



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Evaluación de la delección del gen *mmpL4b* de
Mycobacterium abscessus en cojinetes plantares”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

P R E S E N T A

BENDAÑA PIÑEIRO ARANZA ELIANE

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MATA ESPINOSA DULCE ADRIANA



Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Bendaña
Piñeiro
Aranza Eliane
0445532248716
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311123891

2. Datos del tutor

Doctora
Dulce Adriana
Mata
Espinosa

3. Datos del sinodal 1

Doctor
Jorge Antonio
García
Alvarez

4. Datos del sinodal 2

Doctor
Rogelio Enrique
Hernández
Pando

5. Datos del sinodal 3

Doctora
Edén Marcela
Rodríguez
Flores

6. Datos del sinodal 4

M. en IBB
Gustavo Jesús
Ortega
Lule

Agradecimientos

Agradezco de manera especial a la Dra. Dulce A. Mata Espinosa por su apoyo incondicional, dedicación, consejos, enseñanzas y paciencia a lo largo del proyecto. De igual forma le agradezco al Dr. Rogelio Hernández Pando por su asesoría continúa, enseñanzas, apoyo y confianza depositada en el trabajo y en mi persona. Gracias también al Dr. Jorge Barrios Payan, por sus sugerencias, lecciones y apoyo; y a la Dra. Brenda Marquina-Castillo por su asesoría.

Gracias a mis sinodales, quien amablemente me hicieron darme cuenta de aciertos y errores.

Al mismo tiempo, me gustaría agradecer enormemente a los integrantes del laboratorio de Patología experimental del INCMNSZ, quienes siempre me brindaron su apoyo, experiencias, consejos y simpatía, sin lo cual mi estancia hubiese sido diferente.

Por último quiero agradecer a la UNAM, mi alma máter, que me proporcionó todas las herramientas necesarias para desarrollarme de forma profesional y humana.

Dedicatoria

A mis padres, hermana, abuela, familia y amigos, por su amor incondicional, apoyo, consejos, paciencia, confianza; y sobre todo porque siempre han creído en mí y han puesto su mejor esfuerzo para ayudarme a alcanzar cada una de mis metas y sueños más locos.

Honoríficamente quisiera dedicar esto a todos los ratones cuyas vidas fueron tomadas para el progreso científico.



Nos detuvimos en busca de monstruos debajo de la cama cuando nos dimos cuenta de que estaban dentro de nosotros.- Charles R. Darwin

YOU

Índice de figuras

- Figura 1 Filogenia del género *Mycobacterium* según la secuenciación con base en el gen 16S rRNA
- Figura 2 Componentes de la pared celular del género *Mycobacterium*
- Figura 3 Representación esquemática del árbol filogenético de *M. abscessus*.
- Figura 4 Cambios en la nomenclatura de *M. abscessus* de 1992 al 2013
- Figura 5 Distribución en 62 centros de salud en 30 países de *M. abscessus* en aislados de muestras pulmonares en 2008.
- Figura 6 Estructura básica de nsGPL.
- Figura 7 Colonia lisa
- Figura 8 Colonia rugosa.
- Figura 9 Vías de transmisión propuestas para *M. abscessus*.
- Figura 10 Estructura básica de los TLR
- Figura 11 Principales etapas de infección por *M. abscessus* en modelo de pez Zebra
- Figura 12 Estructura básica del Operón *mmpL* en *M. smegmatis*
- Figura 13. Análisis de PCR y esquema
- Figura 14 Análisis de Sotuthern blott del locus *mmpL4b* en *M. abscessus* WT (1) y mutante (2).
- Figura 15 Fenotipo de las cepas S, $\Delta mmpL4b$ y *mmpL4b* complementada y expresión de GLP vía TLC
- Figura 16 Prueba de sliding motility y formación de biofilm en las cepas de *M. abscessus* WT, mutante $\Delta mmpL4b$ y *mmpL4b* complementada
- Figura 17 ELISAS para TNF-alfa.
- Figura 18 Capacidad de replicación de *M. abscessus* en macrófagos derivados de monocitos (MDM).
- Figura 19 Principales descubrimientos en líneas celulares
- Figura 20. Proceso de inoculación
- Figura 21 Medición de los cojinetes plantares.
- Figura 21 Proceso de corte de cojinetes plantares
- Figura 22 Posición de diluciones

Índice de tabas

- Tabla 1 Clasificación de Ruyon de micobacterias atípicas.
- Tabla 2 Diferencias entre GLPs producidos por diferentes especies de micobacterias
- Tabla 3 Métodos de diagnóstico de *M. abscessus*.
- Tabla 4 Recomendaciones de tratamiento de acuerdo al tipo de patología.

Índice de abreviaturas

- A: adenina
- APC: Antigen Presentation Cells- Células Presentadoras de Antígeno
- Artf: acetiltransferasa
- C: citosina
- CMA: Complejo de *Mycobacterium abscessus*
- CT: Cystic Fibrosis- Fibrosis quística
- DC: Dendritic cells- Células Dendríticas
- DNA: Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxiribonucleico
- G: guanina
- GLP: Glicolipopéptido
- Gtf: glicosiltransferasa
- HGT: Horizontal Gene Transference- Trasmisión Horizontal de Genes
- HIV- Human immunodeficiency Virus- Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- IL- Interleucina
- LRR:Leucine Rich Repetitions Repetición Rica en Leucina
- MAC: *Mycobacterium avium* complex- Complejo de *Mycobacterium avium*
- MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight- Desorción / ionización láser asistida por matriz -Tiempo de vuelo
- MCL: Micobacterias de Crecimiento Lento
- MCR: Micobacterias de Crecimiento Rápido
- MmpL: Mycobacterial membrane protein Large- proteínas de membrana de micobacterias - Largas
- MmpS: Mycobacterial membrane protein Short- proteínas de membrana de micobacterias – Cortas
- Mtf: metiltransferasa
- nsGLP: non specific Glicolipopéptido- GLP no específicos
- NTM. Non Tuberculous Mycobacteria- Micobacterias no tuberculosas
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- Pb: pares de bases
- PBS: Phosphate Buffered Saline- tampón fosfato salino
- PIMS : Phosphatidylinositol mannosides- Manosidos de fosfatidilinositol
- R: Rough- rugosa
- RNA: Ribonucleic acid- Ácido ribonucleico

- S: Soft- lisa
- SLE: Systemic Lupus Erythematosus-eritematosus sistémico
- T: timina
- TB: Tuberculosis
- TDM: Trehalose Dimycolato-Dimicolato de Trealosa
- TLC: Thin Layer Chromatography-Cromatografía de capa fina
- TLR: Toll Like Receptor-Receptores tipo Toll
- TMM: Trehalose Monomycolate-Monomicolato de Trealosa
- TNF: Tumoral Necrosis Factor-Factor de necrosis tumoral
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- VMZ: Virus Varicela-Zóster
- WT: Wild Type- Cepa silvestre

Índice de contenido

Resumen

Capítulo I: Introducción

I. Introducción

1. Introducción
 - a. Género *Mycobacterium*
 - i. Características del género
 - b. Micobacterias atípicas
 - i. Características
 - ii. Clasificación
 - c. Micobacterias de crecimiento lento (MLC)
 - d. Micobacterias de crecimiento rápido (MCR)
2. *Mycobacterium abscessus* sensu lato o Complejo *Mycobacterium abscessus* (CMA)
 - a. Filogenia
 - b. Distribución
 - c. Epidemiología
 - d. Patogenia
 - i. Factores de riesgo
 - a) Dependientes del hospedero
 - b) Dependientes de la bacteria
 - c) Dependientes del ambiente
 - e. Características de *Mycobacterium abscessus*
 - i. Membrana celular
 - a) Estructura
 - ii. Morfología de colonias
 - a) Fenotipo S
 - b) Fenotipo R
 - c) Resistencia a drogas
3. Desarrollo de la enfermedad por *Mycobacterium abscessus*
 - a. Transmisión
 - b. Sistema inmune
 - i. Sistema inmune innato
 - ii. Sistema inmune adaptativo
4. Patologías
 - a. Piel
 - b. Post operatorias
 - c. Pulmonares
 - d. Diseminadas
 - e. Sistema Nervioso Central
 - f. Otras patologías
5. Diagnóstico y tratamiento
 - a. Diagnóstico

- b. Tratamiento

Capítulo II: Antecedentes

II. Antecedentes

1. Biosíntesis de GLPs
 - i. Biosíntesis filogenética comparativa
 - ii. Familia mmpS
 - iii. Familia mmpL
 1. mmpL4b
2. Antecedentes sobre la delección de mmpL4b
 1. *Delección de mmpL4B: Construcción de mutantes*
 - a. Comprobación de mutante
 - b. *Sliding motility*
 - c. Estimulación de macrófagos por TLR2
 - d. Replicación en macrófagos
 - ii. *Conclusiones del estudio*

Capítulo III: Modelo de estudio

III. Modelo

1. Modelos utilizados para el estudio de *Mycobacterium abscessus*
 - i. Modelos celulares
 - ii. Embriones de pez cebra
 - iii. Modelo murino
 - iv. *Drosophila*
 - v. Cerdos de Guinea
2. Descripción del modelo

Capítulo IV: Objetivos y planteamiento del problema

- IV. Objetivos
 1. General
 2. Particulares
- V. Justificación
- VI. Hipótesis

Capítulo V: Planteamiento experimental

- VII. Estrategia experimental
- VIII. Metodología
 1. Preparación de la bacteria para la infección
 2. Infección
 3. Medición indirecta de la inflamación de los cojinetes plantares
 4. Sacrificio
 5. UFC's

6. Histología
7. Análisis estadístico

Capítulo VI: Resultados

IX. Resultados

- a) Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias de los cojinetes plantares
- b) Inflamación de cojinetes plantares
 1. Comparación entre cepas lisas
 2. Comparación entre cepas rugosas
- c) Histología

Capítulo VI: Discusión

X. Discusión

- i. Perspectivas

Capítulo VII: Conclusión

XII. Conclusión

Referencias

Apéndice

1. Cepas

Resumen

Mycobacterium abscessus es una bacteria de crecimiento rápido considerada como patógena oportunista en humanos, que tiene la capacidad de generar infecciones puntuales en distintos órganos del cuerpo, así como infecciones diseminadas. Estas patologías son sumamente difíciles de tratar debido a la alta resistencia de estas bacterias a los tratamientos con fármacos. Si bien, los datos epidemiológicos son sumamente restringidos, se sabe que la tasa de infección de esta bacteria ha ido en aumento en los últimos años y además se indica que las infecciones más comunes en humanos son aquellas en la cual la infección se desarrolla vía subdérmica. Generalmente la mayoría de estas infecciones se contraen durante cirugías plásticas, al hacerse tatuajes o perforaciones, así como en inoculaciones accidentales.

En la actualidad hay muy poca investigación que utilice a *Mycobacterium abscessus* como modelo de la infección subdérmica, por lo que el estudio y por consiguiente control de la enfermedad no se ha sido dilucidado a fondo.

Por resultante este estudio tiene como objetivo recrear un modelo de infección subdérmica en cojinetes plantares de ratones BALB/c. Donde se evalúe la importancia del gen *mmpL4b* en la capacidad histopatogénica de *M. abscessus*, ya que se ha visto que la presencia de este gen está asociado a la producción de glicolipopéptidos (GLP), un conjunto de proteínas transmembranales cuya presencia en fenotipos lisos se ha visto que actúa como mecanismo de evasión de la bacteria al sistema inmune en ensayos *in vitro*, contrariamente a lo que se ha estudiado en las cepas rugosas carentes de la expresión de este gen.

En este estudio se utilizaron cinco cepas diferentes; T1 y T2 como las cepas silvestres lisa o y rugosa respectivamente, así como a las cepas T3 rugosa (con el gen *mmpL4b* eliminado), la cepa T4 lisa (complementada con el gen) y H37Rv (lisa) como control positivo.

Se concluye que tras la inoculación subcutánea de cepas de *M. abscessus* y *M. tuberculosis* (H37Rv), se genera una inflamación crónica extensa a pesar de carecer de carga bacilar, que se mantiene únicamente en el sitio de inoculación, Donde las cepas lisas T1 y T4 se comportan histopatológicamente de la misma manera, produciendo un área fibrótica extensa con infiltrado inflamatorio considerable; mientras que la cepa rugosa silvestre T2, genera un patrón contrario, elemento de acuerdo a lo propuesto en la hipótesis. Sin embargo, la cepa T3, a pesar de poseer una morfología rugosa, generó los niveles más bajos de infiltrado celular inflamatorio, así como de un área fibrótica mínima en comparación a las demás cepas. Estas evidencias sugieren que la presencia del gen *mmpL4b* de *M. abscessus* podría actuar de forma diferencial de acuerdo a la transcripción, siendo este un mecanismo de *M. abscessus* para evadir el reconocimiento de esta bacteria por el sistema inmune. Además, la presencia transcripcionalmente activa contribuye de forma significativa en la producción de fibrosis, la ausencia de la transcripción genera un mayor reconocimiento del sistema inmune, ocasionando un infiltrado celular inflamatorio exacerbado y producción menor de fibrosis.

Capítulo I

I. Introducción

1. Generalidades

a. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* se encuentra fenotípicamente relacionado con otros microorganismos pertenecientes a los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* (García y García; 2011). Actualmente, incluye más de 150 especies (Jhonson y Odell; 2014), las cuales pueden tener diversas relaciones ecológicas, como simbioses, saprófitos, parásitos obligados y parásitos oportunistas (Valdés y Sid; 2004). Adicionalmente, este género incluye a numerosas especies de importancia médica que han influido fuertemente en la morbilidad y mortalidad a lo largo de la historia humana. El ejemplo más ilustrativo corresponde al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, quien es el agente etiológico de la tuberculosis. Ésta ha generado diversas epidemias a nivel mundial, inclusive hoy en día, la OMS estima que un tercio de la población mundial está infectada por esta micobacteria (Saviola y Mishau; 2017).

El género *Mycobacterium*, de acuerdo a Lehmann and Neumann 1896 (Winslow et al., 1917) es clasificado de acuerdo de la siguiente manera:

- Dominio → Bacteria
 - Filo → Actinobacteria
 - Orden → Actinomycetales
 - Suborden → Corynebacterineae
 - Familia → Mycobacteriaceae
 - Género → *Mycobacterium*.

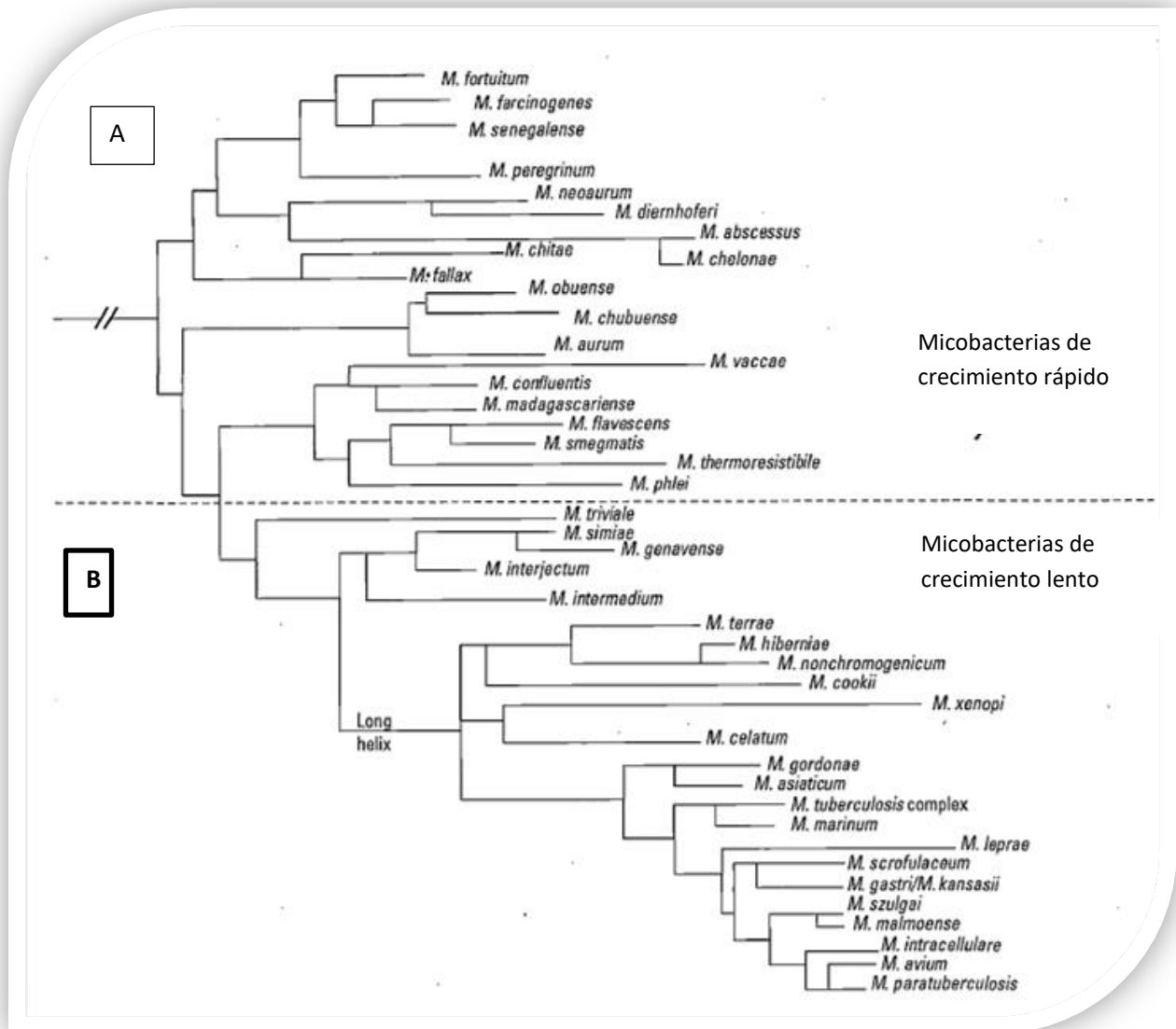


Figura 23 Filogenia del género *Mycobacterium* según la secuenciación con base en el gen 16S rRNA, tomado Rastogi et al., 2001. Esta clasificación muestra las relaciones filogenéticas existentes entre las especies que comprenden al género *Mycobacterium*. Se observa una separación entre micobacterias de crecimiento rápido (A) y especies de crecimiento lento (B)

Si bien, la filogenia del género *Mycobacterium* se basó inicialmente en las características fenotípicas, similitudes DNA-DNA y análisis de ácidos grasos por cromatografía, en la actualidad se utilizan técnicas de secuenciación basadas en la comparación de las secuencias del 16S rRNA (ver figura 1), que brindan una identificación bastante efectiva de las especies que comprenden en este género (García y García; 2011).

En 1882 Robert Koch aísla a *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. leprae*, agentes etiológicos de la TB y la lepra, las cuales en conjunto acapararon los estudios de las micobacterias. Sin embargo, con el paso del tiempo y con la innovación

biotecnológica, se comenzaron a aislar otros tipos de micobacterias del ambiente, que aparentemente no eran consideradas patógenas para el humano. Tras estos hallazgos, varios investigadores coincidieron que era necesario distinguirlas de las micobacterias que generaban lesiones tuberculosas (Ingen et al., 2009). Esto marcó el punto de referencia con respecto a la distinción entre micobacterias típicas y atípicas (o no tuberculosas) (Ortegón et al., 1996).

i. Características del género

Generalmente las micobacterias poseen un metabolismo de tipo aerobio, no presentan movimiento flagelar (son inmóviles), conforma de bacilo curvado en los extremos, tienen un tamaño que oscila de 0.2 a 0.6 micrómetros de longitud (Jorgensen et al; 2015). Dentro de las particularidades que identifican a este género, una de las más relevantes corresponde a la composición morfológica de su membrana celular. Esta posee un alto contenido de G+C en el DNA, que llega a ser cercano al 70% (a excepción de *M. leprae* con 55%). (Jorgensen et al; 2015).

La morfología de las colonias varía de acuerdo a la especie en cuestión, pero el rango va de liso (S) a rugoso (R). También producen (o no) pigmentos que van de amarillo a rojo. Adicionalmente algunas son fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas (Jorgensen et al; 2015).

Estas bacterias son consideradas de tipo Gram-positivas con propiedades de ácido alcohol resistencia, propiciadas por las cualidades específicas de su singular membrana celular (ver figura 2). La composición de ésta, es dominada por la presencia de péptidoglicolípidos, quienes contienen ácido glutámico, alanina, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa, entre otros (Jorgensen et al; 2015). Entre sus otros componentes hay ácidos micólicos y lípidos libres conforman una membrana sumamente hidrofóbica poco permeable (Jorgensen et al; 2015). Esta cualidad le confiere resistencia y protección a numerosos agentes biológicos, químicos y físicos. La resistencia a antibióticos por parte de las micobacterias atípicas, se debe en parte a que tienen una estructura única en la membrana que bloquea su efecto. También permite la sobrevivencia en células fagocíticas y el cambio rápido en la expresión génica (Hall y Lappin; 1998).

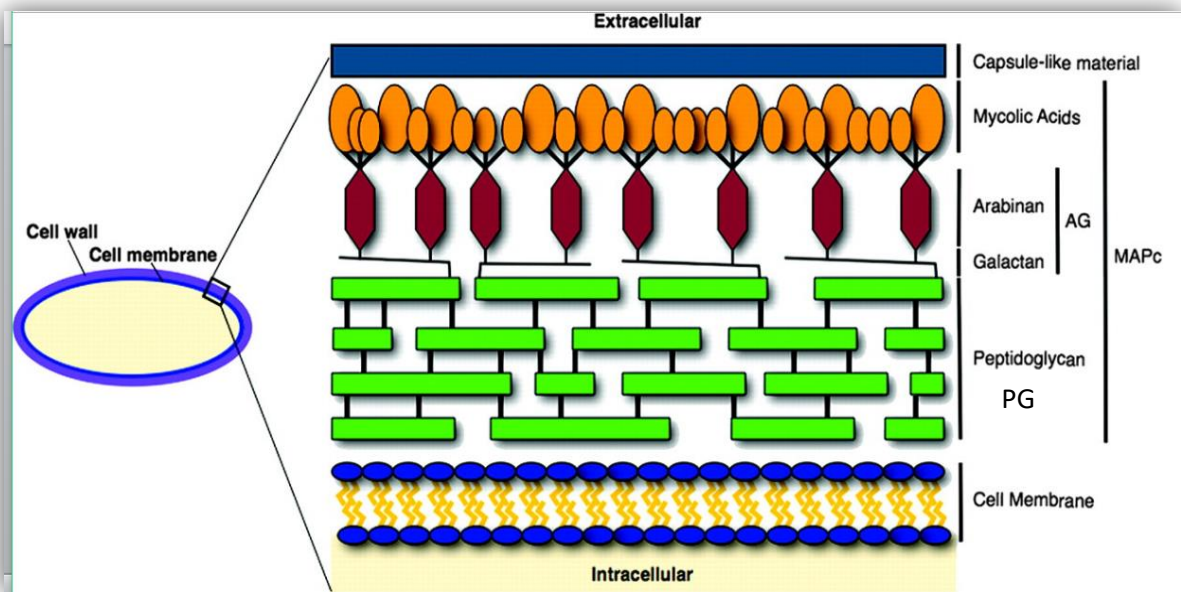


Figura 24 Componentes de la pared celular del género *Mycobacterium*. Tomado de Hett y Rubin., 2011. En esta imagen se puede observar el arreglo espacial de los componentes básicos de la membrana celular de las micobacterias, peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos unidos al complejo PG-AG.

b. Micobacterias atípicas
i. Características

Particularmente, las micobacterias atípicas (también llamadas no tuberculosas), pueden crecer en un amplio intervalo de temperaturas, niveles de pH, de salinidad y de tensión de oxígeno, e inclusive tienen la capacidad de resistir a metales pesados y oxianiones. En conjunto esto propicia que puedan ser encontradas en una diversidad de ecosistemas (Falkinham III; 1996), como es el caso de ecosistemas acuáticos, mixtos y terrestres. Pueden hallarse en agua, suelo, comida, polvo y diversidad de aerosoles (Le et al., 2002).

Las micobacterias atípicas incluyen a saprófitos, comensales, simbioses y patógenos oportunistas (Medjahed et al., 2009). Actualmente existe un aumento en la incidencia de micobacterias atípicas que son patógenos oportunistas (Valdés y Sid; 2004). Estas llegan a infectar al humano, y causar una gran diversidad de patologías (Le et al., 2002), difíciles de diagnosticar y tratar (Ingen et al., 2009) como es el caso de *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, entre otras (Falkinham III; 1996).

Al igual que las micobacterias que causan tuberculosis, presentan metabolismo aerobio, son móviles y ácido-alcohol resistentes. De forma particular, cuenta con una membrana celular rica en lípidos sumamente hidrofóbica muy poco permeable y considerablemente más gruesa que otras bacterias típicas y atípicas dentro del

mismo género, lo que les brinda una importante resistencia a antibióticos (Hall y Lappin; 1998).

ii. Clasificación

Tras su separación de las micobacterias típicas, los estudiosos se refirieron a ellas con diversos nombres. Muller las denominó “bacilos pseudotuberculosos”, Pinner les llamó “bacilo paratuberculoso” y Timple y Ruyon las designaron “micobacterias atípicas” el cual es el nombre más conocido. También han recibido otras denominaciones como “micobacterias comensales”, “saprofitas” o “seudotuberculosas”, aunque aún no se llega a un consenso para referirse a ellas (Valdés y Cid; 2004).

La primera clasificación no natural de las micobacterias atípicas fue la que realizó Ruyon en 1957. Él las catalogó en cuatro grupos de acuerdo al tiempo de crecimiento y al tipo de producción de pigmento (ver Tabla 1). El primer grupo corresponde a las bacterias fotocromógenas, que son de crecimiento lento (mayor a 7 días) con pigmentación amarilla-roja cuando son expuestas a la luz. El segundo grupo son las escotocromógenas, que son de crecimiento lento y producen pigmento en ausencia de luz. El tercer grupo es el no cromógeno de crecimiento lento; y el último grupo es el de crecimiento rápido (menor a 7 días) con bacterias que pueden ser tanto foto, escoto y no cromógenas (Ortegón et al., 1996).

Grupo	Especie
Grupo I Fotocromógenas de crecimiento lento	<i>M. marinum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. simiae</i>
Grupo II Escotocromógenas de crecimiento lento	<i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i>
Grupo III No cromógenas de crecimiento lento	<i>M. avium</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. intracellulare</i>
Grupo IV Crecimiento rápido	<i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i>

Tabla 2 Clasificación de Ruyon de micobacterias atípicas. Modificado de Ortegón et al; 1996. Esta tabla ejemplifica a las bacterias correspondientes a cada grupo de micobacterias atípicas.

c. Micobacterias de crecimiento lento (MCL)

Se consideran micobacterias de crecimiento lento a aquellas que tardan más de 7 días en ser observables en cajas Petri con morfologías lisas o rugosas (Medjahed et al., 2009) o con una tasa de división celular mayor a 20 horas. Dentro de esta clasificación encontramos a especies como *M. avium*, *Mycobacterium*

intracellulare, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium malmoense*, entre otras.

Estas bacterias difieren de las de crecimiento rápido debido a cambios intrínsecos (genéticos, metabólicos y estructurales) y extrínsecos (estímulos físicos, químicos y biológicos) que ocasionan una menor velocidad de crecimiento de estas bacterias (Hett y Rubin; 2008).

Algunas MCL tienen la capacidad de producir agentes como proteínas, pigmentos, o polisacáridos, que funcionan como antagonistas de los antibióticos, confiriéndoles de esta manera una forma de protección ante la quimioterapia (Falkinham III; 1996).

d. Micobacterias de crecimiento rápido (MCR)

Las micobacterias de crecimiento rápido se caracterizan por ser visibles en cajas Petri en menos de 7 días. Algunas de las especies más relevantes de este género son: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, entre otras.

Existen ciertos tipos de MCR capaces de estimular el crecimiento bacteriano por medio de metabolizar y transformar diversos sustratos de forma rápida. Algunos de estos sustratos son contaminantes ambientales, productos de la ignición de combustibles fósiles y actividad volcánica, que pueden tener efectos mutagénicos, carcinogénicos sobre otros organismos, otros sustratos son: la acetona, alcanos, bencenos, fenoles, dioxano, etileno, nitropireno, ácidos fúlvicos y húmicos, morfolina, parafina, hidrocarburos aromáticos policíclicos, propano, pireno, entre otros (Falkinham III; 1996). Por lo que de esta manera, se examina que un prometedor potencial biotecnológico importante en cuanto a la reducción de la contaminación ambiental (Ingen et al., 2009).

Recientemente, las MCR han recibido atención especial, debido a que poseen una alta resistencia a antibióticos y pueden generar diversas patologías en el humano cuya incidencia ha aumentado significativamente durante los últimos años, ocasionando así efectos que pueden llegar a ser muy graves en varios tipos de pacientes (Ingen et al., 2009).

2. Mycobacterium abscessus sensu lato o complejo Mycobacterium abscessus (CMA)

a. Filogenia

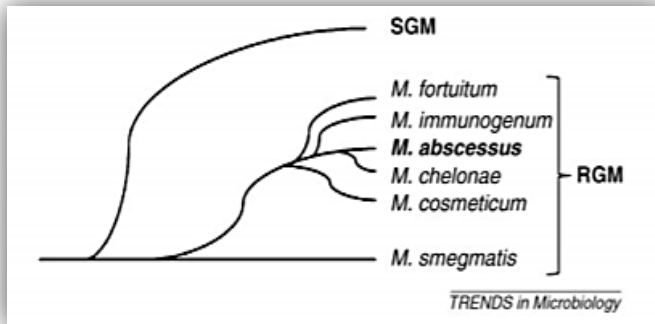


Figura 25 Representación esquemática del árbol filogenético de *M. abscessus*. Tomado de Medjahed et al., 2009

La filogenia en general de las micobacterias atípicas es compleja y ha tenido una serie de modificaciones a lo largo del tiempo. El caso de *M. abscessus* no es la excepción. En el árbol filogenético (Ver figura 3) se puede observar que *M. abscessus* se encuentra en el grupo de las micobacterias de crecimiento rápido y que está emparentado más cercanamente a *M. chelonae*.

Esta micobacteria fue aislada en 1953 por Moore y Frerichs (Cortes et al., 2010) de un absceso subcutáneo de rodilla (Lee et al., 2015), sin embargo anteriormente *M. abscessus* era clasificada como parte del complejo de *M. chelonae* (Ortegón et al., 1996).

Posteriormente en 1992 se reclasifica a *M. abscessus* como especie independiente y se descubren las subespecies (Lee et al., 2015). Además se reconoce como patógeno oportunista del humano responsable de un amplio espectro de patologías (Nessar et al., 2012).

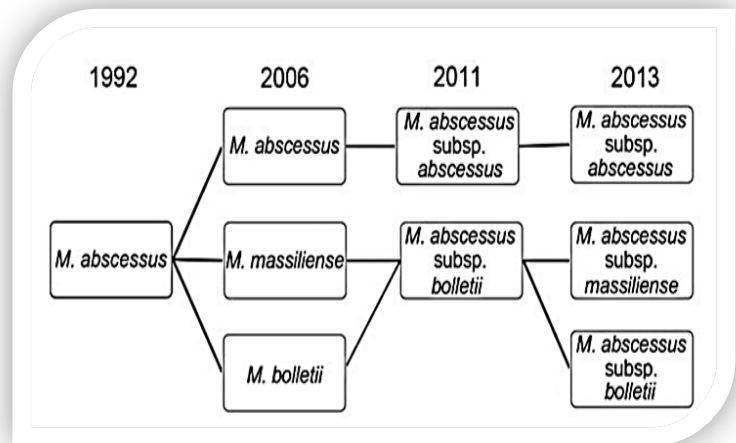


Figura 26 Cambios en la nomenclatura de *M. abscessus* de 1992 al 2013. Recuperado de Lee et al., 2015

Tras la secuenciación del genoma en 2009 por Ripoll et al., en 2009, se ha analizado que existe recombinación homóloga y transferencia horizontal de genes (HGT) entre las diferentes micobacterias atípicas y otros tipos de bacterias; por medio de la cual se adicionan genes (también llamados genes accesorios (Miranda-CasoLuengo et al., 2016) que permiten sobrevivir en diferentes nichos y que impactan en la patogenicidad de la micobacteria (Sapriel et al., 2016). Se encontró que tiene genes muy conservados con *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*

(Deshayes et al; 2010) y algunos compartidos con *Streptomyces* y *Pseudomonas*, que de igual manera sugiere HGT con *M. marinum* (Medjahed et al., 2009).

Actualmente el complejo CMA incluye a un grupo de micobacterias de crecimiento rápido, multidrogorresistentes, patógenas oportunistas, responsables de varias afecciones, donde se reconocen 3 subespecies *M. abscessus abscessus*, *M. abscessus masiliense* y *M. abscessus bolleti* (Lee et al., 2015), con base en su secuencia *rpoB* (Nessar et al., 2012) y por los patrones de expresión del gen *erm* que da resistencia a macrólidos (Nash et al; 2009).

Adicionalmente cabe recalcar que otro de los problemas con la filogenia de este complejo está implícito en la complejidad del genoma (Miranda-CasoLuengo et al., 2016) y el mosaísmo génico que presenta, ya que tiene implicaciones en la evolución y epidemiología, como se puede observar en la figura 4, se han generado varios cambios en la nomenclatura (Sapriel et al., 2016), de lo cual, aún se siguen discutiendo y estudiando.

b. Distribución

La fisiología bacteriana es un determinante para su ecología y distribución geográfica (Falkinham III; 1996). La membrana hidrofóbica que los caracteriza ayuda a la micobacteria a sobrevivir en ambientes sumamente hostiles y bajo un amplio rango de estrés (como es el caso de la desecación y exposición a antibióticos), lo cual les da la facultad de colonizar una variedad de nichos (Medjahed et al., 2009). Debido a este suceso, la distribución de estas se considera cosmopolita (Ingen et al., 2009), lo cual aumenta potencialmente las probabilidades de que cause enfermedad.

Existen diversos estudios a nivel mundial que indican la presencia de MCR en nichos cuya composición es variable, como es el caso de cuerpos de agua dulce o salada (fuentes naturales como océano, lagos, ríos, agua subterránea; así como artificiales, por ejemplo: tuberías, cisternas, depósitos), así como distintos tipos de suelo (Ingen et al., 2009).

En condiciones de laboratorio, es cultivable en medios líquidos y sólidos preferentemente en Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 adicionados con OADC y glicerol, aunque también puede cultivarse en medio LB, M63, M9, Sauton y Mueller-Hinton (Cortes et al., 2010). Tras la inoculación, esta bacteria forma colonias en un promedio de 3 a 5 días a una temperatura ideal de 28° C a 37 °C (Cortes et al., 2010). Tiene la tendencia de formar largos agregados en cultivos líquidos y en sólidos se identifican colonias con morfologías distintas. Se recomienda el uso de Tween 80 para reducir la conglomeración y evitar

contaminación; ya que la presencia de este detergente inhibe el crecimiento de otras bacterias en el medio (Cortes et al., 2010).

En suma, son pocos los estudios epidemiológicos realizados a la fecha. Sin embargo, en el mapa de la figura 5, se puede observar que existen mínimos reportes sobre esta micobacteria atípica, por lo que la distribución real permanece desconocida. En el caso de *M. abscessus*, se puede relacionar a que la mayor incidencia de infecciones ocasionadas, fue en países del oeste de Europa como en el Reino de los Países Bajos y en Oceanía, esto puede ser debido a que en estos lugares, se han realizado la mayoría de investigaciones con esta micobacteria.

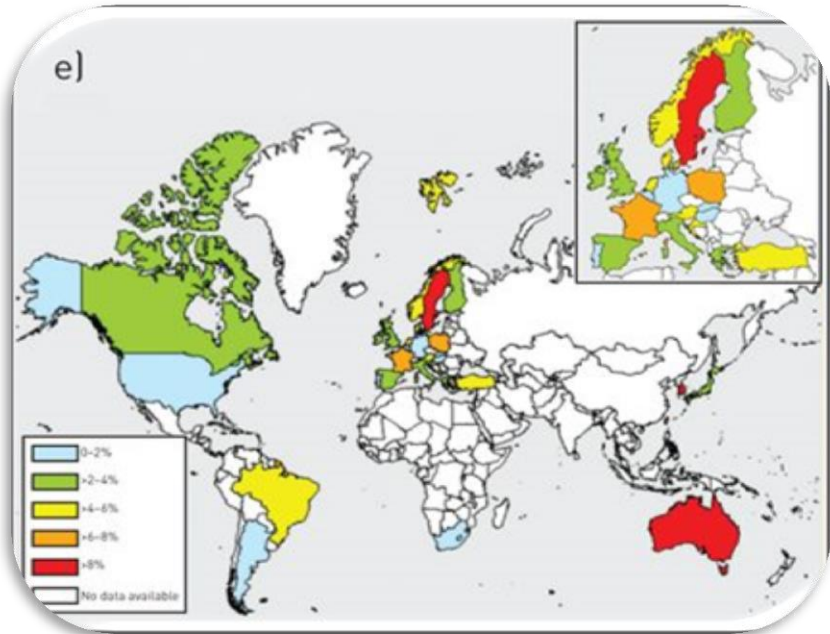


Figura 27 Distribución en 62 centros de salud en 30 países de *M. abscessus* en aislados de muestras pulmonares en 2008. Tomado y modificado de Hoefsloot, et al., 2013. En azul se muestra a los países cuya incidencia es del 0-2%, en verde del 2-4%, en amarillo 4-6%, en naranja de 6-8%, en rojo más del 8% y finalmente en blanco, los países sin datos disponibles.

c. Epidemiología

La epidemiología de estas micobacterias es complicada, debido a que los casos clínicos no son obligados a reportarse o se tienen bases de datos concretas sobre los casos válidos (Valdés y Sid; 2004), por ende no hay mapas epidemiológicos concretos que realice la Organización Mundial de la Salud. Asimismo, anteriormente eran poco estudiadas por ser consideradas como no patógenas para el hombre, por lo que la información es limitada. En suma, existía un dominio de estudio de las micobacterias típicas de gran importancia médica como la tuberculosis y lepra (Ortegón et al., 1996), lo que lleva a que muchos grupos de investigación sólo se dediquen al estudio de estas micobacterias. Sin embargo, el aumento de la eficiencia de los laboratorios para aislar, identificar y crecer a este tipo de bacterias, junto con el aumento del número de individuos inmunosuprimidos (a causa de la epidemia del SIDA principalmente), así como la sobrevida de individuos con enfermedades debilitantes (como cáncer, diabetes, transplantes, afecciones inmunes, y cirugías y procesos estéticos), han ocasionado que el

número de casos donde *M. abscessus* es el agente etiológico aumente en su incidencia (Crespo et al., 1997).

De los datos epidemiológicos a gran escala publicados, se tiene que para el año 2015 en EUA, las infecciones causadas por *M. abscessus-M. chelonae* eran solamente secundarias a las infecciones causadas por el complejo MAC de *M. avium*, donde la prevalencia de *M. abscessus-M. chelonae* es menor a 1 en 100,000 personas pero ha ido en aumento (Lee et al., 2015). Adicionalmente en el este de Asia es muy prevalente, particularmente en Taiwan donde 17.2% de todos los aislados clínicos de bacterias atípicas corresponden a *M. abscessus-M. chelonae*, que corresponde a 1.7 casos por cada 100,000 habitantes (Lee et al., 2015). En el caso de México, no se tiene un registro detallado sobre los datos epidemiológicos causados por esta bacteria.

d. Patogenia

i. Factores de riesgo

a) Dependientes del hospedero

La exposición ante estas micobacterias es inevitable; sin embargo, personas que están constantemente en contacto con agua o suelos contaminados, uso de equipo médico y material de cirugía, plantas o animales (Falkinham III; 1996) poseen un mayor riesgo de infectarse.

La mayor tendencia a desarrollar infección cutánea son aquellas personas que trabajan expuestos a estos ambientes naturales de la bacteria, como son los trabajos de jardinería, agricultura, pescadería, plomería (entre otros), o que se inyectan con frecuencia, incluyendo vacunas y drogas, anestésicos locales, insulina, penicilina, histamina, etcétera, que pueden servir como vehículos para la infección (Ortegón et al., 1996). Por otro lado se incrementa el riesgo al llevarse a cabo procesos estéticos como es el caso de mesoterapia cosmética (del Solar et al., 2005), acupuntura (Rizzo et al., 2013), tatuajes (Pereira et al., 2015), laparoscopia y piercing (Cortes et al; 2011)

Otros factores de riesgos directos del hospedero a padecer enfermedad pulmonar, yacen en la susceptibilidad de infección dado estado inmune, tabaquismo, (Ortegón et al., 1996), alcoholismo (Falkinham III; 2009) o a afecciones crónicas como es el caso de la fibrosis quística, bronquiostasis y vómito crónico (Falkinham III; 1996), así como enfermedades pulmonares previas como es el caso de tuberculosis, alteraciones en la arquitectura del pecho y mutaciones asociadas a enfermedades pulmonares (Falkinham III; 2009).

En el caso de las infecciones diseminadas, aumenta el riesgo de infección en personas con traumas o cirugías recientes, como mamoplastía de aumento,

esternotomía medial, catéter percutáneo, laminectomía, varicetomía, dilataciones uretrales y rinoplastia (Ortegón et al., 1996); así como en personas con trasplantes, enfermedades vasculares, terapia con corticoesteroides, falla renal crónica, cáncer (Falkinham III; 2009) y estado inmune (inmunocomprometidos e inmunodeprimidos) (Falkinham III; 1996).

A su vez en los últimos años se ha demostrado una asociación entre infección con *M. abscessus* y pacientes con HIV, SLE y diabetes mellitus, así como en pacientes sanos con autoanticuerpos de INF- γ , defecto genético en la vía genética Th1 (Phoompoung et al; 2017), que a su vez también se presenta en infecciones causadas por Salmonelosis notifoidal, otras NTM, VZV, infecciones fúngicas y melioidosis.

b) Dependientes de la bacteria

Los factores de virulencia de la bacteria incluyen el tipo de cepa, el tipo de colonia (R/S), capacidad de prevención de la acidificación de las vesículas fagocíticas y de la fusión con el lisosoma, resistencia a constituyentes inhibitorios del suero, respuesta de citocinas, habilidad de reclutamiento, interacción y replicación en células accesorias (Falkinham III; 1996).

c) Dependientes del ambiente

La temperatura, hidratación, pH, incidencia ultravioleta, presencia de minerales, vegetación y reservorios animales. (Ortegón et al., 1996).

e. Características de Mycobacterium abscessus

M. abscessus es una micobacteria de crecimiento rápido, no flagelada (Cortes et al., 2010), considerada como Gram-positiva en forma de bacilo curvada ligeramente en las extremidades (Cortes et al., 2010), no cromógena, que posee propiedades de ácido-alcohol resistencia (Ortegón et al., 1996). Mide de 1 a 0.6 micrómetros de largo y de 0.2 a 0.5 micrómetros de ancho (Cortes et al., 2010). En los cultivos se pueden distinguir colonias que presentan morfologías lisas y rugosas con un color blanco grisáceo (Ortegón et al., 1996). Además esta bacteria tiene un genoma con un tamaño aproximado de 5 Mb con un alto contenido de G+C (64.1%), 81 Kb de longitud total de profago y 5 elementos IS (secuencias de inserción). Además posee un plásmido de resistencia a mercurio de 23 Kb (probablemente adquirido por HGT) (Ortegón et al., 1996), lo que ayudó en parte a su clasificación actual.

i. Membrana celular

a) Estructura

Las membranas poseen un alto contenido lipídico, que corresponde al 60% del peso en seco de la micobacteria (Nessar et al., 2012). Particularmente los glicopeptidolípidos (GPL) son clases de glicolípidos producidos por micobacterias atípicas, requeridos para mantener la integridad de la membrana celular, formación de *biofilms*, *sliding motility*, influyen la agregación de bacterias, liberación de prostaglandinas E2, y de lo más destacado es que induce la interacción entre la bacteria y células de la respuesta inmune como monocitos y macrófagos (Ripoll et al; 2007).

Están compuestos por una base de lipopéptidos glicosilados modificados por O-metilación y O-acetilación. Estos GLP contienen una cadena ácidos grasos de 3-hidroxi o 3-metoxi C26-C33 unida a una base de alcohol-amino-tripéptido, principalmente hecha de D-fenilalanina-D-alo-treonina-D-alanina-L-alaninol; el cual es glicosilado con la alo-treonina unida a 6-deoxitalosa y alaninol terminal unido a ramnosa (ver figura 6).

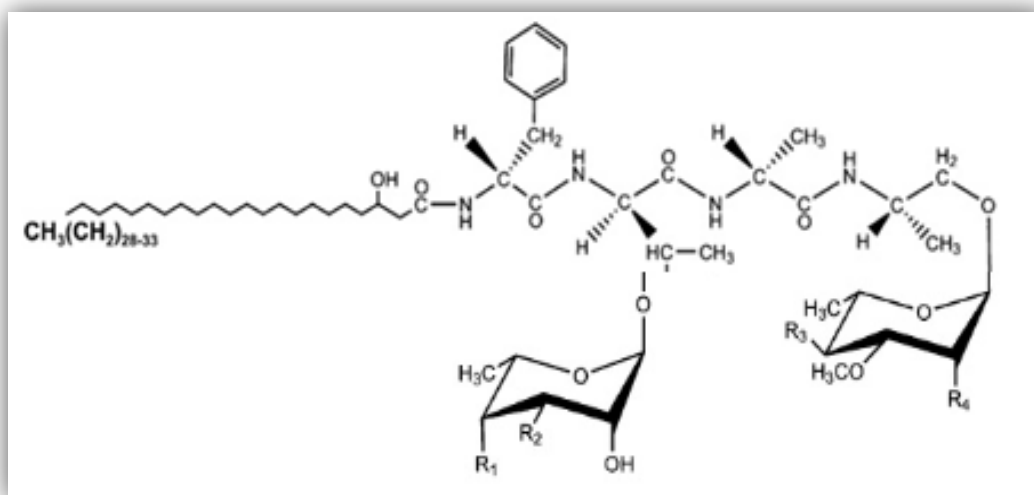


Figura 28 Estructura básica de nsGPL. Recuperado de Schorey y Sweet; 2008

Los GLP también se encuentran presentes en diferentes especies de micobacterias, sin embargo las diferencias entre estos GLP en las diferentes especies son las modificaciones dadas por acetilación, metilación en diferentes posiciones (ver Tabla 2) causadas por cambios en la biosíntesis de estas moléculas (Schorey y Sweet; 2008).

Especie	GPLs no específicos	GPLs polares	GPLs serotipo específico
<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>	Aol: Rha (3,4-OMe2 o 3-OMe) T: 6dTal (3-OMe or No metilado)	Varias modificaciones	Aol: 3,4-OMe2Rha T: 6dTal extendido con oligosacaridos
<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. smegmatis</i>	Aol: Rha (2,3,4-OMe3 o 3,4-OMe2) T: 3,4-OAc26dTal	Aol: 3,4-OMe2Rha (1→2)3,4 OMe2Rha T: 3,4-OAc26dTal	N/A
<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i>	Aol: 3,4OMe2Rha T: 3-OMeRha	Aol: 3,4-OMe2Rha (1→2)Rha (metilado o no metilado) T: 3-OMeRha	N/A

Tabla 3 Diferencias entre GPLs producidos por diferentes especies de micobacterias modificada de Schorey y Sweet; 2008. Estas especies producen GPLs con el mismo esqueleto lipídico; sin embargo varían en la metilación, glicosilación y acetilación. Generalmente una ramnosa metilada (Rha) es glicosilada y unida al esqueleto polipeptídico en la porción del alaninol (Aol) y en una 6-deoxitalosa (6dTal) O-metilada (OMc) u O-acetilada (OAc) unida a la allo-treonina.

Los análisis de GLP producidos por *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. smegmatis* por medio de la combinación de técnicas de TLC-MALDI-TOF arrojan similitudes, producen GPLs diglicosilados en cantidades similares. Sin embargo los GPLs triglicosilados fueron producidos mayormente en *M. abscessus* y *M. chelonae* (Ripoll et al; 2007).

ii. Morfología de las colonias

Las bacterias con cambios en la biosíntesis y producción de GPLs generan alteraciones en la morfología de las colonias, que pueden ser de lisas a rugosas (Schorey y Sweet; 2008).

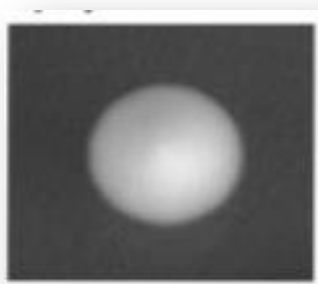


Figura 29 Colonia lisa. Crecida en medio 7H11 sólido a los 7 días Tomado y modificado de Howard et al., 2015

a) Fenotipo S

El fenotipo S (Smooth) o liso (ver figura 7), se encuentra mayormente en aislados ambientales, este se caracteriza por poseer en su membrana una alta cantidad de GPLs, lo que le permite tener la capacidad de formar biofilms mediante *sliding motility*. En el microscopio se observan de color blanco-beige con

una textura brillante, húmeda y lisa (Llorens-Fons et al; 2017).

La formación de biofilms es el proceso en donde los GLPs localizados en la membrana celular exponen sus colas hidrofóbicas, creando así un ambiente hidrofóbico que disminuye la fricción entre la bacteria y la superficie, permitiendo así la adhesión fuerte a superficies, facilitando la formación de biofilms (Schorey y Sweet; 2008), los cuales son comunidades microbianas que se adhieren una a la otra y a superficies produciendo una matriz extracelular de sustancias poliméricas para su mantenimiento, que a su vez confieren una mayor resistencia a agentes antimicrobianos (Ingen et al., 2009), y también aumentan la resistencia a desinfectantes comparada con su estado planctónico (es decir, cuando se dispersan en el agua sin encontrarse agregados, donde son capaces de ser arrastrados por el agua) (Falkinham III; 2009). Esta formación de biofilms permite que puedan crecer en cuerpos de agua en movimiento, así como en estructuras artificiales, siendo así la fuente de infección más común (Ingen et al., 2009).

Por otro lado, la variante S es parte vital de la colonización en el cuerpo, particularmente en las infecciones pulmonares (Greendyke y Byrd; 2008), donde se hipotetiza que la formación de biofilms por parte de este fenotipo permite una colonización facilitada de las vías aéreas, especialmente en casos cuya morfología pulmonar este alterada (Rhoades et al., 2015). Esto debido a que a pesar de que el fenotipo S permite la multiplicación en macrófagos (Rhoades et al., 2009), el acomodo de los GLP del fenotipo S, no permiten la liberación de TNF-alfa por parte de los macrófagos bajo la vía de TLR2, por lo que pasa desapercibido por la respuesta inmune innata (Rhoades et al., 2015) y favorece la colonización del tejido en cuestión.

b) Fenotipo R

Las variantes de *M. abscessus* tienen la capacidad de cambiar su fenotipo de liso a rugoso y viceversa en condiciones *in vivo* e *in vitro* (Greendyke y Byrd; 2008). En el microscopio estas colonias están caracterizadas por una textura creada por una superficie seca de forma irregular con arrugas y crestas (Llorens-Fons et al; 2017).

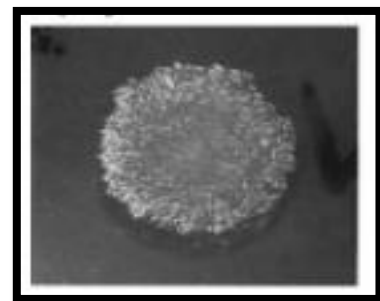


Figura 30 Colonia rugosa. Crecida en medio sólido 7H11 a los 7 días Tomado y modificado de Howard et al., 2015

Además pueden estar presentes ambas morfologías en un paciente. La pérdida espontánea de la expresión de GLP, remoción física o manipulación de los GLPs conlleva a la alteración de las propiedades físicas de la superficie de la membrana (Rhoades et al., 2015), lo

que ocasiona un cambio en la morfología de esta y consiguientemente en la forma de la colonia que cambia al fenotipo R (ver figura 8).

El fenotipo R (Rough) o rugoso, es más frecuente de encontrarse en aislados clínicos a diferencia del S (Rhoades et al., 2015). Posee en su membrana una baja o nula cantidad de GLPs, por lo que de manera general son más virulentas que las micobacterias que presentan un fenotipo S, debido a que se permite la liberación de TNF-alfa por parte de los macrófagos bajo la vía de TLR2 (Rhoades et al., 2015), lo que corresponde con la habilidad de la cepa R de activar la respuesta inmune de manera eficiente.

Tampoco presentan *sliding motility* o movilidad por deslizamiento, ni forman biofilms (Schorey y Sweet; 2008). Sin embargo estos son capaces de invadir macrófagos y causar infección persistente (Greendyke y Byrd; 2008).

Adicionalmente la exposición de GLPs dada por el fenotipo R, al igual que en *M. tuberculosis*, tiene el efecto de formar agregados largos llamadas aglomeraciones, compuestas de bacilos sumamente agregados que forman estructuras en forma de serpientes, quienes después de ser fagocitadas ocasionan la muerte de los macrófagos (Llorens-Fons et al; 2017). En *M. tuberculosis* estas aglomeraciones fueron el primer factor de virulencia descrito por Robert Koch en 1882 y comprobado por Middlebrook en 1947 (Llorens-Fons et al; 2017).

c. Resistencia a drogas

Las características fisiológicas y fenotípicas de las micobacterias atípicas, permiten que exista una barrera ante diversos estímulos que pueden ser nocivos para la bacteria, como es el caso de agentes tóxicos o antibióticos (Nessar et al., 2012). Por otro lado, se considera que *M. abscessus* es una de las micobacterias atípicas de crecimiento rápido más resistentes a antibióticos (Cortes et al., 2010) por lo que hasta la actualidad, no existe un tratamiento estándar establecido para tratar infecciones causadas por este patógeno (Raminki et al; 2017).

La composición lipídica de estas micobacterias brinda una composición hidrofóbica de la superficie celular, así como de la permeabilidad de esta, que impactan de manera positiva en la resistencia a quimioterapia (Falkinham III; 1996). Se ha observado que la composición de GLPs puede afectar la eficacia de antibióticos (Schorey y Sweet; 2008). Las cepas más susceptibles a estas drogas poseen pocos GLP polares, mientras que las resistentes poseen en su mayoría nsGLP. Esto da como resultado que mientras más hidrofóbicos sean los GLPs se tendrá menos permeabilidad a antibióticos (Schorey y Sweet; 2008). Conjuntamente hay una correlación entre la morfología de la colonia, la

composición de GLPs, la resistencia a antibióticos, así como del rol de estos en la respuesta inmune, de lo cual se detallará más adelante.

Adicionalmente la falta de permeabilidad de la membrana celular contribuye en la resistencia a alcaloides y ácidos, así como a antibióticos como β -lactámicos. En el caso de este último, al no dejar entrar el sustrato de esta enzima a la célula, ocasiona una baja actividad de la enzima de β -lactamasa y contribuye a la sobrevivencia de la bacteria (Nessar et al., 2012). También la poca permeabilidad de la membrana en sinergia con la actividad de enzimas modificadoras de aminoglicosidas que promueven la resistencia a antibióticos aminoglicosilados (Nessar et al., 2011).

Por otro parte, cuando se llegan a internalizar algunos antibióticos, la membrana celular actúa sinérgicamente con sistemas internos inducibles conocidos como “resistoma interno” tras una señal (proveniente de antibióticos), actúan de manera agonista a la función del antibiótico. Estos sistemas pueden ser bombas de flujo, enzimas modificadoras de la actividad de antibióticos, enzimas modificadoras del blanco y activación de genes que confieran resistencia a metales y otros antibióticos (Nessar et al., 2012), como es el caso del gen *erm* quien confiere una resistencia inducible a macrólidos (Nash et al; 2008)

Tras varios estudios, se sugiere que el tratamiento consista en la administración oral de macrólidos como claritromicina o azitromicina para aislados clínicos susceptibles a estos compuestos, así como amikacina intravenosa en combinación con un antibiótico beta-lactano como cefoxitina o imipenem (Rominski et al; 2017).

3. *Desarrollo de la enfermedad por M. abscessus*

a. *Transmisión*

La transmisión de estas micobacterias atípicas al humano no ha sido del todo elucidada; pero hasta el momento no existe evidencia de transmisión de persona a persona (Falkinham III; 2009), sin embargo aún se investiga esta posible relación. Existen casos en donde la fuente de infección principal es el agua y suelos contaminados con esta micobacteria (Ingen et al., 2009).

La vía de entrada al organismo sucede en su mayoría por medio de traumas localizados en cualquier sitio de la piel causados por la inoculación de la bacteria al organismo, como lo es el caso de heridas con agujas, cuchillos, espinas, rascarse tras picaduras, cortadas de pezuñas, púas, alambres; así como material quirúrgico infectado, cateterismo, cirugías (mamoplastia y baypass gástrico (Falkinham III; 1996) y procesos estéticos invasivos (Ortegón et al., 1996)

Otras formas descritas de transmisión son por medio de ingestión o contacto de plantas (Primm et al., 2004) o animales infectados (Falkinham III; 2009), así como la respiración de aerosoles con el bacilo infeccioso.

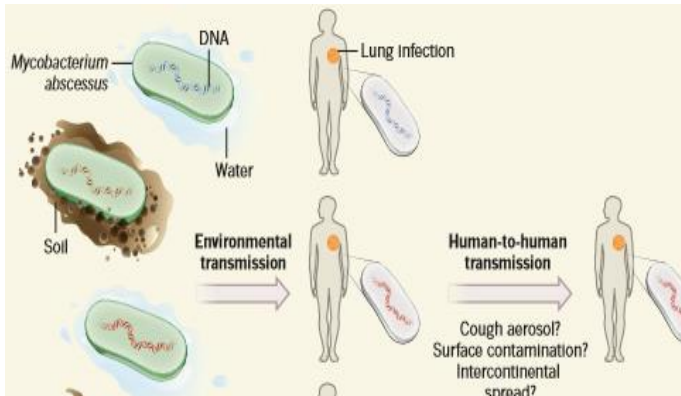


Figura 31 Vías de transmisión propuestas para *M. abscessus*. Modificado de Strong y Davidson; 2017. Estas bacterias se pueden encontrar en el ecosistema en agua o suelos y se puede generar una infección a partir de estos elementos. Asimismo la pregunta actual es si existe o no una transmisión de humano a humano.

b. Sistema inmune
i. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato comprende a la primera línea del organismo que protege contra de algún agente potencialmente patógeno a través de la combinación de barreras físicas, biológicas y químicas. De manera general, esta se caracteriza por tener un tiempo de respuesta rápida, previene la infección y puede eliminar agentes agresores, falta de memoria a largo plazo, es específica para moléculas y patrones moleculares asociados con agentes patógenos así como de células muertas o dañadas, posee un número limitado de receptores codificados por la línea germinal y se caracteriza por células como macrófagos, monocitos, neutrófilos, NK, leucocitos, células epiteliales y endoteliales (Owen et al; 2013).

Las barreras de la infección en primera instancia incluyen a la temperatura y pH corporal, así como la piel, mucosas y glándulas que revisten el tracto respiratorio, gastrointestinal, quienes en conjunto tratan de evitar el paso a través del agente al interior del organismo y órganos respectivamente. Las mucosas contienen sustancias antibióticas y antivirales, además de glándulas secretoras, como las salivales que contienen enzimas y sustancias capaces de eliminar al patógeno, por ejemplo proteínas y péptidos con efectos antimicrobianos (Owen et al; 2013).

Otra línea de defensa en el caso de las infecciones pulmonares es la mucosidad del aparato respiratorio, la cual esta alterada en pacientes con fibrosis quística (CF) y otras afecciones pulmonares, lo que predispone a la colonización por medio del fenotipo S y la formación de biofilms (Rhoades et al., 2015).

Cuando estas barreras principales son vencidas y el patógeno ingresa al organismo y comienza su ciclo de vida en el hospedero, inicia el reclutamiento celular al sitio de la infección, la producción de citocinas (Owen et al; 2013).

Por otro lado, los GLPs modulan directamente la respuesta inmune innata de tipo proinflamatoria, favoreciendo la liberación de TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-1 por medio principalmente del TLR2 (Schorey y Sweet; 2008). En contraste, la liberación de TNF-alfa es dependiente de la estructura de los GLPs, lo cual indica que un cambio mínimo de conformación puede cambiar la forma en que éste interactúa con el hospedero (Schorey y Sweet; 2008).

Los TLR (*Toll Like Receptors* por sus siglas en inglés o Receptores Tipo Toll (ver figura 10), son receptores proteínicos que se encuentran en la membrana de las células como macrófagos alveolares, células dendríticas, células epiteliales y mucosas, entre otras (Rhoades et al., 2009), así como en la membrana de los endosomas y lisosomas, que comparten una estructura en común en la región extracelular, llamadas repeticiones ricas en leucina (LRR), las cuales se encargan de constituir el dominio de unión a ligando extracelular en forma de herradura en la cadena

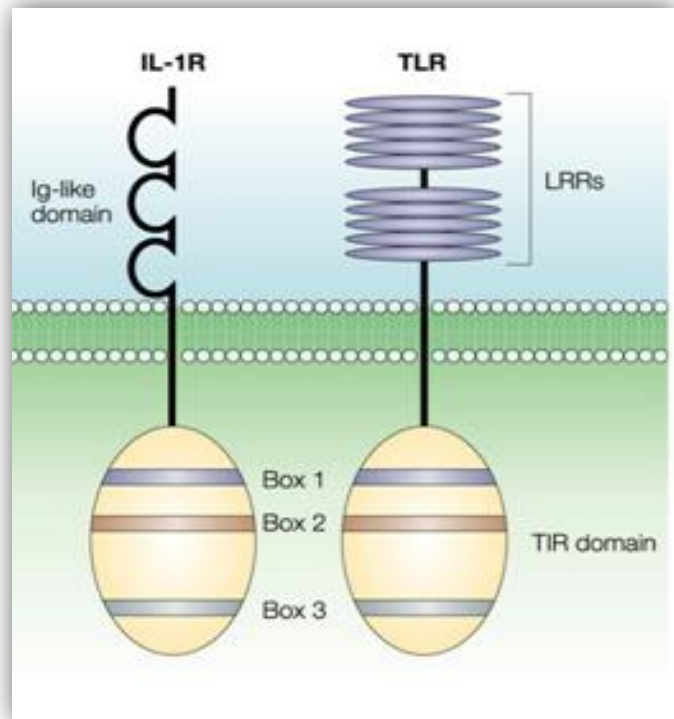


Figura 32 Estructura básica de los TLR. Rescatado de Owen et al., 2013

polipeptídica de los TLR. Cada TLR tiene un repertorio de especificidades para ligandos sumamente conservados; es por ello que cuando se unen los TLR a sus ligandos son inducidos a dimerizar consigo mismos y formar pares con otros TLR, activando diferentes cascadas de señalización en la célula, como es el caso de la producción de citosinas (como NF κ -B, IFN e interleucinas) y diversos compuestos (Owen et al., 2013).

Estos TLR reconocen al patógeno por medio de patrones moleculares, que son motivos conservados expresados por una gran variedad de microorganismos, pero no de eucariotas (Rhoades et al., 2009). Los ligandos de estos TLR son residuos de fosfatidil-1-mio-inositolmanosidos conocidos como (PIMs) que se encuentran en las estructuras de los GLPs de las micobacterias (Rhoades et al., 2009).

En el caso de *M. abscessus*, se teoriza que las variantes R al contrario de las variantes S, permiten el reconocimiento del patógeno vía TLR2 en monocitos y macrófagos en experimentos *in vitro* (Rhoades et al., 2015)

En suma, se ha visto que las células epiteliales (en el caso de la enfermedad pulmonar) juegan un papel esencial en la vigilancia y en la respuesta inmune innata. En este punto, las células epiteliales comienzan la secreción de IL-8, la cual tiene la función de reclutar a los neutrófilos circundantes por medio de la activación de los TLR (Davidson et al., 2011). Sin embargo los TLR no reconocen los fenotipos que generan alta cantidad de GPL, es decir el fenotipo S, lo que conlleva a que la infección se pueda expandir y evadir la respuesta inmune (Davidson et al., 2011).

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inmune, sin embargo también depende de la liberación de IL-8 y TNF-alfa, dada por células epiteliales y macrófagos. Por su parte, se sabe que mantener los niveles de TNF-alfa es necesario para controlar la enfermedad (Rottman et al; 2007). Malcom et al., 2013 encontró que en el caso de pacientes con CF u otras formas de patologías pulmonares, citocinas como IL-8 o TNF son abundantes cuando el patógeno invade las vías aéreas, donde la infección inicial es causada principalmente por el fenotipo S (el cual es más predominante en el ambiente). Esto ocasiona que se modifique la respuesta por parte de los neutrófilos, ya que estos no reconocen a la bacteria y en vez de controlar la infección, crean un ambiente propicio para ella, lo que conlleva a la perpetuación de la inflamación y a la sobrevivencia de la bacteria (Malcom et al., 2013). Adicionalmente pueden producir más quimioatrayentes de neutrófilos así como IL-8, lo que es consistente con la histología donde se puede observar un ambiente rico en este estirpe celular en las infecciones (Malcom et al., 2013).

Adicionalmente cabe recalcar que la función inicial del neutrófilo incluye la liberación de aniones superóxidos con el fin de matar a la micobacteria (Owen et al; 2013). Pero en estudios se sugiere que *M. abscessus* puede poseer mecanismos para evadir la acumulación de estas especies reactivas con el fin de evitar ser destruida. A parte promueve el crecimiento de esta micobacteria y la liberación de estos agentes por parte de los neutrófilos puede llevar a la inflamación local y daño tisular, que conlleva a que se recluten más neutrófilos y por ello se pueden observar ampliamente en las muestras histopatológicas (Malcom et al., 2013).

Por otro lado, se han dilucidado patrones de GLPs que forman una barrera e inhiben o disminuyen la velocidad de la fusión del lisosoma con el fagosoma para la creación de fagolisosomas (Roux et al., 2016), lo cual actúa como otro

mecanismo de evasión a la respuesta inmune (Schorey y Sweet; 2008) y mecanismo de supervivencia bacteriana. Este mecanismo al interferir la formación de los fagolisosomas es debido a la manipulación de la señal de transducción del huésped para que se lleve a cabo este proceso (Roux et al., 2016). Se observa que las variantes S residen dentro de los fagosomas inmaduros que son incapaces de fusionarse debido al secuestro de la proteína Rab5 en la membrana de estos organelos (Roux et al., 2016). Diferente es el caso de la variante R, ya que está en la infección temprana presenta una tendencia formar cuerdas o grandes grupos que de manera general, permanecen en copas fagocíticas en lugar de ser internalizadas, y como resultado de esto, las células contienen menos fagosomas pero con múltiples bacterias (Roux et al., 2016).

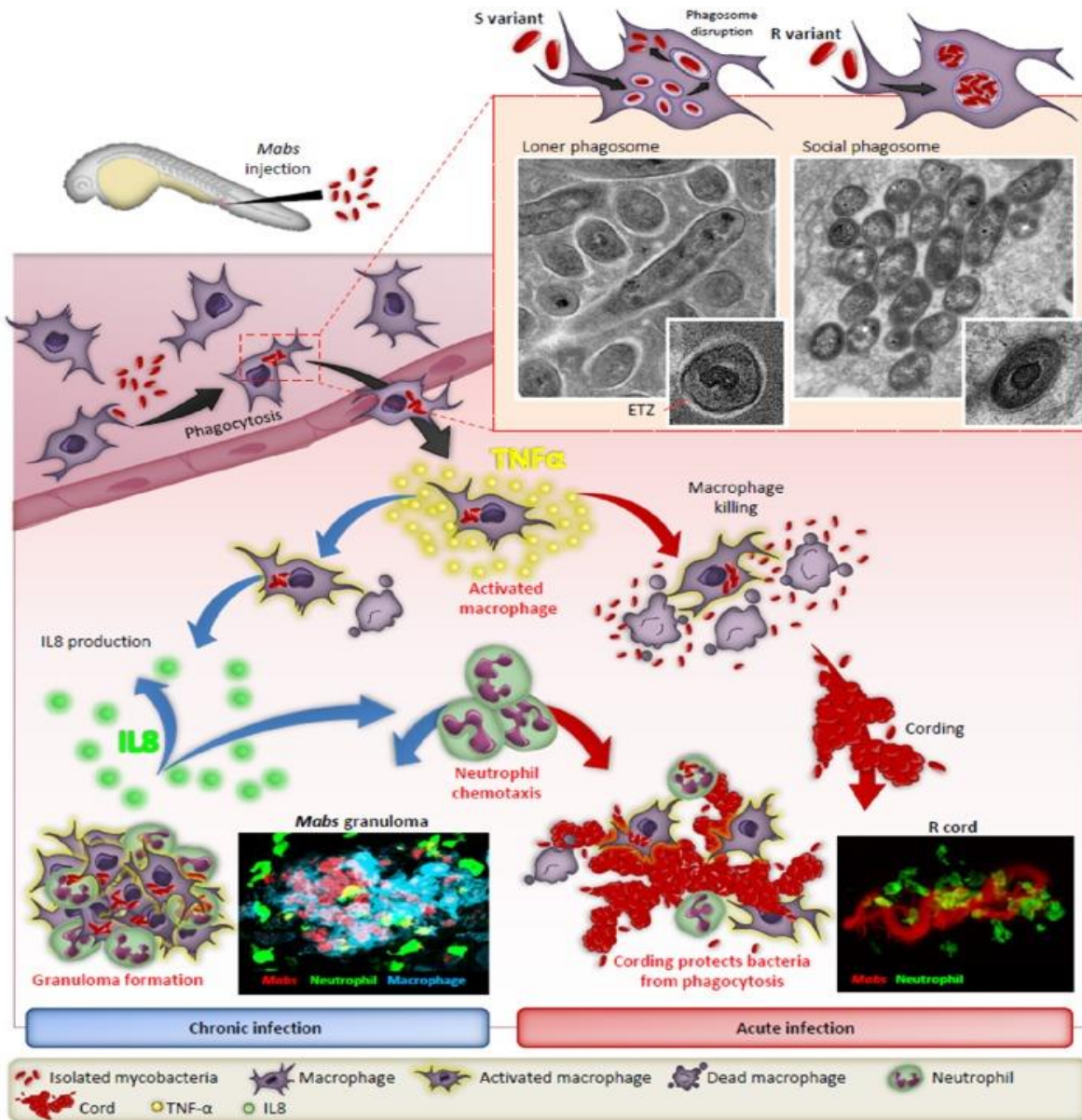


Figura 33 Principales etapas de infección por *M. abscessus* en modelo de pez Zebra. Tomado de Bernut et al; 2017. Tras la superación de las barreras físicas, *M. abscessus* es capaz de ser fagocitada por macrófagos, quienes dependiendo del tipo de colonia S o R se alojarán en diversos fagosomas. Esto puede llevar a 2 caminos, el primero, si se tiene la morfología S se genera una producción de IL-8 a través de macrófagos activados y esto conlleva a una formación de granulomas, correspondiente a una infección crónica. El otro camino corresponde a la morfología R, donde se parte de la muerte de macrófagos, quienes liberan a los bacilos y éstos a su vez forman estructuras organizadas llamadas cordones quienes protegerán a las bacterias de la fagocitosis, elementos que comprenden a una infección activa

Adicionalmente se ha estudiado que el fenotipo R forma agregados compuestos por monocitos-macrófagos en comparación con el tipo S. Por otro lado la cepa R influencia a los monocitos de forma directa, sin que haya el procesamiento completo por medio de las CPA, que modifica los patrones de expresión de citocinas como TNF-alfa y facilita así la formación de granulomas así como la diseminación. En suma. Los monocitos pueden albergar a los bacilos en

fagosomas, quienes al igual que en macrófagos, pueden residir en fagosomas. Sin embargo dependiendo de la cepa, la morfología de estos puede variar. A diferencia de la morfología R, la S forma fagosomas de tipo “loose” quienes poseen una morfología atípica y no previenen la fusión del fagosoma con el lisosoma, efecto que sí es observado con la cepa R (Byrd & Lyons 1999).

ii. Sistema inmune adaptativo

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por tener un tiempo de respuesta relativamente lento en comparación con la inmunidad innata, ser muy específico y discriminatorio entre lo propio y ajeno, sumamente diverso en cuanto a receptores, desarrollo de memoria persistente con una respuesta rápida y de mayor magnitud, alta producción de anticuerpos y citosinas y consta de células como linfocitos B y T (citotóxicos y de memoria) así como CPA (Owen et al; 2013).

Poco se ha estudiado sobre la respuesta inmune adaptativa tras la infección por *M. abscessus*. Sin embargo, se sabe que las células presentadoras de antígeno (APC) median tanto la inmunidad innata como la adaptativa, este es el caso de un tipo específico de APC, las células dendríticas (DC) (Jun et al; 2016). En tejidos periféricos se encuentran DC con bajos niveles de expresión del MHC y muestran un alto nivel de endocitosis; por ende cuando las DC reconocen patrones moleculares de patógenos se inicia la maduración de estas células y aumenta la expresión de moléculas del MHC así como citosinas proinflamatorias y disminuye la actividad endocítica. A su vez, la maduración de estas ocurre mientras migran hacia los nódulos linfáticos donde ocurre la presentación antigénica a las células T vírgenes que inducen la activación y proliferación de las células T (Jun et al; 2016) con el fin de que puedan llevar a cabo su función citotóxica o de memoria.

Por otro lado, se intuye que la inmunidad mediada por células B participa de forma menor en la inmunidad. En modelos de ratones se ha observado que está involucrada en un control temprano de las infecciones por *M. abscessus*, sin embargo los mecanismos por los cuales puede afectar el curso de la infección aún no son elucidados completamente. Se piensa que involucra la presentación de antígenos, lo que está relacionado directamente con los GLPs (Rottman et al: 2007), pero más estudios son necesarios para generalizar estos hallazgos, completarlos y extrapolarlos a humanos

4. Patologías

El espectro de las lesiones causadas por esta micobacteria, son enfermedades cutáneas (más frecuente), post operatorias, pulmonares, diseminadas, del SNC (Sistema Nervioso Central) (Lee et al., 2015) y otras patologías (queratitis, úlceras corneanas, linfadenitis y osteomielitis) (Ortegón et al., 1996).

En el caso de infección se muestran abscesos en el sitio los signos y síntomas varían según el tipo de patología, pero van de dolor, inflamación, eritema y drenaje de material purulento o serosanguinolento (Ortegón et al., 1996).

a. Piel

En la piel la histopatología revela una respuesta granulomatosa, nodular o difusa. En donde los granulomas pueden tener diferentes conformaciones dependiendo del estado inmune del paciente y el tiempo de evolución de las lesiones (Valdés y Sid; 2004). En general se componen por abscesos centrales rodeados por células gigantes y epiteliales, con alta penetración de los infiltrados inflamatorios al tejido celular subcutáneo. También pueden presentar necrosis central que puede ser extensa (de la desintegración de polimorfonucleares generando una forma parecida a la necrosis de caseificación) y drenaje de material hemorrágico y supurativo (Ortegón et al., 1996).

Por otra parte, se pueden observar vacuolas lipídicas provenientes de la hipodermis, que han migrado y alcanzado capas superiores debido a la severa inflamación. Estos se caracterizan por ser espacios redondeados vacuolares rodeados por polimorfonucleares o células epiteliales que se encuentran en el centro de los abscesos o dentro del área granulomatosa, en donde en las vacuolas es posible visualizar a la micobacteria (Ortegón et al., 1996). También se puede observar a la bacteria en grupos extracelulares formando microabscesos, y también se pueden observar áreas con altos contenidos de células polimorfonucleares; de lo cual la observación de este bacilo se correlaciona con el estado inmune del hospedero (Ortegón et al., 1996).

Adicionalmente se ha visto que en pacientes inmunosuprimidos puede que no haya granulomas o que haya pocos y en estos predomine una alta carga bacilar con abundantes polimorfonucleares (Ortegón et al., 1996).

b. Post operatorias

En el caso de las enfermedades post operatorias, la infección se manifiesta sobre las heridas quirúrgicas o sitios de procedimiento; esto debido a la falla en el proceso de cicatrización normal, que se manifiesta a través de drenaje de material purulento o serosanguinolento sobre la sutura, a esto se le suman síntomas de inflamación, eritema y calor en la zona (Ortegón et al., 1996).

c. Pulmonares

La infección pulmonar es más común en pacientes con CF, inmunosuprimidos o con enfermedades pulmonares que en pacientes sanos; sin embargo la prevalencia de este tipo de enfermedad ha ido aumentando (Ortegón et al., 1996).

En este tipo de patología se revela por medio de radiografías de tórax o tomografías axiales computalizadas, infiltrados intersticiales y alveolares, principalmente unilaterales (Ortegón et al., 1996). La enfermedad se desarrolla silenciosamente con un curso asintomático pero progresivo, que tras el paso del tiempo genere síntomas persistentes y baja de la capacidad pulmonar que puede llevar a los pacientes (en especial a los que poseen enfermedades pulmonares) a una falla total de la respiración (Lee et al.; 2015). El tratamiento disponible es cirugía y antibióticos (Ortegón et al., 1996).

El análisis histopatológico revela que en las infecciones causadas por *M. abscessus*, las lesiones pulmonares se caracterizan por la presencia de polimorfonucleares, microabscesos y ausencia de necrosis de caseificación (a diferencia de los granulomas tuberculosos que poseen infiltrado mononuclear, y granulomas caseificados) (Ortegón et al., 1996). Otra diferencia que cabe destacar entre los granulomas de la tuberculosis y de estas micobacterias atípicas, reside en que la localización de los bacilos en estas últimas se encuentra dentro de los microabscesos o en las vacuolas lipídicas, mientras que en la tuberculosis se aprecian en la zona de necrosis de caseificación y en la periferia de este espacio (Ortegón et al., 1996).

d. Diseminadas

Este tipo de infección se caracteriza por un síndrome en el cual hay episodios sintomáticos a asintomáticos de manera recurrente sobre la piel o tejidos blandos. Típicamente se presenta en individuos con alguna condición de inmunosupresión aguda, como es el caso de trasplantes, terapias con corticoides, artritis reumatoide y cáncer (Ortegón et al., 1996). En la mayoría de los casos se presenta debido a cateterismos (Lee et al., 2015). Por otro lado este tipo de infecciones tiende a ocurrir en pacientes inmunocomprometidos (principalmente con HIV), aunque también ocurre en pacientes sanos (Lee et al., 2015).

e. SNC

Las infecciones de SNC son raras, estas bacterias pueden cruzar la barrera hematoencefálica (Cortes et al., 2010) y generar meningitis y/o abscesos cerebrales como sus manifestaciones más comunes. Esto ocurre principalmente en pacientes HIV positivos, aunque también puede ocurrir en pacientes sanos (Lee et al., 2015).

f. Otras patologías

La mayoría de estas patologías las fuentes son infecciones secundarias a un trauma. En el caso de la linfadenitis los ganglios superiores son infectados y con el

tiempo se reblandecen y presentan drenaje espontáneo que va a constituir a la escrofulodermis. El único tratamiento disponible es cirugía y antibióticos (Ortegón et al., 1996).

Otro caso es el de la osteomielitis, donde el foco de infección puede ser un trauma penetrante, que tras el tiempo se puede observar erosión ósea en el sitio de la herida y se puede comprobar con una biopsia ósea.

En el caso de las enfermedades oculares (queratitis, endoftalmitis, escleritis y otros tejidos en el área ocular). Estos se pueden presentar por cuerpos extraños que hieren al ojo, en donde la fuente de infección puede ser el objeto o una infección tras la laceración. El tratamiento consiste en antibióticos colocados de manera tópica o sistémica e intervenciones quirúrgicas (Lee et al., 2015)

5. Diagnóstico y tratamiento

a. Diagnóstico

El diagnóstico puede ser difícil, ya que esta micobacteria puede permanecer silenciosamente por largos periodos de tiempo dentro del organismo, que van de meses a años (Medjahed et al., 2009). Sin embargo para el diagnóstico certero de *M. abscessus* se recomienda utilizar varios métodos descritos en la siguiente tabla.

Método		Resultado
Bacteriológico (Valdés y Sid; 2004).	Prueba: Tinción de ácido alcohol resistencia o Ziehl-Neelsen	Coloración roja de las micobacterias por penetración de fucsina al citoplasma e interacción con ácidos micólicos de la membrana, reacción que impide la salida de la fucsina cuando existe un proceso de decoloración. (De Naranjo et al; 1988)
	Prueba: Temperatura de crecimiento	<i>M. abscessus</i> crece de manera ideal a 37°C, si no crece a esta temperatura, entonces se puede descartar esta posibilidad.
	Prueba: Morfología de la colonias	Las colonias de <i>M. abscessus</i> pueden ser de lisas a rugosas con un color de blanco a grisáceo. Por ende si se observa una morfología y color diferente se descarta que sea esta.
	Prueba: Pigmentación y fotoreactividad	En esta prueba se puede identificar a las micobacterias no cromógenas a las que pertenece <i>M. abscessus</i> y se descartan a las fotocromógenas y escotocromógenas.
	Prueba: Velocidad de crecimiento	De manera general, el crecimiento a 37°C genera que las bacterias sean visibles en los medios sólidos de 3-7 días (promedio 5), con lo que se descarta a micobacterias de crecimiento lento.

Análisis cromatográfico (Valdés y Sid; 2004).		En este análisis es sumamente rápido y permite analizar la constitución lipídica de las micobacterias por medio de técnicas como cromatografía de capa fina, cromatografía de gases y HPLC.
Genéticos (Valdés y Sid; 2004).	AccuProbe	Sondas de DNA marcadas con ésteres de acridina y complementarias a fragmentos de rRNA específicos para cada especie o sub especie, que generan quimioluminiscencia al ser activados.
	PCR	Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa, de una zona concreta o zona diana y la observación directa de los fragmentos con métodos de post-amplificación como restricción, hibridación, secuenciación o rtPCR
	PCR in situ	Proceso de PCR sobre la muestra clínica
Sensibilidad (Valdés y Sid; 2004).		Crecer o colocarles a las bacterias distintos antibióticos y evaluar su efecto. En el caso de <i>M. abscessus</i> se sabe que es resistente a amikacina, cefositina y claritromicina.

Tabla 4 Métodos de diagnóstico de *M. abscessus*. En esta tabla se describen los métodos de diagnóstico más recomendado para las infecciones causadas por *M. abscessus*

b. Tratamiento

Las micobacterias del MAC son resistentes a la mayoría de las drogas antituberculosas (Nessar et al., 2012) como es el caso de antibióticos de primera línea como rifampina, pirazinamida, y etambutoll (Medjahed et al., 2009). Se sabe por medio de MICs y MBCs que las tres variantes de *M. abscessus* (390S, 390R y 390V) son susceptibles a amikacina, claritromicina y ceftoxitina (Greendyke y Byrd; 2008). Sin embargo la genética (transposones, genes y plásmidos), fase de crecimiento, la concentración de los antibióticos, la concentración de nutrientes y el estado (planctónico o biofilm) está relacionado con la resistencia y efectividad a los antibióticos (Greendyke y Byrd; 2008). Por lo que se recomienda el uso de terapias combinadas de antibióticos y cirugía, con el fin de que esta pueda ser erradicada completamente (Medjahed et al., 2009).

De manera general el tratamiento con antibióticos para el caso de patologías extrapulmonares requiere aproximadamente de 6 meses, mientras que para pulmonares 12 meses son necesarios para combatir la infección (So et al; 2016). Sin embargo, la discontinuidad de los tratamientos, junto con el ajuste incorrecto en las dosis administradas conllevan a una gran dificultad para erradicar infecciones causadas por esta micobacteria (So et al; 2016).

En el caso de *M. abscessus*, como se ha mencionado anteriormente los GLPs además de tener relación directa con la morfología de las bacterias, también modulan parte de la respuesta ante antibióticos. La presencia de GLPs en el fenotipo R, actúan como una barrera física que protegen a la colonia de antibióticos (So et al; 2016).

Principalmente la combinación de claritromicina y amikacina es lo más recomendado para hacer frente a esta infección, sin embargo hay otros compuestos que son utilizados para controlar la infección (So et al; 2016). La amikacina en la cepa S, de manera general afecta el arreglo celular, es decir, pueden cambiar de S a R, lo que lleva a que disminuya el sliding motility, la cantidad de GLPs en la superficie celular (So et al; 2016) y aumenta las probabilidades de que sean reconocidos por la respuesta inmune. Por otro lado, en la cepa R las interacciones del *Pks* con *MmpL10* y *MmpL4b* fueron disminuidas en su expresión (So et al; 2016).

En la siguiente tabla rescatada de Lee et al., 2015, se muestran los principales recomendaciones para el tratamiento de infecciones por MAC en humanos:

Tipo de patología	Régimen inicial	Duración
Pulmonar	Terapia basada en macrólidos con terapia antimicrobial intravenosa con cefoxitina o amikacina	12 meses
Piel y tejido blando	Macrolidos en combiinacon con amikacina y cefoxitina/imipenem más cirugía	De 4 a 12 meses
Bacteremia o dispersa	2 agentes antimicrobianos de preferencia incluyendo amikacina y remover el foco	4 semanas
SNC	Terapia de claritromicina combinada con amikacina en las primeras semanas	De 4 a 12 meses
Infección ocular	Agentes tópicos y/o sistémicos (amikacina, cefoxitina o claritromicina) y/o cirugía	De 6 semanas a 6 meses

Tabla 5 Recomendaciones de tratamiento de acuerdo al tipo de patología. (Modificado de Lee et al., 2015)

Capítulo II: Antecedentes

II. Antecedentes

1. Biosíntesis de GLPs

Como se ha mencionado anteriormente, los GLPs juegan un papel crucial en la fisiología y patogenicidad de las micobacterias (Ripoll et al., 2006). La síntesis y exporte requieren del funcionamiento completo de vías biosintéticas complejas y largas, involucrando proteínas codificadas por genes agrupados o genes dispersos en el genoma (Deshayes et al; 2010). Sin embargo continúan incógnitas importantes relacionadas con estos componentes de la membrana celular. Reportes de diversos grupos de investigación, muestran que la presencia de GLPs es necesaria para realizar fenómenos como lo son: sliding motility, formación de biofilms y mediar la respuesta patógeno-hospedero, dependiendo de su estructura y cantidad (Ripoll et al., 2006).

Estudios en diversos modelos muestran una tendencia a que las variantes naturales de *M. abscessus* que producen bajos o nulos niveles de GLPs (es decir fenotipo R), son menos invasivas que las productoras de alta efectividad (fenotipo S). Con esto, uno de los problemas de investigación que se ha desarrollado en los últimos años corresponde al estudio del mecanismo génico sobre la biosíntesis de los GLP, sin embargo son pocos los artículos que tienen como objetivo estudiar estos puntos.

i. Biosíntesis filogenética comparativa

Por ello, primero se ha evaluado de forma comparativa la genómica de la vía biosintética de los GLPs, teniendo como modelos las alineaciones de las proteínas *M. smegmatis* así como los proteomas completos de *M. chelonae* y *M. abscessus*, de lo cual se encontró que en *M. smegmatis* todos los genes necesarios para la síntesis de GLPs se encontraban restringidos a una región delimitada, llamada "locus GLPs"; donde algunos genes han sido analizados experimentalmente, como es el caso de *mps1*, *mps2*, *pks*, *fadD23*, *papA3*, *gft1*, *gft2* (Ripoll et al; 2007) o miembros de la familia de genes *mmpL* y *mmpS* (Deshayes et al; 2010), entre otros. De manera contrastante, para *M. chelonae* y *M. abscessus* se encontraron genes ortólogos (quienes por definición son aquellos homólogos que están presentes en organismos de diferentes especies, cuyo ancestro común antecede a la división entre las especies (Brown; 2008)) de la vía descrita para *M. smegmatis*, compartiendo de 80-90% de similitud entre sí. El único punto de cambio con respecto a *M. smegmatis* subyace en que para *M. abscessus* y *M. smegmatis* este locus de genes se encuentra dividido dos regiones en posiciones diferentes del

genoma, lo cual podía indicar que el estado de locus único es ancestral con respecto a esta división (Ripoll et al; 2007).

La primera zona comprende a 19 genes que tienen como función principal la síntesis de la unidad de tripéptido-amino-alcohol, glicosilación del lipopéptido y las modificaciones de O-acetilación/metilación (Ripoll et al; 2007); mientras que la segunda región involucra a los genes *artf1* y *artf 2*, cuya función radica en la síntesis de lípidos y su unión a la unidad de tripéptido-amino-alcohol (Ripoll et al; 2007).

Con esta información la hipótesis elemental que se maneja sobre la biosíntesis de GLPs puede reflejar que filogenéticamente el locus GLP en *M. smegmatis* representa a la forma ancestral de la vía, mientras que el acomodo de *M. abscessus* –*M. chelonae* corresponde a la vía más actual (Ripoll et al; 2007).

ii. Familia *mmpS*

De los genes más trascendentales en cuanto a la vía de biosíntesis de GLPs, corresponde a la familia *mmpS*, quienes codifican para proteínas de membrana pequeñas con un solo dominio transmembranal. Los genes codificantes para estas proteínas seguidos se encuentran cercanamente asociados con genes miembros de la familia *MmpL* (Deshayes et al; 2010), involucrados directamente en la síntesis o modificación de policetidos. Es sugerido que esta cercanía puede participar en el transporte y/o biosíntesis de moléculas sintetizadas por los productos de la sintasa (Deshayes et al; 2010).

Estudios en *M. smegmatis*, demuestran que *mmpS4* se encuentra organizado en un operón cercano a los genes *mmpL4a* y *mmpL4b* involucrados en el proceso de biosíntesis (descritos a detalle en la siguiente sección) y podrían estarse transcribiendo como un operón. Cuando este gen llega a ser eliminado se observa una disminución significativa en los niveles de GLPs (Deshayes et al; 2010), sin embargo existe la transcripción de otros genes aun producen. Sin embargo, se ha demostrado que promueven la biosíntesis efectiva y secreción de proteínas, actuando como andamio para la maquinaria enzimática y de exportación de estas a la membrana, además de que determinan la cantidad de GLPs producidos (Deshayes et al; 2010).

Conjuntamente, en experimentos utilizando un ortólogo de *mmpS4* en *M. tuberculosis*, se ha encontrado que se organiza en un operón junto a *mmpL4*. Además se sugiere que las proteínas de *mmpS4* interactúan de forma no específica con las de *mmpL4* a través de interacciones de aminoácidos, elemento que parece estar conservado en toda la familia (Deshayes et al; 2010), lo que

sugiere que pudiese actuar de la misma forma para *M. abscesus*, proceso llamado reconocimiento homólogo.

Con base en estos modelos, se refuerza la hipótesis que las proteínas *mmpS4* funcionan como andamio para que se ensamble el megacomplejo enzimático que lleve a la biosíntesis y exportación de GLPs. Por ende se creó un modelo (que falta por ser estudiado completamente) en donde *MmpS4* interactúa con *mmpL4a*, *mmpL4b* y otras enzimas de la vía como *Pks*, *Atf*, *Mtf*, *Gtf*, entre otros. Además se piensa que el dominio extracitosólico de *mmpS4* puede interactuar específicamente con los dominios extracitosólicos de *mmpL4* específicamente en el poro de la bacteria. Contrastantemente se analiza que si existe la ausencia de *mmpS*, el complejo no adopta la configuración correcta y las enzimas se distribuyen en el citoplasma, que conlleva a una reducción en los niveles de GLP.

Por otro lado en *M. tuberculosis* se ha estudiado el rol de *mmpL3*, uno de los genes ortólogos más conservados en todas las especies de micobacterias (Grzegorzewicz et al; 2012), que participa en la exportación de TMM, así como en la necesidad total de este gen para la replicación celular (De la misma manera es esencial para *M. smegmatis*) (Grzegorzewicz et al; 2012). Cuando se elimina se lleva a la represión de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos micólicos, así como en otras vías como TDM. Estos sucesos disminuyen la expresión de genes involucrados en la producción de energía y respiración, lo que lleva a la disminución de la división celular y de igual manera trata de disminuir el estrés oxidativo en respuesta a este suceso. También guía a la modificación de la permeabilidad de la membrana, efecto probablemente causado por la inhabilidad de construir de forma correcta la membrana celular culminando en un estrés osmótico que termina por reventar al bacilo (Degiacomi et al; 2017).

iii. Familia *mmpL*

Dentro de las familias de genes más relevantes en la síntesis de GLPs, el cluster *mmpL*, tiene como objetivo codificar para proteínas de membrana grandes, requeridas (*mmpL*) de aproximadamente de 1 millar de aminoácidos organizados en 12 dominios transmembrana y 2 periplásmicos grandes, que participan para la formación de la membrana celular (Ripoll et al; 2007). Específicamente dentro de esta familia, existen 2 genes completamente necesarios para la formación de los GLPs llamados *mmpL4a* y *mmpL4b*, cuya función exacta *in vivo* e *in vitro* aún no ha sido dilucidada a su totalidad (Ripoll et al., 2006).

1. *mmpL4b*

A través de comparaciones algunos estudios que sugieren que estos genes pueden funcionar como un gen análogo a *mmpL7*, descrito para *Mycobacterium*

tuberculosis, donde las proteínas resultantes de este gen pueden modificar el acoplamiento, exportación a la membrana celular (Ripoll et al; 2007), a través del conjunto enzimático llamado policétido sintetasa (Ripoll et al., 2006), que sintetiza precursores de policétidos (Chan et al; 2008), que tienen como efecto cambios en los productos de los policétidos a lo largo de su síntesis.

De acuerdo con esto, el gen *mmpL4b* sería uno de los responsables principales del cambio de morfología de las colonias y con ello, las implicaciones de resistencia a diversas condiciones físicas, biológicas y químicas.

El gen *mmpL4b* es un gen no esencial que se encuentra como el último gen del operón *mmpL* (ver figura 12), el cual se encuentra directamente involucrado en la biosíntesis de GLP, cuya mutación resulta en un fenotipo R (Medjahed y Reyrat; 2009).

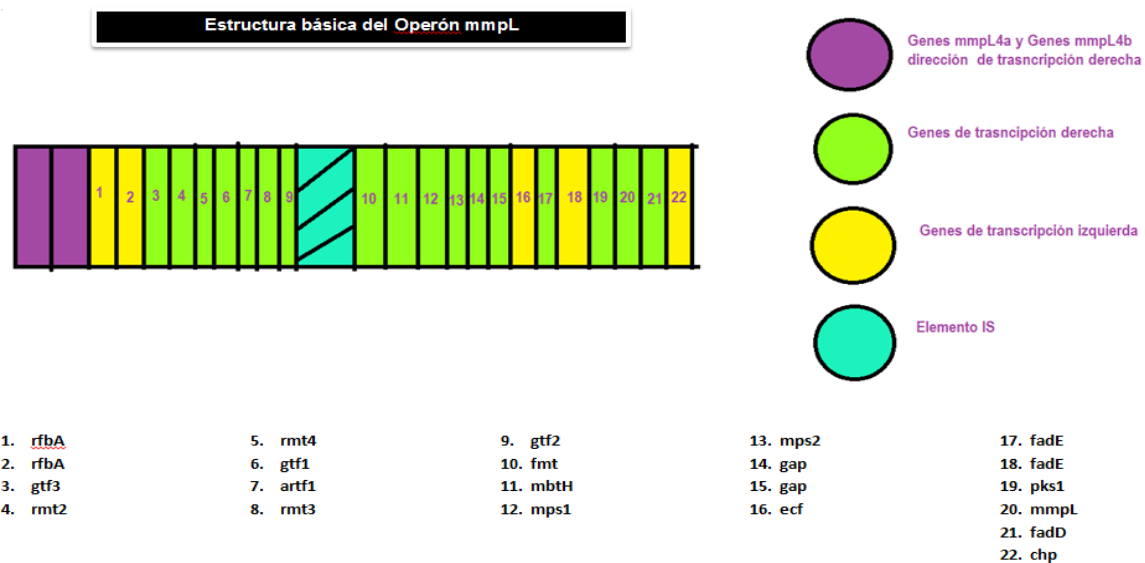


Figura 34 Estructura básica del Operón *mmpL* en *M. smegmatis*. Modificado de Daffé et al., 2013. Editado por Hatfull y Jacobs; 2014. En esta imagen se pueden apreciar los diferentes genes que posee el operón y su dirección de transcripción o marco de lectura. Cabe recordar que *M. smegmatis* está estrechamente relacionada con *M. abscessus* y se cree que el arreglo del operón podría ser homólogo para ambas especies.

El uso de *mmpL4b* es un gen diana que permite la identificación de mutantes y la cuantificación de varios eventos genéticos. La eliminación del gen se puede identificar por medio de pruebas bioquímicas como Southern blott, en donde se permite la predicción del patrón de bandeo (Medjahed y Reyrat; 2008); mientras que la morfología de las colonias se puede analizar por medio de microscopía en cultivos sobre cajas Petri (Medjahed y Reyrat; 2008).

2. Antecedente sobre delección del *mmpL4b*

Como antecedente principal, el estudio reciente de Nessar et al., 2011 titulado “*Deletion of the mmpL4b gene in the Mycobacterium abscessus glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response*”, quien tiene como objetivo estudiar las consecuencias de la deleción del gen en la una cepa mutante, una complementada y compararla con el fenotipos 390 S (Wild type).

i. Deleción de mmpL4B: Construcción de mutantes

La deleción del gen *mmpL4b* se realizó a través de un sistema de recombinación, en la cual se generó una marcada mutación en la construcción del gen *mmpL4b* a través de PCR en el fenotipo 390S. Para la cepa complementada se utilizó DNA genómico de *M. abscessus* fue usado como templado y el producto del PCR se purificó y fue clonado a un plásmido e insertado mediante electroporación.

a. Comprobación de mutante

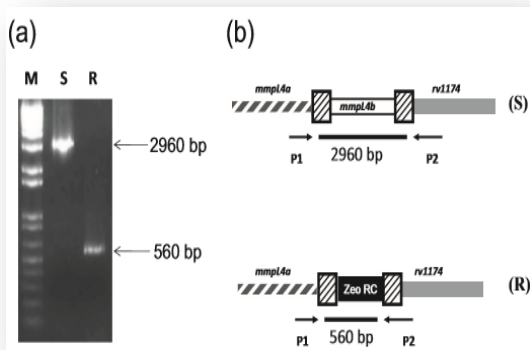


Figura 35. Análisis de PCR y esquema. a) Análisis de PCR del locus *mmpL4b* en *M. abscessus* WT (S) y la cepa knockout (R). b) Representación esquemática de la pérdida del gen *mmpL4b*. Tomado de Nessar et al., 2011

Para comprobar si efectivamente se pudo llevar correctamente el proceso de deleción del gen *mmpL4b* para la formación de la mutante Δ *mmpL4b* a partir de la variante S, se llevó a cabo un PCR utilizando los primers *mmpLAb3* y *mmpLAb3-R* (Wild type = WT). Se encontró que la cepa WT poseía un producto de 2690bp, mientras que la variante R sólo contaba con 560 pb, lo cual es consistente con el tamaño del gen *mmpL4b* (ver figura 13).

Por otro lado, se realizó un Southern blot hibridado con ADN probar la superposición del gen *mmpL4b* en la mutante Δ *mmpL4b* a través de un distinto patrón de bandeo en comparación con la variante WT; en donde se demuestra la pérdida del gen en la transformante (ver figura 14)

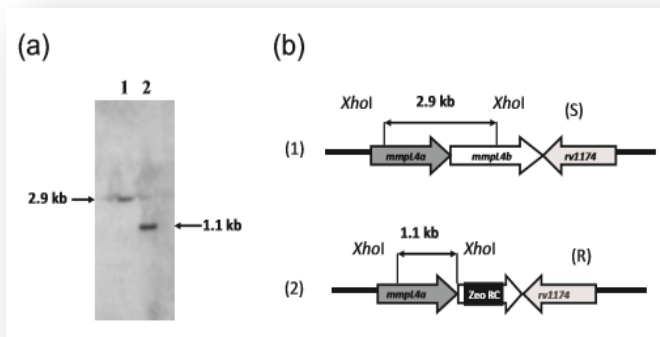


Figura 36 Análisis de Sotthern blott del locus *mmpL4b* en *M. abscessus* WT (1) y mutante (2). b) Representación esquemática del operón WT (1) y de la mutante (2) Tomado de Nessar et al., 2011

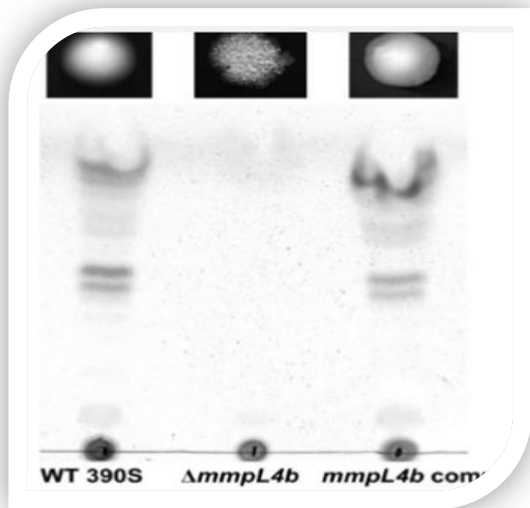


Figura 37 Fenotipo de las cepas S, Δ mmpL4b y mmpL4b complementada y expresión de GPL vía TLC. Tomado de Nessar et al., 2011

Además de estas pruebas se realizó la caracterización del fenotipo de las cepas WT, mutante Δ mmpL4b y la complementada con el fin de confirmar la pérdida del gen mmpL4b. Se encontró por medio de la prueba de TLC, que la expresión de GPL en la cepa WT posee algunos puntos de expresión y posee un fenotipo S, mientras que en la mutante Δ mmpL4b poseía una mínima expresión de GPL y poseía un fenotipo R. En el caso de la cepa complementada (con la incorporación del plásmido pNBVI- mmpL4b) se encontró que expresaba GPL y poseía un fenotipo S, consistente con lo que se esperaba encontrar (ver figura 15).

b. Sliding motility

Se sabe que la propiedad de sliding motility y formación de biofilm permite la sobrevivencia de *M. abscessus* principalmente en el ambiente. Estos procesos son esenciales de la expresión de los GPL, en donde una menor expresión por parte del fenotipo S permite que esto ocurra a diferencia de la alta expresión en el fenotipo R.

Por lo tanto, se llevó a cabo una prueba de sliding motility, en donde se creció la bacteria en medio líquido 7H9, posteriormente se pasó a agar y se incubó a 37°C por 3 días.

Por otro lado, para evaluar la formación de biofilm, la bacteria se cultivó en un dispositivo Clagary para biofilms en medio Gibco e incubado a 37°C en agitación. El medio era reemplazado cada 24 horas en un tiempo total de cultivo de 72 horas. Posteriormente las piezas del biofilm unidas a la tapa del dispositivo se colocaron en una placa de 96 pozos con medio Iscove, se realizó un lavado y por último se removieron las piezas del biofilm y se colocaron en tubos con PBS estéril y se realizaron las UFC de estas.

Tras la realización de estas pruebas, se encontró que la variante WT y la *mmpL4b* complementada exhiben consistentemente formación de biofilm y sliding motility en contrario a la mutante $\Delta mmpL4b$. Por otro lado, se comparó a la variante 390V (mutante espontánea proveniente de la variante S, carente de la expresión de GLP) con la mutante $\Delta mmpL4b$ y se encontró que estas no formaban biofilms, ni poseían sliding motility en comparación con la cepa WT (ver figura 16).

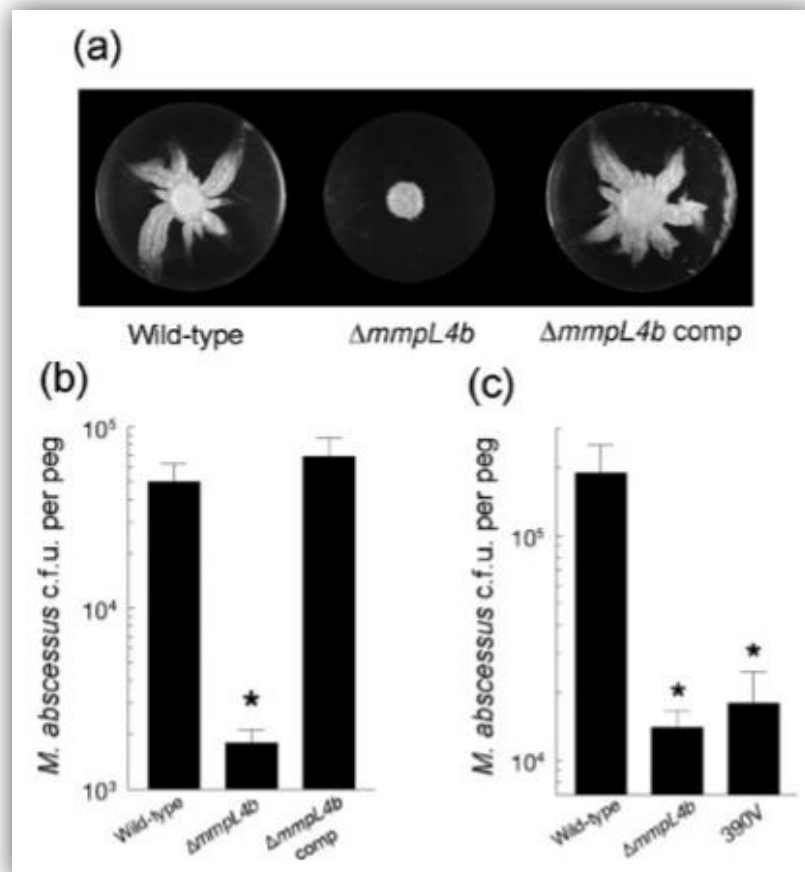


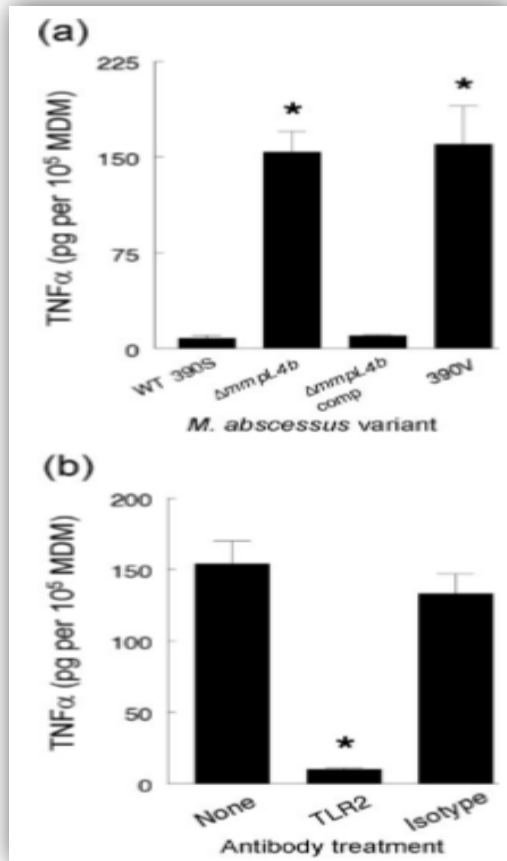
Figura 38 Prueba de sliding motility y formación de biofilm en las cepas de *M. abscessus* WT, mutante $\Delta mmpL4b$ y *mmpL4b* complementada. Tomado de Nessar et al., 2011

c. Estimulación de macrófagos por TLR2

Se sabe que las variantes 390R y 390V estimulan a los macrófagos por medio de la estimulación de los TLRs en la respuesta inmune innata; mientras que la variante S (WT) no ocurre este fenómeno por el proceso de enmascaramiento de los GLP. Por lo que se evaluó la estimulación de macrófagos vía TLR en las cepas $\Delta mmpL4b$ y $\Delta mmpL4b$ complementada. Se halló que la $\Delta mmpL4b$ estimula a los macrófagos vía TLR2, similar a lo que ocurre en la variante 390V, observable debido a la liberación de TNF-alfa por parte de los macrófagos, lo cual es correspondiente a lo esperado. También este experimento comprueba que el

proceso de enmascaramiento evita el reconocimiento por TLR2 en los macrófagos (ver figura 17).

d. Replicación en macrófagos



Por último se evaluó la habilidad de replicación en macrófagos derivados de monocitos (MDM), donde se sabe que las cepas carentes de la expresión de GPL (390R y 390V) son capaces de replicar en estas células, mientras que el fenotipo S (WT) no lo puede lograr. Por ello se estudió este suceso en la variante $\Delta mmpL4b$ y *mmpL4b* complementada; en la primera se encontró que se puede replicar en macrófagos (propio a lo que se esperaba), mientras que en la *mmpL4b* complementada esto no ocurría al inicio e inclusive fomento la agregación de estos. Sin embargo la pérdida del plásmido a las 48 horas generó con ello la falta de expresión de *mmpL4*, lo cual conllevó a la recuperación de la habilidad de esta en la replicación en macrófagos (ver figura 18).

Figura 39 ELISAS para TNF-alfa. a) Activación de marófagos por las variantes de *M. abscesus*: WT, $\Delta mmpL4b$, *mmpL4b* complementada y 390 V evaluado mediante la prueba de ELISA para TNF-alfa. b) Liberación de TNF-alfa de los macrófagos humanos en respuesta a 390S, está bloqueada por el anticuerpo anti-TLR2. Los MDM humanos se preincubaron con anticuerpo anti-TLR2 o anticuerpo de control de isotipo y luego se desafiaron con *M. abscessus* 390S $\Delta mmpL4b$. Los sobrenadantes de cultivos se recogieron 2 h después de la adición de bacterias y se ensayaron mediante ELISA para TNF-alfa. Tomado de ...

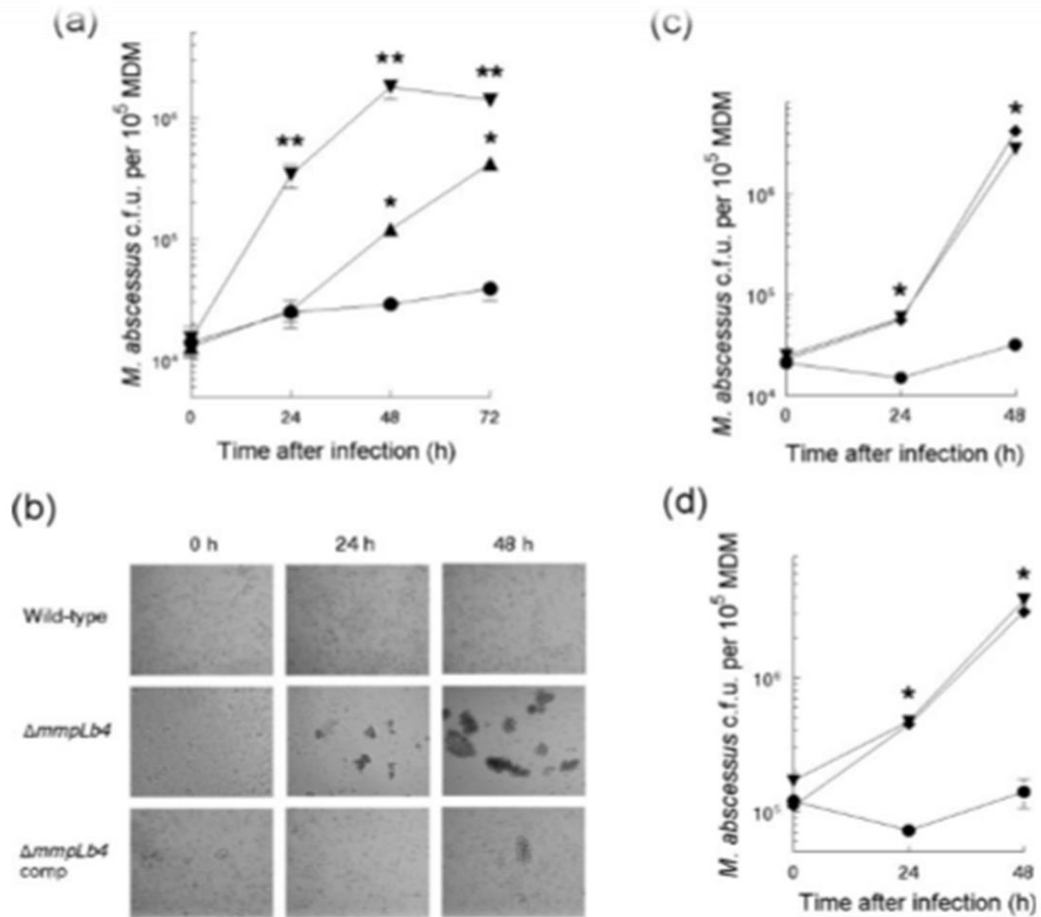


Figura 40 Capacidad de replicación de *M. abscessus* en macrófagos derivados de monocitos (MDM). a) Crecimiento la cepa Δ mmpL4b (▼), 390S (●) y la mmpL4b complementada (◆). b) Progresión de la infección por macrófagos en diferentes tiempos (0, 24 y 28). c) Crecimiento de *M. abscessus* en monocapas de MDM por las cepas Δ mmpL4b (▼), 390S (●) y 390V (◆). d) Crecimiento de *M. abscessus* en MDM de las cepas Δ mmpL4b (▼), 390S (●) y 390V (◆) tras la aplicación de amikacina inmediatamente después de la infección a una concentración de 64 mg/ml Tomado de Nessar et al., 2011

ii. Conclusiones del estudio

Se demuestra que la pérdida o cambio en la expresión de una molécula en la membrana, como los GLPs pueden modificar el fenotipo, capacidad de formación de biofilms y sliding motility y en características referentes a la respuesta inmune, como es el caso de la capacidad de activación y replicación en macrófagos vía TLR2.

Por otro lado se comprueba que la cepa S (WT) posee una expresión mínima de GPL, tiene la capacidad de sliding motility y formación de biofilms, enmascarar a los GPL y con ello evitar la activación y replicación en los macrófagos vía TLR2, pero fomenta la agregación de estos; fomentando así el potencial patogénico en la colonización, contrario a las cepas 390R y 390V, quienes promueven la respuesta inmune en el hospedero (Ver Anexo I).

Capítulo III: Modelo de estudio

III. Modelo

Los modelos animales son claves en la investigación científica, en el caso de las enfermedades de importancia médica, estos modelos ayudan a elucidar cómo es que se desarrolla una infección, como por ejemplo las vías y mecanismos de infección, la respuesta inmune del huésped tanto natural como adaptativa, las patologías aparentes, consecuencias de la enfermedad e inclusive permite la experimentación con terapias de diferentes índoles como es el caso de terapia génica, vacunación y drogas; entre muchas otras aplicaciones del modelo (Acosta et al; 2011).

Para elegir correctamente un modelo de estudio, se debe de conocer a fondo distintos aspectos de su composición biológica, desde características genéticas, fisiológicas y biológicas, como es el caso de los ciclos o ritmos, desarrollo embrionario, particularidades del sistema inmune innato y adaptativo, etcétera; esto con el fin de estructurar experimentos válidos y reproducibles bajo condiciones determinadas, tanto experimentalmente como bioéticamente; que además brinden la opción a extrapolar los datos obtenidos a humanos (Acosta et al; 2011).

1. Modelos utilizados para el estudio de *M. abscessus*

Para la comprensión de esta micobacteria, se han utilizado varios modelos de estudio, quienes han revelado información importante que ha llevado al progreso en cuanto al conocimiento adquirido sobre este microorganismo. El artículo de Revisión de Bernut y colaboradores del 2017, titulado "*The Diverse Cellular and Animal Models to Decipher the Physiopathological Traits of Mycobacterium abscessus infection*" se encarga de hacer un resumen de los modelos utilizados en el estudio de esta bacteria, así como de los beneficios y limitaciones de los mismos.

i. Modelos celulares

Las líneas celulares más utilizadas corresponden a monocitos, neutrófilos y macrófagos, derivados de humanos o ratones. Estos modelos permiten describir las primeras fases de la infección por *M. abscessus*. El siguiente esquema resume algunos de los hallazgos más relevantes:

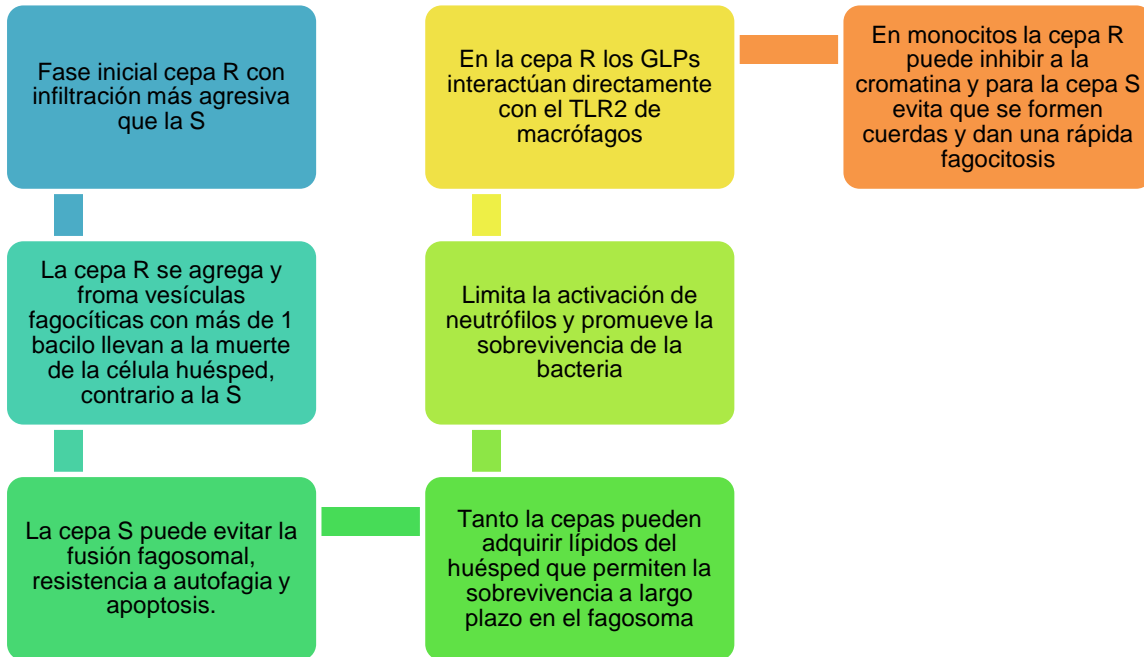


Figura 41 Principales descubrimientos en líneas celulares (Bernut et al; 2017).

ii. Embriones de pez cebra

En este modelo animal *in vivo*, se visualizó a través de imágenes de alta resolución parte de las interacciones entre el patógeno y el sistema inmune del huésped. En este modelo se observó la invasión de tejido muscular, así como la diseminación de cordones a través del SNC de la bacteria. También se analizó que el fenotipo R de forma extracelular previene la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos promoviendo la infección y muerte del embrión. Por otro lado se evaluó la contribución del TNF en la activación capacidad bactericida de macrófagos, que lleva a la limitación del crecimiento de la bacteria, así como la reclusión de neutrófilos por IL-8 que permite el desarrollo y mantenimiento de granulomas (Bernut et al; 2017). Sin embargo este modelo no es completamente adecuado dada la enorme separación filogenética de mamíferos con peces además de las diferencias anatómicas.

iii. Modelo murino

Varios tipos de modelos murinos se han utilizado para evaluar los procesos patogénicos que se dan tras la infección con esta micobacteria. Ejemplos de esto corresponde a ratones desnudos, C57BL/6, KO IFN- γ , Ob/ob (Ordway et al; 2008), SCID y GM-CSF $^{-/-}$ (Bernut et al; 2017). El modelo de infección estudiado hasta la fecha corresponde a la enfermedad pulmonar, en la cual es posible establecer con dosis y vías específicas una infección pulmonar, así como de las principales citosinas involucradas durante esta infección y el daño pulmonar (granulomas,

zonas necróticas, etcétera) (Bernut et al; 2017). Sin embargo es rápidamente controlado, contrario a lo que puede ocurrir en el humano.

iv. Drosophila

En este modelo estudiado por Chun-Taek y colaboradores (2013), se demostró que es posible establecer una infección dosis dependiente con capacidad de infectar músculo y SNC. También se demostró que *M. abscessus* es detectada por la vía de señalización Toll. Al igual que en el pez cebrá, las diferencias anatómicas y filogenéticas no permiten extrapolar la información recabada totalmente al humano, pero continúan siendo una fuente de información básica (Chun-Taek et al; 2013).

v. Cerdos de guinea

En un estudio realizado por Ordway y colaboradores en 2008, se encontró que con una baja dosis de bacteria en pulmones a los 30 días la bacteria se diseminó al bazo y nódulos linfáticos, mientras que con una alta dosis en los pulmones no hubo diseminación a los nódulos linfáticos pero sí hubo una alta carga bacilar en pulmones y bazo. Además para este tiempo se encontró en los pulmones al día 30 se observaron granulomas bien formados, en cambio para el día 60 en las dosis altas generan una inflamación granulomatosa severa compuesta por macrófagos epiteliales y agregados organizados de linfocitos (Ordway et al; 2008).

2. Descripción del modelo

El estudio se llevará a cabo en ratones macho BALB/c de 6-8 semanas, en donde se infectarán con las cepas 390S (T1), 390R (T2), Δ MmpL4b (T3) y Δ MmpL4b complementada (T4). En este modelo se realiza la infección subcutánea en los cojinetes plantares con una carga bacilar específica de una de estas cepas. Para evaluar las características de estas respuestas, se sigue la cinética de “sacrificio” en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120 y 150 post-infección.

Una de las ventajas más grandes que posee este modelo de estudio, es la similitud a la biología humana en términos de respuesta inmunitaria, que está reflejado a un nivel genético. Además la vía de infección, es análoga a la vía de infección en humanos (Acosta et al; 2011).

Otra de las ventajas está otorgada por la información existente y las herramientas metodológicas existentes para ratones, ya que estos han sido a lo largo de la historia un modelo clásico de estudio, adicionando a esto una manipulación sencilla especializada, así como a la manutención relativamente económica en términos monetarios y espaciales.

Sin embargo no hay que olvidar que existen diferencias entre estos, como es el caso de la resistencia natural del ratón a la infección a diferencia de los humanos, así como otras discrepancias durante el desarrollo de la enfermedad (Acosta et al; 2011), por lo que la extrapolación no es directa.

Capítulo IV: Objetivos y planteamiento del problema

IV. Objetivos

1. General

Evaluar la importancia del gen *mmpL4b* en la capacidad histopatogénica de *M. abscessus* inoculado vía subdérmica en cojinetes plantares de ratones BALB/c

2. Particulares

- Evaluar la carga bacteriana en cojinetes plantares infectados con las cepas T1, T2, T3, T4 de *M. abscessus* y H37Rv de *M. tuberculosis*.
- Medir el grosor de los cojinetes plantares como medida indirecta de la inflamación.
- Evaluar las características histopatológicas de los cojinetes plantares en cortes teñidos con H&E.

V. Justificación

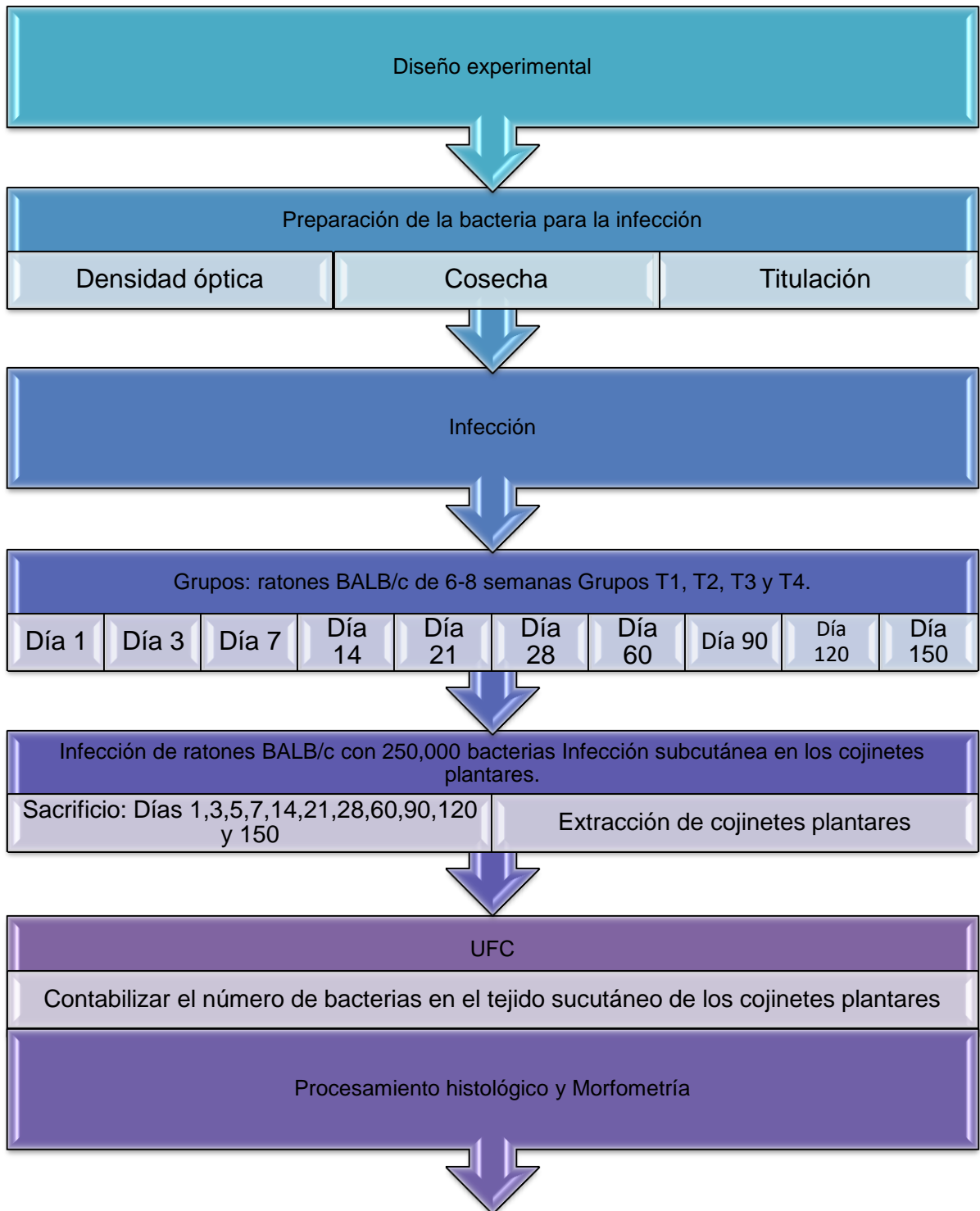
Mycobacterium abscessus, una bacteria de crecimiento rápido, sumamente resistente a antibióticos y muy difícil de erradicar, genera un aumento de enfermedades principalmente localizadas en el tejido subdérmico. Sin embargo, hay una carencia de modelos animales en donde se pueda estudiar a fondo como se desarrolla esta enfermedad. Hasta la fecha, uno de los acercamientos realizados mediante experimentos *in vitro*, indica que el gen *mmpL4b* que codifica para GLPs, puede ser un elemento importante en el reconocimiento de estas bacterias por el sistema inmune; y aunque ya se conoce el efecto de la delección del gen, no hay estudios *in vivo* para evaluar su importancia en la capacidad histopatológica de *Mycobacterium abscessus* a lo largo de la enfermedad.

VI. Hipótesis

A lo largo de una cinética de infección subdérmica en el modelo *in vivo* de cojinetes plantares de ratones BALB/c, las cepas lisas T1 (silvestre) y T4 $\Delta mmpL4b-comp$ que poseen presencia activa del gen *mmpL4b* de *Mycobacterium abscessus* presentarán un comportamiento histopatogénico similar caracterizado por una baja carga bacilar con mínima infiltración inflamatoria, mientras que las cepas rugosas T2 (silvestre) y T3 $\Delta mmpL4b$ presentarán parámetros contrarios.

Capítulo V: Planteamiento experimental

VII. Estrategia experimental



Nota: En las lesiones cutáneas se debe de limpiar con alcohol antes de aspirar las muestra debajo del borde de la lesión para así evitar la contaminación (Valdés y Sid; 2004)

VIII. Metodología

Los experimentos se llevaron a cabo en un laboratorio con un nivel de contención nivel 3, pese a que se trabaja con microorganismos clasificados como grupo de riesgo 3, cumpliendo las normas de bioseguridad que establece la OMS en su convenio de Ginebra en el 2005.

1. Preparación de la bacteria para la infección

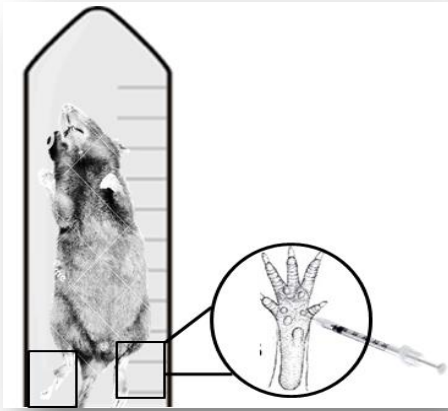


Figura 42. Proceso de inoculación. En esta imagen se muestra gráficamente cómo es realizada la inoculación en los cojinetes plantares de ratones

La bacteria se creció en medio 7H9 Middlebrook enriquecido con glicerol al 0.5% y se incubó a 37°C adicionado con 5% de CO₂ en agitación constante durante 5 días para las cepas de *M. abscessus* y 21 días para *M. tuberculosis* H37Rv. La curva de crecimiento fue monitoreada diariamente por espectrofotometría. En el momento en que se llega a la fase logarítmica aprox 0.4, la cual es identificada tras una medición de densidad óptica de 600 nm; la micobacteria fue lavada con PBS, tres veces, se realizaron alícuotas y se congelaron a -70°C. Se determinó el número de UFC por ml, se calculó y ajustó a 2.5×10^6 bacilos por 100

microlitros.

2. Infección

Para inducir la patología subdérmica, los ratones fueron colocados en un tubo de 50mL con dos aperturas laterales ubicadas en el extremo inferior del tubo. De las aperturas laterales se sacaron las patas cuidadosamente y se inoculó en el centro del cojinete plantar trasero izquierdo y derecho con una jeringa de insulina de calibre 0.5 mm, 10uL de la bacteria suspendida en PBS. Para el grupo control sin infección, se administraron 10ul de solución salina siguiendo el mismo proceso descrito para a los grupos infectados con las siguientes cepas (ver figura 20).

Una vez infectados se colocaron 5 ratones en cajas especiales, con acceso ilimitado de agua y comida durante su participación en el experimento.

Se utilizaron durante todo el experimento 360 ratones. Para el primer experimento se realizaron grupos de 5 ratones de acuerdo al día de sacrificio por cada una de las cepas de la siguiente forma:

Día de sacrificio	3	7	14	21	28	60	90	120	150
T1	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T2	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T3	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
H37Rv	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Solución salina	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Total de ratones por día	30	30	30	30	30	30	30	30	30
								Total de ratones	270 Ratones

Para el segundo experimento se repitieron los experimentos para los días tardíos de la infección generando los siguientes grupos:

Día de sacrificio	90	120	150
T1	5	5	5
T2	5	5	5
T3	5	5	5
T4	5	5	5
H37Rv	5	5	5
Solución salina	5	5	5
Total de ratones por día	30	30	30
		Total de ratones	90

3. Medición indirecta de la inflamación de los cojinetes plantares



Figura 21 Medición de los cojinetes plantares. En esta imagen se muestra el proceso exacto de cómo es que deben de ser medidos correctamente.

Los cojinetes plantares izquierdos de cada ratón se midieron de acuerdo a la cinética de sacrificio, es decir en los días 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120 y 150. Adicionalmente se realizaron mediciones para los días 70, 80, 100, 130 y 140.

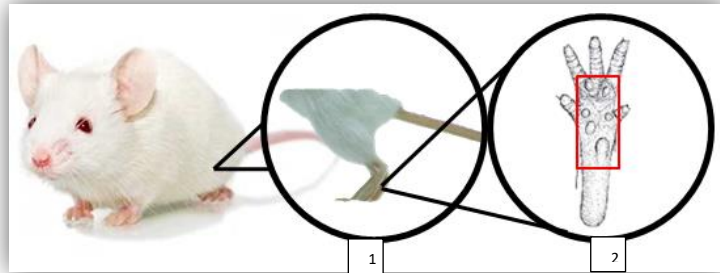
El proceso de medición de los cojinetes plantares consiste en colocar a los ratones dentro de los tubos falcon con orificios en la parte terminal descritos anteriormente. Se sacan las patas con cuidado de no lastimar al ratón tratando de no tocar los cojinetes. Posteriormente se utiliza un calibrador micrométrico para medir el

grosor únicamente de los cojinetes plantares, se toman 3 mediciones por ratón (ver figura 42).

4. Sacrificio

Después de la infección se sigue con una cinética de sacrificio en los días 3, 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 120. En este proceso se obtuvieron las muestras para realizar los procesos de UFC's e histología.

Los ratones son sacrificados en una cámara de éter etílico por medio de una sobredosis. Una vez fallecido el ratón, se extraen los órganos relevantes para la investigación. Con cuidado de aplastar los cojinetes plantares traseros, se lava las patas con abundante agua y jabón y se secan delicadamente con una gasa estéril con el fin de eliminar cualquier contaminación proveniente de las bacterias fecales, así como de los residuos de aserrín. Posterior a esto, para las muestras destinadas para histología con unas tijeras



quirúrgicas para hueso, se corta por encima del tarso y se colocan en frascos individuales con alcohol al 96%. Para el

Figura 43 Proceso de corte de cojinetes plantares. 1. Muestras para histología: En este punto se realiza el corte de la pata por encima del tarso y se deposita en alcohol. 2. Proceso completo de extracción del cojinete plantar.

caso de las muestras destinadas para UFC's, con unas tijeras estériles para cutícula, se realiza un corte subcutáneo cuidando de no tocar nervios o huesos se retira el cojinete plantar y se almacena en tubo MP de 2ml, que inmediatamente se conserva en nitrógeno líquido. Por último, una vez recolectadas todas las muestras de órganos se elimina el cadáver en bolsas amarillas especiales para residuos biológicos y se lleva la bolsa para ser tratada con autoclave para evitar la diseminación de bacterias al medioambiente (ver figura 22).

5. UFC's

Primero se realiza el control de calidad de la infección por medio de UFC's con la finalidad de confirmar el número de bacterias con las que se infectaron a los ratones,. Se realizaron diluciones de -1 a -4 y se procedió a sembrar 10 uL de cada una de la cepas en placas con agar 7H10 adicionado con OADC y 0.5% de glicerol. Al transcurrir el tiempo indicado de crecimiento para cada una de las cepas, se contabilizó que para cada sujeto de estudio se le inoculó un aproximado de 250,000 bacterias vivas suspendidas en 10uL de PBS Tween 80 al 0.5%.

Tras el sacrificio un cojinete plantar de cada ratón fue destinado para contabilizar las UFC's presentes en el tejido. En tubos estériles, el tejido se colocó entre 2 perlas de cerámica especiales para triturar tejido y se molió en seco utilizando el equipo FastPrep. Posteriormente se les adicionó 1 mL de PBS estéril y se realizaron 3 molidas, cuidando de mantener las muestras siempre en hielo. Posteriormente cada muestra del grupo se sonicaron durante 45 segundos,

agitaron 10 y se procedió a realizar diversas diluciones seriadas de la muestra utilizando placas de 96 pozos y PBS tween 80 al 0.5%. Las diluciones del día 3-28 fueron de concentrado (C) a -3, mientras que del día 28 al 150 se utilizaron C,1:2, 1:5,-1. A continuación se procedió a sembrar en placas con medio agar 7H10 Bacto Middlebrook enriquecido con OADC y glicerol al 0.5%, 10 µL por muestra como se muestra en la

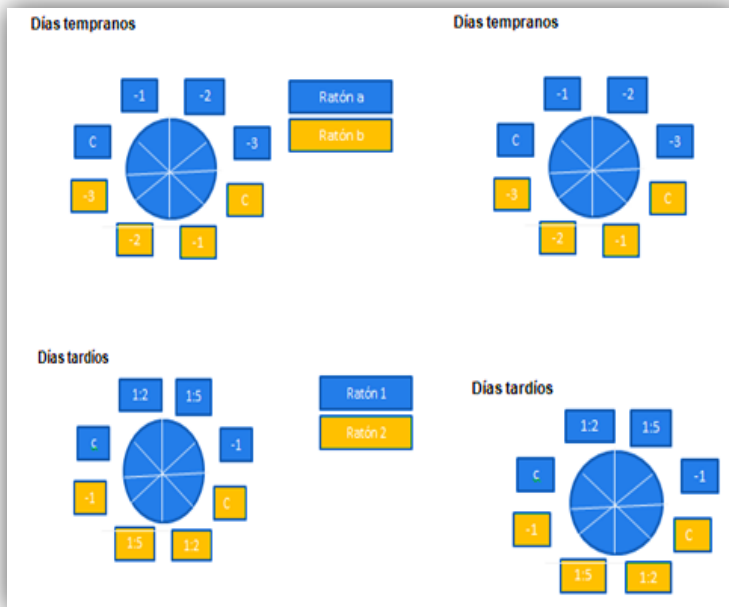


Figura 44 Posición de diluciones. Duplicados colocadas en las caja con medio de cultivo agar 7H10 Bacto Middlebrook enriquecido con OADC y glicerol al 0.5%

ilustración lateral.

Subsecuentemente se incubaron a 37°C adicionado con 5% de CO₂ durante 5 días para las cepas de *M. abscessus* y 21 días para *M. tuberculosis* H37Rv y se procede a contar las colonias presentes en cada una de las diluciones para realizar los cálculos correspondientes.

6. Histología

El cojinete plantar destinado para histología se dejó por 24hrs en alcohol de 96° y procesado para su inclusión en parafina. Una vez incluidas las muestras, se realizan cortes de 0.4 µm y se tiñen con hematoxilina & eosina para el análisis histológico.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado fue realizado en el programa GraphPad Prism 6. Se realizaron ANOVAs de 2 vías para determinar la significancia estadística con una

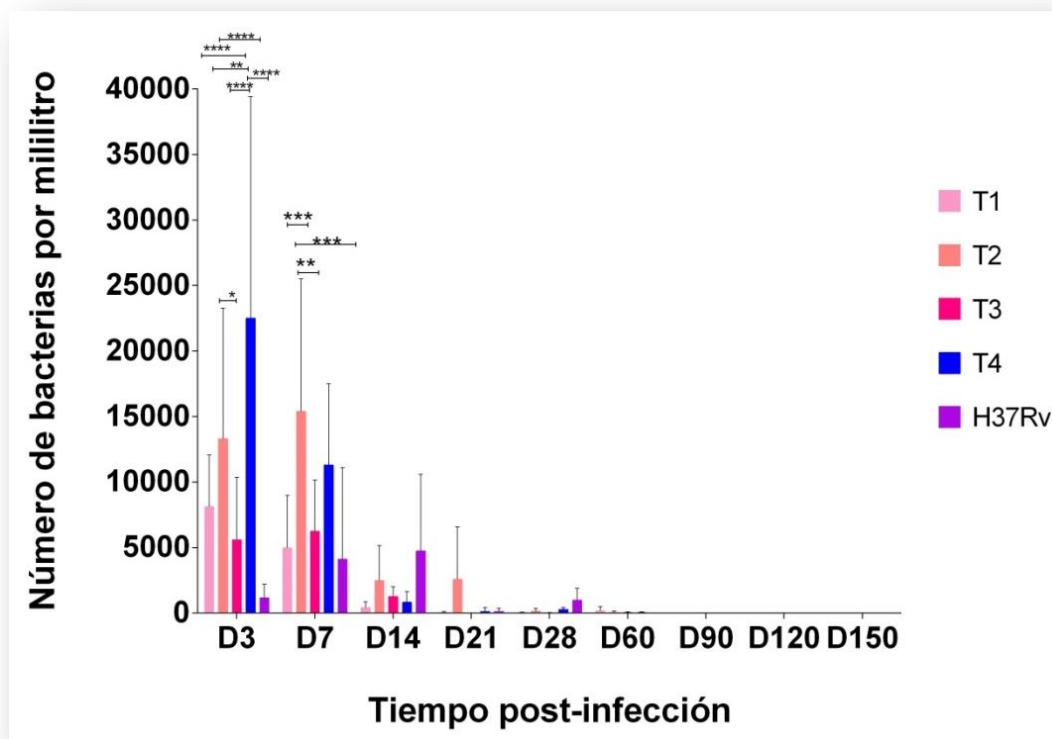
$P < 0.05$, en el cual se realizó un análisis de múltiples comparaciones entre las medias de los grupos, adicionado de una corrección de tipo Bonferroni.

Capítulo VI: Resultados

IX. Resultados

a) Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias de los cojinetes plantares

En este punto se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC's), correspondientes a cada una de las cepas en todos los días de sacrificio establecidos en la metodología con el fin de saber el número de bacterias presentes en los tejidos.



Gráfica 1. Unidades formadoras de colonias en homogenizados de cojinetes plantares de ratones. Se observa en los primeros días post-infección un control rápido de la carga bacteriana, particularmente para las cepas T3 y H37Rv; mientras que en los días posteriores la tendencia continúa a la disminución hasta el día 90 en donde ya no se encuentra carga bacteriana cultivable. Las diferencias significativas entre los grupos según su valor p se encuentran marcadas con * $p > 0.05$. N=6

En la gráfica 1, se observa un control rápido de la infección, debido a que de las 250,000 bacterias inoculadas inicialmente, al día 3 y 7 post-infección sólo alrededor del 10% del inóculo inicial se encontró en el tejido. A pesar de encontrar una disminución los datos no permiten asegurar una tendencia, debido a que la cantidad de bacteria para los días posteriores al 7 es mínima y no se encuentran diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, cabe destacar de manera

particular, que para el día 3 y 7, la carga bacteriana para las cepas T3 y H37Rv fue disminuida significativamente en comparación con todas las demás cepas.

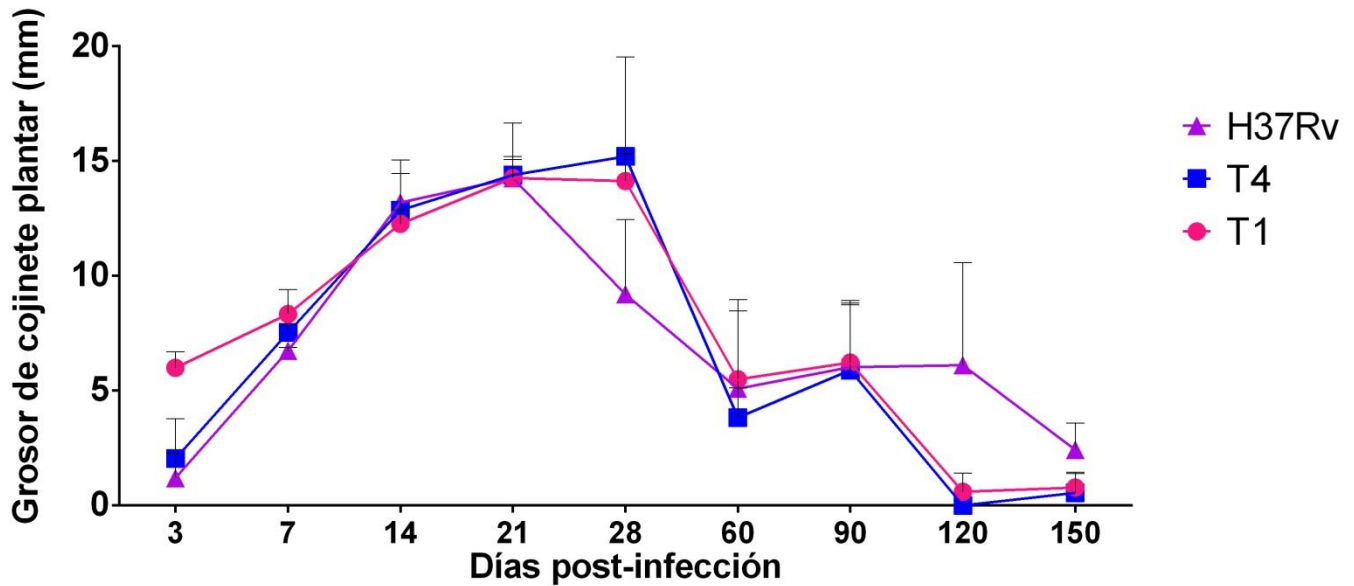
Siguiendo con la cinética, la carga bacilar continuó disminuyendo para el día 60, dónde se encontró una cantidad mínima de micobacterias, mientras que para el día 90 fue eliminada completamente en todos los tejidos. De esto se deduce que el crecimiento bacteriano es controlado rápidamente en menos de 60 días y que H37Rv inoculada de forma subdérmica puede ser erradicada en 28 días, contrario a lo que ocurre en el transcurso de infección por vía aérea. Cabe recalcar que no se observó ningún incremento en los días 120 y 150 post-infección (ver gráfica 1).

b) Inflamación de cojinetes plantares

1. Comparación entre cepas lisas

Tras realizar la comparación de las cepas lisas T1 y T4 durante la cinética completa, se puede observar que de manera general, la dinámica de inflamación de los cojinetes plantares es sumamente parecida conforme a lo que se esperaba. En primera instancia, se analiza que durante el día 3 existe una pequeña inflamación que va aumentando progresivamente hasta llegar a su pico en el día 28. Posterior a este día, hay una disminución abrupta en cuanto al grosor, tendencia que llega prácticamente a las condiciones basales, representadas por el cero 0. Por ende, del día 3 al 28, se van a considerar como la fase temprana de la infección y del día 60-150 fase tardía

Cabe destacar que la cepa H37Rv si tiene un comportamiento parecido, a las cepas de *M. abscessus*, sin embargo, difiere en cuanto a los días picos de inflamación, reactivación y disminución progresiva de la infección.



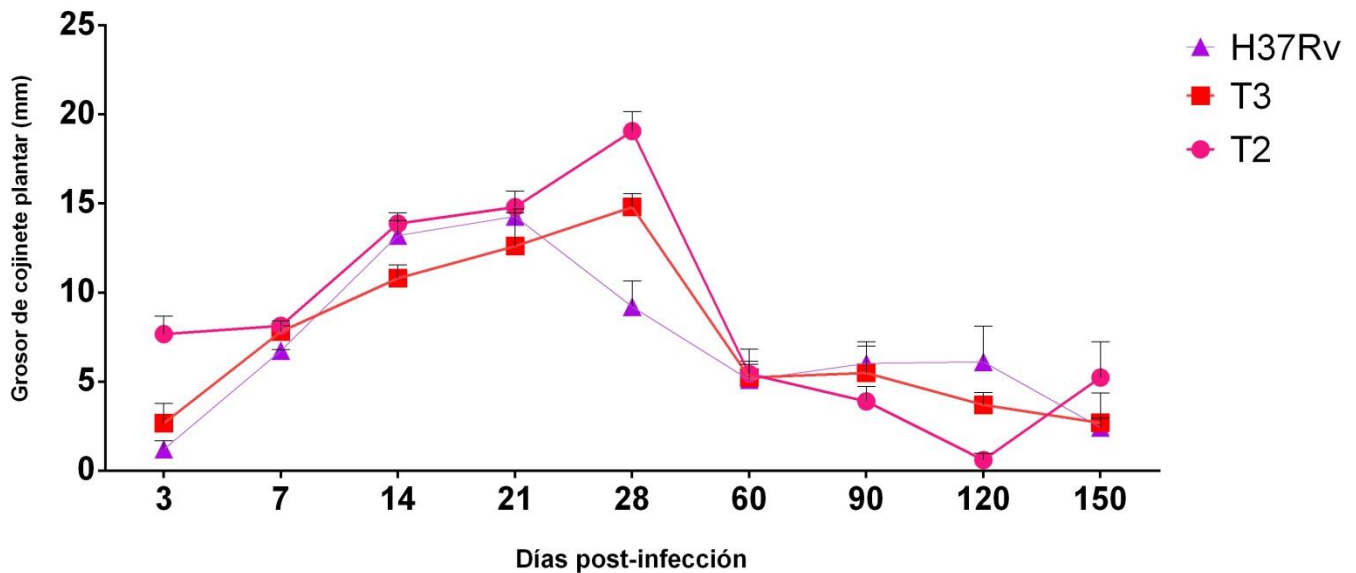
Gráfica 2. Comparación de la inflamación de los cojinetes plantares en los ratones inflamados con las cepas lisas T1 y T4 durante la cinética completa. Se observa una creciente inflamación hasta el día 28 y posteriormente ésta se va reduciendo paulatinamente. Donde cero es el equivalente al estado basal de inflamación determinado en ratones sanos. N=6

De manera específica, para el caso de las micobacterias T4 y T1 lisas y el grupo externo H37Rv, se analizó la progresión del grosor de los cojinetes plantares a lo largo de la fase temprana de la infección. A grandes rasgos se puede observar que todas las cepas generan un incremento en el grosor de los cojinetes de forma ascendente hasta el día 21 y posteriormente disminuye el tamaño de los cojinetes con excepción de la cepa T4. Por otro lado llegan a la cresta de la medición del grosor durante esta fase de la infección.

En cuanto a la fase tardía, es decir del día 60 al día 150, de forma genérica se observa que a comparación de la fase temprana de inflamación, hay una disminución en cuanto al grosor delimitado, con algunos puntos de aumento y disminución, culminando en grosores muy parecidos a los basales, pero sin que desaparezca por completo la diferencia del grosor en comparación a las medidas basales

2. Comparación entre cepas rugosas

Por otro lado se realizó la comparación de la cinética completa de las cepas con fenotipo rugoso, T2 y T3 comparada con el grupo externo H37Rv. A grandes rasgos se analiza que el grosor de los cojinetes plantares es mayor para las cepas rugosas que para las cepas lisas durante la cinética en la fase temprana (ver gráfica 3).



Gráfica 3 Inflamación de cojinetes plantares de ratones infectados con las cepas T2, T3 y H37Rv durante la cinética completa. Es visible que la inflamación aumenta hasta el día 28 y a partir de este se continúa una tendencia a la disminución. Donde cero es el equivalente al estado basal de inflamación determinado en ratones sanos. N=6

En este caso se analiza que desde el día 3 hay una ligera inflamación que va aumentando progresivamente hasta su pico en el día 28, a excepción de H37Rv quien alcanza este mismo punto en el día 21, efecto similar a lo ocurrido con las cepas lisas. A continuación de este punto, se observa una disminución marcada con respecto al día 28 y para el día 60 la disminución continúa ligeramente, llegando a medidas cercanas a las basales en los últimos días de la cinética.

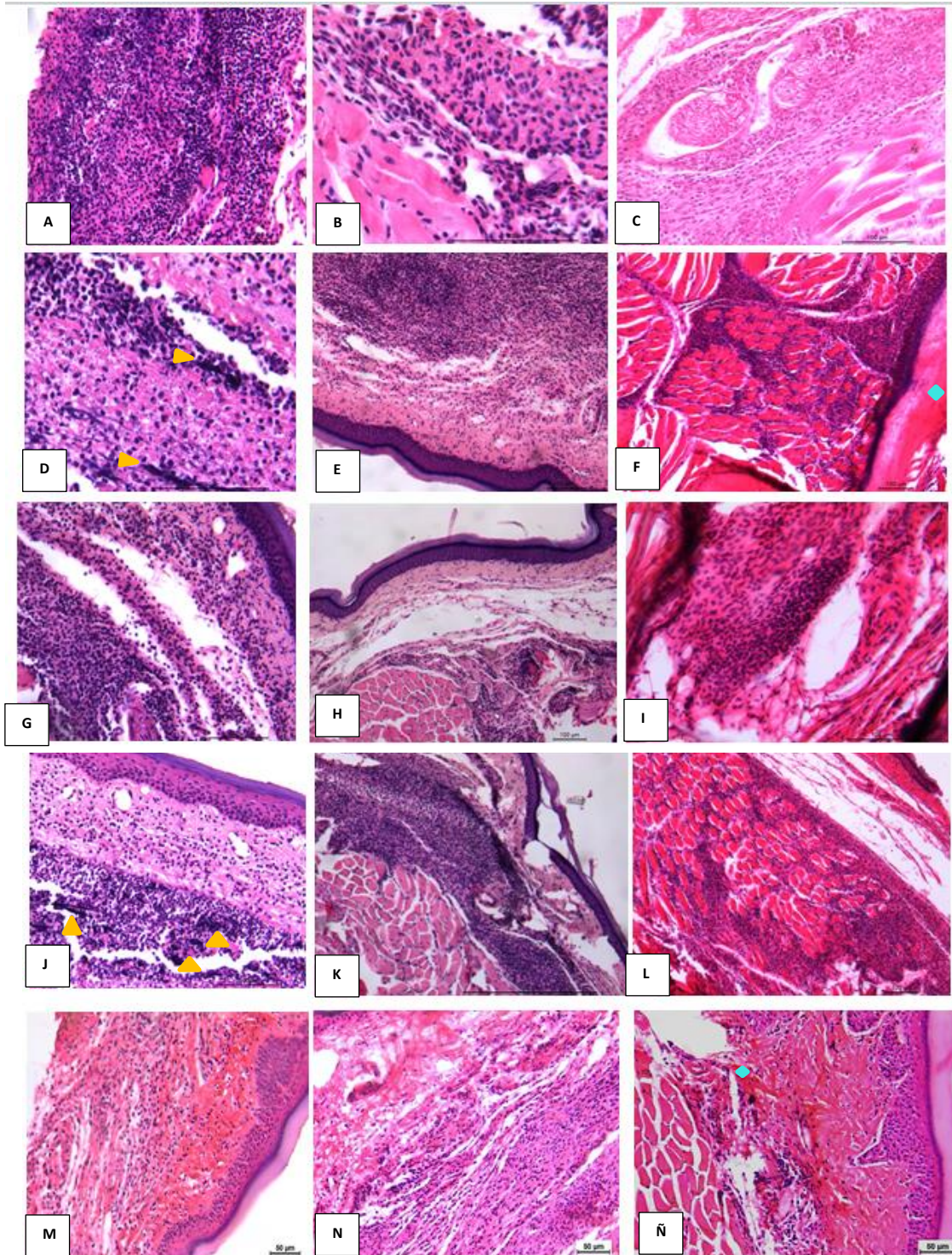
Con respecto a la fase temprana, se puede observar que desde el día 3 hasta al 28 hay una tendencia al aumento, con excepción a la cepa H37Rv quien disminuye en este último día de medición.



Durante la fase tardía en el día 60 se encontró una punteada reducción en cuanto al grosor. En este punto se observa que las 3 cepas poseen un comportamiento igual y no hay grandes diferencias entre éstas. Sin embargo, para el día 90 se muestra una reducción del grosor para la cepa T2, mientras que la T3 aumenta ligeramente, de la misma forma que la cepa H37Rv. Para el día 120 tanto la T2 como la T3 redujeron su grosor, donde la primera disminuyó a niveles basales; mientras que la cepa H37Rv mantuvo estas mediciones.

Finalmente para el día 150 las mediciones de la cepa T2 aumentan, mientras que la T3 y H37Rv disminuyen. Cabe recalcar que a pesar de que han pasado 150 días sigue existiendo diferencia a comparación de las mediciones basales.

c) Histología

Para realizar el análisis histológico, se realizaron cortes de 4 µm teñidos mediante la tinción H&E (Hematoxilina y Eosina). En las siguientes imágenes se muestran las comparaciones más representativas de la composición de los infiltrados inflamatorios presentes en cada una de las cepas durante los distintos tiempos



Fotografía 1 Cortes histológicos de tejidos infectados con las cepas estudiadas en días tempranos post - infección. Las fotografías de la T1: A-C: (días 3, 14 y 28). T2 D-F (días 3, 14 y 28), T3 G-I (días 3, 14 y 28), T4 J-L (días 3, 14 y 28) y H37Rv M-Ñ (días 3, 14 y 28). Necrosis  Fibrosis 

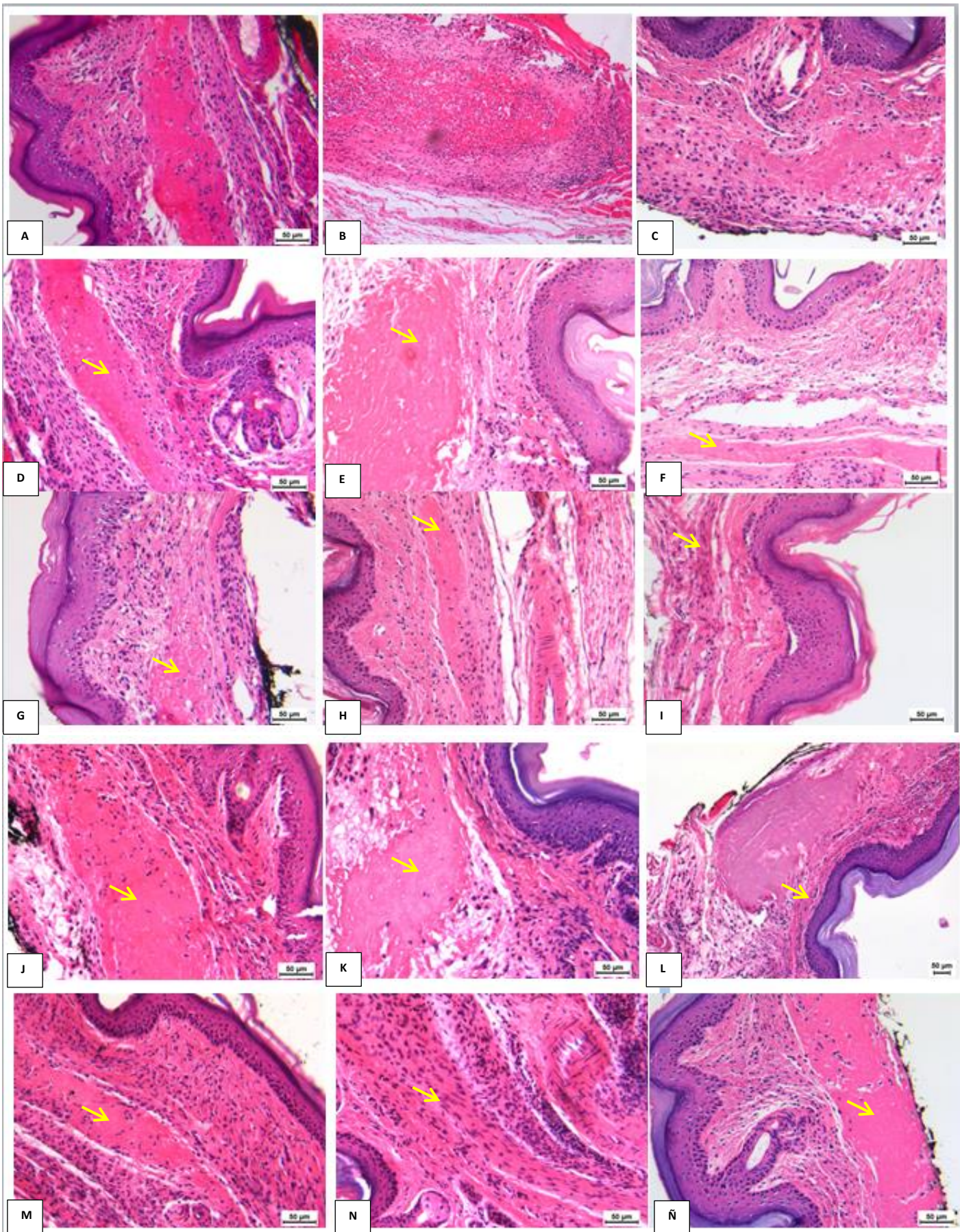
En los primeros días de infección se muestra en todas las cepas un infiltrado inflamatorio extenso compuesto principalmente por macrófagos y linfocitos que abarcan inclusive tejido muscular. Además del día 3 al 7 se observan vasos sanguíneos dilatados y edema en disminución en los días siguientes. Sin embargo, se observan áreas necróticas únicamente en el día 3 en los tejidos infectados con las cepas T2 y T4.

Para el día 28 se aprecia un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos en el caso de la T1, mixto para la T3 y mayormente de linfocitos en T2 y T4. En este punto, la cepa T2 presenta la inflamación más acentuada marcada principalmente por la presencia de linfocitos, ausencia de edema y producción de colágena mediada por fibroblasto. En cuanto a la cepa H37Rv se observa que el infiltrado inflamatorio ya no abarca tejido muscular y se hace más compacto. Adicionalmente se comienza a observar fibrosis en la zona media del tejido celular subcutáneo.

Por otro lado, en los días tardíos, todas las cepas a excepción de la T3 se localizan áreas de fibrosis extensa o compacta sumamente marcada, así como un componente inflamatorio celular cada vez menor de tipo mixto con presencia de tejido mixoide.

Particularmente en el día 90 la inflamación disminuye importantemente en la T1 y T2 y hay presencia de poca inflamación celular y fibrosis delimitada, que al llegar al último día, esta se va a reducir de forma considerable. En contraste, las demás cepas siguen presentando amplia inflamación, compuesta principalmente por macrófagos y linfocitos, a su vez presentan fibrosis extensa.

Destacadamente la cepa T3, no presenta una fibrosis marcada en comparación con las demás cepas, pero aún posee inflamación celular. Además es necesario enfatizar que la fibrosis más marcada corresponde a la T4 y T1, tanto como sorpresivamente a la cepa H37Rv, cuyas áreas son extensas. Lo cual podría indicar que las cepas lisas favorecen por algún mecanismo no descrito la producción de fibrosis, mientras que la cepa rugosa T2 permite una menor fibrosis y mayor infiltrado celular.



Fotografía 2 Cortes histológicos de tejidos infectados con las cepas estudiadas en días tardíos post - infección. Las fotografías de la T1: A-C: (días 90, 120 y 150). T2 D-F (días 90, 120 y 150). T3 G-I (días 90, 120 y 150). T4 J-L (días 90, 120 y 150). H37Rv M-Ñ (días 90, 120 y 150). Fibrosis →

X. Discusión

Existen diversos trabajos que han estudiado genes involucrados en la producción de GLPs, ejemplo de esto es el trabajo de Deshayes y colaboradores, donde evalúan la posición en el genoma de *M. abscessus*, *M. smegmatis* y en *M. tuberculosis*, de los genes *mmpL4b*, *mmpS4* o *mmpL7*, donde se reúne evidencia de que se encuentran dentro de un mismo operón.

Asimismo muestran que en *M. smegmatis* tras la eliminación del gen *MmpS4*, disminuye la expresión de GLP con respecto a las cepas WT; mientras que contrariamente a lo ocurrido en lo reportado por Nessar y cols observaron en *M. abscessus*, el gen *mmpL4b* es crucial para la formación de GLPs, porque su ausencia deriva al fenotipo R y por lo tanto el establecimiento del fenotipo S (liso) (Medjahed y Reyrat; 2009).

En conjunto, Deshayes y cols describen que tanto en *M. smegmatis* como en *M. tuberculosis* *mmpS4* está organizado en un operón junto a *mmpL4*, además que las proteínas del primero interactúan con los productos del segundo, indicando que existe un mecanismo de regulación de la síntesis de GLPs aún no descrito.

Esta información, puede estar indicando que *mmpL4b* en *M. abscessus* es un gen esencial para la formación del mega complejo enzimático de síntesis de GLPs como lo analizado en el estudio de Ripoll y colaboradores del 2006. Además este gen podría estar regulado por *mmpS4* mediante la interacción proteína-proteína, y que en conjunto con otros genes del mismo operón, lleve a la biosíntesis y exportación de GLPs, como sucede en *M. smegmatis*.

Adicionalmente apoyando este punto, se sabe que el análogo de *mmpL4b* en *M. tuberculosis*, *mmpL7* codifica a proteínas resultantes que pueden modificar el acoplamiento y exportación a la membrana celular a través de la enzima policétido sintetasa. Cuando este gen es eliminado, la producción de GLPs se suprime completamente, mecanismo que podría jugar un papel muy similar para *M. abscessus*.

Es necesario recalcar que se necesitan de varios estudios que apoyen estas hipótesis y puedan explicar de manera completa el funcionamiento molecular de *mmpL4b* en *M. abscessus* en la síntesis de GLPs.

Por otro lado, en cuanto a la relación patógeno-hospedero no hay estudios *in vivo* que evalúen los efectos de *mmpL4b* a lo largo de una infección. Adicionalmente a la fecha, aún no hay investigaciones que hayan evaluado las características de una cinética de infección vía subdérmica causada por *M. abscessus* en modelos murinos, asemejando a la vía más común de inoculación de la bacteria e infección

en humanos. Por ello, en este trabajo se tiene como objetivo evaluar el efecto de la delección del gen *mmpL4b* (T3), la cepa complementada T4 y compararlas con las cepas WT lisas y rugosas (T1 y T2 respectivamente)

Lo primero evaluado en este experimento fue la determinación carga bacilar, que en comparación con el inóculo inicial $\pm 250,000$ bacterias, tras los primeros 2 días de la cinética cayó significativamente en todas las cepas, obteniéndose en cultivo tan solo el 10% correspondiente al porcentaje inicial, mientras que los días posteriores fue menor al 1%, y para el día 60 ya no eran cultivables ni detectables por este método. De manera semejante Ordaway y colaboradores en 2008 evaluaron en un modelo murino de infección intratraqueal con cepas lisas de *M. abscessus* y un inóculo semejante (250,000 bacterias) que la infección está resuelta 60 días post infección, hecho análogo a lo encontrado en este estudio por vía subdérmica. Esto podría estar indicando que estas bacterias son reconocidas eficientemente sin importar su morfología y consiguientemente son eliminadas rápidamente por el sistema inmune, contrario a lo que se observó en el caso de los experimentos *in vitro* con monocitos y macrófagos.

Por otro lado, Ordaway observó migración a bazo y nódulos linfáticos, pero en el presente estudio, se observa que tanto las cepas rugosas como las lisas no presentaron ningún tipo de dispersión a otro órgano durante la infección, mediante el conteo de UFC's de ganglios inguinales cercanos al sitio de inoculación, donde el resultado fue nulo crecimiento. Con ello se anula la hipótesis de que la capacidad de realizar desplazamiento horizontal de las cepas lisas está directamente relacionada con un potencial patogénico más relevante durante la infección, al menos en este modelo de infección.

Sin embargo, de forma paradójica, se halla que pese a la ausencia completa de bacteria cultivable a través de UFC's, la inflamación continúa y aunque disminuye tras el paso del tiempo, no desaparece en su totalidad. Este resultado es sumamente notorio tras la observación en donde el pico de inflamación (engrosamiento del cojinete plantar) comienza en el día 28 para las cepas de *M. abscessus*, y en el día 21 para H37Rv, lo cual es completamente opuesto a lo observado para las UFC's, donde para estos días la bacteria era mínimamente cultivada, por lo que de ésta observación surgen 2 hipótesis de por qué la inflamación continúa:

- Presencia latente de la bacteria. Hipótesis apoyada por el hecho de que las cepas pueden adquirir lípidos del huésped que permiten la sobrevivencia a largo plazo en el fagosoma (Bernut et al; 2017) y de esta manera podrían permanecer latentes.

- Elementos restantes de la lisis bacteriana no degradables sencillamente, que contribuyan a la activación de macrófagos y subsecuente atracción de leucocitos, manteniendo una inflamación constante. Hecho posible debido a la gran complejidad que posee su membrana celular.

Por otro lado, el análisis histológico mostró características específicas de cada cepa. En primera instancia, para las cepas lisas T1 y T4 se observó un infiltrado inflamatorio intenso en los primeros días de infección compuesto principalmente por macrófagos y linfocitos; mientras que para los días tardíos, este infiltrado celular se reduce enormemente y produce fibrosis extensa.

De forma contrastante al punto anterior, experimentos *in vitro* realizados por Nessar y colaboradores, muestran que las cepas lisas no son reconocidas eficientemente por macrófagos y por consiguiente no son capaces de replicarse dentro de estas células, sugieren también que se puede limitar la activación de neutrófilos al evitar la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-1 y TNF, promoviendo así su supervivencia. En cepas lisas la presencia del gen *mmpL4b* genera la síntesis de GLPs, y con esto los TLRs no reconocen de manera eficaz a estos organismos, efecto contrario a lo que ocurre en las cepas rugosas, donde son reconocidos fácilmente por el TLR2.

En este estudio, los cortes histológicos de los cojinetes plantares infectados con las cepas T1, T4 y H37Rv, muestran infiltrado celular por lo que se sugiere que hay otro patrón de reconocimiento en macrófagos diferente al de TLR2 para las cepas lisas, que efectivamente reconoce a estos patógenos y puede controlar la infección de una forma eficiente. Esta hipótesis, de reconocimiento por nuevos receptores, puede ser muy probable debido a la presencia de diferentes TLR así como la señalización por otro tipo de moléculas (Owen et al., 2013). Además hay evidencia que apunta que tras la lisis de las bacterias con morfología lisa, es decir, las cepas T1, T4 y H37Rv, queden remanentes específicos de la pared celular que no puedan ser degradados fácilmente por células de la respuesta inmune que contribuyen a la inflamación crónica y que conjuntamente activen de forma eficiente a fibroblastos, generando una fibrosis marcada.

Por otro lado, las cepas rugosas T2 y T3 mostraron un infiltrado celular más acentuado en comparación a las cepas lisas consistente con la medida de inflamación, además de una menor área fibrótica. Esta observación correlaciona a lo que se ha observado en modelos de cultivo celular (Bernut et al; 2017) donde en consecuencia de un mayor reconocimiento por el sistema inmune, favorece reclutamiento celular mediado por citocinas pro-inflamatorias como TNF-alfa. Sin embargo, en este punto es sumamente relevante destacar que la cepa T3 fue la

cepa con una fibrosis mínima e infiltrado celular controlado, en comparación con el resto de las cepas.

Esto sugiere que la ausencia de GLPs debido a la carencia de la expresión de *mmpL4b* o sus productos en la cepa T3, se relacionan directamente con la disminución de la inflamación, así como de leve activación de fibroblastos.

También en la cepa T3, los resultados apuntan que a diferencia de las cepas lisas, los posibles fragmentos de la lisis contribuirían poco a la producción de fibrosis y mantendrían la inflamación celular constante.

Adicionalmente en cortes histológicos Ordaway puntualiza que la presencia de granulomas en infecciones pulmonares se encuentra bien caracterizada, está compuesta por macrófagos epiteliales y agregados organizados de linfocitos desde el día 30 post-infección, así como de daño pulmonar, mientras que para el día 60, ésta inflamación es controlada totalmente. Sin embargo, en ningún corte histológico de este experimento, se observa la presencia de granulomas, pero sí la presencia de un infiltrado mixto de macrófagos y linfocitos, así como la formación de fibrosis. En cuanto al estado de la inflamación, este prevalece aún después del día 150 post infección.

i. Perspectivas

- Realizar el método de hidroxiprolina para analizar el tipo de colágeno en las muestras y contabilizar por software automatizado el área fibrótica.
- Efectuar PCR con la finalidad de saber si la bacteria se encuentra o no en estado viable pero no cultivable.
- Evaluar el patrón de citocinas durante la cinética mediante inmunohistoquímica
- Analizar mediante el método de Killing (*in vitro*) la capacidad de éstas cepas de infectar macrófagos peritoneales J774
- Evaluar el perfil de citocinas de este ensayo por medio de ELISA

Capítulo VII: Conclusión

XII. Conclusión

Se concluye que tras la inoculación subcutánea de cepas de *M. abscessus* y *M. tuberculosis* (H37Rv), se genera una inflamación crónica extensa a pesar de carecer de carga bacilar, que se mantiene únicamente en el sitio de inoculación, Donde las cepas lisas T1 y T4 se comportan histopatológicamente de la misma manera, produciendo un área fibrótica extensa con infiltrado inflamatorio considerable; mientras que la cepa rugosa silvestre T2, genera un patrón contrario, elemento de acuerdo a lo propuesto en la hipótesis. Sin embargo, la cepa T3, a pesar de poseer una morfología rugosa, generó los niveles más bajos de infiltrado celular inflamatorio, así como de un área fibrótica mínima en comparación a las demás cepas. Estas evidencias sugieren que la presencia del gen *mmpL4b* de *M. abscessus* podría actuar de forma diferencial de acuerdo a la expresión, siendo este un mecanismo de *M. abscessus* para evadir el reconocimiento de esta bacteria por el sistema inmune. Además, la presencia activa del gen contribuye de forma significativa en la producción de fibrosis, la ausencia de este, genera un mayor reconocimiento del sistema inmune, ocasionando un infiltrado celular inflamatorio exacerbado y producción menor de fibrosis.

Referencias

2. Acosta A, Nor Norazmi M, Hernández-Pando R, Álvarez N, Borrero R, Infante J.F., Sarmiento M.E. (2011). The Importance of Animal Models in Tuberculosis Vaccine Development. *Malasyan J Med Sci.* 18(4): pp 5-12
3. Aluja, Aline S. (2002) Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2002/gm023n.pdf>. Consultado 03/11/16
4. Beauchamp TL.(1992). The moral standing of animals in medical research. *Law Med Health Care* 1992; Vol 20 No.7
5. Brown T (2008) Genomes. Ed. Médica Panamericana. Tercera edición USA. pp 149.
6. Caverly J.L. , Caceres S. M., Fratelli C., Happoldt C., Kidwell K. M., Malcom K.C. & Nichols D.P. (2015) *Mycobacterium abscessus* Morphotype Comparison in a Murine Model. *PLoS ONE*. Canadá Vol 10, No.2. pp 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0117657
7. Chun-TaekOh, Cheol Moon, Myeong Seon Jeong, Seung-Hae Kwon & Jichan Jang (2013) *Drosophila melanogaster* model for *Mycobacterium abscessus* infection. *Microbes and Infection*, Vol. 15, No. 12, pp 788-795. Korea. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.06.011>
8. Cortes M, Singh AK, Reyrat J-M, Gaillard J-L, Nassif X, et al. (2011) Conditional Gene Expression in *Mycobacterium abscessus*. *PLoS ONE*. Vol 6, No.12. USA. Doi:10.1371/journal.pone.0029306
9. Cortes M.A.M., Nessar R. y Singj A.K, (2010). Laboratory Maintenance of *Myobacterium abscessus*. *Current Protocols in Microbiology*. Capítulo 10: Unidad 10E.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc10e01s18
10. Crespo O.M.P., Corral P.R. y Alzate A. (1997). Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivas y en personas sin factores de riesgo a la infección. *Colombia Médica*. Vol 28. No. 3. pp 136-144. Disponible en <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/65>. Consultado: 06/2/17
11. Daffé M., Crick D. y Jackson M (2013) Genetics of capsular Polisacharides and Cell Envelope (Glyco) lipids. *Molecular Genetics of Mycobacteria*, 2nd Edición. Editado por Hartfull F. y Jacobs W (2014). American Society for Microbiology, USA. Doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0021-2013
12. Davidson L.B., Nessar R., Kempaiah P., Perkins D.J. y Bryd T.F, (2011). *Mycobacterium abscessus* Glycopeptidolipid Prevents Respiratory Epithelial TLR2 Signaling as Measured by HBD2 Gene Expression and IL-8 Release. *PLoS One*. Vol. 6. No.12. e29148. Doi: 10.1371/journal.pone.0029148.
13. De Naranjo P.J., Rodríguez G., Rodríguez J. y Caldas M.L. (1988). La coloracion de ziehl-neelsen en histopatología. *Biomedica*. Vol. 8. No. 3 y 4. pp 84-93. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1964/1988>. Consultado: 06/2/17.
14. Degiacomi G, Benjak A, Madacki J, Boldrin F, Provvedi R, Palù R, Kordulakova J, Stewart T. Cole2 & Manganelli R. (2017). Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on *Mycobacterium tuberculosis* gene expression. *Nature. Scientific RepoRts*. Vol 7, No. 43495. DOI: 10.1038/srep43495
15. Del Solar M., Salomón M., Bravo F., Seas C., Gotuzzo E., Culqui D., Bolarte J. y Suárez L. (2005). Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética. Reporte de casos y revisión de la literatura. *Folia dermatol. Peru*. Vol. 16. Vol.3. pp. 127-135.
16. Deshayes C., Bach H., Euphrasie D, Attarian R, Coureuil M, Sougakoff V, Laval F, Av-Gay Y, Daffé M, Etienne G. & Reyrat J.M. (2010) MmpS4 promotes glycopeptidolipids

- biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. Molecular Microbiology. No. 78, Vol. 4, pp 989–1003. Francia. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07385.x
17. Falkinham III J. (1996). Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria, Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology. Vol 9, No. 2. pp. 177-215.
 18. Falkinham III J. O, (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. Review Article. Journal of Applied Microbiology. Vol 107. No.2. pp 356-367. ISSN: 1364-5072. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x
 19. Fernández Hernández, Jorge, & Heuze de Icaza, Yvonne Michelle. (2007). EL Programa Interno Para El Cuidado Y Uso De Los Animales De Laboratorio En Las Instituciones Biomédicas Docentes, De Investigación Científica E Industria Farmacéutica. Acta bioethica, Vol 13 No. 1, pp 17-24. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100003>
 20. Garcés Giraldo Luis Fernando, Giraldo Zuluaga Conrado (2012) Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. Revista Lasallista de Investigación - Vol. 9 No. 1– pp159. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v9n1/v9n1a16.pdf> Consultado 03/11/16
 21. García M.P y García A.L. (2012). Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. Enferm Infecc Microbiol Clin. Vol. 30. No.4. Pp. 192-200. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.09.017. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-infecciones-por-micobacterias-crecimiento-rapido-S0213005X11003211>. Consultado: 06/2/17.
 22. Greendyke R. y Byrd T.F., (2008). Differential Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* Variants in Biofilms and Macrophages Compared to That of Planktonic Bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 52. No. 6. pp 2019-2026. American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/AAC.00986-07.
 23. Griffith D.E., Phillely J.V., Brown-Elliott B., Benwill J.L., Shephera S., Benwill J.L., York D., Wallace R.J. (2006). The Significance of *Mycobacterium abscessus* Subspecies *abscessus* Isolation During *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease Therapy. CHEST. Vol 147 No., pp 1369-1375. doi: 10.1378/chest.14-1297
 24. Grzegorzewicz A, Pham H, Gundi V, Scherman MS, North EJ, Hess T, Jones V, Gruppo V, Born SEM, Korduláková JS, Sundaramchavadi S, Morisseau C, Lenaerts AJ, Lee RE, Mcneil MR & Jackson M. (2012) Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. Nature Chemical Biology. Vol 8, pp 334–341. USA.Doi:10.1038/nchembio.794
 25. Hall S.L. y Lappin S.H, (1998). Biofilm formation by the rapidly mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Letters. Elsevier. Vol. 168. No.1. pp 77-84. PMID: 9812366
 26. Hett F.C y Rubin E.J, (2008). Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 72. No.1. pp 126-156. doi: 10.1128/MMBR.00028-07. Disponible en: <http://mmbr.asm.org/content/72/1/126.full#sec-1>. Consultado: 06/2/17.
 27. Howard S.T., Rhoades E., Recht J., Pang X., Alsup A., Kolter R., Lyons R. y Bryd T.F, (2006). Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. Microbiology. Vol. 152. No. 6. Pp.1581-1590.DOI: 10.1099/mic.0.28625-0
 28. Ingen J, Boeree M. J, Dekhuijzen P. N. R, Van Soolingen D. (2009) Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. Journal Compilation. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vol 15. pp 888-893. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03013.x

29. Johnson, M. M., & Odell, J. A. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, Vol. 6. No. 3, pp 210–220. Doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949190/>. Consultado: 06/2/17.
30. Kijeong Kim., Seok-Hyun Hong., Byoung-Jun Kim., So-Yuoung Lee., Ga-Na Kim., Tae-Sun Shim., Yoon –Hoh Kook. & Bum-Joon Kim. (2015) Separation of *Mycobacterium abscessus* into subspecies or genotype level by direct application of peptide nucleic acid multi-probe-real-time PCR method into sputa samples. *BMC Infectious diseases*. Vol. 15, No. 325. Korea. DOI: 10.1186/s12879-015-1076-8
31. Kim YS, Yang CS, Nguyen LT, Kim JK, Jin HS, Choe JH, Kim SY, Lee HM, Jung M, Kim JM, Kim MH, Jo EK, Jang JC (2016). *Mycobacterium abscessus* ESX-3 plays an important role in host inflammatory and pathological responses during infection. *Microbes Infectology*, Vol. 19, No. 1. pp 5-17. doi: 10.1016/j.micinf.2016.09.001.
32. Le Dantec C., Duget J.P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S. y Vinvent V, (2002). Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. Vol 68. No. 11. pp 5318-5325. DOI: 10.1128/AEM.68.11.5318-5325.2002.
33. Lee R.M., Wang H.S., Chien C.H., Chong J.Y., Li V.N., Po R.H, (2015). *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 21. No. 9. pp 1638-1646.
34. Lee, S. J., Jang, J.-H., Yoon, G. Y., Kang, D. R., Park, H. J., Shin, S. J., ... Park, Y.-M. (2016). *Mycobacterium abscessus* D-alanyl-D-alanine dipeptidase induces the maturation of dendritic cells and promotes Th1-biased immunity. *BMB Reports*, Vol. 49. No.10. pp 554–559. Doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.10.080 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5227297/>. Consultado: 06/2/17.
35. Llorens-Fons M, Pérez-Trujillo M, Julián E, Brambilla C, Alcaide F, Byrd TF & Luquin M (2017) Trehalose Polyphosphates, External Cell Wall Lipids in *Mycobacterium abscessus*, Are Associated with the Formation of Clumps with Cording Morphology, Which Have Been Associated with Virulence. *Frontier Microbiology*. Vol 8, Artículo: 1402. España Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01402>
36. Macrae DJ. (2007). The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proc Am Thorac Soc* 2007; Vol 4: pp 176-178
37. Malcom K.C., Nichols E.M., Caeceres S.M., Kret J.E., Martiniano S.L., Sagel S.D., Chan E.D., Caverly L., Solomon G.M., Reynolds P., Brarron D., Taylor C..J.L., Nichols D.P., Saavedra M.T. y Nick J.A, (2013). *Mycobacterium abscessus* Induces a Limited Pattern of Neutrophil Activation That Promotes Pathogen Survival. *PLoS One*. Vol. 8. No. 2. e57402. DOI: 10.1371/journal.pone.0057402.
38. Medjahed H. y Reyrat J.M, (2009). Construction of *Mycobacterium abscessus* Defined Glycopeptidolipid Mutants: Comparison of Genetic Tools. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75. No.5. pp 1331-1338. doi: 10.1128/AEM.01914-08.
39. Medjahed H., Gailard J.L. y Reyrat J.M, (2009). *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends in Microbiology*. Cell Press. Elsevier. Vol. 18. No.3. pp 117-123. DOI: 10.1016/j.tim.2009.12.007
40. Miranda-CasoLuengo A.A, Staunton P.M., Dinan A.M. y Lohan A.J, (2016). Functional characterization of the *Mycobacterium abscessus* genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence. *BioMed Central Genomics*. Vol. 17. No. 553. DOI: 10.1186/s12864-016-2868-y
41. Nash K, Brown-Elliott B.A & Wallace RJ (2008) A Novel Gene, erm(41), Confers Inducible Macrolide Resistance to Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* but Is

- Absent from *Mycobacterium chelonae*. Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology . Vol. 53, No. 4, pp 1367–1376. USA. doi:10.1128/AAC.01275-08
42. Nessar R., Cambau E., Reytrat J.M., Murray A. y Gicquel B, (2012). *Mycobacterium abscessus*: a new antibiética nightmare. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 67. pp 810-818. DOI: 10.1093/jac/dkr578
 43. Nessar R., Reyart J.M., Murray A. y Gicquel B, (2011). Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. Journal Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 66. No. 88. DOI: 10.1093/jac/dkr209
 44. Nessar R., Reytrat J.M., Davidson L.B. y Byrd T.F, (2011). Deletion of the mmpL4 gene in *Mycobacterium abscessus* glycolipopeptid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability , but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response. Microbiology. Vol.157. No.4. pp 1187-1195. DOI: 10.1099/mic.0.046557-0.
 45. Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E, Shanley C, Harton M, Troutt J, Bai X, Basaraba R.J, Orme I.M., Chan E.D. (2008) Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. Journal of Leukocyte Biology. No. 6 Vol. 83, pp 1502-1511. USA doi: 10.1189/jlb.1007696.
 46. Ortegón M. M, Rodríguez G, Camargo D y Orozco L. C, (1996). *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus*: patógenos emergentes. Biomédica. Vol 16. No.3. pp 217-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v16i3.910>
 47. Owen J.A, Punt S, Stranford S.A y Jones Patricia P. (2013) KUBY Inmunología. Séptima edición. McGraw Hill. México
 48. Pereira S.P., Mendes S..A.P., Silva C.R.C. y Westphal D.C, (2015). Mycobacterium abscessus skin infection after tattooing. Brazilian Society of Dermatology. Vol. 90. No. 5. pp 741–743. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20153362
 49. Phoompoung P, Ankasekwinai N, Pithukpakorn M, Foongladda S, Umrod P, Suktitipat B, et al. (2017) Factors associated with acquired Anti IFN- γ autoantibody in patients with non tuberculous mycobacterial infection. PLoS ONE. Vol 12, No. 4: Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176342>
 50. Primm T.P., Lucero C.A., Falkinham III J.O, (2004). Health Impacts of Environmental Mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 17. No.1. pp 98-106. doi: 10.1128/CMR.17.1.98-106.2004
 51. Priyadarshi Amit, Sumeet Rastogi, SKS Marya. (2017) Prosthetic knee joint infection due to *Mycobacterium abscessus*. Indian Journal of Orthopaedics. Vol. 51, No. 3, pp 337-342. India. DOI: 10.4103/0019-5413.205685
 52. Rhoades E.R., Archambault A.S., Greendyke R., Hsu F.F., Streeter C. y Byrd T.F, (2009). Mycobacterial abscessus Glycopeptidolipids Mask Underlying Cell Wall Phosphatidylmyo-Inositol Mannosides Blocking Induction of Human Macrophage TNF- α by Preventing Interaction with TLR2. The Journal of Immunology. Vol. 183. No. 3. pp 1997-2007. DOI: 10.4049/jimmunol.0802181
 53. Ripoll F, Deshayes C, Pasek S, Laval F, Beretti JL, Biet F, Risler JL, Daffé M, Etienne G, Gaillard JL, Reytrat JM. (2007) Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. BMC Genomics. Vol 9, No. 8:114 DOI: 10.1186/1471-2164-8-114
 54. Ripoll F., Deshayes C., Pasek S., Leval F., Bretti J.L., Biet F., Raisler J.L., Daffe M., Etienne G., Gillard J.L. y Reytrat J.M, (2006). Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. BioMed Central Genomics. Vol. 8. No. 114. DOI: 10.1186/1471-2164-8-114

55. Rizzo G.J., Sato K.L.F. y Paes S.M.J, (2013). Micobacterias atípicas asociadas a la acupuntura: revisión integral. Revista Latinoamericana de Enfermería. Vol 21. No.1. ISSN 1518-8345.
56. Rodríguez Yunta Eduardo (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. Acta bioeth. Vol 13 No.1 Santiago. ISSN 1726-569X. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726569X2007000100004 Consultado 03/11/16
57. Rominski A, Selchow P, Becker K, Brulle JK, Molin MD & Sander P. (2017) Elucidation of *Mycobacterium abscessus* aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. No. 72, Vol 8, pp 2191-2200. Suiza. Doi:10.1093/jac/dkx125
58. Rottman M, Catherinot E, Hochedez P, Emile J.F., Casanova J.L., Gaillard J-L. & Soudais C. (2007). Importance of T Cells, Gamma Interferon, and Tumor Necrosis Factor in Immune Control of the Rapid Grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 Mice. Infection and immunity. American Society for Microbiology .Vol. 75, No. 12. Francia. Doi: 10.1128/IAI.00014-07
59. Roux A.L., Viljoen A., Bah A., Simeone R., Bernut A., Laencina L., Dermaudt T., Rottman M., Gaillard J.L., Majlessi L., Brosch R., Girard M., Vergne I., Chatellier C., Kremer L. y Hermann J.L, (2016). The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. Open Biol. Vol. 6. No. 11. pp. 160185. DOI: 10.1098/rsob.160185.
60. Sapriel G., Knjek J., Orgeur M., Bouri L., Frézal L., Roux A.L., Dumas E., Brosch R., Bouchier C., Brisse S., Vandenbogaert M., Tiberge J. M., Caro V., Fong Ngeow Y.V., Liang T. J., Hermann J.L., Gaillard J.L., Heym B. y Wirth T. (2016). Genome-wide mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: evolutionary and epidemiological implications. Research Article. BioMed Central Genomics. Vol 17. No.118. DOI: 10.1186/s12864-016-2448-1.
61. Saviola B. y Bishai W, (2017) The Genus *Mycobacterium*—Medical. Springer, pp 919-933. Disponible en: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30743-5_34. Consultado: 06/2/17.
62. Schorey J. S y Sweet L. (2008). The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. Glycobiology. Oxford University Press. Vol 18, No. 11. pp 832-841. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn076>
63. Seung Jun Lee, Jong-Hwa Jang, Gun Young Yoon, Da Rae Kang, Hee Jo Park, Sung Jae Shin, Hee Dong Han, Tae Heung Kang, Won Sun Park, Young Kyung Yoon, Byoung Yul Soh, In Duk Jung, & Yeong-Min Park (2016) *Mycobacterium abscessus* D-alanyl-D-alanine dipeptidase induces the maturation of dendritic cells and promotes Th1-biased immunity. BMB Reports. Vol. 49 No.10, pp 554-559. DOI: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.10.080> ISSN: 1976-670X
64. So-Young Lee, Hee-Youn Kim, Byoung-Jun Kim, Hong Kim, Seung-hyeok Seok, Bum-Joon Kim & Yoon-Hoh Kook (2016) Effect of amikacin on cell wall glycopeptidolipid synthesis in *Mycobacterium abscessus*. Journal of Microbiology Vol. 55, No. 8, pp. 640–647 Doi: 10.1007/s12275-017-6503-7
65. Strong M. & Davidson B.M. (2017) Bacterial transmission tactics. Springer Nature. Vol. 543, No. 495, pp 495-496 USA
66. Valdés F. y Cid A, (2004). Micobacterias atípicas. Academia Española de Dermatología y Venerología. Vol. 95 Núm.6. pp 331-357. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/micobacterias-atipicas/articulo/13064028/>. Consultado: 06/2/17

67. Viljoen A, Dubois V, Girard-Misguich F, Blaise M, Herrmann JL & Kremer L. (2017) The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments.
68. Winslow, C.-E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., & Smith, G. H. (1917). The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *Journal of Bacteriology*, Vol. 2. No. 5. pp 505–566. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC378727/>. Consultado: 06/2/17.

Apéndice

1. Cepas

Característica	390S → T1	390R→T 2	390V	Mutante mmp14b → T3	Complementada → T4
Morfología de colonia	Lisa	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Lisa
Temperatura de crecimiento	37 °C				
Obtención	Natural	Natural	Natural	Recombinación	Inserción de plásmido
Cultivo	Sólido/Líquido				
Expresión de GLP	Alta	Baja	Baja	Nula	Alta
Sliding Motility	Si	No	No	No	Si
Infección invasiva-crónica	No	Si	Si	No	Si
Colonización	Si	No	No	No	Si
Promoción de liberación de TNF-alfa	No	Si	Si	Si	No
Formación de estructuras tipo cuerda	No	Si	Si	No	Si
Formación de Biofilm	Si	No	No	No	Si
Detección de GPL por células epiteliales	No	Si	Si	No hay dato	No hay dato
Reconocimiento por macrófagos	No	Si	Si	Si	No
Reconocimiento por células epiteliales	No	Si	Si	No hay dato	No hay dato

