró la solución y se lavó la placa con solución de lavados (polisorbato 20 [0.05 %] en PBS). La placa fue bloqueada con solución diluyente (SFB [10 %] en PBS) y posteriormente se incubó con una curva patrón correspondiente y con las suspensiones de las muestras recuperadas de ratones infectados con *A. baumannii*. Concluida la incubación, se retiraron las muestras y se lavó la placa. La placa se incubó con anticuerpo de detección y posteriormente se lavó. La placa se incubó con solución de avidina-peroxidasa de rábano, lavándose posteriormente. La placa se incubó con solución de tetrametil bencidina. La reacción se detuvo con solución para detener la reacción (H_2SO_4 [2 N]) y se realizó la lectura espectrofotométrica a 450 nm en un lector de absorbancia para placas Elx808® (BioTek).

En tanto que para IL-17F, la placa se incubó con la curva patrón correspondiente y con las suspensiones de las muestras recuperadas de ratones infectados con *A. baumannii*. Concluida la incubación, la placa fue lavada e incubada con anticuerpo de detección. Posteriormente se lavó y se incubó con solución de avidina-peroxidasa de rábano para lavarse posteriormente. La placa se incubó con solución de tetrametil bencidina. La reacción se detuvo con solución para detener la reacción y se realizó la lectura espectrofotométrica a 450 nm en un lector de absorbancia para placas Elx808® (BioTek).

6.4. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO A DIFERENTES TIEMPOS POST-INFECCIÓN

A diferentes tiempos después de haber inoculado subcutáneamente la bacteria, a los ratones se les practicó eutanasia y se recuperaron el fragmento de piel infectado o control, el bazo y 25 µL de sangre recuperada por punción cardiaca, inmediatamente después de realizar la eutanasia. La piel y el bazo se recuperaron en 1 mL de PBS estéril, se disgregaron mecánicamente mediante el uso de un homogeneizador de tejido Ultra-turrax® (IKA). A partir de la suspensión del órgano disgregado, se realizaron diluciones seriadas, de la piel hasta 10^{-6} y del bazo hasta 10^{-3} , con PBS estéril. De cada una de las tres diluciones de menor concentración, se sembraron 25 µL de cada dilución en una placa de agar con medio de lisogenia (*lysogeny broth*, LB). Para la sangre, se sembraron en placa de agar LB 10 µL de sangre sin diluir y los 10 µL restantes se diluyeron con 90 µL de PBS, dilución de la que se sembraron 25 µL en una placa de LB. Las placas se incubaron por 8 h a 37 °C, al término de lo cual se realizó el conteo de las colonias presentes en cada placa.

6.5. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES INMUNOLÓGICAS PRESENTES EN PIEL DE RATONES INFECTADOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

A diferentes tiempos postinfección, a ratones de la cepa C57BL/6, se les indujo eutanasia y se disectaron para recuperar el fragmento de piel infectado, el bazo, los ganglios linfáticos axilares, que se consideraron no drenantes (NDLNs) y los ganglios linfáticos inguinales, considerados drenantes (DLNs) por su

cercanía con el sitio de infección. Cada uno de los diferentes órganos se recuperó en medio RPMI suplementado con 5 % de SFB y se mantuvo a 4 °C mientras fue procesado.

Los ganglios y el bazo se disgregaron mediante una malla para procesar tejido. Una vez disgregados los ganglios y el bazo, la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g. Se desechó el sobrenadante y se descompactó el botón celular. Las células se resuspendieron en 1 mL de solución de cloruro de amonio y bicarbonato de potasio (NH₄Cl [150 mM], KHCO₃ [10 mM], Na₂EDTA [100 μM]) incubándose durante 1 minuto a temperatura ambiente para realizar lisis eritrocitaria. Para detener la reacción se adicionaron 4 mL de RPMI al 5 % de SFB y se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g,

Para obtener una suspensión celular enriquecida en células hematopoyéticas a partir de los fragmentos de piel del dorso de ratón, cada fragmento de piel se incubó en 500 μL de RPMI al 10% de SFB con Liberasa T® (Roche) [2.5 μg/mL] y desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (Sigma) [0.125 μg/mL] durante 45 minutos a 37 °C. Concluida esta incubación, la piel se fragmentó mediante el uso de tijeras de disección y se incubó nuevamente durante 45 minutos a 37 °C con agitación de 250 rpm en el mismo medio en el que se había incubado con anterioridad. Para detener la digestión enzimática, se adicionaron 2.5 mL de RPMI 10 % de SFB con EDTA 5 mM. El tejido grueso se separó y eliminó mediante la filtración de las muestras a través de una malla y la suspensión celular recuperada se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 mL de RPMI al 10 % de SFB con desoxirribonucleasa I de páncreas bovino [0.125 μg/mL], incubando las células en hielo durante 5 minutos. La suspensión celular se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se recuperaron en 500 μL de RPMI al 10 % de SFB.

Para recuperar los leucocitos a partir de piel de orejas de ratón a diferentes tiempos postinfección se recuperó la oreja, dejándola libre de cartílago. La oreja se separó por la mitad interna y la cara de ambos fragmentos se incubaron en medio de digestión, que consiste en 500 μL de RPMI al 10 % de SFB con Liberasa T® (Roche) [2.5 μg/mL] y desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (Sigma) [0.125 μg/mL], durante 45 minutos a 37 °C. Concluida esta digestión, el tejido se fragmentó manualmente con tijeras de disección. Posteriormente, los fragmentos de tejido se sometieron a una segunda incubación en el mismo medio en el que se había incubado con anterioridad durante 45 minutos a 37 °C con agitación de 250 rpm. Para detener la digestión enzimática, se adicionaron 2.5 mL de RPMI 10 % de SFB con EDTA 5 mM. Concluidas las digestiones, el tejido grueso fue separado mediante filtración por malla de nylon y la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g. El sobrenadante fue desechado y el botón celular se resuspendió en 2 mL de RPMI con desoxirribonucleasa I de páncreas bovino [0.125 μg/mL] en que se incubó en hielo durante 5 minutos. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos para posteriormente realizar la tinción con anticuerpos acoplados a fluorocromos.

Antes de comenzar con la tinción, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 400 x g para eliminar el RPMI y se lavaron con solución de lavados citometría de flujo (PBS al 2 % de SFB), se resuspendieron en 100 μL de PBS 1/500 con colorante fluorescente para determinación de viabilidad (Zombie-aqua®. Biolegend). Las células permanecieron en incubación 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. La tinción se detuvo agregando 400 μL de solución de lavados para citometría de flujo y centrifugando durante 5 minutos a 400 x g. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 μL de solución para lavados de citometría de flujo con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD45, anti-Ly-6G, anti-TCRγδ, anti-FcεRI (Biolegend); o biotinilados para el coctel de linaje: anti-CD11c, anti-TER-119, anti-CD19, anti-Siglec F, anti-B220 y, anti-NK 1.1 (eBioscience). Las muestras permanecieron en incubación a 4 °C durante 30 minutos protegidas de la luz luego de lo cual se lavaron adicionando a cada muestra

400 μL de solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo y centrifugando durante 5 minutos a 400 x g. El sobrenadante se desechó, se descompactó el botón celular y cada muestra se resuspendió en 300 μL de solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo. En el caso de los anticuerpos biotinilados, la tinción secundaria se realizó adicionando 100 μL de solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Biolegend), se realizó una incubación en la oscuridad a 4 °C durante 30 minutos, luego de lo cual, para lavar, se adicionaron 400 μL y se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g.

Las muestras se capturaron utilizando los citómetros Attune NxT Cytometer ® (Thermo Fisher), BD Influx ® (BD Biosciences) o Melody® (Beckman Coulter).

El análisis de las poblaciones celulares se realizó con el programa FlowJo® (Becton Dickinson & Company) versión 10.8.0 para Windows® Microsoft.

Para obtener los porcentajes de las diferentes poblaciones analizadas dentro de la región de las células hematopoyéticas CD45.2⁺, se multiplicaron las frecuencias relativas de la población en cada una de las regiones de interés definidas en el análisis secuencial. Y para expresarlo como porcentaje se multiplicó por 100.

$$\% (\text{población}) = \left[\prod_{i=1}^{n (\text{región de interés})} f_i (\text{región de interés}) \right] * 100$$

6.6. INMUNOFLUOROTINCIONES DE PIEL DE RATÓN

Transcurridas 12 horas después de haber realizado la infección subcutánea con cada una de las cepas de *A. baumannii*, se realizó eutanasia a ratones de la cepa C57BL/6. Se recuperó el fragmento de piel infectado y se fijó en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente la Unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular realizó el servicio de inclusión del tejido en parafina, la obtención de cortes transversales de 5 μm empleando un criostato Leica CM1900 ® (Leica Microsystems Nussloch GmbH) y el montaje de los mismos sobre portaobjetos electrocargados Superfrost Plus Yellow, Sigma Aldrich ®.

Para realizar la tinción, el tejido se sometió a desparafinización calentando las laminillas en una estufa a 70 °C durante 45 minutos. Para terminar de remover la parafina, se realizaron los siguientes lavados: un lavado de 5 minutos con xilol a 70 °C, un lavado de 5 minutos con xilol a temperatura ambiente, un lavado de 5 minutos con xilol:etanol 1:1 a temperatura ambiente, un lavado de 5 minutos con etanol al 100 % a temperatura ambiente, dos lavados de 5 minutos con etanol al 80 % a temperatura ambiente, un lavado de 5 minutos con etanol al 50 % a temperatura ambiente, y finalmente, un lavado de 5 minutos con agua a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizó el proceso de recuperación antigénica durante 20 minutos en solución amortiguadora de citratos (citrato de sodio 10 μM ; pH = 6) a 90 °C, luego de lo cual, se realizó un lavado durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente.

Los tejidos se permeabilizaron mediante su incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución amortiguadora de permeabilización (albúmina sérica bovina [10 mg/mL], suero de caballo [5 %], azida de sodio [0.02 %], tritón [0.5 %] en PBS).

La tinción con anticuerpos primarios se llevó a cabo incubando el tejido toda la noche a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos: anti-IL-17 de ratón policlonal hecho en conejo (Abcam), anti-Ly-6G/Ly6C (Gr-1) de ratón RB6-8C5 hecho en rata (Tonbo), anti-CD11b de ratón/humano M1/70 hecho en rata (Tonbo) o anti-CD4 de ratón GK1.5 hecho en rata (BD Pharmingen).

Se realizaron 4 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS a temperatura ambiente, luego de lo cual, se realizó la tinción con los anticuerpos secundarios anti-IgG (H+L) de conejo AlexaFluor® 488 RRID:AB_2313584 (Jackson ImmunoResearch Labs) y anti-IgG (H+L) de rata AlexaFluor® 594 RRID:AB_2340689 (Jackson ImmunoResearch Labs) incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 4 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizó una contratinción nuclear con Hoechst (Invitrogen) durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual, se realizó un lavado de 5 minutos con PBS. Las muestras se montaron empleando medio de montaje Vectashield® (Vector Laboratories) y las micrografías de las mismas se adquirieron en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, empleando un microscopio confocal Nikon A1. El análisis de las micrografías se realizó con el programa ImageJ (National Institutes of Health).

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para supervivencia se realizó empleando una prueba Mantel-Cox. El resto de los análisis estadísticos se realizó mediante la aplicación de la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas, seguida una prueba *post hoc* usando los métodos de Tukey o de Bonferroni. En cada prueba se consideró significancia estadística para valores con $p < 0.05$, donde * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism® versión 6.00 para Windows® Microsoft, GraphPad Software®, San Diego California.

6.8. RESUMEN GRÁFICO

El resumen gráfico fue realizado con ilustraciones elaboradas por BioRender.com (2020). Obtenido de <https://app.biorender.com/>

7. RESULTADOS

7.1. LA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DE IL-17 SE INDUCEN EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR *A. baumannii* A578

Para corroborar la inducción y participación de IL-17 en la resolución de la infección cutánea por *A. baumannii*, desarrollamos un modelo de infección en el que, considerando las grandes diferencias que han sido reportadas entre los genomas de las cepas de referencia en comparación con las cepas de circulación actual en el entorno hospitalario [92, 94], administramos vía subcutánea, *A. baumannii*, ya fuera de la cepa de referencia ATCC 17978, o A578 resistente a múltiples antibióticos, de reciente aislamiento de un paciente internado en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra” de la Ciudad de México.

Por experimentos realizados previamente en el laboratorio como parte de otro proyecto, se ha determinado que la dosis mínima letal vía intraperitoneal (i.p.) para cada las cepas de *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 es de 2×10^8 UFCs (Fig. 7). Para determinar la cantidad de bacteria a administrar vía subcutánea tomamos en cuenta que diferencias importantes han sido reportadas en cuanto a la letalidad de la misma cantidad de inóculo de una cepa de *A. baumannii* dependiendo de la vía de inoculación [264] y, adicionalmente, consideramos el volumen máximo permitido para una administración subcutánea [265, 266]. Tomando en cuenta estos aspectos, en el modelo empleado en este trabajo administramos, vía subcutánea, un inóculo de 2×10^9 UFCs de *A. baumannii* de las cepas ATCC 17978 o A578 en el dorso de ratones C56BL/6.

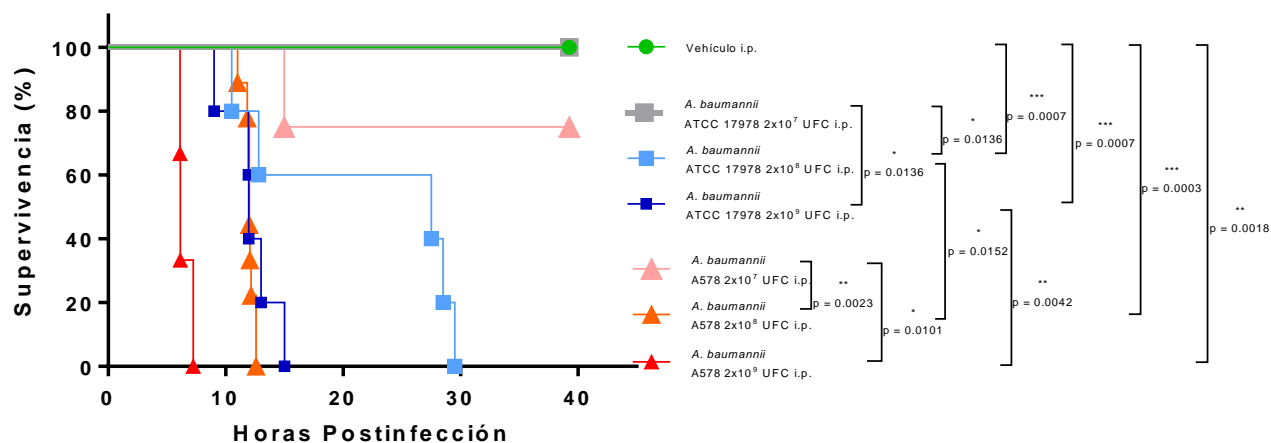


Figura 7. La infección intraperitoneal de ratones con 2×10^8 UFCs de *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 resulta letal dentro las primeras 30 horas postinfección. Ratones de la cepa C57BL/6 se infectaron intraperitonealmente con inóculos crecientes de *A. baumannii* ATCC 17978 o A578, luego de lo cual, se evaluó su supervivencia. Se muestran gráficas de supervivencia para ratones infectados con 2×10^7 (azul oscuro), 2×10^8 (azul claro) o 2×10^9 UFCs de *A. baumannii* ATCC 17978 y de ratones infectados con 2×10^7 (rosa), 2×10^8 (anaranjado) o 2×10^9 UFCs de *A. baumannii* A578. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. Supervivencia de ratones en 3 experimentos independientes, $n = 1-5$ ratones por grupo en cada experimento. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Prueba de Mantel-Cox.

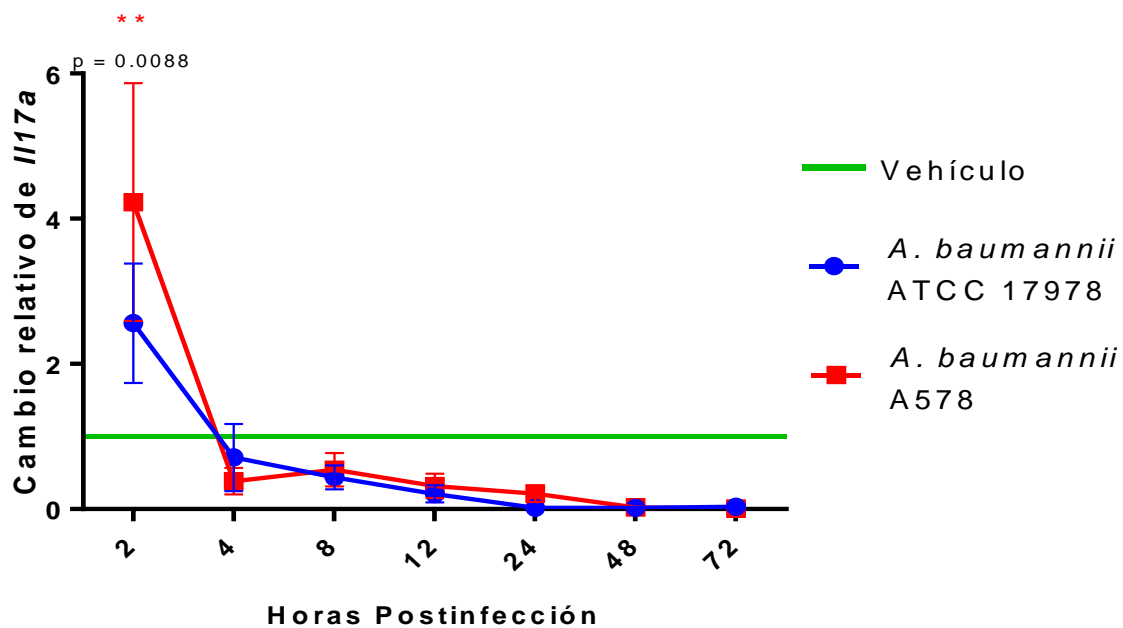
En primer lugar, para tratar de definir el papel de IL-17 en la infección por *A. baumannii*, evaluamos la transcripción del ARNm de *III7a* en el sitio de infección tras la inoculación con cada una de las cepas bacterianas a diferentes tiempos postinfección dentro de las primeras 72 horas. Nos enfocamos en este periodo de tiempo postinfección ya que trabajos previos han identificado que las respuestas inmediatas tras la infección (tan tempranas como 4 horas post infección), son cruciales para el control exitoso de *A. baumannii* [120, 267, 268].

Al analizar la cantidad relativa de ARNm de *III7a* en los grupos de ratones con diferentes tratamientos, encontramos que el único cambio estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de *III7a* tras la infección con *A. baumannii* dentro de las primeras 72 horas postinfección, en comparación con los niveles de *III7a* de ratones administrados con vehículo, se presentó en el dorso de ratones luego de 2 horas de haber sido inoculados con *A. baumannii* A578 (Fig. 8A). En estos ratones, la cantidad de ARNm de *III7a* se incrementó 4.23 ± 1.64 veces ($p = 0.0088$) respecto a la cantidad de ARNm de *III7a* en ratones que solo recibieron vehículo. A este mismo tiempo postinfección, logramos observar una tendencia al incremento (2.56 ± 0.82 veces) en la cantidad de ARNm de *III7a*, que no resulta ser estadísticamente significativa ($p > 0.999$), en ratones que fueron infectados con *A. baumannii* ATCC 17978, para los que el incremento en los niveles del ARNm de *III7a* fue de 2.56 veces respecto al grupo de ratones tratados únicamente con vehículo (Fig.8A).

Habiendo identificado la inducción estadísticamente significativa de la transcripción de *III7a* tras la infección por *A. baumannii* A578, cuantificamos los niveles de proteína de IL-17 a diferentes tiempos postinfección, tanto para ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 como A578 (Fig. 8B), encontrando un incremento estadísticamente significativo ($p = 0.0002$) en los niveles de proteína luego de 12 horas de infección en los ratones infectados con *A. baumannii* A578 (1463.71 ± 299.71 pg/g de tejido) en comparación con los niveles de proteína encontrados en los ratones que únicamente fueron administrados con vehículo (380.84 ± 33.86 pg/g de tejido); aunque luego de 24 horas postinfección, en los ratones de este grupo de tratamiento, los niveles de proteína de IL-17 volvieron a ser estadísticamente similares (871.25 ± 199.95 pg/g de tejido; $p = 0.6215$) a los de ratones administrados con vehículo, y pese a que a las 72 horas postinfección se observa nuevamente una tendencia al incremento en los niveles de proteína, este incremento no resultó estadísticamente significativo (1083.02 ± 262.62 pg/g de tejido; $p = 0.2128$) (Fig. 8B).

Por otro lado, la infección con la cepa de referencia, ATCC 17978, no mostró niveles de IL-17 incrementados significativamente con respecto al nivel basal, aunque muestra una tendencia a incrementar cerca de las 8 (887.40 ± 228.50 pg/g de tejido; $p = 0.568$) y las 12 horas postinfección (875.50 ± 181.80 pg/g de tejido; $p = 0.5952$). Esa tendencia al incremento termina a las 24 horas, en las que los niveles de la proteína regresan a ser indistinguibles del nivel encontrado en ratones administrados únicamente con vehículo. De manera similar a lo que se observa con la concentración de IL-17 en ratones infectados con la cepa A578, en los ratones infectados con la cepa ATCC 17978, a las 72 horas se observa una tendencia al incremento que no resulta significativa (618.52 ± 145.83 pg/g de tejido; $p > 0.999$) (Fig. 8B). Es probable que, a tiempos posteriores, este incremento pudiera ser significativo, pero habría que corroborarlo experimentalmente.

A.



B.

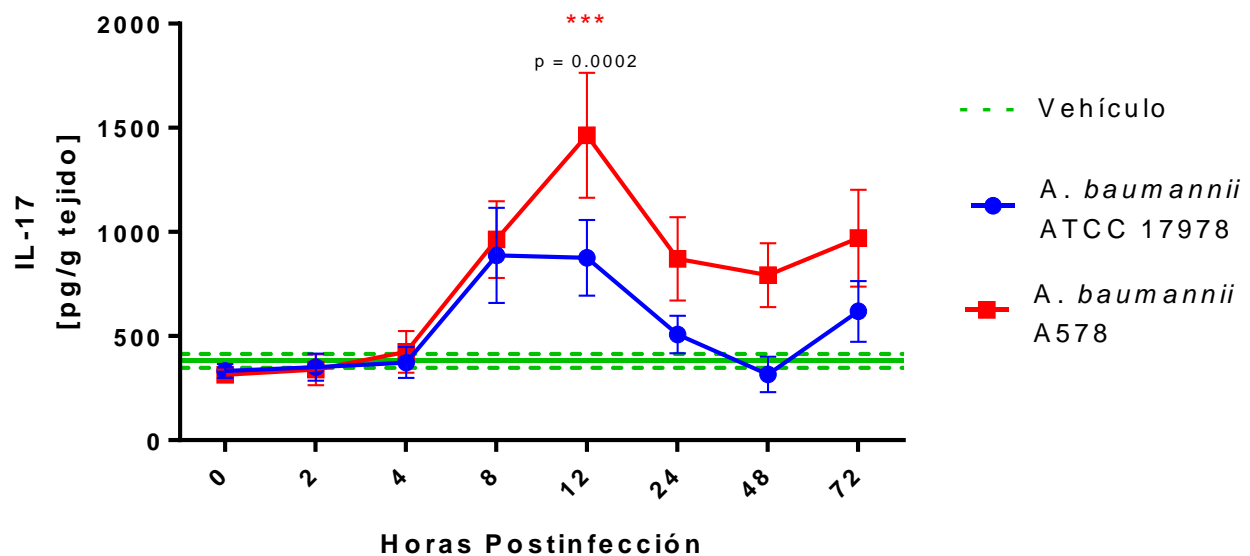


Figura 8. La infección subcutánea con *A. baumannii* A578 induce la transcripción y traducción de IL-17. A. Cinética de los niveles relativos del ARNm de *Il17a* en el área de infección de ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) respecto a ratones administrados únicamente con vehículo. B. Cinética de la proteína IL-17 en el sitio de infección de ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). Las gráficas muestran la media aritmética y el correspondiente error estándar de 3 experimentos independientes para cada tiempo, n = 2-3 ratones por grupo en cada experimento. ** = $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. Diferencias significativas respecto al vehículo. ANOVA y prueba *post hoc* de Bonferroni.

Se ha reportado que IL-17 tiene una elevada identidad con IL-17F perteneciente a la misma familia de citocinas [269, 270] y comparten algunas funciones [269, 271]. Por lo anterior, consideramos importante

determinar la inducción de la transcripción y cuantificar los niveles de proteína de IL-17F (Fig. 9). Al hacerlo, encontramos que luego de la infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 no hay un cambio estadísticamente significativo en la transcripción de *Il17f* dentro de las primeras 72 horas posteriores a la infección con ninguna de las dos cepas de *A. baumannii*. Sin embargo, en las primeras 2 horas tras la infección con cada una de las cepas bacterianas, se observa una tendencia, no significativa, al incremento en la cantidad del ARNm de *Il17f* de 12.35 ± 4.94 veces para los ratones infectados con la cepa ATCC 17978, y 24.00 ± 15.68 veces para ratones infectados con la cepa A578 (Fig. 9A).

En cuanto a los niveles de proteína de IL-17F, observamos que, dentro de las primeras 72 horas posteriores a la infección con cada una de las cepas de *A. baumannii*, la proteína se incrementa de forma estadísticamente significativa en el área subcutánea de infección, con cualquiera de las cepas bacterianas, luego de 8 horas, alcanzando concentraciones de 626.49 ± 71.38 pg/g de tejido para el grupo infectado con la cepa ATCC 17978 y de 557.83 ± 62.27 pg/g de tejido para el grupo infectado con la cepa A578 (Fig. 9B). Ambas concentraciones mostraron ser estadísticamente mayores ($p < 0.0001$, para cada concentración) en comparación con la cantidad de IL-17F presente en el tejido subcutáneo de ratones que solo recibieron vehículo (9.53 ± 9.33 pg/g de tejido) (Fig. 9B). Dichos niveles, permanecen elevados durante las primeras 72 horas posteriores a la infección, tanto para el grupo infectado con la cepa ATCC 17978 (763.10 ± 4.60 pg/g de tejido, $p < 0.0001$), como para el grupo infectado con la cepa A578 (751.18 ± 8.84 pg/g de tejido, $p < 0.0001$) (Fig. 9B).

Reportes previos han corroborado que la forma monomérica de IL-17 es capaz de heterodimerizarse con un monómero de IL-17F [272, 273] y señalar a través del receptor IL-17RA/IL-17RC [274], debido a esto, cuantificamos los niveles del heterodímero IL-17A/IL-17F a distintos tiempos postinfección durante las primeras 72 horas (Fig. 9C). Luego de 2, 4 y 72 horas de infección pudimos identificar un descenso estadísticamente significativo en la concentración de heterodímero en ratones que fueron infectados con la cepa A578 (309.74 ± 94.17 pg/g de tejido, $p = 0.0359$; 235.90 ± 54.39 pg/g de tejido, $p = 0.0203$ y 284.13 ± 73.96 pg/g de tejido, $p = 0.0259$, respectivamente), en comparación con la concentración del heterodímero en el grupo de ratones control administrados únicamente con vehículo (1312.17 ± 163.28 pg/g de tejido) (Fig. 9C). Mientras que para la concentración de IL-17A/IL-17F en el grupo infectado con la cepa ATCC 17978, solo tras 4 horas postinfección se observó una concentración estadísticamente menor del heterodímero (343.17 ± 91.22 pg/g de tejido, $p = 0.0460$) en comparación con la concentración del heterodímero en ratones administrados con vehículo (1312.17 ± 163.28 pg/g de tejido) (Fig. 9C).

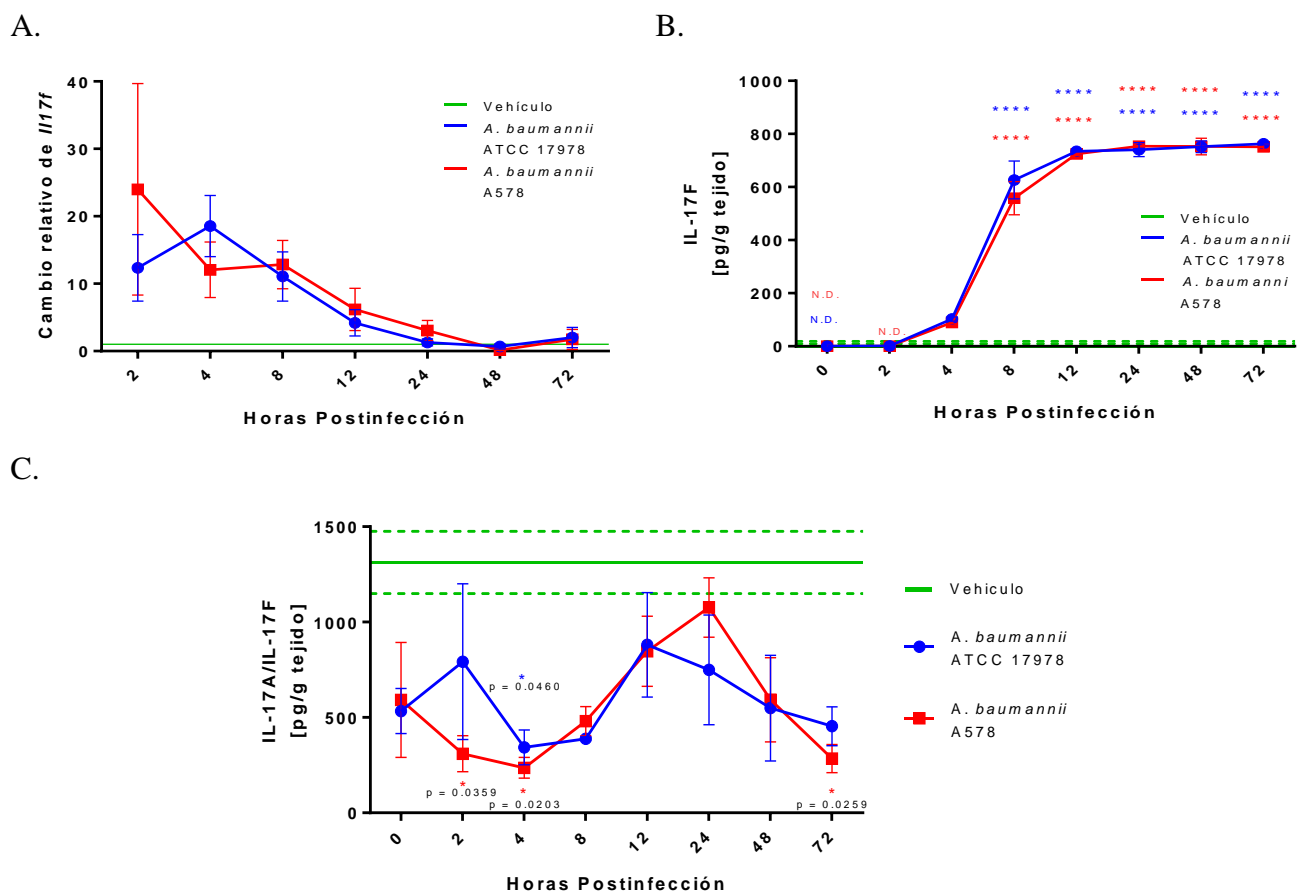
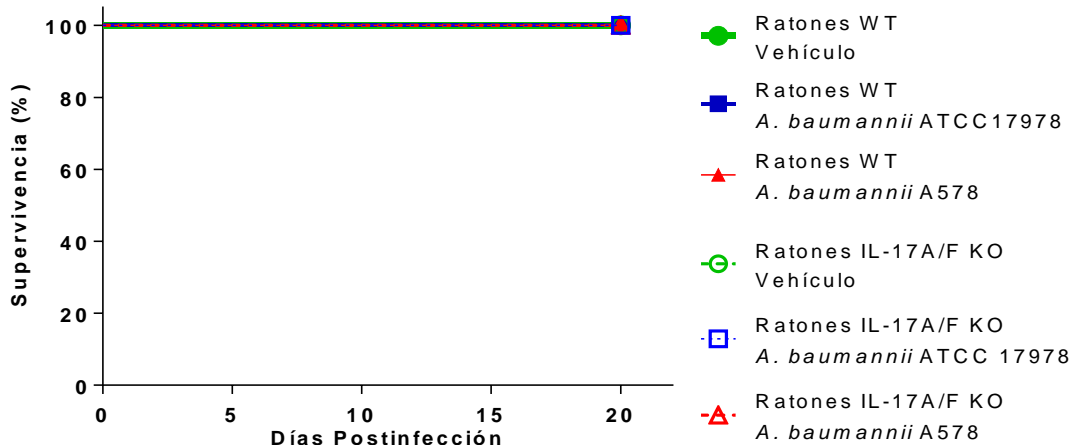


Figura 9. IL-17F se induce en respuesta a la infección subcutánea causada por *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. A. Cinética de los niveles relativos del ARNm de *Il17f* en el área de infección de ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) respecto a ratones administrados únicamente con vehículo (verde). B. Cinética de la proteína IL-17F en el sitio de infección de ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul), *A. baumannii* A578 (rojo) o que recibieron vehículo (verde). C. Cinética de la concentración del heterodímero proteico IL-17A/IL-17F en área subcutánea infectada con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul), *A. baumannii* A578 (rojo) o en el tejido subcutáneo en ratones tratados con vehículo (verde). Las gráficas muestran la media aritmética y el correspondiente error estándar de triplicados biológicos de un experimento en cada gráfica. N.D. = no detectado. n = 2-3 ratones por grupo en cada experimento. **** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$. ANOVA y prueba *post hoc* de Bonferroni.

7.2. IL-17 NO ES ESENCIAL PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR *A. baumannii*

Habiendo identificado una tendencia al incremento en IL-17 tras la infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 y un incremento estadísticamente significativo en la proteína luego de la infección con *A. baumannii* A578, evaluamos si la presencia de esta citocina es esencial para el control o la resolución de la infección subcutánea por estas cepas bacterianas. Para ello, ratones deficientes de IL-17 e IL-17F, B6.Cg-*Il17a/Il17f^{tm1.1Impr}Thy1a/J*, designados en este trabajo como IL-17A/F KO, fueron infectados vía subcutánea con 2×10^9 UFCs de cada una de las cepas bacterianas y posteriormente se evaluó la capacidad de estos ratones para sobrevivir a la infección (Fig. 10).

A.



B.

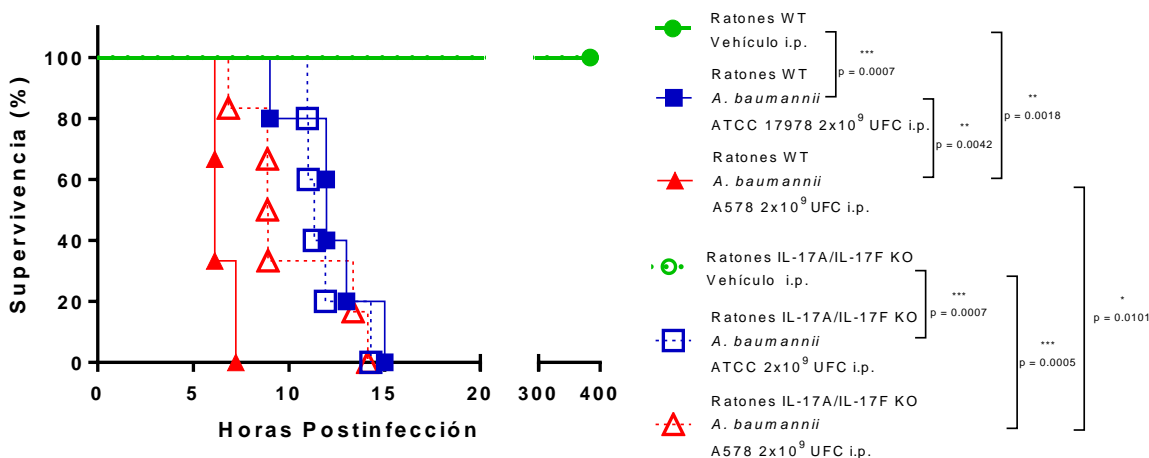


Figura 10. IL-17 no es esencial para el control de la infección subcutánea causada por *A. baumannii*. A. Supervivencia de ratones WT (líneas continuas) e IL-17A/F KO (líneas punteadas) infectados subcutáneamente con 2x10⁹ UFC de *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) o administrados con vehículo (verde). B. Supervivencia de ratones WT (líneas continuas) e IL-17A/F KO (líneas punteadas) infectados vía intraperitoneal (i.p.) con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) o administrados con vehículo (verde). Supervivencia de ratones en 3 experimentos independientes, n = 2-5 ratones por grupo. * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** p < 0.001. Prueba de Mantel-Cox.

El total de ratones infectados subcutáneamente con 2x10⁹ UFCs de *A. baumannii* ATCC 17978 o A578, independientemente de si éstos fueron silvestres (WT) o IL17A/F KO, sobrevivieron al menos 16 días después de haber sido infectados (Fig. 10A), pese a que ambas cepas bacterianas son patogénicas y el inóculo administrado de cada una de ellas puede ser letal si se modifica la vía de administración (Figs. 7, 10B), pues al administrar 2x10⁹ UFCs de *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 vía intraperitoneal, todos los ratones murieron dentro de las primeras 15 horas post infección. Sin embargo, es importante destacar que hay diferencia estadísticamente significativa (p = 0.0042) en la supervivencia de ratones WT infectados con la cepa A578, para los que el 100 % estaba muerto luego de 7.23 horas de haber sido infectados, mientras ratones también WT, pero infectados con la cepa ATCC 17987, murieron en su totalidad hasta 15.00 horas después de haber sido infectados. También encontramos diferencia estadística (p = 0.0101) en la supervivencia de ratones IL-17 WT e IL-17A/F KO infectados con la cepa A578, los que murieron en su totalidad luego de 7.23 y 14.20 horas, respectivamente, de haber sido infectados. El

hecho de que ninguno de los ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* murió en el tiempo en el que monitoreamos la supervivencia, sugiere que IL-17 e IL-17F no son esenciales para el control de la infección subcutánea, sin embargo, hasta este punto, no podemos descartar que estas citocinas favorezcan una pronta o absoluta resolución de la infección.

7.3. DURANTE LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA CAUSADA POR LA CEPA A578 DE *A. baumannii* SE GENERA UNA LESIÓN DE MENOR TAMAÑO EN AUSENCIA DE IL-17

Una vez que descartamos que IL-17 e IL-17F fueran esenciales para el control de la infección subcutánea por *A. baumannii*, evaluamos el peso de los ratones infectados (Fig. 11A-B, Fig. Supl. 1A-B) y el tamaño de la lesión (Fig. 11C-D, Figs. Supl. 1C-E) provocada por *A. baumannii*, como indicadores de la severidad de la infección [275=277].

Los ratones WT e IL-17A/F KO infectados con *A. baumannii* ATCC 17978, mostraron una pérdida de peso significativa respecto al grupo de ratones control correspondiente —WT o IL-17A/F KO— durante los tres primeros días postinfección (Fig. 11A). Los porcentajes de peso correspondientes a los ratones WT infectados con la cepa bacteriana ATCC 17978 que mostraron diferencias fueron $91.42 \pm 0.42 \%$, $p < 0.0001$ luego de un día; $92.02 \pm 0.58 \%$, $p < 0.0001$ luego de dos días y $94.94 \pm 0.67 \%$, $p = 0.0001$ después de tres días de infección; esto respecto al grupo de ratones WT administrados únicamente con vehículo, cuyos porcentajes de peso corporal promedio fue de $98.39 \pm 0.34 \%$ al día posterior a la administración del vehículo, de $99.01 \pm 0.50 \%$ a los dos días y de $100.96 \pm 0.92 \%$ luego de tres días de la administración (Fig. 11A). Mientras para los ratones IL-17A/F KO infectados con *A. baumannii* ATCC 17978, los porcentajes de peso corporal que alcanzaron diferencia fueron $93.27 \pm 0.54 \%$, $p < 0.0001$ después de un día, $93.50 \pm 0.83 \%$, $p < 0.0001$ luego de dos días y $95.30 \pm 0.63 \%$, $p = 0.0063$ luego de tres días de haberse realizado la infección, lo anterior en comparación con los porcentajes registrados para el grupo de ratones IL-17A/F KO control que recibió solo vehículo y cuyos porcentajes de peso promedio fueron de $100.06 \pm 1.79 \%$, $100.73 \pm 1.75 \%$ y $100.57 \pm 1.90 \%$, luego de uno, dos y tres días posteriores a la administración del vehículo, respectivamente (Fig. 11A). Es muy importante señalar que, dentro del periodo en el que se realizó el registro del peso corporal, los porcentajes de peso de ambos grupos de ratones —WT e IL-17A/F KO—, infectados con la cepa ATCC 17978 no mostraron diferencia estadística entre ellos (Fig. 11A).

En cuanto a la infección por la cepa A578, los ratones WT mostraron una pérdida de peso significativa durante los cuatro primeros días postinfección respecto al grupo de ratones WT administrados únicamente con el vehículo, siendo los valores de dichos porcentajes de $89.86 \pm 1.16 \%$, $p < 0.0001$ luego de dos días de haber llevado a cabo la infección y de $94.15 \pm 0.95 \%$, $p < 0.0001$ luego de tres días de la infección con *A. baumannii* A578; en comparación con el porcentaje corporal del grupo de ratones WT que recibieron vehículo cuyo porcentaje de peso corporal promedio fue de $98.39 \pm 0.34 \%$ al día posterior a la administración del vehículo, de $99.01 \pm 0.50 \%$ a los dos días y de $100.96 \pm 0.92 \%$ luego de tres días posteriores a la administración (Fig. 11B). Sin embargo, en el caso de ratones IL-17A/F KO infectados con la cepa bacteriana A578, pese a no mostrar diferencia significativa en el cambio de peso corporal en comparación con los ratones WT infectados con esta misma cepa bacteriana durante el periodo de tiempo evaluado (Fig. 11B), la pérdida de peso corporal en comparación con el grupo control

de ratones IL-17A/F KO, administrados solamente con vehículo, fue estadísticamente distinta durante 5 días postinfección. Los porcentajes de peso corporal de ratones IL-17A/F KO infectados con *A. baumannii* A578 que alcanzaron disminución estadísticamente significativa fueron $90.09 \pm 0.47 \%$, $p < 0.0001$ luego de un día postinfección; $90.79 \pm 0.49 \%$, $p < 0.0001$, después de dos días; $92.46 \pm 0.37 \%$, $p < 0.0001$ al día tres postinfección; $95.40 \pm 0.476 \%$, $p = 0.0437$ al cuarto día y $95.81 \pm 0.59 \%$, $p = 0.0209$ tras cinco días postinfección, en comparación con el ratones IL-17A/F KO que recibieron solo vehículo, cuyos porcentajes de peso corporal a los días cuatro y cinco postinfección fueron, respectivamente de $99.62 \pm 1.85 \%$ y $100.41 \pm 1.90 \%$ (Fig. 11B). De forma similar a lo observado para los ratones infectados con la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii*, en el caso de los ratones infectados con la cepa A578, tampoco se observó diferencia estadística entre los pesos corporales que se registraron para las cepas de ratones WT e IL-17A/F KO (Fig. 11B).

Al analizar estos mismos datos de porcentaje de peso corporal tras la infección, comparando la pérdida de peso registrada en una misma cepa de ratones infectados con diferentes cepas bacterianas (Fig. Supl. 1A-B), también puede visualizarse que solo los ratones IL-17A/F KO infectados con la cepa A578 tardan un mayor tiempo en recuperar un porcentaje de peso corporal similar al de los ratones IL-17A/F KO del grupo control que solo recibieron vehículo, hecho que se presenta hasta el día seis postinfección, en el que el porcentaje de peso corporal para los ratones infectados fue de $96.71 \pm 0.58 \%$, mientras que para los ratones administrados con vehículo fue de $99.93 \pm 1.86 \%$ (Fig. Supl. 1B).

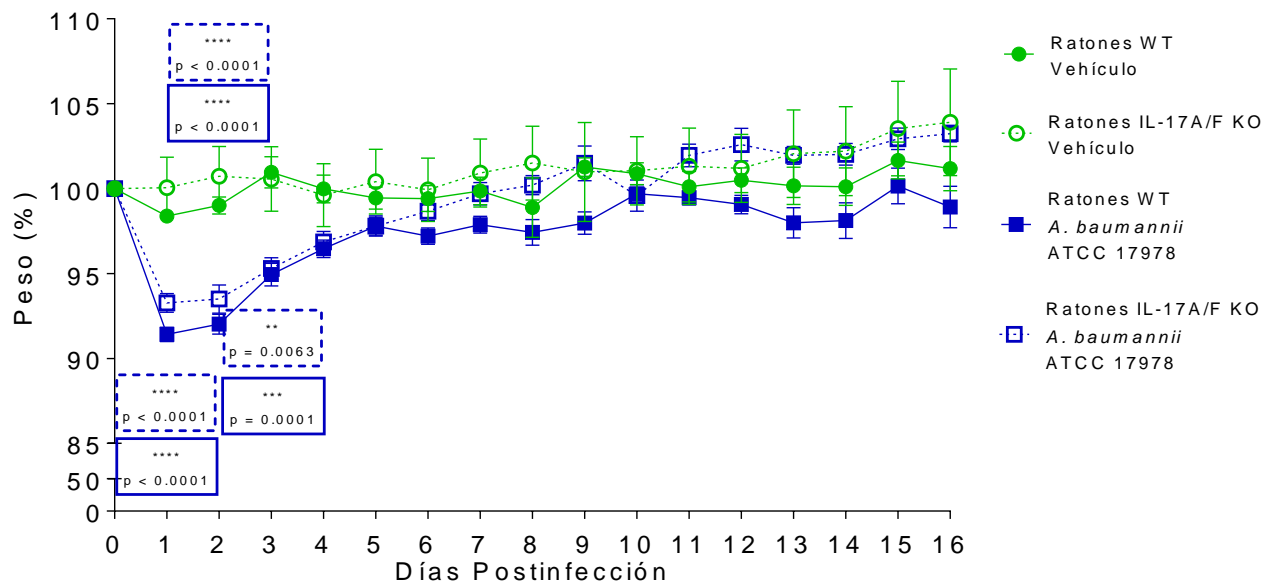
Lo anterior sugiere que la patología asociada a la infección subcutánea por *A. baumannii* A578 es más severa en ratones deficientes de IL-17 e IL-17F.

Es importante destacar que, a ningún tiempo evaluado hubo diferencia estadística en el porcentaje de peso corporal en ratones WT e IL-17A/F KO infectados con la misma cepa bacteriana (Fig. 11A-B), ni al comparar ratones de una misma cepa infectados con cepas bacterianas distintas (Fig. Supl. 1A-B).

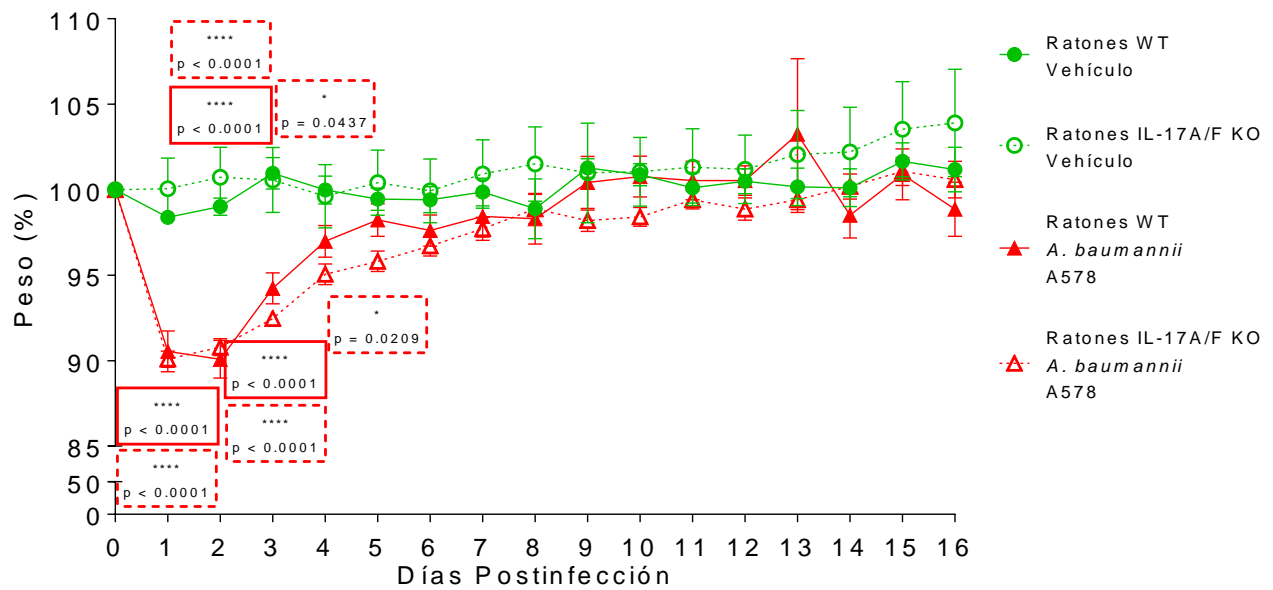
Un enfoque distinto que empleamos para comparar la severidad de la patología de la infección subcutánea entre ratones IL-17A/F KO y ratones WT, fue el evaluar el tamaño de la lesión como otro marcador de la severidad de la infección tanto en ratones infectados con *A. baumannii* ATCC 17978 como A578 (Fig. 11C-E, Fig. Supl. 1C-E).

Tras realizar la infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 pudimos observar que el tamaño de la lesión que se generó en ratones WT fue comparable con el tamaño de la lesión que mostraron los ratones IL-17A/F KO tras la infección con esta misma cepa bacteriana durante los siguientes 16 días posteriores a la infección (Fig. 11D). Sin embargo, al comparar el tamaño de la lesión observada en cada uno de los grupos de ratones —WT o IL-17A/F KO— luego de la infección con *A. baumannii* ATCC 17978 contra el tejido de ratones administrados únicamente con vehículo, pudimos identificar algunas diferencias en cuanto a la evolución del tamaño de la lesión generada en cada cepa de ratones (Fig. 11D). Para los ratones WT infectados con la cepa ATCC 17978 la lesión dejó de ser estadísticamente mayor en comparación con el tejido de los ratones WT administrados únicamente con vehículo a los 11 días postinfección (Fig. 11D), mientras que para los ratones IL-17A/F KO infectados también con la cepa ATCC 17978, la lesión se mantuvo por mayor tiempo, dejando de ser significativamente más distinta en comparación con el tejido de ratones IL-17A/F KO administrados con vehículo hasta los 14 días postinfección (Fig. 11E).




A.

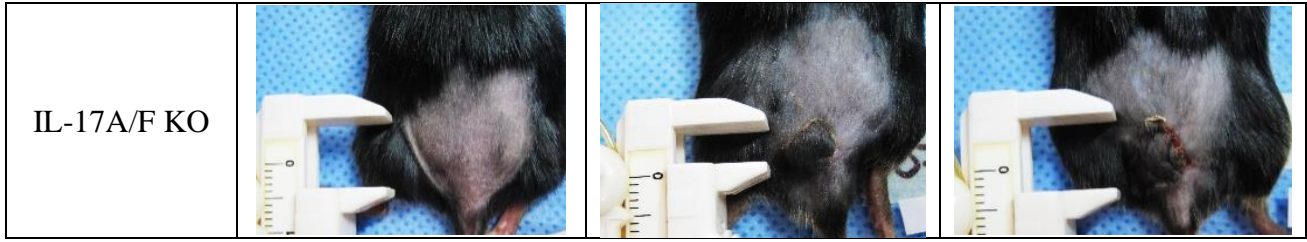


B.

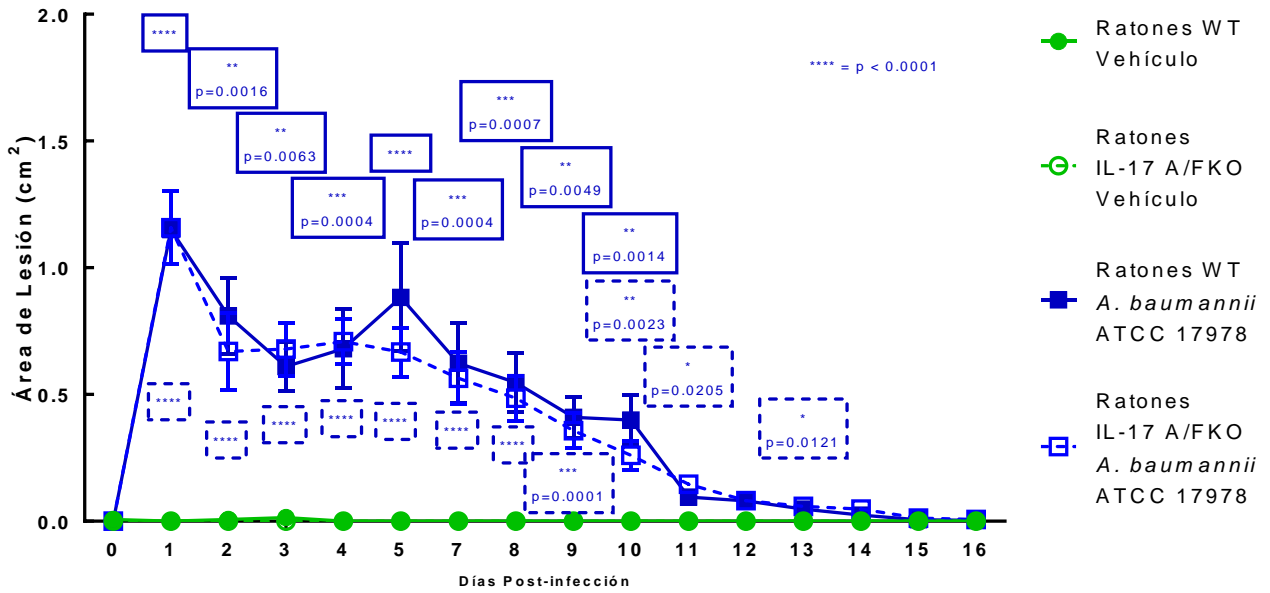


C.

Genotipo murino	Tratamiento subcutáneo		
	Vehículo	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>A. baumannii</i> A578
WT			



D.



E.

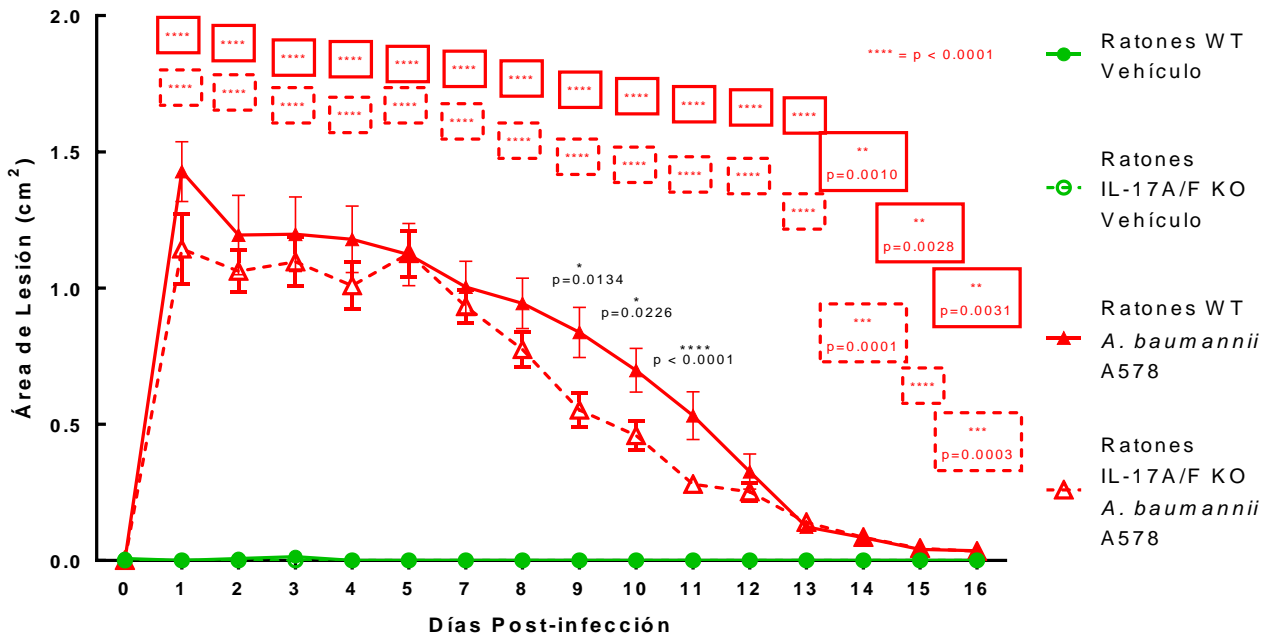


Figura 11. La patología durante la infección subcutánea por *A. baumannii* A578 menos severa en ausencia de IL-17 en *A. baumannii* A578. Cinética del porcentaje de peso corporal de ratones WT (línea azul continua) o IL-17A/F KO (línea azul punteada) tras la

infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 y de ratones WT (línea verde continua) o IL-17A/F KO (línea verde punteada) administrados con vehículo. B. Porcentaje de peso corporal de ratones WT (línea roja continua) o IL-17A/F KO (línea roja punteada) tras la infección subcutánea con *A. baumannii* A578 y de ratones WT (línea verde continua) o IL-17A/F KO (línea verde punteada) administrados con vehículo. C. Fotografías representativas de la lesión desarrollada por ratones WT e IL-17A/F KO 10 días después de haber sido infectados con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. D. Cinética del tamaño de la lesión desarrollada en el área de infección por ratones WT (línea azul continua) o IL-17A/F KO (línea azul punteada) tras la infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 y de ratones WT (línea verde continua) o IL-17A/F KO (línea verde punteada) administrados con vehículo. E. Tamaño de la lesión desarrollada en el área de infección WT (línea roja continua) o IL-17A/F KO (línea roja punteada) tras la infección subcutánea con *A. baumannii* A578 y de ratones WT (línea verde continua) o IL-17A/F KO (línea verde punteada) administrados con vehículo. A-B, D-E Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes, cada uno con $n = 3-7$ ratones por grupo. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. * = ratones WT vs. IL-17A/F KO, $\boxed{*}$ = ratones WT infectados vs. ratones WT vehículo, $\boxed{**}$ = ratones IL-17A/F KO infectados vs. ratones IL-17A/F KO vehículo, * = ratones WT vs ratones IL-17A/F KO ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

En cuanto a los grupos de ratones infectados con la cepa A578 de *A. baumannii*, observamos que los ratones WT infectados con la cepa A578 desarrollaron una lesión significativamente más grande en los días 9 ($0.837 \pm 0.092 \text{ cm}^2$; $p = 0.0134$), 10 ($0.698 \pm 0.080 \text{ cm}^2$; $p = 0.0226$) y 11 (0.532 ± 0.088 ; $p < 0.0001$) postinfección, en comparación con la lesión que desarrollaron los ratones IL-17A/F KO luego de la infección con esa cepa bacteriana (0.552 ± 0.061 ; 0.459 ± 0.053 ; y $0.028 \pm 0.026 \text{ cm}^2$, respectivamente). Por otro lado, al comparar la lesión que se produjo como consecuencia de la infección por *A. baumannii* A578, tanto en ratones WT como en ratones IL-17A/F KO con sus respectivos controles —ratones WT o ratones IL-17A/F KO administrados con vehículo— (Fig. 11E), a diferencia de lo observado durante la infección por la cepa ATCC 17978 (Fig. 11D), las lesiones en ambos grupos de ratones mostraron ser significativamente mayores durante los 16 días que fueron sometidas a medición (Fig. 11E), lo que sugiere que el cierre de herida en los ratones deficientes de IL-17 e IL-17F infectados con la cepa ATCC 17978, es un proceso que requiere de mayor tiempo para llevarse a cabo.

Estos mismos datos del tamaño de la lesión fueron analizados comparando el tamaño de éstas en una misma cepa de ratones, ya fueran WT o IL-17A/F KO, infectados con cada una de las distintas cepas bacterianas (Fig. Supl. 1), observando que, en algunos de los tiempos a los que se evaluó el tamaño de la herida, para una misma cepa de ratones, la lesión generada tras la infección con la cepa A578, fue estadísticamente mayor, en comparación con la herida provocada por la cepa ATCC 17978 (Fig. Supl. 1 significancia marcada en color negro), lo que, de forma similar a los resultados del cambio en el peso corporal de los ratones tras la infección, que la cepa A578 de *A. baumannii*, sugiere que esta cepa bacteriana provoca una patología más severa.

7.4. LA AUSENCIA DE IL-17 RETARDA LA RESOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR LA CEPA A578 DE *A. baumannii*

Considerando que el tamaño de la herida producida durante la infección subcutánea fue distinto tras la infección con cada una de las cepas bacterianas, quisimos determinar si la cinética de la resolución de la infección también difería para la infección causada por cada una de las cepas bacterianas y tratamos de identificar la contribución de IL-17 al proceso de la resolución de la infección. Para ello, cuantificamos la carga bacteriana a diferentes tiempos postinfección en distintos órganos de ratones WT o IL-17A/F KO (Figs. 12-15).

Al cuantificar la carga bacteriana luego de 4 y 24, horas, 6, 8 12, 14, 16, 18, 20 o 22 días postinfección (Fig. 12), no logramos identificar diferencia estadísticamente significativa en el número de UFCs recuperadas del área del dorso infectada en ratones WT inoculados con *A. baumannii* ATCC 17978 o *A. baumannii* A578. Para el día 22 postinfección, ratones WT habían resuelto completamente la infección, independientemente de si habían sido infectados con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. Esto sugiere que la resolución de la infección subcutánea por la cepa ATCC 17978 se lleva a cabo en un tiempo similar al de la infección subcutánea ocasionada por la cepa A578 en ratones WT.

Adicionalmente, no se identificó presencia de bacteria en órganos internos de los ratones WT infectados subcutáneamente ni con la cepa ATCC 17978 ni A578 y estos valores no mostraron diferencia estadística en comparación con ratones administrados únicamente con vehículo (Fig. 13). Esto indica que la infección subcutánea con cada una de las cepas empleadas en este trabajo permanece localizada en el tejido subcutáneo ya que con los resultados generados al momento indican que no hay una diseminación estadísticamente significativa a sangre o a bazo.

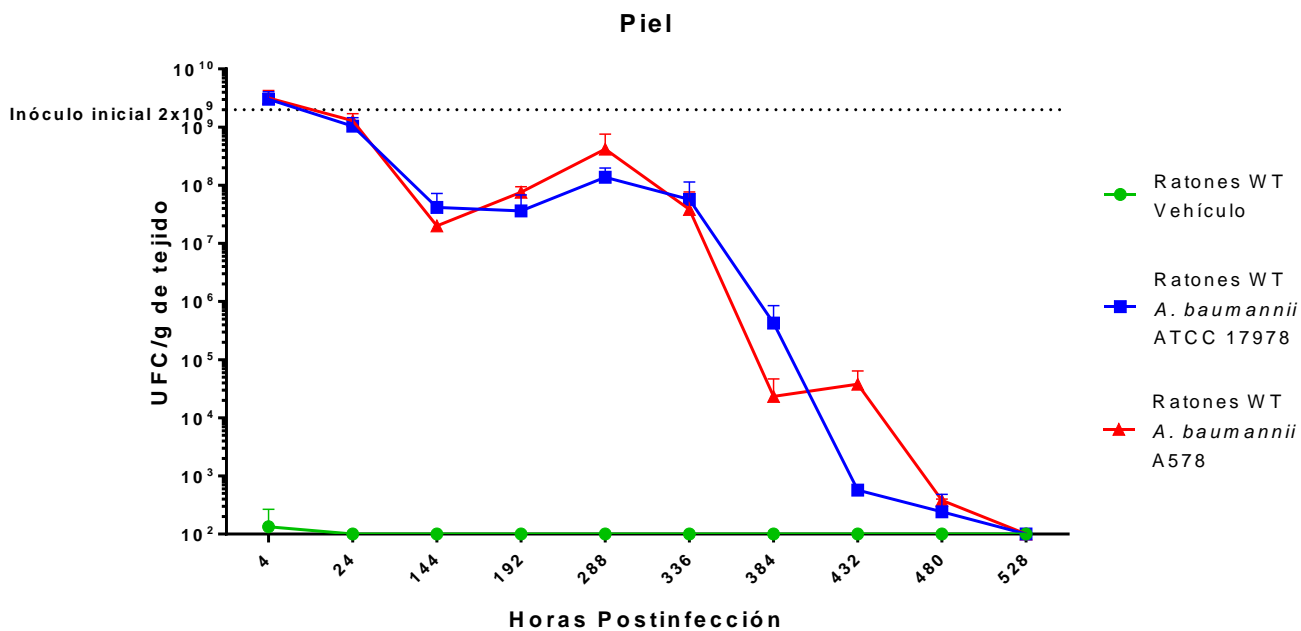


Figura 12. La resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 tiene una cinética similar la resolución de la infección subcutánea causada por la cepa A578. Unidades formadoras de colonia (UFCs) bacterianas recuperadas a distintos tiempos postinfección del dorso de ratones WT infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). La línea punteada señala el inóculo inicial con el que fueron infectados los ratones (2×10^9 UFCs). Media aritmética y error estándar de 11 experimentos independientes, con grupos de $n = 1-3$ cada uno. No se encontró diferencia significativa en la carga bacteriana entre diferentes cepas. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

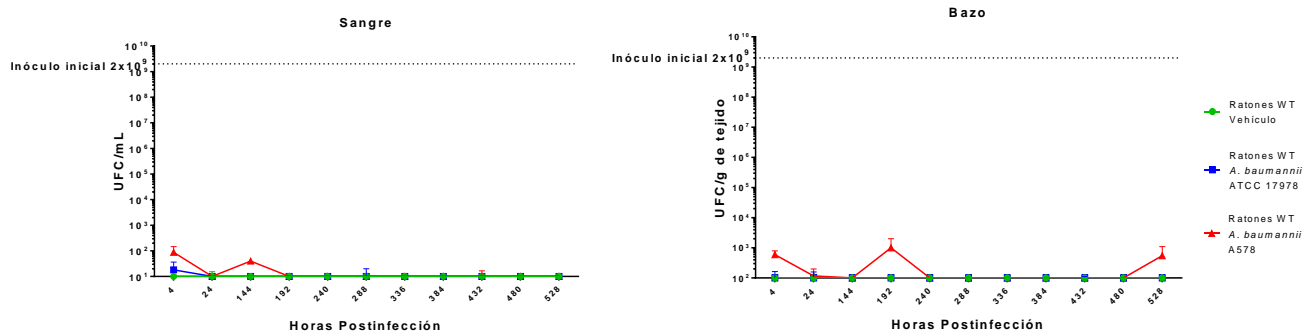


Figura 13. No hay diseminación bacteriana significativa a sangre o bazo tras la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. Unidades formadoras de colonia (UFCs) bacterianas recuperadas a distintos tiempos postinfección de sangre y bazo de ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). La línea punteada señala el inóculo inicial con el que fueron infectados los ratones (2×10^9 UFCs). Media aritmética y error estándar de 13 experimentos independientes, con grupos de $n = 1-3$ cada uno. No se encontró diferencia estadística. ANOVA y prueba *post hoc* de Bonferroni.

Para tratar de dilucidar la contribución de IL-17 a la resolución de la infección, conocer si la cinética de la resolución de la infección subcutánea en ausencia de IL-17 ocurre de manera similar a como se presenta en ratones WT y si la resolución de la infección se lleva a cabo al mismo tiempo en ausencia o presencia de esta citocina, realizamos la infección con cada una de las cepas bacterianas en ratones IL-17A/F KO y hemos cuantificado la carga bacteriana a algunos tiempos postinfección.

De momento, hemos encontrado que a los días 16 y 20 postinfección, los ratones IL-17A/F KO, deficientes de IL-17 e IL-17F, infectados subcutáneamente con la cepa A578 muestran una tendencia a presentar una carga bacteriana mayor en comparación con el resto de los grupos evaluados, esto es, tanto en comparación con ratones WT infectados con la misma cepa bacteriana A578, como en comparación con ratones WT e IL-17A/F KO infectados con *A. baumannii* ATCC 17978 (Fig. 14). Es importante destacar que al día 20 postinfección, la carga bacteriana recuperada del dorso de ratones IL-17A/F KO infectados con la cepa A578 es significativamente mayor en comparación con ratones sin infectar (Fig. 14).

De forma interesante, pese a que ratones IL-17A/F KO tardan más tiempo en resolver la infección subcutánea, al menos la causada por la cepa A578, éstos son capaces de mantener la infección localizada, pues al cuantificar la carga bacteriana en otros órganos del ratón, no logramos recuperar bacteria (Fig. 15).

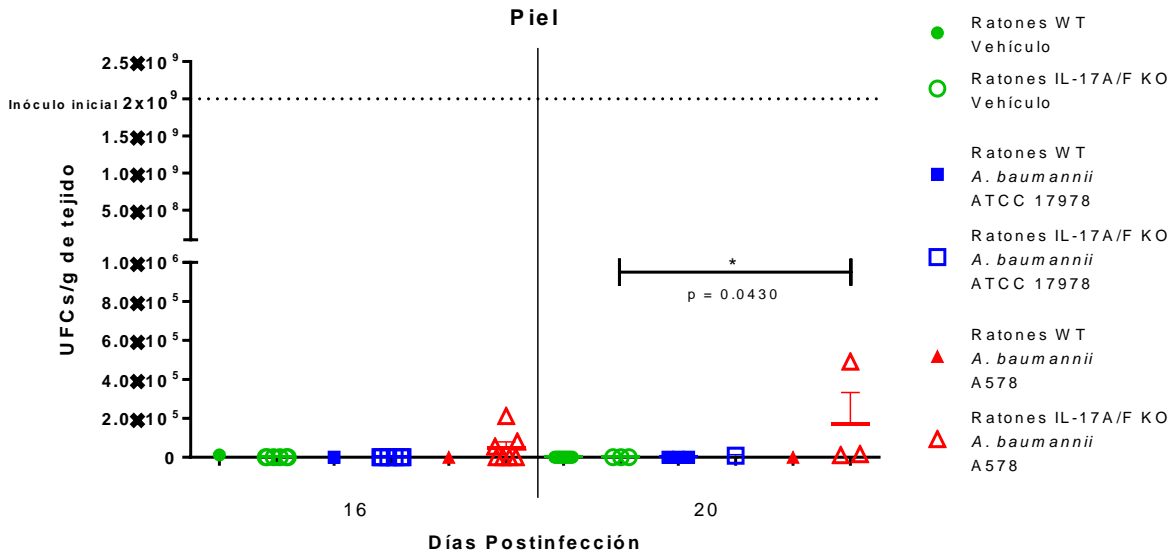


Figura 14. IL-17 y/o IL-17F contribuyen a la pronta resolución de la infección subcutánea causada por *A. baumannii* A578. Unidades formadoras de colonia (UFCs) bacterianas recuperadas de piel de ratones WT (símbolos rellenos) o IL-17A/F KO (símbolos vacíos) infectados subcutáneamente durante 16 o 20 días con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes con grupos de ratones n = 1-4 cada uno. * = p < 0.05. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

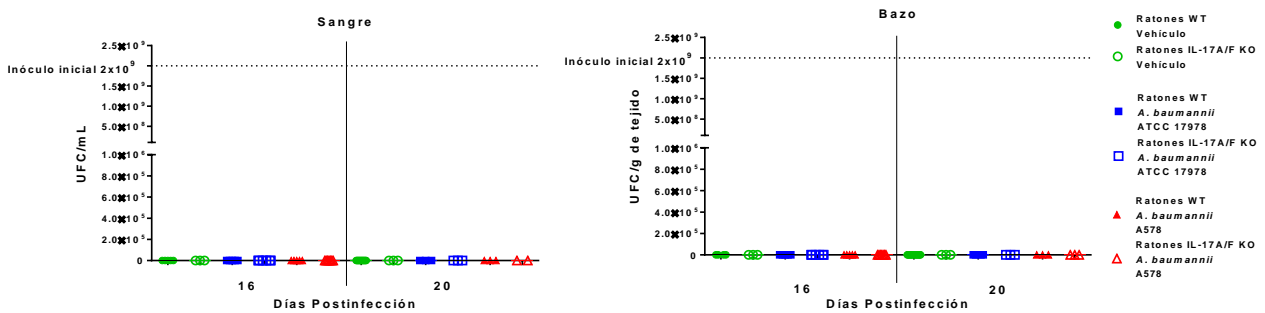


Figura 15. IL-17 ni IL-17F participan en el control de la diseminación de la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 ni A578. Unidades formadoras de colonia (UFCs) bacterianas recuperadas a distintos tiempos postinfección de sangre y bazo de ratones WT (símbolos rellenos) o IL-17A/F KO (símbolos vacíos) infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). La línea punteada señala el inóculo inicial con el que fueron infectados los ratones (2x10⁹ UFCs). Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes con grupos de ratones n = 1-4 cada uno. No se encontró diferencia estadística. ANOVA y prueba *post hoc* de Bonferroni

7.5. NEUTRÓFILOS, LINFOCITOS T CD8⁺ Y CÉLULAS TCR $\gamma\delta$ PRODUCEN IL-17 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR *A. baumannii* ATCC 17978, MIENTRAS QUE LINFOCITOS TCR $\alpha\beta$ ⁺ CONTRIBUYEN A LA PRODUCCIÓN DE IL-17 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *A. baumannii* A578

Tomando en cuenta que la infección subcutánea por *A. baumannii* A578 induce la transcripción (Fig. 8A) y traducción de IL-17 (Fig. 8B) y que la ausencia de esta citocina impacta negativamente en el tiempo de resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* A578 (Fig. 14), consideramos importante identificar la fuente celular responsable de esta producción temprana de IL-17, que previamente habíamos observado tras la infección con *A. baumannii* (Fig. 8B). Para ello, tras realizar la infección subcutánea con cada una de las cepas bacterianas en ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen}/J reporteros para la expresión de *Il17a*, en los que eGFP está regulada por el promotor de *Il17a* [262], analizamos mediante citometría de flujo, siguiendo las estrategias de análisis mostradas en las figuras suplementarias 2-4, diversas poblaciones celulares presentes en piel (Figs. 16-18), bazo DLNs y NDLN (Figs. Supl. 5-7).

El objeto de este trabajo se centra en evaluar la importancia de la participación de IL-17 que se produce durante, la infección subcutánea aguda por *A. baumannii*, en la resolución de dicha infección, y es por ello que la producción de IL-17 y sus posibles fuentes celulares se analizaron dentro de los 3 primeros días postinfección, aunque la presencia de la bacteria se haya evaluado varios días después, puesto que la carga bacteriana a estos tiempos, bien podría estar influenciada por la producción temprana de IL-17.

Considerando nuestro interés en la participación de IL-17 producida en la etapa aguda de la infección a la resolución de la misma, el análisis de poblaciones celulares se realizó luego de 4 (Fig. 16 y Fig. Supl. 5), 12 (Fig. 17 y Fig. Supl. 6) y 24 (Fig. 18 y Fig. Supl. 7) horas postinfección para tratar de identificar las poblaciones celulares responsables de la producción de IL-17 en el sitio de infección en cada uno de estos diferentes tiempos y ya que, diversas poblaciones celulares han sido identificadas como productoras de IL-17 en la piel en diferentes condiciones [210, 216, 223], analizamos diversos marcadores de superficie para identificar diferentes poblaciones celulares. Sin embargo, el uso de un panel de anticuerpos acoplados a fluorocromos que permitan realizar un análisis preciso de múltiples poblaciones llega a ser complicado [278], sobre todo en muestras provenientes de tejidos complejos y ricos en compuestos altamente fluorescentes como la piel [279, 280], así que tratamos de establecer un panel de anticuerpos acoplados a fluorocromos que nos permitiera el análisis del mayor número de poblaciones celulares potencialmente productoras para IL-17, aunque como consecuencia de ello, la estrategia de análisis a diferentes tiempos postinfección fue diferente (Figs. Supl. 2-4) y para cada tiempo analizamos diferentes marcadores de superficie (Figs. 16-18), pero siempre considerando el análisis de las poblaciones celulares que se han reportado como principales productoras de IL-17 en la piel, como linfocitos TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺ [281], TCR $\gamma\delta$ ⁺ [282], TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ [283] y, en algunos casos, ILC3s [284, 285], caracterizadas por carecer de la expresión de marcadores de linaje [273] e incluso realizamos el análisis de la producción de IL-17 en poblaciones celulares que clásicamente no son considerados como productores de IL-17, como los neutrófilos [210].

Para los diferentes tiempos postinfección a los que se analizaron las poblaciones celulares, se identificaron los eventos positivos para IL-17 entre el total de células hematopoyéticas (CD45.2⁺) recuperadas de la piel (Figs. 16-18), así como de bazo y ganglios (Figs. Supl. 5-7).

Luego de 4 horas postinfección, las poblaciones celulares analizadas para identificar su posible contribución a la producción de IL-17 en respuesta a la infección fueron linfocitos TCR β^+ CD4 $^+$, TCR β^+ CD8 $^+$, TCR $\gamma\delta^+$, y neutrófilos (Ly6G $^+$ CD11b $^+$) (Fig. 16).

Decidimos estudiar la posible contribución a la producción de IL-17 por linfocitos TCR $\alpha\beta$, aunque 4 horas postinfección es un tiempo corto considerando que, en previos reportes, la producción de IL-17 por linfocitos T CD4 $^+$ o CD8 $^+$ en la piel se ha detectado días después de haber ocurrido el insulto antigénico ya que la inducción de la citocina es antígeno-específica y este tipo de respuesta requiere de algunos días para llevarse a cabo [222, 287]. Sin embargo, aunque no en piel, en tejidos como los pulmones y la mucosa oral se han identificado poblaciones de linfocitos T CD4 $^+$, denominados Th17 naturales (nTh17), capaces producir IL-17 horas después de un encuentro primario con el antígeno [288, 289], de forma que en nuestro modelo de infección consideramos importante analizar poblaciones TCR β^+ pese a que el mayor tiempo postinfección al que analizamos las poblaciones fueron 24 horas.

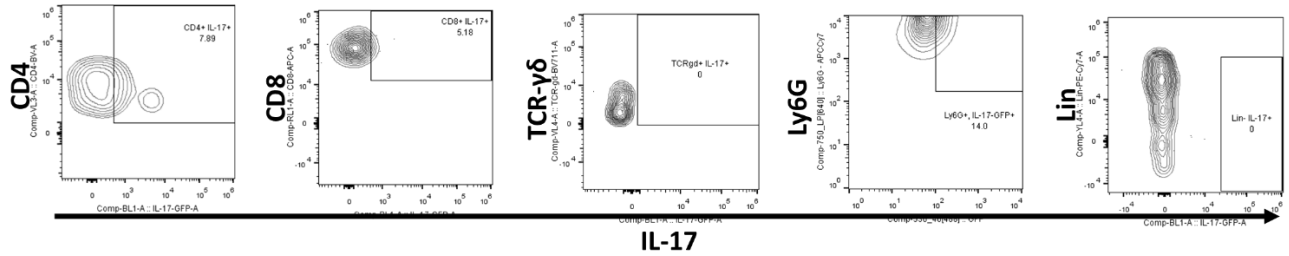
De manera destacable, con base en el nivel de expresión del receptor TCR $\gamma\delta$ pudimos identificar dos subpoblaciones de linfocitos TCR $\gamma\delta$ (Fig. 16-18, Fig. Supl. 2-4). Previamente, la distinción de dos poblaciones celulares de linfocitos TCR $\gamma\delta$ con base en el nivel de expresión del receptor TCR ya había sido reportada en piel [225]. Es importante mencionar que, a partir de las células recuperadas de ratones que solo recibieron el vehículo, así como de algunas de las muestras obtenidas de ratones infectados, la detección de eventos correspondientes a la población con una expresión elevada del TCR $\gamma\delta$ fue mínima o incluso nula (Fig. 16A), sobre todo en el caso de eventos positivos para IL-17, por lo que realizamos el análisis únicamente con base en la presencia o ausencia del receptor TCR $\gamma\delta$ sin considerar el nivel de expresión del mismo (Figs. 16, 18). En el caso de la infección subcutánea por *A. baumannii* luego de 4 horas, las pocas células TCR $\gamma\delta^+$ IL-17 $^+$ que logramos identificar, muestran una baja expresión del receptor TCR $\gamma\delta$ (Figs. 16B-C); aunque ni los porcentajes de esta población celular (Fig. 16D), ni el número total de células (Fig. 16F), se modifican significativamente en respuesta a la infección, lo que sugiere que los linfocitos TCR $\gamma\delta$ no son fuente importante de IL-17 a las 4 horas postinfección en la infección por *A. baumannii*.

Además de analizar las poblaciones que comúnmente se reportan como fuente IL-17 en la piel, analizamos neutrófilos como posible fuente de IL-17. El análisis de las poblaciones celulares luego de 4 horas postinfección, muestra un incremento significativo en el porcentaje de los neutrófilos (Ly6G $^+$ CD11b $^+$) positivos para IL-17 en la piel del grupo de ratones infectados con la cepa ATCC 17978 (18.33 ± 3.08 %), tanto en comparación con el porcentaje de esta población celular en la piel de ratones que solo recibieron el vehículo (0.57 ± 0.56 %; $p = 0.0018$), como en comparación con el grupo de ratones infectados con la cepa A578 (4.24 ± 1.73 %; $p = 0.0040$) (Fig. 16D). Sin embargo, al cuantificar los neutrófilos IL-17 $^+$ totales por cada gramo de piel infectada, no pudimos identificar un incremento significativo en esta población celular, lo que sugiere que el cambio en la frecuencia podría derivarse del cambio en poblaciones que quedaron fuera del análisis con los marcadores evaluados.

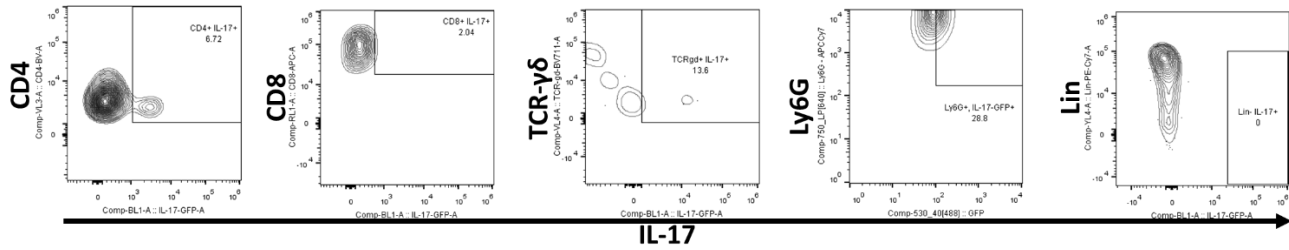
El análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las diferentes poblaciones celulares positivas para la producción de esta citocina, sugiere que luego de 4 horas post infección, los neutrófilos no son la única población celular que produce IL-17, puesto que al realizar el análisis de la IMF asociada a la presencia de IL-17, la población celular que en ratones infectados mostró una IMF asociada a la presencia de IL-17, significativamente mayor en el grupo de ratones infectados con la cepa bacteriana ATCC 17978, fueron los linfocitos TCR β^+ CD8 $^+$ (1.308 ± 0.313) en comparación con la IMF de la misma

población celular en el grupo de ratones infectados con la cepa A578 (0.1372 ± 0.1372 ; $p = 0.0327$) (Fig. 16E).

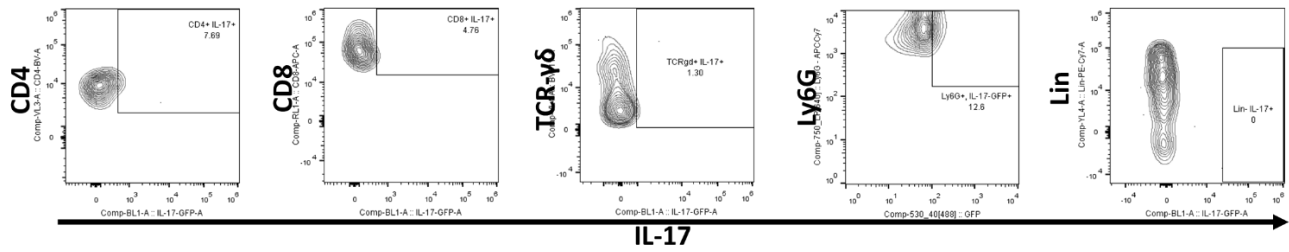
A.



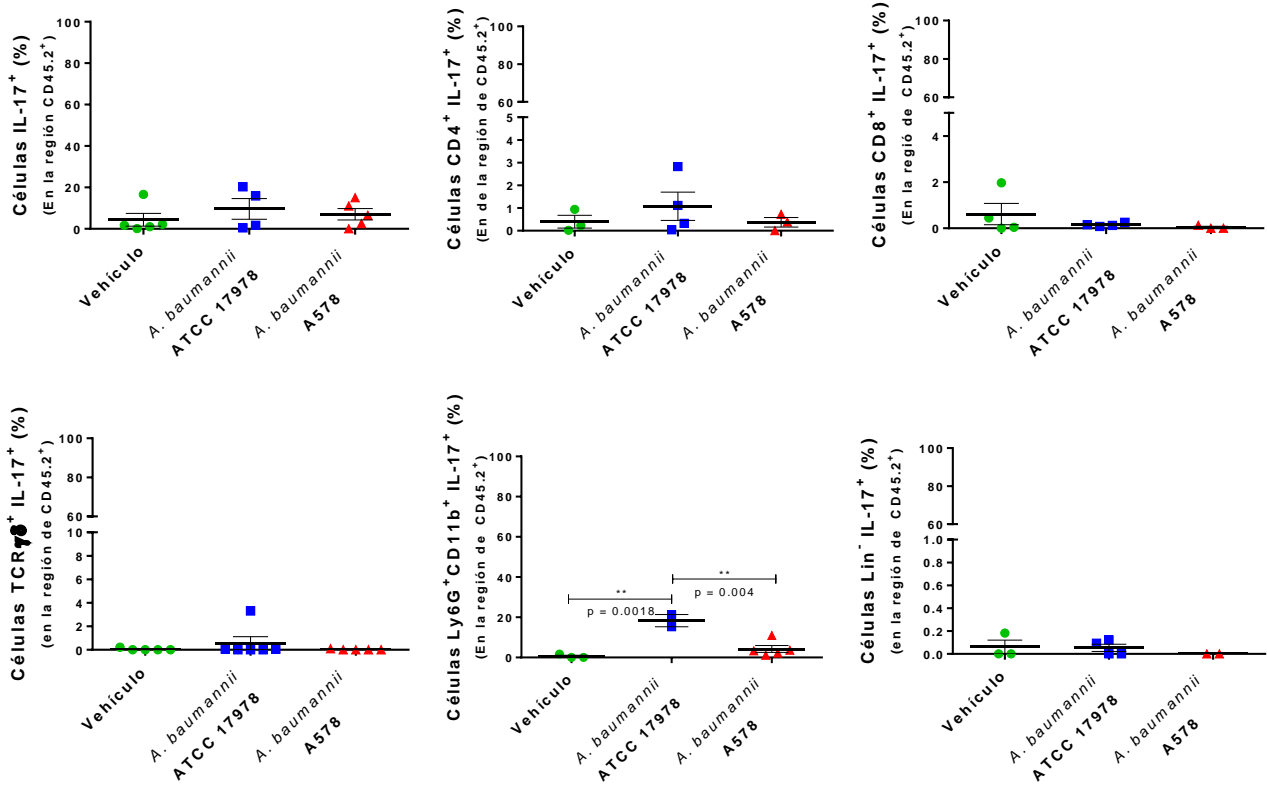
B.



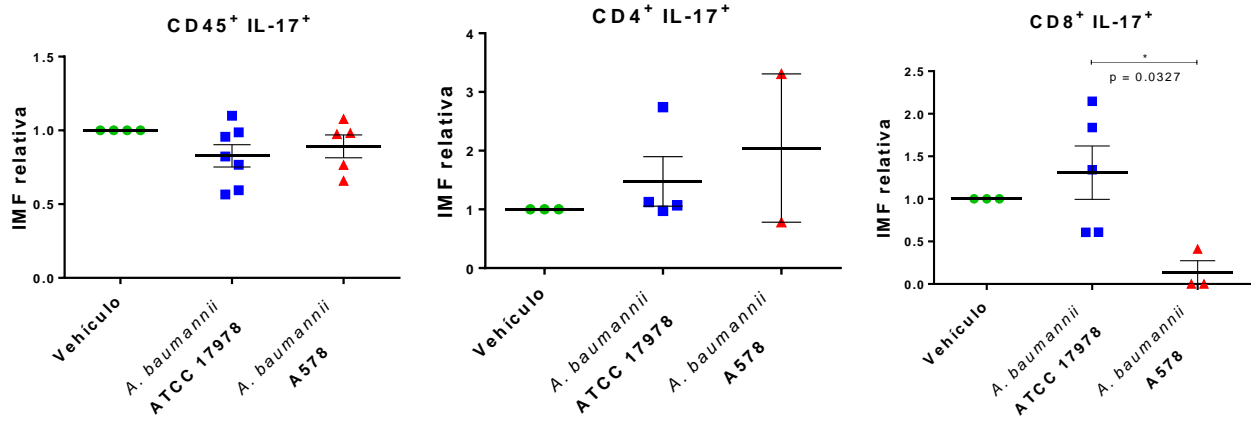
C.

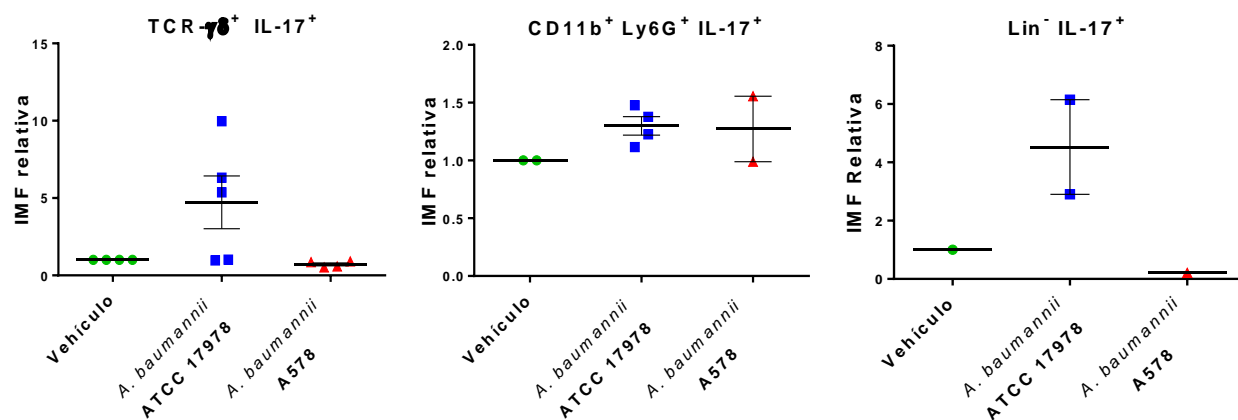


D.



E.





F.

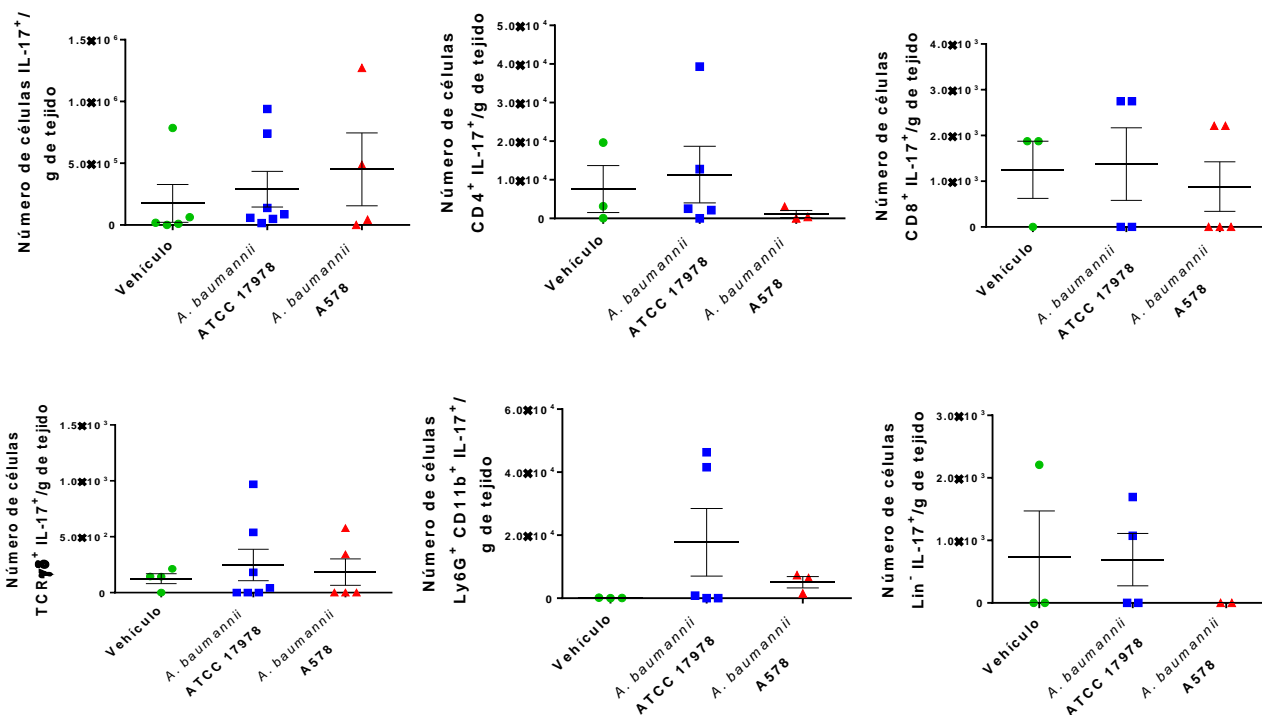


Figura 16. Neutrófilos (CD11b $^+$ Ly6G $^+$) y linfocitos TCR β^+ CD8 $^+$ contribuyen a la producción de IL-17 luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978. A-C. Gráficas de contornos representativas de las poblaciones celulares positivas para IL-17 analizadas en piel de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 4 horas postinfección a partir de la población inmediata anterior en el análisis mostrado en la Fig. Supl. 2. Se muestran gráficas representativas del análisis de IL-17 a partir de las poblaciones celulares TCR β^+ CD4 $^+$, TCR β^+ CD8 $^+$, TCR $\gamma\delta^+$ o Ly6G $^+$ CD11b $^+$ (neutrófilos) analizadas en la piel de A. un ratón que solo recibió administración de vehículo, B. de un ratón luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o C. de un ratón luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* A578. D. Porcentajes de diferentes subpoblaciones celulares IL-17 $^+$ analizadas en el compartimento hematopoyético (CD45.2 $^+$) recuperado de piel infectada durante 4 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) o administrados únicamente con vehículo (verde). E. Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de eGFP como reportera para la expresión de *Il17a* respecto a los valores obtenidos para las diferentes subpoblaciones recuperadas de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} administrados únicamente con vehículo (verde). F. Número total de células IL-17 $^+$ de diferentes subpoblaciones recuperadas por cada gramo (g) de piel de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. D-F. Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes, con grupos de n = 1-2 cada uno. * = p < 0.05, ** = p < 0.01. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

Derivado de la dificultad para recuperar células hematopoyéticas a partir de dorso luego de diferentes tiempos postinfección, el análisis de poblaciones celulares involucradas en la respuesta a la infección subcutánea por *A. baumannii* luego de 12 horas se realizó en piel de oreja de ratón (Fig.17).

Tras 12 horas post infección se analizaron algunas poblaciones celulares como potenciales fuentes de IL-17, entre ellas, linfocitos TCR β^+ , aunque para este tiempo postinfección sin evaluar la expresión de los marcadores CD4 y CD8 que nos permitiera identificar ambas subpoblaciones de linfocitos TCR $\alpha\beta$. A este tiempo también se evaluaron neutrófilos (Ly6G $^+$ CD11b $^+$), linfocitos TCR $\alpha\beta^+$, y células positivas para la expresión de la cadena alfa del receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas E (Fc ϵ RI α^+ , del inglés *chain of the receptor for the Fc region of immunoglobulin E*) como posibles fuentes de IL-17 [290].

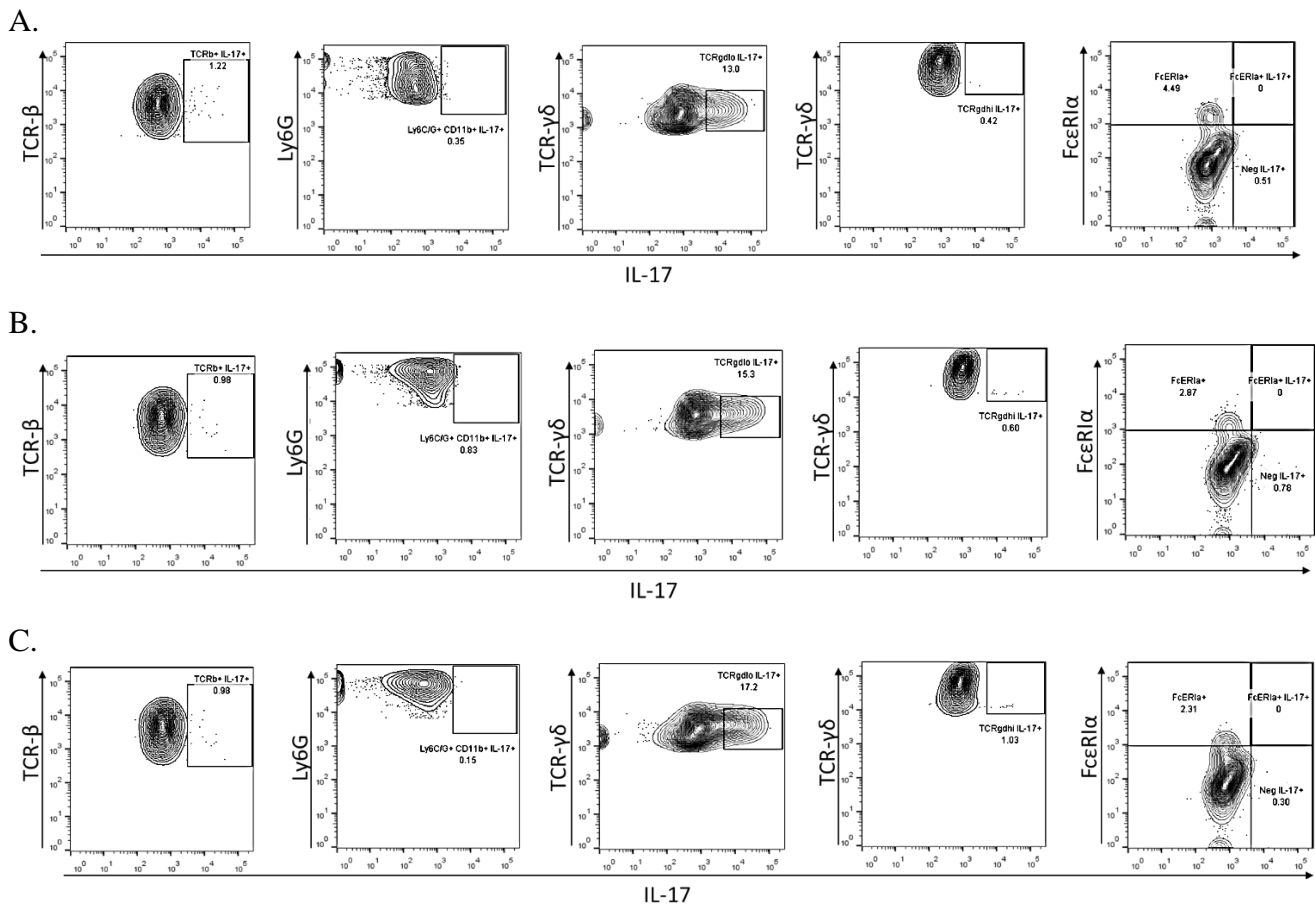
Al evaluar los porcentajes de células hematopoyéticas IL-17 $^+$ recuperadas del sitio de infección luego de 12 horas de la inoculación subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578, solo detectamos una tendencia al incremento de dichas células tras la infección con cada una de las cepas bacterianas, sin que ninguno de estos incrementos resultara estadísticamente significativo (Fig. 17A-D).

Por otro lado, la distinción de dos poblaciones celulares de linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ con base en el nivel de expresión del receptor TCR, designadas como TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$ y TCR $\gamma\delta^{\text{alto}}$, resultó mucho más evidente a este tiempo post infección, aunque también estas poblaciones pueden apreciarse claramente en lo ratones del grupo que recibió solo vehículo (Fig. 17A-C), a diferencia de otros tiempos analizados (Fig. 16A). A este tiempo pudimos observar que luego de 12 horas de infección con la cepa ATCC 17978, el porcentaje de células TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$ IL-17 $^+$ (1.875 ± 0.149 %) es significativamente mayor ($p = 0.0419$) al porcentaje de células TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$ IL-17 $^+$ (0.844 ± 0.179 %) dentro del compartimento hematopoyético presentes en la piel de ratones que solo recibieron el vehículo (Fig. 17D). Mientras que el porcentaje de esta subpoblación celular luego de 12 horas de la infección subcutánea con la cepa A578 (1.795 ± 0.160 %) no es estadísticamente distinto del porcentaje de esta subpoblación observado en ratones tratados con el vehículo (Fig. 17D).

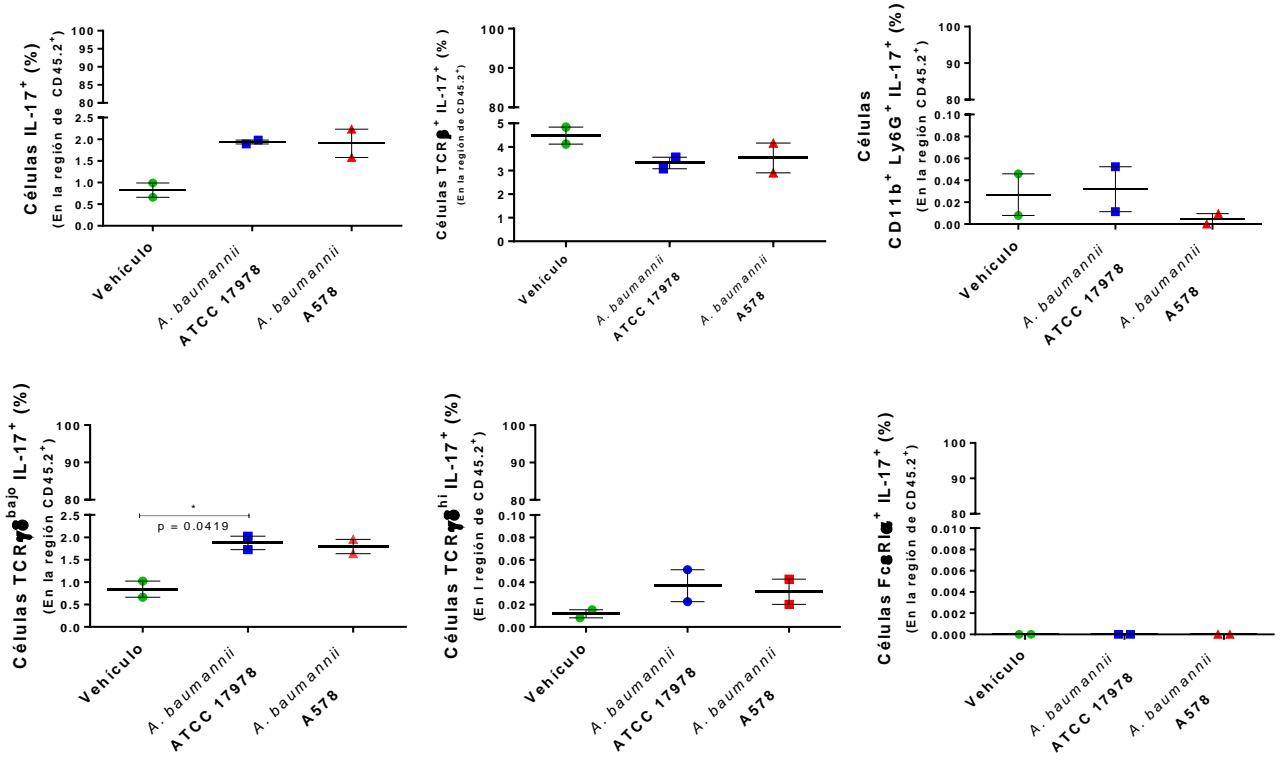
Para darnos una idea sobre la población celular que luego de 12 horas postinfección pudiera estar produciendo mayor cantidad de IL-17, analizamos la IMF en los eventos positivos para IL-17 en las diferentes poblaciones analizadas (Fig. 17E). Al llevar a cabo este análisis, la población que mostró un incremento significativo en la IMF respecto a la población en el grupo control administrado con el vehículo, fue la de las células TCR β^+ IL-17 $^+$, tanto en el grupo de ratones infectados con la cepa ATCC 17978 (1.546 ± 0.039 ; $p = 0.0266$) como en el grupo de ratones infectados con la cepa A578 (1.499 ± 0.0356 ; $p = 0.0366$). Sin embargo, como a este tiempo postinfección no evaluamos la expresión de los marcadores CD4 ni CD8 por la combinación de fluorocromos y anticuerpos seleccionados, desconocemos si estas células TCR β que están contribuyendo con una mayor producción de IL-17, son CD8 $^+$ como lo que se observó luego de 4 horas de infección (Fig. 16E).

Al analizar cómo impacta la infección subcutánea por *A. baumannii* durante 12 horas al número total de células IL-17 $^+$ de diferentes poblaciones celulares presentes en el sitio de infección, solo identificamos incremento significativo de una población celular tras 12 horas de infección por *A. baumannii* ATCC 17978 (Fig. 17F). En este grupo de ratones encontramos que el total de células TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$ IL-17 $^+$ recuperadas por cada gramo de piel infectada (8005.133 ± 1004.170 células/g de tejido) incrementó significativamente ($p = 0.047$) respecto al número de células TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$ IL-17 $^+$ (1799.549 ± 378.546 células/g de tejido) recuperadas de la piel de ratones que no recibieron bacteria. En cuanto al total de

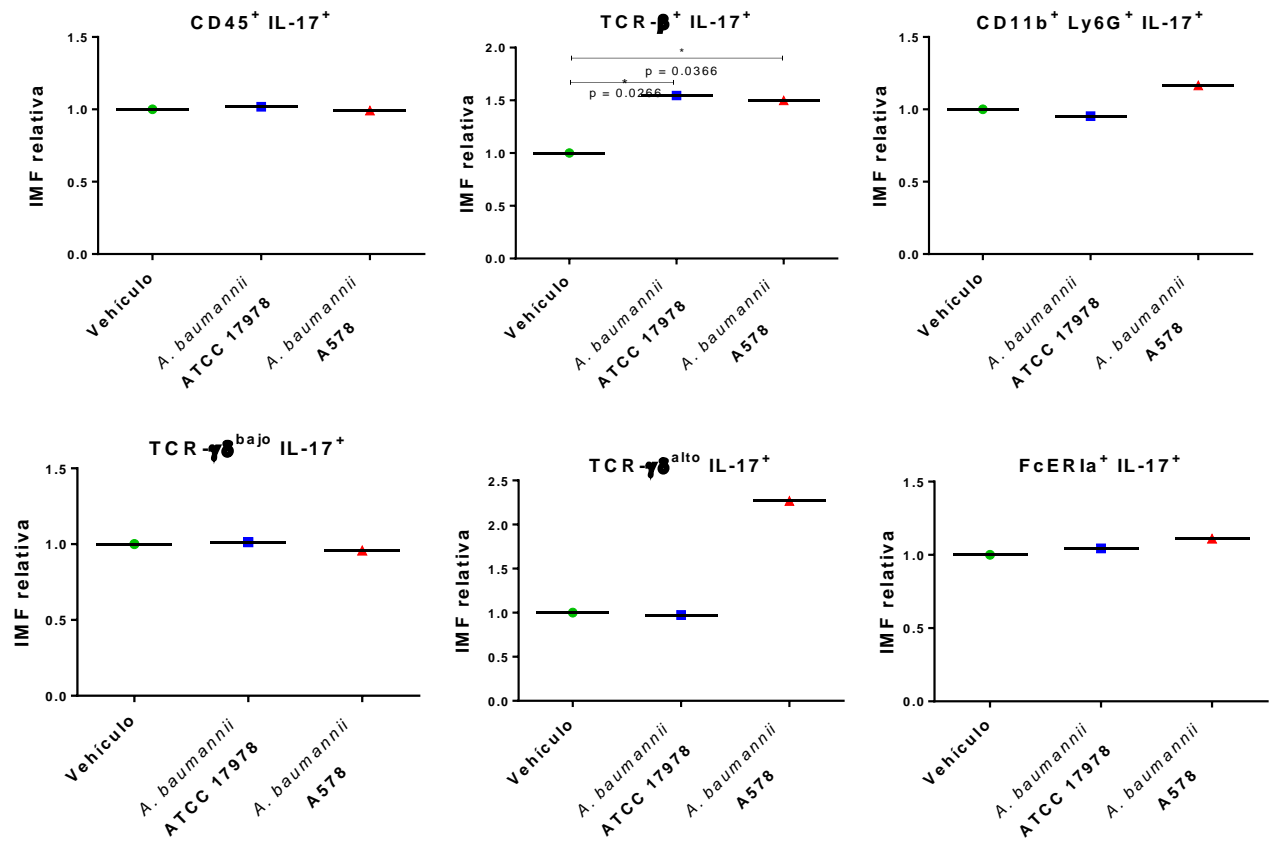
células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}} \text{IL-17}^+$ recuperadas de la piel de ratones infectados con la cepa A578 (5370.344 ± 1413.16 células/g de tejido), pese a que muestra una tendencia al incremento respecto al total de células recuperadas del grupo control, este aumento no resulta ser estadísticamente significativo (Fig. 17F). Por otro lado, el número de células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{alto}} \text{IL-17}^+$ en piel de ratones infectados también tiende a aumentar con respecto al vehículo independientemente de la cepa de bacteria utilizada, aunque este aumento no es significativo.



D.



E.



F.

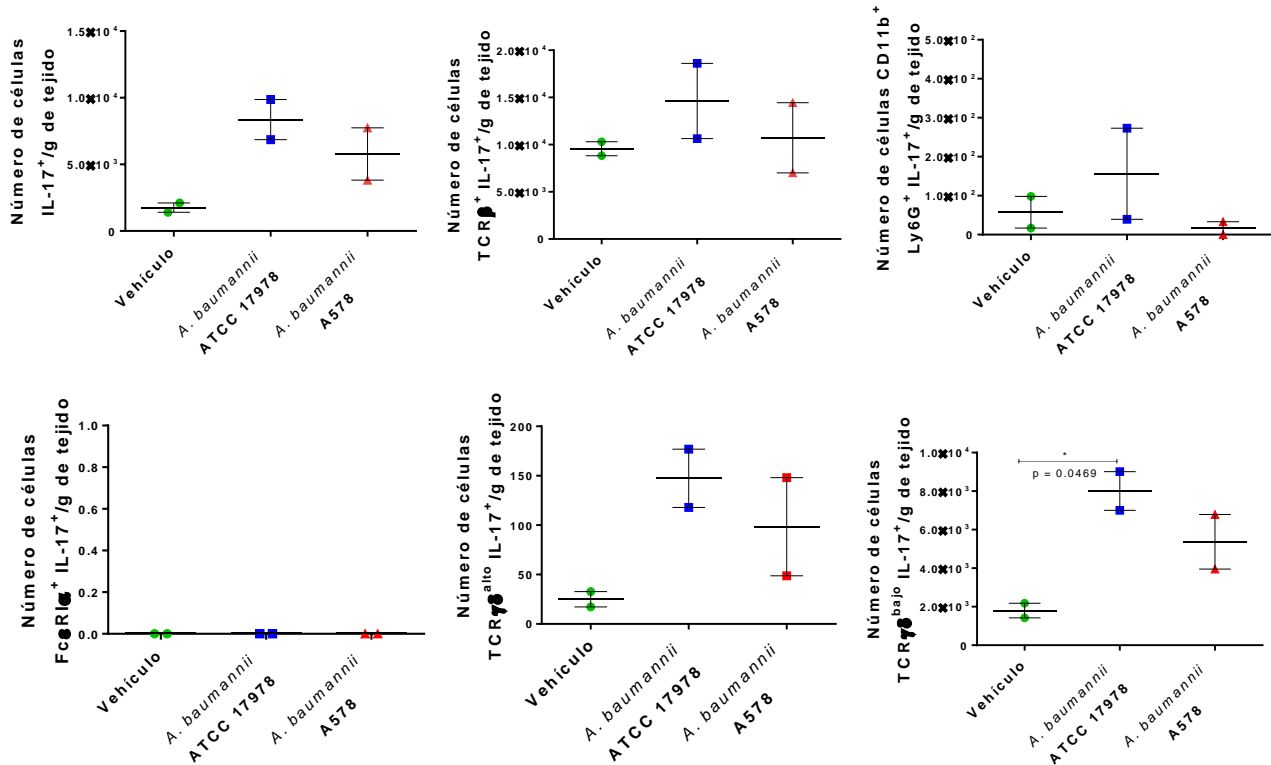


Figura 17. Diferentes poblaciones de linfocitos contribuyen a la producción de IL-17 luego de 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. A-C. Gráficas de contornos representativas de las poblaciones celulares positivas para IL-17 analizadas en piel de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 12 horas postinfección a partir de la población inmediata anterior en el análisis mostrado en la Fig. Supl. 3. Se muestran gráficas representativas de análisis de IL-17 a partir de las subpoblaciones celulares TCR β ⁺, CD11b⁺ Ly6G⁺ (neutrófilos), células Fc ϵ RI α ⁺, TCR $\gamma\delta$ ^{alto} o TCR $\gamma\delta$ ^{bajo} analizadas en la piel de A. un ratón al que solo se le administró vehículo, B. de un ratón tras 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o C. de un ratón tras 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* A578. D. Porcentajes de diferentes subpoblaciones celulares IL-17⁺ analizadas en el compartimento hematopoyético (CD45.2⁺) recuperado de piel infectada durante 12 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). E. Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de eGFP como reportera para la expresión de *Il17a* en células de piel de ratones infectados subcutáneamente con *A. baumannii* respecto a los valores obtenidos para las diferentes subpoblaciones recuperadas de ratones reporteros C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} administrados únicamente con vehículo (verde). F. Número total de células IL-17⁺ de diferentes subpoblaciones recuperadas por cada gramo de piel infectada de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. D-F. Media aritmética y error estándar de un experimento, con n = 2 para cada tratamiento distinto. * = p < 0.05. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

A este tiempo postinfección, también evaluamos la presencia de IL-17 en diferentes poblaciones mediante inmunofluorotinciones en cortes histológicos obtenidos a partir de la piel del dorso de ratones infectados con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 y su posterior análisis mediante microscopía confocal (Fig. Supl. 8A). Al analizar de esta manera las poblaciones celulares positivas para IL-17, encontramos que tanto tras la infección por *A. baumannii* ATCC 17978 como por A578, los porcentajes de las células identificadas como positivas para IL-17, sin tener en cuenta a qué subpoblación pertenecieran (Fig. Supl. 8B), se incrementaron de manera estadísticamente significativa tanto en ratones infectados con la cepa bacteriana ATCC 17978 (7.71 ± 1.04 %, p < 0.0001) como A578 (6.90 ± 0.50 %, p = 0.0003), en comparación con el porcentaje cuantificado en ratones que solo recibieron vehículo (2.81 ± 0.38 %).

Cuando, mediante microscopía confocal, determinamos los porcentajes de algunas poblaciones celulares positivas para IL-17 en los tejidos de ratones infectados durante 12 horas, encontramos que, el porcentaje de Ly6C/G⁺ IL-17⁺ (5.2 ± 1.02 %) y de CD11b⁺ IL-17⁺ (10.00 ± 1.97 %), fue significativamente mayor en comparación con los porcentajes de esas misma subpoblaciones analizados en ratones administrados con vehículo (Ly6C/G⁺ IL-17⁺: 1.80 ± 0.59 %, $p = 0.0238$; CD11b⁺ IL-17⁺ (0.5 ± 0.34 %, $p = 0.0001$) (Fig. Supl. 8B). En tanto que para los ratones infectados durante 12 horas con *A. baumannii* A578, logramos identificar un incremento estadísticamente significativo, respecto a ratones que recibieron vehículo, para los porcentajes de las tres poblaciones celulares analizadas, CD4⁺ IL-17⁺ (6.00 ± 0.68 , $p = 0.0034$), Ly6C/G⁺ IL-17⁺ (5.25 ± 0.75 %, $p = 0.0300$) y CD11b⁺ IL-17⁺ (6.80 ± 0.50 %, $p = 0.0037$) (Fig. Supl. 8B). Lo anterior sugiere que, adicionalmente a las células TCR $\gamma\delta$ (Figs. 17D, F), otras poblaciones celulares como neutrófilos, y células CD4⁺, contribuyen con a la producción de IL-17 a las 12 horas postinfección durante la infección subcutánea por *A. baumannii*. Es importante destacar que fue posible detectar poblaciones de células productoras de IL-17 al menos con dos diferentes métodos y será necesario repetir estos experimentos para poder llegar a conclusiones finales al respecto.

Luego de 24 horas postinfección, las poblaciones celulares en las que evaluamos la actividad de *Il17a* mediante citometría de flujo, fueron linfocitos TCR β ⁺ CD4⁺, TCR β ⁺ CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, células negativas para la expresión de marcadores de linaje (Lin⁻) (CD11⁻, Fc ϵ RI⁻, TER-119⁻, CD19⁻, Siglec F⁻, CD8⁻, B220⁻ y NK1.1⁻) y neutrófilos (Ly6G⁺ CD11b⁺) (Fig. 18 y Fig. Supl. 7).

A este tiempo postinfección por cada una de las cepas bacterianas, el porcentaje de células hematopoyéticas CD45.2⁺ IL-17⁺, no mostró cambio significativo respecto a las células recuperadas del grupo administrado con vehículo (Fig. 18D). Al tratar de identificar si alguna de las subpoblaciones analizadas contribuye de manera importante a la producción de IL-17 a este tiempo postinfección, no identificamos cambio significativo en el porcentaje de ninguna de las poblaciones celulares IL-17⁺ analizadas en el sitio infectado luego de 24 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* (Fig. 18D).

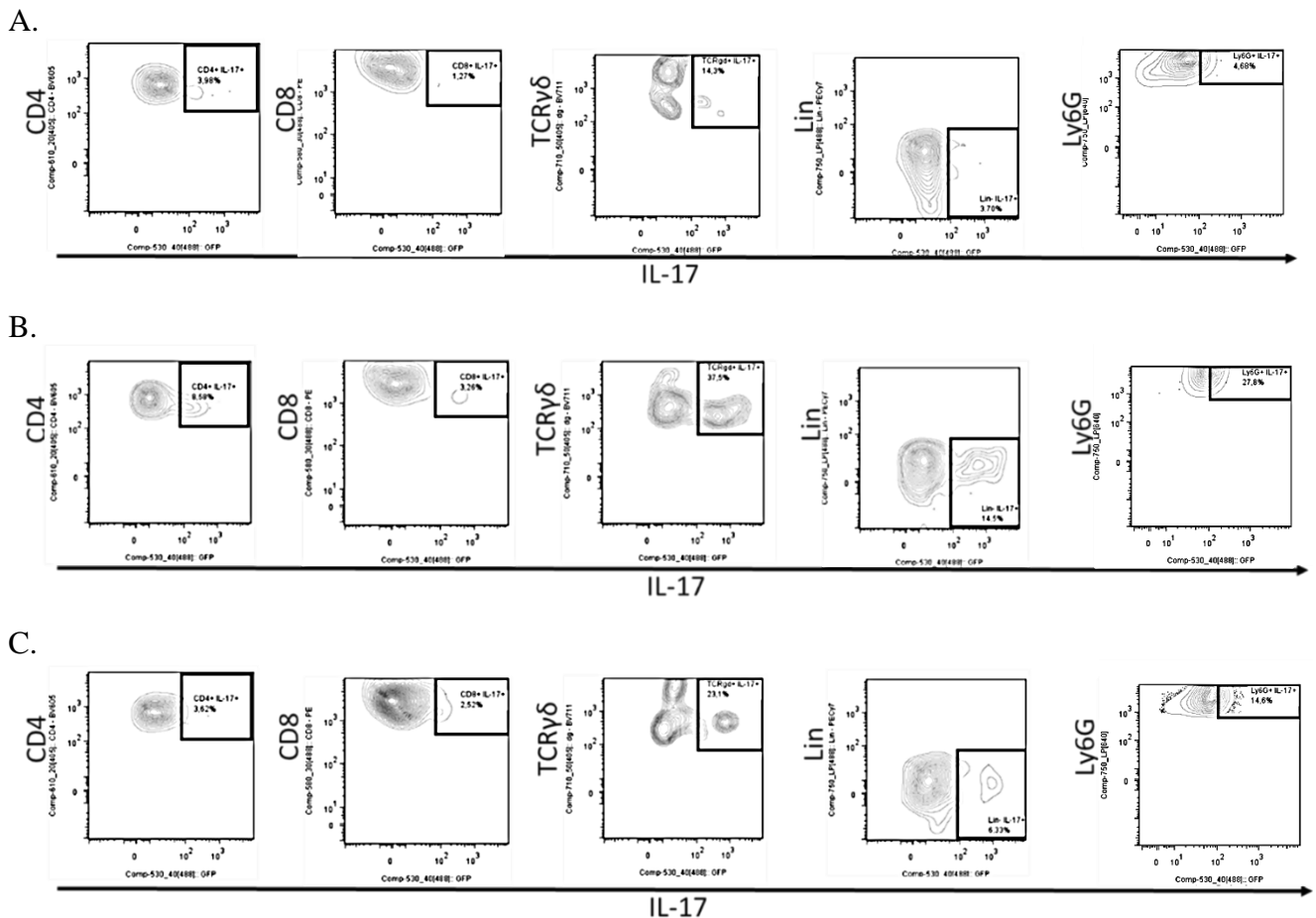
Interesantemente, al analizar la IMF para generar una idea sobre cuál de las poblaciones analizadas podría estar produciendo en mayor medida IL-17 (Fig. 18E), encontramos que la fluorescencia asociada a la actividad de *Il17a* en el total de células IL-17⁺ dentro del total de células hematopoyéticas CD45.2⁺, tanto luego de 24 horas de infección con *A. baumannii* ATCC 17978 (0.852 ± 0.024 ; $p = 0.0015$) como al mismo tiempo postinfección con A578 (0.869 ± 0.0003 ; $p = 0.0024$) fue estadísticamente menor en comparación con la IMF de células IL-17⁺ del total de células hematopoyéticas recuperadas de ratones no infectados. También una disminución significativa en la IMF de células IL-17⁺ en la población de neutrófilos (Ly6G⁺ CD11b⁺) se identificó tras 24 horas de infección con ATCC 17978 (0.831 ± 0.022 ; $p = 0.0122$), así como con A578 (0.840 ± 0.019 ; $p = 0.0144$) (Fig. 18E). Esta disminución, muy probablemente esté relacionada con la cinética de la producción de IL-17 en esta población celular, es decir, que a este tiempo tengan una menor producción de la citocina.

Pese a que a las 24 horas postinfección, la IMF de las células IL-17⁺ de algunas poblaciones en piel—TCR β ⁺ CD8⁺ y Lin— tiende a ser mayor tras la infección por *A. baumannii*, el cambio no es estadísticamente significativo; aunque definitivamente, esto no implica que la producción de IL-17 por estas células no contribuya al control o resolución de la infección.

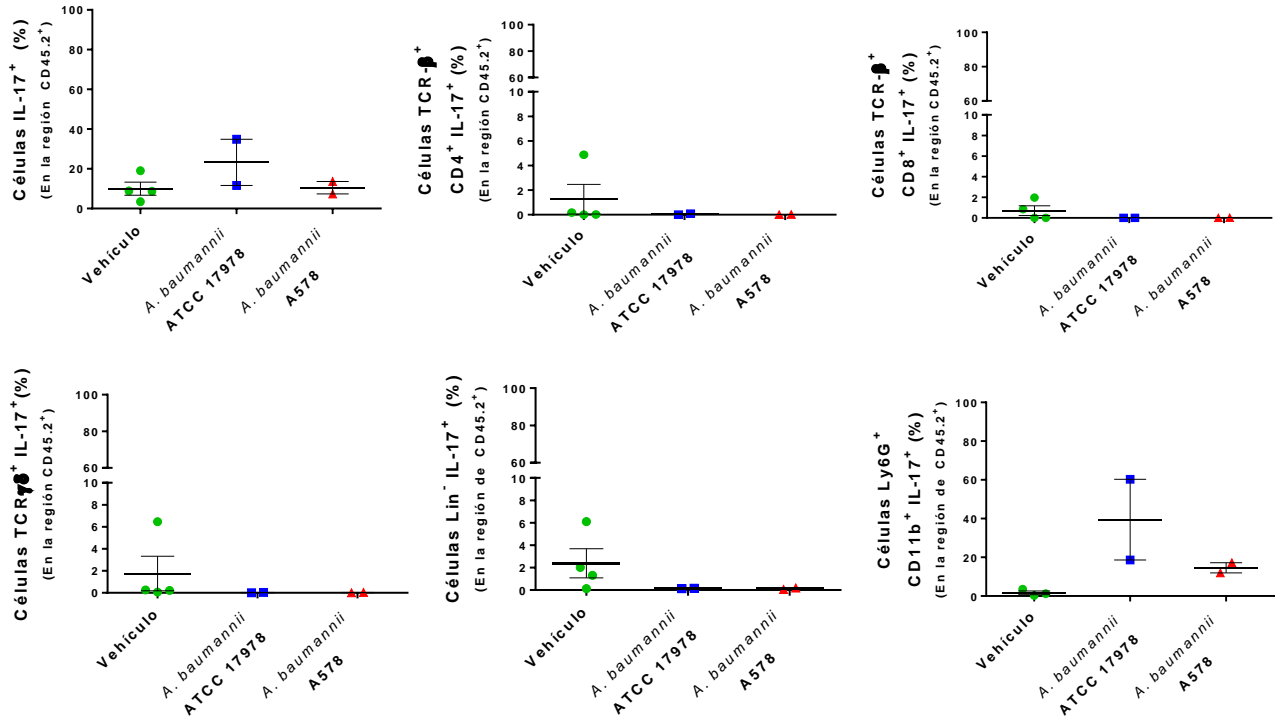
Tampoco identificamos un cambio estadísticamente significativo en el total de células IL-17⁺ de las diferentes poblaciones recuperadas de la piel de ratones infectados subcutáneamente durante 24 horas, respecto al número de esas células en ratones administrados únicamente con el vehículo (Fig. 18F).

Adicionalmente, analizamos las células IL-17⁺ presentes en diferentes órganos, bazo, DLNs y NDLNs, a diferentes tiempos postinfección (Figs. Supl. 5, 6, 7) para conocer si la producción de IL-17 es un fenómeno más generalizado, o se presenta solo en el sitio de infección. En los DLNs de ratones infectados con la cepa ATCC 17978, encontramos un aumento significativo en el número total de células TCRγδ⁺ IL-17 así como en el número total de células Lin⁻ IL-17⁺, respecto a los números de estas poblaciones en los DLNs de ratones administrados con el vehículo a las 24 horas postinfección (Fig. Supl. 7).

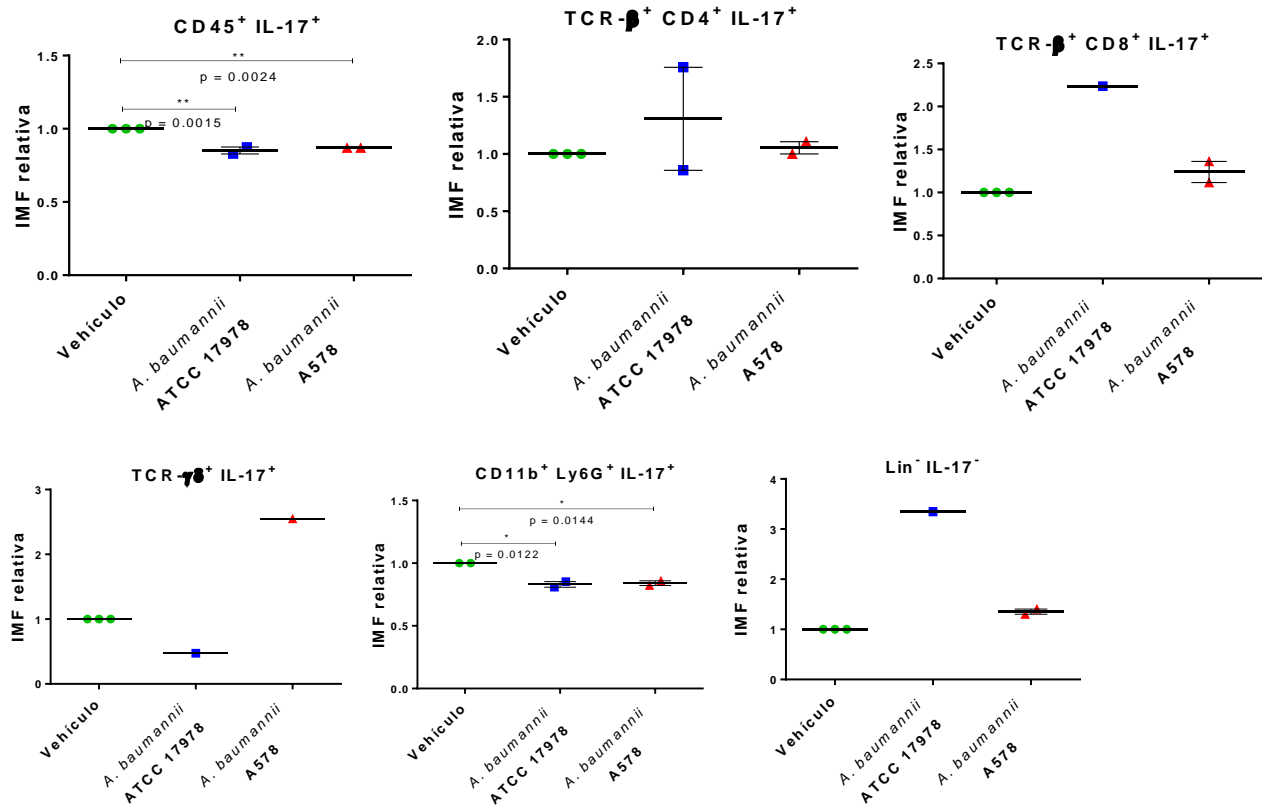
En nuestro modelo de infección subcutánea por *A. baumannii*, salvo en los DLNs luego de 24 horas de infección, donde identificamos un incremento estadísticamente significativo en células TCRγδ⁺ IL-17⁺ y en células Lin⁻ IL-17⁺ (Fig. Supl. 7B), en ningún otro órgano a ninguno de los tiempos evaluados, observamos incremento en las células productoras de IL-17 tras la infección. Lo anterior sugiere que la producción de IL-17 que contribuye al control de la infección por *A. baumannii*, principalmente es un fenómeno local llevado a cabo en el sitio de infección, al menos tras las primeras 24 horas postinfección, sin embargo, el hecho de que al tiempo más tardío analizado se esté observando respuesta en los DLNs, sugiere que la respuesta se está amplificando y a tiempos posteriores cabría esperarse una respuesta sistémica en la producción de IL-17.



D.



E.



F.

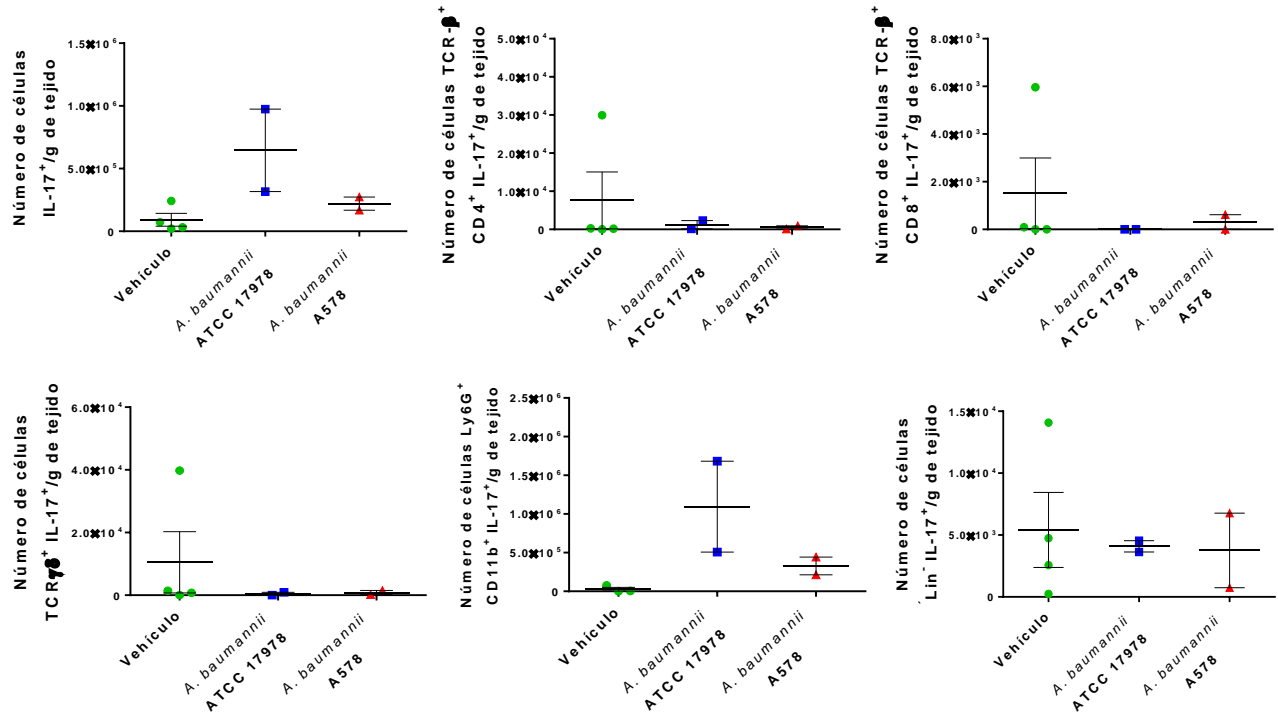


Figura 18. 24 horas después de la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 no hay una producción significativa de IL-17. A-C. Gráficas de contornos representativas de las poblaciones celulares positivas para IL-17 analizadas en piel de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 24 horas postinfección a partir de la población inmediata anterior en el análisis mostrado en la Fig. Supl. 4. Se muestran gráficas representativas de análisis de IL-17 en las subpoblaciones celulares TCRβ⁺ CD4⁺, TCRβ⁺ CD8⁺, Lin⁻, TCRγδ o CD11b⁺ Ly6G⁺ (neutrófilos) analizadas en la piel de A. un ratón al que solo se le administró vehículo, B. de un ratón tras 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o C. de un ratón tras 24 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* A578. D. Porcentajes de diferentes subpoblaciones celulares IL-17⁺ analizadas en el compartimento hematopoyético (CD45.2⁺) recuperado de piel infectada durante 24 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). E. Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de eGFP como reportera para la expresión de *Il17a* en diferentes poblaciones celulares en piel de ratones infectados con *A. baumannii* respecto a los valores obtenidos para las diferentes subpoblaciones recuperadas de ratones reporteros C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} administrados únicamente con vehículo (verde). F. Número total de células de diferentes subpoblaciones recuperadas por gramo de piel infectada de ratones luego de 24 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. D-F. Media aritmética y error estándar de 1 experimento, con n = 2-4 ratones por grupo. * = p < 0.05. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

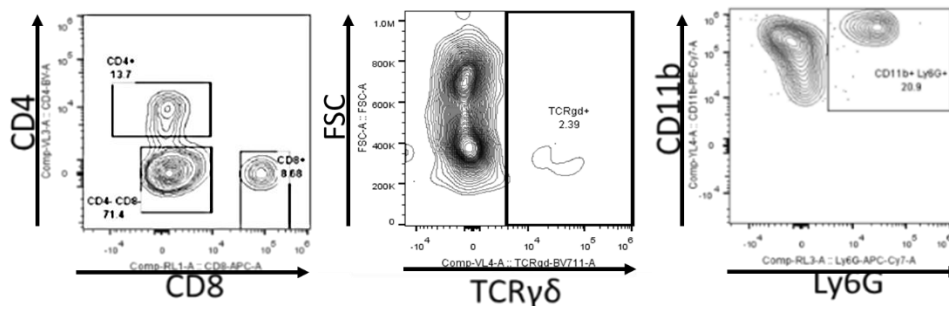
7.6. LA INFECCIÓN SUBCUTÁNEA POR *A. baumannii* INDUCE EL RECLUTAMIENTO DE NEUTRÓFILOS AL SITIO DE INFECCIÓN

Adicionalmente al análisis de la dinámica de diferentes poblaciones celulares positivas para IL-17 presentes en el tejido infectado y en otros órganos, analizamos algunas poblaciones celulares, sin evaluar su contribución a la producción de IL-17, para caracterizar del infiltrado inflamatorio en respuesta a la infección por las dos distintas cepas de *A. baumannii*. Este análisis lo llevamos a cabo tanto en el sitio de infección (Figs. 19-21), como en diferentes órganos (bazo, DLNs y NDLNs) (Figs. Supl. 5-7).

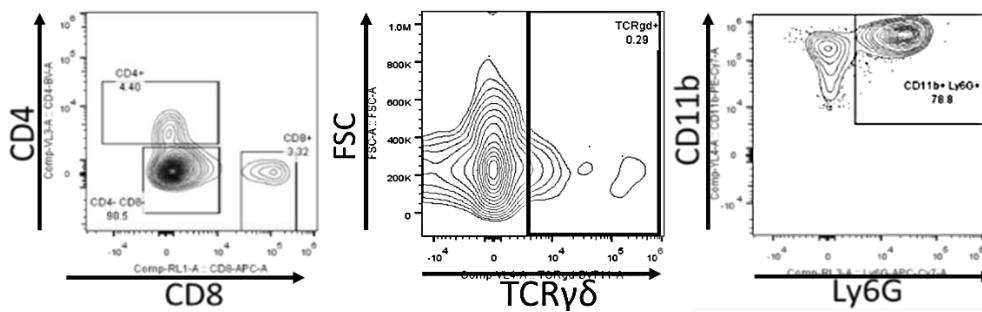
En primer lugar, analizamos las poblaciones celulares presentes en la piel de ratones luego de 4 horas de haber inducido la infección subcutánea por *A. baumannii* (Fig. 19A-C). Al comparar los porcentajes

de diferentes poblaciones celulares luego de 4 horas postinfección con la cepa ATCC 17978, encontramos que en el área de la piel infectada hubo un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos ($\text{Ly6G}^+ \text{CD11b}^+$) ($52.897 \pm 4.571 \%$; $p = 0.0018$) en comparación con el porcentaje de los ratones del grupo control que recibieron únicamente vehículo ($4.126 \pm 3.917 \%$) (Fig. 19D). De manera interesante, este porcentaje también es estadísticamente superior al de neutrófilos en el grupo de ratones infectados con la cepa bacteriana A578 ($19.740 \pm 8.14 \%$; $p = 0.00150$) y aunque al comparar los porcentajes de neutrófilos ($\text{Ly6G}^+ \text{CD11b}^+$) entre el grupo control y el grupo infectado con la cepa A578 se observa una tendencia al incremento en el porcentaje de esa población celular en este último grupo, ese cambio no logra ser estadísticamente significativo (Fig. 19D). A este tiempo postinfección no logramos identificar cambio estadísticamente significativo en los números totales de las poblaciones celulares analizadas en el sitio de infección, en comparación con los números totales de células recuperadas del grupo administrado con vehículo (Fig.19E).

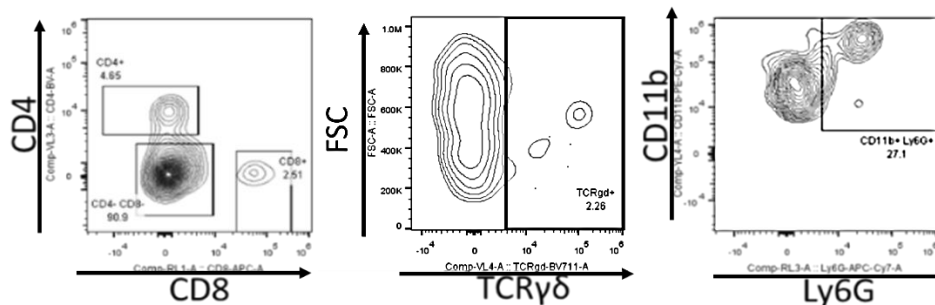
A.



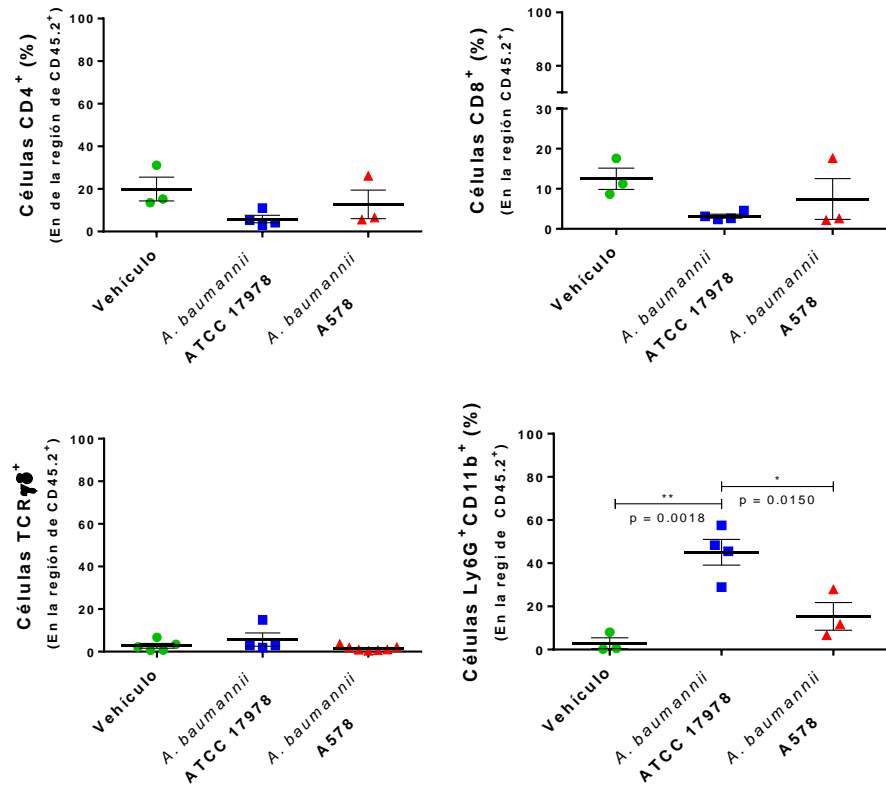
B.



C.



D.



E.

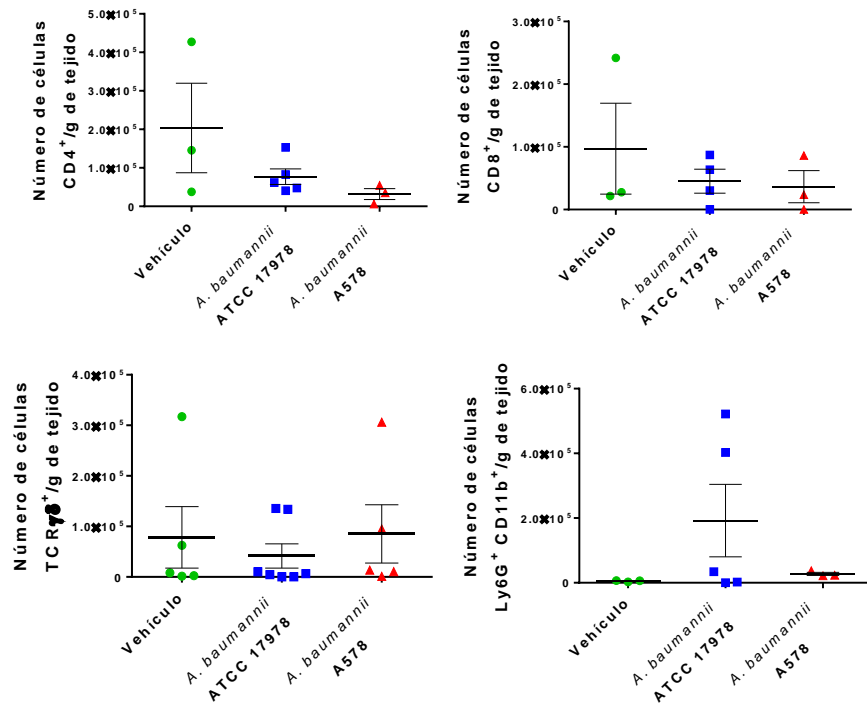
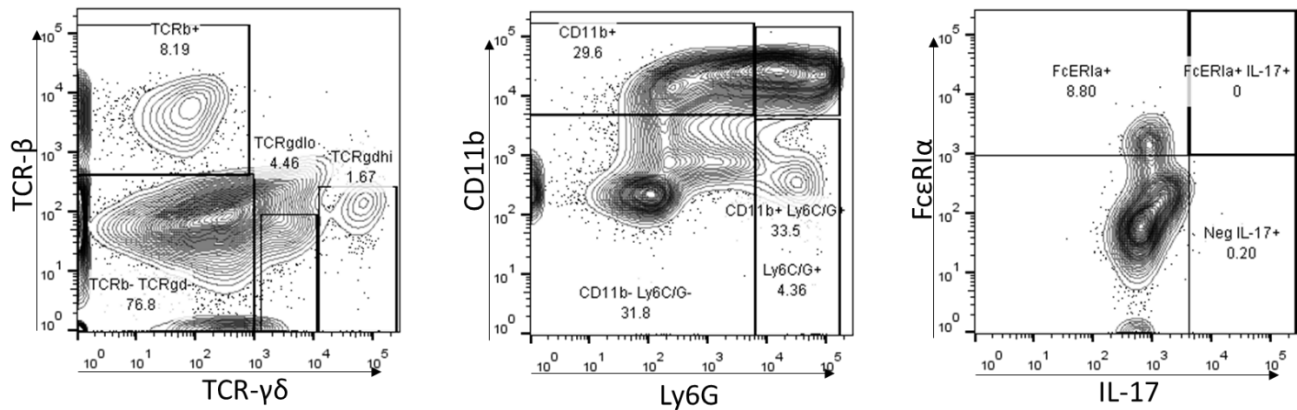


Figura 19. La infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 provoca el reclutamiento de neutrófilos a la zona infectada luego de 4 horas postinfección. A-C. Gráficas de contornos representativas de las poblaciones celulares analizadas en piel de ratones luego de 4 horas postinfección. Se muestran gráficas representativas de análisis las subpoblaciones celulares TCR β ⁺ CD4⁺, TCR β ⁺ CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺ o Ly6G⁺ CD11b⁺ (neutrófilos) analizadas en la piel de A. un ratón que solo recibió administración de vehículo, B. de un ratón luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o C. de

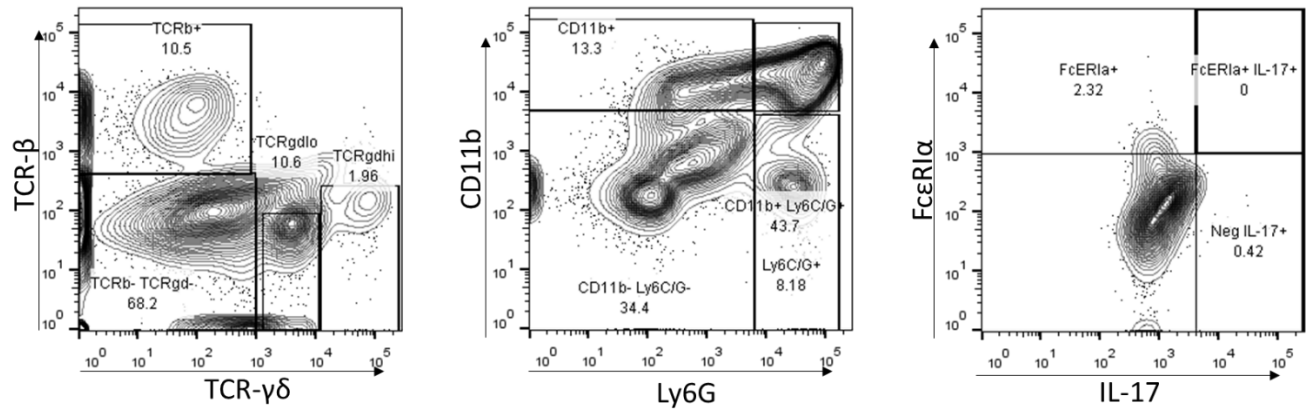
un ratón luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* A578. D. Porcentajes de diferentes subpoblaciones celulares analizadas en el compartimento hematopoyético recuperado de piel infectada durante 4 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) o de piel de ratones que solo fueron administrados con vehículo (verde). E. Número de células de diferentes subpoblaciones recuperadas por gramo de piel infectada de ratones C57BL/6-*Il17a^{tm1Bcgen/}* luego de 4 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. D-E. Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes, con grupos de n = 1-2 ratones cada uno. * = p < 0.05, ** = p < 0.01. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

Al realizar el análisis de las diferentes poblaciones celulares recuperadas del sitio de infección luego de 12 horas de infección subcutánea por *A. baumannii* en comparación con las poblaciones celulares presentes en el grupo administrado con vehículo (Fig. 20AC), aunque no logramos identificar cambios estadísticamente significativos en cuanto a los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares analizadas (Fig. 20D), identificamos un incremento estadísticamente significativo en el número de células tanto TCR $\gamma\delta^{\text{alto}}$ luego de la infección por ATCC 17978 (1483202.500 ± 92663.5 células/g de tejido; p = 0.0295) como por A578 ($1893566.000 \pm 194992.000$ células/g de tejido; p = 0.0135), así como de las células TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$, también tras la infección por ATCC 17978 (1507159.5 ± 97520.5 células/g de tejido; p = 0.0296), así como tras la infección por A578 (1909822.5 ± 197890.5 células/g de tejido; p = 0.0139), respecto a estas mismas poblaciones celulares evaluadas en el grupo de ratones administrados únicamente con el vehículo (TCR $\gamma\delta^{\text{alto}}$: 218035.15 ± 214009.45 células/g de tejido. TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$: 229820.35 ± 214037.05 células/g de tejido) (Fig. 20E).

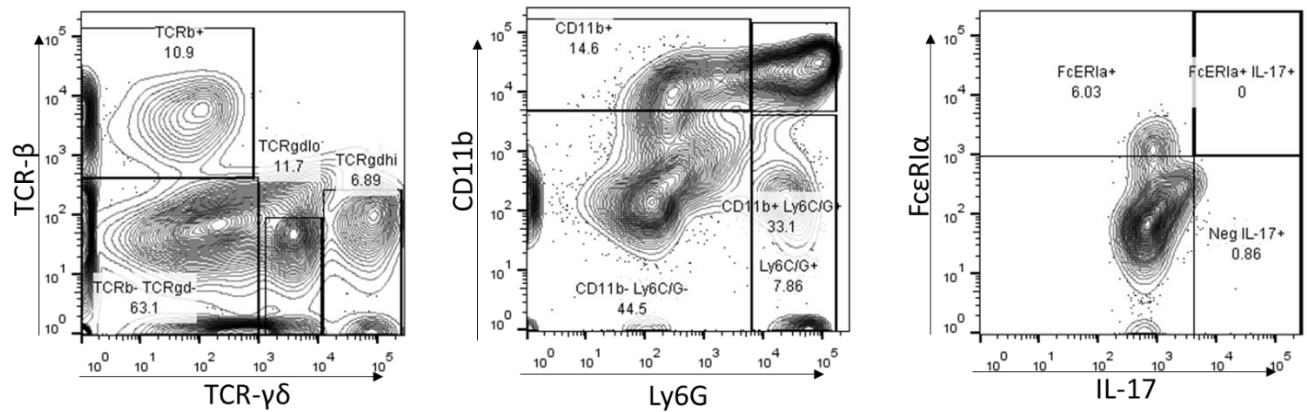
A.



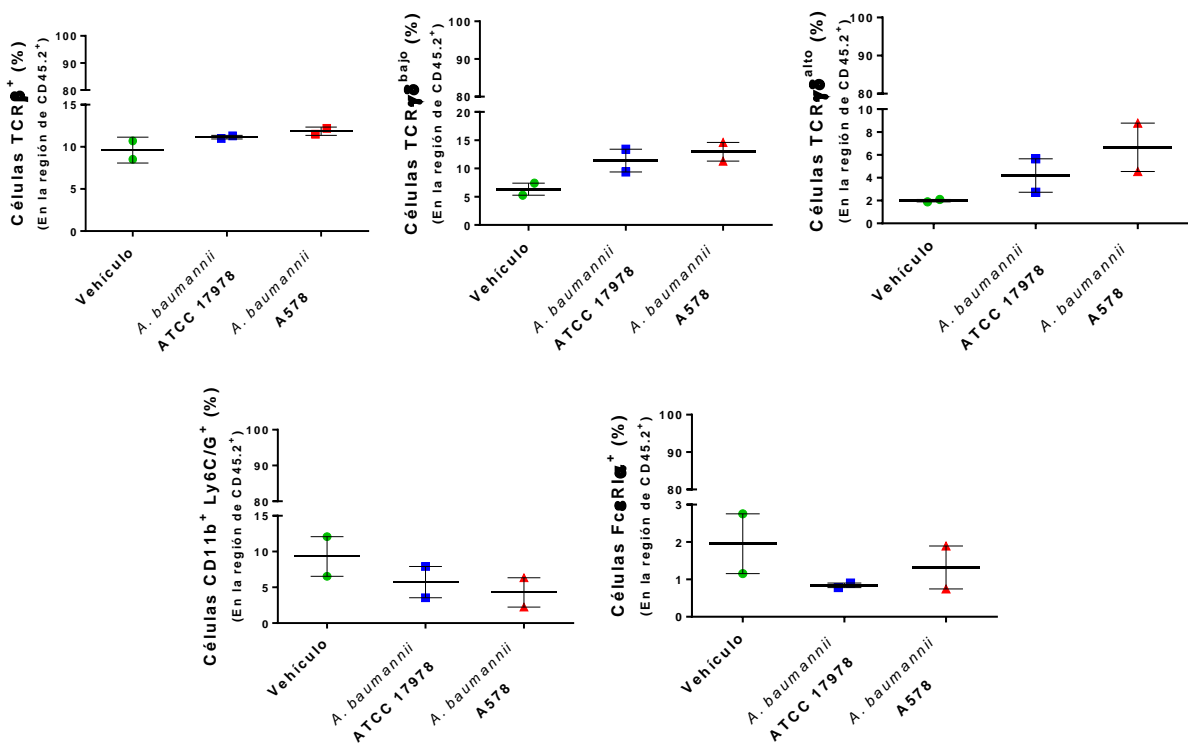
B.



C.



D.



E.

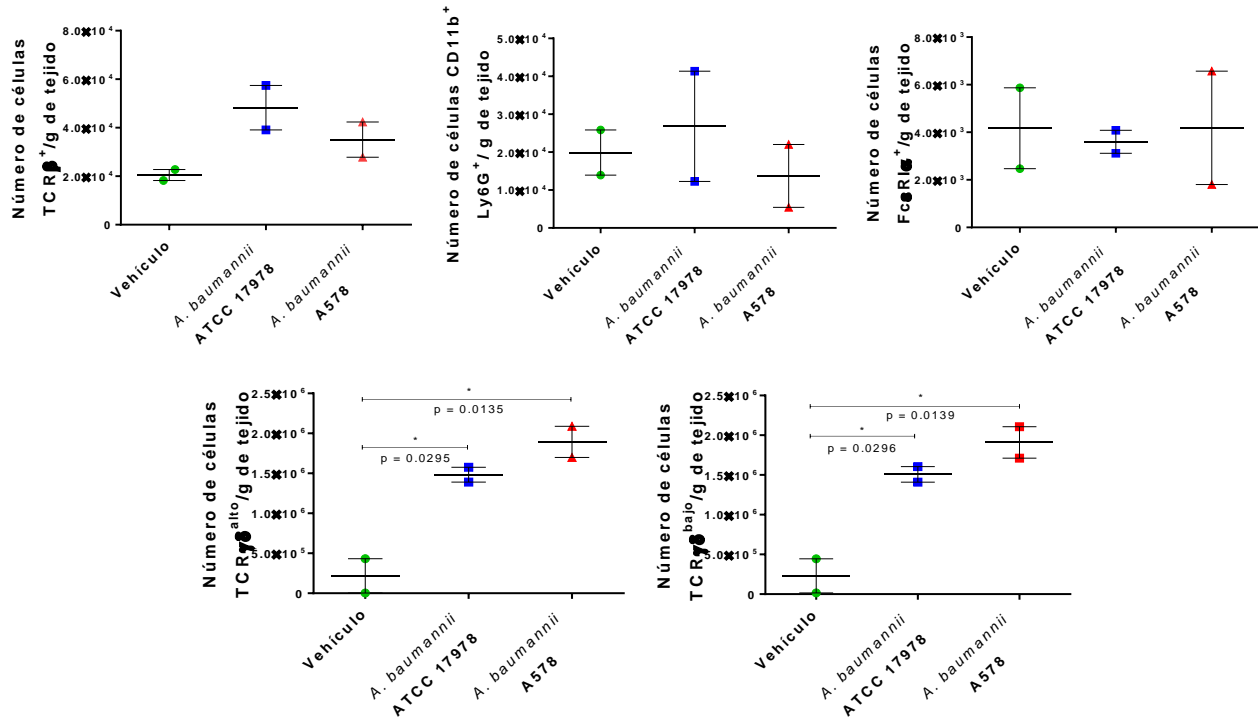


Figura 20. 12 horas después de la infección subcutánea por *A. baumannii* se incrementan las células TCR $\gamma\delta^+$ en la zona infectada. A-C. Gráficas de contornos representativas de las poblaciones celulares analizadas en piel de ratones luego de 12 horas postinfección. Se muestran gráficas representativas del análisis de las subpoblaciones celulares TCR β^+ , CD11b $^+$ Ly6G $^+$ (neutrófilos), células Fc ϵ RI α^+ , TCR $\gamma\delta^{\text{alto}}$ o TCR $\gamma\delta^{\text{bajo}}$ analizadas en la piel de A. un ratón al que solo se le administró vehículo, B. de un ratón tras 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o C. de un ratón tras 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* A578. D. Porcentajes de diferentes subpoblaciones celulares analizadas en el compartimento hematopoyético (CD45.2 $^+$) recuperado de piel infectada durante 12 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo). E Número total de células pertenecientes a diferentes subpoblaciones recuperadas por cada gramo de piel infectada de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 12 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. D-F Media aritmética y error estándar de un experimento, con $n = 2$ ratones para cada tratamiento distinto. * = $p < 0.05$. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

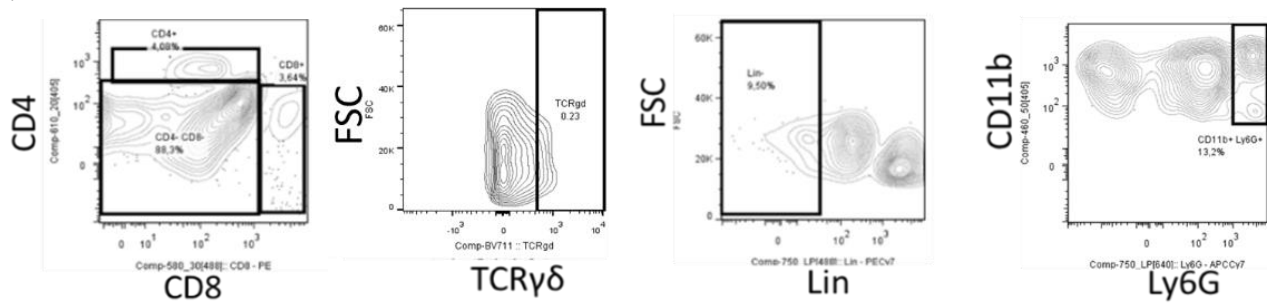
El análisis de las poblaciones celulares presentes en el sitio infectado luego de 24 horas (Fig. 21A-C) nos permitió observar un incremento significativo tanto en el porcentaje de neutrófilos (Ly6G $^+$ CD11b $^+$) (88.136 ± 7.523 %; $p < 0.0001$), como en el número total de estas células recuperadas de la piel infectada con la cepa ATCC 17978 ($2434751.000 \pm 234879.000$ células/g de tejido; $p = 0.0054$), así como con la cepa A578 (62.572 ± 2.950 %; $p = 0.0004$, $2434751.000 \pm 234879.000$ células/g de tejido; $p = 0.0400$) en comparación con ratones que solo recibieron vehículo (4.749 ± 2.792 %, 73825.604 ± 66735.391 células/g de tejido) (Figs. 21D-E). Es importante destacar que el porcentaje de neutrófilos (Ly6G $^+$ CD11b $^+$) observado en la piel de ratones infectados durante 24 horas con la cepa ATCC 17978 es significativamente mayor en comparación con el porcentaje de estas células en la piel de ratones infectados durante 24 horas con la cepa A578 ($p = 0.0259$) (Fig. 21D), sin embargo, en el número total de neutrófilos recuperadas de la piel de ratones infectadas con cada una de las cepas bacteriana, no logramos observar diferencias (Fig. 21E).

A los diferentes tiempos post infección —4, 12 y 24 horas— también se analizaron las diferentes poblaciones celulares, sin considerar si fueron o no productoras de IL-17 en DLNs y NDLNs, así como

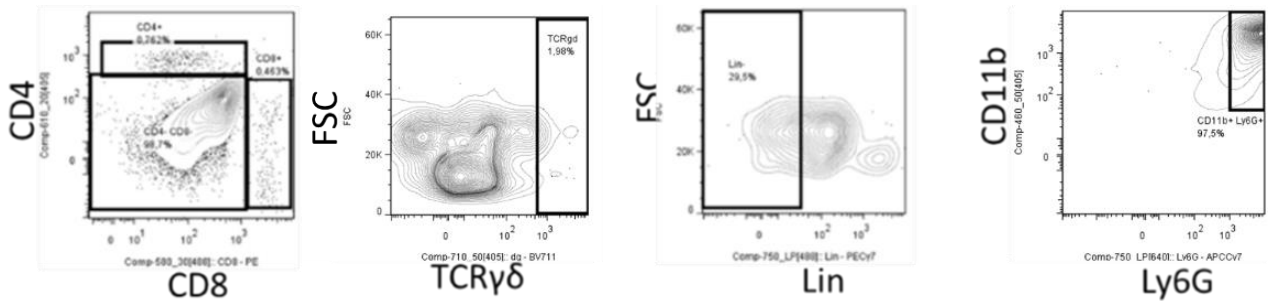
en bazo (Figs. Supl. 5-7). El cambio relevante que pudimos observar en estas poblaciones celulares fue un incremento estadísticamente significativo para el número total de neutrófilos recuperados de los DLNs de ratones infectados durante 24 horas con la cepa ATCC 17978 (1810.550 ± 521.825 células) respecto a los números de esta población celular en los ratones administrados solo con vehículo (100.447 ± 45.252 células; $p = 0.0252$) y respecto al número de neutrófilos recuperados de los DLNs de ratones infectados con la cepa A578 (445.225 ± 269.436 células; $p = 0.0405$) (Fig. Supl. 7B).

Todo lo anterior sugiere que los neutrófilos tienen un papel importante en el control y resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii*.

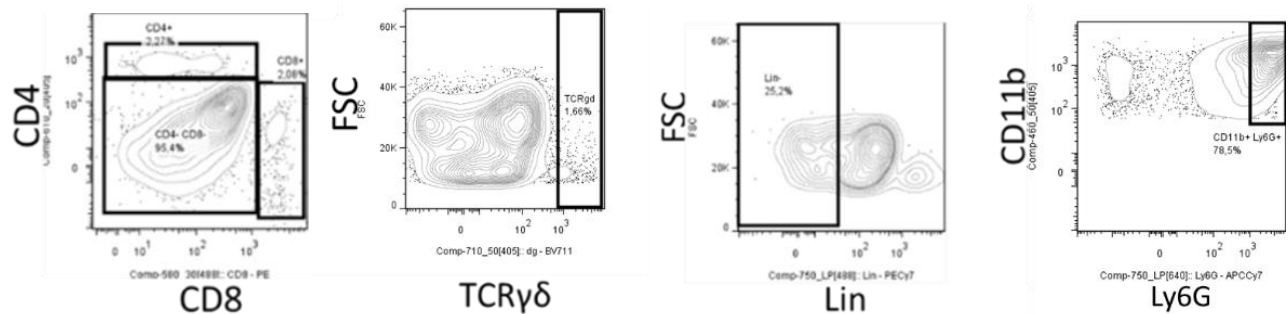
A.



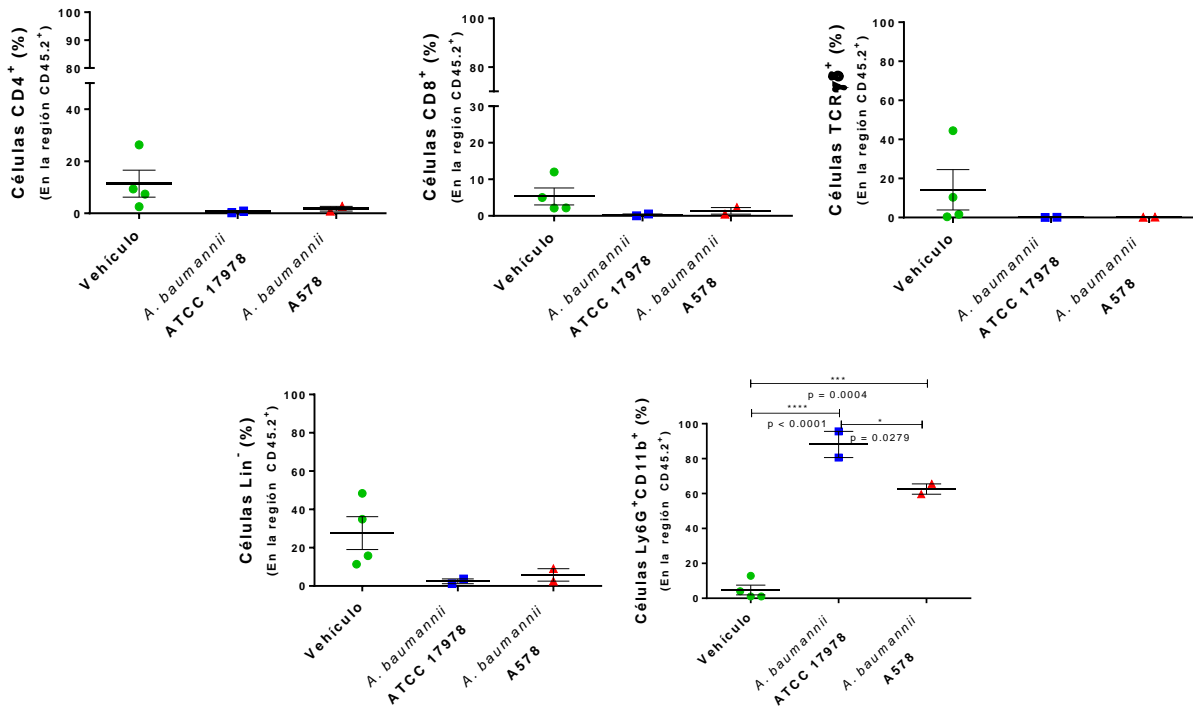
B.



C.



D.



E.

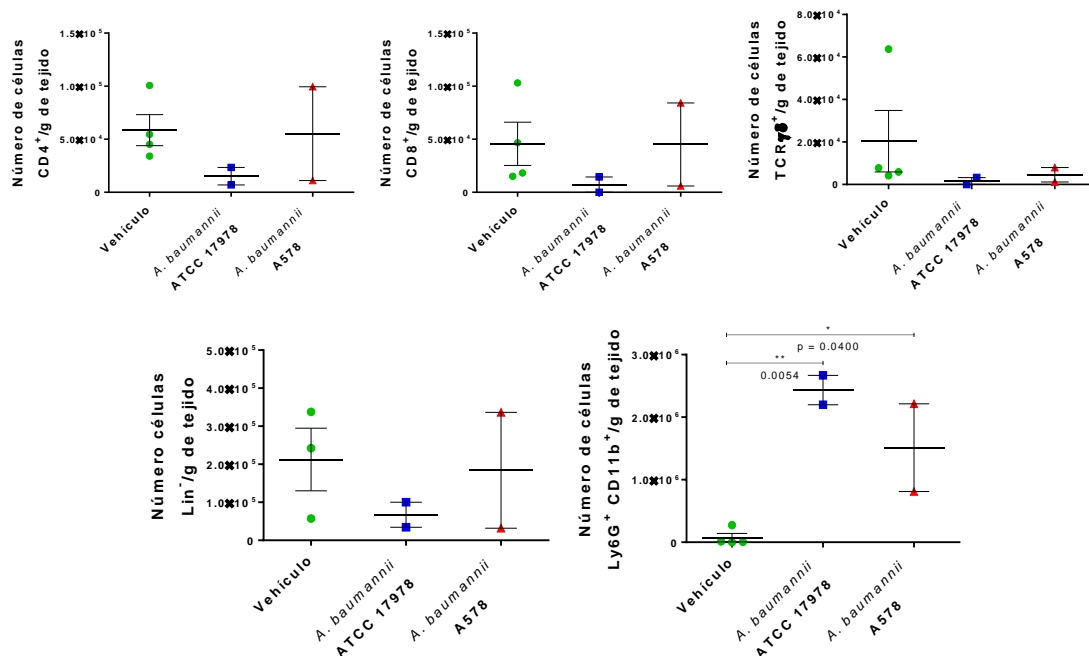


Figura 21. 24 horas después de la infección subcutánea por *A. baumannii* se incrementan los neutrófilos en la zona infectada. A-C. Gráficas de contornos representativas de las poblaciones celulares analizadas en piel de ratones C57BL/6-*I17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 24 horas postinfección. Se muestran gráficas representativas de análisis de las subpoblaciones celulares TCRβ⁺ CD4⁺, TCRβ⁺ CD8⁺, TCRγδ⁺, Lin⁻ o CD11b⁺ Ly6G⁺ (neutrófilos) analizadas en la piel de A. un ratón al que solo se le administró vehículo, B. de un ratón tras 24 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 o C. de un ratón tras 24 horas de infección subcutánea con *A. baumannii* A578. D. Porcentajes de diferentes subpoblaciones celulares analizadas en el compartimento hematopoyético (CD45.2⁺) recuperado de piel infectada de ratones C57BL/6-*I17a*^{tm1Bcgen/J} durante 24 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul), A578 (rojo) o administrado solo con vehículo (verde). E. Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de eGFP como reportera para la expresión de *I17* respecto a los

valores obtenidos para las diferentes subpoblaciones recuperadas de ratones administradas únicamente con vehículo (verde). F. Número total de células IL-17⁺ de diferentes subpoblaciones recuperadas por gramo de piel infectada de ratones luego de 24 horas de infección subcutánea con *A. baumannii*. D-F. Media aritmética y error estándar de 1 experimento, con grupos de n = 1-2 ratones cada uno. * = p < 0.05, ** = p < 0.01. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

8. DISCUSIÓN

A. baumannii es una bacteria patógena oportunista causante infecciones asociadas a la atención sanitaria que ha ganado relevancia por la resistencia a múltiples antibióticos de uso clínico en las cepas de circulación actual en el entorno hospitalario [11, 14].

Esta bacteria Gram negativa es un patógeno, principalmente, extracelular [292-294], para los que se sabe que IL-17 es una citocina proinflamatoria cuya contribución a la resolución de este tipo de infecciones, es relevante, sobre todo, favoreciendo la participación de neutrófilos [146, 295, 296], que son células inmunológicas caracterizadas por poseer elevada capacidad bactericida [297].

Considerando, justamente que, una de las poblaciones celulares inmunológicas que ha demostrado ser crucial para el control y la resolución de infecciones como neumonía, causadas por *A. baumannii*, son los neutrófilos [119, 120, 298] y teniendo en cuenta la relevancia de la participación de IL-17 en la defensa contra patógenos en barreras anatómicas, sobre todo, mediando el reclutamiento de neutrófilos [215, 226, 231], en este trabajo buscamos caracterizar la contribución de IL-17 en el control de la infección por *A. baumannii*. Específicamente, este trabajo está enfocado en identificar el papel de IL-17 en la infección subcutánea por *A. baumannii*, tipo de infección para el que, hasta donde tenemos conocimiento, no se ha caracterizado la respuesta inmunológica contra este patógeno.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la resistencia contra antibióticos en *A. baumannii* es un problema de salud mundial y un elevado porcentaje de los aislados clínicos que circulan en el ambiente nosocomial, tanto a nivel mundial [259, 299, 300] como en México [301, 302, 303], presentan resistencia a múltiples antibióticos, consideramos esencial realizar este trabajo de investigación tanto con la cepa de referencia ATCC 17978 de *A. baumannii*, como con la cepa A578, un aislado clínico resistente a múltiples antibióticos (tabla 2) recuperado del hisopado vertebral de un paciente internado durante el año 2015 en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra” [261]. La cepa referencia ATCC 17978 fue aislada en 1967 [304, 305] y a la fecha es ampliamente utilizada en diversos trabajos de investigación para caracterizar al patógeno, así como para obtener información sobre la interacción con el hospedero [303-309]. Sin embargo, la cepa ATCC 17978, es sensible a muchos de los antibióticos de uso clínico para los que las cepas aisladas en la actualidad suelen presentar resistencia [301, 302]. De manera destacable, algunos de los aislados clínicos actuales que presentan resistencia a múltiples antibióticos también presentan un alto grado de virulencia [108, 109] y, además, algunas de las estructuras bacterianas de *A. baumannii* involucradas en conferir resistencia a antibióticos han mostrado estimular mecanismos de defensa por parte de hospedero [102, 127, 310], por lo que la interacción entre cada una de estas cepas y el hospedero podría ser distinta.

Para determinar la contribución de IL-17 al control y resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* empleamos un modelo en el que inoculamos la bacteria directamente en el tejido subcutáneo

considerando que los pacientes que desarrollan infección en piel y tejido blando por *A. baumannii* presentan pérdida de la continuidad de la barrera de la piel como consecuencia de heridas, quemaduras o procedimientos quirúrgicos [37, 49, 55,311,312].

Este modelo nos permitió identificar la inducción significativa de la transcripción del gen de nuestra proteína de interés, IL-17, desde las dos horas posteriores a la infección con la cepa A578 y el incremento en la concentración de la proteína en el área de la lesión en respuesta a la infección por esta misma cepa bacteriana. Estos procesos, tanto la transcripción como la traducción de IL-17, se indujeron en menor medida tras la infección por *A. baumannii* ATCC 17978 (Fig. 8). Lo anterior sugiere que, si bien la infección por cada una de las cepas puede activar en el hospedero el mismo tipo de moléculas, es posible que la cantidad o el tiempo en el que se inducen éstas impacte sobre la capacidad de resolver exitosamente la infección. Es probable que la intensidad de un mismo tipo de respuesta también se vea afectada por factores presentes en un escenario clínico en el que el paciente esté bajo un régimen antibiótico, puesto que las cepas resistentes podrían estar expresando estructuras que le permitan sobrevivir al estresor que representa el antibiótico [89] y estas mismas estructuras impactar en la magnitud de la respuesta montada por el hospedero [101, 102, 127]. En este punto es importante mencionar que dicha respuesta también dependerá de la condición y comorbilidades del paciente [55, 101, 102, 105, 108, 109], lo que implica que la evolución de la infección tiene influencia multifactorial.

El modelo de infección por *A. baumannii* empleado en este trabajo nos permitió detectar un incremento significativo en el ARNm de *Il17a* tras dos horas de infección con la cepa A578, mientras que, para la infección por esa misma cepa bacteriana, el incremento significativo en la concentración de la proteína en el sitio de infección fue detectado hasta las 12 horas postinfección, para posteriormente, luego de 24 horas postinfección, disminuir (Fig. 8). Esta disminución en los niveles de IL-17 podría estar relacionada con los mecanismos de regulación de la señalización de la proteína, misma que, algunos autores sugieren que ocurre, en parte, a través de la internalización de la citocina unida a la subunidad IL-17RA de su receptor [313, 314]. Posteriormente, luego de 72 horas de infección con la cepa A578, la concentración de IL-17 muestra una tendencia a incrementarse nuevamente, sin que este incremento sea significativo (Fig.8). Desconocemos si a tiempos posteriores el incremento continúa y si pudiera resultar significativo puesto que 72 horas fue el tiempo más tardío al que cuantificamos la proteína (Fig.8).

A partir de 8 horas postinfección con cada una de las cepas bacterianas empleadas en este trabajo, se observa una tendencia a la disminución en la transcripción de *Il17a* respecto al nivel de transcripción basal (Fig. 8). Pese a que esta disminución no es estadísticamente significativa (Fig. 8), es conveniente mencionar que el análisis transcripcional *in vitro* de células epiteliales tras diferentes tiempos de cocultivo con *A. baumannii*, evidenció la regulación a la baja de algunos genes inflamatorios de citocinas, como *Tnf* e *Il1a*, y quimiocinas, como *Cxcl1*, luego de 6 horas de infección [315], y aunque en nuestro análisis la disminución no fue significativa, esta regulación a la baja sí es un cambio que cabría esperarse como efecto de la infección por *A. baumannii*, con base en lo que ha sido reportado en la literatura [315].

Pese a que, biológicamente, cabría esperar una correlación proporcional entre el nivel de ARNm y la abundancia de su proteína [316.], esto no necesariamente ocurre siempre [316, 317], tal como podemos observar en los resultados mostrados en este trabajo respecto al ARNm y de IL-17 a nivel de proteína (Fig. 8). En los resultados mostrados observamos que existe una congruencia en cuanto a que únicamente tras la infección por *A. baumannii* A578 hay un incremento significativo en los niveles de *Il17a* y también hay un incremento significativo en IL-17 a nivel de proteína luego de la infección por *A. baumannii* A578, pero éste se observa hasta las 12 horas postinfección (Fig. 8).

Es importante tener en cuenta que, diferentes procesos celulares afectan el tiempo que transcurre entre la transcripción y la traducción de IL-17. En primer lugar, es importante considerar la estabilidad y tiempo de vida media tanto de los transcritos como de la proteína. De manera general, el ARNm de citocinas es considerado una molécula de vida corta, lo que puede deberse a su rápida degradación, procesamiento o traducción [318]. Lo anterior hace que su detección sea complicada aún mediante el empleo de técnicas altamente sensibles para la detección de ARNm [318]. El tiempo de vida media del ARNm de *Il17a* *ex vivo* se ha calculado entre 36 minutos y 2.98 horas [319, 320], sin embargo, en el caso de nuestro modelo de infección *in vivo*, diferentes mecanismos de regulación postranscripcional podrían estar impactando en el tiempo de vida media del ARNm de *Il17a*. Entre estos mecanismos podrían encontrarse algunos microARNs como miR-21, Let-7e, miR-23b y miR-132, que se han identificado como reguladores postranscripcionales negativos de *Il17a* [321].

Adicionalmente a los microARNs, proteínas de unión a elementos ricos en adenilato-uridilato (ARE-BP, del inglés *AU-rich element-binding proteins*) están involucradas en la regulación de la estabilidad de los ARNm mediante su unión a la región 3' no traducida (3' UTR, del inglés *3' untranslated region*) [321, 322]. Para *Il17a*, se ha identificado que la proteína tristetrapolina participa como ARE-BP reguladora negativa de la estabilidad del ARNm, mientras que la proteína HuR, también mediante la unión a la región 3' UTR del ARNm del *Il17a*, estabiliza los transcritos de esta citocina prolongando su vida media [319]; sería de utilidad evaluar la expresión de estas proteínas para conocer si en el modelo de infección presentado en este trabajo tienen participación en la regulación del ARNm de *Il17a*.

En lo que respecta a IL-17 como proteína y la disminución de los niveles de ésta luego del incremento significativo que se observó luego de 12 horas de infección con *A. baumannii* A578 es importante considerar que diferentes autores coinciden en que tiene un tiempo corto de vida media [323-326]. En suero de ratón, para IL-17 recombinante administrada exógenamente, el tiempo de vida media fue estimado con un valor de una hora [326], mientras que el tiempo de vida media de IL-17 endógena de monos y humanos se calculado con valores de 10 y 22 minutos en suero, respectivamente [324]. Hasta donde tenemos conocimiento, el tiempo de vida media de IL-17 no se ha estimado en otros tejidos, como la piel, sitio donde fue evaluada en este trabajo, de forma que desconocemos el tiempo óptimo aproximado para realizar la cuantificación de la proteína, una vez identificado el incremento de ARNm de *Il17a*.

Por otro lado, factores parácrinos podrían estar contribuyendo a la disminución en los niveles de IL-17 a nivel de proteína, incluidos factores que, río arriba, inducen la transcripción de IL-17, como los niveles de IL-23 o IL-6 [321], para tener una visión más general del microambiente que está contribuyendo a la resolución de *A. baumannii* en nuestro modelo de infección, sería de suma utilidad cuantificar otras citocinas, entre ellas IL-23 e IL-6.

Cabe la posibilidad de que algunos factores de virulencia de la bacteria, como exoproteasas que han mostrado degradar proteínas del hospedero [327], pudieran estar participando en la disminución de la proteína IL-17; aunque también se ha corroborado la participación de exoproteasas propias del hospedero, como las proteasas de serina dependientes de serglicina, en la degradación de IL-17 [328].

Otro de los factores que podría tener un impacto directo en el tiempo en el que puede detectarse IL-17 como proteína en el tejido es la capacidad de almacenamiento intracelular de IL-17 [329]. El almacenamiento de IL-17 dentro de gránulos de IL-17 ha sido detectado en el citoplasma de células en las que, pese a ser evaluada, no pudo evidenciarse actividad transcripcional del gen *Il17a* [329, 330]. Se

ha sugerido que, en células como los neutrófilos, IL-17 es almacenada intracelularmente luego de su transcripción, motivo por el que se sugiere que el incremento en la proteína no siempre esté precedido inmediatamente por incremento en el nivel del ARNm de *Il17a* [330]. Por otro lado, la citocina IL-17 puede secretarse algún tiempo después de haberse mantenido intracelularmente algún tiempo; Takahashi y colaboradores evidenciaron la capacidad de células de Paneth de liberar IL-17 que se mantenía almacenada en gránulos intracelulares al medio extracelular en respuesta a la presencia de TNF- α [329]. En ese mismo trabajo, el incremento en la transcripción de *Il17a* se detectó posteriormente a la liberación de la citocina al medio extracelular [329]. Otros autores [199] han aportado evidencia de que otros tipos celulares como las células cebadas, pueden endocitar IL-17 del medio extracelular, previamente sintetizada por poblaciones celulares distintas, almacenarla por periodos de hasta algunas semanas y posteriormente liberarla en su forma activa [199]. Esta capacidad de almacenamiento de IL-17 dentro de diferentes tipos celulares y los estímulos que permiten su liberación podría tener un impacto en la correlación entre el tiempo de incremento en los transcritos de *Il17* y el tiempo de incremento en la proteína en el tejido.

En algunos modelos de infección bacteriana en los que se ha evaluado tanto la transcripción como la traducción de IL-17 en tejidos murinos, como en segmentos de colon tras la infección por *Clostridium difficile* [331], así como en córneas infectadas con *P. aeruginosa* [331, 332], se reportado incremento en la concentración IL-17 a nivel de proteína, sin que previamente pudiera evidenciarse un incremento en los niveles de ARNm [331, 332], y pese a que en estos trabajos no se discuten los posibles elementos involucrados en esta observación, consideramos que, diferentes factores podrían estar participando, desde cuestiones metodológicas como los tiempos a los que se cuantifican el ARNm y la proteína, hasta procesos moleculares como los mecanismos de regulación postranscripcional que ya se mencionaron, así como mecanismos moleculares activados específicamente en respuesta a la infección. Desde luego, cabe la posibilidad de que algunos de estos mecanismos pudieran estar participando en la regulación de la transcripción y en los niveles de proteína de IL-17 en nuestro modelo de infección.

Dentro de la familia de citocinas de IL-17, IL-17F es la que presenta mayor identidad a nivel estructura proteica primaria con nuestra citocina de interés, IL-17. Además, se ha reportado que ambas citocinas tienen funciones muy similares durante infecciones bacterianas como las causadas por *C. rodentium* o por *S. aureus* [271]. Algunas de estas funciones, podrían resultar importantes para el control de la infección por *A. baumannii*, como la inducción de quimioatrayentes de neutrófilos y la inducción de citocinas inflamatorias [333.], de forma que consideramos importante evaluar la inducción de la transcripción y traducción de IL-17F para obtener una idea sobre su posible participación en el control de la infección subcutánea de *A. baumannii*.

En primer lugar, es necesario resaltar que los resultados que se presentan en este trabajo respecto a la cuantificación de *Il17f* y su proteína corresponden a un experimento (Fig. 9), de forma que es esencial obtenerse de estos resultados son preliminares y es necesario realizar réplicas de los experimentos de cuantificación tanto del mensajero como de la proteína para poder verificar los hallazgos que se presentan en este trabajo.

Los resultados preliminares que se presentan en este trabajo sugieren que IL-17F pudiera estar contribuyendo al control de la infección subcutánea por *A. baumannii*, ya que los niveles de proteína se incrementaron en el sitio afectado tras la infección (Fig. 9). Y si bien, el incremento en la transcripción tras la infección no alcanza a ser estadísticamente significativo, dicha inducción podría contribuir al aumento en el nivel de proteína que observamos y que, en los limitados datos que presentamos de

momento, sí resultó estadísticamente significativo; esto es consistente con los tiempos previamente reportados entre el incremento en los niveles de ARNm y de proteína para IL-17F tras la estimulación con productos bacterianos (LPS) [333].

En nuestros resultados preliminares generados al momento, a nivel de proteína, observamos que IL-17F, se incrementa significativamente en el área de infección luego de 8 horas de la inoculación con cada una de las cepas de *A. baumannii* empleadas en este trabajo y dichos niveles se mantienen elevados durante las primeras 72 horas postinfección (Fig. 9). Desafortunadamente, debido a que no realizamos cuantificación de la proteína más allá de 172 horas postinfección, no es posible determinar cuánto tiempo le toma a la proteína retornar a niveles basales, para realizar esta determinación tendríamos que incluir puntos posteriores en la cinética de cuantificación de esta citocina.

El hecho de que hayamos identificado niveles incrementados de IL-17F dentro de las primeras postinfección sugiere que la citocina pudiera estar siendo producida constantemente, aunque aún es necesario determinar qué población o poblaciones celulares pudieran estar produciéndola dentro de este periodo de tiempo y determinar el papel específico de esta citocina en la resolución de la infección.

Cabe mencionar que, previamente, la participación de IL-17F en la resolución de la infección cutánea por algunas bacterias, como *S. aureus* ha sido descrita [229, 271] y pese a que nuestros resultados preliminares sugieren la participación de esta citocina en la resolución de la infección cutánea causada por *A. baumannii*, corroborar la participación de esta proteína en este proceso de defensa contra *A. baumannii*, es necesario llevar a cabo una investigación experimental extensa y minuciosa para determinar el papel preciso de esta proteína y los mecanismos a través de los cuales pudiera estar contribuyendo a la defensa contra nuestro patógeno de interés. Considerando que IL-17 e IL-17F tienen elevada similitud en cuanto a estructura y función, al determinar el papel de IL-17F en la infección cutánea por *A. baumannii* es altamente recomendable el empleo de ratones deficientes específicamente para esta molécula.

Pese a que en nuestros resultados observamos que tanto la concentración de IL-17 como la de IL-17F se incrementan en el sitio infectado con *A. baumannii*, no logramos identificar que la formación del heterodímero IL-17A/IL-17F se incrementara sobre los niveles basales en respuesta a la infección, más bien encontramos que en algunos puntos postinfección, el heterodímero disminuyó (Fig. 9). Estas fluctuaciones a la baja podrían, muy probablemente, estar influenciadas por la cinética de producción de los monómeros de IL-17 e IL-17F, así como por la cinética de formación de los homodímeros de esas citocinas [335], aunque esta disminución también podría deberse a la cinética de unión del heterodímero a sus receptores, que a su vez está influenciada por la afinidad de los homodímeros a los receptores. Es importante mencionar que ni la afinidad de los dímeros por sus receptores, ni la de unión entre monómeros, han sido caracterizadas para moléculas de ratón [336, 337].

Es muy importante dejar en claro que, de manera similar a los resultados mostrados para IL-17F, los resultados de la cuantificación de la proteína heterodimérica IL17A/IL-17F mostrados en este trabajo fueron generados a partir de un solo experimento (Fig. 9), por lo que es necesario considerarlos resultados preliminares y es indispensable. realizar un mayor número de experimentos en los que se realice la cuantificación del heterodímero con muestras provenientes de experimentos independientes. Adicionalmente, un elemento que evidencia la necesidad de realizar réplicas de estos experimentos es el hecho de que en los resultados obtenidos se observa una tendencia inesperada a que los niveles del heterodímero de IL-17A/IL-17F al tiempo cero de la infección sean menores en comparación con la concentración de dicha molécula en ratones que solo fueron administrados con el vehículo (Fig. 9).

Considerando que el tiempo cero es un tiempo muy temprano para observar un efecto sobre los niveles del heterodímero como consecuencia de la infección, cabría esperarse que el grupo administrado con el vehículo, así como el tiempo cero tras la infección por cada una de las cepas bacterianas tuvieran niveles muy similares en cuanto a la concentración de IL-17A/IL-17F. De momento, con los resultados generados en este trabajo, no es posible descartar la participación del heterodímero en la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* pero aún es necesario realizar más determinaciones para concluir al respecto.

De acuerdo con Liang y colaboradores, la formación *in vitro* del heterodímero IL-17A/IL-17F de ratón está influenciada por las citocinas presentes en el medio, y es variable incluso para un mismo tipo celular cuando es evaluada a diferentes tiempos [335]. En ese mismo trabajo los autores identificaron que la transferencia adoptiva y la estimulación antigénica *in vivo* de células Th17 diferenciadas *in vitro*, resultó en un cambio en la proporción de la formación del heterodímero y los homodímeros respecto a la que muestran *in vitro* [335], los hallazgos realizados por Liang y colaboradores sugieren que el microambiente tiene un papel importante en la modulación de la formación del heterodímero, lo que podría explicar las fluctuaciones que observamos en el área de la lesión durante la infección por *A. baumannii* (Fig. 9). La contribución del heterodímero al control y la resolución de infecciones ha sido poco explorada, aunque algunos estudios sugieren que podría contribuir al control de patógenos extracelulares como *C. albicans* [338], pero, de acuerdo con nuestros resultados preliminares mostrados en el presente trabajo, es poco probable que el heterodímero contribuya importantemente a la resolución de la infección por *A. baumannii*, al menos en el intervalo de tiempo que comprende las primeras 72 horas posteriores a la infección subcutánea por este patógeno. Aunque, por otro lado, considerando los resultados generados por Liang y colaboradores [335], el heterodímero IL-17A/IL-17F podría resultar relevante en control de una infección secundaria por *A. baumannii*, donde otros tipos celulares, como linfocitos Th17 podrían contribuir a la producción de la molécula heterodimérica.

A partir el monitoreo de la supervivencia de ratones infectados pudimos corroborar la importancia de la vía de inoculación de *A. baumannii* en la severidad de la patología y en letalidad de diferentes tipos de infección causados por una misma cepa bacteriana (Fig. 10). Esta característica ya había sido previamente reportada [264] y resulta importante en cuanto a *A. baumannii* puesto que esta bacteria es capaz de causar diferentes tipos de infección [339], para los que, evidentemente, no solo la patología, sino las interacciones patógeno hospedero pudieran ser muy diferentes dependiendo del o los sitios anatómicos afectados por la bacteria.

La evaluación de la supervivencia tras la infección por *A. baumannii* nos permitió determinar que, a diferencia de la infección i.p., la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 ni por A578 es letal en ratones C57BL/6 (Fig. 10). Para infecciones en piel y tejido blando ocasionadas por *A. baumannii* en humanos, tasas de mortalidad de hasta 28 % han sido reportadas [37]; porcentaje que no resulta despreciable. Respecto a estas diferencias es importante mencionar que los ratones C57BL/6 son inmunocompetentes, condición que no comparten muchos de los pacientes que cursan con infecciones por *A. baumannii* [55, 340]. Considerando lo anterior, algunos de los estudios que se realizan para estudiar la patología de la infección por *A. baumannii* emplean estrategias que llevan a la inmunosupresión, como el uso de ciclofosfamida [341] o mucina porcina [342], sin embargo, en este trabajo descartamos el uso de agentes inmunosupresores puesto que nos interesó evaluar la contribución de IL-17 a los mecanismos inmunológicos relevantes para la resolución de la infección.

Es importante destacar que, la administración intraperitoneal se emplea como modelo de sepsis [343], condición en la que se presenta una excesiva respuesta inflamatoria ante la presencia de

microorganismos, lo que fácilmente conduce a la muerte debido a la alta capacidad de intercambio de fluidos y algunos factores solubles para mantener el balance entre las presiones hidrostática y oncótica en la cavidad abdominal [344, 345]. Existe evidencia en la literatura de que infecciones en la piel presentan una mortalidad menor en comparación con infecciones intraperitoneales causadas por un mismo microorganismo [346]; adicionalmente también se ha reportado que la letalidad como consecuencia de infecciones primarias de la piel se puede presentar luego de varios días tras la infección por algunos patógenos [347], pero no parece ser el caso de *A. baumannii* (Fig. 10).

A través de la infección subcutánea llevada a cabo en ratones IL-17A/F KO determinamos que el control de la infección subcutánea por *A. baumannii* no requiere de la presencia de ninguna de estas dos citocinas, puesto que estos ratones, similar a lo observado para los ratones WT, tampoco perecieron a consecuencia de la infección subcutánea por *A. baumannii* (Fig. 10).

Una de las limitaciones de nuestro modelo en cuanto al análisis específico de la contribución de IL-17 al control y resolución de la infección deriva del empleo de un ratón IL-17A//F KO, deficiente tanto para IL-17 como para IL-17F [263]. Para evaluar, estrictamente la participación de cada citocina (IL-17 e IL-17F) en el control de la infección subcutánea causada por *A. baumannii*, sería recomendable emplear ratones que solo sean deficientes para cada una de estas citocinas a la vez o podrían administrarse citocinas recombinantes, una a la vez, en ratones deficientes para ambas citocinas.

En este trabajo identificamos que ni IL-17 ni IL-17F son necesarias para controlar la infección ya que los ratones deficientes de ambas citocinas sobreviven a la infección subcutánea, sin embargo, nuestros resultados sugieren que IL-17 y/o IL-17F influyen en la severidad de la patología (Fig. 11). Los parámetros que evaluamos para conocer la morbilidad de la infección fueron el peso corporal de los ratones y el tamaño de la lesión a diferentes tiempos después de la infección subcutánea (Fig. 11).

Al evaluar la pérdida de peso tras la infección observamos que los ratones WT infectados, independientemente de la cepa bacteriana empleada, así como los ratones IL-17A/F KO infectados con la cepa ATCC 17978 sufrieron pérdida de peso significativa durante los primeros tres días posteriores a la infección, sin embargo, a los ratones IL-17A/F KO les tomó mayor tiempo recuperar el peso que mostraban el día de la infección (Fig. 11A-B). Esto sugiere que la presencia de IL-17 contribuye al desarrollo de una patología menos severa durante la infección por *A. baumannii* A578, mientras que la morbilidad causada por la cepa ATCC 17978 es menor en comparación con la causada por la cepa A578 y, al menos a nivel de pérdida de peso, no se ve influenciada por la participación de IL-17 (Fig. 11A).

Para tener una visión más amplia del impacto de IL-17 en la morbilidad causada por la infección cutánea por *A. baumannii*, evaluamos el área de la lesión desarrollada durante la infección encontrando que la lesión generada durante la infección causada por la cepa ATCC 17978 mostró tener un área menor que la generada por la cepa A578, independientemente de IL-17 (Fig. 11D-E, Fig. Supl. 1D-E), sin embargo, nuestros datos sugieren que IL-17 contribuye a que la pronta cicatrización de la herida causada por *A. baumannii* ATCC 17978 (Fig. 11D).

Por otro lado, los datos presentados en este trabajo sugieren que IL-17 tiene un papel detrimental en el tamaño de la herida provocada por la infección subcutánea por la cepa A578, ya que el área de la lesión a los 9, 10 y 11 días postinfección fue mayor en ratones WT en comparación con ratones IL-17A/F KO (Fig. 11E), sin embargo, en lo que respecta a las lesiones generadas por la cepa A578, los datos presentados en este trabajo no nos permiten identificar si IL-17 participa en acelerar el cierre de la herida, puesto que el lapso durante el que se evaluó el tamaño de la lesión no permite identificar el tiempo al que

este proceso ocurre (Fig. 11E), para ello sería necesario ampliar el tiempo de evaluación del tamaño de las lesiones en ratones suficientes y deficientes de IL-17.

En este punto es importante mencionar que de momento no cuantificamos la profundidad de las lesiones, por lo que no podemos concluir respecto a la capacidad que cada una de las cepas bacterianas tienen para provocar daño en capas más profundas de la piel e incluso en tejidos subyacentes, y por ello desconocemos si IL-17 tiene un papel relevante en el daño a dichos tejidos, que dicho sea de, difieren en su estructura anatómica respecto a los estratos más superficiales de la piel paso [348. 349], por lo que bien podrían tener una susceptibilidad distinta a la bacteria e IL-17 impacto distinto en estos procesos. Además, el evaluar la profundidad junto con el área superficial de las lesiones, permitiría obtener un registro más exacto del tamaño de la lesión. Una sugerencia para evaluar la profundidad de las lesiones, realizar el análisis microscópico de cortes histológicos de las lesiones de los diferentes grupos de tratamiento.

Considerando que, de entre los grupos de tratamiento, los ratones IL-17A/F KO infectados con la cepa A578 mostraron mayor morbilidad reflejada en un intervalo de tiempo más prolongado para recuperar el peso que tenían antes de la infección, que en ratones WT infectados con la cepa ATCC 17978, la lesión generada como consecuencia de la infección persiste durante un mayor periodo en comparación con la lesión de ratones IL-17A/F KO infectados con esa misma cepa bacteriana y que ratones IL-17A/F KO desarrollaron una lesión de mayor tamaño (Fig. 11), nuestros datos sugieren que la contribución de IL-17 a la morbilidad por la infección subcutánea es dependiente del parámetro evaluado. Es importante que la pérdida de peso como indicador de la severidad de la patología es un parámetro sistémico, mientras que la evaluación de la lesión es un proceso localizado, de forma que IL-17 podría tener un papel distinto en la morbilidad a nivel local y a nivel sistémico. Previamente ha sido reportada en la literatura la contribución de IL-17 a una pérdida de peso más severa durante infecciones pulmonares bacterianas y virales, lo que ha sido asociado a un elevado infiltrado de neutrófilos al sitio de infección [350], sin embargo, nuestros resultados muestran una pérdida de peso más severa en ausencia de IL-17 para la infección cutánea por la cepa A578. Las diferencias entre nuestros hallazgos y los reportes previos en la literatura [350, 351] podrían deberse, en primer lugar, a la ruta de infección empleada en cada caso, ya que las diferencias anatómicas y funcionales entre la piel y el pulmón permiten que la interacción sistémica para cada uno de estos órganos sea distinta, es importante considerar la alta queratinización de la piel, así como la presencia de una matriz rica en múltiples componentes lipídicos [352]. Adicionalmente, la composición celular y molecular de cada tejido podrían generar interacciones patógeno-hospedero, así condiciones de microambiente específicas que favorezcan o no la diseminación sistémica [353] y esto impactar en la morbilidad a nivel sistémico, reflejándose en la pérdida de peso.

Por otro lado, tomando en cuenta que, en el sitio de la infección, la lesión generada por la cepa ATCC 17978 permaneció visible por más tiempo en ausencia de IL-17 y la lesión ocasionada por la cepa A578 fue de mayor tamaño en ausencia de IL-17 (Fig. 11C-E), lo que sugiere que esta citocina tiene un impacto negativo en el daño al tejido a nivel local durante la infección por *A. baumannii*, al menos en la infección causada por cada una de las cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Respecto al papel de IL-17 en el cierre de heridas, diferentes trabajos han encontrado resultados contradictorios. Mientras que algunos estudios sugieren que IL-17 favorece el proceso de reparación de herida [354], otros han encontrado que IL-17, dificulta el cierre de la misma [355].

MacLeod y colaboradores encontraron que, en un modelo de cierre de herida, la herida inducida en ratones deficientes de IL-17 tardaba un mayor tiempo en cerrar en comparación con el tiempo que les tomaba este proceso a ratones WT, además de que esta diferencia era abolida cuando a los ratones deficientes de la citocina, se le administraba IL-17 recombinante en el área de la lesión [354].

Por otro lado, se ha descrito que, durante el proceso de cierre de heridas, IL-17 inhibe la producción del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1, de inglés *Insulin-like growth factor*) por DETCs, lo que retarda el proceso de cierre de herida [356], adicionalmente, IL-17, dificulta el cierre de herida a través de la disminución de la deposición de colágeno y del reclutamiento de neutrófilos, mismos que a través de la elastasa, dificultan el proceso de cierre de herida [355].

Es importante considerar que, en el modelo empleado en este trabajo, el microambiente en el sitio de la infección es complejo en comparación con algunos de los estudios en los que se ha evaluado el papel de IL-17 al cierre de la herida, en donde las lesiones se presentan en ausencia de patógenos [357] y que, en nuestro caso, la bacteria es definitivamente es un factor determinante en el proceso del desarrollo y resolución de la lesión. Para poder conocer el o los mecanismos a través de los cuales, en el modelo de infección subcutánea por *A. baumannii*, IL-17 participa en el desarrollo y resolución de la herida, es recomendable realizar el análisis comparativo del infiltrado celular, sobre todo de neutrófilos [355] en el sitio de infección en ratones WT e IL-17A/F KO. También sería de suma utilidad evaluar, a nivel histológico y molecular los componentes involucrados en la reparación tisular, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) y algunas metaloproteinasas como MMP-1 y MMP-9 [358] y sería de utilidad realizar un análisis microscópico de cortes histológicos —sometidos a una tinción tricrómica de Masson, que permite observar colágeno [359]—, provenientes del tejido de ratones tanto WT como IL-17A/F KO infectados con *A. baumannii*. También para explorar la contribución de IL-17 en el cierre de la herida tras la infección por *A. baumannii*, sería de gran utilidad realizar un análisis molecular completo y sin sesgo como el que proporcionaría una secuenciación de ARN (RNAseq).

Nuestros resultados muestran que, adicionalmente a la contribución de IL-17 a la severidad de la lesión, la cepa A578 de *A. baumannii* causa infección subcutánea con patología más severa que *A. baumannii* ATCC 17978. Esto sugiere que alguna característica propia de la cepa A578, ausente en la cepa ATCC 17978, podría estar contribuyendo al incremento de la morbilidad a nivel local. Considerando que las bacterias son organismos complejos con múltiples antígenos [360] y factores de virulencia [361], y que el genoma de *A. baumannii* presenta alta plasticidad, cabe esperar que la interacción con el hospedero sea distinta para cada cepa bacteriana y que IL-17 tenga efectos distintos en la infección con cada una de las cepas que se emplearon en el presente trabajo. En concordancia con esto, previamente se han reportado diferencias significativas en la cantidad de citocinas que distintas variantes de una misma cepa bacteriana de *A. baumannii* son capaces de inducir en el hospedero [362]. De momento no contamos con el análisis del genoma de la cepa A578 de *A. baumannii* y desconocemos qué moléculas podrían estar contribuyendo al desarrollo de una lesión mayor, pero es posible que existan factores de virulencia que pudieran diferir o estar ausentes en la cepa ATCC 17978 y que en la cepa A578 sean los responsables de agravar la lesión. Los factores de virulencia candidatos podrían ser no solo proteasas [363], sino proteínas de membrana externa, para las que se ha corroborado que inducen muerte celular en el hospedero [364, 365].

Con base en nuestros resultados podemos sugerir que el papel de IL-17 en la morbilidad es complejo y, hasta este punto, nuestros resultados no nos permiten determinar la contribución exacta de IL-17 a la severidad de la infección subcutánea por *A. baumannii*.

Otro de los factores que pudiera estar involucrado con el desarrollo de una lesión más severa durante el modelo de infección con el que trabajamos, es la carga bacteriana, además de que, también mediante la cuantificación de la carga bacteriana podría determinarse si IL-17 contribuye a la pronta resolución de la infección subcutánea. Debido a lo anterior llevamos a cabo el conteo de la UFC a diferentes tiempos luego de la administración subcutánea de cada una de las cepas de *A. baumannii*. De momento hemos realizado la cuantificación bacteriana para un mayor número de puntos postinfección en ratones WT, puesto que durante el desarrollo de este trabajo enfrentamos dificultades para expandir la colonia de ratones IL-17A/F KO, sin embargo, estamos conscientes de que para poder determinar el impacto de IL-17 sobre el control y la resolución de la infección, es necesario realizar la cuantificación de la carga bacteriana en ratones IL-17A/F KO.

Lo resultados que hemos obtenido al momento sugieren que la ausencia IL-17 impacta negativamente en el tiempo de resolución de la infección por la cepa A578 (Fig. 14), ya que cuando cuantificamos la carga bacteriana luego de 16 o 20 días postinfección en la piel de ratones WT o IL-17A/F KO, solo recuperamos *A. baumannii* A578 de los ratones IL-17A/F KO (Fig. 14). Sorprendentemente, aunque los ratones IL-17A/F KO tardan más tiempo en resolver la infección, y aunque desconocemos a qué tiempo ocurre esto, pues sería necesario cuantificar la carga bacteriana a tiempos posteriores, los ratones IL-17A/F KO fueron capaces de mantener localizada la infección (Fig. 15), de manera similar a lo ocurrido en ratones WT (Fig. 13). Esto sugiere que, IL-17 e IL-17 F no son necesarias para evitar la diseminación sistémica de *A. baumannii* a partir de una infección subcutánea primaria.

En el caso de la cuantificación bacteriana en sangre y bazo de ratones WT infectados, en algunos puntos de tiempo pude observarse la presencia de bacterias, la que, si bien no es una carga bacteriana significativamente mayor respecto a ratones no infectados, la cuenta de UFC es mayor que cero (Fig. 13). Es importante mencionar que, de este grupo de tratamiento no se recuperaron bacterias de todos los ratones y, en algunos casos, para un mismo ratón, no se recuperó bacteria en ambos tejidos. Considerando estos aspectos, es posible que existan algunos aspectos metodológicos durante el experimento que puedan mejorarse. Entre los detalles técnicos que pueden reducir la presencia de datos atípicos están, el incrementar el volumen de tejido disgregado y de sus diluciones seriadas sembradas en cada placa, como sugiere el trabajo publicado por Sanders [366]. Un aspecto más que merece la atención dentro de los resultados de cuantificación bacteriana que hemos generado al momento es que, la mayoría de las muestras positivas para crecimiento bacteriano, tanto de bazo como de sangre, fueron positivas para el crecimiento de muy pocas colonias (menos de 30 por placa) aún en muestras sin diluir, lo que algunos autores refieren que está por debajo del límite de detección del método de recuento en placa ya que bajos conteos de colonias, se asocian con una gran variabilidad [367].

Otro aspecto que no debemos pasar por alto es que, durante los experimentos de carga bacteriana, el conteo de las colonias se realizó con base en la morfología de las colonias sobre un medio nutricional rico como es el agar LB, es decir que se tomaron en cuenta colonias lisas mucoides, color amarillo pálido, congruentes con la morfología de colonias de *Acinetobacter spp.* [368, 369], sin embargo, no corroboramos que, efectivamente, estas colonias correspondieran a bacterias del género *Acinetobacter* mediante el cultivo de éstas en medios selectivos, pruebas bioquímicas o moleculares [370], para que, dado el bajo conteo, se pudiera descartar la posible contaminación por un microorganismo distinto al patógeno estudiado. Adicionalmente, un aspecto en el que debe ponerse atención durante la realización

de los experimentos de cuantificación de carga bacteriana es evitar exponer los tejidos recuperados a un ambiente no controlado, porque si bien, los tejidos se disgregaron dentro del área aséptica creada alrededor de la flama del mechero [371], el aire ambiental en el lugar de trabajo no está sometido a ningún tipo de purificación, además de que la disgregación de los tejidos se realizó con un mismo homogenizador, no podemos descartar el arrastre de contaminación entre una muestra y otra pese a que el homogenizador fue sometido a lavados entre cada una de las muestras. Para minimizar este tipo de contaminación es recomendable realizar la disgregación de cada una de las muestras bajo hermeticidad [367].

Tomando en cuenta todo lo anterior, consideramos que es necesario realizar experimentos adicionales para tener una cinética de resolución lo suficientemente robusta y bajo condiciones técnicas más estrictas que nos permitan corroborar o descartar la diseminación de las diferentes cepas bacterianas de *A. baumannii* hacia los diferentes órganos del hospedero. Aún es necesario realizar réplicas de los experimentos de cuantificación de carga bacteriana no solo para algunos tiempos de los ratones WT sino también en ratones IL-17A/F KO para determinar el impacto de la ausencia de IL-17 en la velocidad de la resolución de la infección.

Reiteramos que es esencial realizar más experimentos para concluir sobre las similitudes o diferencias en el tiempo de resolución de la infección entre las cepas bacterianas A578 y ATCC 17978, aunque los resultados generados al momento, sugieren que la resolución de *A. baumannii*, ocurre de manera similar para ambas cepas bacterianas en presencia de IL-17 (en ratones WT) (Fig. 12), independientemente de que la cepa A578 produce una patología más severa (Fig.11).

Desafortunadamente, desconocemos el impacto de IL-17 durante la cinética de la resolución, puesto que, al momento solo hemos cuantificado la carga bacteriana en ratones IL-17A/F KO tras 16 y 20 días post infección. De manera preliminar, estos datos sugieren que IL-17 y/o IL-17F favorecen la pronta resolución de la infección causada por la cepa A578 (Fig. 14).

Los resultados preliminares de la cinética de resolución sugieren que tanto factores propios de la cepa bacteriana, como la ausencia de las citocinas IL-17 e IL-17 F impactan sobre el tiempo de resolución, haciéndolo más prolongado. Estos datos también sugieren que IL-17 y/o IL-17 F, aunque no son esenciales para el control y la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii*, alguna de éstas o ambas citocinas contribuyen a llevar a cabo una rápida resolución de la infección causada por la cepa A578.

Valdría la pena realizar una cinética de carga bacteriana en ratones IL-17A/F KO que incluya más puntos de tiempo y determinar si la resolución de la infección ocurre de manera diferente en comparación con ratones WT y también establecer el punto en el que se resuelve la infección en los ratones IL-1A/F KO. Desafortunadamente, nuestro trabajo aún no incluye estos datos por las dificultades con la reproducción de la cepa, y dentro del tiempo de desarrollo de esta tesis no conseguimos obtener suficientes animales para realizar los protocolos de experimentación suficientes.

Considerando que múltiples subpoblaciones hematopoyéticas, como linfocitos Th17, Tc17, células TCR $\gamma\delta^+$, ILC3, NKs, iNKTs, neutrófilos, M ϕ s, células cebadas, monocitos e incluso células dendríticas han sido reportadas previamente como productoras de IL-17 en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas [136-138, 162], consideramos importante identificar la fuente celular de IL-17 durante la infección subcutánea por *A. baumannii*, para lo que llevamos a cabo la inoculación subcutánea de la

bacteria en un ratón reportero de *III7a* y el posterior análisis por citometría de flujo de las células recuperadas de la piel luego de 4, 12 o 24 horas postinfección.

Es necesario destacar que para realizar el análisis citométrico de diferentes poblaciones celulares en el sitio de infección enfrentamos algunas dificultades. Una de estas circunstancias fue la recuperación de un número muy bajo de células hematopoyéticas a partir de la piel de ratón. A fin de incrementar el número de células hematopoyéticas recuperadas de piel tras la infección realizamos diversos protocolos para digerir la piel. En un principio, realizamos la digestión del tejido con colagenasa (Collagenase from *Clostridium histolyticum*) (Sigma) seguida de la centrifugación de las células en un gradiente de densidad elaborado con Optiprep® (Axis-Shield) al 27.5 % en tricina 30 nM. Posteriormente identificamos que la digestión de la piel de ratón con Liberasa T® (Roche) resulta en una mejoría en el rendimiento de las células hematopoyéticas recuperadas (Tabla suplementaria 2), por lo que optamos por seguir dicho protocolo.

Otra de las dificultades que enfrentamos al tratar de identificar la fuente celular de IL-17 a los diferentes tiempos postinfección mediante citometría de flujo, fue la elevada autofluorescencia basal de la piel dada por los componentes elásticos del tejido, como la elastina y el colágeno, tipos I y IV [372, 373]. En el caso particular del colágeno, su espectro de emisión es muy amplio de, entre 400 y 600 nm [372, 373], coincidiendo con la señal emitida por la eGFP [374] y dificultando la identificación de los eventos positivos para IL-17.

Otra situación que complicó el análisis de las poblaciones celulares fue el hecho de que, en algunos canales, la autofluorescencia del tejido se incrementó tras la infección bacteriana aún en ausencia de anticuerpos acoplados a fluorocromos (Fig. Supl. 9).

Tomando en cuenta que diferentes poblaciones celulares residentes en piel, así como poblaciones reclutadas al sitio infectado son células potencialmente productoras de IL-17 [136-138, 162], consideramos diseñar un panel de anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos que nos permitiera distinguir la mayor cantidad de células productoras de IL-17, lo que implicó el uso simultáneo de diversos fluorocromos, algunos de cuyas señales llegaron a traslaparse, motivo que nos dificultó realizar una adecuada compensación de la señal y, por lo tanto, la identificación precisa de las diferentes poblaciones celulares [375].

Debido a la elevada fluorescencia basal del tejido que observamos durante la adquisición de las células en el citómetro, al cambio en dicha fluorescencia como resultado de la infección (Fig. Supl. 9) y a la dificultad para realizar una adecuada compensación de la señal de los fluorocromos en los distintos canales, decidimos probar algunas metodologías alternativas para tratar de reducir el traslape de las señales. En algunos experimentos redujimos el número de marcadores evaluados con el fin de realizar con precisión la identificación de las diferentes poblaciones presentes en el sitio de infección. Este es uno de los motivos por los que no en todas las figuras que se incluyen en este trabajo existe el mismo número de individuos evaluados para las diferentes poblaciones celulares, ya que no en todos los experimentos se empleó el mismo panel de anticuerpos para realizar las tinciones (Figs. 16, 18, 19, 21, Figs. Supl. 5, 7). Lo anterior, claramente, dificulta el análisis estadístico y por ello y debido a que tenemos una cantidad muy baja de individuos analizados para cada una de las poblaciones y un número bajo de eventos en las regiones analizadas, consideramos de vital importancia incrementar el número de experimentos, analizando las mismas poblaciones celulares en cada uno de ellos para poder realizar conclusiones estadísticas.

No debe pasarse por alto que el hecho de no emplear el mismo panel de anticuerpos acoplados a los mismos fluorocromos en todos los experimentos realizados, no nos permitió seguir la misma estrategia de análisis para los diferentes tiempos postinfección que aquí se muestran (Figs. Supl. 2-4), lo que es un motivo más que dificulta realizar comparaciones estadísticas y concluir sobre las poblaciones celulares. En relación con los diferentes paneles de anticuerpos utilizados, es relevante destacar, por un lado, que en diferentes experimentos modificamos dichos paneles para tratar de disminuir la interferencia de las señales entre los diferentes canales, pero también la disponibilidad de los diferentes equipos empleados para adquirir las muestras influenció la elección del panel de anticuerpos empleados y los fluorocromos acoplados a los mismos, ya que los diferentes equipos no cuentan con los mismos detectores, ni con los mismos láseres de excitación.

Otra metodología alternativa que llevamos a cabo para tratar facilitar el análisis celular mediante citometría de flujo fue realizar tinción intracelular para detectar IL-17, pero los resultados que obtuvimos a partir de esta metodología dificultaban aún más detectar cambios en la producción de IL-17 tras la infección, en comparación con los grupos de ratones no infectados (datos no mostrados). Es importante no descartar esta observación, puesto que la tinción intracelular detecta directamente la presencia de la proteína, a diferencia del ratón reportero de la transcripción de *Il17a* que se empleó para la generación de los resultados que aquí se muestran, aunque vale la pena señalar que tampoco mediante el uso de ratones reporteros *Il17a^{tm1Bcgen}/J* identificamos una gran inducción de IL-17 (Figs. 16-18. Figs. Supl. 5-7).

Debido a que durante la realización de este trabajo se emplearon diferentes metodologías para identificar el mejor protocolo que nos permitiera recuperar un mayor número de células hematopoyéticas a partir de piel de ratón y conseguir el menor traslape de señales entre los diferentes canales de los citómetros, no pudimos generar suficientes experimentos para llevar a cabo un análisis estadístico adecuado [376]. Incluso, para poder llevar a cabo algunos análisis, recuperamos datos generados a partir de experimentos realizados para un proyecto similar que comparte en común los grupos de ratones infectados con *A. baumannii* ATCC 17978, A578 y tratados solo con el vehículo; y pese a que esta situación complica la comparación estadística de las poblaciones analizadas, incluimos algunos de esos resultados puesto que otra de las dificultades que enfrentamos fue la generación insuficiente de ratones reporteros *Il17a^{tm1Bcgen}/J*, en los que, como ya se mencionó, pudimos detectar con mayor facilidad las células positivas para la transcripción de *Il17a*. Lo anterior es otro de los motivos por el que el número de individuos no es el mismo en todos los grupos mostrados en los resultados de las diferentes poblaciones celulares identificadas en el sitio de infección (Figs. 16, 18, 19, 21, Figs. Supl. 5, 7).

Uno de los análisis de las poblaciones celulares positivas para IL-17 se realizó considerando los porcentajes de células positivas para IL-17 en cada una de las subpoblaciones celulares analizadas dentro de la región de células hematopoyéticas CD45⁺ debido a que, por las dificultades que encontramos para llevar a cabo el análisis de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo, no todos los resultados que se muestran provienen de experimento con las mismas poblaciones celulares analizadas en cada caso, de forma que el análisis de las diferentes poblaciones positivas para IL-17 dentro del total de la región de células IL-17⁺ no se puede realizar con los datos obtenidos al momento. Otro de los factores que complicaron la identificación de las diferentes subpoblaciones productoras de IL-17, directamente sobre el total de eventos IL-17⁺, fue que, para algunos experimentos realizados luego de 24 horas postinfección, la suma de eventos de las diferentes subpoblaciones celulares positivas para IL-17 resultaba mayor que

el total de eventos identificados como CD45⁺ IL-17⁺. Lo anterior puede deberse a que la señal de los eventos se esté traslapando hacia diferentes canales, lo que coincide con las dificultades que enfrentamos para poder realizar una adecuada compensación de los fluorocromos en los diferentes canales.

Pese a que no realizamos el análisis de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones celulares positivas para IL-17 dentro de la región del total de células hematopoyéticas CD45⁺ IL-17⁺, además de realizar el análisis dentro de la región de eventos CD45⁺, analizamos el total de células productoras de IL-17 de cada una de las subpoblaciones analizadas en cada caso y la intensidad media de fluorescencia para obtener una aproximación de la cantidad relativa de *Il17a* que se pudiera estar transcribiendo en cada una de las subpoblaciones analizadas.

Considerando todas las limitaciones de los pocos datos generados en los resultados respecto a las diferentes poblaciones celulares presentados en este trabajo, de momento no se puede obtener una conclusión definitiva y que es necesario ser cautelosos al tratar de concluir a partir de esos datos. De momento, el análisis de los datos sugiere de manera muy preliminar que, diferentes poblaciones celulares pudieran contribuir a la producción de IL-17 a diferentes tiempos postinfección.

Tras 4 horas postinfección, las células que parecen estar contribuyendo a la producción de IL-17 en respuesta a la infección por *A. baumannii* de la cepa ATCC 17978 son los neutrófilos (Ly6G⁺ CD11b⁺), ya que en nuestros resultados preliminares pudimos identificar un incremento en el porcentaje de dichas células respecto a los ratones tratados solo con vehículo, así como en comparación con los ratones infectados con la cepa A578 (Fig. 16). Sin embargo, el número total de neutrófilos Ly6G⁺ CD11b⁺ IL-17⁺, en los resultados generados al momento, no mostró un cambio significativo tras la infección. Esto sugiere que el cambio en la frecuencia pudiera estar siendo afectado por la dinámica de otras poblaciones presentes en el tejido, lo que permite impactar en los porcentajes de las poblaciones celulares sin que haya un cambio en el número total de las células.

Por otro lado, cuando tratamos de generar una idea respecto a la cantidad de IL-17 que pudieran estar produciendo estas células, mediante el análisis de la IMF, no identificamos un incremento significativo en la señal de la proteína reportera para *Il17a*, eGFP. Un incremento en la señal de esta proteína fue observado para los linfocitos TCRβ⁺ CD8⁺, sin embargo, es importante destacar que, aunque la IMF permite tener una idea aproximada de la cantidad de la proteína reportera en determinada población celular analizada, no debe considerársele un análisis cuantitativo, menos aun teniendo en cuenta que se trata de una proteína reportera de la transcripción de *Il17a* en nuestro sistema de estudio.

Es interesante haber identificado a los neutrófilos como una de las fuentes de IL-17 tras la infección por *A. baumannii*, pues hasta donde tenemos conocimiento, la producción de IL-17 por neutrófilos durante el curso de la infección por *A. baumannii*, no se había reportado previamente para ningún modelo de infección por esta bacteria, esto podría indicar la existencia un mecanismo adicional a los previamente reportados por el que estas células contribuyen a la resolución de la infección por *A. baumannii*. Si bien los neutrófilos ya habían sido reportados como productores de IL-17 [210], en el caso específico de algunos tipos de infección por *A. baumannii*, diferentes a la cutánea, los neutrófilos se han reportado como esenciales en el control de la infección [119, 120], pero no se ha estudiado su capacidad para producir IL-17 durante el curso de la infección.

Nuestros datos sugieren que los neutrófilos pudieran ser una fuente importante de esta citocina a tiempos tempranos postinfección, tal como se ha demostrado para infecciones por hongos como *A. fumigatus* [191, 196], sin embargo, no es la única población que responde a la infección con la producción

de IL-17. También nuestros resultados preliminares sugieren linfocitos TCR β ⁺ CD8⁺ producen IL-17 en respuesta a la infección a este tiempo postinfección.

De acuerdo con nuestros resultados, únicamente en poblaciones celulares provenientes del grupo de ratones infectados con la cepa ATCC 17978 se observaron aumentos significativos; ya fuera en las frecuencias de neutrófilos IL-17⁺, o en la IMF de los eventos IL-17⁺ en la población de linfocitos TCR β ⁺ CD8⁺ (Fig. 16D, E). Sin embargo, a este tiempo postinfección, en los ratones infectados con *A. baumannii* ATCC 17978, no detectamos diferencia significativa en los niveles de proteína cuantificados por ELISA (Fig. 8). Las discrepancias en cuanto a la cantidad y porcentajes de los eventos celulares positivos para IL-17 evaluados por citometría y la cantidad de IL-17 en los tejidos podrían deberse, en primer lugar, a que cada una de las técnicas empleadas, es útil para evaluar condiciones o procesos celulares distintos, ya que, por un lado, el ELISA permite cuantificar la concentración de citocina secretada, mientras que mediante el uso del ratón reportero *C57BL/6-Il17a^{tm1Bcgen}/J*, la citometría, a través de la detección de la eGFP permite identificar la actividad transcripcional de *Il17a*, y es conveniente recordar las limitaciones que presenta nuestro análisis de citometría de flujo.

Es importante mencionar que la diferencia en el establecimiento de las regiones positivas para IL-17 eGFP entre las diferentes poblaciones mostradas en la figura 16A-C se debe a que las gráficas de algunas subpoblaciones vienen de experimentos distintos y no en todos ellos, se empleó la misma combinación de anticuerpos acoplados a fluorocromos, es decir, en diferentes experimentos se analizaron diferentes poblaciones, esto, tratando de identificar un panel que nos permitiera realizar una adecuada compensación para el correcto análisis de las diferentes subpoblaciones. Sin embargo, en los experimentos realizados, la región negativa se estableció con base en los controles de fluorescencia menos uno. El hecho de que en los distintos experimentos no se conservara la tinción de las mismas poblaciones celulares complica obtener una conclusión con validación estadística, por lo que consideramos que es imprescindible realizar experimentos adicionales del análisis de las poblaciones celulares en los que siempre se realice la tinción con el mismo panel de anticuerpos acoplados a los mismos fluorocromos.

Por otro lado, tampoco pudimos detectar cambio significativo en la cantidad del ARNm mediante RT-PCR en el grupo de ratones infectados durante 4 horas con la cepa ATCC 17978 (Fig. 8) a diferencia de lo observado mediante la técnica de citometría de flujo, pese a que tanto el análisis del ratón reportero *C57BL/6-Il17a^{tm1Bcgen}/J* como la cuantificación relativa del mensajero mediante RT-PCR son técnicas basadas en la transcripción de *Il17a*. Aunque es importante señalar que ambas técnicas proporcionan información diferente; por un lado, a partir de la RT-PCR se puede comparar la abundancia del ARNm total obtenido de una muestra determinada, mientras que la citometría permite identificar las poblaciones celulares en las que la transcripción del gen estuvo activa previa a la traducción de la proteína reportera, y no necesariamente es una técnica cuantitativa.

En el análisis de los datos preliminares, observamos algunas poblaciones celulares positivas para IL-17⁺, cuyos marcadores de superficie no fueron evaluados durante el análisis citométrico luego de 4 horas postinfección. Al incrementar el número de experimentos realizando un análisis estricto de las poblaciones celulares probablemente permita identificar dichas poblaciones, lo que podría ayudarnos a confirmar o descartar las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos mediante RT-PCR y citometría de flujo. Aunque es importante señalar que, previamente han sido publicadas discrepancias en el análisis de una misma citocina presente en determinada muestra, mediante diferentes técnicas, entre ellas ELISA y citometría de flujo [377].

Recientemente se ha puesto interés en la dificultad de realizar análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo a partir de piel del dorso de ratones debido a la complejidad de ese tejido [378] y a que múltiples factores como el sexo de los animales de estudio, así como su edad y ciclo capilar [379]. Incluso se han publicado trabajos detallando protocolos específicos a seguir para recuperar leucocitos de piel de dorso de ratón, que difieren de los protocolos seguidos para recuperar células de piel de tejidos menos complejos como las orejas [380], razón por la que el análisis mediante citometría de flujo de poblaciones celulares en el sitio de infección luego de 12 horas postinfección se realizó en oreja, en vez de en dorso, donde se realizó a las 4 y 24 horas postinfección (Figs. 17 y 20).

Es sumamente importante mencionar que dadas las diferencias estructurales y en cuanto a distribución y frecuencias de células inmunológicas de la piel del dorso y de la oreja [381], el analizar dos regiones anatómicas de piel distintas, podría afectar profundamente los resultados de las poblaciones involucradas en la respuesta a la infección por *A. baumannii*, de manera que no es comparable el análisis que se incluye en este trabajo de las poblaciones celulares a las 12 horas con el realizado a las 4 y 24 horas postinfección (Figs. 16-21). Debido a que implementamos el protocolo para obtención y tinción de células de oreja recientemente, en este trabajo solo mostramos los datos correspondientes a un experimento. Sin embargo, consideramos imperativo incrementar el número de experimentos del análisis celular luego de 12 horas postinfección y realizar la cinética de las poblaciones celulares a partir de un solo sitio anatómico, y teniendo en cuenta las dificultades técnicas que enfrentamos al realizar el análisis de dorso, sugerimos que la cinética de poblaciones celulares se realice en su totalidad en oreja. De hecho, actualmente en el laboratorio se está trabajando con el modelo de infección en piel por *A. baumannii* a partir de la inoculación bacteriana en oreja.

El análisis poblacional de células del tejido proveniente de oreja infectado luego de 12 horas postinfección nos permitió identificar un incremento en los porcentajes de células $\text{TCR}\gamma\delta \text{ IL-17}^+$, específicamente las de baja expresión del receptor $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$, tras la infección por ATCC 17978 respecto a ratones que no fueron infectados; mientras que en el grupo de ratones infectados con la cepa A578 también se presentó una tendencia al incremento de esta población celular (Fig. 17). A este tiempo postinfección, también el número total de células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}} \text{ IL-17}^+$ en ratones infectados con la cepa ATCC 17978 fue significativamente mayor en comparación con ratones administrados solo con vehículo y, de forma similar al incremento en el porcentaje, el número total de células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}} \text{ IL-17}^+$ recuperado de ratones infectados con la cepa A578, también mostró una tendencia al incremento (Fig.17). El incremento observado en el número de células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}} \text{ IL-17}^+$, probablemente se deba al reclutamiento de éstas al sitio de infección, similar a lo que se ha reportado previamente en respuesta a otros estímulos inflamatorios [225]. Aunque, con los resultados generados al momento, no podemos descartar que el incremento en el número total de células de esta población pueda verse influenciado por el inicio de la producción de IL-17 en células residentes de la piel, que ya se encontraron ahí previamente a la infección, sin producir IL-17. Tampoco descartamos que, pese a no mostrar un incremento significativo respecto al grupo administrado con vehículo, la tendencia al aumento en los números totales tanto de linfocitos $\text{TCR}\beta \text{ IL-17}^+$ como de linfocitos $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{alto}} \text{ IL-17}^+$ tengan una contribución a la resolución de la infección con cada una de las cepas bacterianas mediante la producción de IL-17 (Fig. 17) y habría que corroborar o descartar su participación mediante la realización de más experimentos.

Al tratar de obtener una idea sobre las poblaciones que en mayor medida producen IL-17 a las 12 horas postinfección a través del análisis de la IMF asociada a la actividad de *Il17a*, identificamos un incremento

significativo en este parámetro para la población TCR β^+ IL-17 $^+$ tras 12 horas de infección por cada una de las cepas.

Pese a que a este tiempo postinfección (12 horas), analizamos células Fc ϵ RI α^+ , no identificamos un cambio relevante para la producción de IL-17 en respuesta a la infección en estas células. Este marcador de superficie, Fc ϵ RI α^+ , en piel de ratones ha sido identificado en células de Langerhans [382] y en células cebadas [383] y aunque en diferentes condiciones inflamatorias, algunas células de Langerhans [165], así como algunas células cebadas han sido identificadas como IL-17 $^+$ [210] pero no es el caso en nuestro modelo luego de 12 horas postinfección (Fig. 17), aunque no descartamos que células Fc ϵ RI α^+ contribuyan a la producción de IL-17 a otros tiempos postinfección.

En complemento al análisis celular por citometría de flujo, luego de 12 horas postinfección también realizamos un análisis microscópico de inmunofluorotinciones de tejido obtenido del área infectada (Fig. Supl. 8), sin embargo, es muy importante destacar que estas inmunofluorotinciones se realizaron en cortes histológicos provenientes del dorso y que también es necesario realizar réplicas experimentales de este enfoque. Mediante el análisis microscópico encontramos, que tras 12 horas de infección por cada una de las cepas hubo un incremento significativo en el porcentaje de células IL-17 $^+$, independientemente del tipo de población al que pertenecieran (Fig. Supl.8). Pese a provenir de un sitio anatómico distinto (oreja), cuya composición basal de poblaciones leucocitarias es distinta de la del dorso [381, 384] un incremento en las células IL-17 $^+$ ya se apreciaba como una tendencia en el análisis citométrico, mediante el que identificamos que porcentajes de células IL-17 $^+$ mostraron una tendencia al incremento tras la infección por cada cepa bacteriana pero dicha tendencia no llegó a ser significativa (Fig. 17).

Adicionalmente, también mediante el análisis microscópico de inmunofluorotinciones identificamos un incremento significativo en el porcentaje de células CD4 $^+$ IL-17 $^+$ tras la infección por la cepa A578 (Fig. Supl. 8). En relación con este hallazgo, entre las células TCR β^+ IL-17 $^+$ que lograron identificarse, mediante citometría de flujo en la piel de ratones infectados con cada una de las cepas luego de 12 horas postinfección, podrían encontrarse linfocitos T CD4 $^+$, considerando que en los cortes histológicos de las muestras de piel infectada por *A. baumannii* lograron identificarse células CD4 $^+$ IL-17 $^+$. Sin embargo, no podemos descartar que las células TCR β^+ IL-17 $^+$ podrían incluir, además, linfocitos Tc17 CD8 $^+$ que podrían contribuir a la producción de IL-17 a este tiempo postinfección. Para corroborar o descartar esto, es necesario incluir la tinción contra cada una de estas moléculas en el panel de anticuerpos de la tinción para análisis por citometría de flujo.

También mediante el análisis microscópico de inmunofluorotinciones, identificamos incrementos significativos en los porcentajes de células Ly6C/G $^+$ IL-17 $^+$ y de células CD11b $^+$ IL-17 $^+$, luego de 12 horas postinfección con cada una de las cepas, respecto a ratones administrado con el vehículo.

En el caso de las células Ly6C/G $^+$ IL-17 $^+$ y de las CD11b $^+$ IL-17 $^+$ identificadas (Fig. Supl. 8), bien podría tratarse la misma población celular, es decir, podría tratarse de neutrófilos que contribuyeran a la producción de IL-17, sin embargo, puesto que ambos marcadores de superficie no lograron teñirse en el mismo corte, no podemos corroborar que se coexpresen en una misma célula y que, efectivamente, se trate de neutrófilos. Por otra parte, considerando que los porcentajes de Ly6C/G $^+$ IL-17 $^+$ no coinciden con los de CD11b $^+$ IL-17 $^+$; células CD11b $^+$ Ly6C/G $^-$, que bien podrían ser M ϕ s, podrían estar contribuyendo a la producción de IL-17 en respuesta a la infección, de forma similar a lo que se ha reportado previamente en respuesta a algunas otras infecciones [203], incluidas algunas bacterianas [385].

Las discrepancias entre las poblaciones celulares positivas para IL-17 identificadas por cada uno de estos métodos podría deberse, en gran medida a que las muestras provienen de una región anatómica distinta, pero también a los diferentes fundamentos de cada una de las técnicas. Por un lado, los ratones reporteros de la actividad de *Il17a*, poseen una construcción que consiste en una secuencia de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, del inglés *internal ribosome entry site*) luego del codón de término de *Il17a* [386]. Al ser una construcción bicistrónica, la cantidad de ambas proteínas podría no guardar una proporción constante puesto que las traducciones de cada proteína son eventos independientes [387, 388], mientras que, en el caso de la inmunofluorotinción, el anticuerpo se une específicamente a la proteína, evidenciando directamente la presencia de la misma.

Otro aspecto que contribuye a las discrepancias identificadas en cuanto a los tipos celulares que producen IL-17 en el curso de la infección subcutánea por *A. baumannii* es que, desafortunadamente, de momento solo se ha realizado un experimento del análisis histológico mediante inmunofluorotinciones para identificar células IL-17⁺ y en éste no se emplearon muestras provenientes de la misma región anatómica ni los mismos marcadores para analizar las mismas poblaciones que se analizaron en el tejido infectado mediante citometría de flujo, por lo que no se puede realizar una comparación adecuada entre ambos métodos. Adicionalmente, las clonas de anticuerpos empleadas en cada metodología son distintas, lo que también podría contribuir a las diferencias observadas. Es importante mencionar que algunas discrepancias entre el análisis microscópico de inmunofluorotinciones y el análisis fluorocitométrico, han sido reportadas previamente [389], sin embargo, en definitiva, es necesario realizar experimentos adicionales tanto de citometría de flujo como de inmunofluorotinciones para el análisis de células productoras de IL-17 y de forma similar a la decisión de emplear muestras provenientes de oreja para el análisis celular mediante citometría de flujo, también para el análisis celular por microscopía, decidimos analizar cortes histológicos provenientes de orejas infectadas con *A. baumannii* o tratadas con vehículo.

El análisis mediante citometría de flujo de las poblaciones celulares luego de 24 horas postinfección, sugiere que no hay una población celular específica que contribuya a la producción de IL-17 a este tiempo postinfección puesto que no detectamos incremento significativo ni en el porcentaje ni en los números absolutos de las diferentes subpoblaciones celulares IL-17⁺ (Fig. 18). Incluso, la IMF de eGFP asociada a la actividad de *Il17a* se vio disminuida en el compartimento hematopoyético (Fig. 18). Esta disminución en los eventos IL-17⁺ luego de 24 horas postinfección es congruente con la disminución observada en la concentración de IL-17 cuantificada mediante ELISA, donde observamos una tendencia a la disminución de la citocina en comparación con la concentración encontrada en el tejido el tiempo previo al que se cuantificó la citocina, que fueron 12 horas postinfección (Fig. 8). Esto sugiere que a este tiempo postinfección la producción de IL-17 disminuye, lo que podría ser indicativo, por un lado, de la disminución de la producción de la citocina y por otro, de su unión a receptores en sus blancos celulares, pues, como ya se mencionó, uno de sus mecanismos de regulación es a través de la internalización de la citocina unida a su receptor [313, 314].

Es probable que la contribución de mayor importancia de IL-17 al control y pronta resolución de la infección, se presente durante las primeras 12 horas post infección. Para corroborar lo anterior, podrían llevarse a cabo experimentos en los que ratones IL-17A/F KO se infectaran con cada una de las cepas bacterianas, y se reconstituyan con la administración de IL-17 recombinante a diferentes tiempos postinfección, para determinar la carga bacteriana después de algunos días postinfección, como 20 días que fue cuando identificamos diferencia en la carga en los ratones IL-17A/F KO (Fig. 14) y establecer la ventana de tiempo en la que la presencia de IL-17 impacta sobre el control de la carga bacteriana.

A pesar de que a las 24 horas postinfección no logramos identificar una población celular que esté contribuyendo de manera importante a la producción de IL-17 en el sitio de infección, el análisis de DLNs de ratones infectados subcutáneamente durante 24 horas con la cepa ATCC 17978, nos permitió identificar un incremento significativo en el número total de células $\text{TCR}\gamma\delta^+ \text{IL-17}^+$, así como en el número total de células $\text{Lin}^- \text{IL-17}^+$ (Fig. Supl. 7), respecto a la cantidad de células totales de estas poblaciones en los DLNs de ratones administrados únicamente con vehículo. Los datos mostrados para ganglios vienen del mismo grupo de ratones en piel, es decir, que igual que para el análisis de piel, aún se tienen muy pocos datos para realizar una conclusión definitiva. De momento, este hallazgo sugiere que estas células podrían haber migrado desde el sitio de infección, como ya se ha reportado previamente tanto para algunas subpoblaciones de células $\text{TCR}\gamma\delta^+ \text{IL-17}^+$ [390], como para ILC3s IL-17^+ [391] tras la administración subcutánea de estímulos inflamatorios.

Sería interesante caracterizar a los linfocitos $\text{TCR}\gamma\delta$ productores de IL-17 tanto en el sitio de infección como en los DLNs para conocer si estas subpoblaciones tienen fenotipo y funciones similares a los que se han descrito para células $\text{TCR}\gamma\delta$ productoras de IL-17 que tienen un papel importante en respuesta a infecciones de la piel como la causada por *S. aureus* [231]. Sobre las células $\text{TCR}\gamma\delta^+ \text{IL-17}^+$ en la infección cutánea por *S. aureus*, se ha descrito que migran desde los DLNs hacia el sitio de infección y median el reclutamiento de neutrófilos a través de la inducción de quimiocinas para contribuir a la resolución de la infección [231]. De momento, no descartamos que un evento similar pudiera contribuir a la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii*. El identificar el nivel de expresión del receptor $\text{TCR}\gamma\delta$ a este tiempo postinfección, no permitiría conocer si desde este tiempo se da una amplificación de la respuesta inflamatoria mediada por IL-17, ya que es muy probable, que, como se ha reportado anteriormente, a este tiempo, comience el reclutamiento al sitio de infección, mediado por CCL20, de células $\text{TCR}\gamma\delta^+$ con niveles bajos de expresión de TCR ($\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$) —población para la que, previamente [225, 231] se ha identificado una vasta producción de IL-17 en respuesta algunas condiciones inflamatorias—, de ser así, esta amplificación temprana de la inflamación, muy posiblemente mediada por neutrófilos, es uno de los mecanismos que contribuyen a mantener la infección localizada.

Es importante señalar que, dado que nuestro estudio se enfoca en determinar la contribución de IL-17 en la respuesta a la infección cutánea aguda por *A. baumannii*, el estudio de poblaciones celulares positivas para IL-17 se llevó a cabo en un breve periodo de tiempo posterior a la infección, por lo que una respuesta sistémica, que involucre producción de IL-17 en linfocitos T específicos para antígenos de *A. baumannii* cabría esperarse a tiempos posteriores, donde se refleje la contribución de la respuesta adaptativa; no obstante, es necesario llevar a cabo más experimentos para corroborarlo.

Al analizar otros órganos en busca de poblaciones celulares positivas para IL-17 a diferentes tiempos postinfección, no identificamos presencia significativa de eventos IL-17^+ , salvo en los DLNs luego de 24 horas de infección, donde identificamos un incremento estadísticamente significativo en células $\text{TCR}\gamma\delta^+ \text{IL-17}^+$ y en células $\text{Lin}^- \text{IL-17}^+$ (Fig. Supl. 7) y aunque esto sugiere que la producción de IL-17 que contribuye al control de la infección por *A. baumannii*, principalmente ocurre el sitio de infección, no descartamos que, a otros tiempos, pudiera detectarse un incremento en la cantidad de células IL-17^+ presentes en los ganglios, sobre todo drenantes, considerando el egreso de células desde el sitio de infección y su llegada a los ganglios para amplificar la respuesta.

Uno de los efectos de IL-17 al actuar sobre algunos de sus blancos celulares como células epiteliales y queratinocitos, es la inducción de algunas quimiocinas, entre ellas, CCL20, CXCL1, CXCL2 y CXCL8. Siendo la primera importante en el reclutamiento de células dendríticas y linfocitos y las tres últimas,

quimioatrayentes de neutrófilos [237, 392] y que, debido a ello, en el contexto de infecciones causadas por *A. baumannii* pueden resultar de suma importancia considerando el papel esencial de estas células en la resolución de la infección por *A. baumannii* [119, 120]. También, tomando en cuenta las diferencias que observamos en cuanto a la magnitud de la producción de IL-17 tras la infección con cada una de las cepas bacterianas (Fig. 8) y para tratar de identificar si estas diferencias impactan en la cantidad o tipo de estímulos quimioatrayentes, también analizamos a diferentes tiempos postinfección, diferentes poblaciones celulares que no necesariamente estuvieran produciendo IL-17 y que más bien, pudieran haberse reclutado al sitio de infección. La caracterización del infiltrado celular, podría proporcionarnos información sobre los eventos moleculares que pudieran estar ocurriendo en el sitio de infección, como sugerir las quimiocinas que pudieran ser partícipes en el reclutamiento de esas células y, adicionalmente, proporcionar una idea sobre los mecanismos bactericidas o de amplificación de la respuesta inflamatoria llevados a cabo por las células reclutadas en respuesta a cada cepa bacteriana. Es importante mencionar que el análisis de las células negativas para IL-17 se realizó en los mismos experimentos y bajo las mismas condiciones y, por lo tanto, limitaciones que presentan los datos generados para identificar las poblaciones productoras de IL-17 mediante citometría de flujo.

A partir del análisis de tejido infectado durante 4 horas, nuestros resultados sugieren que hay un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de neutrófilos recuperados del sitio afectado luego de la infección por la cepa ATCC 17978. Es importante destacar que este incremento también es significativo respecto al porcentaje de neutrófilos que se recuperó del área de piel afectada en ratones infectados con la cepa A578, para los que solo se observó una tendencia al incremento en el porcentaje de esta población celular respecto a ratones no infectados. Sin embargo, el análisis de los números absolutos de estas células en el sitio de infección no mostró un incremento significativo tras 4 horas de infección (Fig. 19). Lo anterior podría deberse a que el porcentaje de neutrófilos se vea modificado como consecuencia de la dinámica de ingreso y egreso del sitio de la lesión de otras células inmunológicas, lo que pudiera modificar el porcentaje de neutrófilos sin impactar en el número total de células presentes en el sitio infectado.

Aunado a lo antes mencionado, algunos de los mecanismos bactericidas de neutrófilos que se han identificado en respuesta a la presencia de *A. baumannii*, como la producción de especies reactivas de oxígeno [393] o la formación de trampas extracelulares [394], que se activan para contener la infección, en ocasiones, culminan en muerte celular de los mismos [395]. Asimismo, cabe recordar en este punto, que algunos factores de virulencia propios de la bacteria inducen muerte celular del hospedero [364, 365], lo que también podría estar impactado en el nulo incremento de los números totales de neutrófilos tras la infección. En todos estos posibles escenarios, cabría esperarse que los neutrófilos se recluten eficientemente al sitio de infección, pero que una vez ahí, ocurra muerte celular, manteniendo los números totales de la población celular sin cambio. Con el fin de identificar si la falta de cambio en el número total de neutrófilos en el sitio de infección se debe a que las células no están siendo reclutadas o a que están muriendo una vez reclutadas, sería de utilidad cuantificar la concentración de quimiocinas quimioatrayentes para esta población celular en el sitio de infección, así como llevar a cabo análisis de viabilidad en esta población celular. En este último sentido, es importante recordar que la estrategia de análisis citométrico de las diversas poblaciones celulares excluye células muertas (Fig. Supl. 2-4), por lo que nuestros resultados no nos permiten explorar cuál proceso es responsable de la falta de cambio en el número total de neutrófilos en el sitio infectado.

Aunque el reclutamiento temprano al sitio infectado por *A. baumannii* ha sido reportado como crucial en la disminución de la carga bacteriana [120], en nuestro modelo de infección, pese a observar diferencia en los porcentajes de neutrófilos en el sitio infectado por cada una de las cepas, esto no se ve reflejado

en una diferencia en la carga bacteriana entre ambas cepas a los diferentes tiempos evaluados (Fig. 12). Lo anterior podría deberse a que los neutrófilos no son las únicas células con capacidad bactericida contra *A. baumannii*. También células como los macrófagos han sido identificados como relevantes para contener la infección a través de mecanismos bactericidas [396], amén de que moléculas solubles como péptidos antimicrobianos también tienen capacidad bactericida contra *A. baumannii* [397].

A través del análisis de las poblaciones celulares en el sitio de infección luego de 12 horas de inoculación, la distinción entre las dos poblaciones celulares de linfocitos $\text{TCR}\gamma\delta^+$ designadas como $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$ y $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{alto}}$, resultó mucho más evidente (Figs. 17, 20). En el caso de los ratones infectados, esto podría deberse a la dinámica de las poblaciones celulares en el sitio de infección, puesto que se ha reportado que estímulos inflamatorios son capaces de inducir el reclutamiento de linfocitos $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$ al sitio de administración, e interesantemente, éstos se han reportado como una fuente importante de IL-17 [225]. Pero tomando en cuenta que estas poblaciones resultaron plenamente distinguibles también en los grupos que recibieron solo vehículo y cuyas poblaciones celulares fueron analizadas a distintos tiempos, es posible que las diferencias observadas pudieran estar influenciadas por diferencias metodológicas en las que se llevó a cabo el análisis de las poblaciones celulares, ya que a diferentes tiempos postinfección, la tinción de los marcadores evaluados fue diferente y también tuvimos algunas complicaciones al momento de recuperar las poblaciones hematopoyéticas a partir de la piel.

Justamente en este tiempo postinfección (12 horas) identificamos incremento significativo en los números totales de cada una de las subpoblaciones $\text{TCR}\gamma\delta$, es decir, en células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{alto}}$ y en células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$, tanto para ratones infectados con la cepa ATCC 17978 como por la cepa A578 (Fig. 20). Vale la pena destacar que el incremento en el número total de ambas subpoblaciones de células $\text{TCR}\gamma\delta$, tiende a ser mayor en el grupo de ratones infectados con la cepa A578, y es factible que, al incrementar el muestreo, esta tendencia resulte significativa. Mientras que la subpoblación de células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$ se ha identificado como una fuente celular importante de IL-17 en condiciones inflamatorias [225], que incluyen la presencia de patógenos cutáneos bacterianos, a cuya resolución contribuyen promoviendo el reclutamiento de neutrófilos, la transcripción de β -defensinas y de péptidos antimicrobianos de la familia S100, así como a la producción de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β [231], la subpoblación de células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{alto}}$, que incluye DETCs, ha sido identificada como reguladora negativa de la inflamación en modelos de dermatitis [225, 398]. En nuestro modelo de infección, el incremento de ambas poblaciones celulares tras la infección sugiere que ambas tienen un papel importante en la patología de la infección por ambas cepas, por un lado, las células $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{bajo}}$, posiblemente estén contribuyendo a amplificar la respuesta bactericida, en tanto que la población $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{alto}}$, contribuya a modular dicha respuesta para disminuir el daño en el hospedero.

De acuerdo con lo que ha sido reportado previamente para otras condiciones inflamatorias, es posible que este incremento en el total de células $\text{TCR}\gamma\delta$, se deba, tanto al reclutamiento de éstas desde los DLNs al sitio de infección [231], como a la proliferación de las mismas en el área infectada [225, 228].

Tras 24 horas postinfección, nuevamente, de manera similar a lo que observamos a las 4 horas postinfección, la población celular que volvió a incrementarse en el sitio de infección por cada una de las cepas bacterianas, fueron los neutrófilos, pero a este tiempo tanto en porcentaje como en números (Fig. 21). De manera interesante, el incremento en el porcentaje de estas células en ratones infectados con la cepa ATCC 17978 es significativamente mayor en comparación con el encontrado en ratones infectados con la cepa A578 (Fig. 21); aunque esta diferencia no impacta sobre la carga bacteriana, puesto que, como ya se mencionó con anterioridad, la cinética de resolución se lleva a cabo de manera similar en la infección por ambas cepas, con cargas bacterianas muy similares a todos los tiempos analizados (Fig.

12). Existe la posibilidad de que el uso de inóculos menores de bacteria, permita ver diferencias en la cinética de resolución, puesto que en estas condiciones, no se estaría saturando el sistema.

El incremento en neutrófilos que detectamos en el sitio de infección en nuestro modelo es congruente con lo ya se había reportado con anterioridad para infecciones por *A. baumannii* en otras localizaciones anatómicas en las que se ha observado reclutamiento de estas células tras las primeras horas postinfección [119, 120, 267, 399].

Un aspecto a destacar en nuestro modelo experimental, es que la cantidad de neutrófilos en el sitio afectado tiende a ser mayor en los ratones infectados por la cepa ATCC 17978 (Fig. 19, 21), y aunque también en este grupo de animales fue donde se observó mayor cambio en el incremento de poblaciones celulares positivas para IL-17 (Fig. 16-18), al cuantificar la proteína mediante ELISA (Fig. 8) los niveles de IL-17 presentan una tendencia a ser mayores en el grupo de ratones infectados con A578 en comparación con los ratones infectados con la cepa ATCC 17978. Esto sugiere que, al menos, algunos de los mecanismos que median el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección por *A. baumannii* pueden ser independientes del efecto de IL-17 y aunque bien pueden inducirse por la acción de otras citocinas, algunas quimiocinas podrían inducirse directamente por el reconocimiento de componentes bacterianos estructurales por células del hospedero [400] e incluso algunos metabolitos de *A. baumannii* se han identificado como quimioatrayentes de neutrófilos [107]. Aún es necesario corroborar el papel de IL-17 en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección.

Respecto al reclutamiento diferencial de neutrófilos al sitio infectado por variantes de *A. baumannii*, Wijers y colaboradores reportaron diferencias en los porcentajes de algunas poblaciones celulares, entre ellas neutrófilos, en los pulmones de ratones infectados vía intranasal con dos variantes de la cepa ATCC 17978 de *A. baumannii* que difieren en la presencia de un locus denominado AbaAL44, mismo que codifica reguladores transcripcionales, genes involucrados en la replicación, y de manera importante, factores de virulencia como *KZA74_09300* que codifica la catalasa y genes potencialmente involucrados en la codificación de un *pilus* de tipo 1 [362]. Este trabajo, los autores reportaron un mayor porcentaje de infiltrado de neutrófilos y una disminución en los porcentajes de linfocitos, tanto T como B, en el pulmón de ratones infectados con la cepa positiva para la presencia de AbaAL44 (*A. baumannii* 17978 UN), en comparación con los ratones infectados con la cepa carente del locus (*A. baumannii* 17978 VU) luego de 24 horas de haber recibido el inóculo bacteriano vía intranasal. En este mismo trabajo, la estimulación *ex vivo* de Mφs derivados de médula ósea con la cepa *A. baumannii* 17978 UN, indujo una mayor producción de IL-1β y una menor producción de IL-10 en comparación con la que se observó en células estimuladas con la cepa *A. baumannii* 17978 VU. De manera interesante, la producción de quimiocinas en estas células, fue comparable tras la infección con cada una de las cepas bacterianas; mientras que *in vivo*, tampoco se lograron identificar diferencias en las concentraciones de IL-1β en suero, ni de linfocitos ni neutrófilos en sangre periférica, comparando ambos grupos infectados [362]. Este trabajo, de manera similar al nuestro, evidencia el impacto de las diferencias propias de las cepas bacterianas en la magnitud de algunos de los mecanismos de defensa montados por el hospedero, y resalta que, las diferencias propias de las cepas bacterianas no afectan todas las moléculas que se inducen en respuesta a la infección [362].

Posiblemente el hecho de que a las 12 horas postinfección, los neutrófilos no se hayan visto incrementados, a diferencia de lo que logró identificarse para los tiempos de 4 y 24 horas postinfección, puede deberse en gran medida a que las muestras analizadas a las 12 horas provienen de oreja, mientras que las analizadas a las 4 y 24 horas provienen de dorso. También existe la posibilidad de que no se haya detectado un incremento en los neutrófilos a las 12 horas postinfección en oreja como consecuencia de

los procesos que pudieran estar llevando a muerte a los neutrófilos que pudieran reclutarse al sitio de infección. Mientras que a tiempos como 24 horas postinfección, es probable que el incremento en el número de células se pueda observar, debido a que el reclutamiento sobrepasa el número de células que pudieran estar siendo afectadas por los mecanismos que conducen a muerte en esta población celular, pero también debido a la cinética del reclutamiento de las células al sitio de la infección.

Por otro lado, podría ser que el no haber observado incremento en neutrófilos a las 12 horas esté relacionado con la cinética de inducción de las quimiocinas o de diferentes moléculas quimioatrayentes presentes en el sitio de infección. Con base en la información publicada previamente respecto a los quimioatrayentes de neutrófilos en el sitio de infección por *A. baumannii*, cabría esperar que el incremento en la frecuencia y/o números (dependiendo del tiempo postinfección analizado) de neutrófilos que pudimos observar tras la infección por cada una de las cepas de *A. baumannii*, muy probablemente se deba al reclutamiento de estas células al sitio afectado como consecuencia de la presencia de quimioatrayentes en dicho sitio. Entre los quimioatrayentes para los que cabría esperar un incremento, se encuentran CXCL1 y CXCL2 [118, 348], moléculas que, cabe destacar, pueden inducirse en respuesta a la estimulación de las células a través de IL-17 [237]. Sin embargo, estas quimiocinas no son las únicas que pudieran estar participando en el reclutamiento celular al sitio de infección. Es importante considerar la posible participación de otras moléculas que son inducidas en respuesta a la presencia de IL-17 para las que se ha corroborado actividad quimioatrayente de neutrófilos en respuesta a infecciones; entre ellas se encuentran algunos péptidos antimicrobianos, como la catelicidina [401, 402], cuyos péptidos relacionados se han reportado como bactericida para *A. baumannii* [397].

Si bien el análisis celular a diferentes tiempos postinfección, no fue el mismo, al comparar las células en el sitio de infección a los diferentes tiempos analizados, pese a la restricción de que las muestras recuperadas a las 12 horas postinfección provienen de un sitio distinto, podemos observar que en la infección por la cepa ATCC 17978 el incremento en las frecuencias de neutrófilos en el sitio de infección se presenta más tempranamente —desde las 4 horas postinfección— en comparación con lo que ocurre en la piel de ratones infectados con la cepa A578, donde este incremento de neutrófilos se observa hasta las 24 horas postinfección. Lo anterior podría deberse tanto a la dinámica de reclutamiento y egreso de diferentes poblaciones celulares del sitio de infección, como también a procesos que pudieran afectar la viabilidad de las células, de manera similar a lo que proponemos que ocurra a las 12 horas donde no identificamos incremento significativo en los neutrófilos en los grupos de ratones infectados.

Los resultados generados hasta este punto son insuficientes para saber si los mecanismos de reclutamiento o los procesos bactericidas que se activan para controlar la infección por ambas cepas *A. baumannii* utilizadas, son dependientes de IL-17. Al respecto es importante considerar que entre los quimioatrayentes que se han identificado como partícipes en la respuesta a la infección por *A. baumannii*, algunos son susceptibles de modular sus niveles por la acción de IL-17, mientras que otros son totalmente independientes de la acción de esta citocina. Respecto a los que pueden modularse por IL-17, es importante recordar que esta citocina no es la única que induce su producción [403]. Tomando en cuenta lo antes mencionado, consideramos que es muy importante evaluar esos procesos —la producción de quimiocinas, así como algunos mecanismos bactericidas— en ausencia de IL-17 y determinar si se ven afectados en comparación con la forma en la que estos procesos se desarrollan en ratones WT. Esto permitirá obtener un panorama más amplio de la contribución de IL-17 al control de la infección subcutánea por cada una de las cepas de *A. baumannii* aquí empleadas y conocer los mecanismos involucrados en dicha respuesta.

Considerando que nuestros resultados sugieren que los neutrófilos tienen un papel importante en el control de la infección subcutánea por *A. baumannii*, sería adecuado corroborar si esta población es indispensable en la resolución de la infección subcutánea. Para responder a este cuestionamiento, la infección subcutánea podría realizarse en ratones deficientes de neutrófilos, en los que la depleción de los mismos se podría conseguir mediante el uso de anticuerpos dirigidos, principalmente, contra neutrófilos (anti-Ly-6G/anti-Gr1) [119, 123] y posteriormente, tras el tratamiento de eliminación de estas células, en estos mismos ratones, monitorear la supervivencia y cuantificar la carga bacteriana. Es importante recordar que, pese a que nuestros resultados sugieren que, en nuestro modelo de infección subcutánea, los neutrófilos tienen un papel relevante en el control de *A. baumannii*, existen otros mecanismos bactericidas [404] que pudieran estar contribuyendo al control de la infección, mismos que sería interesante estudiar.

Es probable que, aunque el reclutamiento de neutrófilos no sea totalmente dependiente de los efectos de IL-17, la contribución de esta citocina a este evento sea considerable, de manera que al no estar presente (como en los ratones IL-17A/F KO), su ausencia impacta negativamente en la inducción de mecanismos de reclutamiento celular y acciones bactericidas, lo que podría interferir el control temprano de la bacteria. Lo anterior, al cabo de algunos días, puede verse reflejado en la presencia de bacteria en ratones deficientes de IL-17, tal como observamos en este trabajo (Fig. 14). Para corroborar esta hipótesis sería necesario realizar una cinética más completa de la carga bacteriana en ratones IL-17A/F KO y poder compararla con la obtenida a partir de la infección en ratones WT.

Los resultados del análisis fluorocitométrico que presentamos en este trabajo parten de análisis de poblaciones celulares, positivas o no para IL-17 que se llevaron a cabo en condiciones que distan de las óptimas para realizar conclusiones definitivas sobre la participación de diferentes subpoblaciones a la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii*. Entre las condiciones que dificultan en el análisis de dichas poblaciones celulares se encuentran el número muy reducido de experimentos a partir de los cuales se obtuvieron dichos resultados, la recuperación de un número muy bajo de células hematopoyéticas, la elevada fluorescencia basal que presenta la piel [279, 280], el uso de un panel de anticuerpos acoplados a fluorocromos cuya compensación llegaba a ser complicada [278], el empleo de diferentes paneles de fluorocromos y la obtención de células a partir de diferentes regiones anatómicas. Es muy importante dejar en claro que para poder realizar una conclusión adecuada respecto a la dinámica celular en respuesta a la infección por *A. baumannii*, es necesario mejorar la metodología de la obtención de células hematopoyéticas del sitio infectado y realizar los análisis de las poblaciones celulares luego de diferentes horas postinfección bajo las mismas condiciones, es decir, con el mismo panel de anticuerpos acoplados a los mismos fluorocromos en todos los casos, optimizado para reducir la interferencia de las señales en los diferentes canales y partiendo de células recuperadas del mismo sitio anatómico; nuestros hallazgos sugieren que realizar la infección en oreja disminuye el ruido por la autofluorescencia basal del tejido y facilita la identificación de diferentes poblaciones celulares. Idealmente, también las mismas poblaciones celulares deberían corroborarse mediante microscopía confocal.

Un indicio importante de que es necesario repetir los experimentos de análisis celular por citometría de flujo en las mismas condiciones, es que basalmente (en ratones tratados únicamente con el vehículo) las células positivas para cada tiempo analizado difieren en gran medida. Una sugerencia para minimizar estas diferencias es que los experimentos se realicen con un grupo de ratones tal que permita infectar y tratar con el vehículo al mismo tiempo un grupo suficientemente grande de ratones, a partir del cual a

diferentes tiempos postinfección se realice la eutanasia de ratones infectados con cada una de las cepas bacterianas.

Los resultados que se incluyen en este trabajo son aún preliminares respecto a la o las poblaciones celulares que contribuyen con la producción de IL-17 y respecto a poblaciones reclutadas o presentes en el sitio afectado durante la infección cutánea por *A. baumannii*, aunque, de momento, nuestros datos sugieren que diversas poblaciones celulares producen IL-17 durante el curso de la infección contribuyendo a la resolución de ésta y aunque hasta este punto es complicado concluir sobre los mecanismos involucrados en la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* que se encuentran favorecidos por IL-17, nuestros hallazgos preliminares también sugieren que la respuesta del hospedero, en lo que respecta a la producción de IL-17, podría ser distinta dependiendo de la cepa bacteriana que esté causando la infección, pese a tratarse de patógenos de la misma especie. Pues si bien el tipo de células que se activa en respuesta a la infección por cada una de las cepas no difiere en gran medida, la cantidad de células involucradas y la intensidad con la que éstas responden, es distinta en la infección por las diferentes cepas bacterianas causantes de la infección pese a tratarse de una misma especie. Las diferencias entre la interacción específica de las diferentes cepas de patógeno con hospedero también pudieron observarse en la severidad con la que se desarrolló la patología evaluada a través de la pérdida de peso y del tamaño de la lesión.

Debido a lo anterior, se debe tener cautela al tratar de extrapolar los resultados biológicos de la infección por una cepa a otra. Adicionalmente, estas diferencias observadas entre cepas podrían impactar desfavorablemente tanto en la respuesta a los tratamientos que se emplean actualmente en la clínica, como al desarrollo de nuevos tratamientos contra microorganismos como *A. baumannii*, para los que de por sí estas situaciones son delicadas, debido principalmente, a la alta prevalencia de mecanismos de resistencia, mismos, que definitivamente pueden ser diferentes entre distintos aislados clínicos y adicionalmente, podrían estar afectados por el tratamiento con antibióticos.

Considerando que la patología que desarrollaron los ratones infectados con la cepa A578 fue más severa y tomando en cuenta la alta plasticidad del genoma de *A. baumannii*, consideramos de suma importancia realizar el análisis comparativo de los genomas de ambas cepas bacterianas, para identificar los factores propios de la bacteria que podrían estar impactando en la severidad de la patología.

Es imprescindible continuar estudiando los mecanismos de defensa importantes para el control de *A. baumannii* resistente a antibióticos de circulación clínica actual, ya que el tener esta información podrá proporcionar herramientas para el desarrollo de nuevos tratamientos contra este patógeno, entre las que podrían resaltar de manera importante las inmunoterapias [405], pues es de destacar que *A. baumannii* afecta en gran medida a individuos que cursan con alguna inmunodeficiencia [55, 340].

Nuestros resultados sugieren que IL-17 tiene una contribución discreta en la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii*, tanto de la cepa ATCC 17978 como de la cepa A578, sin embargo, en un escenario en el que el paciente que cursa con una infección por *A. baumannii* y, al mismo tiempo se ve afectado por otras patologías o por condiciones que lo tornen inmunosuprimido, lo que no es poco frecuente en los individuos infectados con esta bacteria, los mecanismos de defensa modulados por IL-17 podrían resultar determinantes en el desenlace de la infección. Debido a esta situación, sería interesante conocer cómo se encuentran los niveles de IL-17 en pacientes afectados por *A. baumannii* o si los pacientes que cursan con condiciones que afecten la producción o señalización de IL-17, como pacientes que cursan con síndrome de hiper-IgE, pacientes con deficiencia del receptor IL-17RA, con mutaciones en STAT1, IL12B o IL12RB1, que disminuyen la producción de IL-17, o con deficiencia en

el regulador autoinmune AIRE (del inglés, *autoimmune regulator*), para los que se han identificado defectos en la señalización de IL-17 [406, 407] presentan alguna susceptibilidad incrementada al desarrollo de infecciones por *A. baumannii*.

9. CONCLUSIONES PRELIMINARES

- La infección subcutánea por *A. baumannii*, cepas ATCC17978 o A578, no es letal, es autolimitada y no se disemina sistémicamente.
- La infección subcutánea por *A. baumannii* A578, induce significativamente la transcripción de *Il17a* luego de 2 horas de infección, mientras que la infección con la cepa ATCC 17978 solo tiende a incrementar la transcripción basal.
- La infección subcutánea por *A. baumannii* A578 incrementa la concentración de IL-17 en el sitio de infección. La proteína recupera su nivel basal luego de 24 horas de infección, mientras que la infección por la cepa ATCC 17978 solo provoca una tendencia al incremento de la proteína.
- La infección subcutánea por *A. baumannii*, tanto ATCC 7978 como A578, induce la producción de IL-17 F en el sitio de la lesión. La concentración de esta proteína se mantiene elevada desde las 12 y, al menos, hasta las 72 horas postinfección.
- El heterodímero de IL-17A/IL-17F disminuye tras la infección subcutánea con *A. baumannii*.
- IL-17 no es esencial para el control de la infección subcutánea por *A. baumannii*.
- IL-17 contribuye a la disminución de la patología más severa que, a nivel sistémico, causa la infección subcutánea por la cepa A578 de *A. baumannii*.
- La infección subcutánea por *A. baumannii* A578 provoca una lesión de mayor tamaño en comparación con la provocada por *A. baumannii* ATCC 17978 y esto es independiente de IL-17.
- IL-17 contribuye al desarrollo de una lesión de mayor tamaño durante la infección por *A. baumannii* A578, mientras que en la infección subcutánea por la cepa ATCC 17978 contribuye a acelerar la reparación de la lesión.
- La cinética de la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 y A578 es idéntica en presencia de IL-17.
- IL-17 contribuye a la pronta resolución de la infección subcutánea por la cepa A578.
- Durante las primeras 12 horas postinfección, diferentes poblaciones celulares, principalmente neutrófilos, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ y células TCRγδ, contribuyen a la producción de IL-17 en el sitio de infección.
- Diferentes cepas bacterianas, inducen la producción de IL-17 en diferentes poblaciones celulares.
- La infección por *A. baumannii*, tanto ATCC 17978, como A578, induce el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Dicho fenómeno se presenta con una cinética diferencial en respuesta a la infección por A578 y ATCC 17978, donde ocurre más tempranamente, desde 4 horas postinfección.

- Las células TCR $\gamma\delta$ se incrementan en piel infectada por las cepas ATCC 17978 y A578 de *A. baumannii* tras 12 horas postinfección.

Aunque aún es necesario realizar repeticiones de algunos experimentos, sobre todo de aquellos enfocados en identificar las sobpoblaciones celulares productoras de IL-17 a diferentes tiempos postinfección con *A. baumannii* ATCC 17978 y A578, los resultados que se muestran en este trabajo sugieren que la IL-17 producida por diferentes poblaciones de linfocitos T y neutrófilos en el sitio de infección, contribuye a la pronta resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* A578, mientras que su contribución a la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC resulta menor. Adicionalmente estos resultados también sugieren que la IL-17 producida localmente en el sitio de infección, podría tener un impacto negativo en el daño al tejido del hospedero. Mientras que la intensidad y la magnitud de las células involucradas en la defensa contra *A. baumannii* en la infección subcutánea, así como la severidad de la patología, se ven influenciados por la cepa de *A. baumannii* causante de la infección.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la cinética de resolución de la infección a través de la cuantificación de la carga bacteriana en piel de ratones IL-17A/F KO y determinar el tiempo de resolución de la infección por *A. baumannii* A578 en dichos ratones.
- Dar robustez al análisis de poblaciones inmunológicas que participan en respuesta a la infección subcutánea por *A. baumannii* mediante la producción de IL-17 y a través de otros mecanismos pero que son reclutadas o que proliferan en respuesta a la infección. Esto implica realizar el análisis citométrico bajo las mismas condiciones de sitio anatómico infectado, empleo del mismo panel de anticuerpos y uso del mismo equipo para la adquisición de las muestras.
- Corroborar, mediante la eliminación de diferentes poblaciones celulares su contribución al control y resolución de la infección.
- Identificar *in situ*, mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, la presencia de IL-17 tras la infección por *A. baumannii* y corroborar sus fuentes celulares.
- Determinar el papel de IL-17 en la resolución de la lesión, a través del análisis de las moléculas y proteínas involucradas en la reparación del tejido.

Evaluar la transcripción y expresión de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos río abajo de IL-17, tanto a nivel local en el área de la lesión, como a nivel sistémico. Y evaluar si existe una inducción diferencial de estas moléculas tras la infección en ausencia de IL-17.

- Realizar el análisis comparativo del genoma de la cepa A578 con el genoma de la cepa ATCC 17978 e identificar variantes moleculares entre cepas que pudieran explicar las diferencias tras la infección por cada una de las cepas en cuanto a la patología y el reclutamiento y activación de células observado *in vivo*.
- Evaluar la contribución de IL-17F al control y/o resolución de la infección.

11. RESUMEN GRÁFICO

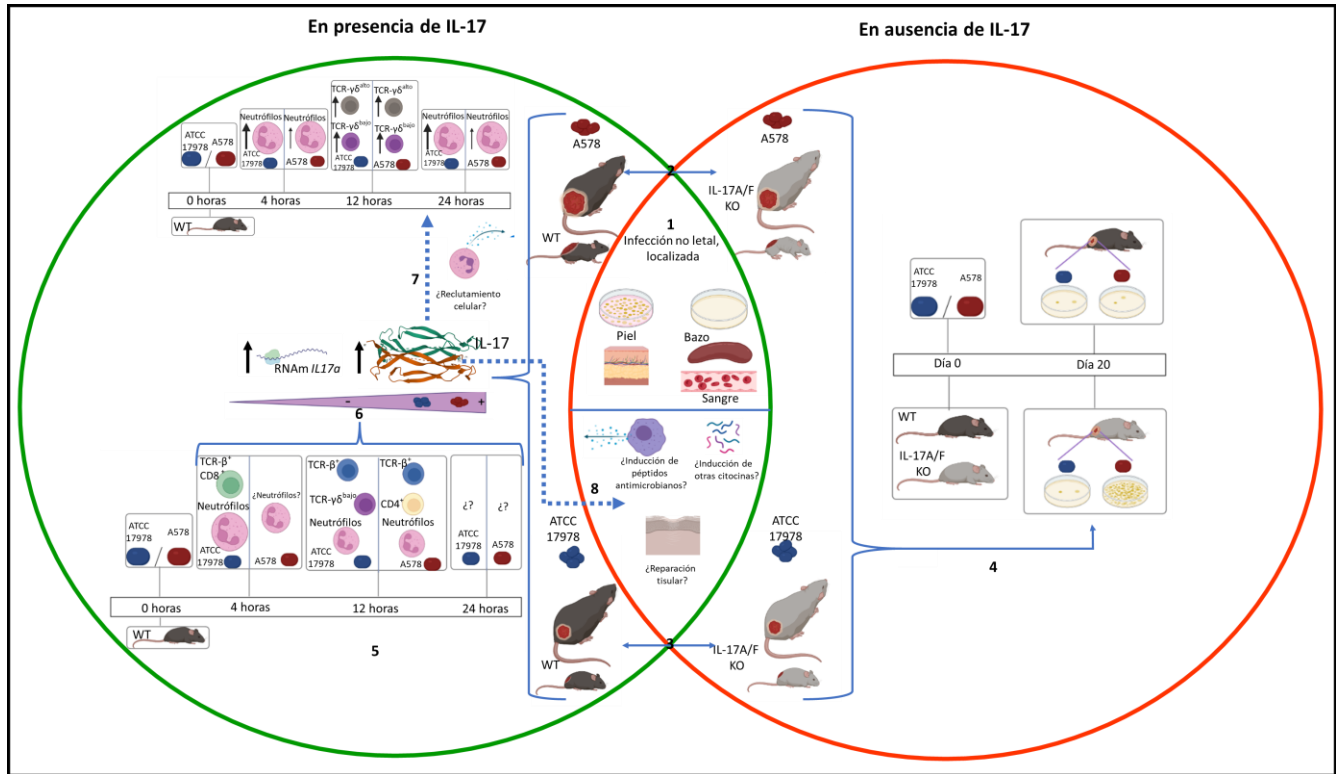
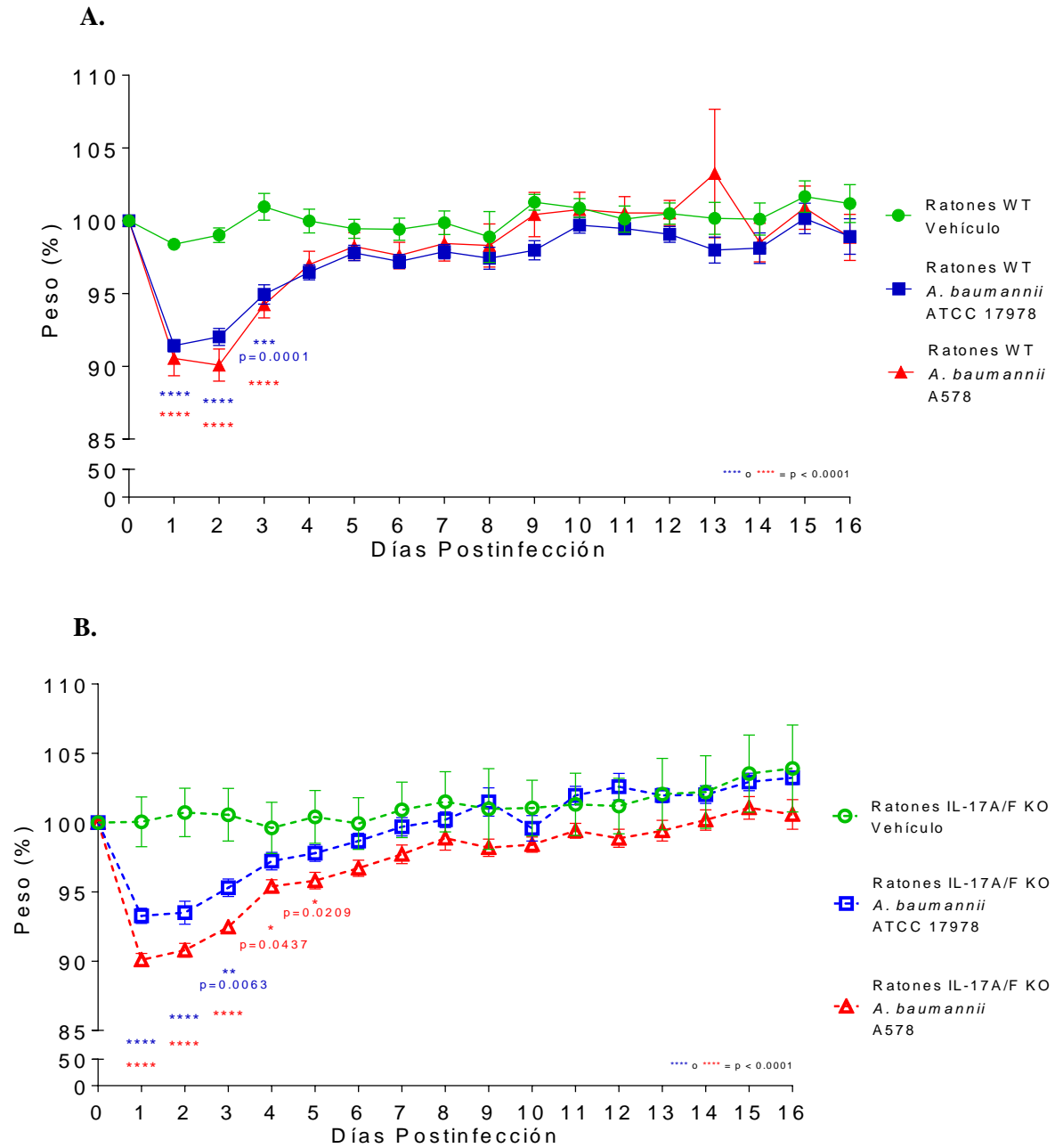

















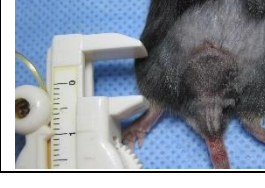





























Figura 22. IL-17 contribuye a la resolución de la infección subcutánea por *A. baumannii* tanto de la cepa ATCC 17978 como por A578. 1) La infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) no es letal ni resulta en diseminación, incluso en ausencia de IL-17 (círculo anaranjado). **2)** Sin embargo, IL-17 tiene efecto detrimental en el desarrollo de la lesión causada por la cepa A578 (que es más severa que la ocasionada por la cepa ATCC 17978), pero tiene un papel benéfico sobre la patología que ocasiona la cepa A578 a nivel sistémico, **3)** mientras que contribuye a la pronta reparación de la lesión ocasionada por la cepa ATCC 17978, **4)** así como a la pronta resolución de la infección por la cepa A578. **5)** Diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas responden a la presencia de *A. baumannii* mediante la inducción del ARNm de *Il17a* y el aumento en la proteína IL-17. **6)** IL-17 (círculo verde) favorece la resolución de la bacteria activando diferentes mecanismos, aún pendientes por determinar (líneas punteadas). Uno de estos posibles mecanismos podría ser **7)** la producción de quimiocinas, lo que, en el sitio de infección, favorecería el incremento observado, a diferentes tiempos, de distintas poblaciones celulares, dependiendo de la cepa bacteriana causante de la infección. **8)** Otros mecanismos que pudieran contribuir a la resolución de la infección, que pueden o no inducirse en respuesta a IL-17, son, la inducción de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α o de péptidos antimicrobianos como β -defensinas o péptidos S100. IL-17 también podría contribuir a procesos relacionados con la reparación del tejido dañado. Creado con BioRender.com

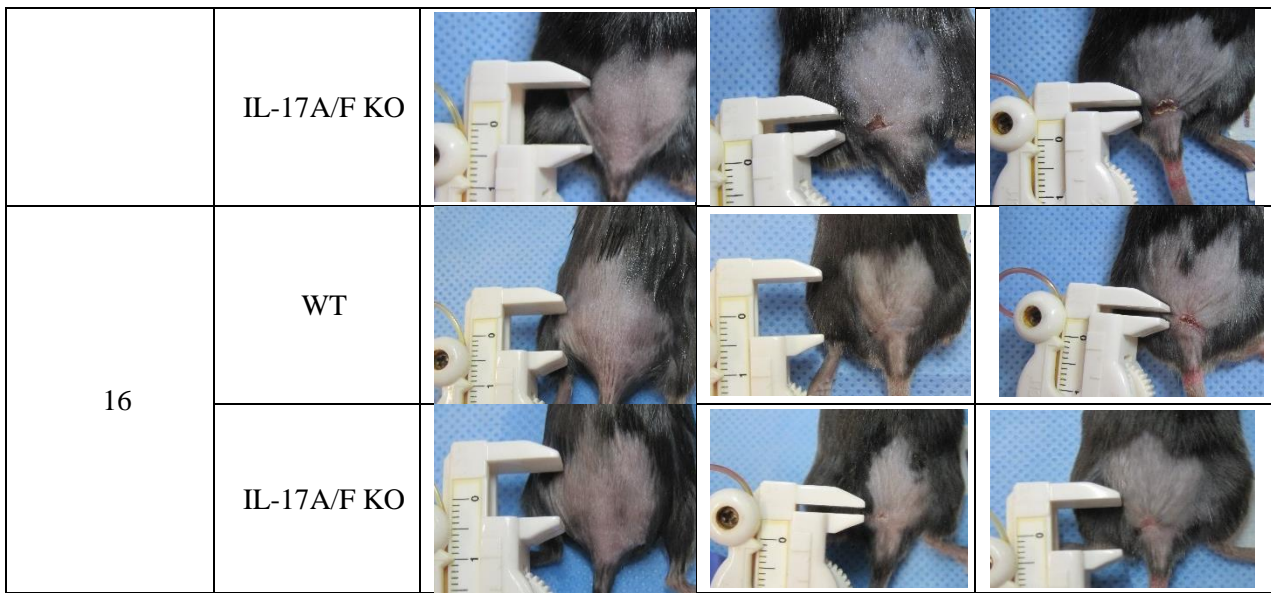
12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA



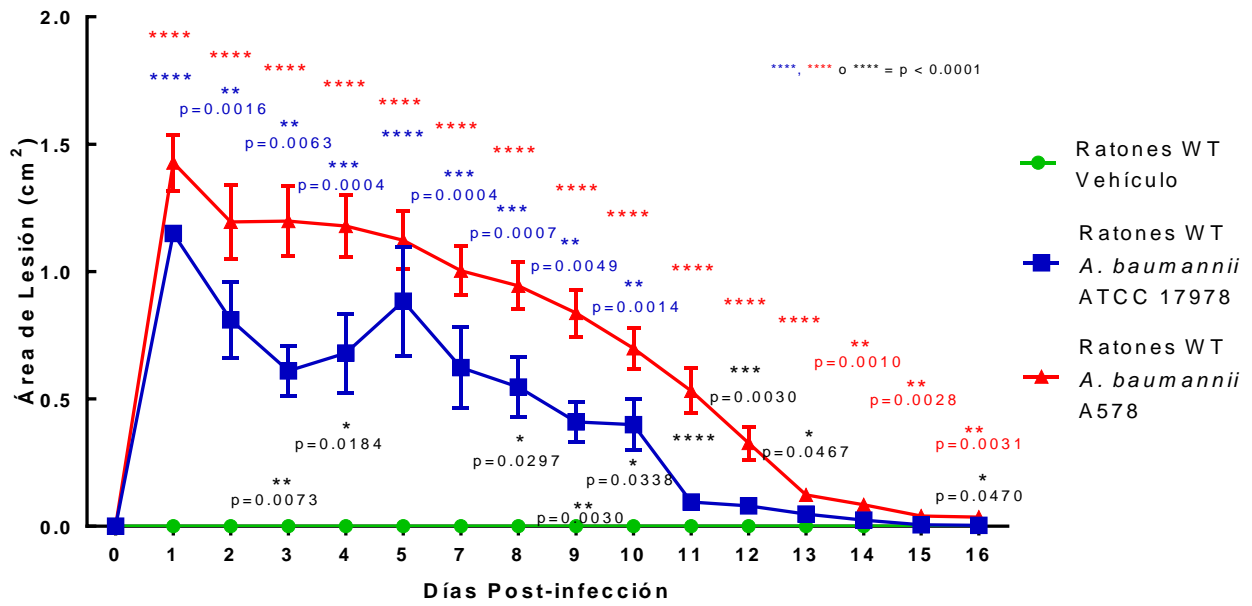
C.

Día postinfección	Genotipo murino	Tratamiento subcutáneo		
		Vehículo	<i>A. baumannii</i> ATC7978	<i>A. baumannii</i> A578
0	WT			
	IL-17A/F KO			
2	WT			
	IL-17A/F KO			
4	WT			
	IL-17A/F KO			

6	WT			
	IL-17A/F KO			
8	WT			
	IL-17A/F KO			
10	WT			
	IL-17A/F KO			
12	WT			
	IL-17A/F KO			
14	WT			



D.



E.

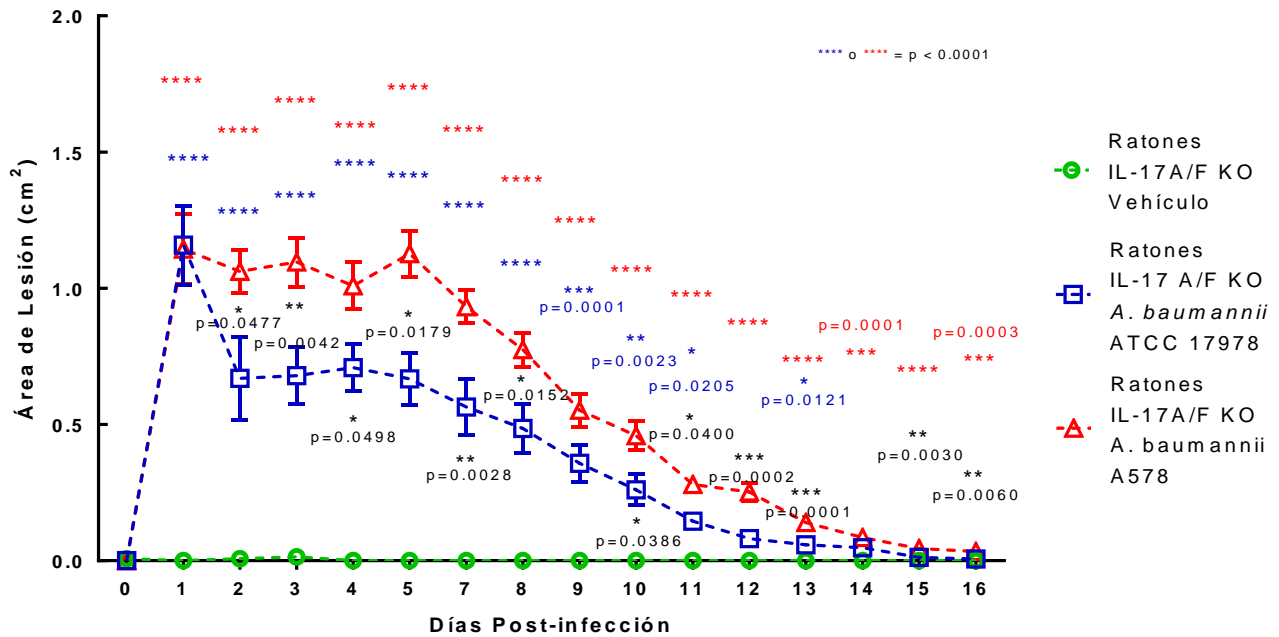
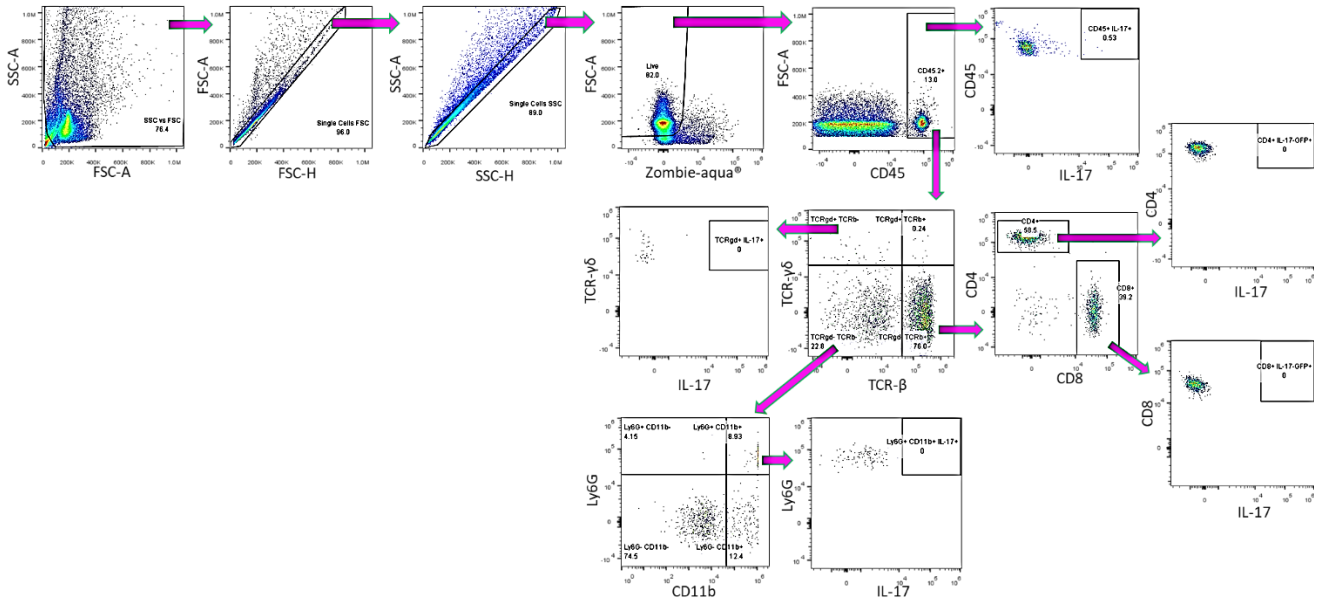


Figura Suplementaria 1. Evolución durante varios días de la patología de ratones WT o IL-17A/F KO luego de ser infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. A-B. Cinética del porcentaje de peso corporal de ratones luego de ser infectados subcutáneamente con *A. baumannii*, se muestran los mismos datos que en la Fig. 11 A-B. A. Porcentaje de peso corporal de ratones WT infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) o administrados con vehículo (verde). B. Porcentaje de peso corporal de ratones IL-17A/F KO infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo) o administrados con vehículo (verde). Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes. C. Fotografías representativas de la lesión desarrollada luego de la infección. D-E. Tamaño de la lesión desarrollada en el área de infección por ratones WT luego de haber sido infectados vía subcutánea con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o *A. baumannii* A578 (rojo). E. Tamaño de la lesión desarrollada en el área de infección por ratones IL-17A/F KO luego de haber sido infectados subcutáneamente con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o *A. baumannii* A578 (rojo). A-B, D-E Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes, cada uno con $n = 3-7$ ratones por grupo. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. * = Vehículo vs. *A. baumannii* ATCC 17978, * = Vehículo vs. *A. baumannii* A578, * = *A. baumannii* ATCC 17978 vs. *A. baumannii* A578. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

A.



B.

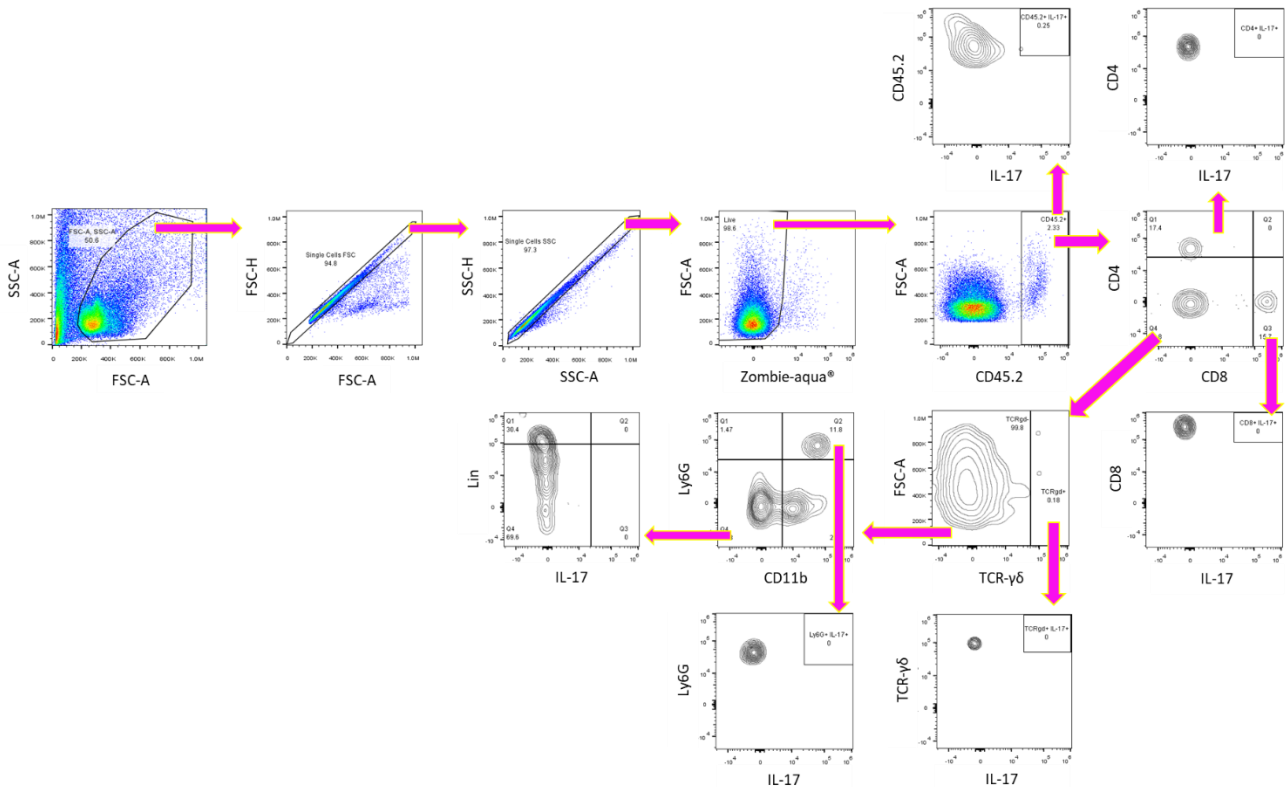


Figura suplementaria 2. Estrategia de análisis para la identificación de distintas poblaciones inmunológicas analizadas con dos diferentes paneles de anticuerpos tras la infección subcutánea durante 4 horas por *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 en piel, bazo y ganglios linfáticos de ratones C57BL/6-*Il17a^{tm1Bcgen}*/J. A. A partir de una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad se excluyó el *debris* celular. Posteriormente, se excluyeron eventos correspondientes a agregados celulares mediante la selección de eventos sencillos tanto en el parámetro de tamaño como en el de granularidad. A partir de los eventos sencillos, se realizó la exclusión de células muertas, positivas para la tinción con Zombie-aqua®. A partir de las células vivas, se identificaron las células de origen hematopoyético CD45⁺ y dentro de éstas, se identificaron células positivas para eGFP como reportera para *Il17a*. También dentro de las células hematopoyéticas se analizó la expresión de los receptores TCR, el receptor TCR $\gamma\delta$ y la cadena β del receptor TCR $\alpha\beta$. Para los eventos positivos para la expresión de TCR β ,

se evaluó la expresión de CD4 y de CD8. Para los eventos negativos para TCR $\gamma\delta$ y para TCR β , se evaluó la expresión de CD11b y de Ly6G. Para las poblaciones CD4⁺, CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺ y Ly6G⁺ CD11b⁺ se evaluó la expresión de eGFP como proteína reportera de *Il17a*. B. Partiendo de una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad se excluyó el *debris* celular. Posteriormente se continuó con la exclusión de eventos correspondientes a agregados celulares mediante la selección de eventos sencillos en los parámetros de tamaño y granularidad. Enseguida se excluyeron células muertas, positivas para la tinción con Zombie-aqua[®]. Dentro de la región de células vivas se seleccionaron, para su análisis, las células hematopoyéticas CD45⁺. Dentro de la región de células hematopoyéticas se identificaron células positivas para eGFP como proteína reportera para *Il17a*. Por otro lado, pero también dentro de las células hematopoyéticas se analizó la expresión de las moléculas CD4 y CD8. Partiendo de los eventos negativos para la expresión tanto de CD4 como de CD8 se evaluó la expresión del receptor TCR $\gamma\delta$ y en la región de eventos negativos para la expresión de este receptor se evaluó la expresión tanto de Ly6G como de CD11b. En el caso de que los eventos fueran negativos para la expresión de ambos marcadores, se realizó la evaluación de la expresión de marcadores de linaje (anti-CD11c, anti-TER-119, anti-CD19, anti-Siglec F, anti-B220 y, anti-NK 1.1. En el caso de las regiones CD4⁺, CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, Ly6G⁺ CD11b⁺ y Lin⁻ se evaluó la expresión de eGFP como proteína reportera de *Il17a*.

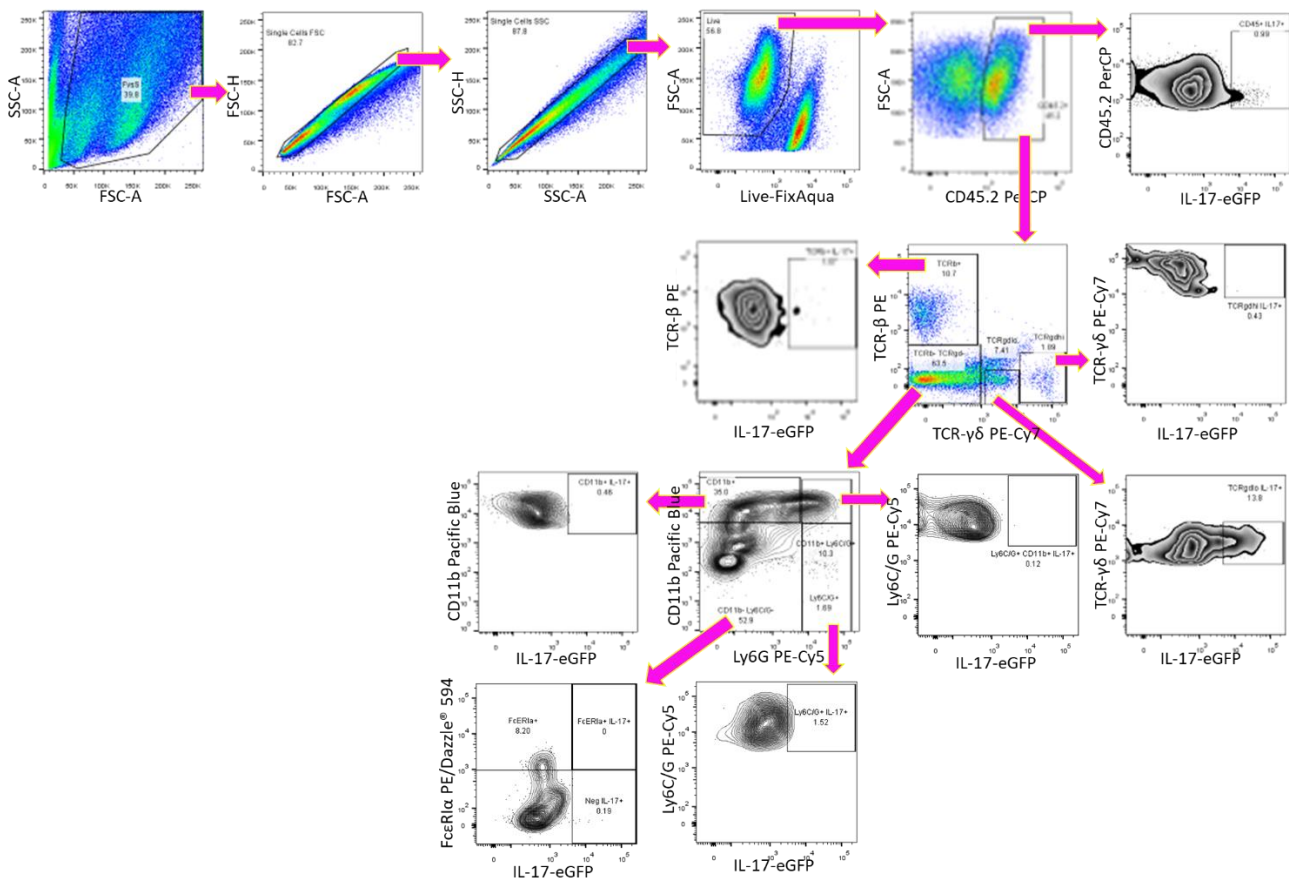


Figura suplementaria 3. Estrategia de análisis para la identificación de diversas poblaciones inmunológicas analizadas en piel, bazo y ganglios linfáticos de ratones C57BL/6-*Il17a^{mlBcgen}*/J luego de 12 horas de horas infección subcutánea por *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se excluyeron los eventos que por su tamaño corresponden a *debris* celular. Posteriormente, en graficas tanto de tamaño como de granularidad se seleccionaron eventos sencillos y posteriormente se excluyeron células muertas positivas para Zombie-aqua[®]. A partir de las células vivas se seleccionaron las células hematopoyéticas mediante la expresión de CD45 y sobre las células positivas para CD45 se identificaron células positivas para eGFP correspondientes a células positivas para *Il17*. También en los eventos CD45⁺ se evaluó la expresión de los receptores TCR, tanto TCR $\gamma\delta$ como la cadena β del receptor TCR $\alpha\beta$. En la región de eventos negativos para la expresión de TCR, se evaluó la expresión de CD11b y de Ly6G y, a partir de los eventos negativos para ambos marcadores, se evaluó la expresión de Fc ϵ RI α . La expresión de eGFP como reportera de IL17 se evaluó en las poblaciones TCR $\gamma\delta$ ⁺, TCR β ⁺, Ly6G⁺ CD11b⁺ y Fc ϵ RI α ⁺.

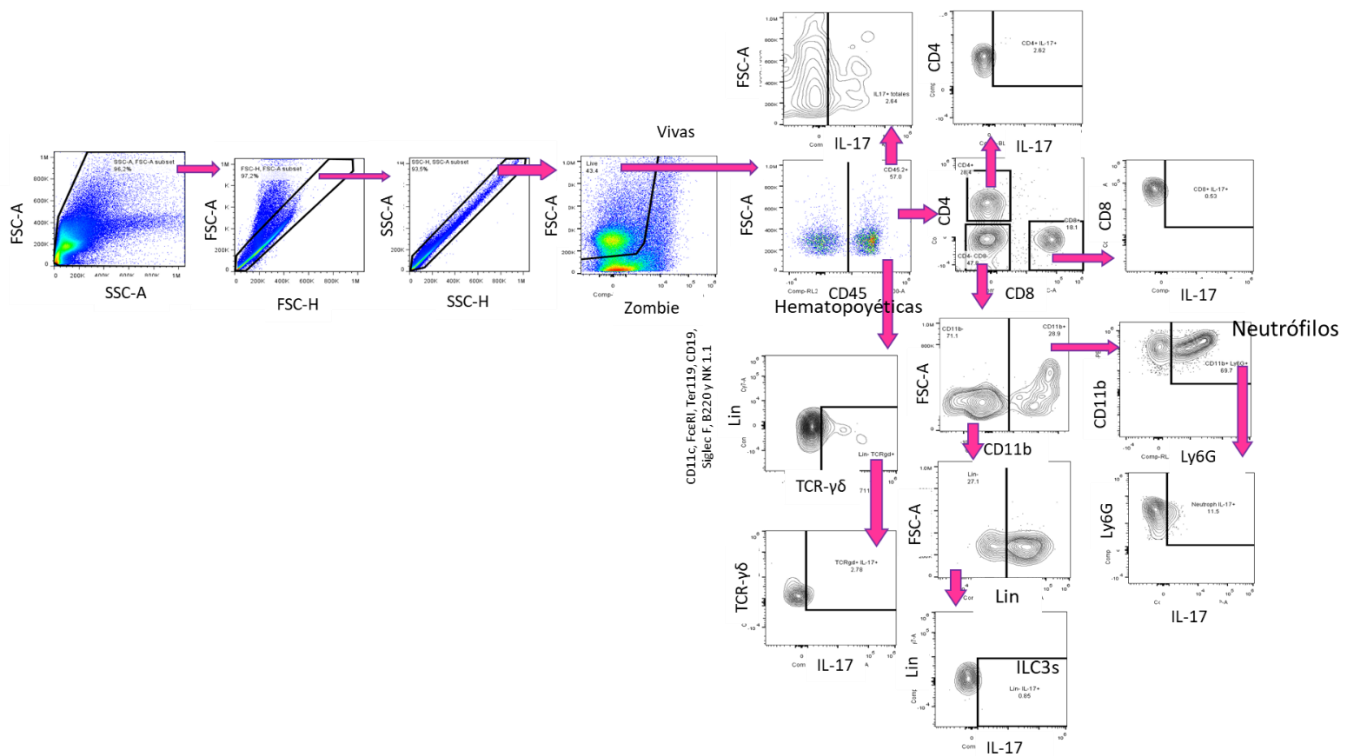
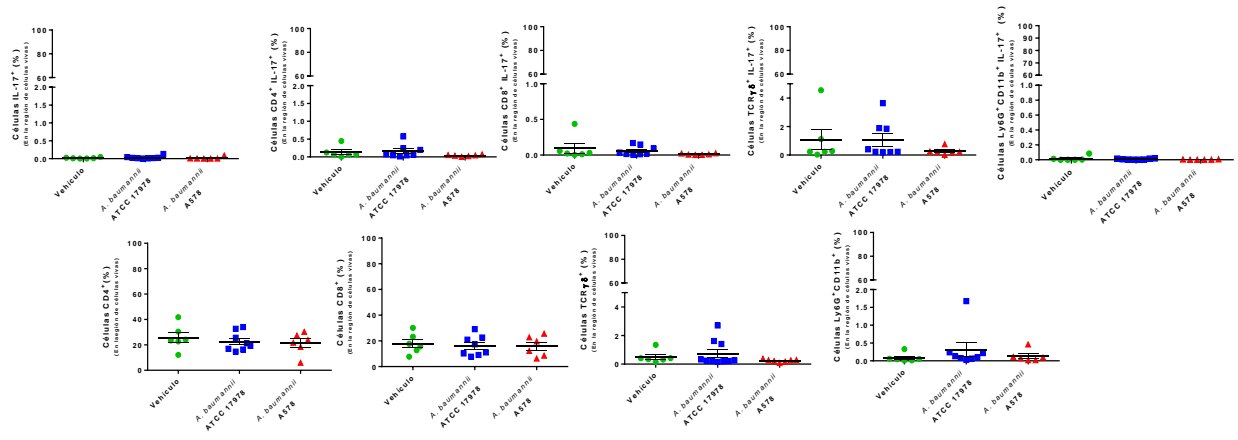
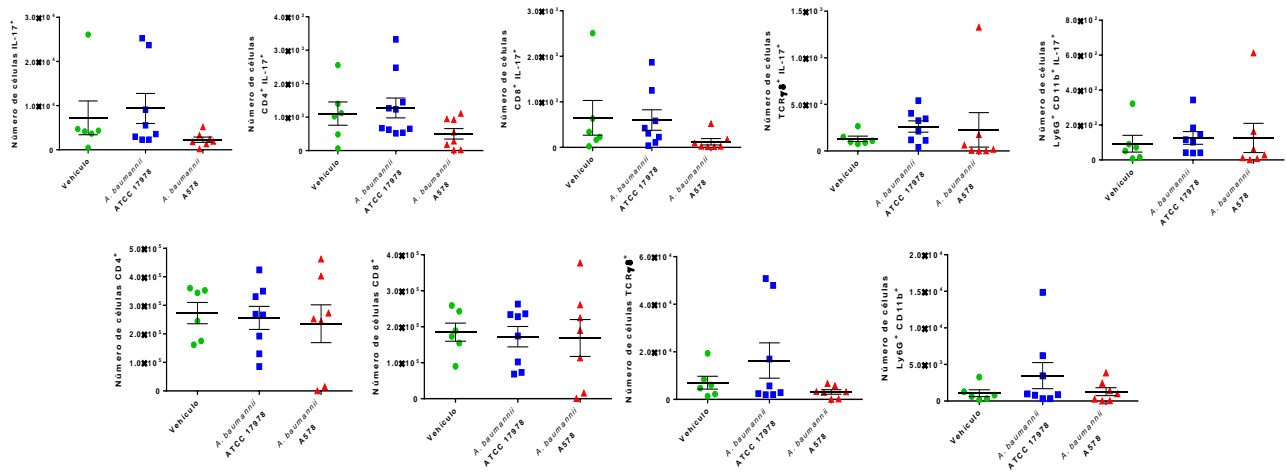


Figura suplementaria 4. Estrategia de análisis para la identificación de distintas poblaciones inmunológicas analizadas tras la infección subcutánea durante 24 horas por *A. baumannii* ATCC 17978 o A578 en piel, bazo y ganglios linfáticos de ratones reporteros C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen}/J. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se excluyeron los restos celulares. Se excluyeron agregados celulares a través de la selección de eventos sencillos tanto en el parámetro de tamaño como en el de granularidad. Sobre la región de eventos sencillos, se excluyeron células positivas para la tinción con Zombie-aqua® que corresponden a células muertas. Sobre las células con membrana íntegra, se seleccionaron las células de origen hematopoyético mediante la expresión de CD45. De las células positivas para CD45, se identificó el porcentaje de células positivas *Il17*, mediante la presencia de eGFP. También sobre la región de eventos positivos para CD45 se evaluó la expresión de CD4, CD8 y del receptor TCR $\gamma\delta$. En la región de eventos negativos para la expresión de CD4 y CD8, se evaluó la expresión de CD11b y sobre los eventos positivos para este marcador, se evaluó la expresión de Ly6G; mientras que sobre la región de eventos negativos para CD11b se evaluaron los marcadores de linaje: CD11c, Fc ϵ RI, TER-119, CD19, Siglec F, B220 y NK 1.1. Las células positivas para *Il17*, identificadas mediante la presencia de eGFP se evaluaron en las poblaciones celulares TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD4⁺, CD8⁺, Ly6G⁺ CD11b⁺ y Lin⁻.

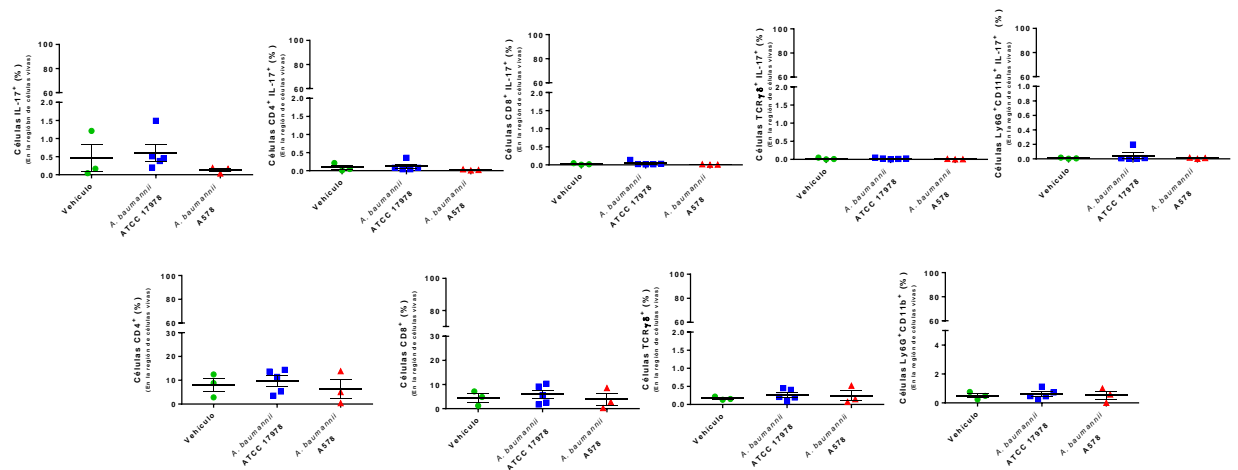
A.



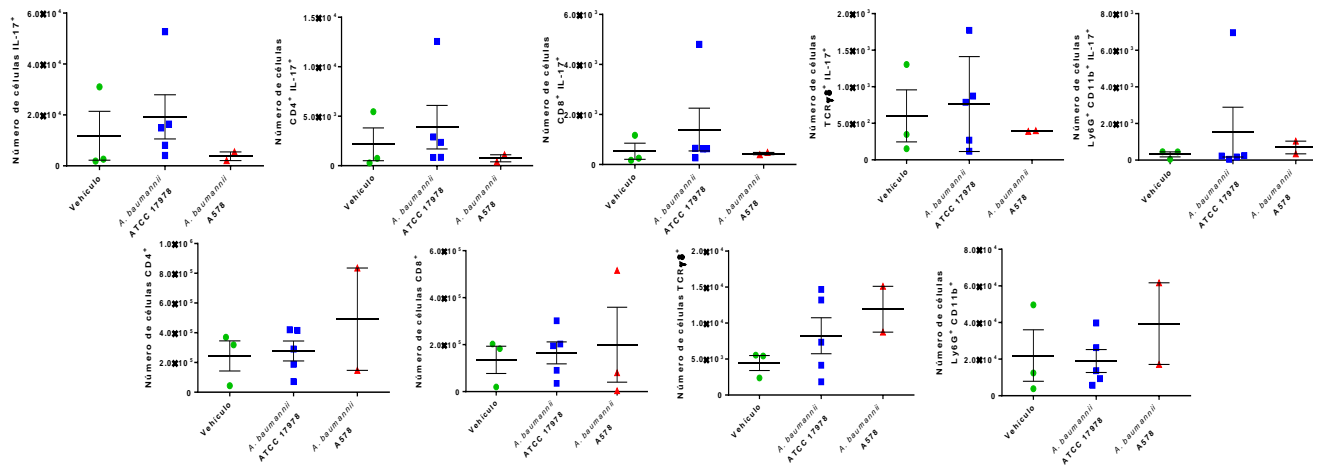
B.



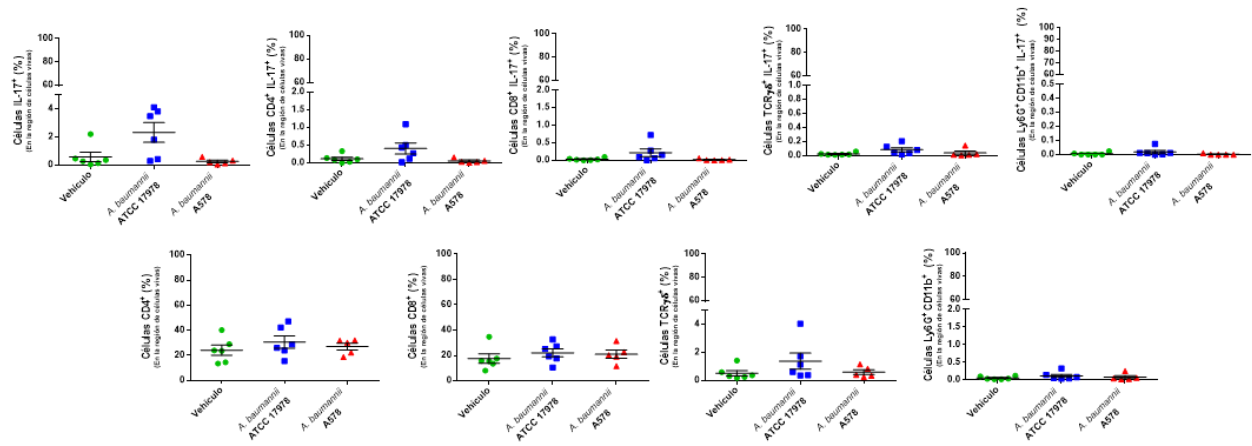
C.



D.



E.



F.

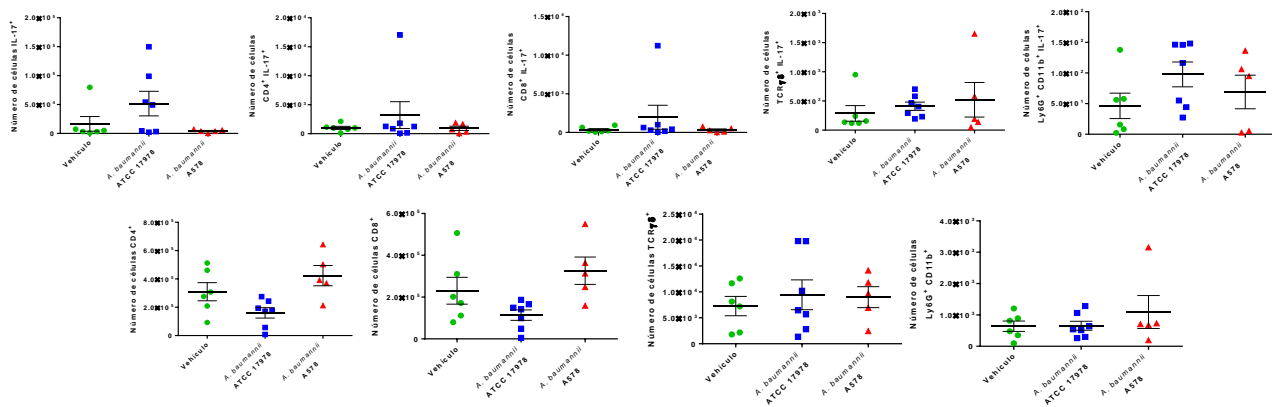
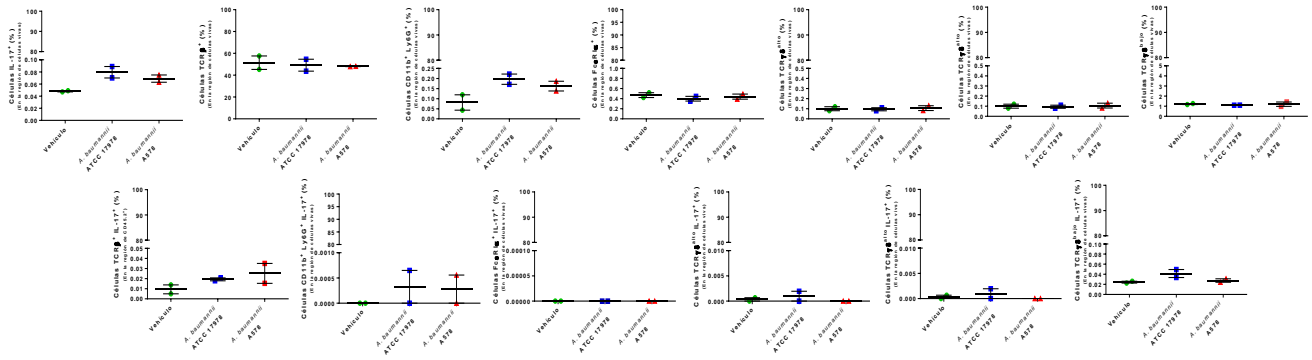
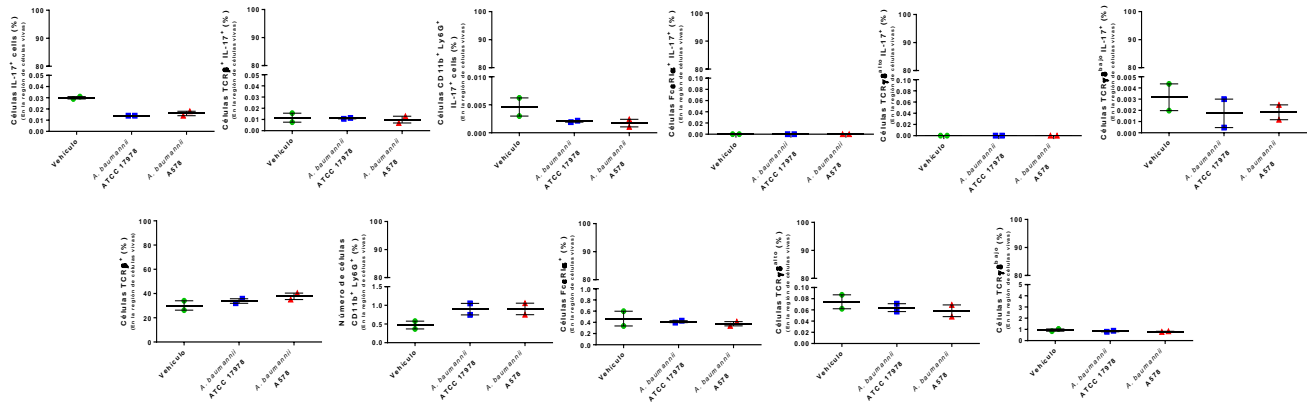


Figura suplementaria 5. A, C, E Porcentajes y B, D, F números totales de poblaciones celulares analizadas en A-B ganglios drenantes, C-D bazo y E-F ganglios no drenantes de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen}/J luego de 4 horas postinfección. Media aritmética y error estándar de 4 experimentos independientes, con grupos de n = 1-2 cada uno. No se encontró diferencia significativa. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

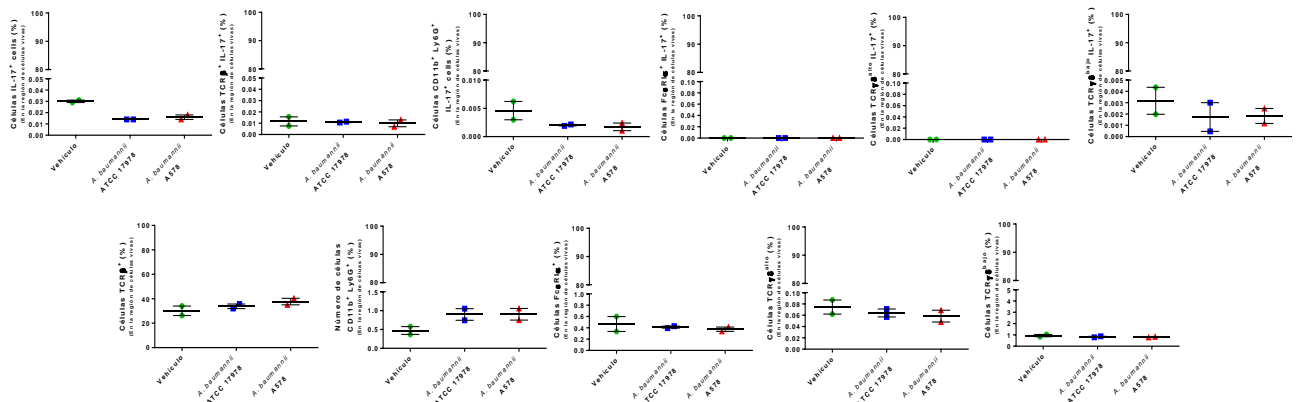
A.



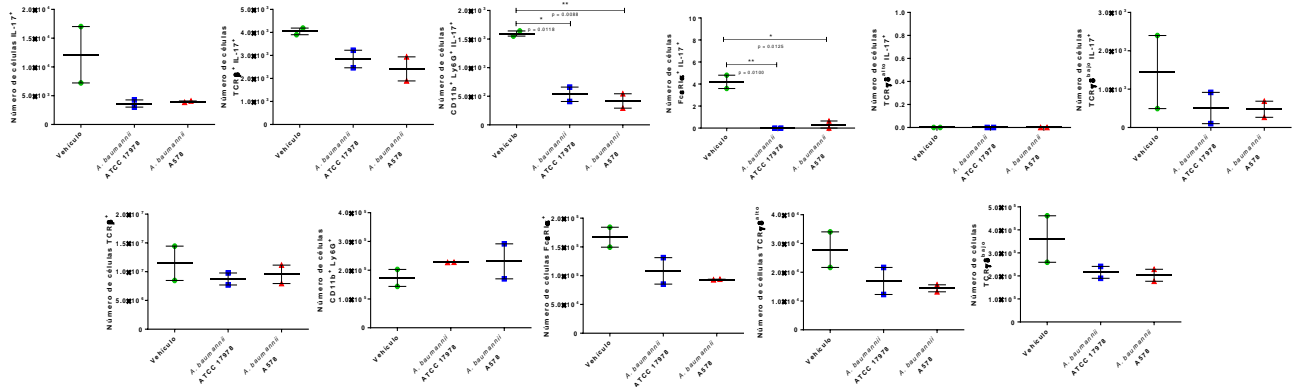
B.



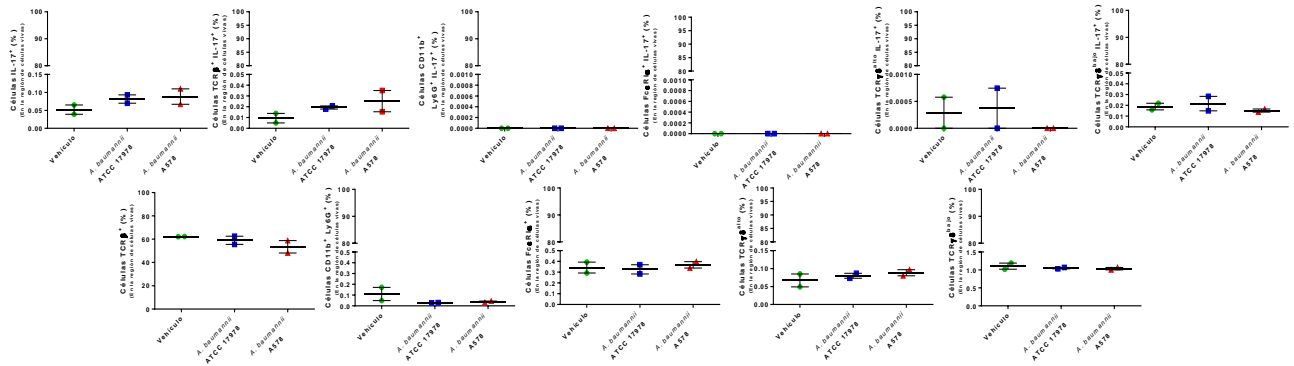
C.



D.



E.



F.

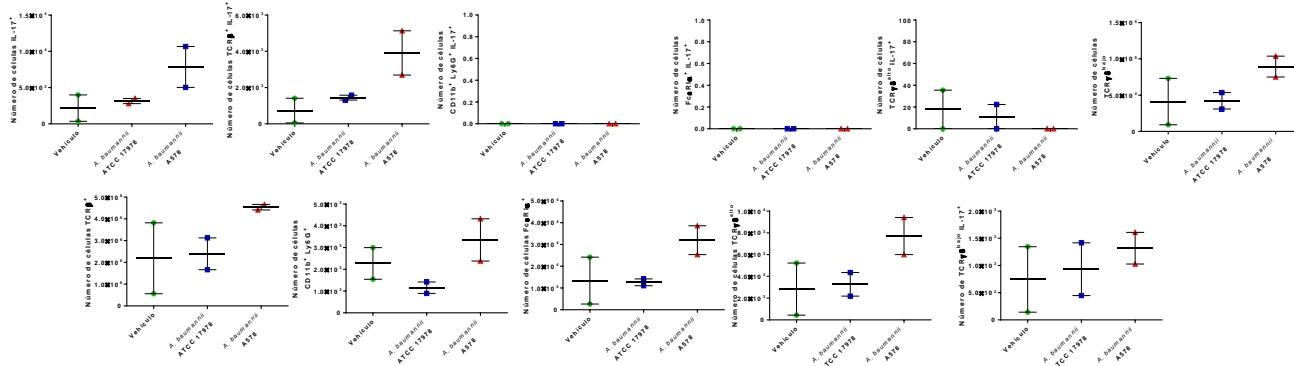
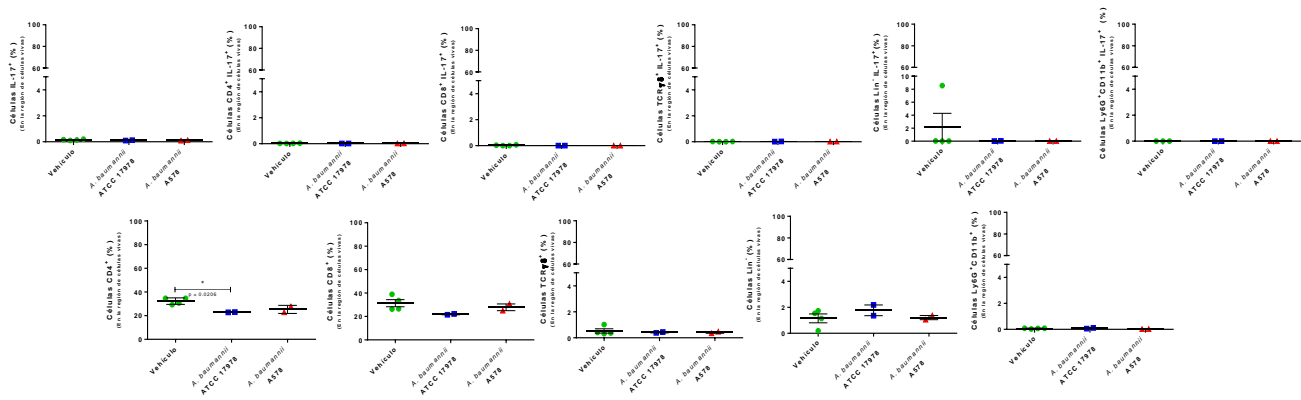
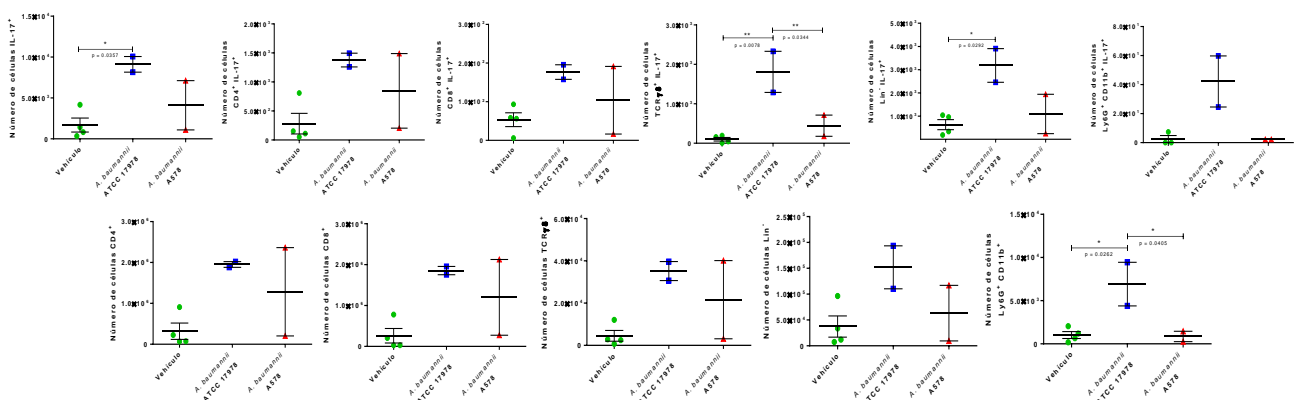


Figura suplementaria 6. A, C, E Porcentajes y B, D, F números totales de poblaciones celulares analizadas en A-B ganglios drenantes, C-D bazo y E-F ganglios no drenantes de ratones C57BL/6-*Il17a^{tm1Bcgen/J}* luego de 12 horas postinfección. Media aritmética y error estándar de un experimento, con n = 2 para cada tratamiento distinto. * = p < 0.05, ** = p < 0.01. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

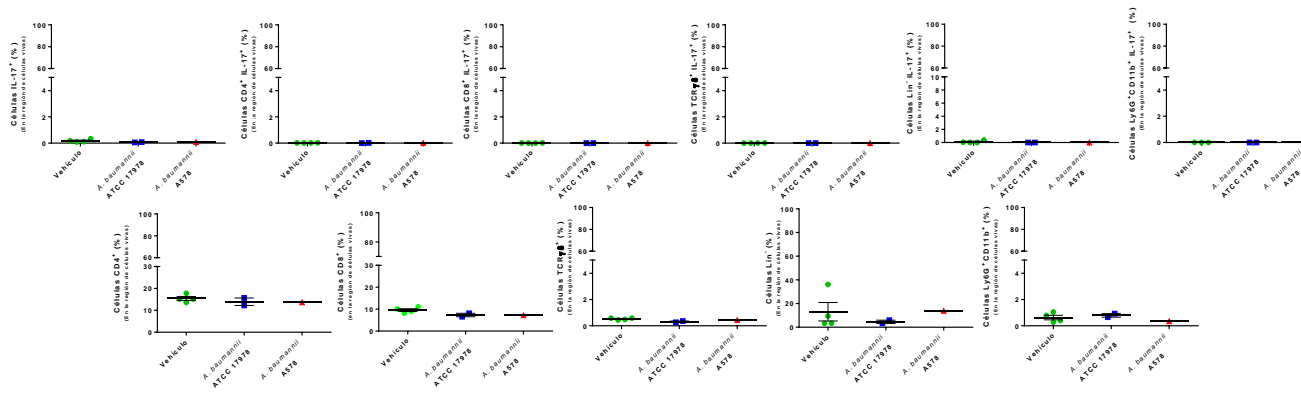
A.



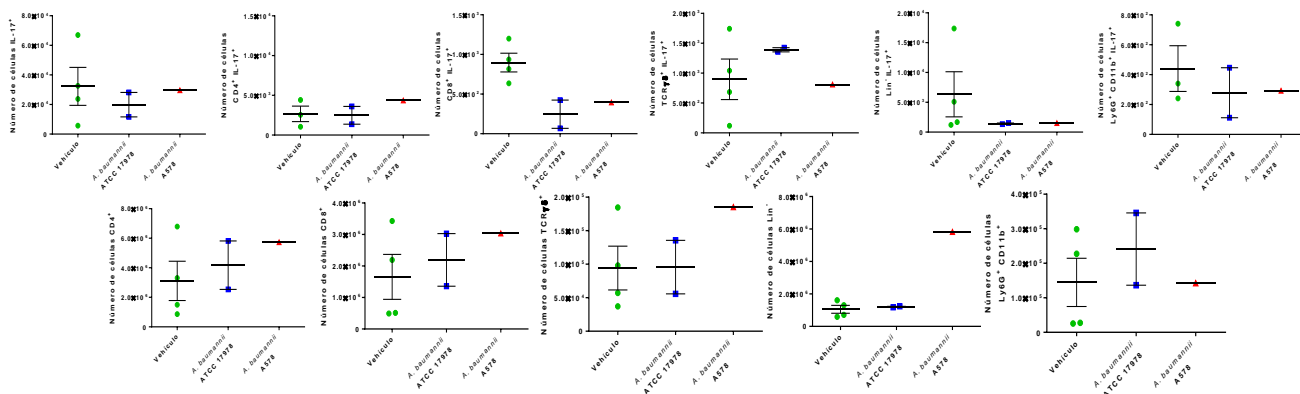
B.



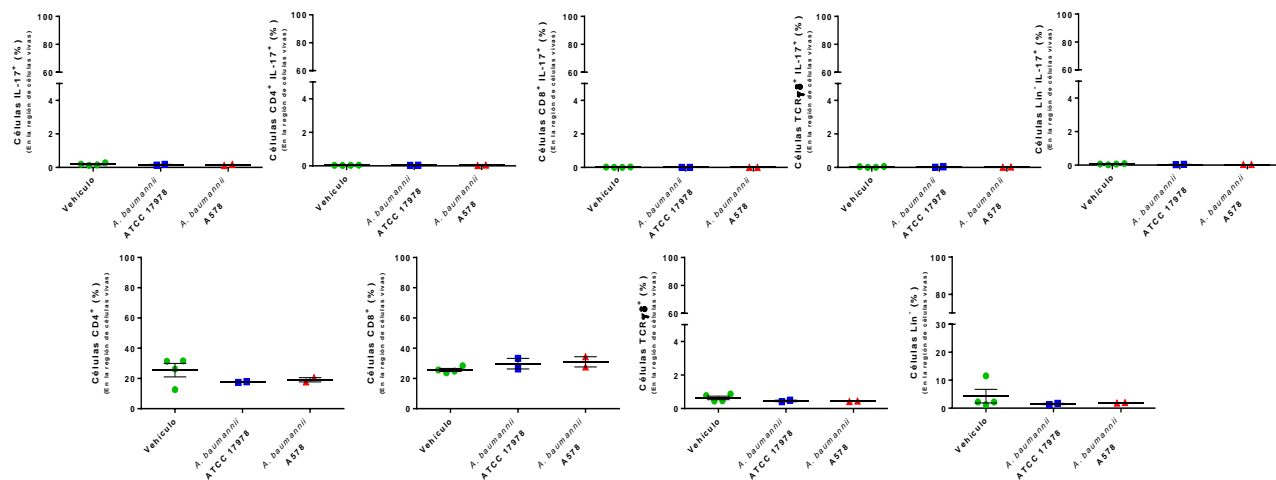
C.



D.



E.



F.

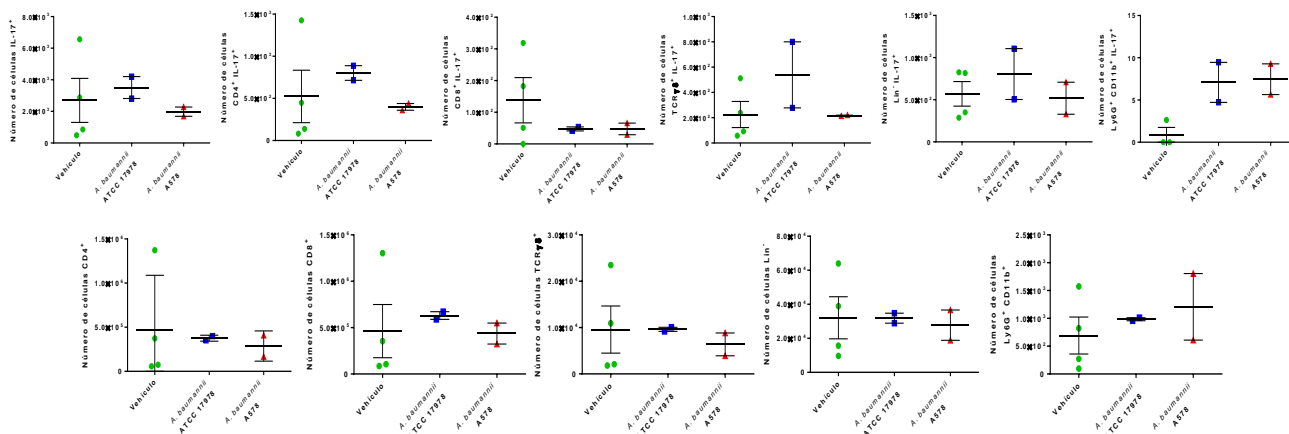
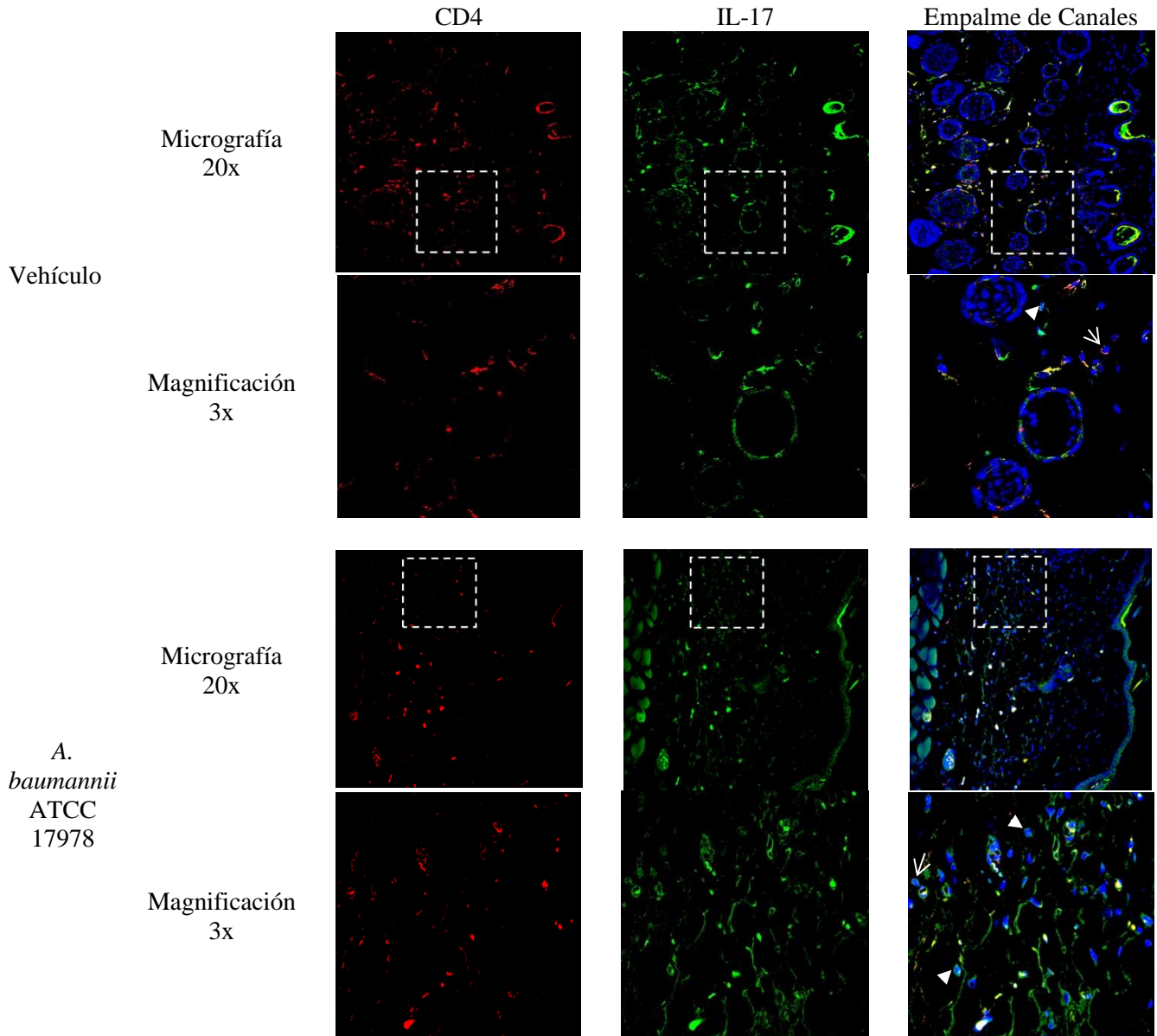


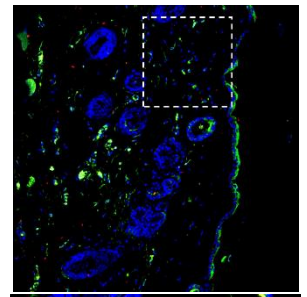
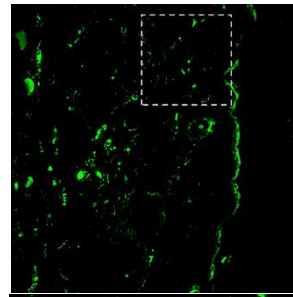
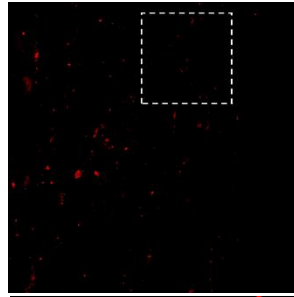
Figura suplementaria 7. A, C, E Porcentajes y B, D, F números totales de poblaciones celulares analizadas en A-B ganglios drenantes, C-D bazo y E-F ganglios no drenantes de ratones C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen/J} luego de 24 horas postinfección. Media aritmética y error estándar de 1 experimento, con n = 2-4 ratones por grupo. * = p < 0.05, ** = p < 0.01. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

A.

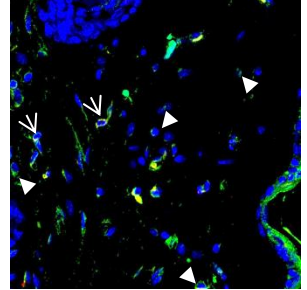
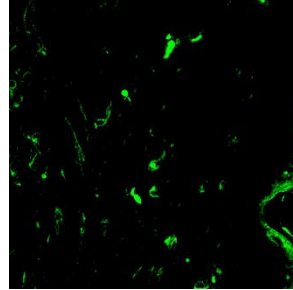
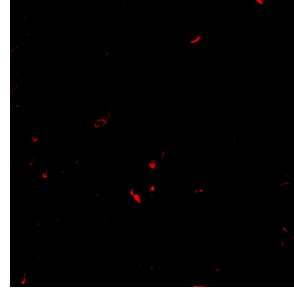


*A.
baumannii*
A578

Micrografía
20x



Magnificación
3x

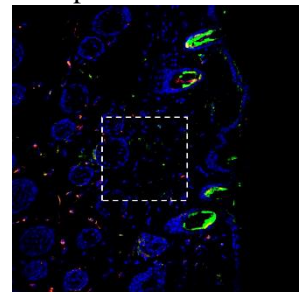
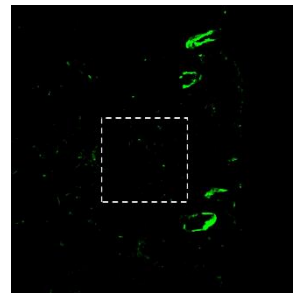
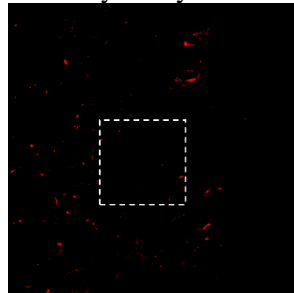


Ly6C/Ly6G

IL-17

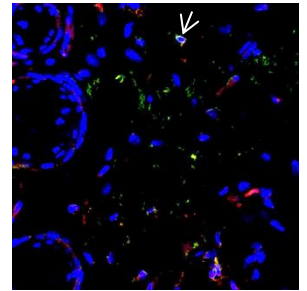
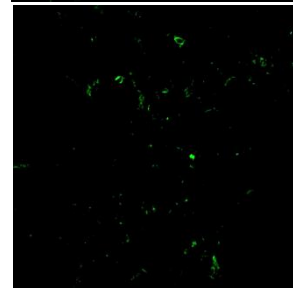
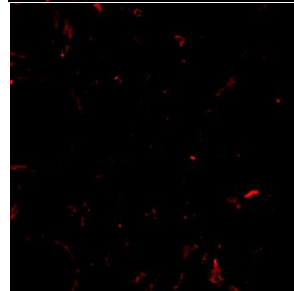
Empalme de Canales

Micrografía
20x



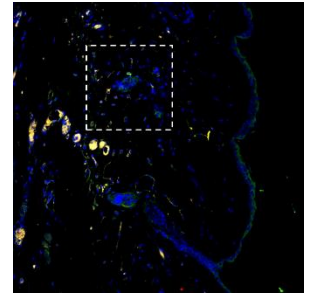
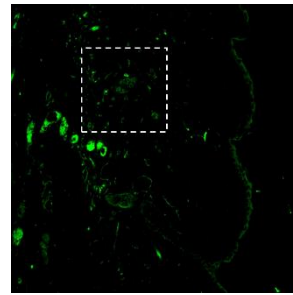
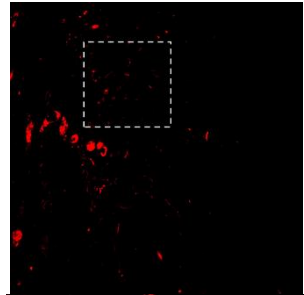
Vehículo

Magnificación
3x

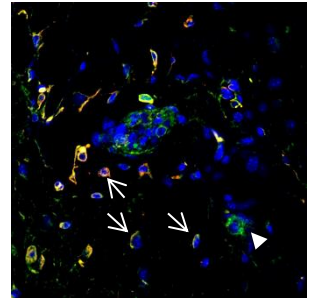
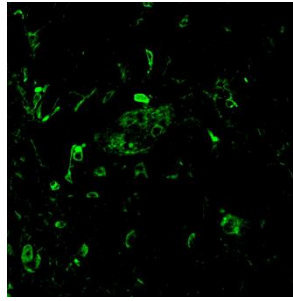
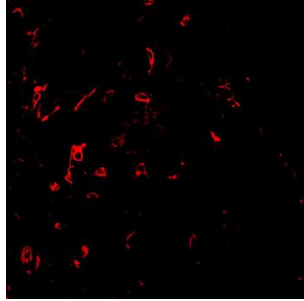


A.
baumannii
ATCC
17978

Micrografía
20x

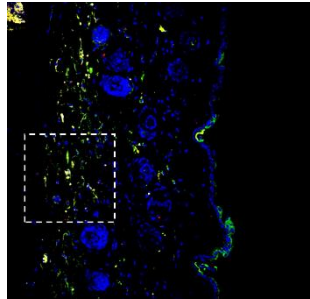
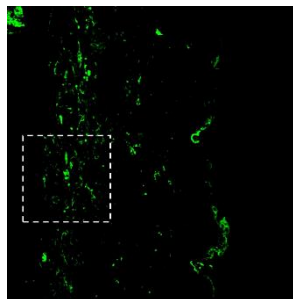
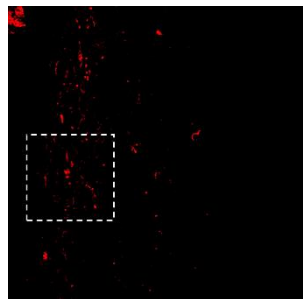


Magnificación
3x

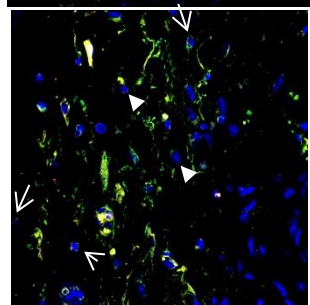
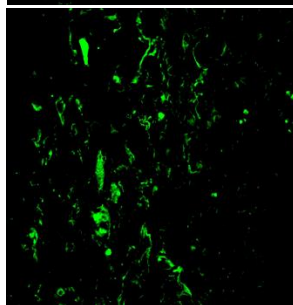
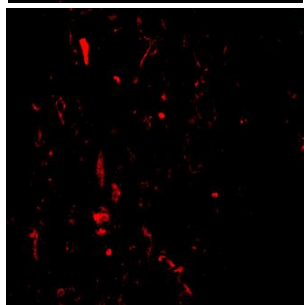


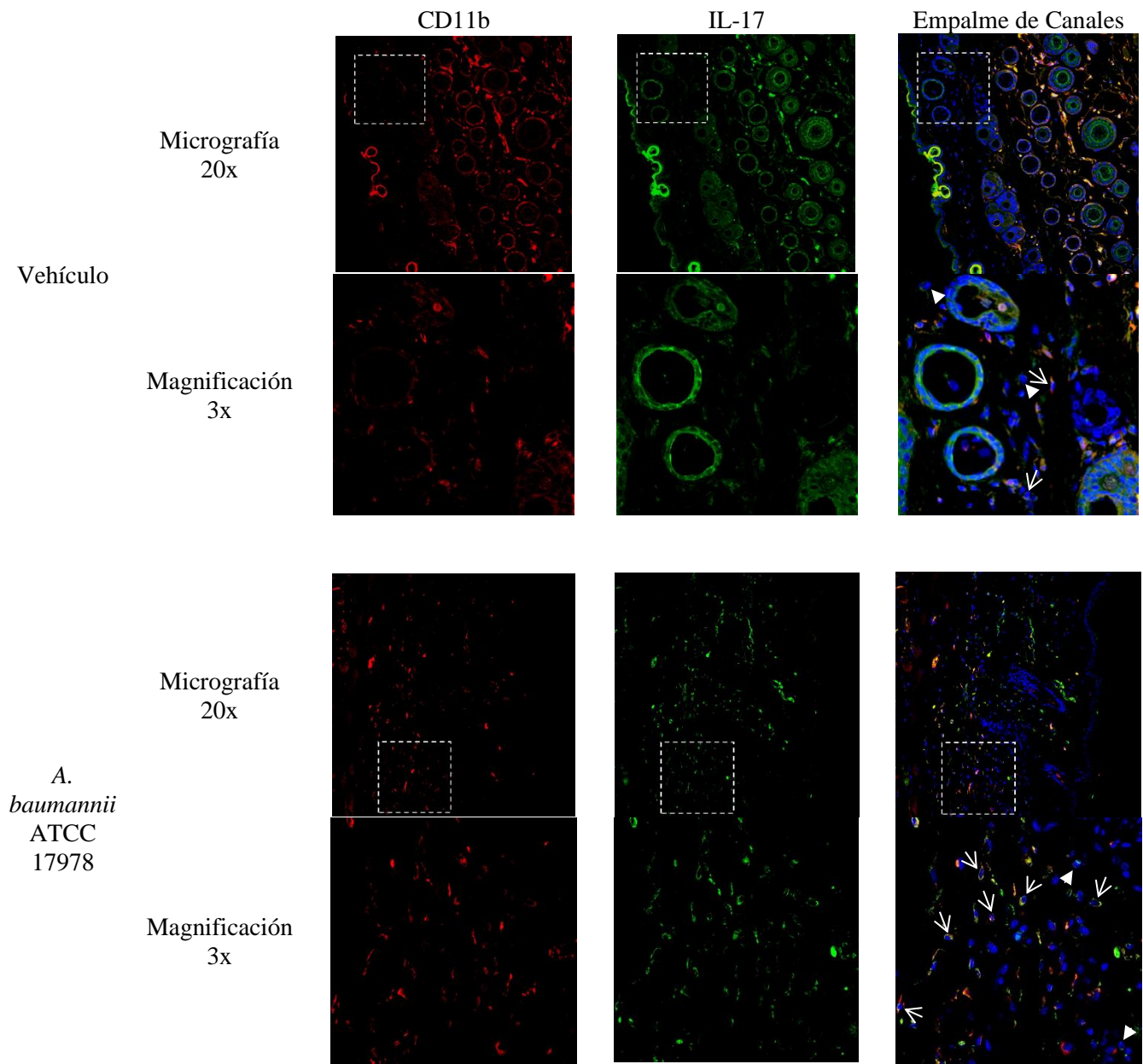
A.
baumannii
A578

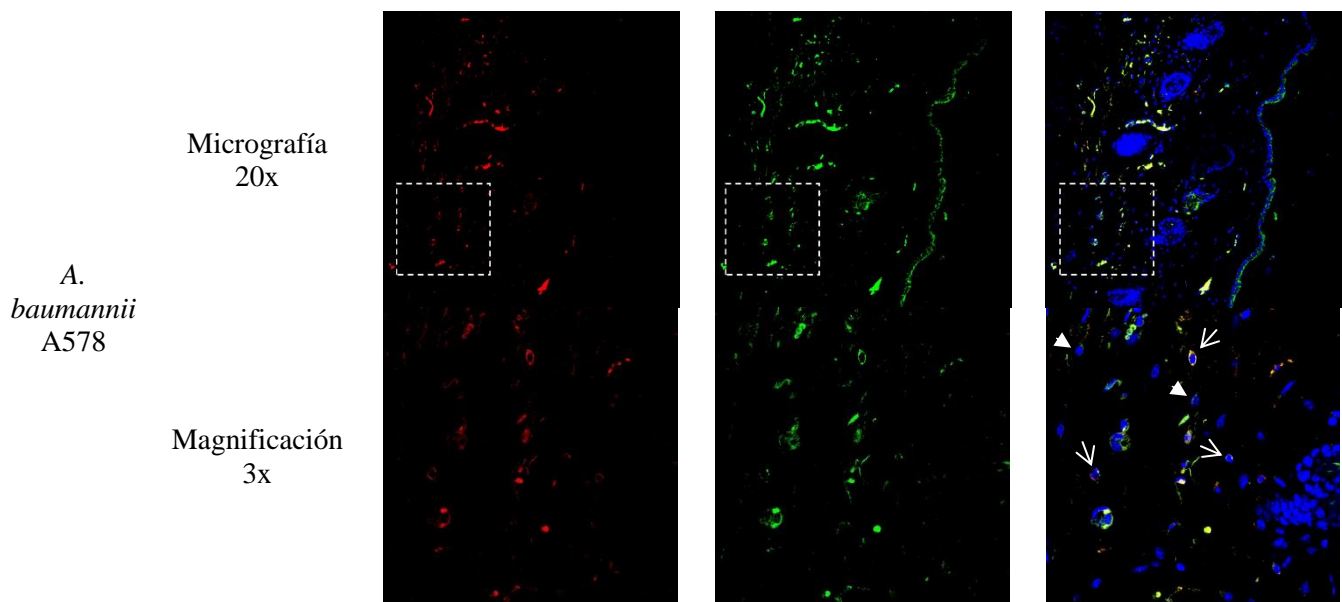
Micrografía
20x



Magnificación
3x







B.

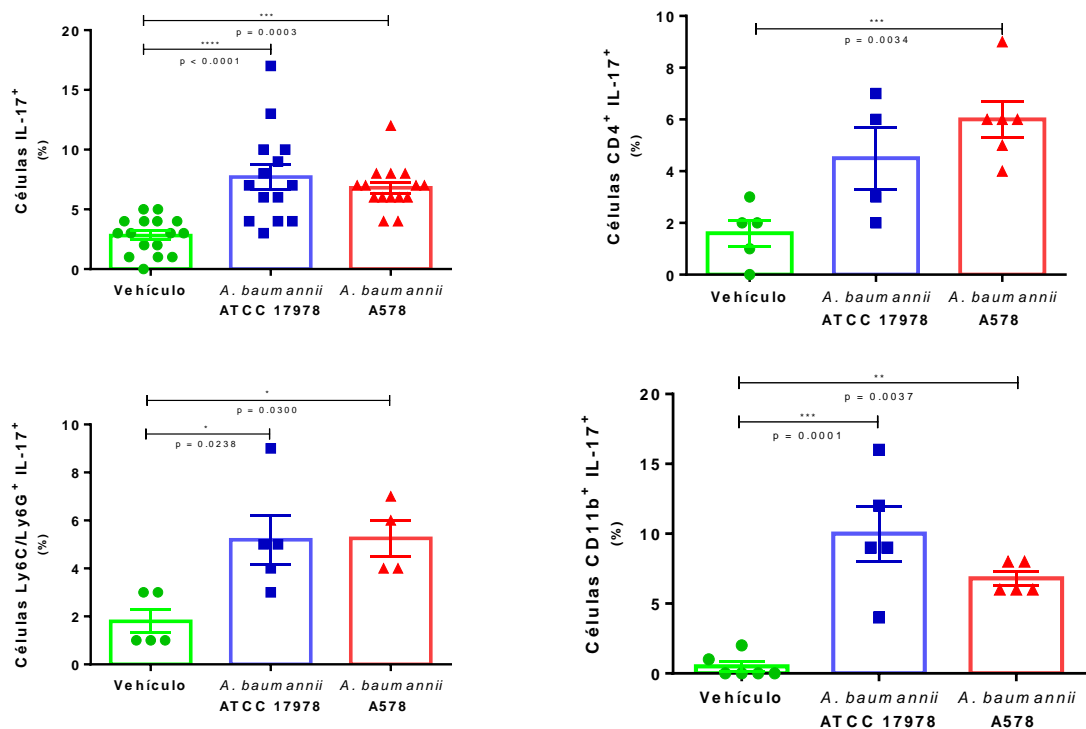


Figura suplementaria 8. Diferentes poblaciones celulares contribuyen a la producción de IL-17 en piel infectada durante 12 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. A. Micrografías de inmunofluorescencias representativas para la expresión de CD4, Ly6C/Ly6G o CD11b (Alexa Fluor® 574-rojo) e IL-17 (Alexa Fluor® 488-verde) y el empalme de canales donde, además, se muestran los núcleos celulares (Hoeschst-azul) de piel del dorso de ratones C57BL/6 infectados durante 12 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 o A578. Las flechas indican coexpresión de IL-17 y el marcador señalado en cada caso. Las cabezas de flechas señalan células positivamente para la expresión de IL-17. Se muestran micrografías 20x y la magnificación 3x de un campo representativo para cada micrografía. B. Cuantificación del porcentaje de células positivas para IL-17, o dobles positivas para la expresión de IL-17 y CD4, IL-17 y Ly6C/Ly6G o IL-17 y CD11b a partir de inmunofluorescencias de cortes histológicos de la piel de dorso de ratones infectados durante 12 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul), A578 (rojo) o administrados simplemente con vehículo (verde) durante 12 horas. Media aritmética y

error estándar de 1 experimento. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey $n = 2$.

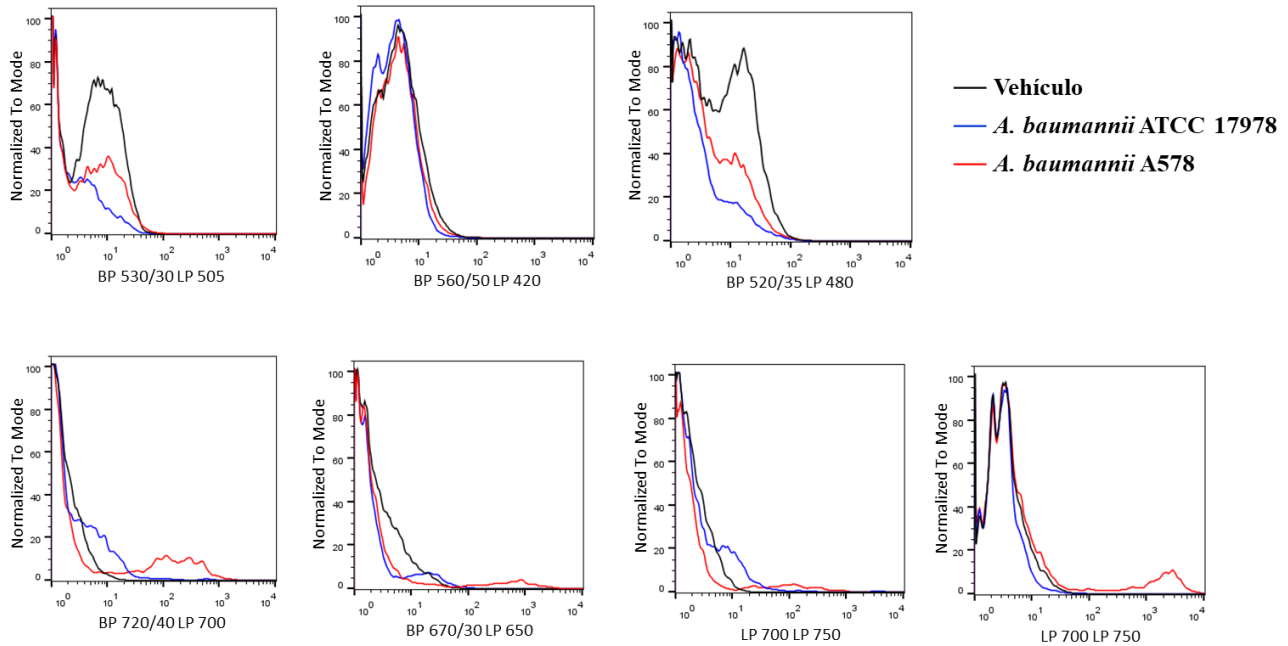


Figura suplementaria 9. Fluorescencia basal mostrada en siete diferentes canales, de células sin tñir recuperadas de piel de ratones WT tratados con vehículo (negro) o infectados durante 4 horas con *A. baumannii* ATCC 17978 (azul) o A578 (rojo).

Tabla suplementaria 1. Condiciones en las que se ha identificado la producción de IL-17 por diversas fuentes celulares

Modelo/Patología	Patógeno/Estímulo	Fuente Celular de IL-17 (marcadores para caracterizar la población)	Referencia
Encefalomiелitis autoimmune experimental (Ratón C57BL/6)	Inmunización con péptido MOG ₃₅₋₅₅ en adyuvante completo de Freud	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺)	[141]
Infección nasal por <i>B. pertussis</i> (Ratón C57BL/6)	<i>B. pertussis</i> (cepa BP338)	Linfocitos T CD4 ⁺ residentes de memoria (CD4 ⁺ , CD62L-CD6 ⁺)	[142]
Dermatofitosis epicutánea (Ratón C57BL/6)	<i>Microsporium canis</i> (cepa UNCMc01)	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD3 ⁺ CD4 ⁺) Linfocitos T CD8 ⁺ (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	[143]
Inmunización intranasal por <i>K. pneumoniae</i> (Ratón C57BL/6)	<i>K. pneumoniae</i> (serotipo K2, cepa 43816 ATCC)	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺)	[144]

Infección intranasal por influenza (Ratón C57BL/6.PL (B6.Thy1.1))	Influenza A (H1N1) (cepa Puerto Rico (A/PR8))	Linfocitos T CD8 ⁺ (CD3 ⁺ , CD8 ⁺)	[158]
Biopsias de lesiones de pacientes diagnosticados con psoriasis en placa	-----	Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[152]
Biopsias de lesiones cerebrales de pacientes diagnosticados con esclerosis múltiples	-----	Linfocitos TCD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[153]
Biopsias de bronquios de pacientes diagnosticados con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.	-----	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺) Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[154]
Sangre periférica de pacientes infantiles con un diagnóstico menor a 6 meses de diabetes de tipo I	-----	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺) Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[155]
Derrame pleural de pacientes con tuberculosis pleural	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[156]
Sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar activa	<i>M. tuberculosis</i>	Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[157]
Tripanosomiasis (Ratones C57BL/6)	Inoculación intraperitoneal <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y-Br)	Linfocitos B (B220 ⁺)	[160]
Encefalomiелitis autoinmune experimental (Ratón C57BL/6)	Inmunización con péptido MOG ₃₅₋₅₅ en adyuvante completo de Freud	Células TCRγδ ⁺ (CD3 ⁺ , TCRγδ ⁺) Linfocitos CD4 ⁺ (CD3 ⁺ , CD4 ⁺)	[172]
Artritis inducida por colágeno (Ratón DBA/1 lac J)	Inmunización con colágeno bovino de tipo II en adyuvante completo de Freud	Células TCRγδ (Vγ4 ⁺)	[173]
Patología con fenotipo similar a la psoriasis inducida por imiquimod (Ratón Rorc-Cre x EYFP)	Aplicación tópica de imiquimod	Células TCRγδ (Vγ4 ⁺)	[174]
Respuesta <i>in vitro</i> a <i>M. tuberculosis</i> (Ratón C57BL/6)	Estimulación <i>in vitro</i> de esplenocitos CD90 ⁺ con medio condicionado de células dendríticas infectadas con <i>M. tuberculosis</i> (cepa Erdman)	Células TCRγδ (TCRγδ ⁺) Linfocitos CD4 ⁺ (CD4 ⁺)	[176]
Infección por <i>L. monocytogenes</i> (Ratón C57BL/6)	Inoculación intraperitoneal de <i>L. monocytogenes</i> (cepa EGD)	Células TCRγδ (Vγ4 ⁺)	[177]
Infección intraperitoneal por <i>E. coli</i> (Ratón C57BL/6)	Inoculación intraperitoneal de <i>E. coli</i> (cepa ATCC 26)	Células TCRγδ (Vγ1 ⁺)	[408]

Infección intraperitoneal por <i>S. aureus</i> (Ratón C57BL/6)	<i>S. aureus</i> (cepa PS80)	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$, CD44 $^+$, CD27 $^-$)	[409]
Infección respiratoria por <i>B. pertussis</i> (Ratón C57BL/6)	<i>B. pertussis</i> (cepa BP338)	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$, V γ 4 γ 1 $^-$)	[410]
Candidiasis orofaríngea (Ratón IL17 ^{Cre} Rosa26R ^{eYFP})	Inoculación sublingual de <i>C. albicans</i> (cepa CAF2-1)	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$) Linfocitos TCR β (TCR β^+)	[290]
Sangre periférica de pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar	<i>M. tuberculosis</i>	Células TCR $\gamma\delta$ (CD3 $^+$, TCR $\gamma\delta^+$)	[320]
Sangre periférica de pacientes y líquido cefalorraquídeo infantiles diagnosticados con meningitis bacteriana	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> o <i>Neisseria meningitidis</i>	Células TCR $\gamma\delta$ (V γ 9 $^+$, V δ 2 $^+$)	[178]
Candidiasis orofaríngea (Ratones C57BL/6 y <i>rag1</i> ^{-/-})	Inoculación sublingual de <i>C. albicans</i> (cepa SC5314)	ILCs (CD45.2 $^+$ Lin $^-$ (CD3 $^-$, CD5 $^-$, Gr-1 $^-$, CD11b $^-$, B220 $^-$) CD90.2 $^+$, Sca1 $^+$, CD127 $^+$)	[183]
Toxoplasmosis (Ratones C57BL/6)	Inoculación intraperitoneal de <i>T. gondii</i> (cepa ME49)	NKs (CD3 $^+$, NK1.1 $^+$)	[184]
Asma (Ratones C57BL/6)	asma inducida por OVA-poli I:C en ratones sensibilizados	NKs (CD3 $^+$, NK1.1 $^+$, CD1d $^-$, α -GalCer $^-$)	[185]
Neutrofilia de las vías aéreas (Ratones C57BL/6)	Administración intranasal y estimulación <i>in vitro</i> con α -galactosilceramida, PBS-57 o LPS	iNKTs (CD1d/ α -GalCer $^+$, NK1.1 $^-$)	[188]
Estimulación bacteriana sistémica (Ratones C57BL/6)	Estimulación <i>ex vivo</i> de iNKTs NK1.1 $^-$ de ratones administrados vía intravenosa con <i>S. aureus</i> (cepa Newman) o <i>E. coli</i> (cepa no especificada)	iNKT (Tetrámeros CD1d $^+$, NK1.1 $^-$, CD103 $^+$, CCR6 $^+$)	[189]
Estimulación con <i>A. fumigatus</i> (Ratones C57BL/6)	Administración subcutánea de <i>A. fumigatus</i> (cepa Af-BP) inactivado por calor	Neutrófilos (NIMP-R14 $^+$)	[191]
Respuesta a anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (Ratones C57BL/6)	Estimulación <i>ex vivo</i> de neutrófilos peritoneales activados por caseína con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos	Neutrófilos (GR-1 $^+$, F4/80 $^-$)	[192]
Daño renal (Ratones C57BL/6)	Daño renal por isquemia-reperfusión	Neutrófilos (GR-1 $^+$)	[193]
Artritis (Ratones C57BL/6)	Transferencia de suero de ratones <i>artríticos</i> K/BxN	Neutrófilos (GR-1 $^+$)	[194]
Neutrofilia de vías aéreas (Ratones BALB/c)	Neutrofilia inducida por administración intranasal de LPS de <i>Salmonella typhosa</i>	Linfocitos CD4 $^+$ (CD4 $^+$) Linfocitos CD8 $^+$	[195]

		(CD8 ⁺) Neutrófilos (CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , no adherentes)	
Infección por <i>A. fumigatus</i> por (Ratones C57BL/6)	Inoculación intratraqueal de <i>A. fumigatus</i> (Aislado 13073)	Neutrófilos (Ly6G ⁺)	[196]
Infección por <i>B. pertussis</i> (Ratones BALB/c)	Inoculación intranasal de <i>B. pertussis</i> (cepa derivada de la cepa Tohama I)	Neutrófilos (GR-1 ^{alto} , CD11b ⁺)	[197]
Infección por <i>L. pneumophila</i> (Ratones C57BL/6)	Inoculación intratraqueal de <i>L. pneumophila</i> (cepa Philadelphia 1 (ATCC 33152))	Neutrófilos (CD5 ⁻ , CD4 ⁻ , CD45R/B220 ⁻ , TER-119 ⁻ , F4/80 ⁻ , CD11c ⁻ , c-kit ⁻)	[198]
Peritonitis por <i>E. coli</i> (Ratones <i>Institute of Cancer Research</i> (IRC))	Inoculación intraperitoneal de <i>E. coli</i> (cepa JM109)	Neutrófilos (CD3 ⁻ , CD14 ⁻ , CD11b ⁺)	[199]
Biopsias de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico	-----	Neutrófilos (CD66b ⁺)	[200]
Sangre periférica de pacientes diagnosticados con asma	-----	Neutrófilos (CD177 ⁺)	[201]
Biopsias pulmonares <i>post mortem</i> de pacientes diagnosticados con neumonía por bacterias Gram negativas	Bacterias Gram negativas	Neutrófilos (Lipocalina-2 ⁺)	[198]
Respuesta a quitina (Ratones C57BL/6)	Estimulación <i>in vitro</i> con quitina de Mφs obtenidos por tioglicolato o derivados de médula ósea	Mφs (CD11b ⁺ , F4/80 ⁺)	[202]
Malaria (Ratones C57BL/6)	Inoculación intraperitoneal de eritrocitos infectados con <i>Plasmodium berghei</i> (cepa NK65)	Mφs (CD16/32 ⁺ , F4/80 ⁺ , CD11b ⁺)	[203]
Inflamación alérgica en pulmón (Ratones BALB/c)	Inflamación inducida por administración de OVA en ratones sensibilizados	Mφs (CD11b ⁺ , F4/80 ⁺)	[204]
Biopsias de atrofia proliferativa inflamatoria de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma prostático.	-----	Mφs (CD68 ⁺)	[205]
Respuesta a ácido lipoteicoico (Ratones C57BL/6)	Estimulación <i>in vitro</i> con ácido lipoteicoico de células cebadas derivadas de peritoneo	Células cebadas (c-kit ⁺ , FcεRI ⁺)	[206]
Sinovio de pacientes diagnosticados con artritis reumatoide	-----	Células cebadas (triptasa ⁺)	[207]
Biopsias de placa pacientes diagnosticados con psoriasis	-----	Neutrófilos (mieloperoxidasa ⁺) Células cebadas (triptasa ⁺ , quimasa ⁺)	[210]

Biopsias de tejido nasal, bronquial y transbronquial de pacientes diagnosticados con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, rinitis alérgica o asma.	-----	Células cebadas (quimasa+)	[211]
Biopsias de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico	-----	Células cebadas (triptasa ⁺)	[212]
Biopsias de tejido peritumoral de pacientes diagnosticados con carcinoma hepatocelular	-----	Células cebadas (triptasa ⁺)	[213]
Sangre periférica de pacientes diagnosticados con histiocitosis de células de Langerhans	-----	Monocitos (CD14 ⁺)	[164]
Lesiones verrucosas de pacientes diagnosticados con cromoblastomicosis por <i>Fonseca pedrosoi</i>	<i>F. pedrosoi</i> ,	Células de Langerhans (CD207 ⁺)	[165]
Respuesta a <i>B. canis</i> (Caninos)	Estimulación <i>in vitro</i> con <i>B. canis</i> (cepa SCL)	moDCs (CD11c ⁺) Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺)	[166]
Biopsias de lesiones de pacientes diagnosticados con psoriasis	-----	Th17 (no especificados)	[218]
Biopsias de lesiones de pacientes diagnosticados con dermatitis alérgica por contacto	-----	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺) Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[219]
Biopsias de pacientes diagnosticados con dermatosis neutrofílica febril aguda	-----	No especificada (RORγt ⁺)	[220]
Biopsias de pacientes diagnosticados con Pioderma gangrenoso	-----	No especificada (RORγt ⁺)	[220]
Lesiones de pacientes diagnosticados con síndrome de Behçet's	-----	Linfocitos CD4 ⁺ (CD4 ⁺)	[221]
Respuesta a la bacteria comensal <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Ratones C57BL/6, ratones BALB/c, biopsias de primates no humanos y de voluntarios sanos)	Asociación con <i>Staphylococcus epidermidis</i> (cepas NIHLM087 y NIHLM061)	Linfocitos Tc17 (CD3 ⁺ , CD8 ⁺) MAIT (tetramero MR1 ⁺ , TCRβ ⁺ , TCRγδ ⁻ , CD3 ⁺ , CD90.2 ⁺ , CD45 ⁺)	[222, 233]
Biopsias de lesiones de pacientes diagnosticados con psoriasis o dermatitis atópica	-----	Linfocitos T CD4 ⁺ (CD4 ⁺) Linfocitos T CD8 ⁺ (CD8 ⁺)	[217]

Condiciones basales (Ratones C57BL/6)	-----	DETCs (TCR $\gamma\delta^{\text{intermedio}}$, CCR6 $^+$)	[224]
Dermatitis psoriasisiforme (Ratones C57BL/6)	Administración de IL-23 intradermal	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^{\text{bajo/intermedio}}$, CCR6 $^+$)	[225]
Infección en piel por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG (Ratones C57BL/6)	Inoculación intradermal de <i>M. bovis</i> BCG	Células TCR $\gamma\delta$ (CD3 $^+$, TCR $\gamma\delta^+$)	[226]
Condiciones basales (Ratones C57BL/6)	-----	Células TCR $\gamma\delta$ (CD3 $^+$, TCR $\gamma\delta^{\text{intermedio}}$)	[227, 228]
Infección subcutánea por <i>S. aureus</i> (Ratones C57BL/6)	Inoculación subcutánea de <i>S. aureus</i> (cepa SH1000 ALC2906)	Células TCR $\gamma\delta$ (CD3 $^+$, TCR $\gamma\delta^+$)	[229]
Hipersensibilidad por contacto por 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) (Ratones C57BL/6)	Administración epicutánea de DNFB	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$, V γ 4 $^+$)	[230]
Infección en piel por <i>S. aureus</i> (Ratones C57BL/6)	Inoculación intradérmica de <i>S. aureus</i> (cepa USA300 LAC::lux)	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$)	[231]
Respuesta a IL-23 (Ratones C57BL/6)	Estimulación <i>in vivo</i> con IL-23 de células recuperadas de piel	Células TCR $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$)	[232]
Proceso de cierre de herida (Ratones ROR $\gamma^{\text{+/-}}$)	Herida por uso de sacabocados	ILCs (CD45 $^+$, Lin $^-$, CD127 $^+$)	[234]
Dermatitis atópica inducida por ácaros domésticos del polvo (Ratones C57BL/6)	Sensibilización con ungüento con extracto de ácaros del polvo domésticos (<i>Dermatophagoides farinae</i>)	ILCs (CD45 $^+$, antígeno leucocitario cutáneo $^+$, Lin $^-$, CD90.2 $^+$)	[235]

Tabla suplementaria 2. Características cuantitativas de células obtenidas a partir de piel procesada enzimáticamente con colagenasa o liberasa.

Enzima empleada para realizar la digestión	Número de células totales recuperadas / g de tejido	Células vivas (%)	Células hematopoyéticas CD45$^+$ dentro de la región de células vivas (%)
<u>Colagenasa</u>	7.647x10 5	33.4	26.9
<u>Liberasa</u>	21.88x10 6	33.8	35.0

13. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Girard, R., Perraud, M., Prüss, A., Savey, A. Tikhomirov, E., Thuriaux, M. & Vanhems, P. (2002). Prevention of hospital-acquired infections. A Practical Guide. (Ducel, G., Fabry, J. & Nicolle, L. Eds. 2nd ed). http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67350/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12.pdf?sequence=1
2. World Health Organization. (2011). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80135>
3. Allegranzi, B., Bagheri Nejad, S., Combescure, C., Graafmans, W., Attar, H., Donaldson, L., & Pittet, D. (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 377(9761), 228–241. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4)
4. Khan, H.A., Baig, F.K. and Mehboob, R. (2017) Nosocomial Infection: Epidemiology, Prevention, Control and Surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 478-482. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>.
5. Flaherty JP, Weinstein RA. (1996). Nosocomial infection caused by antibiotic-resistant organisms in the intensive-care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.*;17:236–248.
6. Struelens M. J. (1998). The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ (Clinical research ed.)*, 317(7159), 652–654. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.652>
7. Rice L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
8. Cruz-López, F., Villarreal-Treviño, L., Camacho-Ortiz, A., Morfín-Otero, R., Flores-Treviño, S., & Garza-González, E. (2020). Acquired Genetic Elements that Contribute to Antimicrobial Resistance in Frequent Gram-Negative Causative Agents of Healthcare-Associated Infections. *The American journal of the medical sciences*, 360(6), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.06.028>
9. Weiner-Lastinger, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., Pollock, D., See, I., Soe, M. M., Walters, M. S., & Dudeck, M. A. (2020). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infection control and hospital epidemiology*, 41(1), 1–18. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.296>
10. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., ... Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
11. Parker T. (2014). Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=17068>
12. Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Czobor, I. B., & Chifiriuc, M. C. (2020). Antibiotic Resistance Profiles, Molecular Mechanisms and Innovative Treatment Strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 8(6), 935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060935>
13. Carr, J. H. (2004). Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=6497>
14. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*. Virulence, 3(3), 243–250. <https://doi.org/10.4161/viru.19700>

15. Guzman-Rodriguez, M., McDonald, J., Hyde, R., Allen-Vercoe, E., Claud, E. C., Sheth, P. M., & Petrof, E. O. (2018). Using bioreactors to study the effects of drugs on the human microbiota. *Methods (San Diego, Calif.)*, *149*, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.08.003>
16. Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., & Biswas, I. (2016). Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Frontiers in public health*, *4*, 105. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00105>
17. Euzéby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* *47*, 590-592; doi: 10.1099/00207713-47-2-590
18. Parte, A.C. (2013). LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, *42*, Issue D1, D613–D616; doi: 10.1093/nar/gkt1111
19. Parte, A.C. (2018). LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*, 1825-1829; doi: 10.1099/ijsem.0.002786
20. Fitzpatrick, MA, Ozer, E, Bolon MK, Hauser AR. (2015). Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *J Infect.* *70*(2):144-52.
21. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* *21*(3):538-82.
22. Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews. Microbiology*, *5*(12), 939–951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
23. Ramirez, M. S., Bonomo, R. A., & Tolmasky, M. E. (2020). Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules*, *10*(5), 720. <https://doi.org/10.3390/biom10050720>
24. Shah, I., & Kapdi, M. (2016). Multidrug-resistant *Acinetobacter meningitis* in children. *Journal of family medicine and primary care*, *5*(4), 858–859. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.201169>
25. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, Garcia-Curiel A, Jiménez-Jiménez FJ. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med.* 2005 May;*31*(5):649-55. doi: 10.1007/s00134-005-2598-0. Epub 2005 Mar 23. PMID: 15785929.
26. Fluit, A. C., Schmitz, F. J., Verhoef, J., & European SENTRY Participant Group (2001). Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *20*(3), 188–191. <https://doi.org/10.1007/s100960100455>
27. Alrahmany, D., Omar, A. F., Harb, G., El Nekidy, W. S., & Ghazi, I. M. (2021). *Acinetobacter baumannii* Infections in Hospitalized Patients, Treatment Outcomes. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10*(6), 630. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060630>
28. Keen, E. F., Robinson, B. J., Hospenthal, D. R., Aldous, W. K., Wolf, S. E., Chung, K. K., & Murray, C. K. (2010). Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns*, *36*(6), 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.10.013>
29. Al-aali, K. Y. (2016). Microbial Profile of Burn Wound Infections in Burn Patients, Taif, Saudi Arabia. *Archives of Clinical Microbiology*, *7*(2), 1–9.
30. Wilson, S. J., Knipe, C. J., Zieger, M. J., Gabehart, K. M., Goodman, J. E., Volk, H. M., & Sood, R. (2004). Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *American Journal of Infection Control*, *32*(6), 342–344. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2004.02.008>

31. Wong, T. H., Tan, B. H., Ling, M. L., & Song, C. (2002). Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit--clinical risk factors and prognosis. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 28(4), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00012-8)
32. Vanegas, J. M., Higuaita, L. F., Vargas, C. A., Cienfuegos, A. V., Rodríguez, É. A., Roncancio, G. E., & Jiménez, J. N. (2015). *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia [Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* causing osteomyelitis and infections of skin and soft tissues in hospitals of Medellín, Colombia]. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 35(4), 522–530. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2572>
33. Nawas, Z. Y., Tong, Y., Kollipara, R., Peranteau, A. J., Woc-Colburn, L., Yan, A. C., Lupi, O., & Tyring, S. K. (2016). Emerging infectious diseases with cutaneous manifestations: Viral and bacterial infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 75(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.04.033>.
34. Hachimi, M. A., Rafik, R., Elkartouti, A., Louzi, L., Hanafi, S. M., & Mahmoudi, A. (2013). Fasciite nécrosante communautaire à *Acinetobacter baumannii* [Community-acquired necrotizing fasciitis caused by *Acinetobacter baumannii*]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 140(6-7), 468–470. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2012.06.053>
35. Adler, B. L., Krausz, A., & Friedman, A. J. (2014). *Acinetobacter baumannii* emerging as a multidrug-resistant skin and soft-tissue pathogen: parallels to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA dermatology*, 150(8), 905–906. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.8855>
36. Manchanda, V., Sinha, S., & Singh, N. (2010). Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 291. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68538>
37. Guerrero, D. M., Perez, F., Conger, N. G., Solomkin, J. S., Adams, M. D., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2010). *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections: recognizing a broadening spectrum of disease. *Surgical infections*, 11(1), 49–57. <https://doi.org/10.1089/sur.2009.022>
38. Moet, G. J., Jones, R. N., Biedenbach, D. J., Stilwell, M. G., & Fritsche, T. R. (2007). Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.009>
39. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol*. 35(11):2819-25.
40. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. (1999). Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18:179-183.
41. Gonzalez-Villoria, A. M., & Valverde-Garduno, V. (2016). Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. *Journal of Pathogens*, 2016,7318075. <https://doi.org/10.1155/2016/7318075>
42. Chiang, W. C., Su, C. P., Hsu, C. Y., Chen, S. Y., Chen, Y. C., Chang, S. C., & Hsueh, P. R. (2003). Community-acquired bacteremic cellulitis caused by *Acinetobacter baumannii*. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 102(9), 650–652.
43. Marioni, G., Marchese-Ragona, R., Boldrin, C., Parisi, S. G., Vianello, A., Prencipe, R. S., Breda, C., Staffieri, A., & Rinaldi, R. (2010). Deep neck abscess due to *Acinetobacter baumannii* infection. *American journal of otolaryngology*, 31(4), 304–307. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2009.02.018>

44. Ng, G., Sharma, B. K., & Fox, G. F. (2004). Acinetobacter skin abscess in a neonate. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, 24(8), 526–527. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211133>
45. Bachmeyer, C., Landgraf, N., Cordier, F., Lemaitre, P., & Blum, L. (2005). Acinetobacter baumannii folliculitis in a patient with AIDS. *Clinical and experimental dermatology*, 30(3), 256–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2005.01743.x>
46. Sinha, N., Niazi, M., & Lvovsky, D. (2014). A fatal case of multidrug resistant acinetobacter necrotizing fasciitis: the changing scary face of nosocomial infection. *Case reports in infectious diseases*, 2014, 705279. <https://doi.org/10.1155/2014/705279>
47. Emre, A., Sertkaya, M., Akbulut, S., Duman, Y., & Kale, I. T. (2016). Neglected Fournier's Gangrene Caused by *Acinetobacter baumannii*: A Rare Case Report. *Case reports in surgery*, 2016, 8461354. <https://doi.org/10.1155/2016/8461354>
48. Oliveira, P. R., Carvalho, V. C., Saconi, E. S., Leonhardt, M. C., Kojima, K. E., Santos, J. S., Rossi, F., & Lima, A. (2020). Tigecycline Versus Colistin in the Treatment of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Complex Osteomyelitis. *Journal of bone and joint infection*, 5(2), 60–66. <https://doi.org/10.7150/jbji.42448>
49. Sebeny, P. J., Riddle, M. S., & Petersen, K. (2008). Acinetobacter baumannii skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(4), 444–449. <https://doi.org/10.1086/590568>
50. Hodle, A. E., Richter, K. P., & Thompson, R. M. (2006). Infection control practices in U.S. burn units. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association*, 27, 142–151. <https://doi.org/10.1097/01.BCR.0000203493.31642.79>
51. Chim, H., Tan, B. H., & Song, C. (2007). Five-year review of infections in a burn intensive care unit: High incidence of Acinetobacter baumannii in a tropical climate. *Burns*, 33(8), 1008–1014. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.03.003>
52. Tekin, R., Dal, T., Bozkurt, F., Deveci, Ö., Palanc, Y., Arslan, E., ... Hoşoğlu, S. (2014). Risk Factors for Nosocomial Burn Wound Infection Caused by Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii. *Journal of Burn Care & Research*, 35(1), e73–e80. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e31828a493f>
53. Po-Yen, H., Shie, S.-S., Ye, J.-J., Shih-Pin, L., Tsui-Ping, L., Ting-Shu, W., ... Ching-Tai, H. (2017). Acquisition and clearance of multidrug resistant Acinetobacter baumannii on healthy young adults concurrently burned in a dust explosion in Taiwan: the implication for antimicrobial stewardship. *BMC Infectious Diseases*, 17, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12879-017-2682-4>
54. Soares De Macedo, J. L., & Santos, J. B. (2005). Bacterial and fungal colonization of burn wounds. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5), 535–539. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000500014>
55. Munier, A. L., Biard, L., Legrand, M., Rousseau, C., Lafaurie, M., Donay, J. L., Flicoteaux, R., Mebazaa, A., Mimoun, M., & Molina, J. M. (2019). Incidence, risk factors and outcome of multidrug resistant Acinetobacter baumannii nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 79, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.371>
56. Oncül, O., Keskin, O., Acar, H. V., Küçükardali, Y., Evrenkaya, R., Atasoyu, E. M., Top, C., Nalbant, S., Ozkan, S., Emekdaş, G., Cavuşlu, S., Us, M. H., Pahsa, A., & Gökben, M. (2002). Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *The Journal of hospital infection*, 51(1), 47–51. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1205>

57. Wang, Y., Hao, P., Lu, B., Yu, H., Huang, W., Hou, H., & Dai, K. (2010). Causes of infection after earthquake, China, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 974–975. <https://doi.org/10.3201/eid1606.091523>
58. Kennedy, P. J., Haertsch, P. A., & Maitz, P. K. (2005). The Bali burn disaster: implications and lessons learned. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 26(2), 125–131. <https://doi.org/10.1097/01.bcr.0000155532.31639.0d>
59. Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013
60. Petersen, K., Riddle, M. S., Danko, J. R., Blazes, D. L., Hayden, R., Tasker, S. A., & Dunne, J. R. (2007). Trauma-related Infections in Battlefield Casualties from Iraq. *Annals of Surgery*, 245(5), 803–811. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000251707.32332.c1>
61. Keen, E. F., Robinson, B. J., Hospenthal, D. R., Aldous, W. K., Wolf, S. E., Chung, K. K., & Murray, C. K. (2010). Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns*, 36(6), 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.10.013>
62. Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., ... Petrucci, B. (2007). An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), 1577–1584. <https://doi.org/10.1086/518170>
63. Rosales-Reyes, R., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J. L., Jarillo-Quijada, M. D., Rivera-Benítez, C., Santos-Preciado, J. I., & Alcántar-Curiel, M. D. (2017). Virulence profiles and innate immuneresponses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PLoS ONE*, 12(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182899>
64. Arista-Olvera NX, Lozano-Nuevo JJ, García-López VH, Narváez-Rivera JL, Garro-Almendaro AK, Zamora-Cervantes LE, Sánchez-González C, Ramírez-Villa ML, Hernández-Islas D. (2019). Infección nosocomial por *Acinetobacter* y su efecto en un hospital de segundo nivel *Med Int Mex X*; 35 (4)
65. Alcántar-Curiel, M. D., García-Torres, L. F., González-Chávez, M. I., Morfín-Otero, R., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., ... Santos-Preciado, J. I. (2014). Molecular Mechanisms Associated with Nosocomial Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. *Archives of Medical Research*, 45(7), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.10.006>
66. Jindal, A. K., Pandya, K., & Khan, I. D. (2015). Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical journal, Armed Forces India*, 71(2), 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.04.011>
67. World Health Organization (2021). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
68. Centers for Disease Control and Prevention (2021). Antibiotic / Antimicrobial Resistance (AR / AMR) <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>.
69. De Sousa Oliveira, K., de Lima, L. A., Cobacho, N. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2016). *Mechanisms of Antibacterial Resistance. Antibiotic Resistance*, 19–35. doi:10.1016/b978-0-12-803642-6.
70. Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States (2019). <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>.
71. Macgowan, A. P., & BSAC Working Parties on Resistance Surveillance (2008). Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62 Suppl 2, ii105–ii114. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn357>

72. Kahlmeter, G., Giske, C. G., Kirn, T. J., & Sharp, S. E. (2019). Point-Counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute Recommendations for Reporting Antimicrobial Susceptibility Results. *Journal of clinical microbiology*, 57(9), e01129-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01129-19>
73. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). New definitions of S, I and R from 2019. <https://www.eucast.org/newsiandr/>
74. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
75. Falagas, M. E., & Karageorgopoulos, D. E. (2008). Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(7), 1121–1122. <https://doi.org/10.1086/528867>
76. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., ... (2018) WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
77. Abbo, A., Navon-Venezia, S., Hammer-Muntz, O., Krichali, T., Siegman-Igra, Y., & Carmeli, Y. (2005). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 22–29. <https://doi.org/10.3201/eid1101.040001>
78. Dizbay, M., Altuncekic, A., Sezer, B. E., Ozdemir, K., & Arman, D. (2008). Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(1), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.016>
79. Nowak, P., & Paluchowska, P. (2016). *Acinetobacter baumannii*: Biology and drug resistance ??? role of carbapenemases. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 54(2), 61–74. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2016.0009>
80. Kuo, L. C., Lai, C. C., Liao, C. H., Hsu, C. K., Chang, Y. L., Chang, C. Y., & Hsueh, P. R. (2007). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia: Clinical features, antimicrobial therapy and outcome. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(2), 196–198. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01601.x>
81. Garza-González, E., Llaca-Díaz, J. M., Bosques-Padilla, F. J., & González, G. M. (2010). Prevalence of multidrug-resistant bacteria at a tertiary-care teaching hospital in Mexico: Special focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*, 56(4), 275–279. <https://doi.org/10.1159/000319903>
82. The Center for Disease Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2018. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>
83. Rizo Amézquita, J. N., Lozano Noriega A. R. (2018). Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. *Boletín Conamed*, 4, 2018. <http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin22/Vigilancia.pdf>

84. Da Silva, G. J., & Domingues, S. (2016). Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, *4*(3), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030029>
85. Sun, B., Liu, H., Jiang, Y., Shao, L., Yang, S., & Chen, D. (2020). New Mutations Involved in Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *mSphere*, *5*(2), e00895-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00895-19>
86. Salehi, B., Ghalavand, Z., Yadegar, A., & Eslami, G. (2021). Characteristics and diversity of mutations in regulatory genes of resistance-nodulation-cell division efflux pumps in association with drug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial resistance and infection control*, *10*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00924-9>
87. Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology: IJMM*, *303*(6-7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
88. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
89. Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(3), 373. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
90. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, *31*(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
91. Hamidian, M., & Hall, R. M. (2014). Resistance to third-generation cephalosporins in *Acinetobacter baumannii* due to horizontal transfer of a chromosomal segment containing ISAbal-ampC. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *69*(10), 2865–2866. <https://doi.org/10.1093/jac/dku202>
92. Sahl, J. W., Johnson, J. K., Harris, A. D., Phillippy, A. M., Hsiao, W. W., Thom, K. A., & Rasko, D. A. (2011). Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. *BMC genomics*, *12*, 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-291>
93. Imperi, F., Antunes, L. C., Blom, J., Villa, L., Iacono, M., Visca, P., & Carattoli, A. (2011). The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB life*, *63*(12), 1068–1074. <https://doi.org/10.1002/iub.531>
94. Galac, M. R., Snesrud, E., Lebreton, F., Stam, J., Julius, M., Ong, A. C., Maybank, R., Jones, A. R., Kwak, Y. I., Hinkle, K., Waterman, P. E., Lesho, E. P., Bennett, J. W., & Mc Gann, P. (2020). A Diverse Panel of Clinical *Acinetobacter baumannii* for Research and Development. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *64*(10), e00840-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00840-20>
95. Sunenshine, R. H., Wright, M. O., Maragakis, L. L., Harris, A. D., Song, X., Hebden, J., Cosgrove, S. E., Anderson, A., Carnell, J., Jernigan, D. B., Kleinbaum, D. G., Perl, T. M., Standiford, H. C., & Srinivasan, A. (2007). Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerging infectious diseases*, *13*(1), 97–103. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060716>
96. Mahto, M., Chaudhary, M., Shah, A., Show, K. L., Moses, F. L., & Stewart, A. G. (2021). High antibiotic resistance and mortality with *Acinetobacter* species in a tertiary hospital, Nepal. *Public health action*, *11*(Suppl 1), 13–17. <https://doi.org/10.5588/pha.21.0036>
97. Valentine, S. C., Contreras, D., Tan, S., Real, L. J., Chu, S., & Xu, H. H. (2008). Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks

- in Los Angeles County, California. *Journal of clinical microbiology*, 46(8), 2499–2507. <https://doi.org/10.1128/JCM.00367-08>
98. Grier, J. T., Arivett, B. A., Ramírez, M. S., Chosed, R. J., Bigner, J. A., Ohneck, E. J., Metz, M. L., Wood, C. R., Arce, S., Tartaro, A., Relich, R. F., Actis, L. A., & Fiester, S. E. (2021). Two *Acinetobacter baumannii* Isolates Obtained From a Fatal Necrotizing Fasciitis Infection Display Distinct Genomic and Phenotypic Characteristics in Comparison to Type Strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 635673. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.635673>
 99. Zhai, M., Chen, F., Zhao, Y., Wu, Y., Li, G., Gao, Y., & Qi, Y. (2015). Novel epitopes identified from efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* could induce cytotoxic T lymphocyte response. *PeerJ*, 3, e1229. doi.org/10.7717/peerj.1229
 100. Hill, M., Deghmane, A. E., Segovia, M., Zarantonelli, M. L., Tilly, G., Blancou, P., ... Cuturi, M. C. (2011). Penicillin binding proteins as danger signals: Meningococcal penicillin binding protein two activates dendritic cells through toll-like receptor 4. *PLoS ONE*, 6(10). doi.org/10.1371/journal.pone.0023995
 101. Smani, Y., Fabrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., & Pachón, J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1806–1808. doi.org/10.1128/AAC.02101-13
 102. Lee, J. S., Choi, C. H., Kim, J. W., & Lee, J. C. (2010). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein a induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *Journal of Microbiology*, 48(3), 387–392. doi.org/10.1007/s12275-010-0155-1
 103. Fajardo Bonin, R., Chapeaurouge, A., Perales, J., da Silva, J. G., do Nascimento, H. J., D'Alincourt Carvalho Assef, A. P., & Moreno Senna, J. P. (2014). Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *Proteomics - Clinical Applications*, 8(11–12), 916–923. <https://doi.org/10.1002/prca.201300133>
 104. Sakharwade S.C., Prasad G.V.R.K., Mukhopadhaya A. (2015) Immuno-Modulatory Role of Porins: Host Immune Responses, Signaling Mechanisms and Vaccine Potential. In: Chakrabarti A., Surolia A. (eds) *Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 842. Springer, Cham
 105. Gebhardt, M. J., Gallagher, L. A., Jacobson, R. K., Usacheva, E. A., Peterson, L. R., Zurawski, D. V., & Shuman, H. A. (2015). Joint Transcriptional Control of Virulence and Resistance to Antibiotic and Environmental Stress in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 6(6), e01660-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01660-15>
 106. Joly-Guillou M. L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(11), 868–873. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x>
 107. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulias X, Cerqueira GM, Schulze KE, Mahamad Maifiah MH, Li J, Creek DJ, Lieschke GJ, Peleg AY. *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 23;113(34):9599-604. doi: 10.1073/pnas.1523116113. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27506797; PMCID: PMC5003227.
 108. Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS pathogens*, 11(2), e1004691. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691>

109. Roux, D., Danilchanka, O., Guillard, T., Cattoir, V., Aschard, H., Fu, Y., Angoulvant, F., Messika, J., Ricard, J. D., Mekalanos, J. J., Lory, S., Pier, G. B., & Skurnik, D. (2015). Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection. *Science translational medicine*, 7(297), 297ra114. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab1621>
110. Dikshit, N., Kale, S. D., Khameneh, H. J., Balamuralidhar, V., Tang, C. Y., Kumar, P., Lim, T. P., Tan, T. T., Kwa, A. L., Mortellaro, A., & Sukumaran, B. (2018). NLRP3 inflammasome pathway has a critical role in the host immunity against clinically relevant *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. *Mucosal immunology*, 11(1), 257–272. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.50>
111. Sycz, G., Di Venanzio, G., Distel, J. S., Sartorio, M. G., Le, N. H., Scott, N. E., Beatty, W. L., & Feldman, M. F. (2021). Modern *Acinetobacter baumannii* clinical isolates replicate inside spacious vacuoles and egress from macrophages. *PLoS pathogens*, 17(8), e1009802. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009802>
112. Sato, Y., Unno, Y., Kawakami, S., Ubagai, T., & Ono, Y. (2017). Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *Journal of medical microbiology*, 66(2), 203–212. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000394>
113. McConnell, M. J., Actis, L., & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*, 37(2), 130–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>
114. Ankomah, P., & Levin, B. R. (2014). Exploring the collaboration between antibiotics and the immune response in the treatment of acute, self-limiting infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), 8331–8338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400352111>
115. Falagas, M. E., Karveli, E. A., Kelesidis, I., & Kelesidis, T. (2007). Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 26(12), 857–868. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0365-6>
116. García-Garmendía, J. L., Ortiz-Leyba, C., Garnacho-Montero, J., Jiménez-Jiménez, F. J., Pérez-Paredes, C., Barrero-Almodóvar, A. E., & Gili-Miner, M. (2001). Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(7), 939–946. <https://doi.org/10.1086/322584>
117. Ramampisendrahova, J. B., Razafimahatratra, R., & Solofomalala, G. D. (2020). Fasciite nécrosante monomicrobienne de la jambe due à l'*Acinetobacter baumannii* multirésistante chez un adulte sain: rapport d'un cas [Monomicrobial necrotizing fasciitis of the leg due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a healthy adult: about a case]. *The Pan African medical journal*, 36, 344. <https://doi.org/10.11604/pamj.2020.36.344.24614>
118. Chen W. (2020). Host Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 486. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00486>
119. Van Faassen, H., KuoLee, R., Harris, G., Zhao, X., Conlan, J. W., & Chen, W. (2007). Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infection and Immunity*, 75(12), 5597–5608. <https://doi.org/10.1128/IAI.00762-07>
120. Qiu, H., KuoLee, R., Harris, G., & Chen, W. (2009). High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. *Microbes and Infection*, 11(12), 946–955. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.06.003>

121. Breslow JM, Meissler JJ, Jr, Hartzell RR, Spence PB, Truant A, Gaughan J, et al. Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infect Immun* (2011) 79:3317–27. [10.1128/IAI.00069-11](https://doi.org/10.1128/IAI.00069-11)
122. Liu, Z., Ling, B., & Zhou, L. (2015). Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *Journal of chemotherapy* (Florence, Italy), 27(4), 207–212. <https://doi.org/10.1179/1973947814Y.0000000190>
123. Grguric-Smith, L. M., Lee, H. H., Gandhi, J. A., Brennan, M. B., DeLeon-Rodriguez, C. M., Coelho, C., ... Martinez, L. R. (2015). Neutropenia exacerbates infection by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a murine wound model. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01134>
124. Qiu, H., KuoLee, R., Harris, G., Van Rooijen, N., Patel, G. B., & Chen, W. (2012). Role of Macrophages in Early Host Resistance to Respiratory *Acinetobacter baumannii* Infection. *PLoS ONE*, 7(6), e40019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040019>
125. March, C., Regueiro, V., Llobet, E., Moranta, D., Morey, P., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2010). Dissection of host cell signal transduction during *Acinetobacter baumannii* - triggered inflammatory response. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010033>
126. Feng, Z., Jia, X., Adams, M. D., Ghosh, S. K., Bonomo, R. A., & Weinberg, A. (2014). Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infection and Immunity*, 82(11), 4458–4465. <https://doi.org/10.1128/IAI.01897-14>
127. Moffatt, J. H., Harper, M., Mansell, A., Crane, B., Fitzsimons, T. C., Nation, R. L., ... Boyce, J. D. (2013). Lipopolysaccharide-deficient *acinetobacter baumannii* shows altered signaling through host toll-like receptors and increased susceptibility to the host antimicrobial peptide LL-37. *Infection and Immunity*, 81(3), 684–689. <https://doi.org/10.1128/IAI.01362-12>
128. Liu, S., Song, X., Chrnyk, B. A., Shanker, S., Hoth, L. R., Marr, E. S., & Griffior, M. C. (2013). Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nature communications*, 4, 1888. <https://doi.org/10.1038/ncomms2880>
129. Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., & Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 155(12), 5483–5486.
130. Fossiez, F., Djossou, O., Chomar, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., & Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*, 183(6), 2593–2603. <https://doi.org/10.1084/jem.183.6.2593>
131. Gaffen, S. L. (2010). IL-17_rev_NatImmu2010. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(8), 1–24. <https://doi.org/10.1038/nri2586.Structure>
132. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., & Nakae, S. (2011). Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity*, 34(2), 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.012>
133. Matsuzaki, G., & Umemura, M. (2007). Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology and Immunology*, 51(12), 1139–1147. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb04008.x>
134. Milovanovic, J., Arsenijevic, A., Stojanovic, B., Kanjevac, T., Arsenijevic, D., Radosavljevic, G., Milovanovic, M., & Arsenijevic, N. (2020). Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. *Frontiers in immunology*, 11, 947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00947>
135. Ho, A. W., & Gaffen, S. L. (2010). IL-17RC: A partner in IL-17 signaling and beyond. *Seminars in Immunopathology*, 32(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0185-0>

136. Abusleme, L., & Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral diseases*, *23*(7), 854–865. <https://doi.org/10.1111/odi.12598>
137. Marks, B. R., & Craft, J. (2009). Barrier immunity and IL-17. *Seminars in immunology*, *21*(3), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.03.001>
138. Minegishi, Y., Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K., Yamada, M., Kawamura, N., Ariga, T., Tsuge, I., & Karasuyama, H. (2009). Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *The Journal of experimental medicine*, *206*(6), 1291–1301. <https://doi.org/10.1084/jem.20082767>
139. Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., Mastrangelo, A., Danne, C., Mann, E. R., Reid, D. M., Gaboriau-Routhiau, V., Chaparro, M., Lorenzo, M. P., Minnerup, L., Saz-Leal, P., Slack, E., Kemp, B., Gisbert, J. P., Dzionek, A., Robinson, M. J., Rupérez, F. J., Cerf-Bensussan, N., Brown, G. D., ... Sancho, D. (2019). Microbiota Sensing by Mincle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and -22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity. *Immunity*, *50*(2), 446–461.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.020>
140. Clark, R. A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N. K., Yamanaka, K., Dowgiert, R. K., & Kupper, T. S. (2006). The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *176*(7), 4431–4439. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4431>
141. Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., & Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*, *201*(2), 233–240. <https://doi.org/10.1084/jem.20041257>
142. Borkner, L., Curham, L. M., Wilk, M. M., Moran, B., & Mills, K. H. G. (2021). IL-17 mediates protective immunity against nasal infection with *Bordetella pertussis* by mobilizing neutrophils, especially Siglec-F⁺ neutrophils. *Mucosal immunology*, *14*(5), 1183–1202. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00407-5>
143. Burstein, V. L., Guasconi, L., Beccacece, I., Theumer, M. G., Mena, C., Prinz, I., Cervi, L., Herrero, M., Masih, D. T., & Chiapello, L. S. (2018). IL-17-Mediated Immunity Controls Skin Infection and T Helper 1 Response during Experimental *Microsporum canis* Dermatophytosis. *The Journal of investigative dermatology*, *138*(8), 1744–1753. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.02.042>
144. Chen, K., McAleer, J. P., Lin, Y., Paterson, D. L., Zheng, M., Alcorn, J. F., Weaver, C. T., & Kolls, J. K. (2011). Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity*, *35*(6), 997–1009. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.018>
145. Reynolds, J. M., Angkasekwinai, P., & Dong, C. (2010). IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *21*(6), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.10.002>
146. Nakagawa, S., Matsumoto, M., Katayama, Y., Oguma, R., Wakabayashi, S., Nygaard, T., Saijo, S., Inohara, N., Otto, M., Matsue, H., Núñez, G., & Nakamura, Y. (2017). Staphylococcus aureus Virulent PSM α Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell host & microbe*, *22*(5), 667–677.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.008>
147. Mills, K. H. G. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European Journal of Immunology*, *38*(10), 2636–2649. <https://doi.org/10.1002/eji.200838535>
148. Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X. P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., Ramos, H. L., Wei, L., Davidson, T. S., Bouladoux, N., Grainger, J. R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W. T., Sun, H. W., Eberl, G., Shevach, E. M., Belkaid, Y., Cua, D. J., Chen, W., ... O'Shea, J. J. (2010).

- Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*, 467(7318), 967–971. <https://doi.org/10.1038/nature09447>
149. Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T. B., Oukka, M. and Kuchroo, V. K., IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007. 448: 484–487.
 150. Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., & de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology*, 8(9), 950–957. <https://doi.org/10.1038/ni1497>
 151. Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
 152. Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, J P Beijn S, Kupper TS, et al. CD8+ T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J Invest Dermatol* 2013;133:973-979.
 153. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172:146-155.
 154. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2011; 12:1-10.
 155. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, et al. Cutting Edge: Increased IL-17–secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol* 2010; 185:3814-3818.
 156. Li X, Zhou Q, Yang WB, Xiong XZ, Du RH, Zhang JC. Pleural mesothelial cells promote expansion of IL-17–producing CD8+ T cells in tuberculous pleural effusion. *J Clin Immunol*. 2013; 33:775-787.
 157. Silva, B. D. de S., Trentini, M. M., da Costa, A. C., Kipnis, A., & Junqueira-Kipnis, A. P. (2014). Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. *Immunology Letters*, 160(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.03.009>
 158. Hamada, H., Garcia-Hernandez, M. d. l. L., Reome, J. B., Misra, S. K., Strutt, T. M., McKinstry, K. K., ... Dutton, R. W. (2009). Tc17, a Unique Subset of CD8 T Cells That Can Protect against Lethal Influenza Challenge. *The Journal of Immunology*, 182(6), 3469–3481. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801814>
 159. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
 160. Bermejo, D. A., Jackson, S. W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E. V., Amezcua Vesely, M. C., Sather, B. D., ... Rawlings, D. J. (2013). Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nature Immunology*, 14(5), 514–522. <https://doi.org/10.1038/ni.2569>
 161. Isailovic, N., Daigo, K., Mantovani, A., & Selmi, C. (2015). Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *Journal of Autoimmunity*, 60, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.04.006>
 162. Cua, D. J., & Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(8), 611–611. <https://doi.org/10.1038/nri2819>

163. Chamoun, M. N., Blumenthal, A., Sullivan, M. J., Schembri, M. A., & Ulett, G. C. (2018). Bacterial pathogenesis and interleukin-17: interconnecting mechanisms of immune regulation, host genetics, and microbial virulence that influence severity of infection. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(4), 465–486. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1426556>
164. Lourda, M., Olsson-Åkefeldt, S., Gavhed, D., Björnfot, S., Clausen, N., Hjalmar, U., ... Svensson, M. (2014). Detection of IL-17A-producing peripheral blood monocytes in Langerhans cell histiocytosis patients. *Clinical Immunology*, *153*(1), 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.04.004>
165. Alves de Lima Silva, A., Criado, P. R., Nunes, R. S., Kanashiro-Galo, L., Seixas Duarte, M. I., Sotto, M. N., & Pagliari, C. (2017). Langerhans Cells Express IL-17A in the Epidermis of Chromoblastomycosis Lesions. *Biomedicine Hub*, *2*(2), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000477954>
166. Pujol, M., Borie, C., Montoya, M., Ferreira, A., & Vernal, R. (2019). *Brucella canis* induces canine CD4 + T cells multi-cytokine Th1/Th17 production via dendritic cell activation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *62*(November 2018), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.017>
167. Haas, J.D. *et al.* CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN- γ -producing $\gamma\delta$ effector T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3488–3497 (2009).
168. Papotto, P. H., Ribot, J. C., & Silva-Santos, B. (2017). IL-17+ $\gamma\delta$ T cells as kick-starters of inflammation. *Nature Immunology*, *18*(6), 604–611. <https://doi.org/10.1038/ni.3726>
169. Sutton, C. E., Mielke, L. A., & Mills, K. H. G. (2012). IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *European Journal of Immunology*, *42*(9), 2221–2231. <https://doi.org/10.1002/eji.201242569>
170. Do, J.S. *et al.* Cutting edge: spontaneous development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the thymus occurs via a TGF- β 1-dependent mechanism. *J. Immunol.* *184*, 1675–1679 (2010).
171. Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B., & Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals. *Immunity*, *31*(2), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.020>
172. Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C., & Mills, K. H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, *31*(2), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.001>
173. Roark, C. L., French, J. D., Taylor, M. A., Bendele, A. M., Born, W. K., & O'Brien, R. L. (2007). Exacerbation of Collagen-Induced Arthritis by Oligoclonal, IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells. *The Journal of Immunology*, *179*(8), 5576–5583. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5576>
174. Pantelyushin, S., Haak, S., Ingold, B., Kulig, P., Heppner, F. L., Navarini, A. A., & Becher, B. (2012). Ror γ t+ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *The Journal of clinical investigation*, *122*(6), 2252–2256. <https://doi.org/10.1172/JCI61862>
175. Papotto, P. H., Reinhardt, A., Prinz, I., & Silva-Santos, B. (2018). Innately versatile: $\gamma\delta$ 17 T cells in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, *87*, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.11.006>
176. Lockhart, E., Green, A. M., & Flynn, J. L. (2006). IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(7), 4662–4669. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4662>
177. Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Tanaka, K., Yahagi, A., Begum, M. D., Oshiro, K., Okamoto, Y., Watanabe, H., Kawakami, K., Roark, C., Born, W. K., O'Brien, R., Ikuta, K., Ishikawa, H., Nakae, S., Iwakura, Y., Ohta, T., & Matsuzaki, G. (2008). IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection

- in the liver. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(5), 3456–3463. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3456>
178. Caccamo, N., La Mendola, C., Orlando, V., Meraviglia, S., Todaro, M., Stassi, G., Sireci, G., Fournié, J. J., & Dieli, F. (2011). Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood*, 118(1), 129–138. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331298>
179. Peng, M. Y. *et al.* Interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell. Mol. Immunol.* 5, 203–208 (2008).
180. Walker, J. A., Barlow, J. L., & McKenzie, A. N. J. (2013). Innate lymphoid cells — how did we miss them? *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 75–87. <https://doi.org/10.1038/nri3349>
181. Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W. T., Tato, C. M., Weiss, G., Ivanov, I. I., ... O’Shea, J. J. (2009). Lymphoid tissue inducer–like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(1), 35–41. <https://doi.org/10.1084/jem.20072713>
182. Gladiator, A., & LeibundGut-Landmann, S. (2013). Innate Lymphoid Cells: New Players in IL-17-Mediated Antifungal Immunity. *PLoS Pathogens*, 9(12), 1–3. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003763>
183. Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., & LeibundGut-Landmann, S. (2013). Cutting Edge: IL-17-Secreting Innate Lymphoid Cells Are Essential for Host Defense against Fungal Infection. *The Journal of Immunology*, 190(2), 521–525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202924>
184. Passos, S. T., Silver, J. S., Hara, A. C. O., Stumhofer, J. S., & Hunter, C. A. (2018). IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901843>
185. Lunding, L. P., Webering, S., Vock, C., Behrends, J., Wagner, C., Hölscher, C., ... Wegmann, M. (2015). Poly(inosinic-cytidylic) Acid–Triggered Exacerbation of Experimental Asthma Depends on IL-17A Produced by NK Cells. *The Journal of Immunology*, 194(12), 5615–5625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402529>
186. Pandya, A. D., Al-Jaderi, Z., Høglund, R. A., Holmøy, T., Harbo, H. F., Norgauer, J., & Maghazachi, A. A. (2011). Identification of human NK17/NK1 cells. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026780>
187. Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, et al. Cutting Edge: NKT Cells Constitutively Express IL-23 Receptor and ROR γ t and Rapidly Produce IL-17 upon Receptor Ligation in an IL-6-Independent Fashion. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2008;180(8):5167-5171.
188. Michel, M.-L., Keller, A. C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P. B., ... Leite-de-Moraes, M. C. (2007). Identification of an IL-17–producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5), 995–1001. <https://doi.org/10.1084/jem.20061551>
189. Doisne, J.-M., Soulard, V., Becourt, C., Amniai, L., Henrot, P., Havenar-Daughton, C., ... Benlagha, K. (2011). Cutting Edge: Crucial Role of IL-1 and IL-23 in the Innate IL-17 Response of Peripheral Lymph Node NK1.1- Invariant NKT Cells to Bacteria. *The Journal of Immunology*, 186(2), 662–666. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002725>
190. Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., ... Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
191. Taylor, P. R., Roy, S., Leal, S. M., Sun, Y., Howell, S. J., Cobb, B. A., ... Pearlman, E. (2013). Activation of neutrophils by autocrine IL-17A–IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and dectin-2. *Nature Immunology*, 15(2), 143–151. <https://doi.org/10.1038/ni.2797>

- 192.Hoshino, A., Nagao, T., Nagi-Miura, N., Ohno, N., Yasuhara, M., Yamamoto, K., ... Suzuki, K. (2008). MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via its Fc region- and complement-dependent manner. *Journal of Autoimmunity*, 31(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.03.006>
- 193.Li, L., Rosin, D. L., Okusa, M. D., Li, L., Huang, L., Vergis, A. L., ... Narayan, V. (2010). IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ – mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury Find the latest version: IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ – mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-re, 120(1), 331–342. <https://doi.org/10.1172/JCI38702>.that
- 194.Katayama, M., Ohmura, K., Yukawa, N., Terao, C., Hashimoto, M., Yoshifuji, H., ... Mimori, T. (2013). Neutrophils Are Essential As A Source Of Il-17 In The Effector Phase Of Arthritis. *PLoS ONE*, 8(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062231>
- 195.Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E., & Trifilieff, A. (2003). IL-17, Produced by Lymphocytes and Neutrophils, Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Airway Neutrophilia: IL-15 as a Possible Trigger. *The Journal of Immunology*, 170(4), 2106–2112. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2106>
- 196.Werner, J. L., Gessner, M. A., Lilly, L. M., Nelson, M. P., Metz, A. E., Horn, D., ... Steele, C. (2011). Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a Dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection. *Infection and Immunity*, 79(10), 3966–3977. <https://doi.org/10.1128/IAI.05493-11>
- 197.Andreasen, C., Powell, D. A., & Carbonetti, N. H. (2009). Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to Bordetella pertussis infection in mice. *PLoS ONE*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007079>
- 198.Cai, S., Batra, S., Langohr, I., Iwakura, Y., & Jeyaseelan, S. (2016). IFN- γ induction by neutrophil-derived IL-17A homodimer augments pulmonary antibacterial defense. *Mucosal Immunology*, 9(3), 718–729. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.95>
- 199.Ren, Y., Hua, L., Meng, X., Xiao, Y., Hao, X., Guo, S., ... Wang, L. (2016). Correlation of Surface Toll-Like Receptor 9 Expression with IL-17 Production in Neutrophils during Septic Peritonitis in Mice Induced by *E. coli*. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/3296307>
- 200.Li, T. J., Jiang, Y. M., Hu, Y. F., Huang, L., Yu, J., Zhao, L. Y., ... Li, G. X. (2017). Interleukin-17-producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(6), 1575–1585. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0617>
- 201.Ramirez-Velazquez, C., Castillo, E. C., Guido-Bayardo, L., & Ortiz-Navarrete, V. (2013). IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 9(1), 19–21. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-9-23>
- 202.Da Silva, C. A., Hartl, D., Liu, W., Lee, C. G., & Elias, J. A. (2008). TLR-2 and IL-17A in Chitin-Induced Macrophage Activation and Acute Inflammation. *The Journal of Immunology*, 181(6), 4279–4286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4279>
- 203.Ishida, H., Imai, T., Suzue, K., Hirai, M., Taniguchi, T., Yoshimura, A., ... Hisaeda, H. (2013). IL-23 protection against Plasmodium berghei infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *European Journal of Immunology*, 43(10), 2696–2706. <https://doi.org/10.1002/eji.201343493>

204. Song, C., Luo, L., Lei, Z., Li, B., Liang, Z., Liu, G., ... Feng, Z.-H. (2008). IL-17-Producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma. *The Journal of Immunology*, *181*(9), 6117–6124. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6117>
205. Vykhovanets, E. V, Maclennan, G. T., Vykhovanets, O. V, & Gupta, S. (2011). IL-17 Expression by macrophages is associated with proliferative inflammatory atrophy lesions in prostate cancer patients.pdf, *4*(6), 552–565
206. Mrabet-Dahbi, S., Metz, M., Dudeck, A., Zuberbier, T., & Maurer, M. (2009). Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands. *Experimental Dermatology*, *18*(5), 437–444. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00878.x>
207. Hueber, A. J., Asquith, D. L., Miller, A. M., Kerr, S., Leipe, J., Melendez, A. J., ... McInnes, I. B. (2018). Cutting Edge: Mast Cells Express IL-17A in Rheumatoid Arthritis Synovium. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903566>
208. Kan, J. ichiro, Mishima, S., Kashiwakura, J. ichi, Sasaki-Sakamoto, T., Seki, M., Saito, S., ... Okayama, Y. (2016). Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Allergy International*, *65*, S11–S16. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.04.007>
209. Noordenbos, T., Blijdorp, I., Chen, S., Stap, J., Mul, E., Canete, J. D., ... Baeten, D. (2016). Human mast cells capture, store, and release bioactive, exogenous IL-17A. *Journal of Leukocyte Biology*, *100*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI1215-542R>
210. Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J., & Bruce, A. T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *187*(1), 490–500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100123>
211. Siddhuraj, P., Bergqvist, A., Mori, M., Bjermer, L., & Erjefält, J. (2015). Chymase-positive mast cells represent a major source for IL-17A in airway inflammation. *European Respiratory Journal*, *46*(suppl 59). Retrieved from http://erj.ersjournals.com/content/46/suppl_59/PA381.abstract
212. Liu, X., Jin, H., Zhang, G., Lin, X., Chen, C., Sun, J., ... Yu, J. (2014). Intratumor IL-17-positive mast cells are the major source of the IL-17 that is predictive of survival in gastric cancer patients. *PLoS ONE*, *9*(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106834>
213. Tu, J. F., Pan, H. Y., Ying, X. H., Lou, J., Ji, J. S., & Zou, H. (2016). Mast cells comprise the major of interleukin 17-producing cells and predict a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Medicine (United States)*, *95*(13), e3220. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003220>
214. Spidale, N. A., Malhotra, N., Frascoli, M., Sylvia, K., Miu, B., Freeman, C., Stadinski, B. D., Huseby, E., & Kang, J. (2020). Neonatal-derived IL-17 producing dermal $\gamma\delta$ T cells are required to prevent spontaneous atopic dermatitis. *eLife*, *9*, e51188. <https://doi.org/10.7554/eLife.51188>
215. Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2016). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000.*, *69*(1), 142–159. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>.Basic
216. Eberle, F. C., Brück, J., Holstein, J., Hirahara, K., & Ghoreschi, K. (2016). Recent advances in understanding psoriasis. *F1000Research*, *5*, F1000 Faculty Rev-770. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7927.1>
217. Nograles, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *123*(6), 1244–52.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.03.041>

218. Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P., & Krueger, J. G. (2008). Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *The Journal of investigative dermatology*, *128*(5), 1207–1211. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701213>
219. Zhao, Y., Balato, A., Fischelevich, R., Chapoval, A., Mann, D. L., & Gaspari, A. A. (2009). Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *The British journal of dermatology*, *161*(6), 1301–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09400.x>
220. Caproni, M., Antiga, E., Volpi, W., Verdelli, A., Venegoni, L., Quaglino, P., Fabbri, P., & Marzano, A. V. (2015). The Treg/Th17 cell ratio is reduced in the skin lesions of patients with pyoderma gangrenosum. *The British journal of dermatology*, *173*(1), 275–278. <https://doi.org/10.1111/bjd.13670>
221. Shimizu, J., Takai, K., Fujiwara, N., Arimitsu, N., Ueda, Y., Wakisaka, S., Yoshikawa, H., Kaneko, F., Suzuki, T., & Suzuki, N. (2012). Excessive CD4⁺ T cells co-expressing interleukin-17 and interferon- γ in patients with Behçet's disease. *Clinical and experimental immunology*, *168*(1), 68–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04543.x>
222. Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J. L., Han, S. J., Harrison, O. J., Wilhelm, C., Conlan, S., Himmelfarb, S., Byrd, A. L., Deming, C., Quinones, M., Brenchley, J. M., Kong, H. H., Tussiwand, R., Murphy, K. M., Merad, M., Segre, J. A., & Belkaid, Y. (2015). Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature*, *520*(7545), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature14052>
223. Gadsbøll, A. Ø., Jee, M. H., Funch, A. B., Alhede, M., Mraz, V., Weber, J. F., Callender, L. A., Carroll, E. C., Bjarnsholt, T., Woetmann, A., Ødum, N., Thomsen, A. R., Johansen, J. D., Henson, S. M., Geisler, C., & Bonefeld, C. M. (2020). Pathogenic CD8⁺ Epidermis-Resident Memory T Cells Displace Dendritic Epidermal T Cells in Allergic Dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, *140*(4), 806–815.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.722>
224. Gray, E. E., Suzuki, K., & Cyster, J. G. (2011). Cutting edge: Identification of a motile IL-17-producing gammadelta T cell population in the dermis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *186*(11), 6091–6095. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100427>
225. Mabuchi, T., Takekoshi, T., & Hwang, S. T. (2011). Epidermal CCR6⁺ $\gamma\delta$ T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasiform dermatitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *187*(10), 5026–5031. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101817>
226. Sumaria, N., Roediger, B., Ng, L. G., Qin, J., Pinto, R., Cavanagh, L. L., Shklovskaya, E., Fazekas de St Groth, B., Triccas, J. A., & Weninger, W. (2011). Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal gammadelta T cells. *The Journal of experimental medicine*, *208*(3), 505–518. <https://doi.org/10.1084/jem.20101824>
227. Parlet, C. P., Waldschmidt, T. J., & Schlueter, A. J. (2014). Chronic ethanol feeding induces subset loss and hyporesponsiveness in skin T cells. *Alcoholism, clinical and experimental research*, *38*(5), 1356–1364. <https://doi.org/10.1111/acer.12358>
228. Cai, Y., Xue, F., Fleming, C., Yang, J., Ding, C., Ma, Y., Liu, M., Zhang, H. G., Zheng, J., Xiong, N., & Yan, J. (2014). Differential developmental requirement and peripheral regulation for dermal V γ 4 and V γ 6T17 cells in health and inflammation. *Nature communications*, *5*, 3986. <https://doi.org/10.1038/ncomms4986>
229. Cho, J. S., Pietras, E. M., Garcia, N. C., Ramos, R. I., Farzam, D. M., Monroe, H. R., Magorien, J. E., Blauvelt, A., Kolls, J. K., Cheung, A. L., Cheng, G., Modlin, R. L., & Miller, L. S. (2010). IL-

- 17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(5), 1762–1773. <https://doi.org/10.1172/JCI40891>
230. Jiang, X., Park, C. O., Geddes Sweeney, J., Yoo, M. J., Gaide, O., & Kupper, T. S. (2017). Dermal $\gamma\delta$ T Cells Do Not Freely Re-Circulate Out of Skin and Produce IL-17 to Promote Neutrophil Infiltration during Primary Contact Hypersensitivity. *PloS one*, 12(1), e0169397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169397>
231. Marchitto, M. C., Dillen, C. A., Liu, H., Miller, R. J., Archer, N. K., Ortines, R. V., Alphonse, M. P., Marusina, A. I., Merleev, A. A., Wang, Y., Pinsker, B. L., Byrd, A. S., Brown, I. D., Ravipati, A., Zhang, E., Cai, S. S., Limjunyawong, N., Dong, X., Yeaman, M. R., Simon, S. I., ... Miller, L. S. (2019). Clonal $V\gamma 6^+V\delta 4^+$ T cells promote IL-17-mediated immunity against *Staphylococcus aureus* skin infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(22), 10917–10926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818256116>
232. Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V. R., Zhang, H. G., Wang, T., Zheng, J., & Yan, J. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity*, 35(4), 596–610. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.001>
233. Constantinides, M. G., Link, V. M., Tamoutounour, S., Wong, A. C., Perez-Chaparro, P. J., Han, S. J., Chen, Y. E., Li, K., Farhat, S., Weckel, A., Krishnamurthy, S. R., Vujkovic-Cvijin, I., Linehan, J. L., Bouladoux, N., Merrill, E. D., Roy, S., Cua, D. J., Adams, E. J., Bhandoola, A., Scharschmidt, T. C., ... Belkaid, Y. (2019). MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6464), eaax6624. <https://doi.org/10.1126/science.aax6624>
234. Hodgkinson, T., Gothard, E. J., Boroumand, S., Lamb, R., Cummins, I., Narang, P., Sawtell, A., Coles, J., Leonov, G., Reboldi, A., Buckley, C. D., Cupedo, T., Siebel, C., Bayat, A., Coles, M. C., & Ambler, C. A. (2016). Epidermal Notch1 recruits ROR γ (+) group 3 innate lymphoid cells to orchestrate normal skin repair. *Nature communications*, 7, 11394. <https://doi.org/10.1038/ncomms11394>
235. Kim, M. H., Jin, S. P., Jang, S., Choi, J. Y., Chung, D. H., Lee, D. H., Kim, K. H., & Kim, H. Y. (2020). IL-17A-Producing Innate Lymphoid Cells Promote Skin Inflammation by Inducing IL-33-Driven Type 2 Immune Responses. *The Journal of investigative dermatology*, 140(4), 827–837.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.447>
236. Yao, Z., Spriggs, M. K., Derry, J. M., Strockbine, L., Park, L. S., VandenBos, T., Zappone, J. D., Painter, S. L., & Armitage, R. J. (1997). Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine*, 9(11), 794–800. <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0240>
237. Onishi, R. M., & Gaffen, S. L. (2010). Interleukin- 17 and its target genes: mechanisms of interleukin- 17 function in disease, 311–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x>
238. Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., & Peschon, J. (2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), 36–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.36>
239. Hu, Y., Ota, N., Peng, I., Refino, C. J., Danilenko, D. M., Caplazi, P., & Ouyang, W. (2010). IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(8), 4307–4316. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903614>
240. Chang, S. H., Park, H., & Dong, C. (2006). Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *The Journal of biological chemistry*, 281(47), 35603–35607. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600256200>

241. Qian, Y., Liu, C., Hartupée, J., Altuntas, C. Z., Gulen, M. F., Jane-Wit, D., Xiao, J., Lu, Y., Giltiay, N., Liu, J., Kordula, T., Zhang, Q. W., Vallance, B., Swaidani, S., Aronica, M., Tuohy, V. K., Hamilton, T., & Li, X. (2007). The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature immunology*, 8(3), 247–256. <https://doi.org/10.1038/ni1439>
242. Liu, C., Qian, W., Qian, Y., Giltiay, N. V., Lu, Y., Swaidani, S., Misra, S., Deng, L., Chen, Z. J., & Li, X. (2009). Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling. *Science signaling*, 2(92), ra63. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000382>
243. Iyoda, M., Shibata, T., Kawaguchi, M., Hizawa, N., Yamaoka, T., Kokubu, F., & Akizawa, T. (2010). IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *American journal of physiology. Renal physiology*, 298(3), F779–F787. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00198.2009>
244. McGeachy, M. J., Cua, D. J., & Gaffen, S. L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, 50(4), 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
245. Jin, W., & Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging microbes & infections*, 2(9), e60. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.58>
246. Gaffen, S. L. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Current Opinion in Immunology*, 23(5), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.006>
247. Schwarzenberger, P., La Russa, V., Miller, A., Ye, P., Huang, W., Zieske, A., Nelson, S., Bagby, G. J., Stoltz, D., Mynatt, R. L., Spriggs, M., & Kolls, J. K. (1998). IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), 6383–6389.
248. Liu, R., Lauridsen, H. M., Amezcua, R. A., Pierce, R. W., Jane-Wit, D., Fang, C., Pellowe, A. S., Kirkiles-Smith, N. C., Gonzalez, A. L., & Pober, J. S. (2016). IL-17 Promotes Neutrophil-Mediated Immunity by Activating Microvascular Pericytes and Not Endothelium. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 197(6), 2400–2408. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600138>
249. Kasten, K. R., Prakash, P. S., Unsinger, J., Goetzman, H. S., England, L. G., Cave, C. M., Seitz, A. P., Mazuski, C. N., Zhou, T. T., Morre, M., Hotchkiss, R. S., Hildeman, D. A., & Caldwell, C. C. (2010). Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infection and immunity*, 78(11), 4714–4722. <https://doi.org/10.1128/IAI.00456-10>
250. Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J., & Kolls, J. K. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine*, 194(4), 519–527. <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.519>
251. Kwiecien, K., Zegar, A., Jung, J., Brzoza, P., Kwitniewski, M., Godlewska, U., ... Cichy, J. (2019). Architecture of antimicrobial skin defense. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, (June), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.08.001>
252. Brewer, M. G., Yoshida, T., Kuo, F. I., Fridy, S., Beck, L. A., & Benedetto, A. De. (2019). Antagonistic Effects of IL-4 on IL-17A-Mediated Enhancement of Epidermal Tight Junction Function, 1–11.
253. Martin, D., & Towne, J. (2013). The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 133(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.194>.
254. Wu, X., Tian, J., & Wang, S. (2018). Insight into non-pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01112>

255. Harrison, O. J., Linehan, J. L., Shih, H. Y., Bouladoux, N., Han, S. J., Smelkinson, M., ... Belkaid, Y. (2019). Commensal-specific T cell plasticity promotes rapid tissue adaptation to injury. *Science*, 363(6422). <https://doi.org/10.1126/science.aat6280>
256. Kagami, S., Rizzo, H. L., Kurtz, S. E., Miller, L. S., & Blauvelt, A. (2010). IL-23 and IL-17A, but Not IL-12 and IL-22, Are Required for Optimal Skin Host Defense against *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5453–5462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001153>
257. Trautwein-Weidner, K., Gladiator, A., Nur, S., Diethelm, P., & LeibundGut-Landmann, S. (2015). IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal immunology*, 8(2), 221–231. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.57>
258. García-Patiño, M. G., García-Contreras, R., & Licona-Limón, P. (2017). The Immune Response against *Acinetobacter baumannii*, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. *Frontiers in immunology*, 8, 441. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00441>
259. Qiu, H., Li, Z., KuoLee, R., Harris, G., Gao, X., Yan, H., Xu, H. H., & Chen, W. (2016). Host resistance to intranasal *Acinetobacter baumannii* reinfection in mice. *Pathogens and disease*, 74(5), ftw048. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw048>
260. Breslow, J. M., Meissler, J., Hartzell, R. R., Spence, P. B., Truant, A., Gaughan, J., & Eisenstein, T. K. (2011). Innate immune responses to systemic *acinetobacter baumannii* infection in mice: Neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infection and Immunity*, 79(8), 3317–3327. <https://doi.org/10.1128/IAI.00069-11>
261. Cruz-Muñiz, M. Y., López-Jacome, L. E., Hernández-Durán, M., Franco-Cendejas, R., Licona-Limón, P., Ramos-Balderas, J. L., ... García-Contreras, R. (2016). Repurposing the anticancer drug mitomycin C for the treatment of persistent *Acinetobacter baumannii* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 88–92. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.022
262. Shen, Y. 2012. C57BL/6-*Il17a^{tm1Bcgen}*/J. The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/strain/018472>
263. Haas JD, Ravens S, Düber S, et al. Development of interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity*. 2012;37(1):48-59.
264. Grundstad ML, Parlet CP, Kwiecinski JM, et al. Quorum Sensing, Virulence, and Antibiotic Resistance of USA100 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *mSphere*. 2019;4(4): e00553-19.
265. Liu, D., Liu, Z. S., Hu, P., Hui, Q., Fu, B. Q., Lu, S. Y., Li, Y. S., Zou, D. Y., Li, Z. H., Yan, D. M., Ding, Y. X., Zhang, Y. Y., Zhou, Y., Liu, N. N., & Ren, H. L. (2016). Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China. *Microbiology and immunology*, 60(8), 533–539. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12400>
266. Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., van de Vorstenbosch, C., & European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of applied toxicology: JAT*, 21(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>
267. Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 50(5), 600–613.
268. Bruhn, K. W., Pantapalangkoor, P., Nielsen, T., Tan, B., Junus, J., Hujer, K. M., Wright, M. S., Bonomo, R. A., Adams, M. D., Chen, W., & Spellberg, B. (2015). Host fate is rapidly determined by innate effector-microbial interactions during *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *The Journal of infectious diseases*, 211(8), 1296–1305. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu593>

269. Harris, G., KuoLee, R., Xu, H. H., & Chen, W. (2019). Acute intraperitoneal infection with a hypervirulent *Acinetobacter baumannii* isolate in mice. *Scientific reports*, 9(1), 6538. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43000-4>
270. Hymowitz, S. G., Filvaroff, E. H., Yin, J. P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R. F., Pan, G., Gurney, A. L., de Vos, A. M., & Starovasnik, M. A. (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *The EMBO journal*, 20(19), 5332–5341. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5332>
271. Zhang, X., Angkasekwina, P., Dong, C., & Tang, H. (2011). Structure and function of interleukin-17 family cytokines. *Protein & cell*, 2(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1006-5>
272. Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C., & Iwakura, Y. (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 30(1), 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.009>
273. Chang, S. H., & Dong, C. (2007). A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell research*, 17(5), 435–440. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.35>
274. Wright, J. F., Guo, Y., Quazi, A., Luxenberg, D. P., Bennett, F., Ross, J. F., Qiu, Y., Whitters, M. J., Tomkinson, K. N., Dunussi-Joannopoulos, K., Carreno, B. M., Collins, M., & Wolfman, N. M. (2007). Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *The Journal of biological chemistry*, 282(18), 13447–13455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700499200>
275. Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., & Peschon, J. (2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(1), 36–39.
276. Grundstad, M. L., Parlet, C. P., Kwiecinski, J. M., Kavanaugh, J. S., Crosby, H. A., Cho, Y. S., Heilmann, K., Diekema, D. J., & Horswill, A. R. (2019). Quorum Sensing, Virulence, and Antibiotic Resistance of USA100 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *mSphere*, 4(4), e00553-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00553-19>
277. Johnzon, C. F., Artursson, K., Söderlund, R., Guss, B., Rönnerberg, E., & Pejler, G. (2016). Mastitis Pathogens with High Virulence in a Mouse Model Produce a Distinct Cytokine Profile *In Vivo*. *Frontiers in immunology*, 7, 368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00368>
278. Tseng, C. W., Biancotti, J. C., Berg, B. L., Gate, D., Kolar, S. L., Müller, S., Rodriguez, M. D., Rezai-Zadeh, K., Fan, X., Beenhouwer, D. O., Town, T., & Liu, G. Y. (2015). Increased Susceptibility of Humanized NSG Mice to Panton-Valentine Leukocidin and *Staphylococcus aureus* Skin Infection. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005292>
279. Mahnke, Y. D., & Roederer, M. (2007). Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clinics in laboratory medicine*, 27(3), 469–v. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2007.05.002>
280. Kollias, N., Gillies, R., Moran, M., Kochevar, I. E., & Anderson, R. R. (1998). Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *The Journal of investigative dermatology*, 111(5), 776–780. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00377.x>
281. Weagle, G., Paterson, P. E., Kennedy, J., & Pottier, R. (1988). The nature of the chromophore responsible for naturally occurring fluorescence in mouse skin. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 2(3), 313–320. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(88\)85051-6](https://doi.org/10.1016/1011-1344(88)85051-6)

282. Park, C. O., Fu, X., Jiang, X., Pan, Y., Teague, J. E., Collins, N., Tian, T., O'Malley, J. T., Emerson, R. O., Kim, J. H., Jung, Y., Watanabe, R., Fuhlbrigge, R. C., Carbone, F. R., Gebhardt, T., Clark, R. A., Lin, C. P., & Kupper, T. S. (2018). Staged development of long-lived T-cell receptor $\alpha\beta$ T_H17 resident memory T-cell population to *Candida albicans* after skin infection. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *142*(2), 647–662. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.042>
283. Kashem, S. W., & Kaplan, D. H. (2016). Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends in immunology*, *37*(7), 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.007>
284. Teunissen, M. B., Koomen, C. W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E. A., & Bos, J. D. (1998). Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, *111*(4), 645–649. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00347.x>
285. Teunissen, M., Munneke, J. M., Bernink, J. H., Spuls, P. I., Res, P., Te Velde, A., Cheuk, S., Brouwer, M., Menting, S. P., Eidsmo, L., Spits, H., Hazenberg, M. D., & Mjösberg, J. (2014). Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *The Journal of investigative dermatology*, *134*(9), 2351–2360. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.146>
286. van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A. M., Florencia, E., Prens, E. P., & Lubberts, E. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *182*(9), 5836–5845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802999>
287. Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I. I., Littman, D. R., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*, *464*(7293), 1371–1375. <https://doi.org/10.1038/nature08949>
288. Liu, H., Archer, N. K., Dillen, C. A., Wang, Y., Ashbaugh, A. G., Ortines, R. V., Kao, T., Lee, S. K., Cai, S. S., Miller, R. J., Marchitto, M. C., Zhang, E., Riggins, D. P., Plaut, R. D., Stibitz, S., Geha, R. S., & Miller, L. S. (2017). Staphylococcus aureus Epicutaneous Exposure Drives Skin Inflammation via IL-36-Mediated T Cell Responses. *Cell host & microbe*, *22*(5), 653–666.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.006>
289. Tanaka, S., Yoshimoto, T., Naka, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Cua, D., & Kubo, M. (2009). Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(11), 7523–7530. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803828>
290. Conti, H. R., Peterson, A. C., Brane, L., Huppler, A. R., Hernández-Santos, N., Whibley, N., Garg, A. V., Simpson-Abelson, M. R., Gibson, G. A., Mamo, A. J., Osborne, L. C., Bishu, S., Ghilardi, N., Siebenlist, U., Watkins, S. C., Artis, D., McGeachy, M. J., & Gaffen, S. L. (2014). Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. *The Journal of experimental medicine*, *211*(10), 2075–2084. <https://doi.org/10.1084/jem.20130877>
291. Chen, X., Churchill, M. J., Nagar, K. K., Tailor, Y. H., Chu, T., Rush, B. S., Jiang, Z., Wang, E. B., Renz, B. W., Wang, H., Fung, M. C., Worthley, D. L., Mukherjee, S., & Wang, T. C. (2015). IL-17 producing mast cells promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells in a mouse allergy model of colorectal cancer. *Oncotarget*, *6*(32), 32966–32979. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5435>
292. Lázaro-Díez, M., Navascués-Lejarza, T., Remuzgo-Martínez, S., Navas, J., Icardo, J. M., Acosta, F., Martínez-Martínez, L., & Ramos-Vivas, J. (2016). *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *Microbes and infection*, *18*(9), 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.002>

293. Lázaro-Díez, M., Chapartegui-González, I., Redondo-Salvo, S., Leigh, C., Merino, D., Segundo, D. S., Fernández, A., Navas, J., Icardo, J. M., Acosta, F., Ocampo-Sosa, A., Martínez-Martínez, L., & Ramos-Vivas, J. (2017). Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*. *Scientific reports*, *7*(1), 4571. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04870-8>
294. Rubio T, Gagné S, Debruyne C, Dias C, Cluzel C, Mongellaz D, Rousselle P, Göttig S, Seifert H, Higgins PG, Salcedo SP. (2022). Incidence of an Intracellular Multiplication Niche among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *mSystems*. Feb 22;7(1): e0048821. doi: 10.1128/msystems.00488-21. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35103489; PMCID: PMC8805633.
295. Chen, K., Eddens, T., Trevejo-Nunez, G., Way, E. E., Elsegeiny, W., Ricks, D. M., Garg, A. V., Erb, C. J., Bo, M., Wang, T., Chen, W., Lee, J. S., Gaffen, S. L., & Kolls, J. K. (2016). IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against *K. pneumoniae*. *Cell host & microbe*, *20*(5), 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.003>
296. Borkner, L., Curham, L. M., Wilk, M. M., Moran, B., & Mills, K. (2021). IL-17 mediates protective immunity against nasal infection with *Bordetella pertussis* by mobilizing neutrophils, especially Siglec-F⁺ neutrophils. *Mucosal immunology*, *14*(5), 1183–1202. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00407-5>
297. Teng, T. S., Ji, A. L., Ji, X. Y., & Li, Y. Z. (2017). Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *Journal of immunology research*, *2017*, 9671604. <https://doi.org/10.1155/2017/9671604>
298. Zhao, L., KuoLee, R., Harris, G., Tram, K., Yan, H., & Chen, W. (2011). c-di-GMP protects against intranasal *Acinetobacter baumannii* infection in mice by chemokine induction and enhanced neutrophil recruitment. *International immunopharmacology*, *11*(9), 1378–1383. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.03.024>
299. He, S., Li, Z., Yang, Q., Quan, M., Zhao, L., & Hong, Z. (2020). Resistance Trends Among 1,294 Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Strains from a Tertiary General Hospital in China, 2014 - 2017. *Clinical laboratory*, *66*(3), 10.7754/Clin.Lab.2019.190629. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.190629>
300. Jin, H., Qiu, F., Ji, H. J., & Lu, Q. (2016). Analysis of drug resistance in 1,861 strains of *Acinetobacter baumannii*. *Biomedical reports*, *4*(4), 463–466. <https://doi.org/10.3892/br.2016.598>
301. Garza-González, E., Franco-Cendejas, R., Morfín-Otero, R., Echaniz-Aviles, G., Rojas-Larios, F., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Ponce-de-León, A., Rodríguez-Noriega, E., Alavez-Ramírez, N., Mena-Ramírez, J. P., Rincón-Zuno, J., Fong-Camargo, M. G., Morales-De-la-Peña, C. T., Huerta-Baltazar, C. R., López-Jacome, L. E., Carnalla-Barajas, M. N., Soto-Noguerón, A., Sanchez-Francia, D., Moncada-Barrón, D., ... Camacho-Ortiz, A. (2020). The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico During the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, *26*(11), 1372–1382. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0354>
302. Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Bobadilla-Del-Valle, M., Ponce-de-León-Garduño, L. A., Esteban-Kenel, V., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., López-Jacome, L. E., Colin-Castro, C. A., Franco-Cendejas, R., Flores-Treviño, S., Morfín-Otero, R., Rojas-Larios, F., Mena-Ramírez, J. P., Fong-Camargo, M. G., Morales-De-la-Peña, C. T., García-Mendoza, L., Choy-Chang, E. V., Aviles-Benitez, L. K., ... Camacho-Ortiz, A. (2021). Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. *PloS one*, *16*(3), e0248614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248614>
303. Fuentes-González, M. F., & Ahumada-Topete, V. H. (2020). Incremento de resistencias antimicrobianas en bacteriemias. Reporte de un centro de referencia [Increase of antimicrobial

- resistance in bacteremias. Report of a reference center]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 58(3), 284–291. <https://doi.org/10.24875/RMIMSS.M20000032>
304. ATCC. *Acinetobacter baumannii* Bouvet and Grimont 17978™ <https://www.atcc.org/products/17978#product-references>
305. Baumann, P., Doudoroff, M., & Stanier, R. Y. (1968). A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of bacteriology*, 95(5), 1520–1541. <https://doi.org/10.1128/jb.95.5.1520-1541.1968>
306. Lucaßen, K., Gerson, S., Xanthopoulou, K., Wille, J., Wille, T., Seifert, H., & Higgins, P. G. (2021). Comparison of the *Acinetobacter baumannii* Reference Strains ATCC 17978 and ATCC 19606 in Antimicrobial Resistance Mediated by the AdeABC Efflux Pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(8), e0057021. <https://doi.org/10.1128/AAC.00570-21>
307. Martínez-Gutián, M., Vázquez-Ucha, J. C., Álvarez-Fraga, L., Conde-Pérez, K., Vallejo, J. A., Perina, A., Bou, G., Poza, M., & Beceiro, A. (2021). Global Transcriptomic Analysis During Murine Pneumonia Infection Reveals New Virulence Factors in *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of infectious diseases*, 223(8), 1356–1366. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa522>
308. Na, S. H., Oh, M. H., Jeon, H., Lee, Y. K., Lee, B., Shin, M., & Lee, J. C. (2019). Imaging of bioluminescent *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *Microbial pathogenesis*, 137, 103784. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103784>
309. Álvarez-Fraga, L., Vázquez-Ucha, J. C., Martínez-Gutián, M., Vallejo, J. A., Bou, G., Beceiro, A., & Poza, M. (2018). Pneumonia infection in mice reveals the involvement of the *feoA* gene in the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 9(1), 496–509. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1420451>
310. Xu, Q., Chen, T., Yan, B., Zhang, L., Pi, B., Yang, Y., Zhang, L., Zhou, Z., Ji, S., Leptihn, S., Akova, M., Yu, Y., & Hua, X. (2019). Dual Role of *gnaA* in Antibiotic Resistance and Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(10), e00694-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00694-19>
311. Zurawski, D. V., Banerjee, J., Alamneh, Y. A., Shearer, J. P., & Demons, S. T. (2019). Skin and Soft Tissue Models for *Acinetobacter baumannii* Infection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1946, 271–287. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_25
312. Munoz-Price, L. S., & Weinstein, R. A. (2008). *Acinetobacter* infection. *The New England journal of medicine*, 358(12), 1271–1281. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070741>
313. Lindemann, M. J., Hu, Z., Benczik, M., Liu, K. D., & Gaffen, S. L. (2008). Differential regulation of the IL-17 receptor by gamma-cytokines: inhibitory signaling by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 283(20), 14100–14108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801357200>
314. Gaffen S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews. Immunology*, 9(8), 556–567. <https://doi.org/10.1038/nri2586>
315. Crua Asensio, N., Macho Rendón, J., & Torrent Burgas, M. (2021). Time-Resolved Transcriptional Profiling of Epithelial Cells Infected by Intracellular *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 9(2), 354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020354>
316. Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters*, 583(24), 3966–3973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>
317. Du, H. W., Chen, G. Y., Yang, C. H., Li, C. B., Xun, Y. P., Liu, J., Chen, P., & Shi, L. L. (2014). Multiple correlations of mRNA expression and protein abundance in human cytokine profile. *Molecular biology reports*, 41(10), 6985–6993. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3585-8>
318. Whiteside T. L. (2002). Cytokine assays. *BioTechniques, Suppl*, 4–15

319. Chen, J., Cascio, J., Magee, J. D., Techasintana, P., Gubin, M. M., Dahm, G. M., Calaluce, R., Yu, S., & Atasoy, U. (2013). Posttranscriptional gene regulation of IL-17 by the RNA-binding protein HuR is required for initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *191*(11), 5441–5450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301188>
320. Peng, H., Ning, H., Wang, Q., Lai, J., Wei, L., Stumpo, D. J., Blackshear, P. J., Fu, M., Hou, R., Hoft, D. F., & Liu, J. (2020). Tristetraprolin Regulates TH17 Cell Function and Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice. *Frontiers in immunology*, *11*, 1952. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01952>
321. Khan, D., & Ansar Ahmed, S. (2015). Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Frontiers in genetics*, *6*, 236. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00236>
322. Lee, H. H., Yoon, N. A., Vo, M. T., Kim, C. W., Woo, J. M., Cha, H. J., Cho, Y. W., Lee, B. J., Cho, W. J., & Park, J. W. (2012). Tristetraprolin down-regulates IL-17 through mRNA destabilization. *FEBS letters*, *586*(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.021>
323. Simundic, T., Jelakovic, B., Dzumhur, A., Turk, T., Sahinovic, I., Dobrosevic, B., Takac, B., & Barbic, J. (2017). Interleukin 17A and Toll-like Receptor 4 in Patients with Arterial Hypertension. *Kidney & blood pressure research*, *42*(1), 99–108. <https://doi.org/10.1159/000471900>
324. Zheng, S., Shen, F., Jones, B., Fink, D., Geist, B., Nnane, I., Zhou, Z., Hall, J., Malaviya, R., Ort, T., & Wang, W. (2020). Characterization of concurrent target suppression by JNJ-61178104, a bispecific antibody against human tumor necrosis factor and interleukin-17A. *mAbs*, *12*(1), 1770018. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1770018>
325. Moise, N., & Friedman, A. (2021). A mathematical model of the multiple sclerosis plaque. *Journal of theoretical biology*, *512*, 110532. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110532>
326. Kumar, P., Monin, L., Castillo, P., Elsegeiny, W., Horne, W., Eddens, T., Vikram, A., Good, M., Schoenborn, A. A., Bibby, K., Montelaro, R. C., Metzger, D. W., Gulati, A. S., & Kolls, J. K. (2016). Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity*, *44*(3), 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.007>
327. King, L. B., Pangburn, M. K., & McDaniel, L. S. (2013). Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation. *The Journal of infectious diseases*, *207*(7), 1128–1134. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis939>
328. Waern, I., Karlsson, I., Pejler, G., & Wernersson, S. (2015). IL-6 and IL-17A degradation by mast cells is mediated by a serglycin:serine protease axis. *Immunity, inflammation and disease*, *4*(1), 70–79. <https://doi.org/10.1002/iid3.95>
329. Takahashi, N., Vanlaere, I., de Rycke, R., Cauwels, A., Joosten, L. A., Lubberts, E., van den Berg, W. B., & Libert, C. (2008). IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. *The Journal of experimental medicine*, *205*(8), 1755–1761. <https://doi.org/10.1084/jem.20080588>
330. Reich, K., Papp, K. A., Matheson, R. T., Tu, J. H., Bissonnette, R., Bourcier, M., Gratton, D., Kunyetz, R. A., Poulin, Y., Rosoph, L. A., Stingl, G., Bauer, W. M., Salter, J. M., Falk, T. M., Blödorn-Schlicht, N. A., Hueber, W., Sommer, U., Schumacher, M. M., Peters, T., Kriehuber, E., Lee, D. M., Wieczorek, G. A., Kolbinger, F., Bleul, C. C. (2015). Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Experimental dermatology*, *24*(7), 529–535. <https://doi.org/10.1111/exd.12710>

331. Chen, Y. S., Chen, I. B., Pham, G., Shao, T. Y., Bangar, H., Way, S. S., & Haslam, D. B. (2020). IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells protect against *Clostridium difficile* infection. *The Journal of clinical investigation*, *130*(5), 2377–2390. <https://doi.org/10.1172/JCI127242>
332. Me, R., Gao, N., Dai, C., & Yu, F. X. (2020). IL-17 Promotes *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in C57BL/6 Mouse Corneas. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *204*(1), 169–179. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900736>
333. Yang, X. O., Chang, S. H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y. H., Schluns, K. S., Broaddus, R. R., Zhu, Z., & Dong, C. (2008). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *The Journal of experimental medicine*, *205*(5), 1063–1075. <https://doi.org/10.1084/jem.20071978>
334. Bosmann, M., Patel, V. R., Russkamp, N. F., Pache, F., Zetoune, F. S., Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). MyD88-dependent production of IL-17F is modulated by the anaphylatoxin C5a via the Akt signaling pathway. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *25*(12), 4222–4232. <https://doi.org/10.1096/fj.11-191205>
335. Liang, S. C., Long, A. J., Bennett, F., Whitters, M. J., Karim, R., Collins, M., Goldman, S. J., Dunussi-Joannopoulos, K., Williams, C. M., Wright, J. F., & Fouser, L. A. (2007). An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *179*(11), 7791–7799. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7791>
336. Kuestner, R. E., Taft, D. W., Haran, A., Brandt, C. S., Brender, T., Lum, K., Harder, B., Okada, S., Ostrand, C. D., Kreindler, J. L., Aujla, S. J., Reardon, B., Moore, M., Shea, P., Schreckhise, R., Bukowski, T. R., Presnell, S., Guerra-Lewis, P., Parrish-Novak, J., Ellsworth, J. L., ... Levin, S. D. (2007). Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(8), 5462–5473. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5462>
337. Li, J., Casanova, J. L., & Puel, A. (2018). Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal immunology*, *11*(3), 581–589. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.97>
338. Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., Gumbleton, M., Toulon, A., Bodemer, C., El-Baghdadi, J., Whitters, M., Paradis, T., Brooks, J., Collins, M., Wolfman, N. M., Al-Muhsen, S., ... Casanova, J. L. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6025), 65–68. <https://doi.org/10.1126/science.1200439>
339. Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(3), 119. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>
340. García-Garmendia, J. L., Ortiz-Leyba, C., Garnacho-Montero, J., Jiménez-Jiménez, F. J., Pérez-Paredes, C., Barrero-Almodóvar, A. E., & Gili-Miner, M. (2001). Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *33*(7), 939–946. <https://doi.org/10.1086/322584>
341. Liu, A. R., Du, W. J., Xie, J. F., Xu, J. Y., Huang, Y. Z., Qiu, H. B., & Yang, Y. (2020). Role of immunodeficiency in *Acinetobacter baumannii* associated pneumonia in mice. *Chinese medical journal*, *133*(18), 2161–2169. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001027>
342. Harris, G., Holbein, B. E., Zhou, H., Xu, H. H., & Chen, W. (2019). Potential Mechanisms of Mucin-Enhanced *Acinetobacter baumannii* Virulence in the Mouse Model of Intraperitoneal Infection. *Infection and immunity*, *87*(11), e00591-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00591-19>

343. Harris, G., KuoLee, R., Xu, H. H., & Chen, W. (2017). Mouse Models of *Acinetobacter baumannii* Infection. *Current protocols in microbiology*, 46, 6G.3.1–6G.3.23. <https://doi.org/10.1002/cpmc.36>
344. Ragetly, G. R., Bennett, R. A., & Ragetly, C. A. (2011). Septic peritonitis: etiology, pathophysiology, and diagnosis. *Compendium (Yardley, PA)*, 33(10), E1–E7.
345. Kirby BM. Peritoneum and peritoneal cavity. In: Slatter D, ed. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Science; 2003:414-445.
346. Easmon, C. S., & Glynn, A. A. (1976). Comparison of subcutaneous and intraperitoneal staphylococcal infections in normal and complement-deficient mice. *Infection and immunity*, 13(2), 399–406. <https://doi.org/10.1128/iai.13.2.399-406.1976>
347. Gaydos, J. M., Carrick, L., Jr, & Berk, R. S. (1975). Experimental studies on mice challenged subcutaneously with *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 149(4), 908–914. <https://doi.org/10.3181/00379727-149-38925>
348. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
349. Salmon, J. K., Armstrong, C. A., & Ansel, J. C. (1994). The skin as an immune organ. *The Western journal of medicine*, 160(2), 146–152.
350. Crowe, C. R., Chen, K., Pociask, D. A., Alcorn, J. F., Krivich, C., Enelow, R. I., Ross, T. M., Witztum, J. L., & Kolls, J. K. (2009). Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(8), 5301–5310. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900995>
351. Jung, B. G., Samten, B., Dean, K., Wallace, R. J., Jr, Brown-Elliott, B. A., Tucker, T., Idell, S., Phillely, J. V., & Vankayalapati, R. (2022). Early IL-17A production helps establish *Mycobacterium intracellulare* infection in mice. *PLoS pathogens*, 18(4), e1010454. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010454>
352. Javadzadeh, Y., Bahari, LA. (2017). Therapeutic Nanostructures for Dermal and Transdermal Drug Delivery. En Grumezescu, AM. *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. (2017). (pp. 131-146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00008-X>.
353. Ellis, S., & Ong, E. (2015). Disseminated Infections: A Clinical Overview. *Molecular Medical Microbiology*, 637–653. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00036-6>
354. MacLeod, A. S., Hemmers, S., Garijo, O., Chabod, M., Mowen, K., Witherden, D. A., & Havran, W. L. (2013). Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *The Journal of clinical investigation*, 123(10), 4364–4374. <https://doi.org/10.1172/JCI70064>
355. Takagi, N., Kawakami, K., Kanno, E., Tanno, H., Takeda, A., Ishii, K., Imai, Y., Iwakura, Y., & Tachi, M. (2017). IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin. *Experimental dermatology*, 26(2), 137–144. <https://doi.org/10.1111/exd.13115>
356. Li, Y., Wang, Y., Zhou, L., Liu, M., Liang, G., Yan, R., Jiang, Y., Hao, J., Zhang, X., Hu, X., Huang, Y., Wang, R., Yin, Z., Wu, J., Luo, G., & He, W. (2018). V γ 4 T Cells Inhibit the Pro-healing Functions of Dendritic Epidermal T Cells to Delay Skin Wound Closure Through IL-17A. *Frontiers in immunology*, 9, 240. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00240>
357. Hadian, Y., Bagood, M. D., Dahle, S. E., Sood, A., & Isseroff, R. R. (2019). Interleukin-17: Potential Target for Chronic Wounds. *Mediators of inflammation*, 2019, 1297675. <https://doi.org/10.1155/2019/1297675>
358. Simonetti, O., Lucarini, G., Morrioni, G., Orlando, F., Lazzarini, R., Zizzi, A., Brescini, L., Provinciali, M., Giacometti, A., Offidani, A., & Cirioni, O. (2020). New Evidence and Insights on

- Dalbavancin and Wound Healing in a Mouse Model of Skin Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(4), e02062-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02062-19>
- 359.Chvapil, M., Speer, D. P., Owen, J. A., & Chvapil, T. A. (1984). Identification of the depth of burn injury by collagen stainability. *Plastic and reconstructive surgery*, 73(3), 438–441. <https://doi.org/10.1097/00006534-198403000-00018>
- 360.McConnell, M. J., & Martín-Galiano, A. J. (2021). Designing Multi-Antigen Vaccines Against *Acinetobacter baumannii* Using Systemic Approaches. *Frontiers in immunology*, 12, 666742. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666742>
- 361.Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature reviews. Microbiology*, 16(2), 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
- 362.Wijers, C., Pham, L., Menon, S., Boyd, K. L., Noel, H. R., Skaar, E. P., Gaddy, J. A., Palmer, L. D., & Noto, M. J. (2021). Identification of Two Variants of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 17978 with Distinct Genotypes and Phenotypes. *Infection and immunity*, 89(12), e0045421. <https://doi.org/10.1128/IAI.00454-21>
- 363.Kwon, S. O., Gho, Y. S., Lee, J. C., & Kim, S. I. (2009). Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS microbiology letters*, 297(2), 150–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x>
- 364.Rumbo, C., Tomás, M., Fernández Moreira, E., Soares, N. C., Carvajal, M., Santillana, E., Beceiro, A., Romero, A., & Bou, G. (2014). The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infection and immunity*, 82(11), 4666–4680. <https://doi.org/10.1128/IAI.02034-14>
- 365.Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. K., & Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular microbiology*, 7(8), 1127–1138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x>
- 366.Sanders E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: volume transfers with serological pipettes and micropipettors. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), 2754. <https://doi.org/10.3791/2754>
- 367.Wang, N., Strugnell, R., Wijburg, O., & Brodnicki, T. (2011). Measuring bacterial load and immune responses in mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (54), 3076. <https://doi.org/10.3791/3076>
- 368.Alsan, M., & Klompas, M. (2010). *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. *Journal of clinical outcomes management : JCOM*, 17(8), 363–369.
- 369.Percival, S. L., & Williams D. W. (2014) *Acinetobacter*. In Percival, S. L., Yates, M. V., Williams, D. W., Chalmers, R., & Gray, N. F. (Ed.) *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*. 35-48. Elsevier Ltd.
- 370.Ciftci AY, Karakece E, Atasoy AR, Asik, G, & Ciftci, IH. Culture media for detection of *Acinetobacter baumannii* selective media for detection of A *baumannii*. *J Microbiol Exp*. 2015;2(3):87-90. DOI: 10.15406/jmen.2015.02.00046
- 371.Sanders E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: plating methods. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
- 372.Mansfield, J. R., Hoyt, C. C., Miller, P. J., & Levenson, R. M. (2005). Distinguished photons: increased contrast with multispectral in vivo fluorescence imaging. *BioTechniques*, 39(6 Suppl), S33–S37. <https://doi.org/10.2144/000112093>

373. Chen, J., Lee, A., Zhao, J., Wang, H., Lui, H., McLean, D. I., & Zeng, H. (2009). Spectroscopic characterization and microscopic imaging of extracted and in situ cutaneous collagen and elastic tissue components under two-photon excitation. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 15(4), 418–426. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00381.x>
374. Myšková, J., Rybakova, O., Brynda, J., Khoroshyy, P., Bondar, A., & Lazar, J. (2020). Directionality of light absorption and emission in representative fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(51), 32395–32401. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017379117>
375. Holmberg-Thyden, S., Grønbaek, K., Gang, A. O., El Fassi, D., & Hadrup, S. R. (2021). A user's guide to multicolor flow cytometry panels for comprehensive immune profiling. *Analytical biochemistry*, 627, 114210. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114210>
376. Brooks, G P., Johanson, George A. (2011). Sample Size Considerations for Multiple Comparison Procedures in ANOVA. *Journal of Modern Applied Statistical Methods*. 10 (1). 10.22237/jmasm/1304222940 <http://digitalcommons.wayne.edu/jmasm/vol10/iss1/10>
377. Hagen, J., Zimmerman, R., Goetz, C., Bonnevier, J., Houchins, J. P., Reagan, K., & Kalyuzhny, A. E. (2015). Comparative Multi-Donor Study of IFN γ Secretion and Expression by Human PBMCs Using ELISPOT Side-by-Side with ELISA and Flow Cytometry Assays. *Cells*, 4(1), 84–95. <https://doi.org/10.3390/cells4010084>
378. Li, Z., Gothard, E., Coles, M. C., & Ambler, C. A. (2018). Quantitative Methods for Measuring Repair Rates and Innate-Immune Cell Responses in Wounded Mouse Skin. *Frontiers in immunology*, 9, 347. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00347>
379. Sakamoto, K., Goel, S., Funakoshi, A., Honda, T., & Nagao, K. (2021). Flow cytometry analysis of the subpopulations of mouse keratinocytes and skin immune cells. *STAR protocols*, 3(1), 101052. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101052>
380. Broggi, A., Cigni, C., Zanoni, I., & Granucci, F. (2016). Preparation of Single-cell Suspensions for Cytofluorimetric Analysis from Different Mouse Skin Regions. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (110), e52589. <https://doi.org/10.3791/52589>
381. Martins Cardoso, R., Absalah, S., Van Eck, M., & Bouwstra, J. A. (2020). Barrier lipid composition and response to plasma lipids: A direct comparison of mouse dorsal back and ear skin. *Experimental dermatology*, 29(6), 548–555. <https://doi.org/10.1111/exd.14106>
382. Bieber T, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med*. 1992; 175(5):1285–1290. [PubMed: 1533242]
383. Meixiong, J., Anderson, M., Limjunyawong, N., Sabbagh, M. F., Hu, E., Mack, M. R., Oetjen, L. K., Wang, F., Kim, B. S., & Dong, X. (2019). Activation of Mast-Cell-Expressed Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors Drives Non-Histaminergic Itch. *Immunity*, 50(5), 1163–1171.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.013>
384. Tong, P. L., Roediger, B., Kolesnikoff, N., Biro, M., Tay, S. S., Jain, R., Shaw, L. E., Grimbaldeston, M. A., & Weninger, W. (2015). The skin immune atlas: three-dimensional analysis of cutaneous leukocyte subsets by multiphoton microscopy. *The Journal of investigative dermatology*, 135(1), 84–93. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.289>
385. Ren, Y., Hua, L., Meng, X., Xiao, Y., Hao, X., Guo, S., Zhao, P., Wang, L., Dong, B., Yu, Y., & Wang, L. (2016). Correlation of Surface Toll-Like Receptor 9 Expression with IL-17 Production in Neutrophils during Septic Peritonitis in Mice Induced by *E. coli*. *Mediators of inflammation*, 2016, 3296307. <https://doi.org/10.1155/2016/3296307>
386. The Jackson Laboratory. C57BL/6-*II17a*^{tm1Bcgen}/J <https://www.jax.org/strain/018472>

387. de Felipe P. (2002). Polycistronic viral vectors. *Current gene therapy*, 2(3), 355–378. <https://doi.org/10.2174/1566523023347742>
388. Shen, C. R., Chen, Y. S., Hwang, Y. S., Chen, H. J., & Liu, C. L. (2021). Differential bicistronic gene translation mediated by the internal ribosome entry site element of encephalomyocarditis virus. *Biomedical journal*, 44(6 Suppl 1), S54–S62. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.06.006>
389. Jenson, H. B., Grant, G. M., Ench, Y., Heard, P., Thomas, C. A., Hilsenbeck, S. G., & Moyer, M. P. (1998). Immunofluorescence microscopy and flow cytometry characterization of chemical induction of latent Epstein-Barr virus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(1), 91–97. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.1.91-97.1998>
390. Roark, C. L., Huang, Y., Jin, N., Aydintug, M. K., Casper, T., Sun, D., Born, W. K., & O'Brien, R. L. (2013). A canonical V γ 4V δ 4+ $\gamma\delta$ T cell population with distinct stimulation requirements which promotes the Th17 response. *Immunologic research*, 55(1-3), 217–230. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8364-9>
391. Kim, M. H., Jin, S. P., Jang, S., Choi, J. Y., Chung, D. H., Lee, D. H., Kim, K. H., & Kim, H. Y. (2020). IL-17A-Producing Innate Lymphoid Cells Promote Skin Inflammation by Inducing IL-33-Driven Type 2 Immune Responses. *The Journal of investigative dermatology*, 140(4), 827–837.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.447>
392. Furue, M., Furue, K., Tsuji, G., & Nakahara, T. (2020). Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1275. <https://doi.org/10.3390/ijms21041275>
393. Qiu, H., Kuolee, R., Harris, G., & Chen, W. (2009). Role of NADPH phagocyte oxidase in host defense against acute respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in mice. *Infection and immunity*, 77(3), 1015–1021. <https://doi.org/10.1128/IAI.01029-08>
394. Kamoshida, G., Kikuchi-Ueda, T., Tansho-Nagakawa, S., Nakano, R., Nakano, A., Kikuchi, H., Ubagai, T., & Ono, Y. (2015). *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 21(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.032>
395. Geering, B., & Simon, H. U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell death and differentiation*, 18(9), 1457–1469. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.75>
396. Sato, Y., Unno, Y., Miyazaki, C., Ubagai, T., & Ono, Y. (2019). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* resists reactive oxygen species and survives in macrophages. *Scientific reports*, 9(1), 17462. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53846-3>
397. Kang, M. J., Jang, A. R., Park, J. Y., Ahn, J. H., Lee, T. S., Kim, D. Y., Jung, D. H., Song, E. J., Hong, J. J., & Park, J. H. (2020). Cathelicidin-related Antimicrobial Peptide Contributes to Host Immune Responses Against Pulmonary Infection with *Acinetobacter baumannii* in Mice. *Immune network*, 20(3), e25. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e25>
398. Girardi, M., Lewis, J., Glusac, E., Filler, R. B., Geng, L., Hayday, A. C., & Tigelaar, R. E. (2002). Resident skin-specific $\gamma\delta$ T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 195(7), 855–867. <https://doi.org/10.1084/jem.20012000>
399. Tsuchiya T, Nakao N, Yamamoto S, Hirai Y, Miyamoto K, Tsujibo H. (2012). NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Microbiol Immunol* 56:107–16. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00402.x
400. De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., & Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the

- early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, *121*(24), 4930–4937. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>
401. Archer, N. K., Adappa, N. D., Palmer, J. N., Cohen, N. A., Harro, J. M., Lee, S. K., Miller, L. S., & Shirliff, M. E. (2016). Interleukin-17A (IL-17A) and IL-17F Are Critical for Antimicrobial Peptide Production and Clearance of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Infection and immunity*, *84*(12), 3575–3583. <https://doi.org/10.1128/IAI.00596-16>
402. De Yang, Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., & Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of experimental medicine*, *192*(7), 1069–1074. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1069>
403. Oлару, F., & Jensen, L. E. (2010). *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil targeting chemokine expression in keratinocytes through an autocrine IL-1 α signaling loop. *The Journal of investigative dermatology*, *130*(7), 1866–1876. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.37>
404. Feng, X., Sambanthamoorthy, K., Palys, T., & Parnavitana, C. (2013). The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*, *49*, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.09.007>
405. McCulloch, T. R., Wells, T. J., & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. (2022). Towards efficient immunotherapy for bacterial infection. *Trends in microbiology*, *30*(2), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.05.005>
406. Lévy, R., Okada, S., Béziat, V., Moriya, K., Liu, C., Chai, L. Y., Migaud, M., Hauck, F., Al Ali, A., Cyrus, C., Vatte, C., Patiroglu, T., Unal, E., Ferneiny, M., Hyakuna, N., Nepesov, S., Oleastro, M., Ikinciogullari, A., Dogu, F., Asano, T., ... Puel, A. (2016). Genetic, immunological, and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(51), E8277–E8285. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618300114>
407. Huppler, A. R., Bishu, S., & Gaffen, S. L. (2012). Mucocutaneous candidiasis: the IL-17 pathway and implications for targeted immunotherapy. *Arthritis research & therapy*, *14*(4), 217. <https://doi.org/10.1186/ar3893>
408. Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K., & Yoshikai, Y. (2007). Resident V δ 1+ γ T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(7), 4466–4472. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4466>
409. Murphy, A. G., O'Keefe, K. M., Lalor, S. J., Maher, B. M., Mills, K. H., & McLoughlin, R. M. (2014). *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory $\gamma\delta$ T cells that are protective against subsequent infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*(8), 3697–3708. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303420>
410. Misiak, A., Wilk, M. M., Raverdeau, M., & Mills, K. H. (2017). IL-17-Producing Innate and Pathogen-Specific Tissue Resident Memory $\gamma\delta$ T Cells Expand in the Lungs of *Bordetella pertussis*-Infected Mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *198*(1), 363–374. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160102>