



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de la respuesta inmunológica e inflamatoria local producida por *Mycobacterium abscessus* y su mutante GPL en un modelo de infección subcutánea en ratones BALB/c”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ARANZA ELIANE BENDAÑA PIÑEIRO

TUTOR PRINCIPAL

DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO

[INCMNSZ](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MARTIN GUSTAVO PEDRAZA ALVA

[Instituto de Biotecnología](#)

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México, Junio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo de investigación, lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis, es inevitable reconocer el mérito en el aporte a varias personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Estoy profundamente agradecida con el Dr. Rogelio E. Hernández Pando por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este proyecto. Sus innumerables consejos, lecciones, asesorías continuas, su apoyo incondicional y paciencia hicieron des esta experiencia un pasaje sumamente fructífero. Asimismo, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a los Dres. Dulce A. Mata Espinosa, Brenda Marquina Castillo y Jorge Barrios Payán, quienes en todo momento estuvieron brindándome su apoyo, supervisión, enseñanzas y sugerencias. Ustedes me permitieron aprender varias técnicas experimentales, normas y diseño de experimentos, sin lo cual este trabajo hubiese sido imposible efectuar.

También, quiero agradecer mi comité tutor durante la maestría, conformado por los Dres. Martin Gustavo Pedraza Alva y Enrique Ortega Soto, por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me permitió darme cuenta de mis aciertos y errores, proporcionaron su guía y recomendaciones, enriqueciendo enormemente este proyecto.

Igualmente, mi total gratitud a cada uno de los integrantes del laboratorio de patología del INCMNSZ. Sin ustedes, esta experiencia y resultados no habrían sido lo mismo, gracias por sus tips, simpatía, generosa ayuda y crítica. Me han enseñado a resolver problemas eficientemente, pero más importantemente el significado de compañerismo. Las escasas veces que sostuvimos discusiones de carácter científico y personal, generalmente improvisadas, fueron altamente enriquecedoras en los dos ámbitos; espero que en el futuro la vida nos de otras oportunidades de compartir impresiones.

Gracias al programa de Maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas. Las oportunidades que me ha brindado son incomparables. El acceso a inmuebles, actividades y a clases con investigadores altamente calificados, nos brinda conocimientos que aplicaremos en nuestras vidas profesionales.

Asimismo, aprecio extraordinariamente el financiamiento al Programa de Apoyos a los estudios de Posgrado (PAEP), permitió y apoyó mi estancia de investigación en el extranjero.

Especial reconocimiento y agradecimiento al Dr. Horacio Bach y a la Universidad de British Columbia, por haberme aceptado, dirigido y supervisado durante mi estancia de investigación.

Por otro lado, quisiera agradecer cuantiosamente al CONACYT, institución que me hizo ser receptor de la beca nacional de excelencia para estudios de posgrado a nivel maestría, así como la beca mixta para estancias en el extranjero.

Finalmente, gracias totales a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido formarme y en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a todos ustedes, fueron ustedes los responsables de realizar pequeño aporte, que el día de hoy se vería reflejado en este trabajo y en mi desarrollo profesional y personal.

DEDICATORIA

Una simple página no es suficiente para agradecer a todos aquellos que me ayudaron de alguna manera para lograr este objetivo, sobre todo durante este último año donde lo más normal es el caos. Sin embargo, al estar rodeada de personas que creen en tí, te motivan y ayudan a cumplir tus metas y sueños, cada paso se hace infinitamente más sencillo.

A mis padres. Este es un espacio demasiado pequeño para agradecerles cada cosa que han hecho por mí. Los admiro, amo y agradezco que ustedes hayan sido mis papás. Mis logros son tanto míos como suyos, gracias su amor, comprensión y otro millón de cosas.

Rocío, sin duda la relación más loca del mundo, pero no la cambiaría -ni a tí- por nada. Tú sabes la importancia que tienes en mi vida y espero seguir compartiendo nuestros éxitos donde sea que estemos.

A Mamá Ruba, estoy verdaderamente feliz por tenerte y que me ayudes a llegar aquí, eres de las personas más fuertes que conozco. Todos los recuerdos que tenemos son invaluable y de las cosas más preciadas que tengo. Te estaré infinitamente agradecida.

A mi familia, mis tíos y primos, los abrazo, este año fue duro. Sin embargo, ustedes siempre están ahí pase lo que pase, aprender de ustedes -sin duda- catapultó este logro, cada uno me ha ayudado tanto en distintos aspectos.

A Valentine, es increíble haberte conocido en esta aventura, eres un alma única. En poco tiempo has creído y confiado en mí enormemente, me has enseñado tantas cosas, siempre agradeceré tu cariño, paciencia –y más con la diferencia de idiomas- así como tu apoyo incondicional... ALWAYS

Emi, mi mejor amigo – a quien obligué a escribir en su tesis una dedicatoria- gracias por escucharme siempre; tus consejos, constante apoyo y pláticas tan divertidas me ayudaron infinitamente. Aunque esté del otro lado del mundo sé que puedo contar contigo. De verdad no lo hubiera logrado sin tu ayuda.

Mis amigos de toda la vida, Koba y Karla, aunque nuestros caminos son muy distintos, seguimos siendo los mismos niños de la primaria. Ibra, Andy, Mariana, Dany, Fer, David, Omar, Ara, Julius, Marc, Yahir; mejores amigos son difíciles de encontrar, sin ustedes sobrevivir la prepa, universidad y maestría hubiese sido otra historia. Pasamos juntos por muchas cosas, desde resistir el estrés de las clases, hasta fiestas (o más bien reuniones). Espero que sin importar dónde o que estemos haciendo en el futuro, sigamos creando recuerdos juntos.

A mis amigos y colegas Pato Exp, especialmente a Mafer, eres de las personas más divertidas, empáticas y listas que conozco, nuestras aventuras en el lab, alitas, pulques, café o en el micro jamás las olvidaré. Muchísimas gracias por todo, todo tu apoyo. Sujhey, León, Vasti,, su manera de ver el mundo es única. Ustedes me han enseñado muchísimas cosas, han sido increíblemente pacientes conmigo y me han ayudado incluso sin pedirlo. Afortunadamente los tengo como amigos.

A las personas que salieron de mi vida, pero que de alguna u otra forma fueron un peldaño; y a aquellas nuevas que hacen cada momento maravilloso y sorprendente.

Honoríficamente quisiera agradecer a mi tío Antonio, te extrañaremos siempre.

RESUMEN

Mycobacterium abscessus es una bacteria patógeno-oportunista que causa infecciones agudas en el tejido subcutáneo, causando inflamación extensa, formación de abscesos y necrosis. En algunos casos, la infección puede perdurar y ocasionar en los pacientes, fibrosis deformante prioritariamente en el sitio de infección.

Se han aislado de biopsias de pacientes, así como de muestras ambientales, dos fenotipos de colonias de *M. abscessus*, lisas y rugosas. Las colonias lisas se caracterizan por presentar glicopeptidolipidos (GPL) en la membrana, que son formados a través de la activación del gen *mmpL4b* y sinergia de un megacomplejo enzimático encargado de producir los GPLs y exportarlos. Por el contrario, las colonias rugosas no activan esta, en consecuencia no presentan GPLs en su membrana.

En numerosos casos clínicos y estudios *in vitro* se ha correlacionado la gravedad de los signos y la duración de la infección con el fenotipo de colonia aislada. Experimentos de infección *in vitro* han mostrado que las bacterias lisas poseen distintos mecanismos relacionados son eficientes en la evasión de la respuesta inmune y causan infecciones menos agudas; mientras que la infección *in vitro* producida por las rugosas genera una patogenicidad más alta.

El objetivo de este trabajo fue determinar la contribución de los GPL en la respuesta inmunológica asociada a la patología causada por la inoculación de distintos fenotipos de *M. abscessus* utilizando un modelo de infección subcutánea en ratones BALB/c. Los ratones se infectaron subcutáneamente en los cojinetes plantares traseros con cepas que presentan diferentes fenotipos: 390S (lisa), 390R (rugosa), $\Delta mmpL4b$ (no produce GPL) y $\Delta mmpL4b$ -comp (mutante complementado rugoso). La cinética de la inflamación de la almohadilla, la cuantificación de unidades formadoras de colonias, la producción de citocinas y la fibrosis se determinaron continuamente durante 150 días post-infección.

Independientemente del fenotipo de las cepas, después del día 28 post infección, no se presentó crecimiento por el método de UFC's convencional en agar 7H10, por lo que se detectó mediante PCR la expresión de la subunidad 16Sr, lo que indica que hay bacilos vivos que probablemente se encuentran en fase latente en coexistencia con inflamación extensa y fibrosis, particularmente inducida por cepas rugosas.

Curiosamente, la infección con la cepa mutante $\Delta mmpL4b$ indujo menor inflamación y fibrosis, en comparación con las demás cepas,

Estos resultados sugieren que la infección subcutánea con *M. abscessus* puede deberse a la existencia de bacterias en estado latente, cuyo contenido de GPL contribuye a producir una inflamación crónica extensa y fibrosis.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ABC: ATP-binding cassette-transportador del casete de unión a ATP.
- BMDM: Bone Marrow Derived Macrophages
- CMA: Complejo de *Mycobacterium abscessus*
- DAT: Diacil Trealosa
- PDIM: Phthiocerol Dimycocerosates
- DNA: Desoxiribonucleic acid
- GPL: Glicopeptidolípidos
- H&E: Hematoxilina & Eosina
- IHQ: Inmunohistoquímica
- IL- Interleucina
- IT: Intratraqueal
- L: Liso
- Mab: *Mycobacterium abscessus*
- MAC: *Mycobacterium avium* complex-Complejo de *Mycobacterium avium*
- MATE- Multidrug and toxic compound extrusion
- MCL: Micobacterias de Crecimiento Lento
- MCR: Micobacterias de Crecimiento Rápido
- MDR: Multi Drug Resistant
- MFS -Major facilitator superfamily
- MmpL: Mycobacterial membrane protein Large- proteínas largas de membrana de micobacterias
- MmpS: Mycobacterial membrane protein Short- proteínas cortas de membrana de micobacterias
- MQ: Macrófago
- *Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*
- ns GPL: non specific Glicolipoptide-GPL no específicos
- NTM. Non Tuberculosis Mycobacteria- Micobacterias no tuberculosas
- PAT: Poliacil trehalosa
- PBS: Phosphate Buffered Saline-tampón fosfato salino
- PCR: Polymerase chain reaction
- PGL: fenolftiocerol dimicerosatos
- PIMS : Phosphatidylinositol mannosides- Manósidos de fosfatidilinositol
- R: Rough- rugosa
- R´FP: Resuscitation Factor Proteins
- RNA: Ribonucleic acid
- RND -resistance-nodulation-cell division
- ROS: Reactive Oxygen Species
- S: Soft- lisa
- SC: Subcutánea
- SIA: Sistema inmune adaptativo
- SL: sulfolípidos
- SMR- small multidrug resistance
- SNC: Sistema Nervioso Central
- TB: tuberculosis
- TDM: Trehalose 6,6'-dimicolate - Dimicolatos de trealosa
- TLC: Thin Layer Chromatography- Cromatografía de capa fina
- TLR: Toll Like Receptor- Receptores tipo Toll
- TM: Transmembranal
- TMM: Trehalose Monomycolate- Monomicolato de Trealosa
- TNF: Tumoral Necrosis Factor- Factor de necrosis tumoral
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- VBNC: Viable But Not Culturable
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- WT: Wild Type- Cepa silvestre
- ZF: Zebra Fish
- SM: Sliding motility-Motilidad deslizante
- TUNEL-Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa
- FACS- clasificación de células activadas por fluorescencia
- MPT- complejo de transición de la permeabilidad mitocondrial
- TPP- polifleatos de trehalosa
- BALF- líquido de lavado bronqueoalveolar

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	4
RESUMEN	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE CONTENIDO	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE GRÁFICAS	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Generalidades de <i>Mycobacterium</i>	13
1.2 <i>Mycobacterium abscessus</i> (Mab)	15
1.3 Morfología de colonias	16
1.4 Epidemiología	18
1.5 Tipos de patología, transmisión y susceptibilidad	22
1.5.1 Sistema nervioso central (SNC)	23
1.5.2 Pulmonar	23
1.5.3 Diseminada	24
1.5.4 Cutáneas	24
1.5.4.1 Características histológicas de la enfermedad cutánea	25
1.6 Latencia	26
2 ANTECEDENTES	29
2.1 Generalidades de Glicolipopéptidos (GPLs)	29
2.2 Síntesis de GPLs	30
2.3 Familia MmpL	32
2.3.1 Filogenia de la familia MmpL	32
2.3.2 Organización estructural y funcional de la familia MmpL	34
2.4 Morfología de colonias	35
2.4.1 Reversión fenotípica de colonias	36
2.5 Formación de biopelículas y motilidad deslizante (SM)	36
2.6 Producción de citocinas y ROS	37
2.7 Fagosomas y GPLs	38
2.8 Apoptosis mediada por GPLs	40
2.9 Cuerdas extracelulares y formación de abscesos	41
2.10 Infecciones pulmonares en modelo murino.	42
2.11 Infecciones cutáneas en modelo murino.	44

3	JUSTIFICACIÓN	46
4	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	47
5	OBJETIVOS	48
5.1	General	48
5.2	Particulares	48
6	HIPÓTESIS	49
7	METODOLOGÍA	50
7.1	Cepas experimentales	50
7.1.1	Identificación de las cepas de Venezuela	50
7.1.2	Construcción e identificación de las cepas “Francesas”	51
7.2	Grupos experimentales	51
7.3	Preparación para la infección	53
7.4	Infección	53
7.4.1	Intratraqueal (IT)	53
7.4.2	Subcutánea (SC)	54
7.5	Eutanasia	55
7.5.1	Intratraqueal	55
7.5.2	Subcutánea	56
7.6	Carga bacilar	56
7.7	Técnica histológica	57
7.8	Extracción de muestras de RNA en parafina	57
7.9	PCR	58
7.10	Análisis estadístico	59
8	RESULTADOS	60
8.1	Cepas de Venezuela	61
8.1.1	Infección pulmonar	61
8.1.1.1	Sobrevida	61
8.1.1.2	Carga bacilar	62
8.1.1.3	Histopatología pulmonar	63
8.1.1.4	Biología molecular	68
8.1.2	Infección subcutánea	70
8.1.2.1	Carga bacilar	70
8.1.2.2	Histología	72
8.1.2.3	Biología molecular	80

8.2	Cepas de Francia	86
8.2.1	Infección pulmonar	86
8.2.1.1	Sobrevida	86
8.2.1.2	Carga bacilar	86
8.2.1.3	Histología	87
8.2.2	Infección subcutánea	91
8.2.2.1	Carga bacilar	91
8.2.2.2	Histología	92
8.2.3	Biología molecular	100
8.2.3.1	PCR tiempo final <i>16Sr</i> y <i>mmpL4b</i>	100
8.2.3.2	PCR tiempo real citocinas	102
9	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	106
10	REFERENCIAS	116
	ANEXO 1: Secuencias de primers utilizados	124
	ANEXO 2: Histología de pulmones-Experimento Venezuela	125
	ANEXO 3: Histología de cojinetes plantares-Experimento Venezuela	128
	ANEXO 4: Stiches representativos de fibrosis e inflamación en cojinetes	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación del género <i>Mycobacterium</i> según Lehmann & Neuman 1986.....	13
Figura 2 Morfología de colonias.....	16
Figura 3 Organización de los componentes del envoltorio celular de las micobacterias.....	17
Figura 4 Mapa de aislamientos de <i>M abscessus</i>	20
Figura 5 Aislados clínicos de <i>M abscessus</i>	21
Figura 6 Distintas patologías causadas por Mab.....	22
Figura 7 Fotografía de un adulto con infección por <i>Mycobacterium abscessus</i> subcutáneo..	25
Figura 8 Histopatología causada tras inoculaciones subcutáneas con Mab en humanos.....	26
Figura 9 Estructura básica de nsGPL.....	29
Figura 10 Organización genética del locus GPL en <i>M. smegmatis</i> (<i>Ms</i>), <i>M. abscessus</i> (<i>Ma</i>) y <i>M. chelonae</i> (<i>Mc</i>).....	31
Figura 11 Árbol de máxima parsimonia de abundancia relativa de genes de <i>mmpL</i>	33
Figura 12 Modelo de <i>MmpL4b</i>	34
Figura 13 Mecanismo de producción de GPLs en <i>Mycobacterium abscessus</i>	36
Figura 14 Distribución de cepas utilizadas.....	52
Figura 15 Cinética de infección.....	52
Figura 16 Vías de infección en ratones BALB/c, intratraqueal y subcutánea.....	54
Figura 17 Representación de eutanasia y toma de muestras.....	55
Figura 18 Formato de presentación de resultados.....	60
Figura 19 Progresión diferencial en etapas agudas durante la infección con cepas rugosas C4 _(R) y C6 _(R)	65
Figura 21 Formación de pseudogranulomas cerca de zonas ricas de oxígeno tras la infección con cepas rugosas C4 _(R) y C6 _(R)	67
Figura 22 Detección transcripcional de la subunidad 16 Sr de Mab en las cepa C4 _(R) y C6 _(R) en la fase crónica experimental.....	68
Figura 23 Ausencia de transcripción de <i>mmpL4b</i>	68

Figura 24 Activación de la respuesta inmune del hospedero en la fase aguda de la infección subcutánea.....	73
Figura 25 Mantenimiento de la respuesta inflamatoria e incremento de la producción fibrótica.....	75
Figura 26 Continuación de inflamación y producción de fibrosis extensa en etapas crónicas de la infección subcutánea.....	77
Figura 27 Exceso de fibrosis en etapas crónicas en tejido blando.....	79
Figura 28 Detección de actividad transcripcional en los días 60 y noventa de la fase crónica en las cepas C6 _(R) , C7 _(L) , C10 _(R) y C20 _(R)	81
Figura 29 Ausencia de la detección de la transcripción de RNAm de <i>mmpL4b</i> durante la cinética de infección en cojinetes plantares infectados con cepas originarias de Venezuela..	82
Figura 30 Similitud de respuesta inmune pulmonar generada en etapas agudas.....	88
Figura 31 La infección pulmonar con cepas rugosas provoca mayor inflamación en etapas crónicas.....	90
Figura 32 Respuesta aguda a la infección subcutánea.....	93
Figura 33 Reforzamiento de la respuesta inmune durante la fase aguda a la infección subcutánea.....	95
Figura 34 Fallo en la restauración del tejido en etapas crónicas.....	97
Figura 35 Fallo en la restauración y formación de granulomas en fases crónicas de la infección subcutánea.....	99
Figura 36 Detección de actividad transcripcional durante la etapa aguda y crónica de la infección.....	101
Figura 37 Ausencia de RNAm de <i>mmpL4b</i> durante la cinética.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Identificación de las cepas de Venezuela.....	50
Tabla 2 Particularidades de las cepas utilizadas en la segunda parte de este estudio.....	51
Tabla 3 Resumen de resultados del experimento 1 de la infección pulmonar y subcutánea..	85
Tabla 4 Resumen de resultados del experimento 2 de la infección pulmonar y subcutánea..	105

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Número de publicaciones en PUBMED sobre <i>Mycobacterium abscessus</i>	19
Gráfica 2 Porcentaje de sobrevivencia tras infección intratraqueal con diferentes cepas de Mab provenientes de Venezuela.....	61
Gráfica 3 Disminución de la carga bacilar hasta el límite de detección del método durante la fase tardía de la cinética experimental.....	63
Gráfica 4 Producción de IL-4 en el día 90 p.i.....	69
Gráfica 5 Disminución progresiva de la carga bacilar en cojinetes infectados con distintas cepas provenientes de aislados clínicos de Venezuela..	70
Gráfica 6 Porcentaje de área fibrótica en días tardíos de la infección crónica.	80
Gráfica 7 Detección de citocinas IL-4 y TGF- β en los días 60 y 90.	83
Gráfica 8 Disminución de la carga bacilar en pulmones infectados.....	86
Gráfica 9 Disminución continua de la carga bacilar en cojinetes plantares inoculados con Mab hasta niveles no detectables.....	91
Gráfica 10 Distintos porcentajes de fibrosis tras la infección con cepas de Francia..	100
Gráfica 11 Cuantificación de la producción de citocinas IL-4 y TGF- β en cojinetes plantares en etapas crónicas de la infección subcutánea.	103

INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE MYCOBACTERIUM

El género *Mycobacterium* está formado por más de 150 especies de bacterias en forma de bacilos (Jhonson y Odell, 2014). Las micobacterias están dispersas a nivel global debido a la variedad de nichos que habitan; así como a las diversas relaciones ecológicas que presentan. En consecuencia, dentro de éste género encontramos organismos simbiotes, saprófitos, parásitos obligados y oportunistas (Valdés y Sid, 2004) donde se incluyen a numerosos organismos de importancia médica.

De acuerdo con Lehmann & Neumann 1896 (Winslow., 1917) el género *Mycobacterium* es clasificado como se muestra en la figura 1:

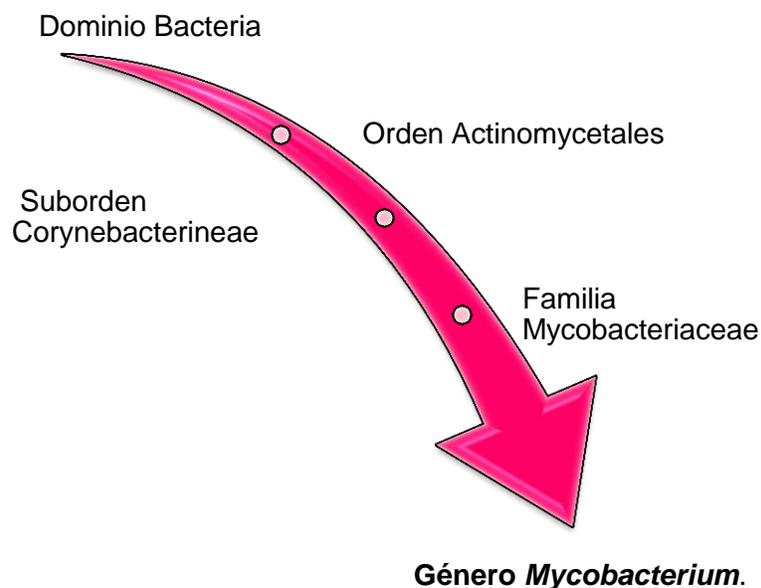


Figura 1 Clasificación del género *Mycobacterium* según Lehmann & Neuman 1986. Tomado de Winslow *et al.*, 1917.

Los ejemplos más ilustrativos del género -que dominaron los estudios científicos por varios siglos- corresponden a las bacterias del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*, que han sido los agentes etiológicos de pandemias a lo largo de la historia humana (Saviola y Mishau; 2006), es por ésta razón que estas 2 especies fueron las primeras especies del género en ser descritas y estudiadas exhaustivamente.

Con el paso del tiempo, principalmente en el siglo pasado, con la mejora de técnicas de identificación, clasificación y diagnóstico, fue posible aislar otras

especies del mismo género que no causaban estas enfermedades pero que cumplían con las características distintivas del mismo.

En consecuencia del descubrimiento y descripción de éstas nuevas especies, científicos comenzaron a sugerir algunas clasificaciones para facilitar el estudio de las micobacterias. En primera instancia, a los bacilos del género que no causan lepra o tuberculosis se les denominó como “micobacterias atípicas o no tuberculosas” (NTM).

Durante los primeros estudios de las bacterias NTM, se pensaba que únicamente tenían relaciones saprófitas y que eran inofensivas para el humano; sin embargo, evidencia posterior indicó que en realidad pueden tener un elevado impacto en la frecuencia y letalidad en la población mundial (Ortegon *et al.*, 1996).

Las micobacterias no tuberculosas poseen un mayor contenido lipídico en la membrana, les brinda una mayor hidrofobicidad y baja permeabilidad a diferentes compuestos, principalmente contra antibióticos y desinfectantes (Falkinham III 1996). Asimismo, las NTM son capaces de crecer bajo amplios rangos de temperatura, pH, salinidad, tensión de O₂, y son capaces de metabolizar compuestos inorgánicos como algunos metales pesados, oxianiones e hidrocarburos, por lo que pueden ser aisladas de una amplia variedad de muestras ambientales (Falkinham III 1996). Estas cualidades de crecimiento hacen a las NTM sumamente eficientes para sobrevivir y permiten que estos bacilos puedan colonizar nichos diversos tanto en ambientes terrestres como acuáticos. Esta gran diversidad de condiciones propicia que su distribución sea mundial y por ende exista un peligro potencial de exposición a estas bacterias.

Conforme se encontraban más especies de NTM, surgió la necesidad de hacer una clasificación artificial que las agrupara ciertas de acuerdo a sus características de crecimiento con el objetivo de facilitar su estudio y comprensión.

La primera clasificación no natural de micobacterias que incluye a las NTM, es la propuesta por Runyon y Timpe en 1957, la cual sigue siendo la más utilizada (Valdés y Cid, 2004). En ésta categorización se agrupan los organismos de acuerdo a la naturaleza de las lesiones que causan y el tiempo de crecimiento en medio de cultivo, se divide en dos grupos principales: típicas y atípicas.

En el grupo de típicas –llamadas así por su alta incidencia epidemiológica podemos encontrar al complejo de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*. Para el segundo grupo correspondiente a las atípicas se subdividen en dos subgrupos: las de crecimiento lento, llamadas micobacterias de crecimiento lento (MCL) con crecimiento mayor a 7 días en placas de agar; de micobacterias de crecimiento rápido (MCR) con crecimiento menor a 7 días en placas de agar.

Las MCL como *M. kansasii* y *M. avium*, difieren de las de crecimiento rápido debido a cambios intrínsecos (genéticos, metabólicos, estructurales) y extrínsecos (estímulos físicos, químicos y biológicos) que ocasionan una menor velocidad de crecimiento de estas bacterias (Hett y Rubin; 2008). Por ejemplo, la capacidad de producir proteínas, pigmentos o polisacáridos que funcionan como antagonistas de los antibióticos, confiriéndoles de esta manera una forma de protección extra ante la quimioterapia (Falkinham III; 1996).

Por otro lado, las MCR como *M. cheleoniae*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y *M. abscessus* (Ortegon *et al.*, 1996) -a diferencia de las MCL- son capaces de estimular el crecimiento bacteriano ya que consiguen metabolizar diversos sustratos de forma rápida, por ejemplo: contaminantes ambientales, productos de la ignición de combustibles fósiles, acetona, alcanos, bencenos, fenoles, entre otros (Falkinham III; 1996).

A partir de la década de los 50, existieron muy pocos grupos de investigación alrededor del mundo dedicados al estudio de NTM. A partir de esta fecha las NTM se reconocieron como patógenos potenciales del hombre ya que cada vez se comenzaron a aislar casos clínicos cuyo agente etiológico era identificado como micobacterias no tuberculosas (Crespo *et al.*, 1997). Hoy en día la situación comienza a mejorar, cada vez nuevos grupos enfocan recursos a la investigación de *M. smegmatis*, *M. avium* y *M. abscessus*, especies de NTM consideradas como patógenos oportunistas. En particular *M. avium* y *M. abscessus* (Mab) han comenzado a recibir atención especial, debido a que poseen una alta resistencia a antibióticos y pueden generar en el humano diversas patologías de agudas a crónicas en pacientes inmunocomprometidos y con fibrosis quística (Ingen *et al.*, 2009).

1.2 *Mycobacterium abscessus* (Mab)

M. abscessus es una bacteria de crecimiento rápido en forma de bacilo delgado y recto con punta curvada. En promedio mide 1-2.5 μm de largo y 0.5 μm de ancho y es considerado ácido-alcohol resistente por lo que puede ser identificado por la tinción de Ziehl-Neelsen (Ortegon *et al.*, 1996).

Su metabolismo es principalmente aerobio, no posee flagelos, por lo que se le considera sésil. Adicionalmente no tiene la capacidad de formar esporas, por lo que su capacidad de distribución es menor (Ortegon *et al.*, 1996; Valdés y Cid, 2004; Jorgensen *et al.*, 2015).

1.3 Morfología de colonias

Mycobacterium abscessus posee una membrana sumamente rica en lípidos, lo cual, es una de las características más destacables de esta especie. Esta membrana les permite tener una tolerancia innata contra agentes físicos, biológicos y químicos como antibióticos y desinfectantes, por lo que son difíciles de eliminar (Primm *et al.*, 2004).

Sus colonias pueden tener tanto morfologías lisas (L) como rugosas (R) (ver figura 2), presentando un tono de color blanco a grisáceo (Ortegon *et al.*, 1996; Valdés y Cid., 2004; Jorgensen *et al.*, 2015).

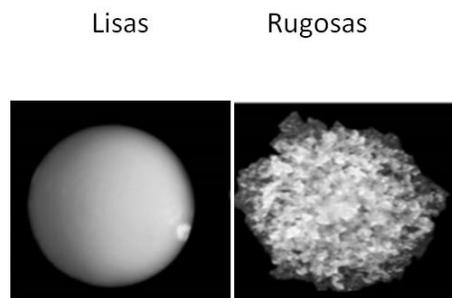


Figura 2 Morfología de colonias. Tomado de Medjahed y Reyrat., 2009. Se observa en la imagen de la derecha una fotografía de una colonia lisa y brillante, con una circunferencia regular. En la imagen de la izquierda, se aprecia una colonia rugosa opaca cuya geometría es irregular y foliada.

Un elemento distintivo de estas micobacterias es la cubierta celular, cuya composición es sumamente hidrofóbica favoreciendo su poca permeabilidad a compuestos, incluidos los antibióticos (Jorgensen *et al.*, 2015). Se estima que el peso seco de lípidos es mayor al 70% (Jorgensen *et al.*, 2015; Chalut, 2016).

Ésta cubierta celular (ver figura 3) consta de un complejo de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos covalentemente asociados a una gran variedad de lípidos y a una capa rica de polisacáridos que rodean la célula (Chalut., 2016).

A su vez, existen algunos ácidos micólicos que se unen al arabinogalactano de forma no covalente, que son conocidos como lípidos extraíbles, que interactúan entre sí de forma atípica creando una membrana externa adicional llamada micomembrana. Ejemplo de estos ácidos micólicos son los TDM (dimicolatos de trealosa), TMM (monomicolatos de trehalosa), DAT y PAT (di / poli acil trehalosas), SL (sulfolípidos), DIM (dimitococerosados de phithiocerol), PGL (fenolphitocerol dimycerosatos) como GPL (Glicopeptidolípidos).

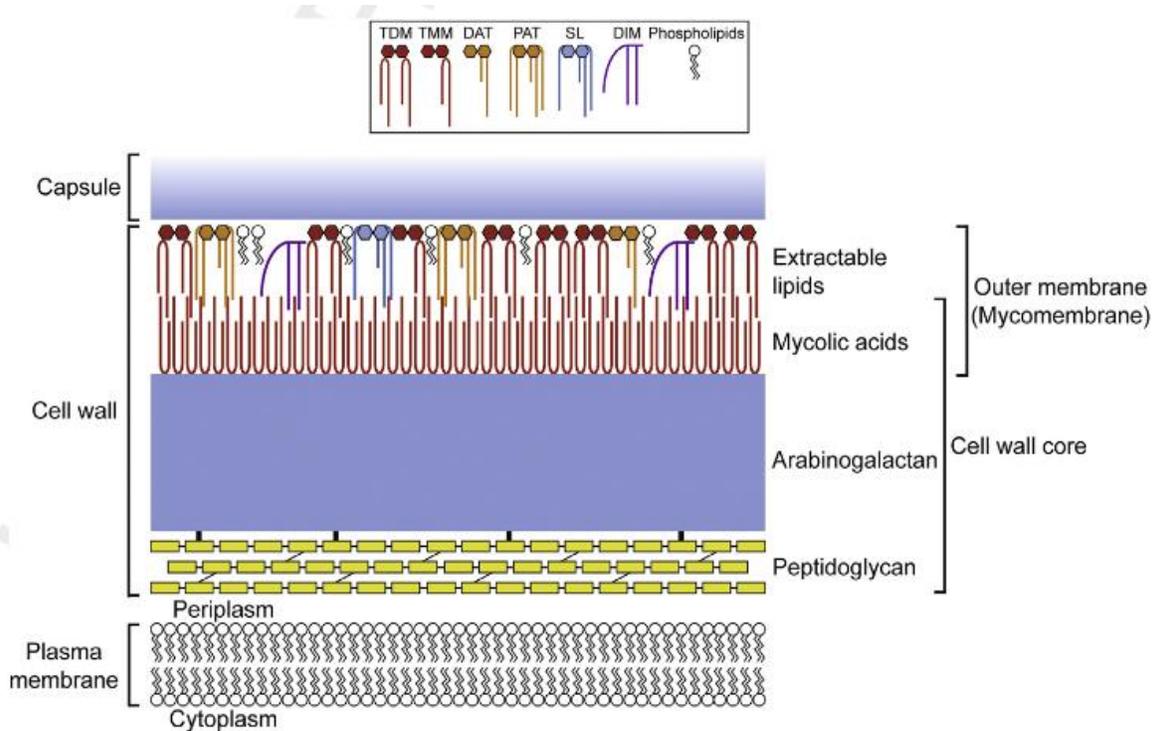


Figura 3 Organización de los componentes del envoltorio celular de las micobacterias. Tomado de Chalut, 2016.

La compleja organización de su cubierta les impide entrar a diversos sustratos nutritivos, causando que los bacilos crezcan más lentamente (Markova, 2012). Asimismo, esta cualidad de organización membranosa confiere a la bacteria resistencia y protección a numerosos agentes biológicos, químicos y físicos, que en general, pudieran resultar dañinos para algún otro organismo favoreciendo la colonización de nichos específicos tanto terrestres como acuáticos (por ejemplo suelo, animales y sistemas de distribución de agua) (Ingen *et al.*, 2009; Crespo *et al.*, 1997; Primm *et al.*, 2004).

M. abscessus fue aislado por primera vez por Moore y Frerichs en 1953 a partir de una biopsia de glúteo de una mujer (Ortegon *et al.*, 1996). Tras subsecuentes casos identificando a Mab como el agente etiológico, se catapultó como patógeno oportunista, ocasionando lesiones nodulares y abscesos en diversos órganos, así como patologías diseminadas (Ortegon *et al.*, 1996).

De forma sobresaliente Mab posee un alto grado de resistencia a antibióticos, en especial los medicamentos antituberculosos, mayormente propiciada por la composición de la pared celular lo que puede bloquear la entrada de estos compuestos a la micobacteria (Hall y Lappin; 1998). Adicionalmente los receptores en pueden activar un resistoma interno (Nessar *et al.*, 2012). El resistoma es un conjunto de genes que confieren resistencia a antibióticos. Los productos de estos genes disminuyen o bloquean el efecto de antibióticos (Wright D. 2010).

Únicamente se ha observado que tiene susceptibilidad a la acción de la amikacina, cefoxitina y claritromicina (Greendyke y Byrd, 2008.). Asimismo, intervenciones quirúrgicas son requeridas en diversos casos para eliminar el tejido fibrótico excesivo generado tras la resolución de la infección (Medjahed *et al.*, 2009). Por estas razones hacen a Mab sumamente difícil de tratar y potencialmente peligrosa.

1.4 Epidemiología

En cuanto a la epidemiología, los casos confirmados no son de declaración obligatoria, por lo que la incidencia, mortalidad y otros parámetros permanecen aún en las sombras (Valdés y Cid., 2004).

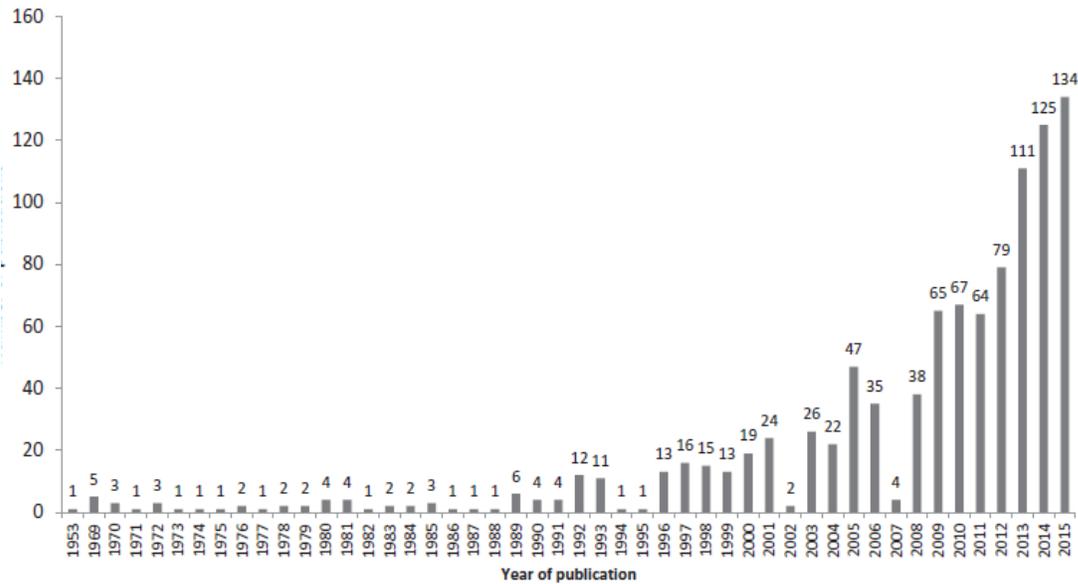
Para 2004 se estimaba que la incidencia global era de 1.78 casos por cada 100,000 habitantes (Valdés y Cid., 2004), pero los datos recabados son realmente escasos. Otro estudio de Hoefsloot, *et al.*, 2013, muestra el mapa de incidencia más representativo actualmente, donde toma en cuenta registros de 62 centros de salud en 30 países, donde se registra que la mayor incidencia de infecciones fue en países del oeste de Europa como en el Reino de los Países Bajos y Oceanía; sin embargo, esto puede ser debido a que en estos lugares, se han realizado la mayoría de investigaciones con esta micobacteria.

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*. La prevalencia de *M. abscessus-M. chelonae* era menor a 1 en 100,000 habitantes (Meng-Rui *et al.*, 2015).

Adicionalmente, en el este de Asia, particularmente en Taiwan, 17.2% de todos los aislados clínicos de bacterias atípicas se encontró como agente etiológico *M. abscessus-M. chelonae*, lo que corresponde a 1.7 casos por cada 100,000 habitantes (Meng-Rui *et al.*, 2015).

No obstante, a nivel mundial se considera que hay un aumento en la incidencia de Mab, lo que corresponde a la eficiencia de los laboratorios de reconocer y aislar este tipo de micobacterias, también incluye la alza del número de individuos inmunológicamente deprimidos, el aumento en la sobrevivencia de individuos con enfermedades debilitantes (cáncer o diabetes) así como turismo estético (Crespo *et al.*, 1997; Nessar *et al.*, 2012).

En consecuencia a no tener acceso a una epidemiología más contundente, Mourgari y colaboradores (2016) contabilizaron en la literatura, las publicaciones correspondientes a *M. abscessus* en la plataforma de PUBMED de 1992-2015, donde se incluyen casos clínicos y experimentales (gráfica 1).



Gráfica 1 Número de publicaciones en PUBMED sobre *Mycobacterium abscessus*. Se ejemplifica el incremento del número de publicaciones, particularmente desde 2008-2015.

En continuidad, Mougari y colaboradores (2017) generaron un mapa (ver figura 4) donde se representa la distribución geográfica de aislamientos ambientales y veterinarios descritos en la literatura. Estos datos, si bien no reflejan la distribución real o la incidencia, nos dan un indicio de qué regiones tienen numerosos casos, ya sea porque haya un sistema de registro con Mab o por que se estudien casos clínicos provenientes de otros países o experimentos.

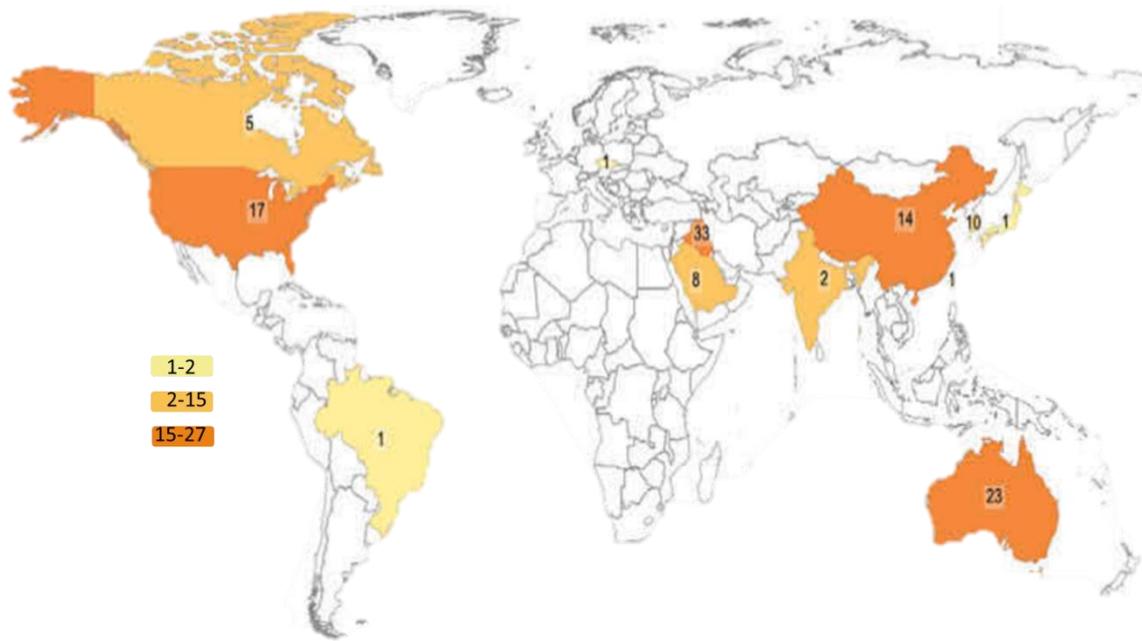


Figura 4 Mapa de aislamientos de *M. abscessus*. Número de aislamientos de *M. abscessus* de origen ambiental descritos en la literatura (PubMed, 1992-2015). Tomado de Mougari *et al.*, 2016.

Adicionalmente Mougari y colaboradores (2016) encontraron que Mab es la principal responsable de hasta el 80% de los aislados dentro del grupo de RGM en infecciones respiratorias por NTM (ver figura 5). En esta búsqueda bibliográfica, se encontró que las infecciones respiratorias por NTM difieren entre regiones geográficas, con 56% en los Estados Unidos, 52% Reino Unido, en Francia 45%, mientras que en China, se ha estimado la prevalencia de *M. abscessus* a menos del 13,3% de los aislamientos de NTM en infecciones

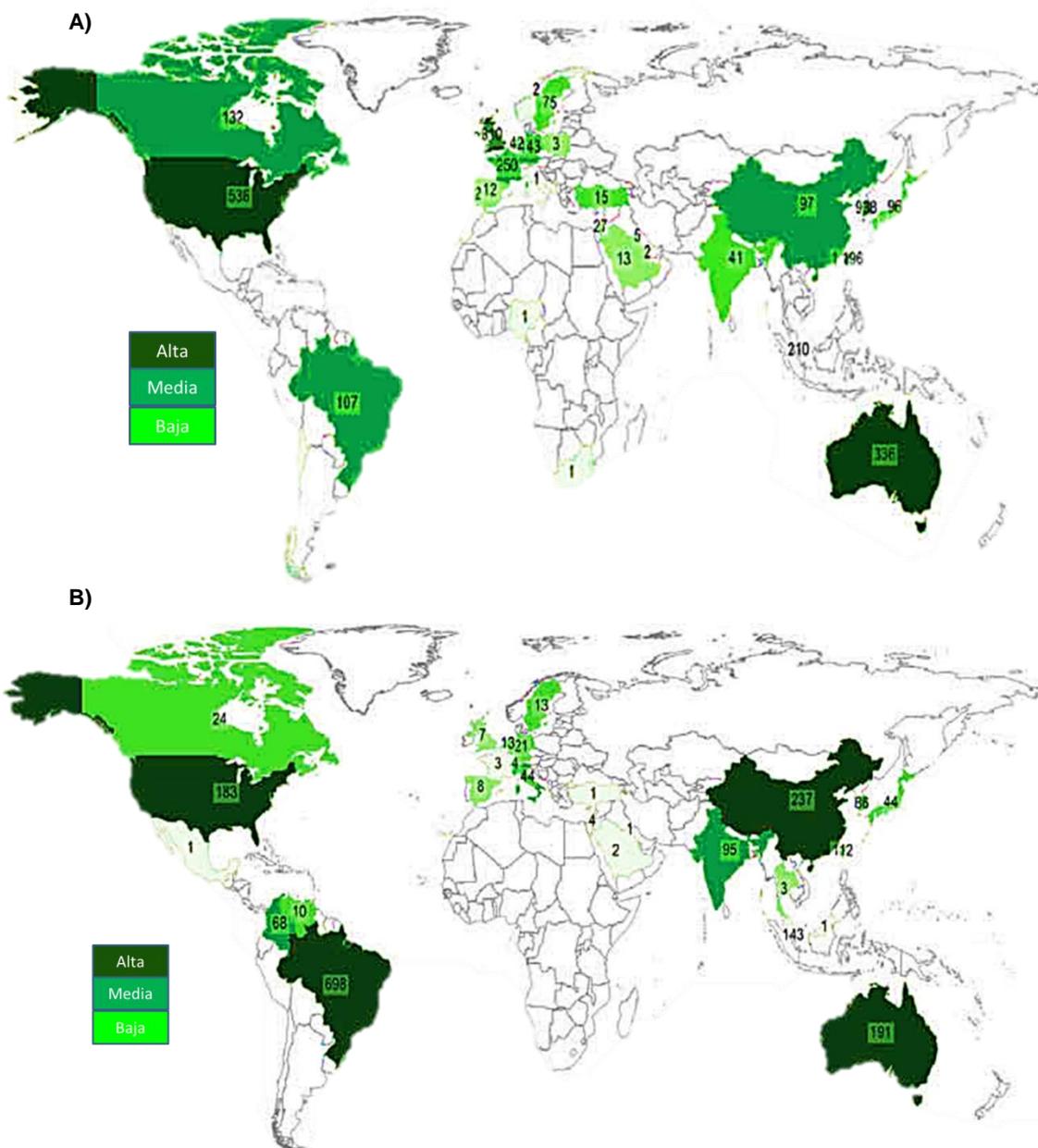


Figura 5 Aislados clínicos de *M. abscessus*. a) Número de aislados clínicos de *M. abscessus* de origen respiratorio descritos en la literatura (PubMed, 1992-2015). (b) Número de aislados clínicos de *M. abscessus* de origen extra respiratorio descritos en la literatura (PubMed, 1992-2015). Tomado de Mougari *et al.*, 2016.

En el caso específico de las infecciones del tejido blando, Mougari y colaboradores encuentran en la bibliografía hasta 2016 que casi la mitad (45%) de las infecciones extrapulmonares por *M. abscessus* son posoperatorias con mayor frecuencia, las epidemias involucran infecciones de la piel con abscesos crónicos relacionados con procedimientos quirúrgicos y estéticos principalmente en China, Brasil y EUA (Mougari *et al.*, 2016). Sin embargo, hay que tener claro que es probable que los casos estén subestimados.

En el caso de México no se tiene un registro detallado sobre los datos epidemiológicos causados por esta bacteria en ninguna base de datos de acceso libre. Sin embargo en octubre del 2019 y febrero del 2020 el gobierno de México por parte de la CONAVE (Consejo Nacional Para La Vigilancia Epidemiológica) publicó un aviso epidemiológico sobre el aumento de casos de infección cutánea y tejidos blandos asociado a productos cosméticos para uso en mesoterapia lipolítica. En este aviso, identifican a Mab como uno de los agentes etiológicos responsables de estos casos.

1.5 Tipos de patología, transmisión y susceptibilidad

Mab causa diferentes patologías que pueden ser localizadas en la piel y tejido blando, sistema nervioso central (SNC), pulmonar, así como infecciones diseminadas (Byrd y Lyons, 1999) (ver figura 6), donde la formación de granulomas o nódulos puede variar dependiendo del estado inmune del huésped y factores de susceptibilidad (Valdés y Cid, 2004).



Figura 6 Distintas patologías causadas por Mab. A) Resonancia magnética nuclear del sistema nervioso central donde se observan abscesos en cerebro. B) Radiografía torácica con presencia de granulomas caseificados en un paciente con fibrosis quística. C) Lesiones subcutáneas supurativas causadas durante mesoterapia cosmética.

La transmisión de Mab puede ser durante la ingestión, inhalación o inoculación de fuentes ambientales de bacilos. Hasta el momento no se tiene registro de transmisión de persona a persona, sin embargo se requieren hacer más estudios (Le Dentec *et al.*, 2002; Medjahed *et al.*, 2009).

Los riesgos potenciales de infección con este patógeno son: la exposición a material contaminado, alteraciones pulmonares o infecciones previas, inmunosupresión, procedimientos estéticos o quirúrgicos o traumas (Falkinham III 1996; Medjahed *et al.*, 2009; Falkinham, 2009).

Cuando la infección se encuentra activa, puede producir nódulos eritematosos o abscesos con drenaje espontáneo de material sero-sanguinolento (Ortegon *et al.*, 1996).

En fases posteriores, se hacen visibles lesiones granulomatosas no caseificantes (parecidas a las causadas por tuberculosis) las cuales se encuentran organizadas por células epiteliales gigantes (Medjahed *et al.*, 2009).

El tratamiento es muy diverso, dependiendo de la localización, gravedad y condiciones propias del huésped, puede ser desde 4 semanas hasta 18 meses (Meng-Rui *et al.*, 2015) y cabe mencionar que tras su resolución, generalmente existe una falla en el proceso de cicatrización normal (Ortegon *et al.*, 1996) produciendo tejido fibrótico excesivo, que en varios casos es preciso remover con cirugía.

En los siguientes apartados se describen las principales características y factores de susceptibilidad producidas por Mab de acuerdo a su localización.

1.5.1 Sistema nervioso central (SNC)

La incidencia de las infecciones del SNC es mínima, sin embargo, estudios *in vitro* y casos clínicos han probado que la bacteria es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica ocasionando meningitis y abscesos cerebrales, tal como lo hace *M. tuberculosis*.

Este tipo de patología es principalmente encontrada en sujetos inmunodeprimidos o que hayan tenido procedimientos quirúrgicos cerebrales recientes (Medjahed *et al.*, 2009; Meng-Rui *et al.*, 2015). La transmisión en algunos de los casos originada por uso de material quirúrgico no estéril infectado con la bacteria.

1.5.2 Pulmonar

La patología pulmonar puede ser identificada tras una radiografía de tórax y cultivo de biopsia de esputo o de pulmón. Esta infección se caracteriza por infiltrados intersticiales y alveolares así como granulomas definidos (Ortegon *et al.*, 1996).

La transmisión es generalmente causada por la inhalación de polvo contaminado con la micobacteria.

Principalmente afecta a pacientes con fibrosis quística, quienes son los más susceptibles a infecciones pulmonares ocasionadas por Mab (Cullen *et al.*, 2000). Asimismo, afecta particularmente a fumadores, individuos inmunosuprimidos, individuos con alteraciones en la arquitectura bronquial y pacientes que hayan tenido alguna infección pulmonar previa (particularmente causadas por *M. avium* y *M. tuberculosis* (Valdés y Cid, 2004; Ortegon *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 2015).

1.5.3 Diseminada

La patología diseminada se caracteriza por episodios recurrentes de abscesos supurativos en la piel y demás tejidos blandos, seguidos de periodos asintomáticos. Es frecuente en pacientes con alguna condición de inmunosupresión, así como en individuos recién transplantados o en proceso, en terapia con corticoides, con artritis reumatoide, cáncer o VIH (Ortegon *et al.*, 1996), así como en intervenciones quirúrgicas invasivas como cateterismo (Meng-Rui *et al.*, 2015). La transmisión es variada, pero el consenso propone que es por el uso de material quirúrgico contaminado (Ortegon *et al.*, 1996).

1.5.4 Cutáneas

Las lesiones cutáneas de los tejidos blandos son las más frecuentes puesto que muestran un proceso inflamatorio supurativo y granulomatoso (ver figura 7) en individuos clínicamente sanos (Ortegon *et al.*, 1996). La infección se origina por una lesión traumática en cualquier sitio de la piel, generalmente por el uso de material médico infectado como agujas o bisturíes.

Hay que resaltar que numerosos casos donde Mab ha sido aislado, el foco de infección es durante o inmediatamente posterior a procedimientos estéticos o quirúrgicos como es el caso de rinoplastia, mamoplastia, abdominoplastia, varicectomía, cateterismo y trasplantes (Ortegon *et al.*, 1996); mesoterapia cosmética (Del Solar *et al.*, 2005); así como por tatuajes (Pereira de Sousa *et al.*, 2015), pedicura (Mougari *et al.*, 2016), piercing o acupuntura (Ortegon *et al.*, 1996).



Figura 7 Fotografía de un adulto con infección por *Mycobacterium abscessus* subcutáneo. Presenta scrofuloderma con extensa destrucción de tejidos en las áreas cervicales y supraclaviculares derechas. Tomado de Franco-Paredes *et al.*, 2018.

1.5.4.1 Características histológicas de la enfermedad cutánea

La histopatología en biopsias de humanos de las lesiones producidas por Mab (ver figura 8) muestra una severa respuesta inflamatoria granular o difusa con granulomas mixtos compuestos por abscesos centrales, rodeados por células gigantes epiteliales. Hay una amplia penetración de los infiltrados inflamatorios al tejido celular subcutáneo, en conjunto con numerosos linfocitos llegando a formar incluso colecciones circunscritas que asemejan nódulos linfoides (Ortegon *et al.*, 1996).

De la misma forma, la necrosis es otra característica constante cuya localización es central, puede llegar a ser extensa asemejando a necrosis por caseificación. En etapas tempranas o agudas hay abundante hemorragia, mientras que en las etapas crónicas se encuentra abundante fibrosis en la periferia de los granulomas (Ortegon *et al.*, 1996).

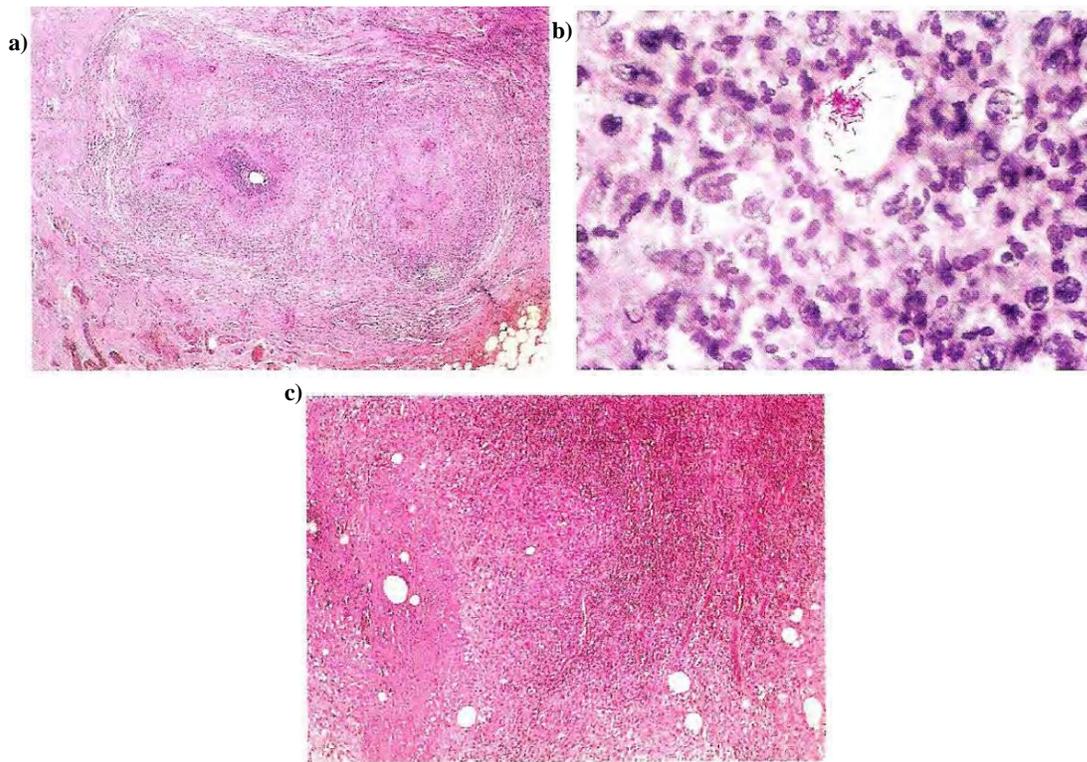


Figura 8 Histopatología causada tras inoculaciones subcutáneas con Mab en humanos. a) Granulomas confluentes con presencia de células polimorfas nucleares y material fibrótico rodeado por células epiteliales, linfocitos y macrófagos. b) Bacilos rodeados por neutrófilos en vacuolas. c) Inflamación difusa severa en dermis e hipodermis. Tomado de Ortegón *et al.*, 1996.

1.6 Latencia

Una gran cantidad de especies bacterianas son capaces de subsistir a diferentes condiciones ambientales a través de cambios intrínsecos donde se limita su crecimiento, metabolismo y reproducción, entre otros. Existen distintas maneras de mantenerse viables, por ejemplo, la generación de endoesporas, dormancia (fenotipo del bacilo) o latencia (definición clínica), así como un estado viable pero no cultivable VBNC por sus siglas en inglés (Keep *et al.*, 2006; Veatch y Kaushal., 2018).

La dormancia se caracteriza por un estado de inducción de baja actividad metabólica reversible. En contraste, el estado VBNC es definido como bacterias vivas que no crecen en condiciones estándar pero que pueden crecer en medios ricos de nutrientes (Keep *et al.*, 2006). Tanto la dormancia como VBNC tienen en común el cambio en la concentración de algunos de sus componentes de la pared celular (Keep *et al.*, 2006), efecto que disminuye la permeabilidad y aumenta su resistencia en distintos ambientes.

En el caso de los organismos pertenecientes al género *Mycobacterium*, se ha descrito en pocas especies el proceso de dormancia. Los primeros trabajos se enfocaban a la latencia de especies de elevada importancia epidemiológica como *Mtb*, sin embargo en estudios recientes, han prestado atención a los fenómenos de latencia en NTM en humanos.

Para describir este proceso de latencia en *Mycobacterium*, se estandarizaron algunos métodos experimentales, de los cuales destacan el método de Wayne & Sohaskey y el modelo de Cornwell. El primero es un método de estudio *in vitro* donde se reduce gradualmente la concentración de O₂ en un cultivo líquido de micobacterias, aunque actualmente hay otras vías para causar latencia como es el caso de la disminución o cambio de fuentes nutricionales o uso de fármacos (Kuznetsov *et al.*, 2004; Trutneva *et al.*, 2018). Por otro lado, el modelo de Cornell es utilizado en ratones para inducir latencia se infecta con una dosis intranasal media-alta de bacilos y una vez que la infección se establece, se administra un tratamiento para inducir niveles no detectados de UFC's; después suspenden el tratamiento promoviendo que el bacilo pueda resucitar. Sólo del 10-20% de los ratones reactiva la enfermedad (Veatch y Kaushal, 2018).

En *Mtb*, *M. avium* y *M. smegmatis*, el inicio de la dormancia es catapultado por un estrés físico, químico o biológico en una población heterogénea, como resultado se seleccionan aquellos organismos sobrevivientes capaces de modificar su fenotipo y disminuir su metabolismo propiciando una resistencia aumentada contra factores estresantes y ausencia de crecimiento (Markova, 2012).

Durante el inicio de esta fase inicial, el ambiente intracelular puede ser muy hostil; hay muy bajas concentraciones de O₂ pero altas de CO₂, pH ácido, presencia de compuestos alifáticos orgánicos, bajas temperaturas, alta osmolaridad, entre otros (Cunninham y Spredbury, 1998; Smeulders *et al.*, 1999). Estos cambios ambientales propician la activación del regulón DosR, formado por aproximadamente 50 genes, presente en todas las micobacterias, que es necesario para inducir latencia y esencial para su sobrevivencia (Veatch y Kaushal, 2018; Gerasimova *et al.*, 2011).

Las alteraciones principales causadas por la activación de Dos R en la dormancia o VBNC son el cambio al ciclo de glioxilato, arresto en fase G1 del ciclo celular, disminución de tamaño celular, cambio de morfología, reestructuración de pared celular y resistencia contra antibióticos (Cunninham y Spredbury, 1998; Berube *et al.*, 2018; Dick *et al.*, 1998).

Para salir de la dormancia se necesita de interacciones célula-célula y de la producción de RFP's (Resuscitation Factor Proteins), que han sido aislados de

varias especies bacterianas incluyendo a las pertenecientes a *Mycobacterium* (Keep *et al.*, 2006).

Los RFP's son proteínas de bajo peso molecular que tienen actividad aún en concentraciones picomolares, siendo un elemento clave en la resucitación de los bacilos (Keep *et al.*, 2006; Kaprelyants *et al.*, 2012). Todos los Rfp's comparten un dominio de 70 residuos que son primariamente responsables de la actividad biológica.

Estas proteínas funcionan como lisozimas y transglicosilasas líticas que actúan intracelularmente y ayudan al rompimiento de la pared celular al originar el quebrantamiento de algunos lípidos para el consumo energético y salida del arresto metabólico (Veatch y Kaushal, 2018). Por otro lado se cree que los RPFs pueden participar en la dispersión de agregados de bacterias antes del inicio de la división celular, así como de actuar sobre un receptor de membrana y ser capaces de transmitir la señal a esa célula y a las vecinas (Nikitushkin *et al.*, 2016).

Un método común para resucitar bacterias es la incubación en un medio líquido con RFP's añadidos secretados por actinobacterias activas, ya que se ha demostrado que hay actividad inespecífica (Kaprelyants *et al.*, 2012), es decir, la secreción de RPF's, puede tener reactividad cruzada y ser secretados por una especie particular y provocar la reactivación de otras (Keep *et al.*, 2006; Kaprelyants *et al.*, 2012).

El estudio de la actividad enzimática de los RPFs ha dado como resultado la búsqueda de drogas potenciales contra la reactivación de una infección latente, por ello, el bloquear los RFP's puede ser una estrategia novedosa para el control de la tuberculosis y enfermedades similares (Keep *et al.*, 2006; Kaprelyants *et al.*, 2012). Asimismo, se han utilizado inhibidores de estas moléculas para dilucidar su mecanismo de acción específico, sin embargo, aún está siendo estudiado.

El problema con la latencia, es el potencial de reactivación (término clínico) o resucitación (recuperación del bacilo) y la falta de una vacuna profiláctica, lo que da como resultado que sea aún más compleja la tarea de tratar la enfermedad generada por Mab en humanos (Veatch y Kaushal, 2018).

M. tuberculosis tiene 5 genes *rfp*, algunas de las proteínas codificadas por estos genes son secretadas y otras están unidas a la membrana, por otro lado *M. smegmatis* tiene 4 genes *rfp*, similares a los de *Mtb*. En el caso de Mab, se sabe por estudios de BLAST que hay 4 genes *rfp*, pero aún no se ha estudiado su función (Kaprelyants *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de Glicolipopéptidos (GPLs)

Los GPLs son lípidos de superficie que se encuentran embebidos en la membrana externa de Mab o también conocida como micomembrana y constituyen aproximadamente el 70% de los lípidos expuestos a la superficie. Poseen una cubierta polipeptídica glicosilada que es modificada mediante O-metilación-acetilación (ver figura 9).

La estructura de los GPLs está basada en un tri-péptido amino-alcohol, unida a un residuo de acilo graso de cadena larga (Ripoll *et al.*, 2006; Mukherjee y Chatterji, 2012).

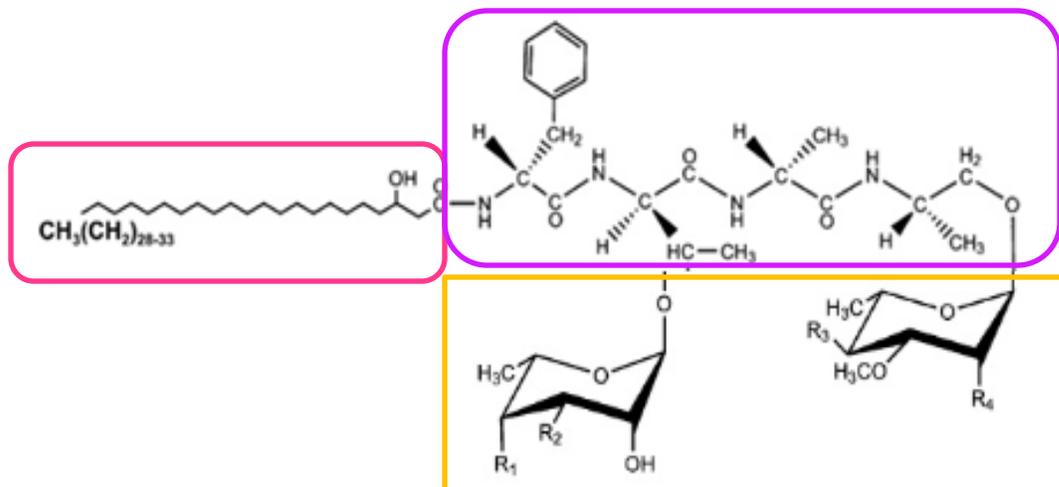


Figura 9 Estructura básica de nsGPL. Recuperado de Schorey y Sweet; 2008. Está compuesta por una parte lipídica (rosa), proteica (morado) y de carbohidratos (amarilla) con modificaciones postraduccionales específicas para cada micobacteria.

Los GPLs se encuentran en varias micobacterias como *M. abscessus*, *M. avium* o *M. smegmatis* (Chalut, 2016) pertenecientes a las NTM –con excepción de las variantes productoras de PGL’s (Daffé y Draper; 1998)- donde las diferencias entre cada uno de estas especies depende de las cadenas laterales y modificaciones postraduccionales específicas (Mukherjee y Chatterji, 2012).

Por otro lado, los GPLs parecen jugar un rol importante en la fisiología y comportamiento de la micobacteria. Por ejemplo, la cantidad de estas moléculas en la cubierta influye en el fenotipo de colonias, para desplazarse horizontalmente (motilidad deslizante), así como para formar biopelículas e influenciar la agregación bacteriana (Ripoll *et al.*, 2006), permitiéndoles existir en el ambiente y dentro del hospedero.

El alto contenido de GPLs juega un papel muy importante en la patogénesis. Se ha demostrado *in vitro*, que los GLP's enmascaran a los PIM's disminuyendo la interacción entre bacteria-huésped, posteriormente inhiben la fusión del fagosoma-lisosoma por la interacción con los receptores de manosa y también promueven la activación de citocinas proinflamatorias por medio de la señal de transducción de vía del TLR-2 (Mukherjee y Chatterji, 2012).

Asimismo, la hidrofobicidad de los estos compuestos permite una menor permeabilidad a antibióticos (Schorey y Sweet, 2008), generando así una tolerancia adaptativa y específica. En el caso de los antibióticos pertenecientes a la familia de β -lactanos la presencia de GPLs reduce el influjo y en conjunto con la producción de la enzima β -lactamasa es suficiente para explicar la poca efectividad de esos compuestos para tratar infecciones generadas por Mab.

2.2 Síntesis de GPLs

La complejidad en la estructura de estos glicopeptidolípidos justifica una ruta biosintética elaborada, que implica la coordinación de un mega-complejo enzimático que promueve la síntesis de ácidos grasos, formación de enlaces peptídicos seguida de glicosilación, transferencia de metilo y finalmente la exportación a la membrana (Mukherjee y Chatterji, 2012; Viljoen *et al.*, 2017, Chalut, 2016).

A diferencia de *M. smegmatis*, el locus GPL en *Mab* parece estar dividido en varias partes al igual que en *M. chelonae*. Un grupo de 19 genes se relaciona con la síntesis del core tripéptido-aminoalcohol, la glicosilación del lipopéptido y modificaciones de O-metilación/ acetilación.

Subsecuentemente un segundo y distante locus, comprende a seis genes involucrado en la síntesis del acilo graso y su unión al resto tripéptido-aminoalcohol.

Los genes restantes que codifican para GPLs; están dispersos por todo el genoma, incluyendo dos genes que codifican a las proteínas reguladoras putativas (Ripoll *et al.*, 2006).

Con esto se observa que aunque estas tres especies producen GPL idénticos, la organización de los genes difiere entre ellos, apoyando a la hipótesis en la que *M. smegmatis* representa la forma ancestral y esa evolución ha dispersado varias piezas a lo largo del genoma en *M. abscessus* y *M. chelonae* (Ripoll *et al.*, 2006; Viljoen *et al.*, 2017).

2.3 Familia MmpL

2.3.1 Filogenia de la familia MmpL

El transporte de lípidos mebranales en micobacterias es predominantemente a través de una familia de proteínas denominadas proteínas MmpL (Mycobacterial Membrane Protein Large) que pertenece a la superfamilia RND, la cual comprende a transportadores que impulsan el eflujo de una amplia variedad de compuestos; por ejemplo, sustancias orgánicas, metales pesados, lípidos y antibióticos, utilizando la fuerza motriz de protones (PMF) como fuente de energía (Chalut 2016; Székely y Cole, 2016; Briffotiaux *et al.*, 2017, Vijoen *et al.*, 2017).

Recientemente los estudios se han enfocado a entender el funcionamiento de la familia mmpL en varias micobacterias; muchos de estos trabajos han sido realizados en bacterias cercanas filogenéticamente a Mab, como es el caso de *M. smegmatis* y *M. avium* (Chalut, 2016; Székely y Cole, 2016; Briffotiaux *et al.*, 2017, Vijoen *et al.*, 2017). En un estudio elaborado por Vijoen y colaboradores, se realizó un árbol filogénico de máxima parsimonia con el objetivo de evaluar la abundancia de miembros de la familia MmpL por cepa (ver figura 11).

En este análisis se encontró que la mayor abundancia de genes MmpL está presente en el grupo de MCR en comparación con MCL. *M. leprae* presentó menos MmpL en paralelo con el resto del grupo de MCL, esto causado probablemente porque su nicho ecológico principal es intracelular (Vijoen *et al.*, 2017).

Por otro lado, *M. abscessus* presentó la mayor cantidad de genes de MmpL en todo el estudio, seguido de *M. fortuitum* y *M. smegmatis*; esta diferencia podría estar relacionada con sus diversos nichos ecológicos, donde las relaciones ecológicas varían (Vijoen *et al.*, 2017).

Otro punto interesante, es que la riqueza de MmpL en Mab podría proporcionar a la bacteria alguna ventaja fisiológica a través de una mayor dosis de genes de MmpL para realizar funciones como exportación de líquidos, importación de nutrientes, protección, etcétera (Vijoen *et al.*, 2017).

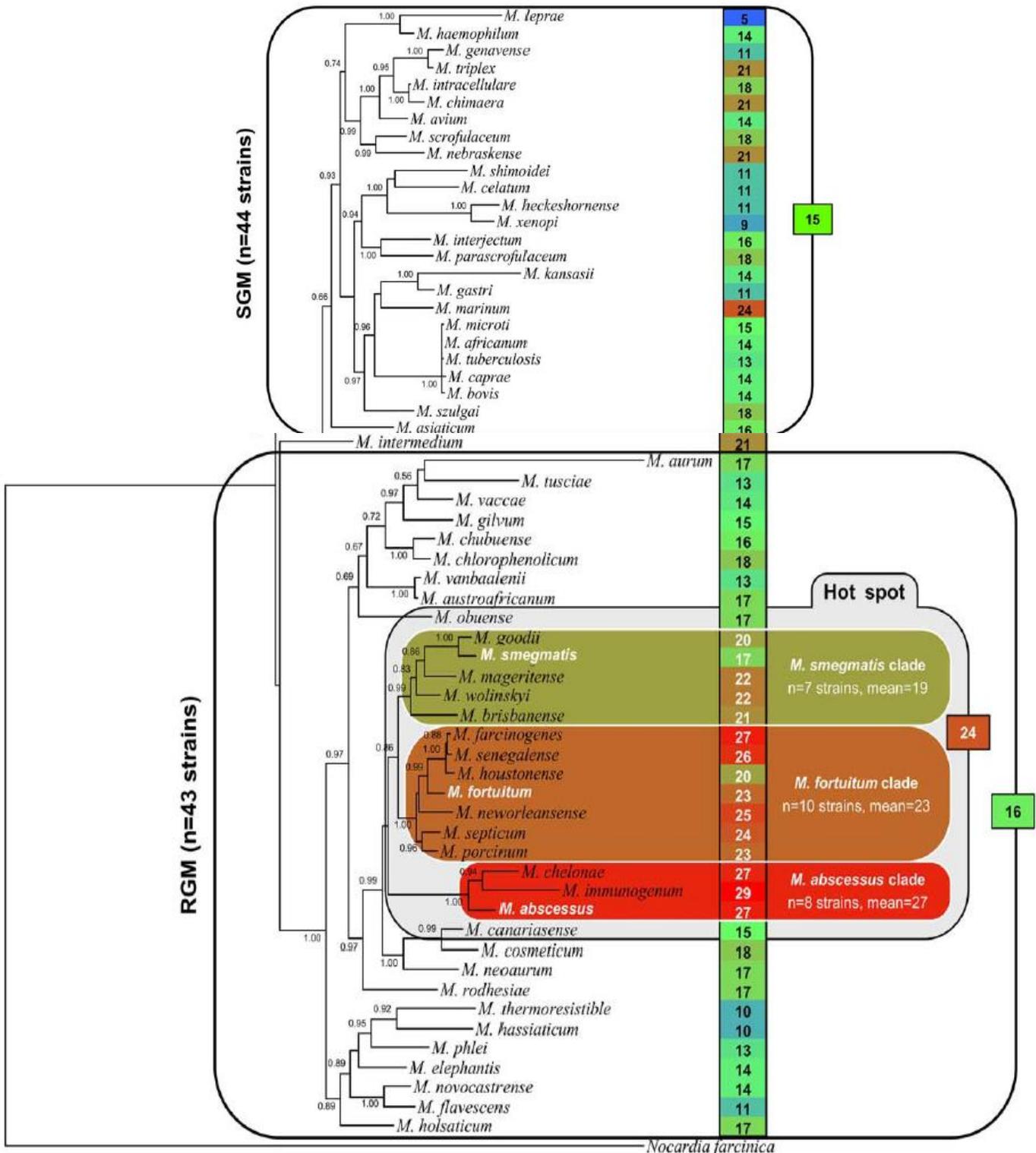


Figura 11 Árbol de máxima parsimonia de abundancia relativa de genes de *mmpL*. Azul= cantidad mínima, verde= moderada y roja=alta En la parte superior se encuentra las micobacterias de crecimiento lento donde la cantidad relativa de abundancia de genes asociados con proteínas de la familia MmpL. En la parte inferior se observan la cantidad de genes de las representantes del clado de crecimiento rápido donde hay un hot spot o punto de diversificación. Donde el clado de *M. abscessus*. Tomado de Vijoen *et al.*, 2017

2.3.2 Organización estructural y funcional de la familia MmpL

Se sabe muy poco sobre la organización estructural de MmpL y el mecanismo de acción preciso de éstos en Mab. No obstante, la arquitectura topológica (ver figura 12) en un estudio reciente, ha propuesto que todos los MmpL comparten una estructura topológica idéntica que exhibe 12 hélices transmembrana y dos dominios extra-citoplásmicos entre TM1 y 2 y TM7 y 8 de acuerdo con las estructuras conocidas de los transportadores RND (Chalut, 2016).

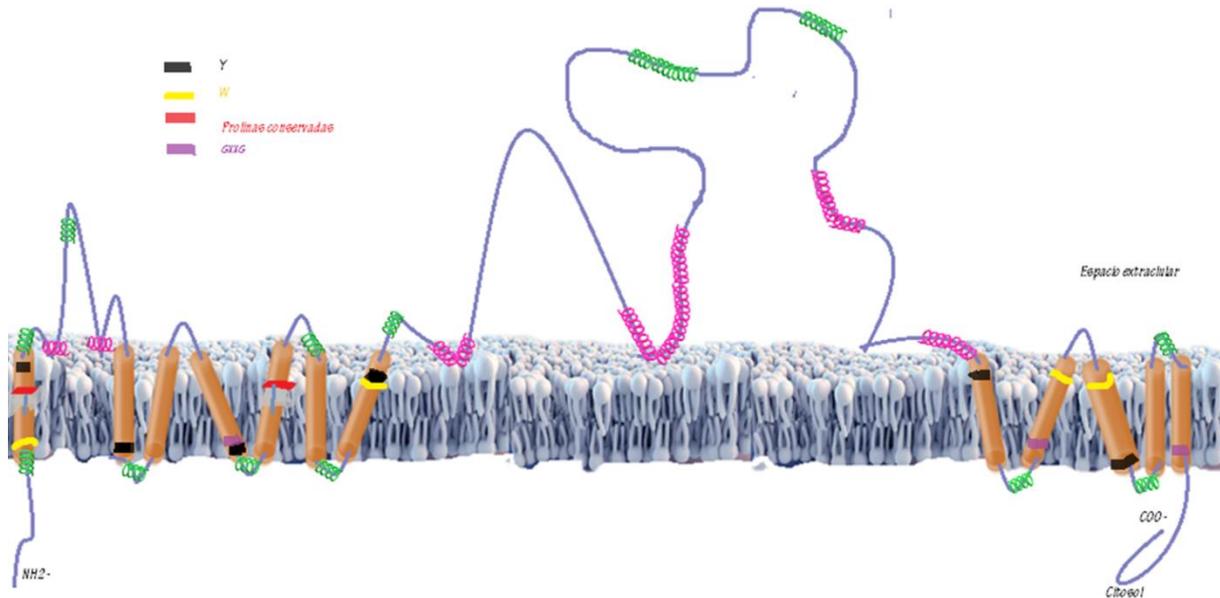


Figura 12 Modelo de MmpL4b. En verde se encuentran marcadas asas extracelulares cuyo momento hidrofóbico no es considerado por su corta longitud, en fucsia se destacan las hélices cuyo uH es cuantificable. Para el caso del cinturón aromático podemos encontrar presencia de W & Y (negro y amarillo) en varios p TM. Las prolinas conservadas se encuentran marcadas con rojo, donde coincide con el quiebre de las hélices.

Cada proteína del cluster de *mmpL* posee una función diferente (Székely y Cole., 2016), es por esto que las proteínas MmpL no solo son importantes en el transporte del sustrato a través de la membrana interna, sino que también son parcialmente responsables de la resistencia a los medicamentos tuberculosos, efectuando eflujo de antibióticos desde el periplasma (Székely y Cole, 2016). Por otro lado, se ha expuesto que podrían mediar la absorción de nutrientes privados o expulsar compuestos tóxicos en un ambiente hostil como el fagosoma de los macrófagos (Viljoen *et al.*, 2017).

Asimismo, la evidencia indica que los transportadores de MmpL probablemente trabajen en estrecha asociación con proteínas accesorias que modulan la exportación de lípidos. El caso más estudiado de modulación de transporte de lípidos a la membrana recae en MmpS, proteínas cercanas filogenéticamente a los

genes *mmpL* (Chalut 2016; Vijoen *et al.*, 2017). Por ejemplo, la exportación de GPLs, implica dos proteínas MmpL: MmpL4a y MmpL4b, cuyas actividades están reguladas por MmpS4 y por una proteína de membrana integral (Gap), (Viljoen *et al.*, 2017).

La explicación más próxima de la maquinaria de síntesis y exportación de GPLs, corresponde a aquella dilucidada en *M. smegmatis*, bacteria filogenéticamente muy relacionada a Mab. En un estudio donde eliminaron al gen *mmpS4*, que se encuentra en un operón putativo con los genes *mmpL4a* y *mmpLb*, el resultado fue que no se elimina por completo la exportación de GPLs. En consecuencia se propuso que probablemente *mmpS* regula la expresión de *mmpL4b/a*. De este estudio se concluye que tras la eliminación o modificación de algún componente del mega-complejo enzimático, la producción de GPLs es alterada (Deshayes *et al.*, 2010).

A partir de este punto, para el caso de Mab se investigaron las posibles mutaciones relacionadas a los genes *mmpL4b* y *mmpL4a*. Más tarde, se encontró que el cambio de fenotipo puede deberse a la eliminación de un residuo de adenosina, causado por un error de lectura de la RNA polimerasa (Pawlik *et al.*, 2013). Este descubrimiento promovió la realización de numerosas cepas mutantes para investigaciones, como las que se describirán en este trabajo.

2.4 Morfología de colonias

La morfología es dependiente de la composición de glicolipopéptidos. Se ha demostrado *in vitro* por diferentes métodos -como TLC- que las micobacterias de fenotipo liso (S) poseen una mayor cantidad en su membrana, mientras las de morfología rugosa (R) carecen de éstos (Howard *et al.*, 2006).

Entonces, se hizo la pregunta de que si algún componente de la síntesis es responsable del cambio de fenotipo; por lo que se eligió a *mmpL4b* -quien está involucrado en la exportación de GPLs-. De esa manera se concluyó que la mutación de *mmpL4b* resulta en un cambio en el fenotipo de la cepa.

Además, mediante TLC se obtiene que tras la eliminación de *mmpL4b* no hay producción de GPLs (Medjahed y Reyrat, 2009). En definitiva este ensayo comprueba que *mmpL4b* no tiene una función de redundancia con *mmpL4a* (ver figura 13).

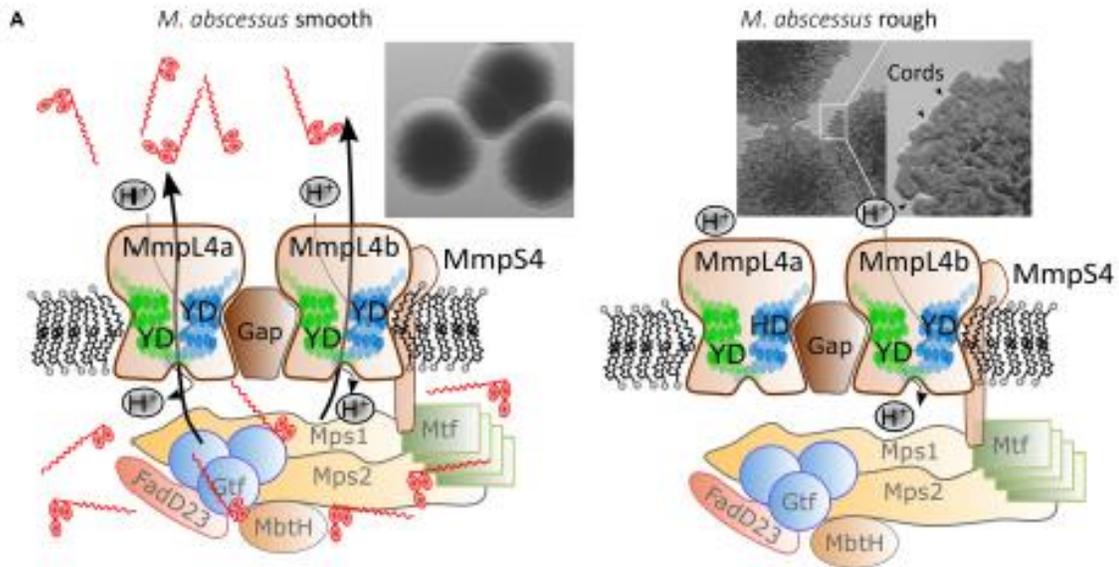


Figura 13 Mecanismo de producción de GPLs en *Mycobacterium abscessus*. En la imagen de la derecha, podemos observar el funcionamiento del mega-complejo enzimático que lleva a la producción de GPLs en el caso del fenotipo liso; mientras que en la imagen de la izquierda, se aprecia la interrupción del funcionamiento de este mecanismo. Tomado de Gutiérrez *et al* 2017.

2.4.1 Reversión fenotípica de colonias

Desde su aislamiento, se ha observado que existe reversión fenotípica de colonias lisas a rugosas y viceversa. Diversos grupos han aportado a la comprensión del mecanismo de reversión fenotípica, no obstante, no se sabe completamente los factores que propician este cambio (Medjahed y Reyrat, 2008).

En lo que respecta, un artículo reciente de Lee *et al* 2017, se analiza tras un tratamiento con una concentración sub-inhibitoria de amicacina, que se propicia la transición de S-R. Este cambio de concentración, generó la disminución en la producción de GPLs, dando como resultado la regulación río abajo de los genes de biosíntesis de estas moléculas. Aunque hay un gran avance en este campo, nuevos estudios son necesarios para comprender mejor los detonantes de este cambio fenotípico.

2.5 Formación de biopelículas y motilidad deslizante (SM)

Se ha señalado que la presencia de estos componentes en las cepas S es estrictamente necesaria para desplazarse horizontalmente y formar biopelículas *in vitro* (Behr y Falkinham III; 2009; Howard *et al.*, 2006).

Otros experimentos demuestran que al eliminarse el gen *mmpL4b* y cambiar de morfología, estos organismos son incapaces de deslizarse horizontalmente y

formar biopelículas. También obtienen que la mutante del gen *mmpL4b*, no es detectada por la vía del TLR-2. Cuando se fabrica una cepa complementada con el mismo gen, se obtuvo como resultado que ahora sí puede ser detectada por el TLR-2. En consecuencia se sugiere que la expresión de GPLs facilita la colonización del huésped y enmascara a las moléculas inmunogénicas PIM's, permitiendo así no ser detectada por esta vía de señalización (Nessar *et al.*, 2011).

La producción de SM y biopelículas permite la habilidad de permanecer en sistemas de agua facilitando su transmisión. Un modelo propone que los GPLs localizados en la superficie celular exponen su cola hidrofóbica disminuyendo la fricción entre la bacteria y la superficie, permitiendo que se puedan adherir y crecer tras la producción de matriz extracelular (Schorey y Sweet, 2008), por lo que pueden persistir en sistemas de agua (Falkinham III 1996).

Asimismo, hay otra evidencia que respalda esta teoría, ya que se ha demostrado que hay formación de biopelículas en la cavidad pulmonar de humanos producida por infecciones con cepas de fenotipo liso (Fennelly *et al.*, 2016). Este hallazgo es clave para proponer nuevas formas de diagnóstico y tratamiento, así como de alertar sobre potenciales riesgos epidemiológicos.

2.6 Producción de citocinas y ROS

Varios reportes indican que las colonias R muestran mayor grado de virulencia con respecto a las colonias S, lo que implica que los GPLs podrían estar implicados en la virulencia de Mab en el hospedero (Howard *et al.*, 2006).

Al respecto, algunos estudios han mostrado que los GPLs modulan la respuesta inflamatoria dependiendo de modificaciones pos-traduccionales que posean en su estructura. Estas modificaciones implican que una pequeña variación en la estructura puede alterar la forma en que estos elementos interactúan con el huésped (Schorey y Sweet, 2008). En algunos experimentos, Schorey y Sweet, (2008) demostraron que diferentes alteraciones postraduccionales de los GPL's pueden liberar diferentes mediadores proinflamatorios como PGE, leucotrienos, IL-1, IL-6 y TNF- α , modulando así la respuesta Th1.

Trabajos posteriores usando como modelo de infección a macrófagos MDM humanos, se descubrió que la producción de IL-8 y TNF- α es mediada por el TLR-2 en respuesta a las cantidades de GPLs. Como resultado, las cepas R indujeron significativamente más citocinas proinflamatorias que la cepa S. Este fenómeno se demostró cuando eliminaron los GPLs de la membrana de las micobacterias con fenotipo S. Esta supresión restituyó la capacidad del TLR-2 de inducir la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos. Con esto se concluye que los GPLs

enmascaran la respuesta pro-inflamatoria de los PIM's al alterar la interacción con el TLR-2 y también que los GPLs son capaces de cambiar la producción de citocinas proinflamatorias, por lo que la presencia o ausencia de GPLs modulan la respuesta inmune (Rhoades *et al.*, 2009).

Otra evidencia de este sistema es encontrada en un artículo de Nessar y colaboradores. En este trabajo, al eliminarse el gen *mmpL4b*, se probó que en un modelo de infección de células MDM's, la mutante $\Delta mmpL4b$, (en comparación con las cepas lisas WT y $\Delta mmpL4b-comp$) ahora tiene capacidad de estimular a macrófagos y replicarse dentro de ellos eficientemente mediante la estimulación por la vía del TLR-2. Este suceso implica que los GPLs están directamente relacionados con la capacidad de la bacteria de enmascarar a los PIM's y evitar ser reconocidos por el sistema inmune (Nessar *et al.*, 2011).

Adicionalmente en este mismo estudio se demuestra que las cepas rugosas tienen la capacidad de producir altas cantidades de TNF- α en comparación con las cepas lisas. Este incremento en TNF- α se propone que puede ser causado tras el reconocimiento por el TLR-2 y la subsecuente cascada de señalización que deriva en la producción de citocinas proinflamatorias (Nessar *et al.*, 2011).

Por otro lado, estudios han demostrado que Mabs R promueve la liberación de aniones superóxido en neutrófilos, lo que puede llevar a la inflamación local y daño tisular. Estos aniones superóxidos resultan en un reclutamiento adicional de células de la respuesta inmune en el sitio de la infección y también promueve la producción de IL-8, IL-1 y TNF- α . Este daño propicia el mantenimiento de un estado de inflamación crónica (Malcolm *et al.*, 2013).

En otro caso, Bernut y colaboradores (2016) utilizaron un modelo de pez cebra, para demostrar que alteraciones en la liberación de TNF- α son causadas por macrófagos activados. La activación de estas células conduce a la producción de ROS, conduciendo a la muerte del macrófago y promoviendo la existencia de cuerdas extracelulares.

Con esto se propone que los GPLs pueden modular la respuesta inmune del huésped, modificando la cantidad de citocinas proinflamatorias inducidas *in vitro* (Schorey y Sweet, 2008).

2.7 Fagosomas y GPLs

Roux y colaboradores (2016) lograron demostrar que existe una diferencia fagocítica entre variantes lisas y rugosas en un modelo de infección de células BMDM. En primera instancia usando microscopía electrónica (TEM) se observó que se formaron más fagosomas tras la infección con la cepa S, además fue

eficientemente fagocitada 24h post infección, se calcula que el 80% los fagosomas formados para contener a las bacterias con este fenotipo, mostraron un solo bacilo dentro de su estructura; mientras que de manera opuesta la variante rugosa formó menos fagosomas y éstos en su interior retenían a más de 2 bacilos. En este trabajo se tiene la hipótesis de que la fagocitosis puede estar relacionada con la capacidad de las bacterias con fenotipo R para formar cuerdas extracelulares (lo cual se discutirá en un punto posterior) (Roux *et al.*, 2016).

Adicionalmente se analizaron las ultraestructuras de los fagosomas y la pared bacteriana tras la infección con cepas R y S, así como con la infección de una cepa mutante en el gen $\Delta mmpL4b$ y $\Delta mmpL4b-comp$. En este experimento, se enfocaron en dilucidar las diferencias en la zona translúcida de electrones (ETZ por sus siglas en inglés), la cual es una parte importante de la pared celular de las micobacterias. Como resultado, sólo *M. abscessus* S de tipo salvaje (WT) y $\Delta mmpL4b-comp$ (ambas productoras de GPL), elaboraron una ETZ gruesa; mientras que el mutante $\Delta mmpL4b$ (deficiente en GPL) y la variante R, no lo hicieron. En general, estos resultados indican que Mab elabora una ETZ que depende de la producción de GPLs, lo que podría contribuir a la supervivencia de la variante S dentro de su célula huésped.

Asimismo se evaluó el crecimiento intracelular de ambas variantes fenotípicas, dentro de las células M ϕ murinas y humanas, donde se eliminó la expresión de *cfr* (cystic fibrosis conductance transmembrane), mutación que está directamente relacionada con el desarrollo de fibrosis quística. En este tipo celular se encontró que la replicación de la bacteria es similar tanto en lisas como rugosas. Esto revela que ambos fenotipos son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de las células y además se demuestra que no es necesario tener CFTR funcional para que puedan crecer; por lo que en personas sanas (generalmente sin mutación en *cfr*) ambas cepas S y R pueden potencialmente causar infecciones (Roux *et al.*, 2016).

Dados los resultados anteriores, evaluaron el mecanismo en que las cepas pueden sobrevivir en los fagosomas. Descubrieron que la variante S, de forma opuesta a la cepa R, puede prevenir la fusión del fagosoma con el lisosoma, es decir, la creación del fagolisosoma activo que disminuye el pH dentro de esta estructura y potencia su supervivencia (Roux *et al.*, 2016).

2.8 Apoptosis mediada por GPLs

En 2010 Roux y colaboradores mostraron que las cepas S falla en promover la apoptosis y autofagia, al menos en BMDM, elemento contrario a lo observado con las R, elementos probablemente influenciados por el tipo de fagosomas (Roux *et al.*, 2010).

Con este antecedente, el grupo de investigación conformado por Whang y colaboradores en 2017 demostraron usando los métodos de FACS (por sus siglas en inglés) con anexina V/ yoduro de propidio y TUNEL (Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa), que el morfotipo R, tiene una capacidad de generar apoptosis en macrófagos RAW 264.7 significativamente mayor con respecto al fenotipo S (Whang *et al.*, 2017).

En seguida, se evaluó si la apoptosis se debía a la activación de la vía de las caspasas. Para ello, usaron un ensayo de Western Blot, el cual reveló la presencia de formas escindidas de caspasa 3 (C3), caspasa 9 (C9) y PARP en células infectadas con el tipo R. En este punto las actividades de C3 y C9 fueron significativamente mayores en los macrófagos infectados de tipo R que en los macrófagos infectados de tipo S, con lo que se comprueba la apoptosis por vía de las caspasas dependiente del fenotipo y por ende, del contenido de GLP's en su membrana (Whang *et al.*, 2017).

Tras la observación de que las cepas S promueven significativamente menos la apoptosis, y para saber si los causantes de este efecto eran los GPLs, aislaron a estos componentes de la membrana por TLC, retaron a los macrófagos con esta molécula y observaron que no solo no inducían apoptosis sino que además la inhibían (Whang *et al.*, 2017).

Posteriormente también probaron que los GPLs inhiben la producción de ROS y evitan la liberación de citocromo c de la mitocondria ya que los GLP's son transportados a la mitocondria y ahí interactúan con la ciclofilina D, la cual es un componente del complejo de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Esta interacción evita que el poro se abra y se liberen moléculas apoptóticas (Whang *et al.*, 2017). Esto indica que las cepas S, al contrario de las cepas R, pueden permanecer dentro del huésped ya que evitan la apoptosis celular, lo cual podría ser clave para el proceso de latencia.

Adicionalmente comprobaron que un tratamiento de GPLs inhibe la respuesta apoptótica, limitando el crecimiento intracelular y por ende la dispersión de forma significativa (Whang *et al.*, 2017). Esto evidencia de manera directa la virulencia de la cepa R y abre una vía a nuevas investigaciones para proponer tratamientos efectivos contra esta bacteria.

2.9 Cuerdas extracelulares y formación de abscesos

Las cuerdas son un factor de virulencia visto por primera vez hace más de 100 años por Robert Koch y descrito por varios grupos para otras micobacterias como *Mtb* (Llorens-Fons *et al.*, 2017). Sin embargo, no se había estudiado la participación de los ácidos micólicos en la generación de cuerdas, por lo que el grupo de Llorens-Fons (2017) se encargó de esta tarea. El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de los lípidos y ácidos micólicos de la pared celular expuestos a la superficie en la formación de cordones en *M. abscessus*. Usando microscopía electrónica demostraron que estos ácidos micólicos, en particular los polifleatos de trehalosa (TPP) se localizan en las superficies externas de los cordones y los bacilos R, por lo que son generados son los generadores de las cuerdas (Llorens-Fons *et al.*, 2017).

En otro estudio, Byrd y Lyons (1999) infectaron fibroblastos humanos con ambos fenotipos. En este se encontró que las cepas R tienen una mejor capacidad de diseminación entre células, esto debido a la formación de cuerdas, fenómeno ausente en la cepa S.

Con estas bases ahora era necesario comprobar si los GPLs eran los inductores maestros de las cuerdas. En este caso, se utilizó un modelo de infección del pez cebra (ZF) usando cepas WT de fenotipo R y S, así como una mutante deletada en el gen *mmpL4b* y una cepa complementada con este mismo gen. El experimento se formuló con base en la transparencia óptica de los embriones, para visualizar la progresión de la infección con Mab teñida con fluorescencia y se evaluó la carga bacteriana, sobrevivencia de embriones, así como el daño tisular (Bernut *et al.*, 2014).

En este modelo se encontró la formación de cuerdas extracelulares generadas por la variante R es un mecanismo para evitar la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, promoviendo así la prevalencia de la infección, formación de granulomas y muerte de la larva. Adicionalmente observaron que existe una mayor virulencia de la variante *M. abscessus* R en comparación con la variante S, efecto correlacionado con la pérdida de producción de GPLs (Bernut *et al.*, 2014).

Asimismo, la virulencia de la variante R involucró la producción masiva de cuerdas de serpentina, ausentes durante la infección con variante S, y los cordones iniciaron la formación de abscesos que condujeron a una muerte larvaria rápida. Se examinó que la liberación de *M. abscessus* de macrófagos apoptóticos inició la formación de cordones que crecieron demasiado para ser fagocitados por macrófagos o neutrófilos (Bernut *et al.*, 2014)

En conjunto, estos resultados demuestran que la ausencia de los GPLs en las cepas rugosas son los ejes centrales de la modulación de la respuesta inmune, al favorecer la replicación en macrófagos y modular la formación de cuerdas extracelulares, para posteriormente evitar ser fagocitadas por macrófagos o neutrófilo circundantes. Esto concluye que los GPLs juegan un papel crucial en la fisiopatología *in vivo* de la infección por *M. abscessus* y enfatiza el cordaje como un mecanismo de evasión inmune (Bernut *et al.*, 2014).

2.10 Infecciones pulmonares en modelo murino.

El primer estudio en dilucidar las diferencias tras una infección con cepas S y R de mab fue realizado por Byrd y Lyons en 1999. En este estudio usaron cepas provenientes de una biopsia a las cuales tipificaron como Mab y se infectaron ratones BALB/c y SCID. Se obtuvo en ambos modelos que el morfotipo R persista tanto en el pulmón y se disemina al bazo, mientras que la S se aclara rápidamente y no se disemina. No obstante, en este trabajo no se evaluaron otros rasgos de la enfermedad en un modelo *in vivo*, por ello más estudios fueron necesarios para acreditar el modelo.

Posteriormente Ordway y colaboradores en 2008, hicieron una cinética de infección pulmonar con una cepa de Mab y se utilizaron cepas de ratones C57BL/6-*ob/ob* (deficientes en lectina y más susceptibles a *Mtb* y otros patógenos) y hembras C57BL/6-*wt* (resistentes a otras infecciones micobacterianas, usadas como controles de resistencia) estudiadas por cada 15 días por 60 días. Usando un modelo de inoculación con una dosis alta (200 bacterias por animal) en aerosol, ambos desarrollaron una infección establecida, donde hubo una respuesta inmune pulmonar que en ratos WT se eliminó al día 60, mientras que en *ob/ob* en el 60 (Ordway *et al.*, 2008), demostrando que se resuelve la infección localizada. Asimismo se encontraron micobacterias en el bazo desde el primer día, esto muestra la capacidad de Mab para diseminarse y afectar a otros órganos, en este punto las unidades formadoras de colonias fueron detectadas también en último día de la cinética. Esto muestra que estos 2 órganos tienen una respuesta diferente en la infección causada por Mab.

En este mismo trabajo usaron C57BL/6-*INF- γ* (GKO susceptible a *Mtb*) usando el mismo proceso de infección con *M. abscessus*. Este experimento mostró una infección pulmonar progresiva que no se eliminó en 60 días y se diseminó al bazo a pesar de una fuerte afluencia de células T, macrófagos y células dendríticas, que culminó en una extensa consolidación pulmonar (Ordway *et al.*, 2008)

El estudio histopatológico mostró que al día 30 cuando había nulo crecimiento de bacilos en los pulmones de C57BL/6, se podían encontrar lesiones granulomatosas compuestas por linfocitos y células espumosas. Para el día 60, los granulomas tenían fibrina centralizada densamente rodeada de grupos apretados de linfocitos y pocas células espumosas en el manto de las lesiones. De manera contrastante, en los ratones ob/ob había más células espumosas y lesiones granulomatosas más extensas para el día 30 que siguió hasta el día 60 con la persistencia de células espumosas vacuoladas. En los GKO se encontró muchos más infiltrados peribronqueales desde el día 15-30, para el día 60 era evidente que había una mayor área de consolidación de la inflamación con varios agregados con células espumosas. (Ordway *et al.*, 2008)

Además en los ratones GKO, se observó la aparición de linfocitos TCD4+ y CD8+ productores de IL-4 e IL-10 en los pulmones, lo que hace a la infección más persistente y por ende difícil de tratar, con ello concluyen que IFN- γ es de importancia crítica en la defensa del huésped contra Mab (Ordway *et al.*, 2008).

El grupo conformado por Caverly y colaboradores (2015) se encargó de comparar las infecciones causadas por el morfotipo rugoso y liso usando como modelos de infección intratraqueal dirigida a los pulmones de ratones C57BL/6-*ctr* y C57BL/6-*wt*. Observaron que ambos morfotipos causan infecciones similares, se recuperaron unidades formadoras de colonias en el día 3 y 14 post infección en el pulmón, aunque también se encontraron colonias en el bazo, pero en menor magnitud. La infección persistió, no obstante la carga de infección disminuyó con el tiempo en los ratones C57BL/6-*wt* y aumentó en C57BL/6-*ctr*, lo que asemeja a lo que sucede en pacientes con fibrosis quística (Caverly *et al.*, 2015).

Asimismo, en este mismo ensayo se observó conversión espontánea *in vivo* de un fenotipo liso a rugoso, el cual ocurrió en 21% de los ratones (12/57) efecto que se describe *in vitro* algunos artículos mencionados en la introducción de este trabajo (Caverly *et al.*, 2015).

Después del día 3 y 14 se recuperó el líquido de lavado bronqueoalveolar (BALF) y mostró que la infección por la cepa rugosa tiene más conteo leucocítico en comparación con la cepa lisa en ambos modelos. También se midieron los niveles de las citocinas TNF- α , KC e IL-1 β del BALF por ELISA en el día 14, aquí notaron que en los C57BL/6-*wt* había mayor producción de estas citocinas tras la infección con el morfotipo R, en contraste los C57BL/6-*ctr* esta tendencia fue contraria. Por otro lado, en el caso de la inoculación con cepas lisas no se encontraron cambios histológicos pulmonares, incluidas bronquiectasias, granulomas o inflamación, en ninguno de los grupos (Caverly *et al.*, 2015).

Esto indica la capacidad de la cepa R de causar una mayor respuesta inflamatoria en el huésped además de que es capaz de diseminarse de forma sistémica más eficientemente que la cepa L, lo cual es clave para detectar infecciones no controladas y proponer otros tratamientos.

En un estudio no publicado de éste laboratorio, se utilizaron diferentes cepas de aislados médicos de *M. abscessus*, tanto lisas como rugosas, se observa que después del día 60 ya no hay carga bacilar, sin embargo, no se observan diferencias significativas con respecto a la morfología. Este estudio demuestra que puede ser eficientemente contenida por el sistema inmune.

2.11 Infecciones cutáneas en modelo murino.

En la actualidad, no hay artículos publicados que asemejan un modelo de infección cutánea, por lo que en éste laboratorio, se utilizaron las cepas de *M. abscessus*, como piloto de infección subcutánea utilizando cepas tanto lisas como rugosas.

En 2018 se publicó la tesis de licenciatura titulada “Evaluación de la delección del gen *mmpL4b* de *Mycobacterium abscessus* en cojinetes plantares”, donde se llevó a cabo una infección subcutánea ratones BALB/c machos. En este estudio se infectaron con $\pm 250,000$ bacilos de cuatro cepas 390R, 390S, $\Delta mmpL4b-comp$ (S) y $\Delta mmpL4b$ (R) y *Mtb* H37Rv como control positivo (Hernández-Pando *et al.*, 1996)-utilizadas en el presente estudio- durante una cinética de infección de 150 días.

El primer parámetro a revisar fueron las UFC's en los cojinetes plantares. En el día 3 post infección (p.i) se observa una disminución de la carga bacilar en comparación al inóculo para todas las cepas. A continuación, sigue disminuyendo progresivamente el número de bacilos, hasta su eliminación total en el día 90, efecto que se asemeja a lo observado en otros modelos de infección e inclusive otros modelos animales como los mencionados anteriormente (Bendaña, 2018).

Igualmente, se evaluó un parámetro indirecto de la inflamación que es la medida del grosor del cojinete plantar. Se obtuvo que en las cepas 390S y $\Delta mmpL4b-comp$ (S), así como H37Rv, se incrementa el grosor a partir del día 3 p.i, llegando a su máximo en el día 28 y disminuyendo prácticamente a niveles basales para los días 120 y 150 p. i. En contraste, las cepas 390R y $\Delta mmpL4b$ mostraron mayor inflamación en comparación a las cepas S y H37Rv; en particular, el punto más alto fue en el día 28 p.i, seguido de disminución en el día 60, sin embargo, pese a que continúa la disminución para los días 90 al 150, no llega a niveles basales (Bendaña, 2018).

Por esta misma razón, se revisó la histología de los tejidos obtenidos tras la eutanasia y realizando cortes de 4 μm con tinción de hematoxilina y eosina. Se observa en la etapa temprana de la de infección un abundante infiltrado celular proinflamatorio compuesto por macrófagos y linfocitos, con signos de edema y puntos necróticos en el tejido celular subcutáneo para todas las cepas. A continuación, el día 28 post-infección el edema disminuye y no se observan puntos necróticos, no obstante, el infiltrado celular proinflamatorio no disminuye y comienza la producción de fibrosis central, particularmente en las cepas 390R y $\Delta mmpL4b$ (Bendaña, 2018).

En los días más crónicos 60-150, las cepas 390S, 390R y $\Delta mmpL4b\text{-comp}$ se observa mayor fibrosis extensa localizada en el tejido celular subcutáneo en comparación con las cepas lisas y H37Rv. Asimismo, se ve una disminución considerable de macrófagos y linfocitos, lo que denota una compactación que se ve reflejada en el parámetro de la medición indirecta de la inflamación.

En contraste, la cepa $\Delta mmpL4b$ en la etapa aguda (día 3-28 p.i) tiene el mismo patrón que las cepas lisas, mostrando infiltrado celular mixto de macrófagos y linfocitos. No obstante, en la etapa crónica se destaca por ser la cepa que muestra una mucho menor fibrosis extensa y una clara disminución de infiltrado proinflamatorio (Bendaña, 2018).

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 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, mientras que la ausencia de este, genera un reconocimiento más eficiente por el sistema inmune, lo que ocasiona un infiltrado celular inflamatorio exacerbado y menor producción de fibrosis. Por último se propone que *mmpL4b*, podría estar involucrado en otras funciones fisiológicas además de la exportación de sideróforos y GPLs, efecto que podría estar resultando en la disminución de estos signos de inflamación (Bendaña, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

Mycobacterium abscessus es una bacteria patógeno-oportunista de crecimiento rápido, cuya incidencia a nivel global ha aumentado considerablemente, particularmente en el caso de las patologías subdérmicas.

El tratamiento de las infecciones provocadas por este agente etiológico son sumamente complejas de tratar debido a la multidrogoresistencia que presentan causada por factores internos y externos, en particular a su complejidad de estructura y composición de membrana.

Se ha reportado en numerosos casos clínicos se requiere de un periodo de tratamiento extenso con varios antibióticos y en la mayoría de los casos genera fibrosis deformante, por lo que cirugía reconstructiva es necesaria.

Existen dos fenotipos de colonias; lisas y rugosas, que difieren en el contenido de GPLs en su membrana. Estudios han mostrado la relación entre el fenotipo colonias y su efecto en el huésped. Sin embargo, se desconoce el papel exacto de los GPLs a lo largo de la infección, es por ello que es necesario estudiar en un modelo de infección subdérmico en ratones BALB/c la importancia de los GPLs en la histopatología generada tras la infección, lo que podría indicar un posible blanco terapéutico en la respuesta inmunológica e inflamatoria local producida por *Mycobacterium abscessus*.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Pregunta principal

¿Cuál es el papel de los GPLs en la histopatología generada por una infección subcutánea de *M. abscessus*?

Preguntas complementarias:

¿Cómo el contenido de GPLs influye en la inflamación y cicatrización del tejido celular subcutáneo durante la cinética de infección?

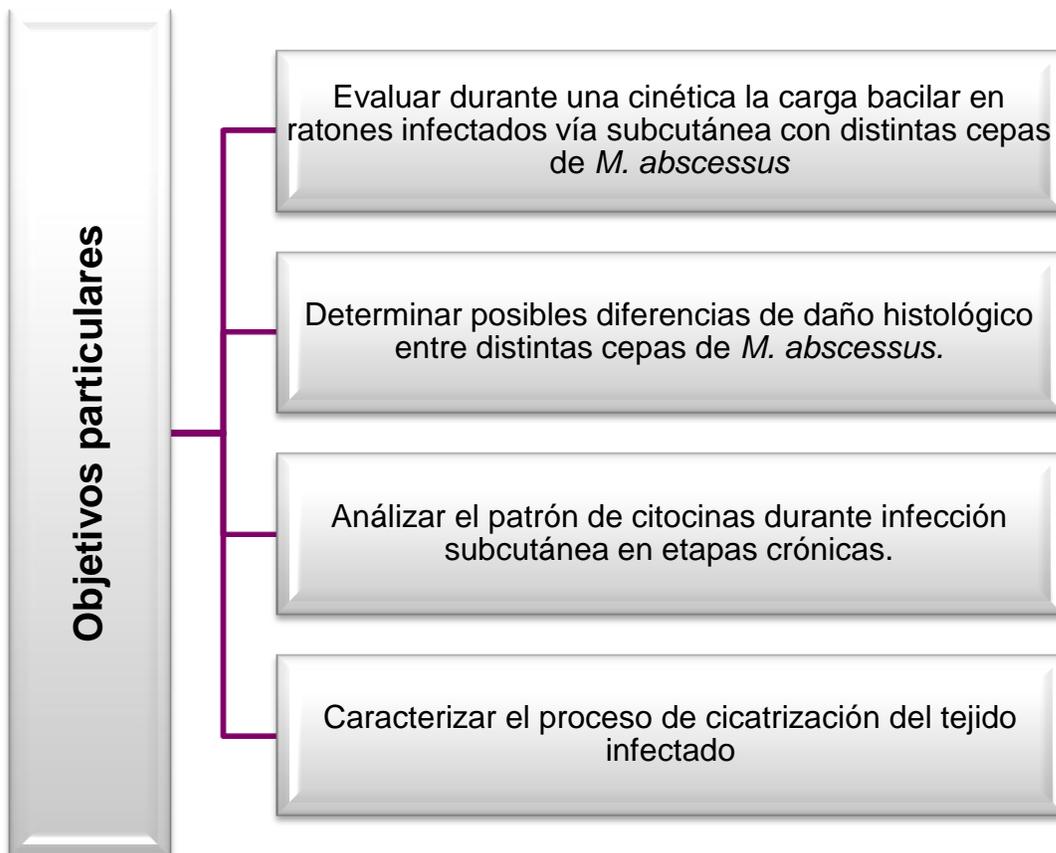
¿Cómo afectan el contenido de GLP's la supervivencia bacteriana en el huésped?

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar la importancia de los GPLs en la respuesta inmune e inflamatoria local producida por *Mycobacterium abscessus* en un modelo de infección subcutánea y pulmonar en ratones BALB/c.

5.2 Particulares



6. HIPÓTESIS

La ausencia de GPLs en las cepas rugosas tiene un papel crucial en el desarrollo de la infección producida *Mycobacterium abscessus* en un modelo de infección subcutánea en ratones BALB/c. La histopatología de las cepas rugosas presenta mayor inflamación durante la etapa aguda de la cinética de infección y más fibrosis durante la etapa crónica. Adicionalmente las cepas rugosas tienen mayor carga bacilar y producción elevada de citocinas proinflamatorias. Por el contrario, las cepas lisas -productoras de GPLs- generan en el huésped menor inflamación en la etapa aguda, seguido de menor producción de fibrosis durante la etapa crónica y presentan menor carga bacilar a lo largo de la cinética.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cepas experimentales

7.1.1 Identificación de las cepas de Venezuela

La identificación de las cepas venezolanas fue realizada por la Lic. Andrea Rodríguez Goncalves y MSc. Adriana D'Alessandro bajo la dirección del Dr. Jacobus de Waard en el Instituto de Biomedicina, Venezuela así como el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). No se poseen detalles específicos de la historia clínica de los pacientes, por lo que no se puede efectuar otros tipos de análisis más profundos.

Tras la obtención de las muestras se realizó en primera instancia la tinción de Ziehl-Neelsen, seguida de un cultivo micobacteriano para aislar a las cepas en cada muestra. Posteriormente se realizó un ensayo de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de reacción en cadena de la polimerasa, conocido como PCR-RFPL (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay), el cual fue descrita por Telenti y colaboradores en 1993, el cual establece un patrón único para cada micobacteria usando el gen *hsp65*. Este experimento da como resultado 8 cepas distintas de Mab las cuales se muestran en la tabla 1.

Cepa	Origen	Fenotipo	Cepa	Origen	Fenotipo
C1	Biopsia de tejido blando	L	C7	Tejido	L
C3	Orina	L	C10	Ambiente	R
C4	Secreción	R	C19	Espujo	L
C6	Biopsia de tejido blando	R	C20	Espujo	R

Tabla 1 Identificación de las cepas de Venezuela. Esta tabla muestra fenotipo de diferentes cepas provenientes de distintos orígenes identificadas mediante PCR-RFPL del gen *hsp65* específico para Mab.

7.1.2 Construcción e identificación de las cepas “Francesas”

En la segunda parte de este estudio se utilizan dos cepas provenientes de una biopsia descrita por Byrd y Lyons (1999), las cuales van a fungir como cepas de referencia, asimismo, se usan las cepas construidas por Nessar y colaboradores (2011), las cuales fueron proporcionada para éste trabajo por el grupo de investigación que era dirigido por el Dr. Jean-Marc Reyrat[†] en la Université Paris V-Descartes.

Cepa	Referencia	Origen	Notas
<i>M. abscessus</i> 390R (Rugosa)	Byrd & Lyons (1999)	Universidad de California, Davis, EUA	Mab-R aislado en cultivo puro de un granuloma iléal en un paciente con la enfermedad de Crohn
<i>M. abscessus</i> 390S (Lisa)			Mab-S fue un mutante espontánea (reversible) de la cepa de colonia R aislada <i>in vitro</i>
Mab $\Delta mmpL4b$ (Rugosa)	Nessar <i>et al.</i> , (2011)	Construcción <i>in vitro</i> Université Paris V-Descartes, Francia	Sistema a partir del constructo del gen <i>mmpL4b</i> (MAB_4115c), construcción de pBSK $\Delta mmpL4b$: : Zeo para mutagénesis dirigida en Mab 390S
Mab $\Delta mmpL4b$- <i>comp</i> (Lisa)			Constructo <i>pNBV1-mmpL4b</i> electroporado en Mab $\Delta mmpL4b$ y transformado. Mutantes seleccionadas con higromicina (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tabla 2 Particularidades de las cepas utilizadas en la segunda parte de este estudio. Se muestra el origen de las cepas WT utilizadas en este estudio, así como el resumen de la construcción de la cepa mutante y complementada.

7.2 Grupos experimentales

Para la realización de este trabajo, se utilizó como modelo a ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad y 22 gr de peso, proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), los cuales

fueron infectados con distintas cepas de Mab (ver figura 14) en dos partes experimentales.

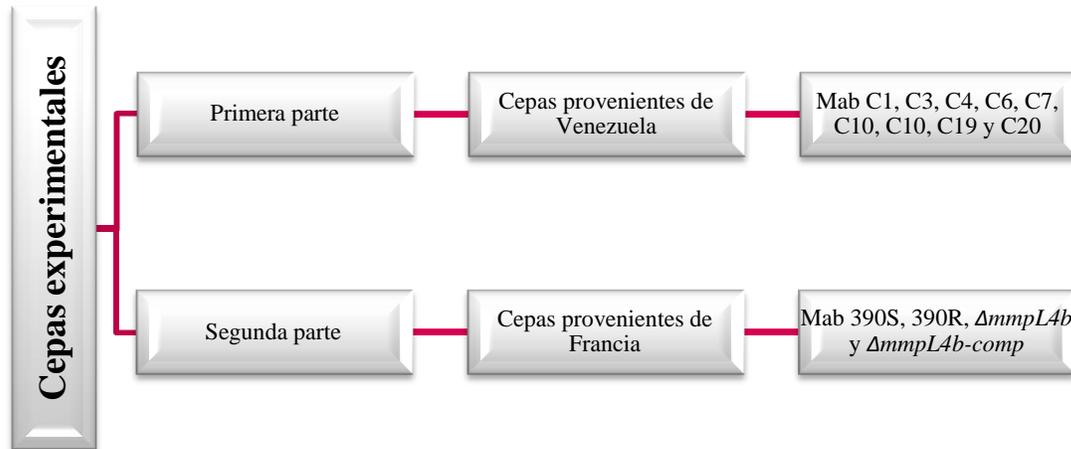


Figura 14 Distribución de cepas utilizadas. Se muestra las cepas utilizadas para cada sección de este trabajo.

Con las cepas mencionadas anteriormente, se realizaron dos cinéticas de infección, la primera consta de inoculación intratraqueal, mientras que la siguiente corresponde a la inoculación subcutánea como se describe en la figura 15.

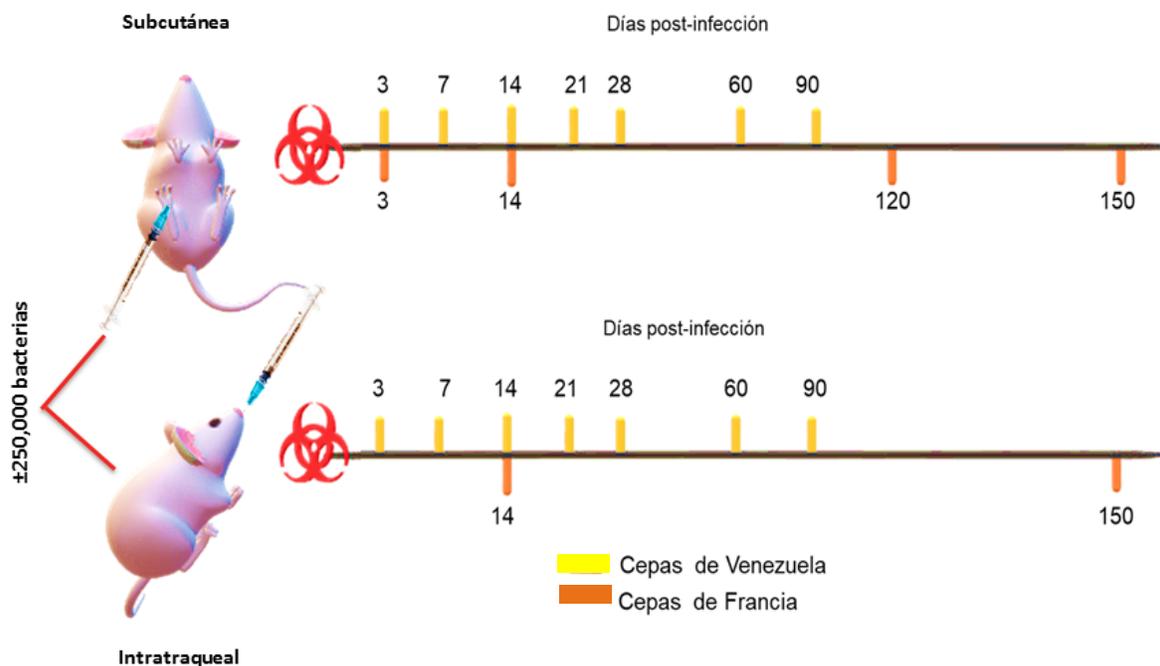


Figura 15 Cinética de infección. En la parte superior se muestran la cinética correspondiente a la infección subcutánea, tanto para las cepas de Venezuela (amarillo) como para las de Francia (naranja), mientras que en la parte inferior está representada la cinética de la infección intratraqueal.

7.3 Preparación para la infección

La bacteria crece en medio 7H9 Middlebrook enriquecido con glicerol al 0.5% y se incuba a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ en agitación constante durante 5 días. La curva de crecimiento se monitorea diariamente por espectrofotometría. En el momento en que se llega a la fase logarítmica aproximadamente 0.4 unidades de densidad óptica a 600 nm y se lava con PBS tres veces. Posteriormente se realizan alícuotas y se congela a -70°C. Después se cuantifica cada lote bacteriano se determina el número de UFC por mL, con esto se calcula y ajusta a 2.5×10^6 bacilos por cada 100 μ L para infección intratraqueal (IT) y 2.5×10^6 bacilos resuspendidas en 10 μ L para la vía subcutánea.

En paralelo, de ese mismo lote se toma una muestra para realizar un cultivo como control de calidad de la infección y se realiza el conteo de UFC's con la finalidad de confirmar el número de bacterias con las que se infectaron a los ratones, es decir, el nivel basal. Se efectúan diluciones de -1 a -4 y se procede a sembrar 10 μ L 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 contabiliza por lote cuál fue el inóculo final.

7.4 Infección

Los animales utilizados para éste estudio se deben alojar en microaisladores en un sistema de presión negativa/positiva. El aire suministrado se pasa a través de filtros HEPA y toda la manipulación es realizada bajo protocolos de Bioseguridad Animal Nivel 3.

7.4.1 Intratraqueal (IT)

Para establecer la infección pulmonar (ver figura 16), se utiliza como base el modelo de infección murino de tuberculosis pulmonar progresiva descrito por Hernández-Pando *et al.*, 1996. Los animales fueron anestesiados con vapor de sevoflurano (100 μ L por ratón dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm). Se inocularon 2.5×10^5 unidades formadoras de colonias suspendidas en 100 μ L de PBS de las cepas mencionadas anteriormente.

Para la inoculación intratraqueal los animales se colocan sobre una placa de unigel revestida con papel de aluminio y se sujetan los incisivos con una liga de caucho. Una vez colocados los ratones en esta posición, se introduce una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea para administrar la preparación mencionada. A continuación, los ratones infectados fueron

mantenidos en posición vertical asegurando la llegada de bacterias al pulmón y posteriormente colocados en grupos de 5 en cajas con microaisladores con libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo laminar en una instalación de nivel III de bioseguridad.

Para el grupo control, se administran 10 μ L de solución salina siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente.

7.4.2 Subcutánea (SC)

Para inducir la patología subdérmica (ver figura 16), los ratones se colocan en un tubo de 50 mL con dos aperturas laterales ubicadas en el extremo inferior del tubo. De las aperturas laterales se toma el músculo abductor de las patas traseras y se precede a sacar del tubo falcon las extremidades traseras. Posteriormente se inyecta en el centro del cojinete plantar trasero izquierdo y derecho con una jeringa de insulina de calibre 0.5 mm de 0.3 mL o 30 unidades (UCC). Se inyecta una unidad equivalente a 10 μ L, de la preparación que contiene \pm 250,000 bacterias resuspendidas en solución salina.

Para el grupo control sin infección, se administran 10 μ L de solución salina siguiendo el mismo proceso descrito.



Figura 16 Vías de infección en ratones BALB/c, intratraqueal y subcutánea.

7.5 Eutanasia

Después de la infección se da muerte a los animales en los periodos mencionados anteriormente. En este proceso se obtienen las muestras para realizar los procesos de UFC's, histología y biología molecular como se muestra en la figura 17.

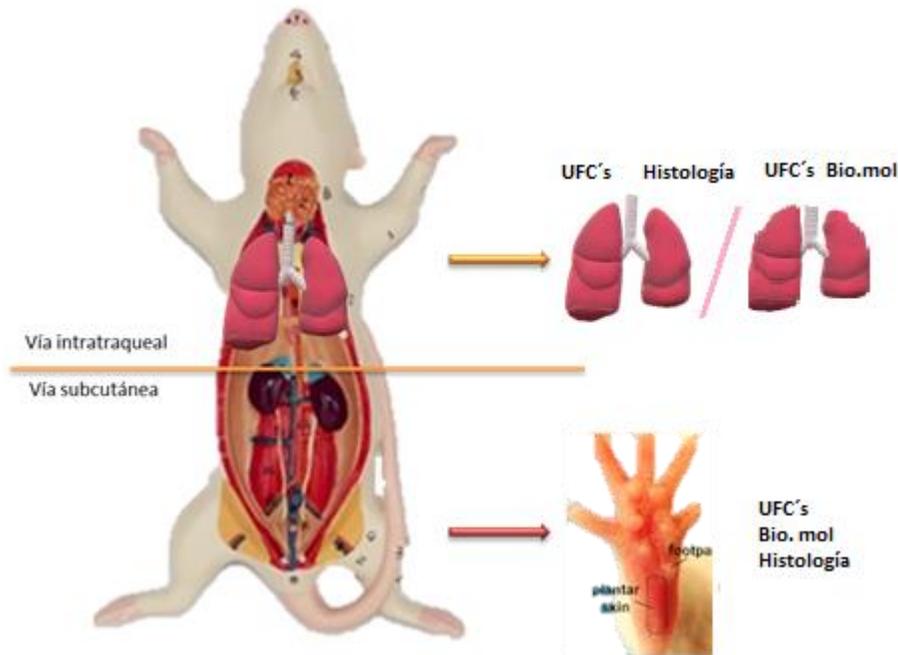


Figura 17 Representación de eutanasia y toma de muestras. En la parte superior se muestra la extracción de pulmones y en la inferior el proceso de colecta de los cojinetes plantares de las patas traseras. Estas muestras se congelan y se utilizan para la cuantificación de la carga bacilar, el análisis histológico y de biología molecular.

Los ratones se anestesian mediante una sobredosis por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (210 mg/kg). Subsiguientemente se induce la muerte por exanguinación y se extraen los órganos relevantes para la investigación, es decir, los cojinetes plantares y pulmones dependiendo de la vía de infección. Las muestras obtenidas se reparten para los procedimientos de histología, biología molecular, hidroxiprolina y conteo de unidades formadoras de colonias.

7.5.1 Intratraqueal

A continuación se coloca al ratón sobre una placa de unicel cubierta con aluminio y se procede a rociar la piel con alcohol al 96°, se realiza una incisión en la zona abdominal y con una jeringa de 1mL se extrae la mayor cantidad de sangre posible de la vena cava, se corta hasta la parte superior del pecho y se fractura el esternón destapando la tráquea, con una pinza se bloquea un pulmón y se procede a perfundir desde la tráquea con alcohol absoluto. Se retira la pinza y se guarda el otro pulmón a -70°C para su posterior uso.

7.5.2 Subcutánea

Al momento de la toma de las muestras, se evita aplastar los cojinetes. Se procede a lavar con aspersor las patas con abundante agua y jabón, se secan delicadamente con una gasa estéril para eliminar cualquier contaminación.

Posterior a esto, se emplean unas tijeras quirúrgicas estériles para cortar el hueso por encima del tarso para obtener las muestras destinadas para histología, y se colocan en frascos individuales con alcohol absoluto durante al menos 24 horas.

Para el caso de las muestras destinadas corte con tijeras estériles para cutícula cuidando de no dañar nervios o huesos, extrayendo únicamente el cojinete plantar. Se almacena en tubo cryovial estéril de 2 mL, que inmediatamente se conserva en nitrógeno líquido y posteriormente se guarda a -70°C hasta su uso.

7.6 Carga bacilar

Las muestras destinadas para determinar la carga bacilar por UFC's se descongelan a 37°C por 5 minutos, se colocan dos perlas de cerámica especiales ©Sena en el tubo para triturar tejido y se homogeniza en congelación, utilizando el equipo FastPrep 24™ 5G MP Biomedicals durante un ciclo de 25 segundos. Posteriormente se les adiciona 1 mL de PBS estéril y se efectúan tres ciclos más de homogenización, cuidando de mantener las muestras siempre en hielo.

Posterior a la homogenización, se sonica durante 45 segundos, se agita con vortex por 5 segundos y se realizan diluciones seriadas de la muestra utilizando placas de 96 pozos y PBS tween80 al 0.5%.

A continuación se toman 10 μL de cada dilución para sembrar en placas con medio agar 7H10 Bacto Middlebrook enriquecido con OADC y glicerol al 0.5%, 10 μL por muestra. Todo el material y los desechos que tuvieron contacto con los tejidos infectados se inactivan con Clidox™ y se tratan como se describió previamente. Todos los procedimientos se realizan dentro de un gabinete de bioseguridad nivel III. Subsecuentemente se incuban a 37°C con 5% de CO_2 durante 5 días y se procede a contar las colonias presentes en cada una de las diluciones para establecer la carga bacilar.

7.7 Técnica histológica

Las muestras destinadas para histología se dejan por 72 hrs en alcohol absoluto. Los pasos a seguir para la inclusión de las muestras en parafina son:

- 1 Deshidratación: en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico de la siguiente forma: al 70 % por 24 horas, al 95% por 2 horas, al 100 % por 2 horas.
- 2 Diafanización: sustancias capaces, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina mediante líquidos diafanizadores, en este caso xilol. Al igual que en la deshidratación se practican baños sucesivos como se describe a continuación: alcohol absoluto (50%)-xilol (50%) por 1 hora, alcohol absoluto (30%)-xilol (70%) por 1 hora y xilol absoluto por 2 horas.
- 3 Inclusión y formación del bloque de parafina: se realizan tres baños en parafina sucesivos, a manera que el xilol en exceso se elimine, el primer baño de 1.5 horas, el segundo de 1 hora y el tercero de 30 a 60 minutos.

La formación del bloque de parafina se efectúa empleando un incluidor usando moldes de metal, los cuales se llenan con parafina caliente pura; con una pinza caliente se toma una pieza de tejido, se orienta una de sus superficies y se sumerge al interior del molde. Después éstos se enfrían de inmediato para que la parafina se solidifique de manera homogénea, formando un bloque sólido.

Una vez incluidas las muestras, se realizan cortes de 0.4 μm , se toman cuidadosamente y se colocan en un baño de agua destilada a 43°C con la finalidad de estirar el tejido. A continuación se sitúan los cortes en un portaobjetos cargado y se tiñen con hematoxilina & eosina y tricrómico de Masson para el análisis histológico. En estas preparaciones se hace el análisis histológico y morfométrico por medio de la determinación en micras cuadradas de la inflamación y daño tisular con la utilización del software Leica ApplicationSuite v4.3.

7.8 Extracción de muestras de RNA en parafina

En este punto se utiliza el kit Total RNA isolation from FFPE Samples: Nucleo Spin total RNA FFPE XS de Macherey-Nagel para tejido en parafina. Se utilizan ± 15 cortes de 4-5 μm del tejido en parafina cuidando de limpiar todas las superficies con aguda DEPC y RNAsa-off. Posteriormente se procede a eliminar la parafina en la que está embebido el tejido agregando 1 mL del disolvente de parafina y se incuba en baño maría 56°C por 5 minutos. A continuación se agita con vortex la muestra y se centrifuga 2 minutos a 10000 rpm. Cuidando de que la muestra aún siga líquida, se agrega 140 μL del buffer MLF sin mezclar y se centrifuga de nuevo

bajo las mismas condiciones. Después se elimina el disolvente de parafina en la fase menos densa y se adicionan 12 μ L de proteinasa K mezclando suavemente e incubando de 30-90 minutos a 56°C.

En seguida, se verifica que no queden residuos de tejido visibles, se continúa con el procedimiento y a partir de este punto se debe continuar la extracción en hielo. Se agregan 12 μ L del buffer MKA y se incuba por 5 minutos en hielo, se centrifuga 5 minutos a 10000 rpm y se transfiere el sobrenadante transparente a otro tubo eppendorf de 1.5 mL, se le agregan 400 μ L del buffer MX para ajustar las condiciones de unión y se reposa 1 minuto a temperatura ambiente, se coloca la columna en un tubo de colecta y se transfiere el volumen total de la muestra, se centrifuga 1 min 10000 rpm y se desecha el sobrenadante. Posteriormente se realizan 2 lavados, en el primero se añaden 400 μ L del buffer de lavado MW2, se centrifuga bajo la misma condición y se descarta el sobrenadante; este paso se repite con un volumen de 200 μ L del mismo buffer y subsiguientemente se agregan 25 μ L de rDNAsa, se reposa por 15 minutos a temperatura ambiente; se agregan 15 μ L del buffer MX, se centrifuga 1 minuto 10000 rpm, se lleva a cabo el procedimiento de lavado descrito con el buffer MW2 y se desecha el sobrenadante. Para finalizar, se centrifuga por 5 minutos 10000 rpm para eliminar cualquier elemento que no sea el RNA pegado a la columna y se cambia a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL, la muestra se eluye utilizando 30 μ L de H₂O libre de RNAasa y se centrifuga 1 minuto a 10000 rpm. El residuo contiene el RNA y éste debe de ser conservado a -70°C hasta su uso.

7.9 PCR

La calidad y cantidad de RNA será evaluada mediante espectrofotometría (260/280) por Nanodrop (Thermo Scientific). Se realiza la retrotranscripción del RNAm para cDNA utilizando 5 μ g de RNA, oligo-dT y Omniscript Kit (Qiagen, México). Posteriormente se realizan dos tipos de PCR (ver secuencia de primers en el Anexo 1):

- Punto final: para ver la expresión del gen *mmpL4b* de Mab
- Tiempo real: para cuantificar la expresión del hospedero de las citocinas: *TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-10*, *IL-1*, *IL-4* *IL-13* y *TGF- β* .

En seguida se lleva al termociclador para la reacción en tiempo real o punto final y se estipulan las condiciones generales del experimento.

En el caso del tiempo real, se indican los blancos que serán detectados, así como las muestras que se procesan y son acomodados en el diseño de la placa. Para iniciar el procedimiento, el equipo está preparado para las corridas estándar en las

que se utilizan primers y sondas prediseñados por el fabricante. La PCR en Tiempo Real se realiza empleando el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) y se cuantifica utilizando Quantitech Sybr Green Master Mix (Qiagen). Se usa el método de curva estándar (1×10^9 hasta 1×10^2) para cuantificar el número de copias y se diseñarán primers específicos haciendo uso del programa Primers Express (Applied Biosystem) para el gen *16Sr* de *Mycobacterium abscessus*. El número de copias de cada citocina se normaliza a un millón de copias de RNAm de gen constitutivo.

Todo el material y los desechos que tuvieran contacto con los tejidos infectados son inactivados con Clidox™ y tratados como se describió previamente. Los procedimientos se realizan dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

7.10 Análisis estadístico

El programa de análisis estadístico que se utiliza es GraphPad Prism 6, donde se realizan ANOVAs de 2 vías para determinar la significancia estadística con una $P < 0.05$, con corrección de tipo Bonferroni.

8. RESULTADOS

Los resultados se exponen de manera secuencial como se muestra en la figura 18.

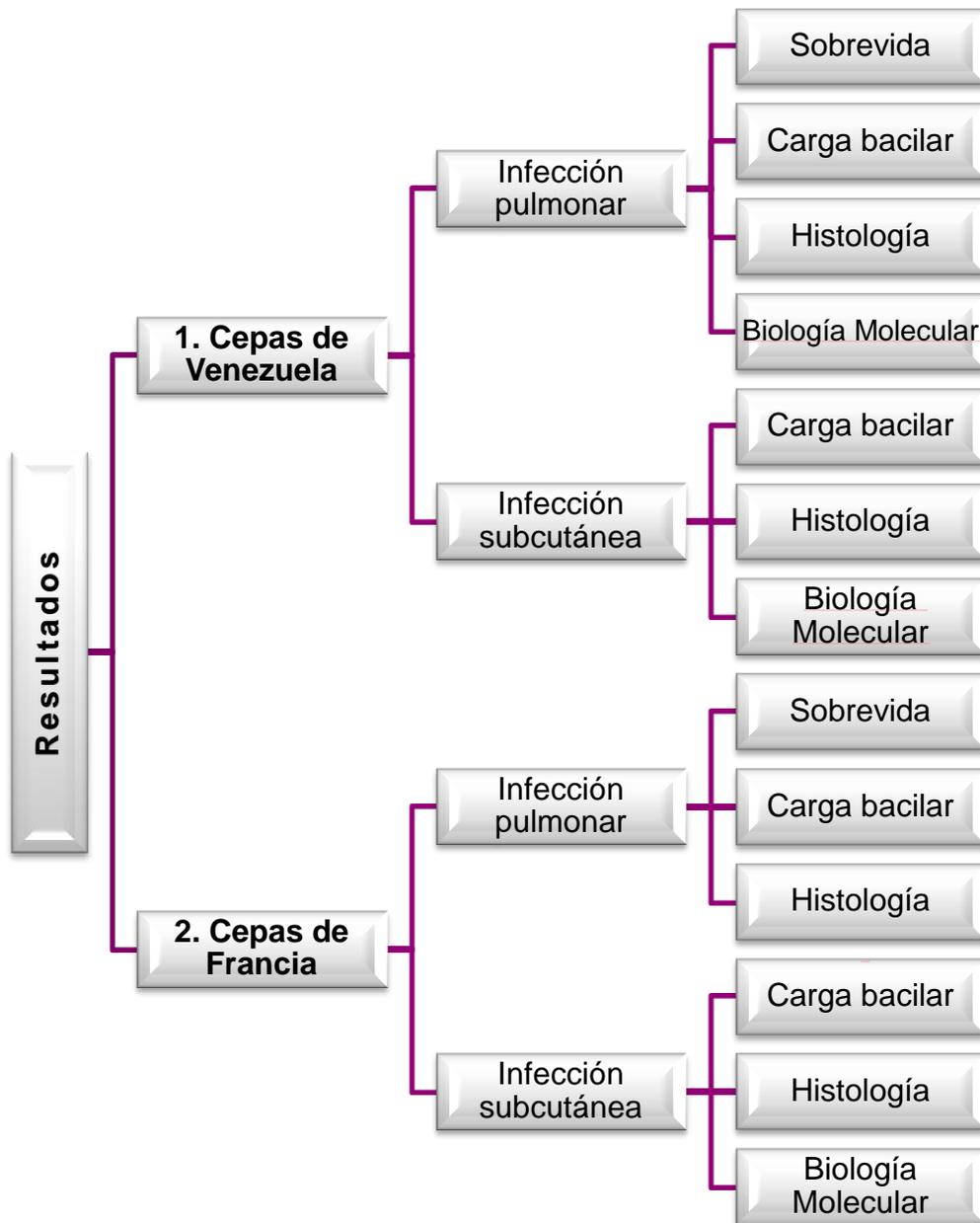


Figura 18 Formato de presentación de resultados.

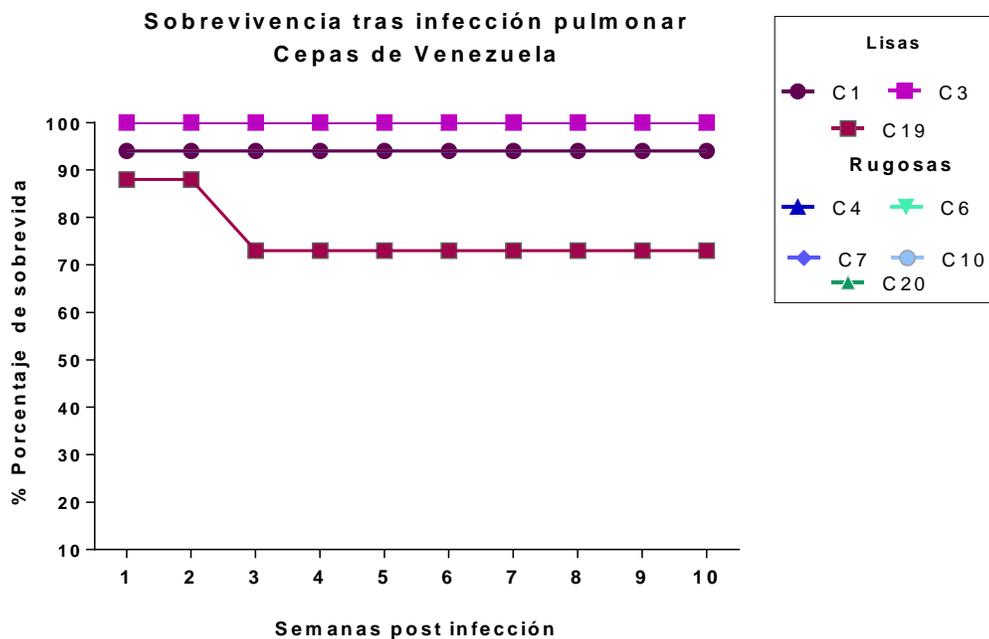
Primera parte experimental “Cepas de Venezuela”

8.1 Cepas de Venezuela

8.1.1 Infección pulmonar

8.1.1.1 Sobrevida

Tras la infección con Mab, semanalmente se registró la sobrevida de cada grupo experimental (ver gráfica 2). Los primeros decesos se dieron durante la primera semana post infección en los grupos C1_(S), C10_(S) y C19_(S) así como otra pérdida ocurrida en la tercera semana. Tras realizar las necropsias correspondientes, se concluye que las muertes no están relacionadas directamente a la infección y apunta a causas propias del comportamiento en grupos durante el hacinamiento u otras causas naturales.



Gráfica 2 Porcentaje de sobrevida tras infección intratraqueal con diferentes cepas de Mab provenientes de Venezuela. Se muestra un alto porcentaje de ratones sobrevivientes tras la infección sin importar su morfotipo. Las cepas S se observan en tonos morados, mientras que las R en azules.

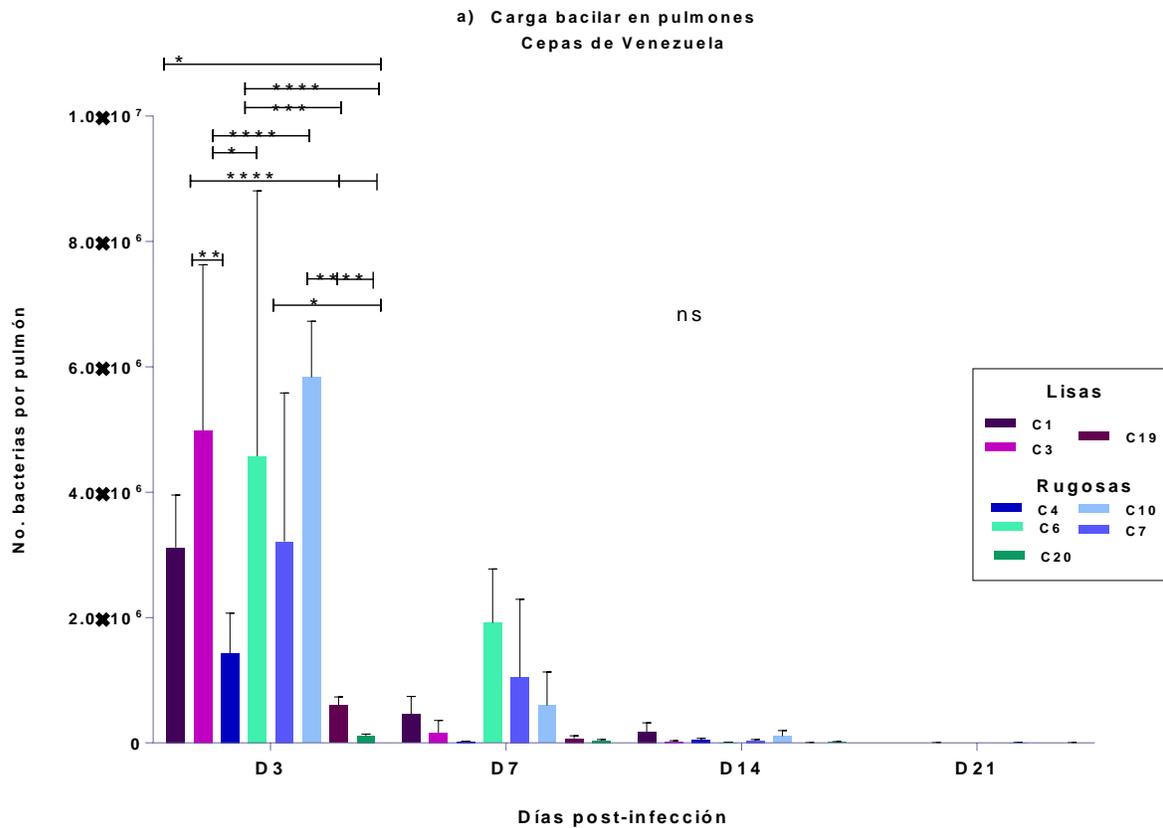
Este parámetro indica que las cepas seleccionadas para este estudio independientemente de su fenotipo S o R no afectan la sobrevida en este modelo de infección murina BALB/c.

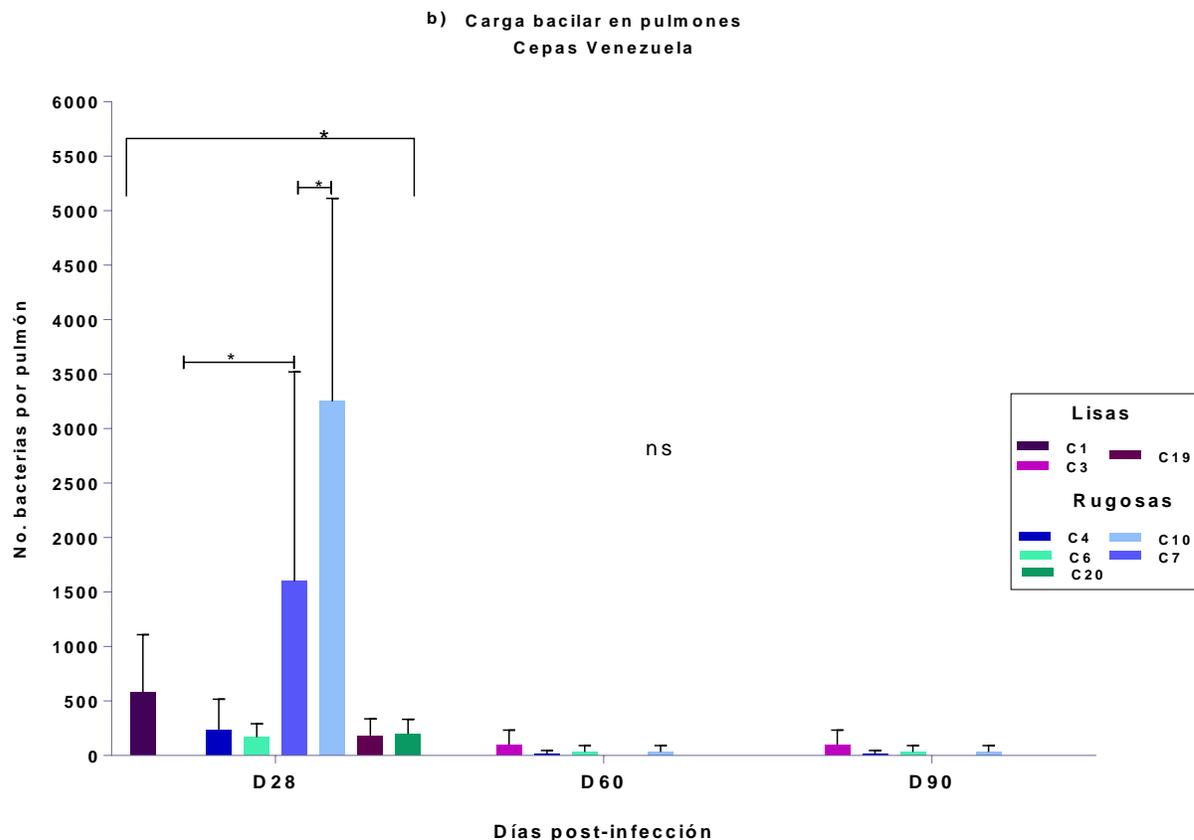
8.1.1.2 Carga bacilar

El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC's) durante la fase aguda (ver gráfica 3a), muestra una disminución progresiva para todas las cepas analizadas, lo cual hace referencia a la detección de la bacteria por el sistema inmune innato sin importar el contenido de GPL en su membrana.

Por otro lado, para el día 14 de la cinética, hay una disminución abrupta en el conteo bacilar, lo cual es un elemento indicador de la acción del sistema inmune adaptativo, que tarda aproximadamente dos semanas en iniciar una respuesta concreta hacia éste patógeno.

A partir del día 14 la disminución es continua, para el día 90 (ver grafica 3 b) hay un mínimo crecimiento de colonias en las placas de 7H10 cerca del límite de sensibilidad del método.





Gráfica 3 Disminución de la carga bacilar hasta el límite de detección del método durante la fase tardía de la cinética experimental. a) Fase aguda, se observa un aumento en la carga bacilar en el día 3 post infección, mientras que en el día 7 se registra una disminución progresiva. b) Fase tardía, del día 28 en adelante, la carga bacilar es cercana al límite de detección del método (50 bacterias) cultivadas en placas de cultivo 7H10+OADC+glicerol 0.05%. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos (*) representan significancia estadística ($p < 0.05$), mientras que (ns) corresponde a las diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

En la fase aguda (ver gráfica 3 b) las cepas lisas ($C1_{(s)}$, $C7_{(s)}$ y $C19_{(s)}$) a excepción de la $C3_{(s)}$, son eficientemente eliminadas antes del día 60 por el sistema inmune del hospedero en comparación con las cepas rugosas, las cuales siguen siendo cultivadas hasta el último punto de la cinética. Estas diferencias muestran que el morfotipo tiene un impacto en la resolución de la infección.

8.1.1.3 Histopatología pulmonar

En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, se procedió a realizar distintos cortes de los tejidos embebidos en parafina, que ulteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina para analizar los cambios tras la infección.

Se obtuvo que únicamente las cepas C4_(R) y C6_(R), ambas de morfología rugosa, fueron las que durante la cinética presentaron en general mayor inflamación y mayor número de granulomas en comparación con las cepas restantes provenientes de Venezuela, cuya histología está representada en el anexo 2.

Como se puede observar en la figura 19 a, la C4_(R) genera inflamación localizada en el espacio alveolar con presencia de macrófagos y linfocitos que se encuentran formando una especie de pseudogranuloma no necrotizante; asimismo, se avista un poco de infiltrado celular inflamatorio localizado en el espacio inter alveolar, sin embargo no se ve ningún otro daño pulmonar relevante. En contraste, la cepa C6_(R) (ver figura 19 b) provoca escaso infiltrado inflamatorio, e inclusive se asemeja al tejido que fue inoculado con solución salina (ver figura 19 e). Estos datos indican que el sistema inmune es capaz de reconocer la infección por esta cepa, ya que se controla rápidamente y no se observan signos de lesiones pulmonares severas que pudiesen haber puesto en riesgo la vida de nuestro modelo.

Para el día 28 p.i vemos para la cepa C4_(R) (ver figura 19 c) una clara presencia de infiltrado inflamatorio ubicado en la periferia de los bronquios, vasos sanguíneos y en algunos puntos del espacio inter alveolar. Igualmente, se comienzan a notar algunos puntos fibróticos que van desde la pared del saco alveolar hasta el espacio inter alveolar. No obstante, tras la infección con la cepa C6_(R) (ver figura 19 d) existe la aparición de edema, que se encuentra localizado entre los sacos alveolares, disminuye la celularidad de macrófagos y linfocitos, aumenta la producción de fibrosis intersticial lo que genera algunos parches neumónicos entre los sacos alveolares. De este modo, se aprecia daño alveolar en los puntos cercanos a los puntos fibróticos, cabe resaltar que eran sólo algunas zonas del pulmón que presentaban este patrón (imágenes no mostradas) por lo que a pesar de que se produjo neumonía, no fue severa.

Estos datos muestran que el hospedero tiene la capacidad de controlar la infección durante el proceso de respuesta inmune adaptativa, sin embargo existen diferencias en la forma y tiempo en la progresión a la resolución de la infección dependiendo de las cepas utilizadas, lo cual podría indicar diferencias intrínsecas en sus factores de virulencia.

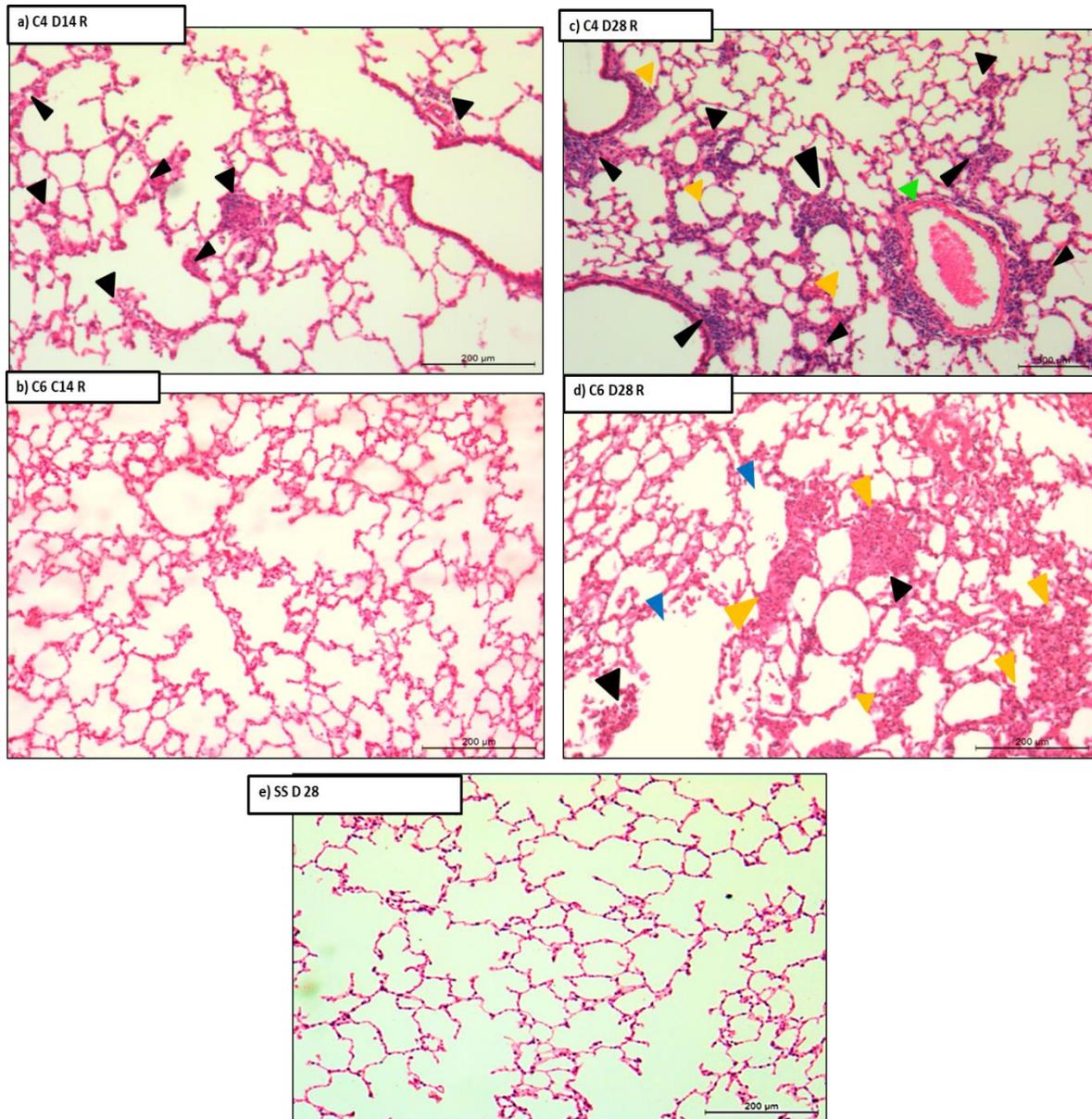


Figura 19 Progresión diferencial en etapas agudas durante la infección con cepas rugosas C4_(R) y C6_(R). a) C4 D14 muestra la presencia de un pseudogranuloma e infiltrado mixto inter alveolar. b) Ausencia de daño pulmonar provocado tras la infección. c) C4 D28 mayor celularidad de macrófagos y linfocitos en la periferia de sacos alveolares, vasos sanguíneos (dilatados) y espacio inter alveolar. d) C6 D28 presencia de edema entre sacos alveolares, disminución de infiltrado inflamatorio y avistamiento de parches neumónicos. e) Ausencia de daño en el tejido pulmonar=tejido normal. Los triángulos verdes representan vasos sanguíneos, en rojo necrosis, azul edema, negro infiltrado inflamatorio y amarillo fibrosis.

Durante la etapa crónica de la infección, se puede apreciar que para el día 60 p.i la cepa C4_(R) muestra la producción de infiltrado celular inflamatorio en forma de pseudogranulomas localizados en el espacio inter alveolar que se unen de una manera difusa provocando alveolitis. También podemos apreciar la formación de fibrosis periférica en la pared de algunos sacos alveolares. En cambio, la cepa

C6_(R) incitó la presencia de pseudogranulomas no necróticos más definidos situados entre los espacios inter alveolares y escasos puntos fibróticos.

Al día 90 p.i, C4_(R) presentó pseudogranulomas más definidos compuestos por linfocitos y macrófagos espumosos, cercanos a la pared de los vasos sanguíneos. En contraparte la cepa C6_(R) mostró este mismo patrón, con la diferencia que era más común de encontrar comenzando en la pared de los bronquios hasta el espacio inter alveolar.

Estos datos muestran que aunque no hay áreas neumónicas importantes, la formación de granulomas y presencia de alveolitis en etapas crónicas puede ser un mecanismo por el cual la bacteria puede permanecer en un estado latente dentro del hospedero. Además podría indicar que la formación de estas estructuras puede estar relacionada con microambientes con concentraciones elevadas de oxígeno, lo cual puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune y mantenimiento de un estado de latencia.

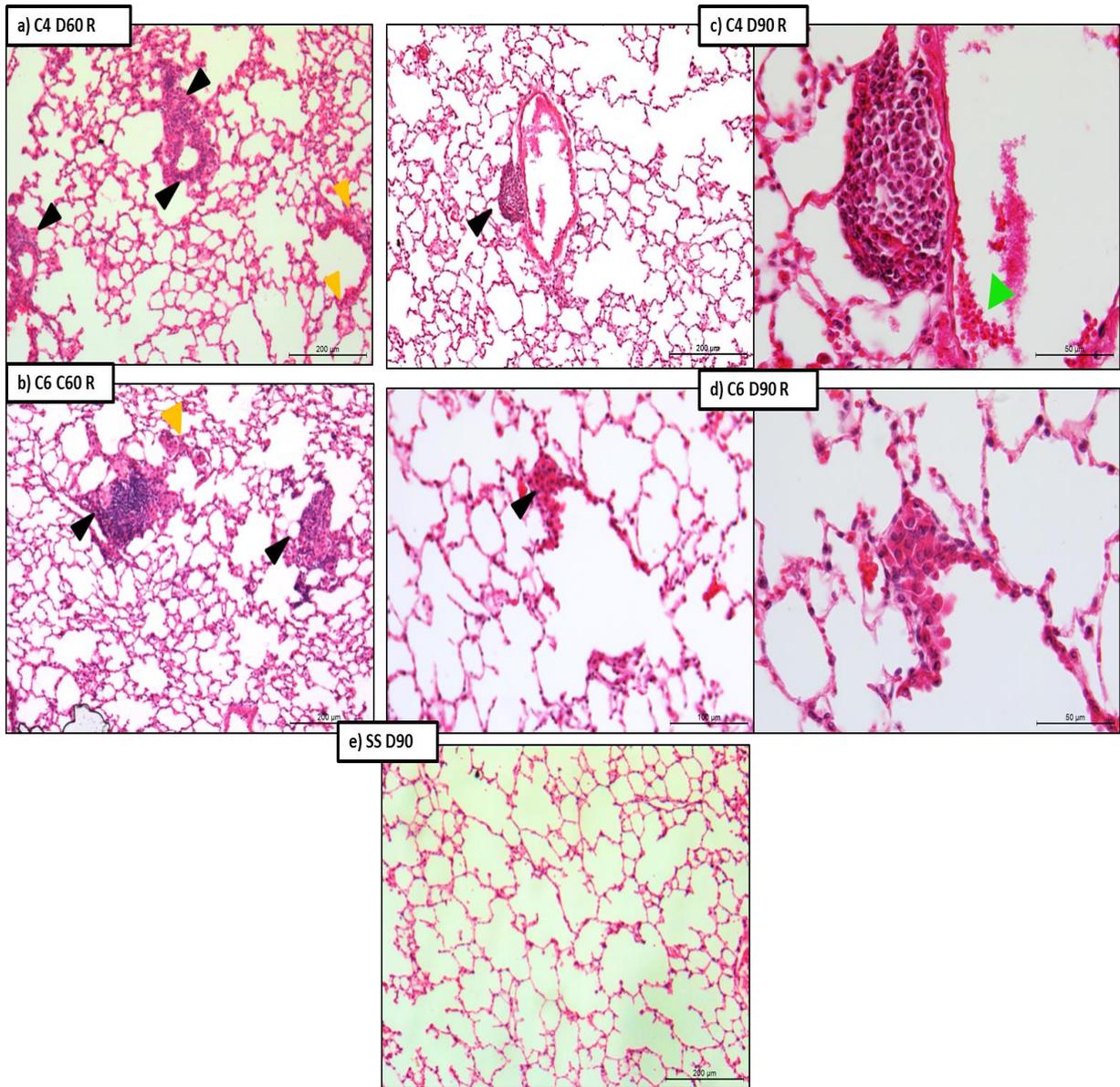


Figura 20 Formación de pseudogranulomas cerca de zonas ricas de oxígeno tras la infección con cepas rugosas $C4_{(R)}$ y $C6_{(R)}$. En etapas crónicas. a) $C4_{(R)}$ muestra la presencia de un pseudogranulomas unidos entre el espacio inter alveolar. b) $C6_{(R)}$ Pseudogranulomas de gran tamaño localizados entre los espacios inter alveolares. c) $C4_{(R)}$ pseudogranulomas compacto encontrado en la pared de un vaso sanguíneo. d) $C6_{(R)}$ pseudogranuloma yacente en el ápice bronquial e) Ausencia de daño en el tejido pulmonar=tejido normal. Los triángulos verdes representan vasos sanguíneos, negro infiltrado inflamatorio y amarillo fibrosis. En el D90 fueron encontrados en el pulmón 15 pseudogranulomas para la $C6_{(R)}$ y 25 para $C4_{(R)}$

8.1.1.4 Biología molecular

Se seleccionaron las cepas C4_(R) y C6_(R) ya que en el día 90 post infección se observaron pseudogranulomas en los pulmones del hospedero. Se efectuó la extracción de RNA en parafina con el objetivo de comprobar la presencia del gen 16Sr a través de PCR punto final (ver figura 22).



Figura 21 Detección transcripcional de la subunidad 16 Sr de Mab en las cepa C4_(R) y C6_(R) en la fase crónica experimental. En esta figura se aprecian las bandas correspondientes al gen 16Sr de *M. abscessus* en el día 90 p.i. Donde N es el control negativo, 390S y 390R corresponde al control positivo proveniente del extracto de RNA de cultivo fresco.

Como se observa en la figura anterior, gracias a la presencia de esta unidad ribosomal, se comprueba que hay bacteria transcripcionalmente activa en todas las muestras para el día 90 en contraste con las unidades formadoras de colonias, ya que sólo 1 de cada 4 muestras era cultivable en cajas de agar sólido. Esta observación puede indicar que la bacteria se encuentre metabólicamente activa dentro de los granulomas en un probable estado VBNC, no obstante más estudios son necesarios para comprobar esta hipótesis.

También se examinó la presencia del gen *mmpL4b* en el RNA de estas mismas cepas, sin embargo no se detectaron bandas correspondientes (ver figura 23).

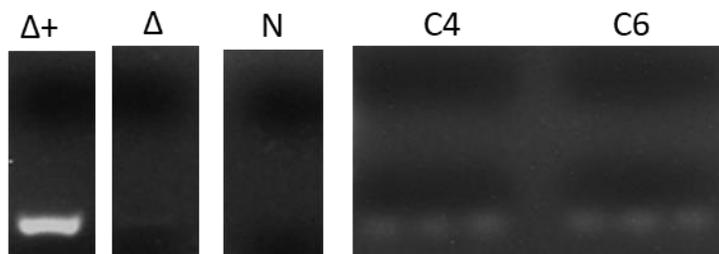


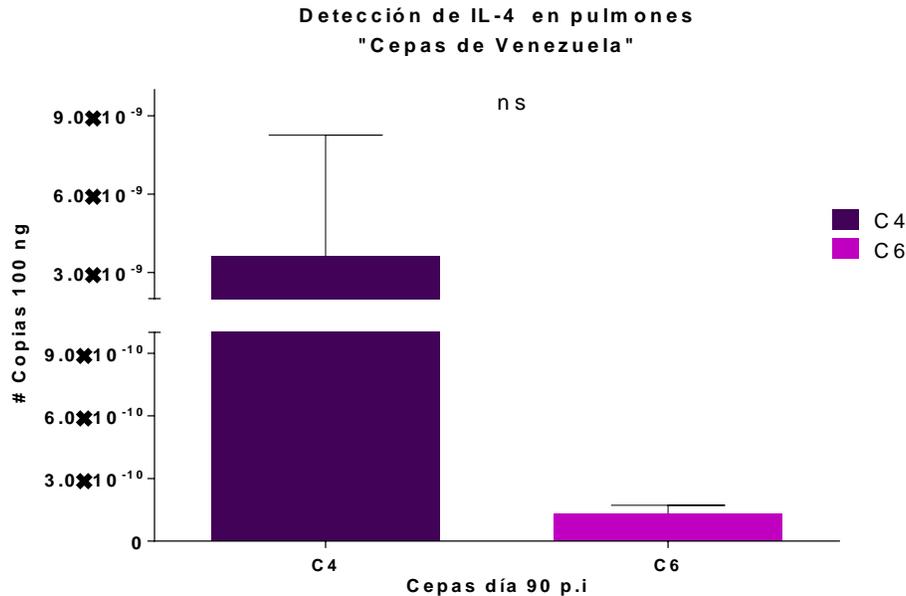
Figura 22 Ausencia de transcripción de *mmpL4b*. Como se observa, en esta figura no hay bandas correspondientes al gen *mmpL4b* de *M. abscessus* en el día 90 p.i. Donde N es el control negativo, mientras que Δ+ (cepa *ΔmmpL4b-comp*) y Δ (cepa *ΔmmpL4b*) corresponden al control positivo proveniente del extracto de RNA de cultivo fresco.

Esto confirma que las bacterias no están transcribiendo el gen *mmpL4b* y por tanto, no producen GLP's y permanecen con morfología rugosa dentro del hospedero.

Adicionalmente, se procedió a evaluar la presencia de diversos genes relacionados con la respuesta inmune del huésped, con el objetivo de evaluar el contexto de citocinas pro o anti inflamatorias. Como control positivo se tomó

RPLP0, el cual es un gen Housekeeping (Yokoyama *et al.*, 2018) que se utilizó como control positivo (ver gráfica 4).

Se analizó la presencia de *il-1*, *il-13*, *il-10*, *il-4*, *tnf- α* , *tgf- β* e *ifn- γ* ; sin embargo, la única citocina detectada por el método de PCR en tiempo real de las cuantificadas es IL-4.



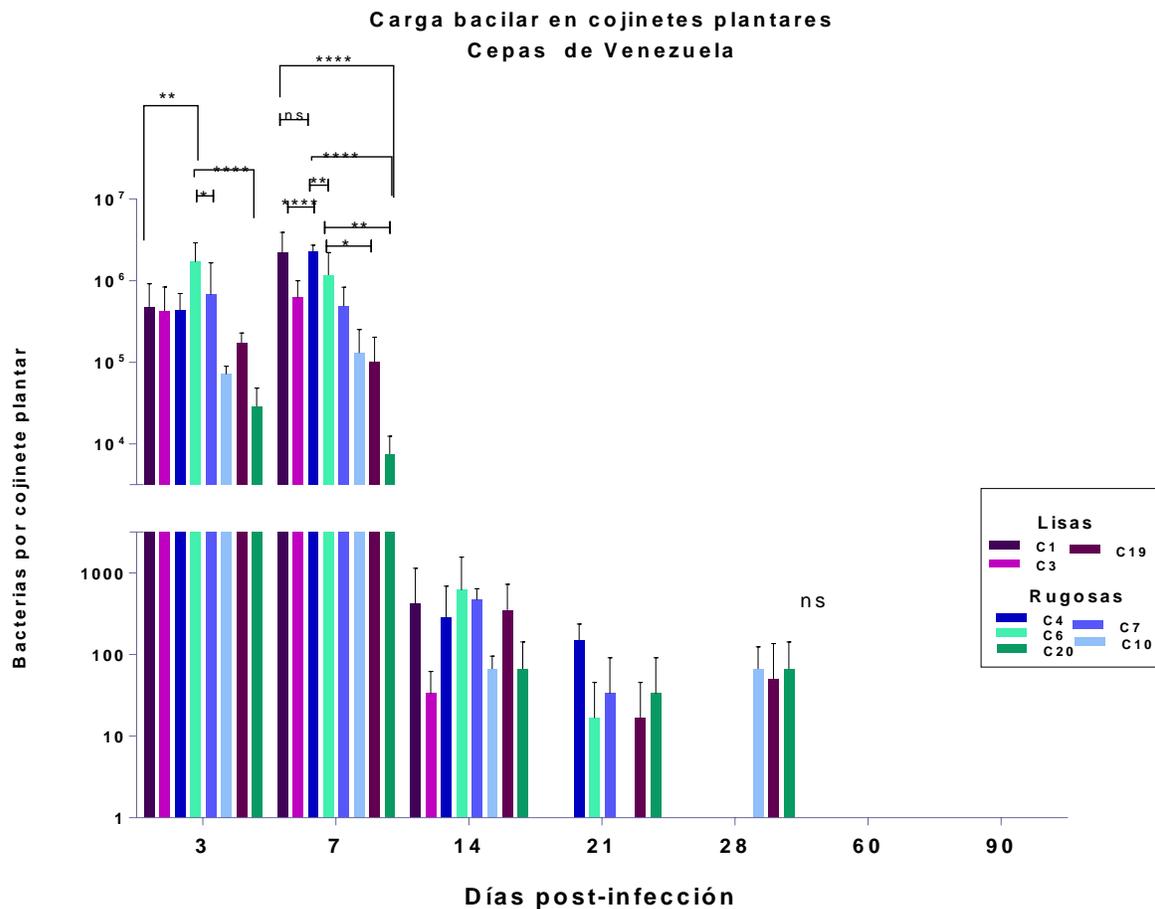
Gráfica 4 Producción de IL-4 en el día 90 p.i. Se muestra que la elaboración de IL-4 es significativamente mayor en los ratones infectados por la cepa C4_(R) y C6_(R) al final de la cinética de infección. La estandarización se realizó utilizando el gen constitutivo del ratón *RPLP0*. Los datos son expresados como promedios de 3 muestras con su desviación estándar; el símbolo ns representa una ausencia de significancia estadística $p < 0.05$ por el método de T-student pareada con nivel de confianza del 95%

La producción de IL-4 en este tiempo tardío de infección juega un papel importante en la reducción de la inflamación crónica y reparación del tejido, lo cual inhibe la activación de macrófagos con fenotipo M1 (proinflamatorio) y favorece la respuesta M2. Sin embargo, como se observa en la figura 23 sigue existiendo bacteria transcripcionalmente activa probablemente localizada dentro de los pseudogranulomas, elemento que podría estar ligado al proceso de latencia y evasión de la respuesta inmune.

8.1.2 Infección subcutánea

8.1.2.1 Carga bacilar

El primer experimento tuvo como objetivo el determinar posibles diferencias en la cuantificación de la carga bacilar entre distintos tipos y aislados de Mab provenientes de Venezuela de acuerdo a su morfología tras la infección subcutánea en cojinetes plantares de ratones BALB/c.



Gráfica 5 Disminución progresiva de la carga bacilar en cojinetes infectados con distintas cepas provenientes de aislados clínicos de Venezuela. En esta gráfica se observa una tendencia clara a la disminución cuyo punto de inflexión mayor es durante el día 14 post infección y continuando hasta la ausencia de cultivo en placas de cultivo 7H10+ OADC + glicerol 0.05%. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos (*) representan significancia estadística ($p < 0.05$), mientras que (ns) corresponde a las diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

En esta gráfica se observa que en los días 3 y 7 hay una leve replicación de los bacilos en relación al número de bacterias inoculadas en el día 0 ($\pm 250,000$) lo

cual indica un control limitado de la replicación bacteriana por parte del sistema inmune innato.

A continuación se genera una disminución abrupta de la carga bacilar en el día 14 p.i, elemento que puede indicar la activación y efecto del sistema inmune adaptativo. Después la carga bacilar disminuye hasta la ausencia de crecimiento en placas de cultivo a partir del día 60 en adelante sin importar la morfología de las cepas L o S.

En conjunto, estos resultados indican a grandes rasgos que el huésped es capaz de controlar la infección, evitando que se multiplique la bacteria en el área inoculada independientemente del fenotipo de la colonia.

En cuanto a las diferencias individuales, en el día 3 p.i la C6_(R) es la que tiene significativamente una mayor carga bacilar respecto a las otras cepas, lo que indica que esta bacteria es difícil de eliminar por el sistema inmune innato.

Para el día 7 las unidades formadoras de colonias contabilizadas para la C6_(R) se reducen, efecto que indica que el sistema inmune comienza a ejercer efecto ante ellas. Sin embargo para las cepas C1_(S), C4_(R) y C3_(S) presentan un aumento de carga bacilar, lo que puede indicar que el sistema inmune falla en inhibir la replicación de estos patógenos y por ello aumenta su número en el tejido. Esta observación sugiere ser consecuencia de la evasión de la respuesta inmune innata.

Por otro lado, para las cepas C7_(R), C10_(R), C19_(S) y C20_(R) la carga bacilar permanece estable con respecto al día 3, lo cual indica que a pesar de que hubo una disminución de su número, el sistema inmune innato es ineficiente para eliminarlas por completo.

Para el día 14, la reducción de la carga bacilar es sumamente evidente, posiblemente por la activación y efecto del sistema inmune adaptativo, donde es mínima la cantidad de bacterias con respecto a los 2 días anteriores. En este punto, C6_(R) es la que tiene mayor carga bacilar, seguida de la C7_(S), sin embargo hay diferencias estadísticas entre las cepas analizadas en el día 14.

Siguiendo con la cinética, para el día 21 las cepas lisas C1_(S) y C3_(S) no fueron cultivables en placas de agar, de forma contrastante C4_(R) continua presentando la mayor carga bacilar, no hay diferencia significativa con respecto a las demás cepas.

Al día 28 sólo son cultivables las cepas C10_(R), C19_(S) y C20_(R), donde aumenta un poco la carga bacilar con respecto al día 21, efecto que indica que probablemente

tienen una manera de evadir a la respuesta inmune, sin embargo no es tan eficiente, ya que en el día 60 ninguna de éstas son cultivables.

Este análisis muestra que la mayoría de las cepas con fenotipo liso son erradicadas eficientemente por el sistema inmune adaptativo con respecto a las cepas de morfología rugosa, las cuales tardan más tiempo en ser eliminadas. En conjunto esto indica que la producción de GPLs es clave para la detección y eliminación de la bacteria.

8.1.2.2 Histología

Éste análisis histológico reveló que todas las cepas son capaces de producir una reacción inmune del hospedero y en etapas crónicas todas tienen la capacidad de producir fibrosis. Igualmente el daño histológico coincide con lo observado en el antecedente de la tesis de Bendaña (2018) y el experimento 1 de este trabajo, donde en los primeros días de infección (3-21 p.i) hay una gran cantidad de infiltrado celular proinflamatorio mixto compuesto de macrófagos y linfocitos que van desde el tejido celular subcutáneo hasta el músculo, con presencia de focos necróticos, vasodilatación y edema. No obstante, fue notorio que en tiempos tardíos las cepas rugosas C10_(R), C6_(R), C7_(R) y C20_(R) (ver figura 24) presentaron notablemente menores áreas fibróticas en comparación con todas las cepas lisas C1_(S), C3_(S) y C9_(S), así como la rugosa C4_(R) proveniente de secreción (ver anexo 3). Dadas estas observaciones, se eligieron las cepas rugosas mencionadas anteriormente para hacer más estudios sobre la cinética de infección. De igual modo, para fines didácticos, serán las imágenes representativas de éstas las que se estarán analizando a detalle en esta sección. Es preciso mencionar que los stiches representativos de la histopatología provocada por las cepas no seleccionadas en el día 90 se puede observar claramente en el anexo número tres.

Para el día 7 p.i (ver figura 24) la cepa C6_(R) presenta mayor infiltrado inflamatorio mixto (macrófagos y linfocitos) en comparación a las demás cepas, elemento que corresponde a la carga bacilar obtenida en el conteo de las unidades formadoras de colonias. Éste infiltrado se localiza en la parte intersticial del tejido, es decir, en el tejido celular subcutáneo y para hasta donde comienza el tejido muscular. Se pueden ver puntos necróticos con presencia de vasodilatación (no mostrado) y leve edema. En contraste, los aislados C7_(R) y C4_(R) expusieron un infiltrado inflamatorio mixto más compacto, con la presencia de puntos necróticos, vasodilatación y edema (no mostrado). Sin embargo, de manera interesante, en este periodo tan agudo, la C10_(R) mostro la presencia de escasos granulomas no necrotizantes ni caseificantes en el lumen del tejido. Por otro lado, la cepa C20_(R) no estimuló tan eficientemente la atracción del infiltrado al sitio de infección en

comparación con las demás cepas en este día, asemejándose inclusive a un tejido con solución salina. Este dato no coincide con las unidades formadoras de colonias -las cuales fueron elevadas- lo que podría demostrar que este aislado tiene algún mecanismo de la respuesta inmune innata y además que es capaz de provocar menores signos de inflamación en este tiempo agudo.

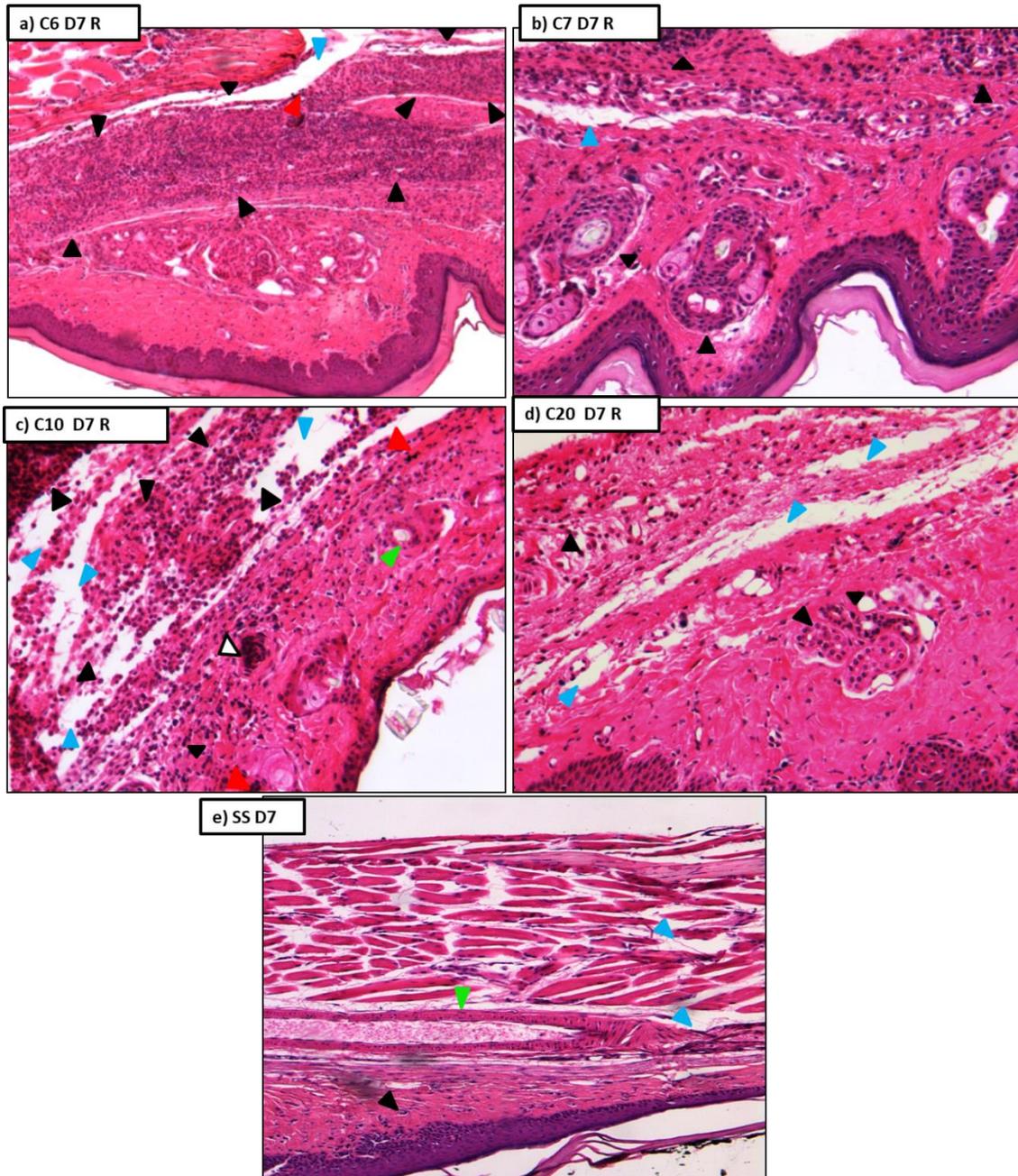


Figura 23 Activación de la respuesta inmune del hospedero en la fase aguda de la infección subcutánea. a) C6_(R) infiltrado inflamatorio denso en el intersticio del tejido, avistamiento de puntos necróticos y presencia de vasodilatación y edema leve. b) C7_(R) infiltrado mixto compacto en la parte media le tejido celular subcutáneo y aparición leve de edema c) C10_(R) Infiltrado denso en el lumen del tejido con algunos puntos necróticos, edema considerable, presencia de

vasodilatación y avistamiento de pseudogranuloma en la zona de inflamación. d) C20_(R) leve infiltrado inflamatorio, con presencia de edema. e) SS control de solución salina, el cual muestra vasodilatación edema leve y presencia de mínimo infiltrado proinflamatorio. Los triángulos verdes representan vasodilatación, los rojos necrosis, los azules edema, los negros inflamación, los amarillos fibrosis y los blancos granulomas.

En el día 28 p.i (ver figura 25) se observa un patrón que se repite en todas las cepas estudiadas. Se revela un aumento considerable en el infiltrado celular inflamatorio, el cual está compuesto primariamente por macrófagos y linfocitos, pudiendo llegar hasta el tejido muscular, lo cual podría ser incómodo para el ratón al momento de caminar.

Igualmente cabe destacar que a pesar de que la carga bacilar es mínima en comparación a los días anteriores de la cinética, sobre todo para la C6_(R) (donde ya no es cultivable la bacteria) hay signos relevantes de inflamación en tejido.

En particular, la C6_(R), C7_(R) y C10_(R) poseen un elevado infiltrado mixto que va desde el lumen hasta el tejido muscular. Se observa disminución del edema y vasodilatación en comparación con el punto anterior, comienza la aparición fibroblastos, por consiguiente de la presencia de parches de fibrosis cerca del estrato basal y en la parte media del tejido celular subcutáneo.

De manera destacable, la cepa 20 produjo una cantidad sustancial de fibrosis, lo cual se puede observar en la figura 25 g. Este elemento sin duda, cambia en extremo la estructura original del tejido y podría incomodar el transitar del ratón. De igual forma, este elemento de fibrosis extensa también ocurre en el humano en este tipo de infecciones subcutáneas, por lo que es un punto válido para el modelo experimental que se está utilizando en este trabajo.

Por otro lado cabe subrayar que las cepas lisas y C4_(R) (datos no mostrados) aún muestran leve infiltrado celular inflamatorio, presencia de edema leve y comienzan a aparecer signos de fibrosis central, sin embargo, no son tan evidentes en comparación a las cepas seleccionadas.

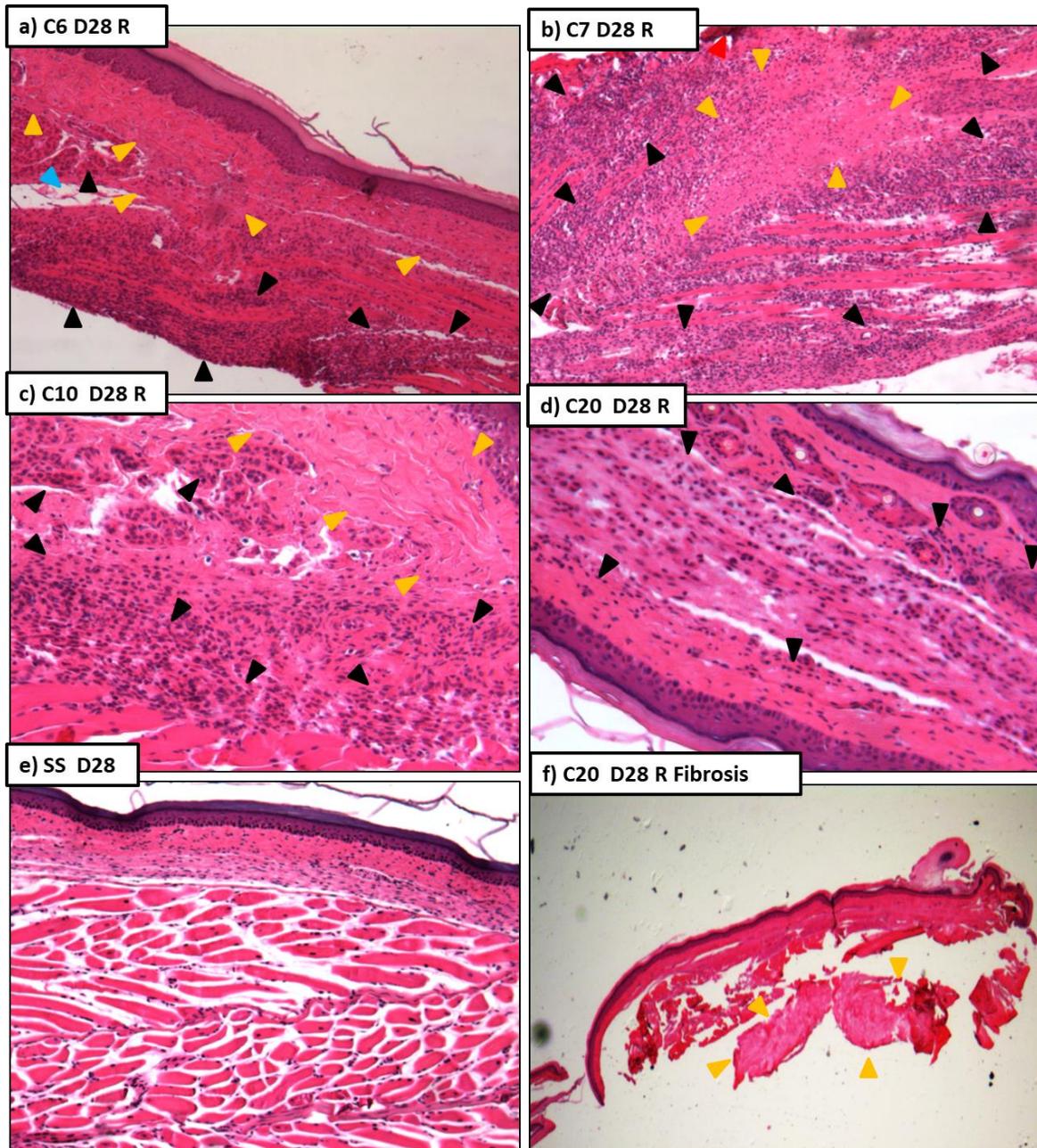


Figura 24 Mantenimiento de la respuesta inflamatoria e incremento de la producción fibrótica. a) C6_(R) infiltrado inflamatorio denso en el intersticio del tejido, presencia de vasodilatación y edema leve. b) C7_(R) infiltrado mixto compacto en la parte media le tejido celular subcutáneo, fibrosis central y edema muy leve. c) C10_(R) Infiltrado leve- denso en el lumen del tejido, ligero edema y presencia de fibrosis en la zona cercana al estrato basal. d) C20_(R) insustancial infiltrado inflamatorio en la zona media del tejido celular subcutáneo, aparición de pseudogranulomas en la zona cercana a las glándulas. e) SS control de solución salina, el cual ya no muestra ningún signo de inflamación. f) C20_(R) Stich donde se aprecia el tamaño exagerado de fibrosis. Los triángulos verdes representan vasodilatación, los rojos necrosis, los azules edema, los negros inflamación, los amarillos fibrosis y los blancos granulomas.

En el día 60 p.i (ver figura 26) podemos encontrar en general un aumento evidente de la fibrosis en comparación con el control de infección de solución salina. En particular, la cepa más destacable corresponde a C6_(R), la cual presentó un dramático incremento en el infiltrado celular proinflamatorio compuesto por macrófagos y linfocitos inclusive podemos observar algunos puntos necróticos en el tejido; en conjunto estos elementos invaden cada una de las regiones que componen al cojinete plantar. De igual forma, en parangón con los otros aislados, se observa acantosis axiomatica y fibrosis extensa deformante, que inclusive pierde el orden normal de la estructura de la piel, y por ende es imposible visualizar el estrato basal, espinoso, granuloso y córneo en ciertas zonas.

En contraste, la cepa C7_(R) también presentó un área fibrótica importante, sin embargo disminuyó el influjo de células inflamatorias, las cuales se localizaban básicamente en todo el tejido, incluyendo parte de los músculos. De forma semejante tanto C20_(R) como C10_(R) mostraron estos mismos signos, pero en menor proporción y también expresaron un estrato basal adelgazado (no acantótico) en comparación con muestras de solución salina (control).

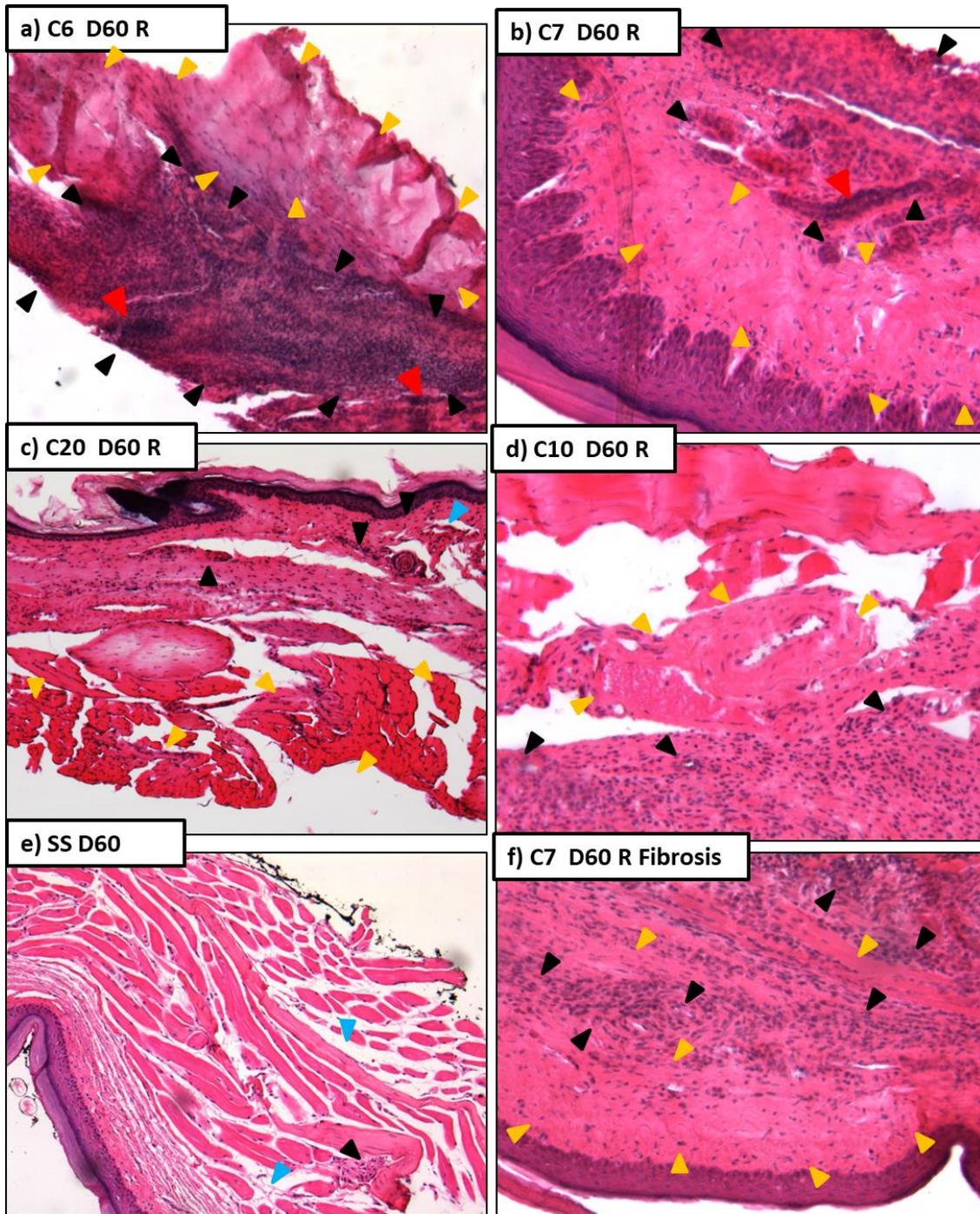


Figura 25 Continuación de inflamación y producción de fibrosis extensa en etapas crónicas de la infección subcutánea. a) C6_(R) Infiltrado inflamatorio mixto extenso, fibrosis aguda y presencia de puntos necróticos y ausencia de estratos de la piel. b) C7_(R) Fibrosis en el tejido celular subcutáneo adyacente a estrato basal y avistamiento de puntos necróticos e inflamación en el tejido subcutáneo. c) C20_(R) Adelgazamiento estrato basal, fibrosis en zona muscular, y presencia de infiltrado en el lumen del tejido celular subcutáneo. d) C10_(R) Infiltrado en la zona central del tejido y presencia de parches fibróticos importantes. e) SS control de infección con presencia mínima de edema y escasa inflamación. f) C7_(R) Fibrosis intercalada con una densa cantidad de células inflamatorias como macrófagos y linfocitos. Los triángulos verdes representan vasodilatación, los rojos necrosis, los azules edema, los negros inflamación, los y amarillos fibrosis.

Para el día 90 (ver figura 27) el infiltrado inflamatorio disminuyó drásticamente, no obstante, el aumento de la fibrosis en los cojinetes plantares es exorbitante incluso sustituyendo al tejido celular subcutáneo y tejido muscular por una masa de colágeno amorfo. También se muestra una disminución o hasta desaparición de los distintos estratos de la piel (ver anexo 4 para observar stiches del tejido completo).

Este resultado aunado a lo observado en el día 60 revelaron que aunque no hay bacterias cultivables en las etapas más crónicas, pudiese permanecer algún detrito de la bacteria (no degradado por el sistema inmune) o en un estado latente/VBNC o algún otro proceso que está propiciando el reclutamiento de células de la respuesta inmune y haya un desequilibrio importante en la reparación del tejido dado a la excesiva producción de fibrosis.

Por otro lado, cabe destacar que esta deformación del tejido y producción fibrótica anormal es un hecho que asemeja definitivamente a la histopatología observada en lesiones del tejido blando en humanos, donde el proceso de cicatrización es alterado. Esto es otro indicativo de que el modelo de infección seleccionado es funcional y puede replicar las observaciones en un modelo experimental apoyando la tesis de Bendaña (2018).

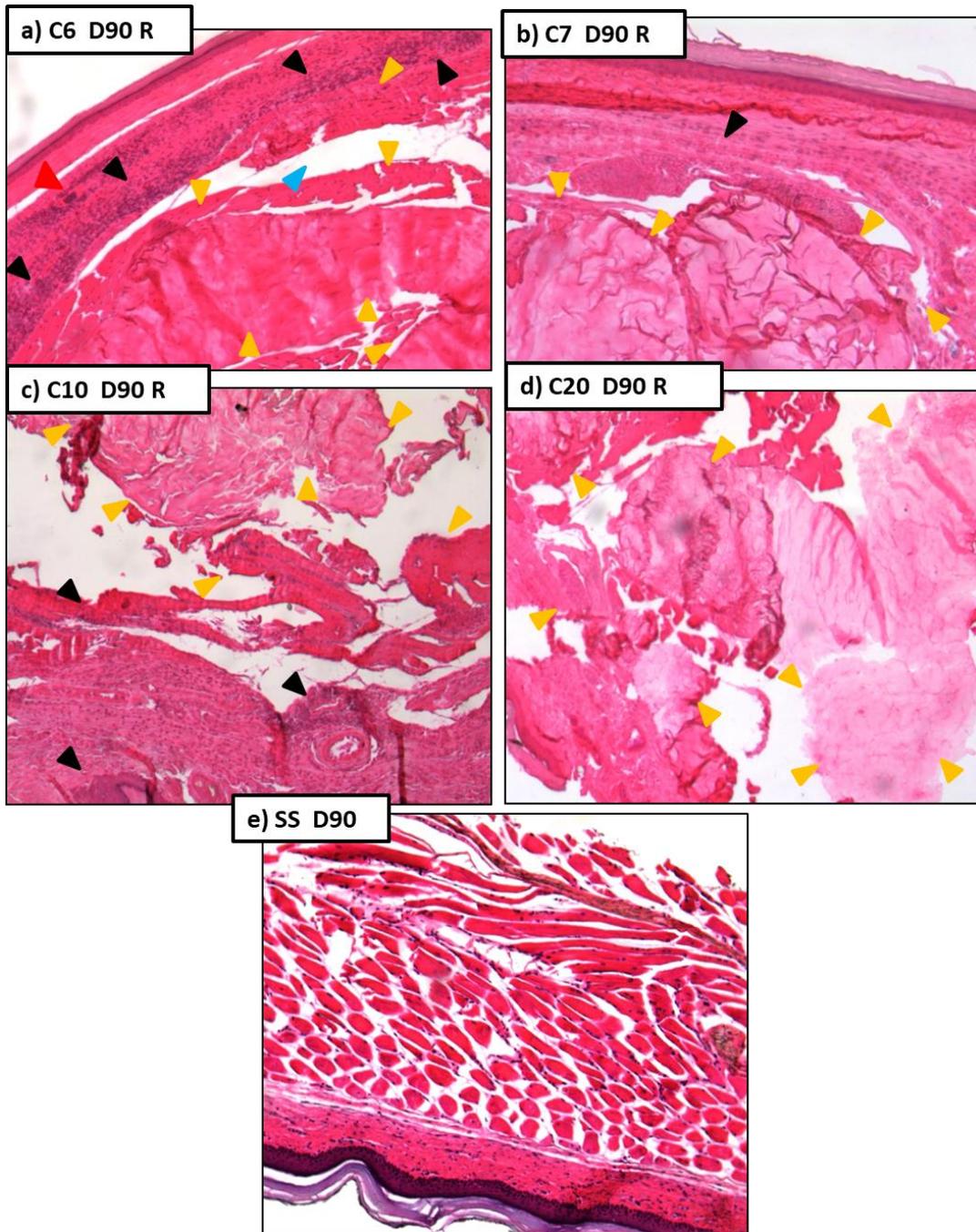
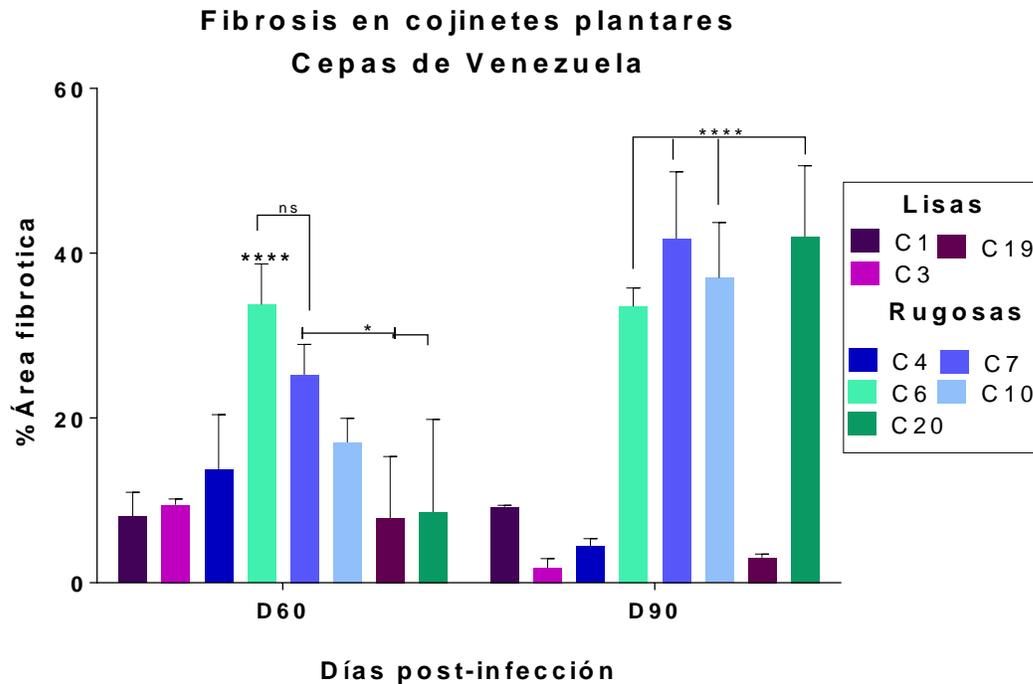


Figura 26 Exceso de fibrosis en etapas crónicas en tejido blando. a) C6_(R) Membrana basal adelgazada, presencia de infiltrado compacto en el lumen con avistamiento de escasos puntos necróticos y fibrosis extensa desde el lumen que sustituye el tejido muscular. b) C7_(R) Producción excesiva de colágeno con presencia de leve infiltrado. c) C10_(R) Bastante destrucción del tejido, avistamiento de zonas limitadas de macrófagos y linfocitos y fibrosis que abarca desde el lumen del tejido celular subcutáneo hasta el tejido muscular. d) C20_(R) Disminución de infiltrado y producción deformante de colágeno, propiciando la aparición de zonas fibróticas extensas. e) SS Tejido control con solución salina en muestra aparente de inflamación o cicatrización extrema. Los triángulos rojos representan necrosis, los azules edema, los negros inflamación, los y amarillos fibrosis.

Por ello, utilizando el software Leica Biosystems se midió el porcentaje de área fibrótica en los días 60 y 90 (ver gráfica 6), donde se obtuvo que las cepas lisas productoras de GPLs, tienen menor fibrosis en comparación con las rugosas que carecen de la producción de estos componentes, esto coincide con la bibliografía encontrada, donde las cepas lisas son fácilmente reconocidas por la respuesta inmune adaptativa y las cepas rugosas son más virulentas, causando fibrosis exacerbada.



Gráfica 6 Porcentaje de área fibrótica en días tardíos de la infección crónica. En el día 60 post-infección, la cepa 6 es la que presenta mayor área cicatricial, mientras que al día 90 se registra un incremento de la fibrosis para las cepas 6, 7, 10, 19 y 20. Los datos representan el promedio de tres muestras con su desviación estándar; los asteriscos (*) representan significancia estadística ($p < 0.05$), mientras que (ns) corresponde a las diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

8.1.2.3 Biología molecular

Dados los resultados anteriores se procedió a realizar PCR con el gen *16Sr* (gen constitutivo) para verificar si había presencia de bacteria viva en estado de replicación activa en el tejido a pesar de no ser cultivable.

Se obtuvo que del día 3 al 28 post-infección había presencia del *16Sr*, donde se muestra una banda delimitada (dato no mostrado), elemento que concuerda con la presencia de bacteria cultivable mediante el conteo de la carga bacilar; no obstante en los días posteriores al 28 en el caso de algunas cepas la presencia de la banda era sumamente tenue y en algunos no se encontraba presente. Este

elemento puede ser debido a que la sensibilidad de los geles de agarosa al 2% es menor en comparación con otros métodos, por lo que se recurrió a una técnica de reamplificación de cada muestra del día 60-90, usando 5.5 μ L del producto obtenido en la primera PCR como transcrito basal (ver figura 28).

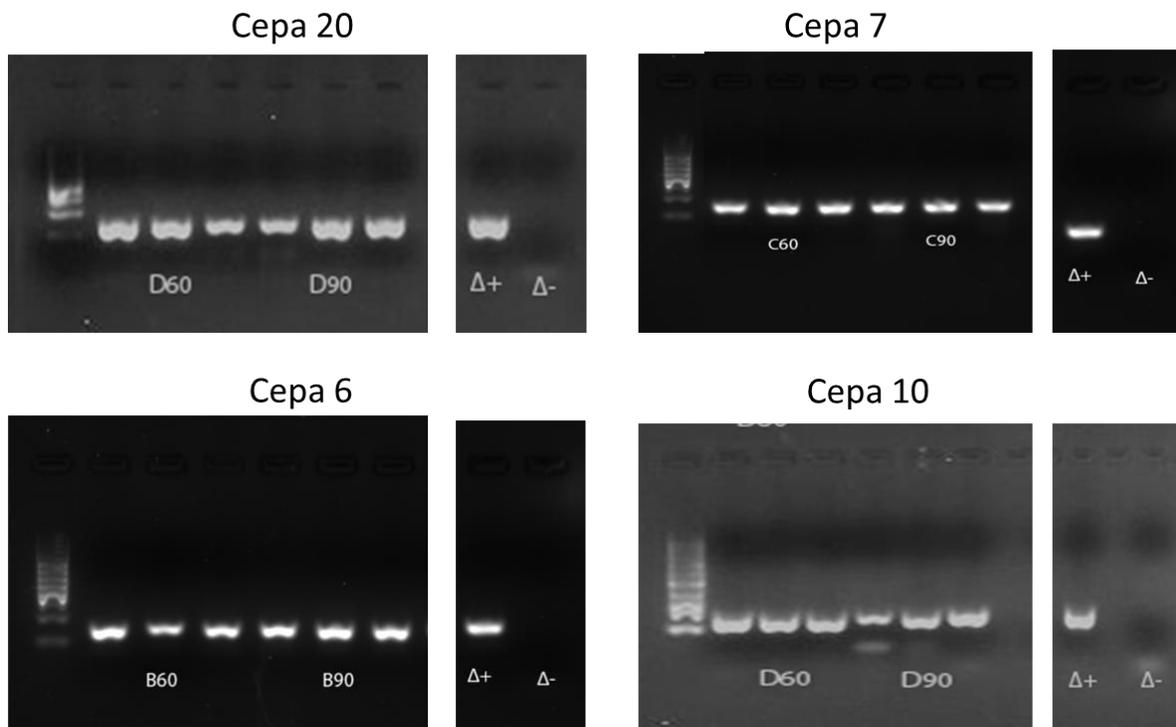


Figura 27 Detección de actividad transcripcional en los días 60 y noventa de la fase crónica en las cepas C6_(R), C7_(L), C10_(R) y C20_(R). En estos geles se observa la presencia de la banda correspondiente al gen 16Sr para cada una de las cepas, a pesar de que las UFC's son nulas. Se toma como control positivo la cepa 390S representada como $\Delta+$ y el control negativo de reacción como $\Delta-$ provenientes del extracto de RNA de cultivos frescos.

Interesantemente, observamos en la imagen anterior la presencia del gen 16Sr en el día 60 y 90 post-infección donde ya no hay presencia de bacteria cultivable. Esto indica que la subunidad ribosomal 16 está activa y por ende la traducción de proteínas.

Estos datos demuestran que los bacilos se encuentran vivos, no obstante pueden estar en un estado VBNC o latente en el sitio de infección. En conjunto, esto podría explicar la inflamación crónica vista en la histología, probablemente la presencia de la bacteria puede influir en la activación de fibroblastos, provocando así la fibrosis exacerbada. Este análisis señala que el fenotipo de la bacteria y por tanto de la carencia de producción de GPLs está relacionado con la sobrevivencia dentro del huésped.

Por otro lado, se evaluó si existe la presencia del gen *mmpL4b* en el RNA mensajero de Mab a lo largo de la cinética con el objetivo de analizar el fenotipo dentro de las muestras. Se usaron primers específicos para este gen utilizando como control negativo las cepas frescas $\Delta mmpL4b$ y $\Delta mmpL4b-comp$. En este experimento no se halla presencia de la banda de 987 KDa correspondiente de *mmpL4b* para ninguna de las cepas en cuestión a lo largo de 90 días (ver figura 29).

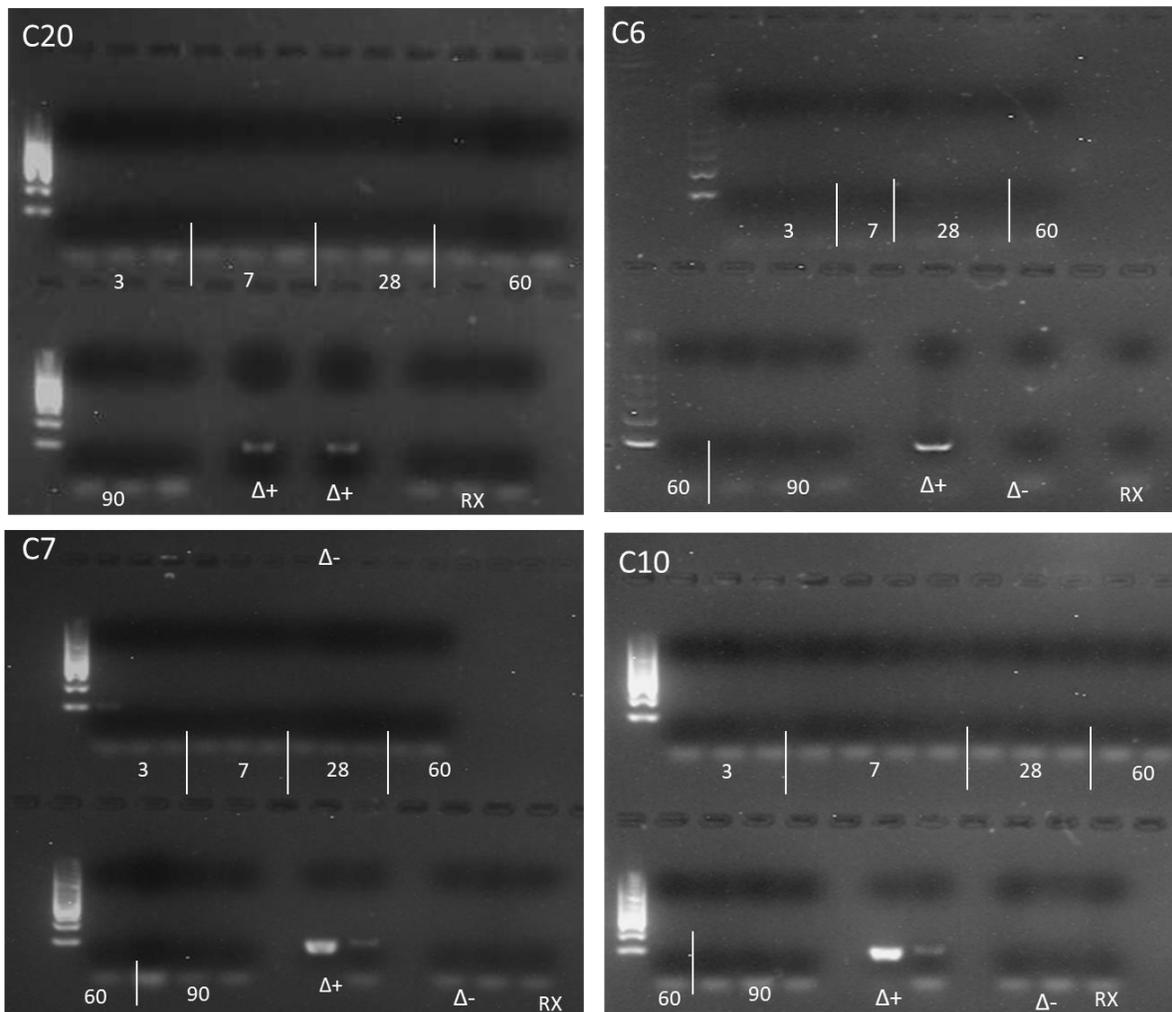
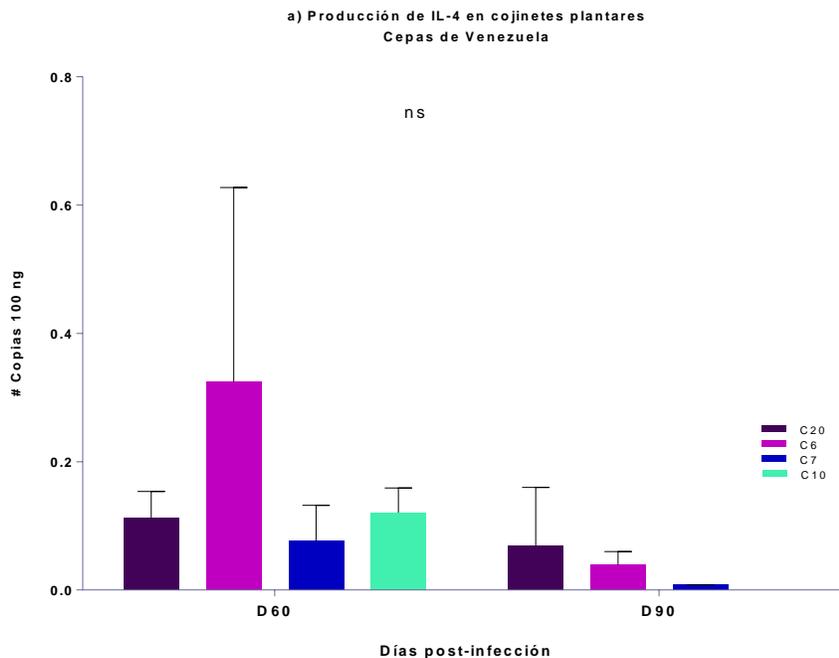


Figura 28 Ausencia de la detección de la transcripción de RNAm de *mmpL4b* durante la cinética de infección en cojinetes plantares infectados con cepas originarias de Venezuela. Como se muestra en la figura anterior no fue posible la observación de la banda correspondiente a este gen durante todo el tiempo de infección y por lo tanto no producen GPLs y poseen una morfología rugosa. Se toma como control positivo la cepa $\Delta mmpL4b-comp_{(S)}$ representada como $\Delta+$, el control negativo de la cepa $\Delta mmpL4b_{(R)}$ como $\Delta-$ provenientes del extracto de RNA de cultivos frescos y el control de reacción anotado como RX.

Estos resultados indican que la morfología en el sitio de infección se mantiene como rugosa, lo cual es producto a la falta de síntesis y exportación de GPLs a la membrana.

Por otro lado, se procedió a evaluar la presencia de diversos genes relacionados con la respuesta inmune del huésped con el objetivo de evaluar el contexto de citocinas pro o anti inflamatorias, usando como control positivo RPLP0. Se obtuvo que sólo se detecta la presencia de IL-4 (ver gráfica 7a), así como de TGF- β (ver gráfica 7b).



Gráfica 7 Detección de citocinas IL-4 y TGF- β en los días 60 y 90. En la figura a) se observa que la expresión de TGF- β es mayor durante el día 60 p.i para la C4_(R) y disminuye al día 90, donde C10_(R) mostró una mayor cantidad de copias de esta citocina. La estandarización se realizó utilizando el gen constitutivo del ratón RPLP0. Los datos son expresados como promedios de 3 muestras con su desviación estándar; el asterisco (*) representa una significancia estadística $p < 0.05$.

En la gráfica 7a se aprecia que la hay una mayor cantidad de copias de IL-4 en el caso de la C6_(R) en relación a las demás cepas. Asimismo, se muestra que la menor cantidad fue producida por la cepa C7_(S), después para el día 60 se disminuye la cuantificación de esta citocina para todas las cepas, particularmente para C10_(R) el cual no se detecta.

En la gráfica 7b la cuantificación de TGF- β es mayor en la para la C6_(R) durante el día 60, mientras que la cepa C7_(S) es la que menor produjo esta citocina. Por otro lado, para el día 90 se observa una disminución en comparación al día anterior de

la cinética. Para este punto, la C10_(s) es la que posee más copias durante la prueba.

En conjunto, este análisis indica que la a producción elevada de IL-4 y TGF- β en la etapa crónica de infección juega un papel importante en la reducción de la inflamación y propicia la reparación del tejido favoreciendo la respuesta M2. Sin embargo, como como se observa en la histología, hay una producción excesiva de fibrosis, lo que denota un fallo en la cicatrización promovido por la coacción de estas 2 citocinas probablemente debido a la presencia de la bacteria.

Resumen de resultados

Parte 1

A continuación se resumen los resultados obtenidos durante el experimento 1 durante la infección pulmonar y subdérmica con los aislados provenientes de Venezuela.

Infección	Característica	Aislado							
		C1 _(S)	C3 _(S)	C4 _(R)	C6 _(R)	C7 _(R)	C10 _(R)	C19 _(S)	C20 _(R)
Pulmonar	Necrosis								
	Vasodilatación								
	Edema								
	Infiltrado mixto								
	UFC's días crónicos (60-90 p.i)								
	Fibrosis								
	Pseudogranulomas								
	Actividad transcripcional mRNA 16Sr								
	Transcripción de mRNA <i>mmpL4b</i>								
	Producción de IL-4								
Subcutánea	Característica								
	Necrosis								
	Vasodilatación								
	Edema								
	Infiltrado mixto								
	UFC's días crónicos (60-90 p.i)								
	Fibrosis								
	Pseudogranulomas								
	Actividad 16Sr								
	mRNA de <i>mmpL4b</i>								
	Producción de IL-4								

Ausente	Leve	Moderado	Alto	No aplica
Ausente	Leve	Moderado	Alto	No aplica

Tabla 3 Resumen de resultados del experimento 1 de la infección pulmonar y subcutánea. En esta tabla de calor se representa con los colores descritos arriba la intensidad del fenómeno observado para cada una de las cepas.

Segunda parte experimental

“Cepas de Francia”

8.2 Cepas de Francia

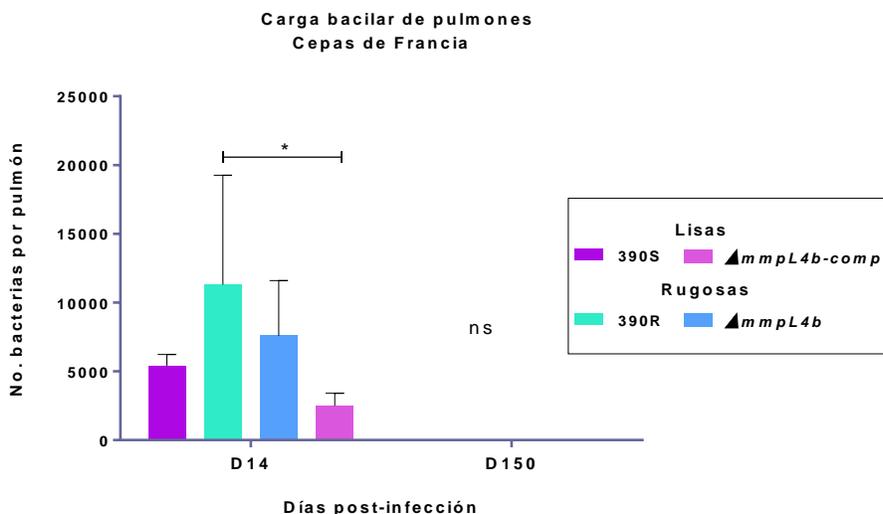
8.2.1 Infección pulmonar

8.2.1.1 Sobrevida

La sobrevivencia de los ratones tras la infección fue del 100% a lo largo de la cinética (datos no mostrados). Esto indica que independientemente del fenotipo bacteriano las cepas utilizadas no son un factor de mortalidad al menos en este modelo, ya que no se observan signos clásicos de una infección tan grave como es caquexia, zonas de alopecia, o comportamiento anormal.

8.2.1.2 Carga bacilar

Debido a los experimentos anteriores y teniendo en cuenta la tesis de licenciatura de Bendaña (2018), se decidió utilizar únicamente 2 días representativos de la cinética de infección: día 14 (donde el sistema inmune innato comienza a ejercer efecto en la sobrevivencia bacteriana) y día 150 (donde teóricamente la infección, al menos en términos de unidades formadoras de colonias, se encuentra resuelta).



Gráfica 8 Disminución de la carga bacilar en pulmones infectados. En esta gráfica se observa en el día 14 que la cepa rugosa 390R tiene significativamente la mayor carga bacilar en comparación con las demás cepas, por otro lado en el último día de la cinética no hay bacterias cultivables. Los datos representan el promedio de tres muestras con su desviación estándar; los asteriscos (*) representan significancia estadística ($p < 0.05$), mientras que (ns) corresponde a las diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

Como se muestra en la gráfica 8, para el día 14 p.i se reduce 90% la carga bacilar en comparación con al inóculo inicial. En parangón con la infección pulmonar con las cepas de Venezuela, la carga bacilar fue aún menor, por ello ésta disminución abrupta hace lución a una rápida respuesta del sistema inmune innato en los primeros días de la infección.

Asimismo se observa que la cepa rugosa 390R_(R) fue la que tuvo la carga bacilar más elevada, elemento que concuerda con la bibliografía, donde las cepas rugosas son las más virulentas y que presentan una carga bacilar elevada.

Por otro lado, para el día 150 no hay presencia de bacterias cultivables, tal como lo ocurrido con las cepas de Venezuela, no hay presencia de bacteria cultivable, por lo que se pensaría que la infección en este punto se encuentra resuelta.

8.2.1.3 Histología

Lo primero que podemos observar en la figura 30 en el día 14 p.i es un patrón muy similar de infección durante la fase aguda, las cepas lisas (figura 30 a y c) muestran infiltrado inflamatorio que provoca alveolitis dispersa; en contraste, en 390S_(S) éste fenómeno está localizado en la periferia de los sacos alveolares y en algunos alveolos cercanos a estos sacos. En el caso de $\Delta mmpL4b\text{-comp}_{(S)}$ muestra infiltrado inflamatorio mixto que va desde la pared del bronquio hasta abarcar el espacio inter e intra alveolar.

En segunda instancia, la cepa 390R_(R) estableció un denso contenido de macrófagos y linfocitos ubicados en el espacio inter alveolar, no obstante, la cepa $\Delta mmpL4b_{(R)}$ produjo inflamación intersticial e intra alveolar.

Este análisis demuestra que las bacterias son reconocidas por el sistema inmune en el sitio de la infección en la etapa aguda, además de que esta respuesta inflamatoria es considerada leve-media por lo que no es probable que ponga en juego la vida de nuestro modelo.

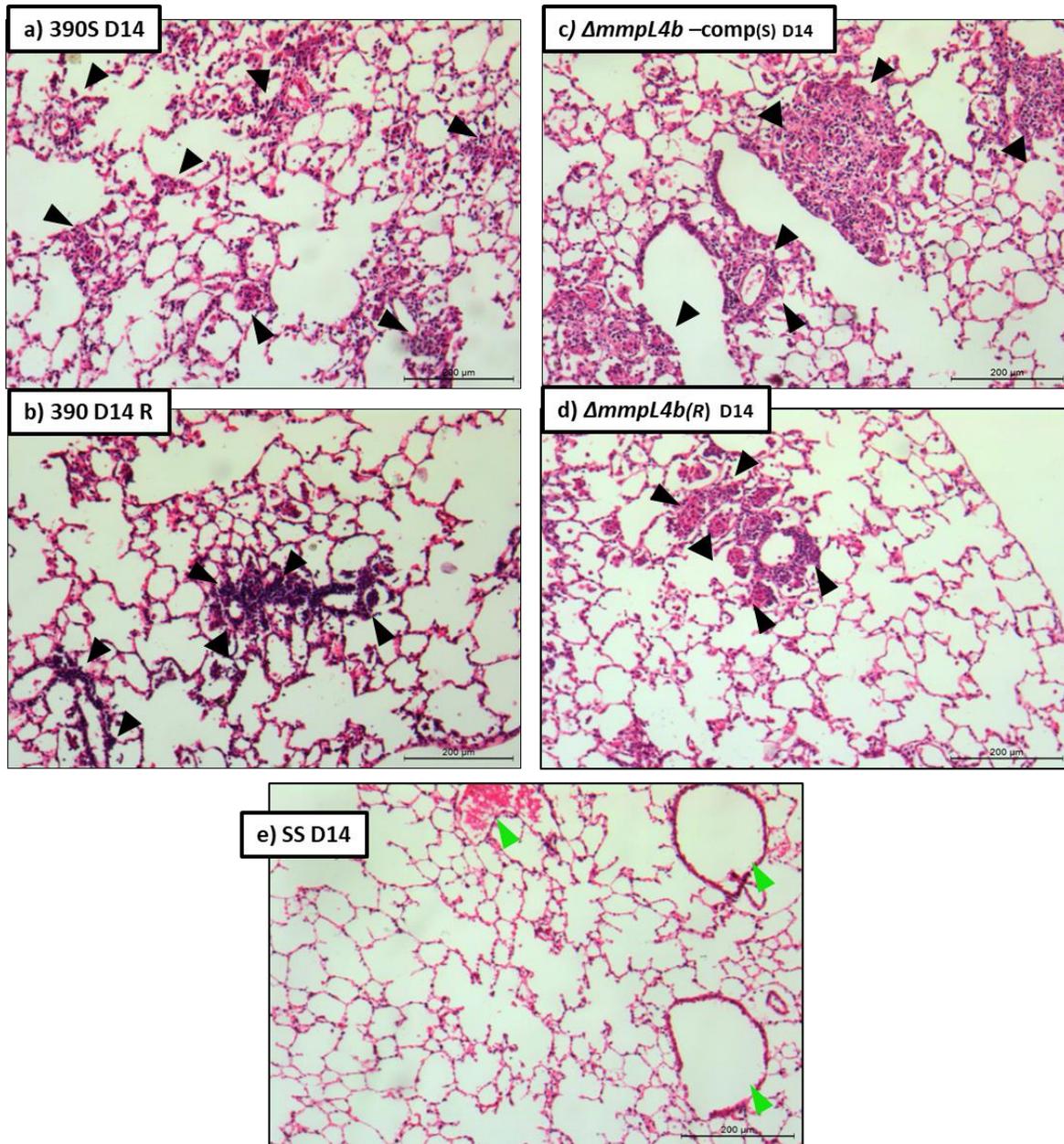


Figura 29 Similitud de respuesta inmune pulmonar generada en etapas agudas. a) Ceba 390_S(_S) presenta alveolitis dispersa alrededor de sacos y alveolos b) Ceba 390_R(_R) celularidad mixta compacta dispuesta en el espacio inter alveolar c) $\Delta mmpL4b$ (_R) infiltrado mixto disperso comenzando en la pared bronquial d) $\Delta mmpL4b$ -comp(_S) inflamación intersticial e intra alveolar e) Control de solución salina. D14=tejido normal. Los triángulos verdes indican la los vasos sanguíneos, mientras que los negros el sitio del infiltrado inflamatorio.

Para el día más tardío de la cinética, se aprecia que la cepa 390_S(_S) posee algunos puntos fibróticos intersticiales, sin embargo éstos son mínimos. También hay avistamiento de escasos macrófagos vacuolados ubicados el espacio inter alveolar, cabe destacar que el resto del tejido pulmonar no presenta daños severoselemento que corresponde a lo observado en el control de solución salina,

por lo que se podría considerar que la infección está resultando. Por otro lado, la cepa lisa mutante ($\Delta mmpL4b-comp_{(S)}$) revela la aparición de escasos granulomas no caseificantes o necrotizantes localizados en las afueras de los sacos alveolares, también presenta alveolitis con parches de fibrosis intersticial, al igual que la cepa 390S_(S), no se ve un daño significativo en el tejido. En paralelo, la cepa 390R_(R) exhibe una leve cantidad de pseudogranulomas (menos de 5 por pulmón) de gran tamaño que se localizan entre sacos alveolares, también se aprecia la presencia de macrófagos espumosos y linfocitos en el intersticio de los sacos; no obstante, a diferencia de la cepa 390S_(S), la infección causa más parches fibróticos en el intersticio de los sacos bronquiales.

En contraste, la cepa mutante $\Delta mmpL4b_{(R)}$ no presenta pseudogranulomas, pero sí presencia de infiltrado proinflamatorio mixto cercano a los vasos y a la periferia de los sacos alveolares, en suma genera sitios fibróticos dentro de los alveolos en lugares cercanos al vaso sanguíneo, elemento que es distintivo para esta cepa.

Estos datos indican que cada morfotipo tiene un patrón en la etapa crónica que varía ligeramente, en los aislados lisos se tiende a controlar la inflamación más rápido y pueden provocar menos daño en el tejido; al contrario, las cepas rugosas tuvieron la propensión en etapas crónicas a generar una mayor respuesta inflamatoria y fabricación de fibrosis, lo cual va en concordancia con lo observado en el experimento anterior y las referencias.

No obstante, al igual que las cepas rugosas del experimento de las cepas provenientes de Venezuela, la presencia de pseudogranulomas es un indicador de que la bacteria pudiese permanecer en estado VBNC o latente, estado que probablemente esté relacionado directamente con un microambiente oxidativo.

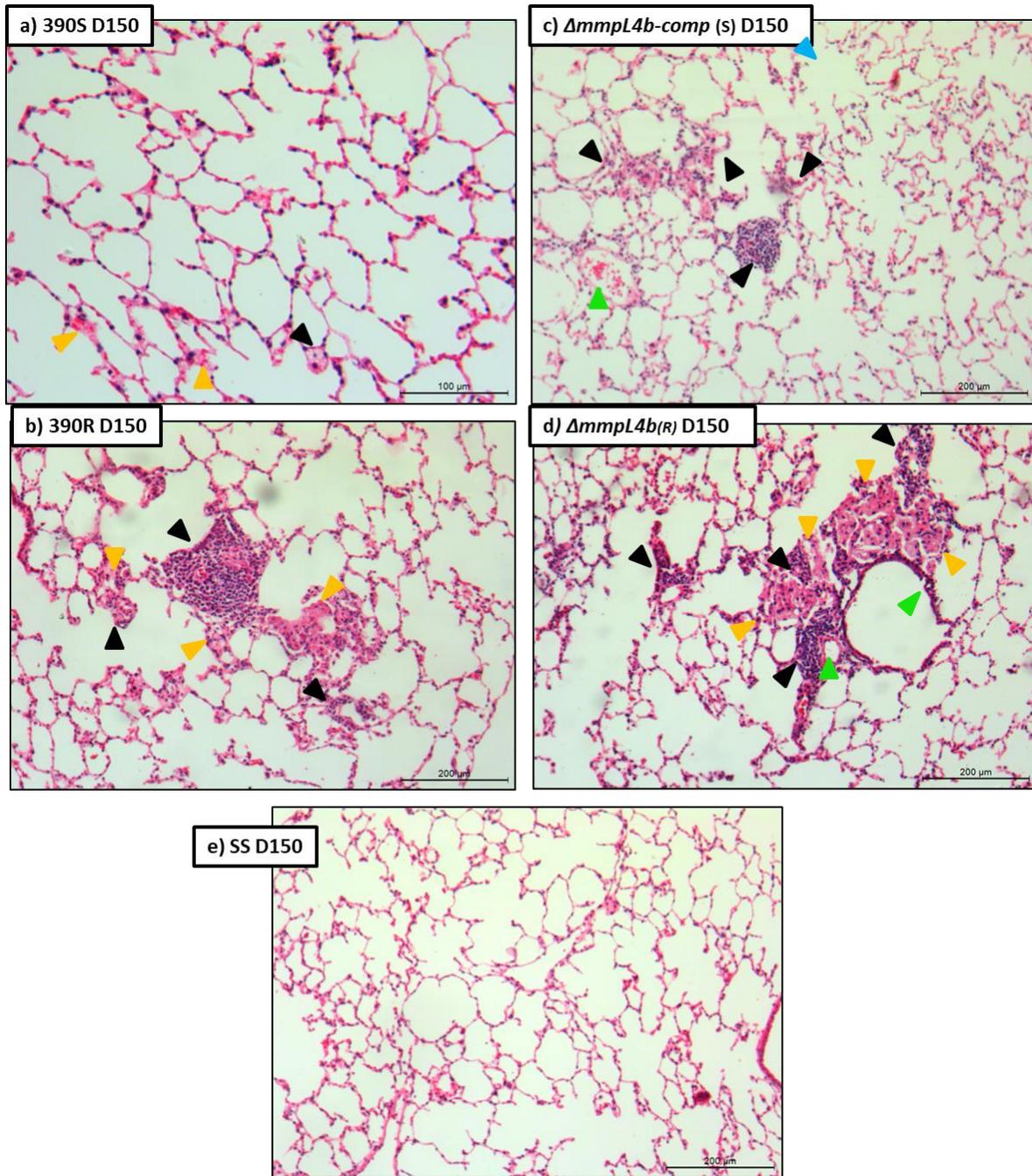


Figura 30 La infección pulmonar con cepas rugosas provoca mayor inflamación en etapas crónicas. a) Cepa 390S_(S) denota escasa fibrosis intersticial y escasos macrófagos alveolares en la periferia de los alveolos. b) Cepa 390R_(R) pseudogranulomas con perímetro considerable, sitios fibróticos en el intersticio de los sacos bronquiales c) $\Delta mmpL4b_{(R)}$ se ubica infiltrado inflamatorio mixto alrededor de vasos y sacos alveolares. d) $\Delta mmpL4b\text{-comp}_{(S)}$ escasos granulomas no caseificantes de tamaño pequeño junto con poca alveolitis así como fibrosis intersticial. e) control de solución salina. Los triángulos amarillos indican la localización del infiltrado inflamatorio, mientras que los negros los granulomas o pseudogranulomas. e) Control de solución salina. D150=tejido normal. Los triángulos verdes indican la los vasos sanguíneos, los negros el sitio del infiltrado inflamatorio y los amarillos la fibrosis.

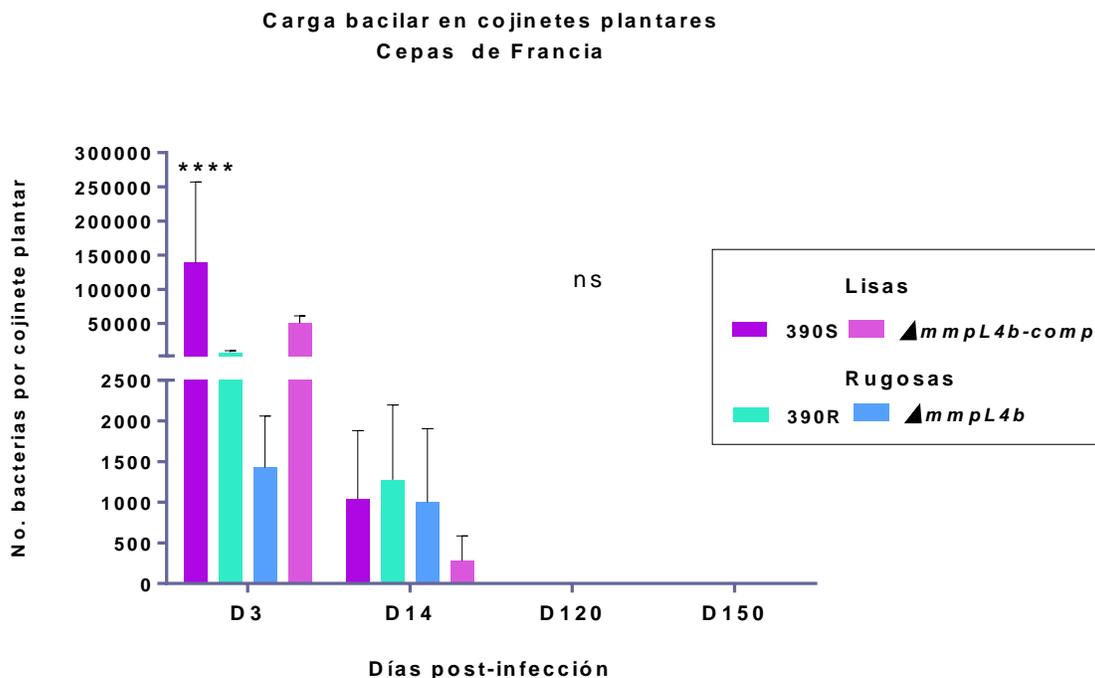
8.2.2 Infección subcutánea

8.2.2.1 Carga bacilar

En esta cinética (ver gráfica 9) se nota al día 3 post infección que los bacilos no son eliminados completamente por el sistema inmune innato, sorpresivamente la cepa con menor carga fue la $\Delta mmpL4b_{(R)}$, elemento que indica un eficiente control de infección.

A continuación, en el día 14 hay una baja considerable en el conteo de la carga bacilar, efecto que podría ser debido a la activación de la respuesta inmune adaptativa, efecto que se observa con las cepas de Venezuela. De la misma forma, la infección es controlada debido a que para los siguientes días de la cinética, ninguna de las cepas son cultivables en placas de 7H10.

Con esta información podemos comprobar las tendencias de los experimentos anteriores, así como en el antecedente directo de este trabajo publicado en la tesis de licenciatura de Bendaña (2018).



Gráfica 9 Disminución continua de la carga bacilar en cojinetes plantares inoculados con Mab hasta niveles no detectables. Como se observa, para el día 3 p.i $\Delta mmpL4b_{(R)}$ presenta significativamente la menor carga bacilar en comparación a las otras cepas. Posteriormente al día 14 todas las cepas presentan una disminución en las UFC's, y no presentan diferencias significativas. En continuación, para el día 120 y 150 no hay crecimiento de bacterias en 7H10+OADC+glicerol 0.05%. Los datos representan el promedio de cinco muestras con su desviación estándar; los asteriscos (*) representan significancia estadística ($p < 0.05$), mientras que (ns) corresponde a las diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

8.2.2.2 Histología

Para analizar el daño tisular provocado por la inoculación de la bacteria, se procedió a realizar la tinción de H&E de cortes del cojinete plantar de 4 μm de grosor fijados en parafina y se eligió representar los puntos en la histología más representativos.

En el día 3 p.i (ver figura 32), tanto la cepa 390S_(S) como 390R_(R) denotan un infiltrado considerable de macrófagos y algunos neutrófilos que abarca desde el estrato basal hasta llegar a la zona del tendón y músculos; del mismo modo, podemos apreciar algunos puntos necróticos cercanos al estrato basal y a las glándulas sudoríparas, al igual que vasodilatación y edema. En contraste, ambas cepas mutantes revelan la ausencia de puntos necróticos así como un menor infiltrado proinflamatorio el cual se localiza de forma compacta y se detiene al llegar al tejido muscular, aunque también podemos encontrar vasodilatación y edema.

Estos datos prueban que el sistema inmune innato es capaz de reconocer la bacteria y arma una respuesta para contener la infección y muestra que al modificar la expresión del gen *mmpL4b*, se modifica un poco la respuesta del hospedero, sin embargo, más estudios son necesarios.

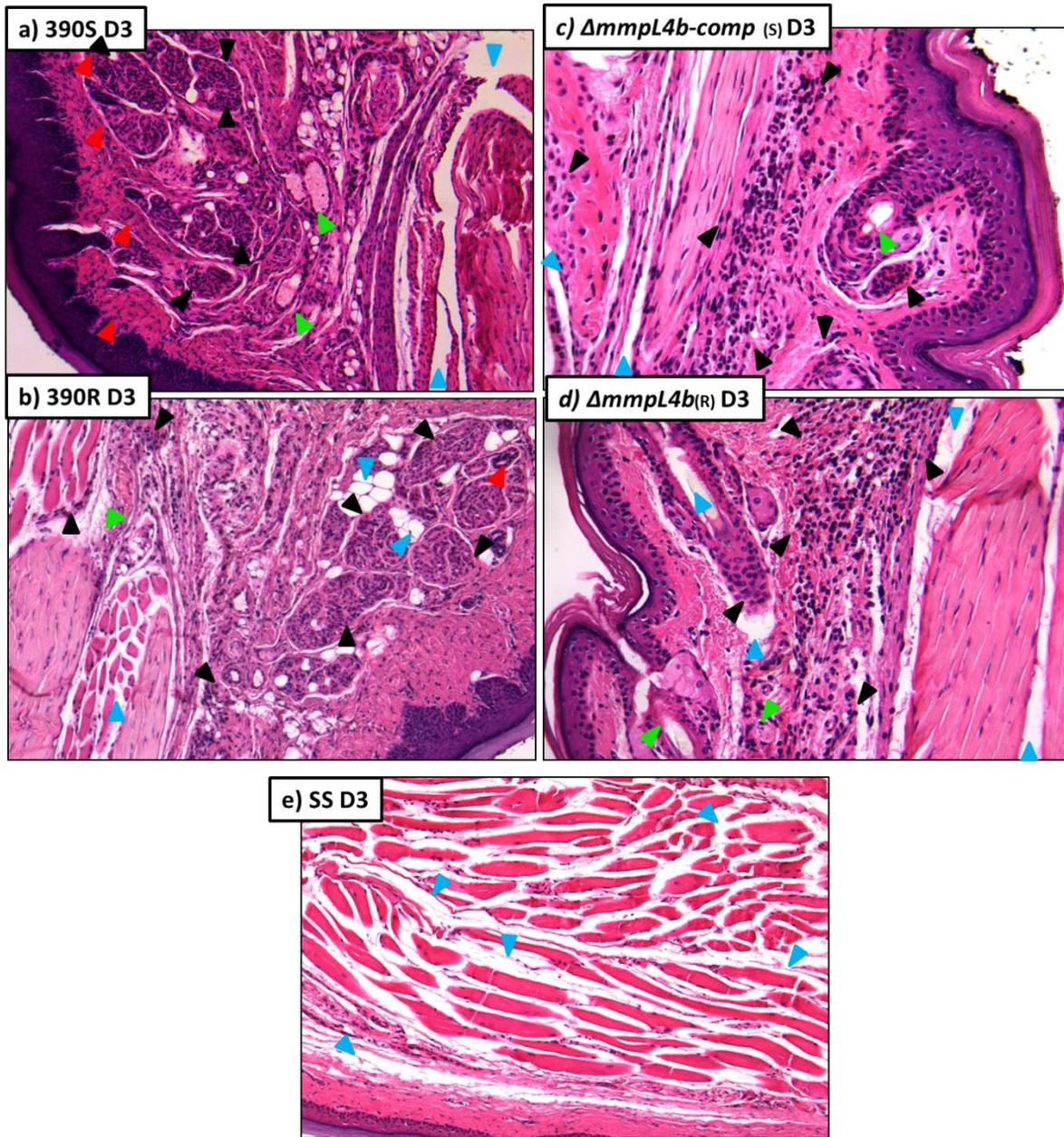


Figura 31 Respuesta aguda a la infección subcutánea. a) Cepa 390S_(S) existencia de edema y vasodilatación con infiltrado mixto con distribución amplia, desde el estrato basal hasta el tejido muscular, presencia de pocos sitios de necrosis cercana a glándulas sudoríparas. b) Cepa 390R_(R) infiltrado de macrófagos y linfocitos extenso, con vasodilatación y baja producción de edema c) $\Delta mmpL4b_{(R)}$ inflamación mixta compacta en la zona del tejido celular subcutáneo con presencia de edema y vasodilatación. d) $\Delta mmpL4b_{(S)}$ avistamiento leve de edema, visible vasodilatación e infiltrado compacto. e) Solución salina D3, tejido sin presencia de infiltrado proinflamatorio pero se observa edema tras la inoculación. Los triángulos verdes muestran vasodilatación, los rojos necrosis, los azules edema y los negros inflamación.

Para el día 14 p.i (ver figura 33) se aprecia una distensión del infiltrado proinflamatorio en el tejido celular subcutáneo, mostrando un leve retroceso en el musculo, en comparación del día anterior el edema se reduce pero continúa la vasodilatación, adicionalmente hay una reducción de los puntos necróticos que ahora están situados en el tejido celular subcutáneo. En el caso de 390R_(R), al igual que la cepa 390S_(S) los puntos necróticos son desplazados al área central del tejido y en comparación con el día 3 aumenta tanto el edema como la vasodilatación.

En contraparte las cepas mutantes también aumentan la distribución del infiltrado al centro del tejido, donde también ahora aparecen puntos de necrosis, se reduce el edema y continúa la vasodilatación. En este punto pocas son las diferencias histológicas con las otras cepas.

Este experimento muestra que la respuesta inmune innata no es suficiente para controlar la infección y en el día 14 tras la activación de la respuesta adaptativa, el hospedero monta una respuesta más evidente que intenta controlar la infección y corresponde al fenómeno visto con las cepas de Venezuela así como a las unidades formadoras de colonias.

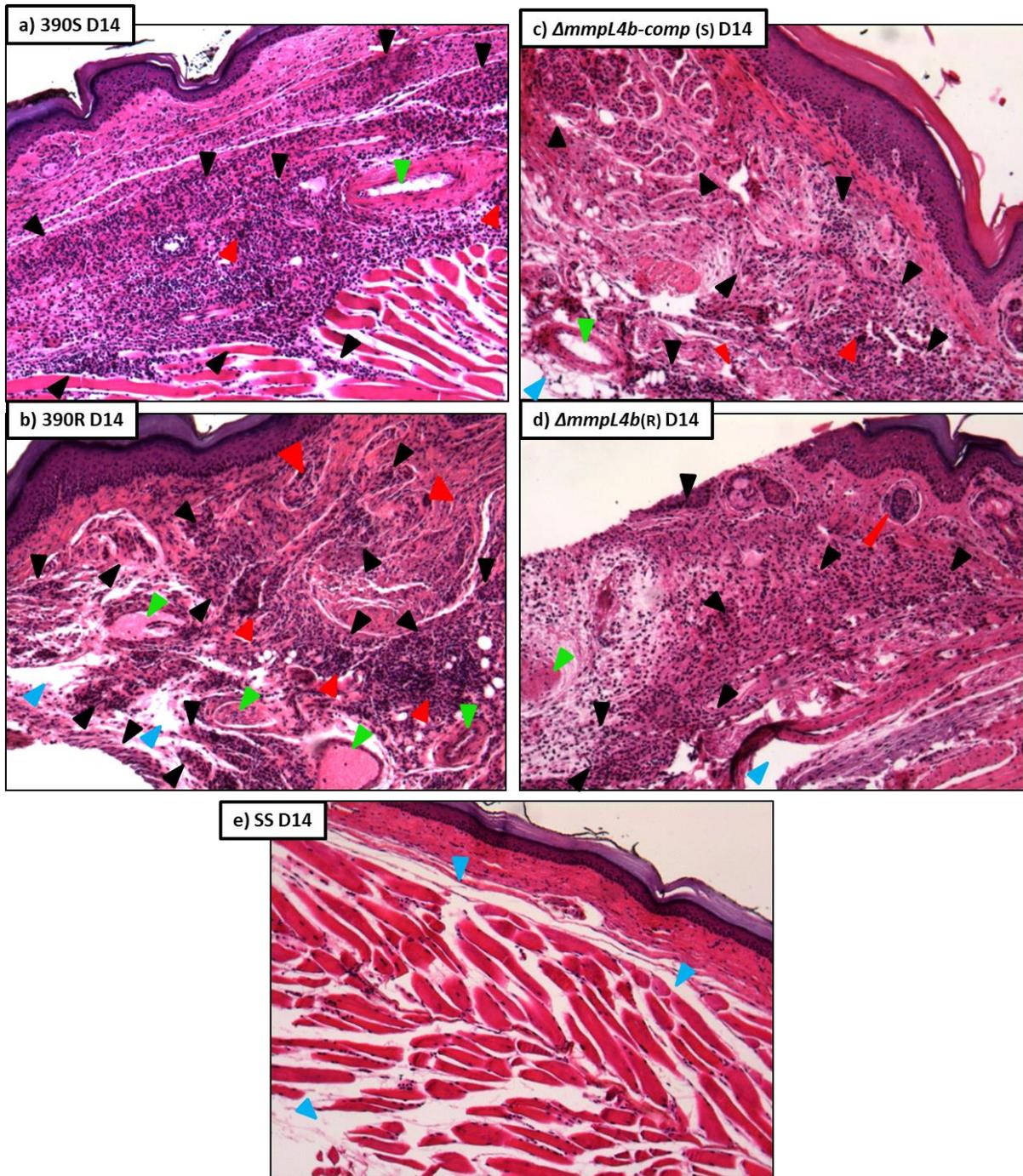


Figura 32 Reforzamiento de la respuesta inmune durante la fase aguda a la infección subcutánea. a) Cepa 390S_(S) ampliación de la inflamación en tejido celular subcutáneo, menor presencia de sitios necrótico y vasodilatación. b) Cepa 390R_(R) necrosis mínima en el área central, reducción de edema e incremento de la celularidad así como mantenimiento de los vasos sanguíneos dilatados. c) $\Delta mmpL4b_{(R)}$ aparición de sitios necróticos, aumento de edema y vasodilatación así como de macrófagos y linfocitos en el tejido. d) $\Delta mmpL4b\text{-comp}_{(S)}$ necrosis escasa distensión de inflamación e incremento mínimo de edema. e) Solución salina D14, tejido sin presencia de infiltrado proinflamatorio pero aún se observa edema en este tiempo. Los triángulos verdes muestran vasodilatación, los rojos necrosis, los azules edema y los negros inflamación.

Al día 120 p.i (ver figura 34) todas las cepas a excepción de la mutante $\Delta mmpL4b_{(R)}$, promueven la formación de una zona fibrótica considerable en la zona central (especialmente en el caso de 390R_(R)). Con respecto al día 14 p.i, el infiltrado inflamatorio y el edema se reduce drásticamente, pero no desaparece por completo, disminuye el edema y desaparecen los sitios necróticos.

En contraste, $\Delta mmpL4b_{(R)}$ genera menor fibrosis en comparación con las demás cepas, muestra aún edema cercano al tendón, así como un mayor infiltrado de linfocitos y macrófagos en el lumen del tejido celular subcutáneo comenzando desde el estrato basal hasta la porción central.

Por otro lado, todas las cepas presentan acantosis primaria, lo cual es el inicio de un trastorno cutáneo distinguido por hiperplasia epidérmica difusa, es decir, engrosamiento de la piel, lo que implica un mayor espesor de la capa de Malpighi o estrato espinoso, que en la mayoría de los casos se asocia directamente con un aumento del número de queratinocitos y cambia la anatomía original, deformando el tejido.

Dicho experimento revela menor producción de fibrosis en comparación con las cepas de Venezuela (ver anexo 4), sin embargo esto indica que existen diferencias intrínsecas que modifican el grado de virulencia y en consecuencia la respuesta del hospedero.

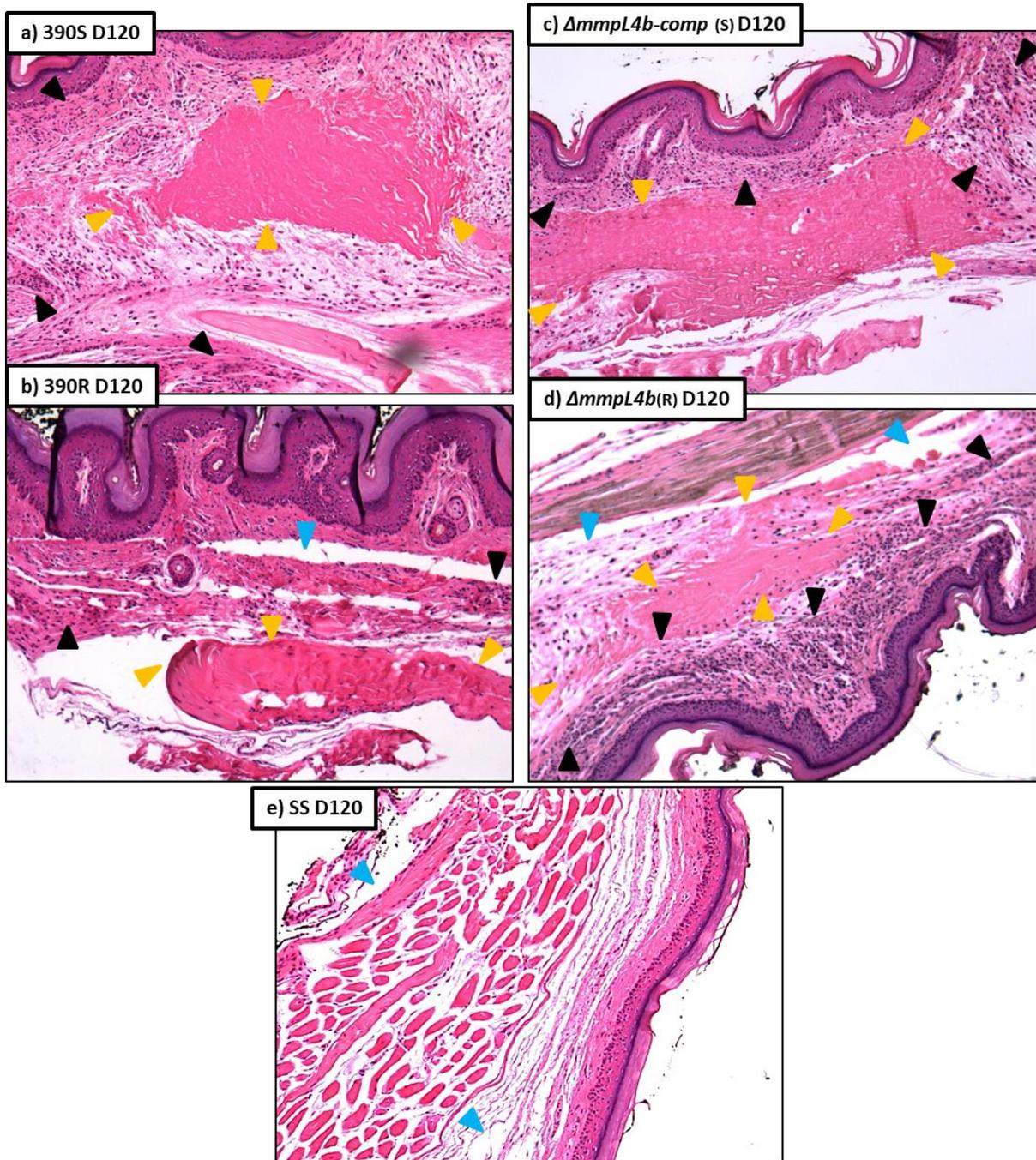


Figura 33 Fallo en la restauración del tejido en etapas crónicas. a) Ceba 390S_(S) fibrosis. Central con infiltrado proinflamatorio leve. b) Ceba 390R_(R) fibrosis compacta central con presencia de celularidad mixta, edema y aparición de acantosis. c) $\Delta mmpL4b_{(R)}$ fibrosis extensa en el lumen del tejido celular subcutáneo, poca presencia de infiltrado y acantosis d) $\Delta mmpL4b\text{-comp}_{(S)}$ fibrosis central no extensa, edema en la periferia del tejido muscular y avistamiento de linfocitos y macrófagos cercanos al estrato basal. e) Solución salina D120, tejido sin presencia de infiltrado proinflamatorio pero aún se observa edema en este tiempo. Los triángulos verdes muestran vasodilatación, los rojos necrosis, los azules edema y los negros inflamación.

En el caso de la cepa 390S_(S) y $\Delta mmpL4b-comp_{(S)}$ en el día 150 p.i, (ver figura 35) se nota fibrosis en la parte media rodeado de numerosos fibroblastos, se ve la presencia disminuida de edema y vasodilatación. Para 390S_(S) se observa poca inflamación cercana a la lámina basal que ahora se encuentra en un estado hiperplásico leve. No obstante, la cepa mutante muestra el infiltrado inflamatorio cerca de glándulas, así como en la parte del lumen del tejido sin llegar a músculo, por lo que se considera menos invasiva.

En contraparte, 390R_(R) presenta una mayor área fibrótica en comparación a las demás cepas, la cual está localizada cerca del tejido muscular. Igualmente se observa mayor infiltrado en el tejido subcutáneo, sin una presencia importante de fibroblastos; el estrato basal presenta una hipertrofia marcada importante en comparación con el control de solución salina. Por otro lado, la característica más destacable es la presencia de algunos granulomas no caseificantes ni necrotizantes en la zona central, lo que podría estar indicando que la hipótesis de latencia podría ser la más fehaciente de acuerdo al fenómeno observado.

De forma contraria, la cepa mutante $\Delta mmpL4b_{(R)}$ en comparación con todos los aislados utilizados, provoca menor fibrosis en este tiempo de infección, está localizada cercana a la lámina basal, cabe resaltar que este efecto coincide con el primer experimento descrito en la tesis de licenciatura de Bendaña (2018). Este estrato al igual que en los demás casos, también presenta hiperplasia. Sin embargo, esta mutante aún presenta edema leve y vasodilatación (elemento no mostrado); pese a que se disminuye el número de fibroblastos en el área con respecto al día 120 p.i, podemos encontrar infiltrado inflamatorio cercano a las glándulas sudoríparas y lumen de la muestra

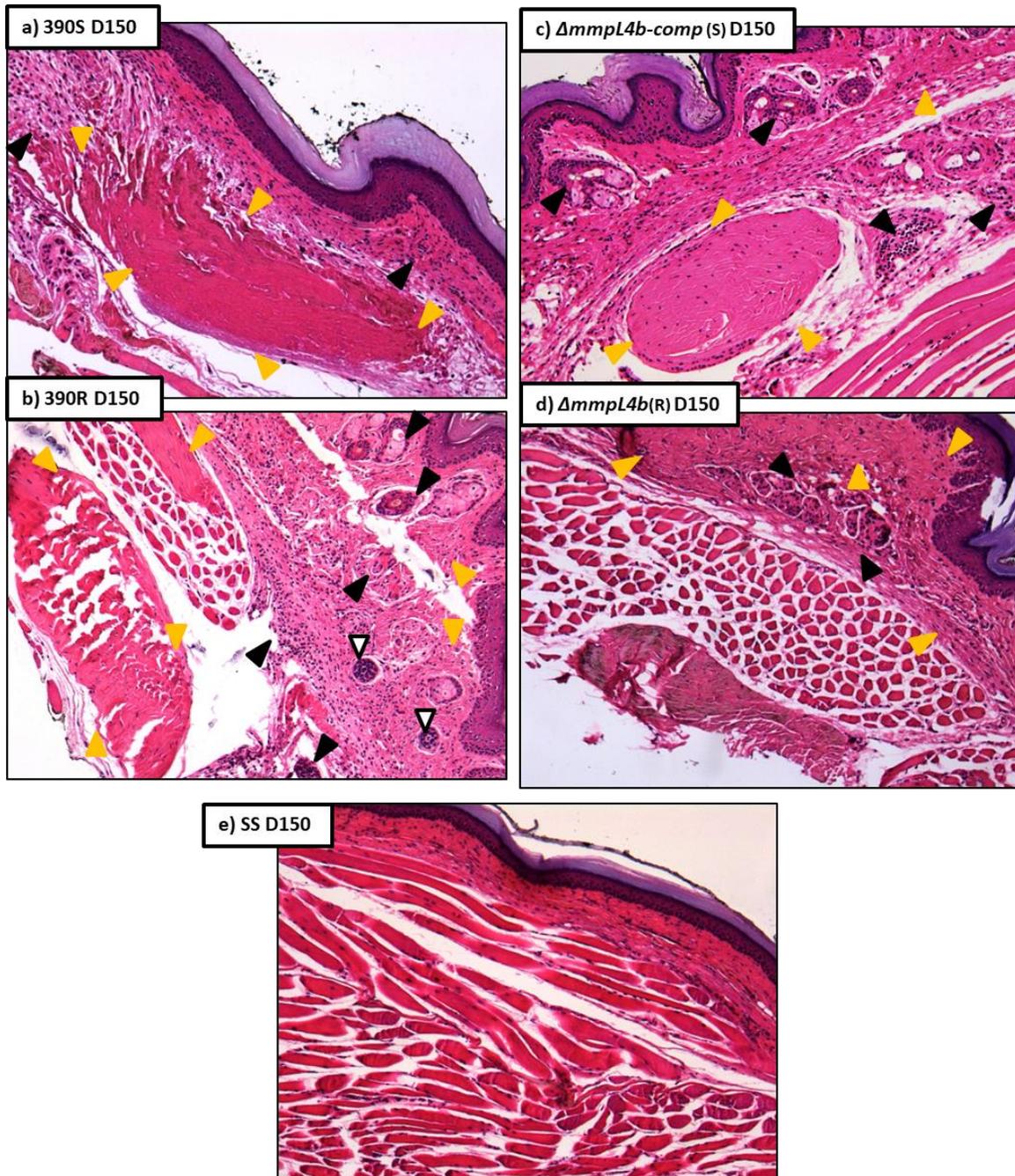
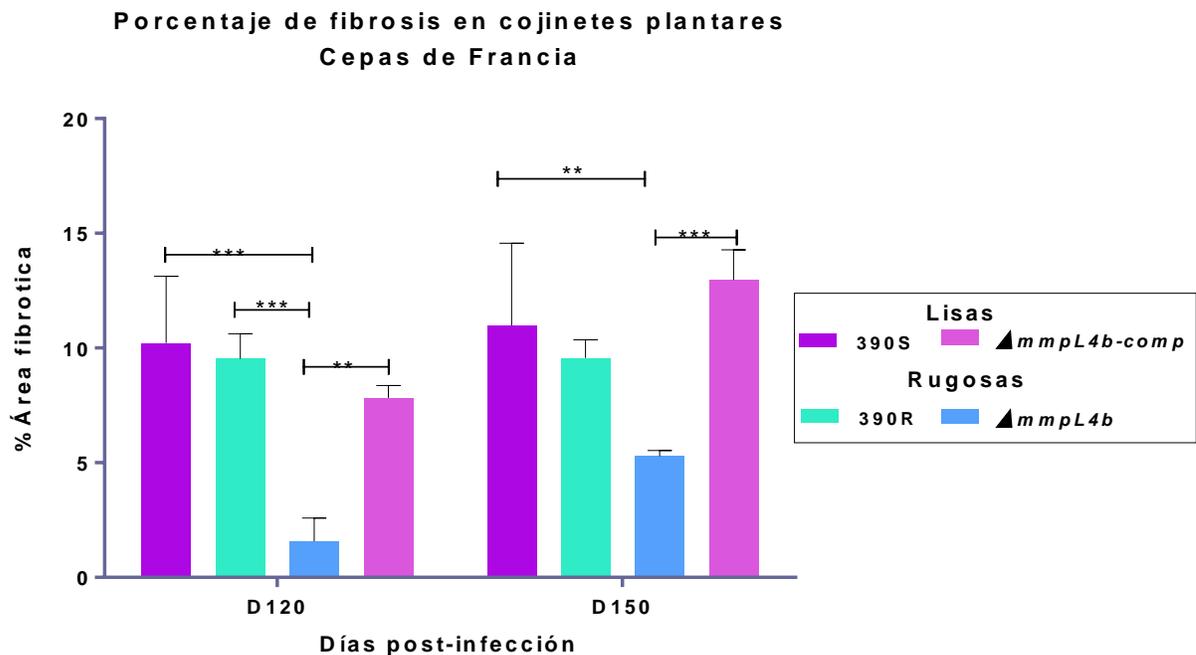


Figura 34 Fallo en la restauración y formación de granulomas en fases crónicas de la infección subcutánea. a) Cepa 390S_(S) se nota una membrana scantótica, también presenta fibrosis dispersa con fibroblastos periféricos e infiltrado de macrófagos y linfocitos en el tejido celular subcutáneo. b) Cepa 390R_(R) estrato basal con hiperplasia, también se identifica una extensa área fibrótica en la parte intersticial del tejido muscular, en conjunto, hay infiltrado considerable localizado en el lumen del tejido y cercano a las glándulas sudoríparas y presencia de granulomas no caseificantes c) $\Delta mmpL4b_{(R)}$ muestra infiltrado en la periferia de las glándulas y centro del tejido lámina basal con acantosis y área fibrótica considerable. d) $\Delta mmpL4b\text{-comp}_{(S)}$. se exhibe una base con acantosis, pocos puntos fibróticos, baja presencia de fibroblastos, ausencia de edema y baja cantidad de macrófagos y linfocitos, quienes están ubicados cerca de las glándulas e) Solución salina D120, tejido sin presencia de infiltrado proinflamatorio o fibrosis con lámina basal normal (no acantótica). Los triángulos amarillos muestran fibrosis, los blancos granulomas y los negros inflamación.

Por otro lado, utilizando el software Leica Biosystems se midió el porcentaje de área fibrótica en los días 120 y 150 (ver gráfica 10). En este análisis se obtuvo que la cepa *mmpL4b_(R)* carente de GPLs genera significativamente menor fibrosis en comparación con las demás.



Gráfica 10 Distintos porcentajes de fibrosis tras la infección con cepas de Francia. En este gráfico se observa que la cepa *AmmpL4b_(R)* es la que posee significativamente menor área fibrótica, tanto para el día 120 como para 150 p.i, mientras que las demás cepas no poseen diferencias significativas entre ellas. Los datos representan el promedio de tres muestras con su desviación estándar; los asteriscos (*) representan significancia estadística ($p < 0.05$).

8.2.2.3 Biología molecular

8.2.2.3.1 PCR tiempo final 16Sr y *mmpL4b*

Dados la similitud de los resultados anteriores con las cepas venezolanas, se procedió a realizar PCR con el gen 16Sr (gen constitutivo) para verificar si había presencia de bacteria viva en el tejido a pesar de no ser cultivable mediante la técnica tradicional.

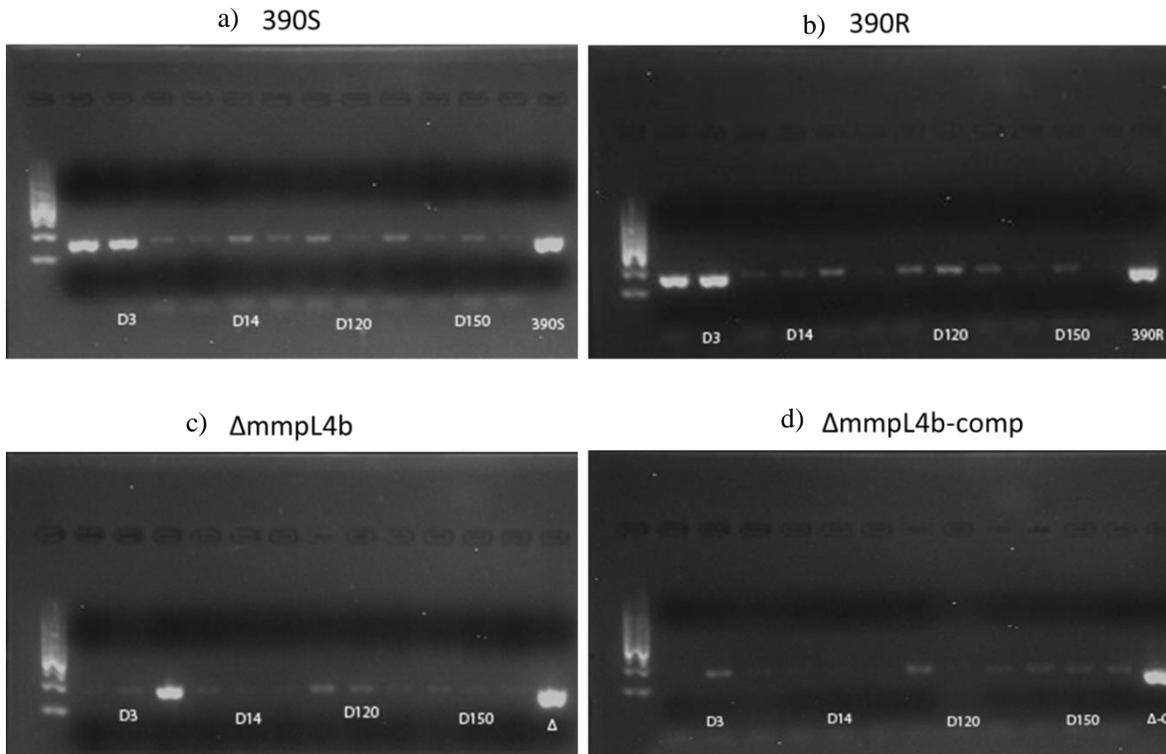


Figura 35 Detección de actividad transcripcional durante la etapa aguda y crónica de la infección. En estos geles se observa la presencia de la banda correspondiente al gen *16Sr* de Mab en cada una de las cepas estudiadas pesar de la ausencia de crecimiento en placas de agar. Se toma como control positivo el extracto de RNA de cultivos frescos de cada cepa.

Como se muestra en la figura anterior las bandas más claramente marcadas corresponden los días día 3 y 14 p.i, lo cual está en concordancia con el número de bacterias existentes en ese tiempo de la cinética. Sin embargo, de manera sorprendente para el día 120 y 150 p.i donde las UFC's eran completamente negativas para todas las cepas, encontramos la presencia de RNA mensajero de la subunidad 16 ribosomal, indicando rotundamente que esta bacteria se encuentra viva y transcripcionalmente activa en el tejido, probablemente en un estado no cultivable o durmiente, elemento que también se encontró en las cepas de Venezuela.

Con este mismo método, se evaluó si existe la presencia RNAm para *mmpL4b* de Mab (ver figura 37); se usaron los primers para el gen mencionado y como control negativo se usaron el RNAm de las cepas en cultivo fresco de $\Delta mmpL4b_{(R)}$ y $\Delta mmpL4b-comp_{(S)}$.

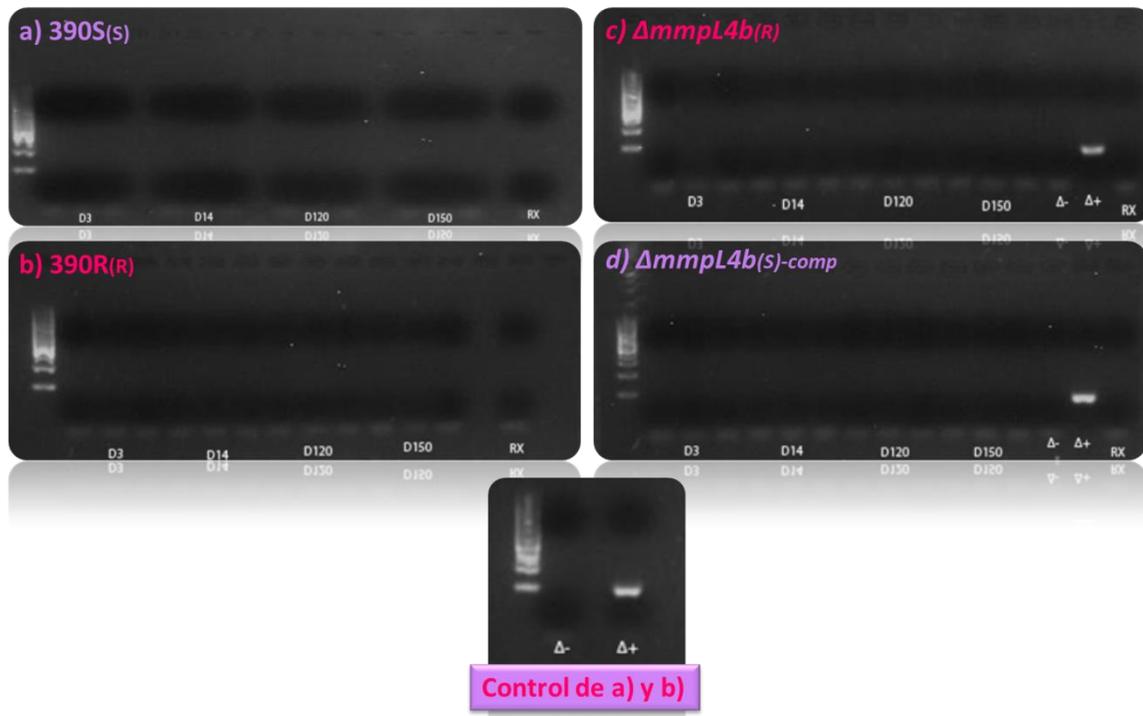
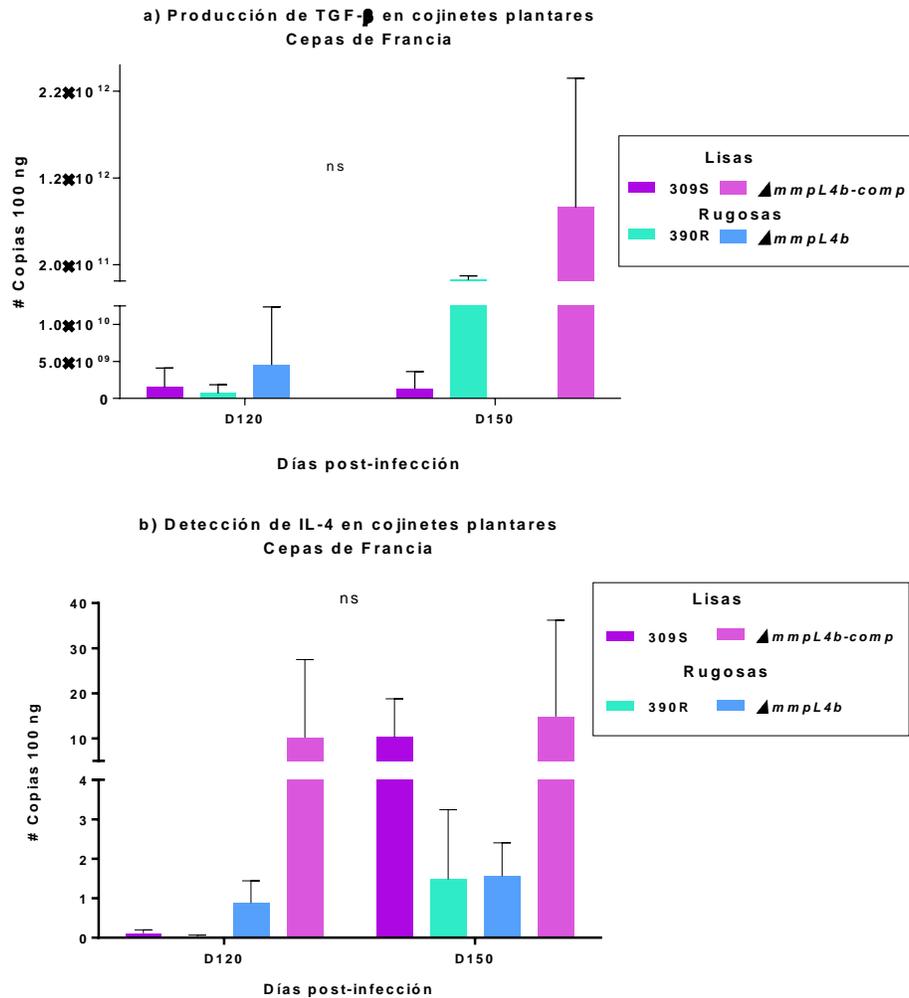


Figura 36 Ausencia de RNAm de *mmpL4b* durante la cinética. En estos geles se observa la ausencia total de la banda correspondiente al gen *mmpL4b* de Mab en cada una de las cepas estudiadas. Se toma como control negativo la $\Delta mmpL4b_{(R)}$ representada como Δ^- y $\Delta mmpL4b\text{-comp}_{(S)}$ como positivo de reacción ilustrada como Δ^+ ambas provenientes del extracto de RNA de cultivos frescos.

Interesantemente a pesar de que se cuenta con 2 cepas lisas, que en teoría se encuentran transcribiendo a *mmpL4b* y por ende producen y exportan los GPLs a la membrana, se observó que en ningún momento de la cinética de infección de 150 días no se halla presencia de la banda de 987 KDa correspondiente de *mmpL4b* para ninguna de las cepas en cuestión. Estos resultados indican que su morfología en el sitio de infección es rugosa, lo que sugiere un cambio de fenotipo tras la infección, elemento que concuerda con los patrones observados en los experimentos anteriores ya que éstas tuvieron un comportamiento similar a las cepas rugosas.

8.2.2.3.2 PCR tiempo real citocinas

Por otro lado, se procedió a evaluar la presencia de diversos genes relacionados con la respuesta inmune del huésped, usando la prueba de PCR en tiempo real, teniendo como control positivo *RPLP0* como gen constitutivo (ver gráfica 11).



Gráfica 11 Cuantificación de la producción de citocinas IL-4 y TGF- β en cojinetes plantares en etapas crónicas de la infección subcutánea. a) Se observa un incremento en la cuantificación de IL-4 durante los días 120 y 150 post-infección en particular para 390S_(S) y $\Delta mmpL4b$ -comp_(S). b) Incremento de la producción de TGF- β , particularmente en 390R_(S) y $\Delta mmpL4$ _(R). La estandarización se realizó utilizando el gen constitutivo del ratón RPLP0. Los datos son expresados como promedios de 3 muestras con su desviación estándar; el asterisco (*) representa una significancia estadística $p < 0.05$.

En el caso de la gráfica 11a podemos apreciar una producción sumamente elevada de copias del RNAm para la producción de TGF- β . Para el día 120 la cepa $\Delta mmpL4b$ _(R) fue la que produjo más copias de esta citocina, fue seguido por 390S_(S) y 390R_(R), no obstante, no se detectó por este medio la expresión de TGF- β tras la infección con $\Delta mmpL4b$ -comp_(S). Para el día 150p.i, no se manifestó la presencia de esta molécula para $\Delta mmpL4b$ _(R), sin embargo en el caso de 390S_(S) permaneció estable; se observó un aumento significativo para el caso de las cepas 390R y $\Delta mmpL4b$ -comp_(S).

En la gráfica 11b podemos apreciar un aumento notable de la expresión de esta citocina en los tiempos tardíos de la cinética. Durante el día 120 el conteo de copias en 100 ng es a penas detectable para las cepas lisas 390S_(S) y $\Delta mmpL4b$ -comp_(S); no obstante, las cepas rugosas 390R_(R) y $\Delta mmpL4b$ _(R) producen mayor número de copias.

Para el día 150 p.i, las cepas lisas aumentan notablemente la producción de esta citocina, en particular la cepa WT 390S_(S), mientras que las cepas rugosas mantienen estable la producción de la misma.

Estos resultados muestran que existe un proceso de desregularización de la producción de citocinas al momento de la restauración del tejido. Se hace notable que hay una expresión sumamente alta de TGF- β , la cual es una citocina que se encuentra directamente relacionada con la producción de fibrosis, en este caso al ser tan elevada, explica una superproducción fibrótica que deriva en la deformación del tejido, como se observa en la histología.

Al encontrar que todas dejan de expresar RNAm de *mmpL4b* y por tanto no producen GPLs, puede indicar que algún elemento de su composición está fomentando la producción excesiva de fibrosis. También el hecho de que la cepa *mmpL4b* sea la que haya presentado menos fibrosis en la histología y luego se haya detectado menor producción de TGF- β en comparación a todas las muestras, podría ser un indicativo de que este gen realiza una función adicional a la exportación y producción de GPLs a la membrana, sin embargo más estudios son necesarios para evaluar esta hipótesis.

Resumen de resultados

Parte 2

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante el experimento 2 con los aislados provenientes de Francia.

Infección	Característica	Aislado			
		390S _(S)	$\Delta mmpL4$ <i>b</i> - <i>comp</i> _(S)	390R _(R)	$\Delta mmpL4b$ (R)
Pulmonar	Necrosis				
	Vasodilatación				
	Edema				
	Infiltrado mixto				
	UFC's día agudo (14 p.i)				
	UFC's día crónico (150 p.i)				
	Fibrosis				
	Pseudogranulomas				
Subcutánea	Característica	390S _(S)	$\Delta mmpL4$ <i>b</i> - <i>comp</i> _(S)	390R _(R)	$\Delta mmpL4b$ (R)
	Necrosis				
	Vasodilatación				
	Edema				
	Infiltrado mixto				
	UFC's días agudos				
	UFC's días crónicos				
	Fibrosis				
	Pseudogranulomas				
	Actividad 16Sr				
	mRNA de <i>mmpL4b</i>				
	Producción de TGF- β				
	Producción de IL-4				

Ausente	Leve	Moderado	Alto	No aplica
Ausente	Leve	Moderado	Alto	No aplica

Tabla 4 Resumen de resultados del experimento 2 de la infección pulmonar y subcutánea. En esta tabla de calor se representa con los colores descritos arriba la intensidad del fenómeno observado para cada una de las cepas.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Mycobacterium abscessus es un patógeno oportunista (Ortegon *et al.*, 1996) que comienza a destacar como un problema de salud pública a escala global ya que puede afectar severamente a pacientes con fibrosis quística, individuos inmunodeprimidos, e inclusive causar la muerte (Mougari *et al.*, 2016). En años recientes, con el incremento de los procedimientos estéticos invasivos, se ha observado que en individuos considerados clínicamente sanos este patógeno puede ser extremadamente difícil de eliminar, y que por ende compromete la calidad de vida del paciente (Crespo *et al.*, 1997; Nessar *et al.*, 2012).

A pesar de la relevancia de esta micobacteria, la bibliografía cuenta con pocos estudios que describan su proceso infeccioso desde las etapas agudas hasta las crónicas. Además, aunque se han usado distintos modelos de infección pulmonar, hasta el momento no existe ningún modelo que recree el desarrollo de la infección tras la inoculación subcutánea de *Mycobacterium abscessus*.

Este trabajo presenta un avance novedoso que, en conjunto con el trabajo anterior (2018) realizado por la misma autora, sienta una base descriptiva para que en el futuro se propongan estrategias terapéuticas más efectivas para controlar este tipo de infecciones en el tejido blando.

Esta investigación revela que la morfología de las colonias y, por ende, el contenido de GPLs en su membrana, juegan un papel importante la respuesta inmunohistopatológica del hospedero tanto en el modelo de infección pulmonar como en el subcutáneo. De acuerdo con los experimentos realizados en este trabajo con las cepas seleccionadas, a pesar de que tanto las cepas lisas como rugosas son reconocidas por el sistema inmune innato y adaptativo, los aislados rugosos (carentes de GPLs) provocan una respuesta inmune y un daño histológico más prominentes en comparación con las cepas lisas. Estos elementos van en concordancia a lo encontrado con diversos estudios como se describe detalladamente en el artículo de Bernut y colaboradores en 2017 donde describen los modelos celulares y animales con respecto a las infecciones con Mab, donde se muestra experimentalmente la virulencia de ambos morfotipos.

Por otro lado, es posible relacionar la presencia de GPLs con un efecto protector ya que disminuye los signos de inflamación en el tejido y presentan mucho menores signos de fibrosis en comparación con las cepas rugosas carentes de estos componentes. Además, la ausencia de estos glicopeptidolípidos sugiere que está directamente relacionada con la virulencia, hipótesis también propuesta por Medjahed *et al.*, (2009) y Medjahed y Reyrat (2009). Sin embargo más estudios

son necesarios para comprobar esta observación al igual que dilucidar las diferencias entre las cepas a nivel genético, metabólico y capacidad de movimiento, entre otras.

Conjuntamente se evidencia una preferencia o posible tropismo hacia un tipo de tejido, en particular con el tejido celular subcutáneo en este modelo de infección, ya que la inoculación de la misma cepa puede provocar en signos más agudos o más leves causados por la progresión de la infección de la enfermedad dependiendo de la localización de la infección; pese a que la cantidad de bacterias era similar tanto en pulmón como en los cojinetes plantares, el proceso inflamatorio durante la fase aguda es distinto en cada uno de los tejidos, al igual que lo observado en los trabajos de Byrd y Lyons (1999), Ordway *et al.*, (2008) y Caverly *et al.*, (2015) en modelos C57BL/6, GKO, BALB/c y SCID, con lo que podemos comprobar que las cepas tienen un efecto histopatológico diferencial dependiendo del lugar de establecimiento de la infección.

Por otro lado, Mab, es eficiente causando lesiones agudas en el tejido celular subcutáneo y generar fibrosis deformante, en este punto, varios casos clínicos indican que tras la inoculación, se produce un infiltrado proinflamatorio mixto compuesto de macrófagos y linfocitos, con presencia de abscesos supurativos, con edema y necrosis central, que en etapas avanzadas produce fibrosis con avistamiento de granulomas (Ortegon *et al.*, 1996; Del Solar *et al.*, 2005; Pereira de Sousa *et al.*, 2015), a pesar de que los granulomas causados por estas cepas no son frecuentes en las cepas que fueron utilizadas, se observa el mismo patrón de infección. En paralelo, se sabe que en el caso del uso de distintas especies del género *Mycobacterium*, la cepa sinérgica de ratones BALB/c es tolerante a la infección (Pando *et al.*, 2004); elemento respaldado por Odway y colaboradores así como con ratones C57BL/6 inoculados por vía intratraqueal, donde se genera infección persistente con presencia de inflamación hay inflamación perialveolar, lo que indica que éste modelo de infección pulmonar con distintas cepas de Mab puede generar infección con características similares a las observadas en otros modelos así como en humanos y además comprueba que puede desarrollar un proceso de infección aguda en un huésped sano. En conjunto, estos datos demuestran la capacidad de Mab de producir material fibroso deformante, suceso análogo a lo visto en humanos, por este motivo se confirma que este modelo de infección es adecuado para estudiar la patología subcutánea.

En relación a esta observación, se aprecia que a pesar de que Mab puede causar infecciones pulmonares en ratones BALB/c, éstas cepas utilizadas no suelen ser

tan invasivas ni provocar daños relevantes que pongan en juego la calidad de vida del huésped; en contraste, tras la infección subcutánea, existe una respuesta inflamatoria aguda seguida de una superproducción fibrótica, que aunque no es un peligro inminente, modifica la histología normal del tejido. Este dato es importante, ya que el tratamiento varía de acuerdo a la cepa utilizada, así como a los signos y características del huésped, sin embargo puede ir de 4-18 meses y a veces, una intervención quirúrgica puede ser necesaria para remover el tejido cicatricial excesivo, por lo que se elevan las probabilidades de reinfección, por ende el distinguir el proceso inflamatorio particular en el tejido es clave para proponer tratamientos más certeros que eliminen la infección y eviten que siga a la fase crónica.

El patrón que se observa en las unidades formadoras de colonias tanto en al pulmón como en los cojinetes plantares es muy similar, tras la infección hay leve crecimiento de la carga bacilar, para el día 14 p.i, disminuye evidentemente y continua la tendencia a la disminución hasta llegar a no ser cultivada o estar en los límites de detección del método. Éstos datos muestran una mayor avidez en reproducirse dentro del huésped gracias a un fallo en la respuesta del hospedero y/o capacidades de la micobacteria y va en concordancia a lo que se ha demostrado en diversos estudios, donde las cepas rugosas causan infecciones más severas como lo describen Byrd y Lions (1999), Roux *et al.*, (2016), Bernut *et al.*, (2017), entre otros antecedentes descritos en este trabajo. Con esto se demuestra que independientemente de la vía de inoculación, el sistema inmune innato, es capaz de reconocer a las bacterias y limitar su crecimiento a través del montaje de una respuesta inflamatoria conformada por macrófagos y linfocitos. Sin embargo, este sistema no es totalmente competente de controlar por sí mismo, por lo que es necesaria la activación de la respuesta inmune adaptativa, que tras el día 14 p.i ejerce un efecto inmediato que es reflejado en la abrupta disminución de la carga bacilar e incremento de la reclutación de infiltrado celular inflamatorio en el sitio de infección. Estos elemento se correlacionan con las observaciones realizadas en el modelo murino de infección pulmonar C57BL/6 en el día 14 (Jeon *et al.*, 2009; Caverly *et al.*, 2015), mientras que en la infección subcutánea a lo obtenido en la tesis de Bendaña (2018).

De las cepas utilizadas (ver tabla 3 y tabla 4), se observa que los aislados provenientes de Venezuela en general son más virulentos en comparación a los franceses, los primeros presentan en la fase aguda un infiltrado relevante con vasodilatación y edema, seguido en etapas crónicas de formación de pseudogranulomas en pulmones o producción extremadamente elevada de material fibrótico en cojinetes que deforma el tejido y modifica la organización del

tejido; mientras que las cepas de Francia se aprecian estos parámetros evidentemente reducidos. Esto puede deberse a que las condiciones de recolección manipulación y pases previos. Las cepas venezolanas fueron muestras frescas con pocos pases que fueron colectadas de pacientes con Mab y una muestra ambiental, mientras que las francesas han sido estudiadas por más tiempo por lo que no son muestras frescas y derivan de una cepa parental 390R_(R), proveniente de un asilado ileal de una mujer con enfermedad de Crohn, la cual implica una inflamación intestinal constante y pudiese haber influenciado cambios adaptativos en el fenotipo de una población de bacterias dentro del huésped y por consiguiente influido en la virulencia de la bacteria, por lo que pudiese estar atenuada esta respuesta. Esto es análogo a lo observado en las cepas de *Mtb H37Ra* y *H37Rv* (Bifani *et al.*, 2000).

En particular, la cepa más virulenta de acuerdo a los parámetros medidos corresponde a C6_(R) (ver tabla 3 y tabla 4), que fue capaz de provocar infecciones establecidas, tanto en el tejido pulmonar como el subcutáneo mientras que en la etapa crónica, fibrosis extensa el cojinete plantar que deforma el tejido original así como presencia de considerable infiltrado inflamatorio en comparación a otras cepas.

A diferencia del modelo pulmonar de Ordway *et al* 2008 en ratones C57BL/6 donde al día 30 pi se generaban lesiones granulomatosas compuestas por linfocitos y células esponjosas, y al 60 los granulomas presentaban fibrina central acompañada de linfocitos y células esponjosas mostrando neumonía leve; con las cepas utilizadas tanto de Venezuela C6_(R) y C4_(R) como las de Francia no se observa la construcción de granulomas, pero sí lesiones pseudogranulomatosas y parches muy leves de fibrosis, mientras que el resto de las cepas venezolanas muestran una resolución total de la infección, donde el tejido es prácticamente idéntico a un tejido sano. Con estos datos se observa una diferencia en la respuesta inmune del huésped en la fase tardía dependiendo del aislado. Este efecto se ha descrito para muchas otras especies dentro del género (López *et al.*, 2003; Whang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2019, Tientcheu *et al.*, 2017), lo que implica que es necesario hacer un estudio más a detalle de las diferencias entre las cepas encontradas y correlacionarlos con los tipos de lesiones que causan, origen, sus características inmunopatogénicas, entre otros elementos para así proponer tratamientos más certeros.

No obstante, en lo que respecta a las diferencias de UFCs entre los distintos morfotipos, algunas cepas no cumplen con este patrón y pueden mostrar mayor carga bacilar que algunas cepas rugosas, en consecuencia éste fenómeno indica

que además del contenido de GPLs en la membrana existen algunas diferencias intrínsecas en las cepas que favorecen la sobrevivencia de éstas dentro de los tejidos. Estos datos pueden evidenciar variabilidad intrínseca entre cepas S o R independientemente del contenido de GPL en su membrana que intervienen con la respuesta patógeno-hospedero, observación derivada de la variabilidad en la intensidad en la progresión de la enfermedad. De igual modo, es necesario identificar las diferencias entre estas cepas, ya que nos podrían dar indicio de factores de virulencia no descritos que podrían ayudar en un futuro en la elaboración de tratamientos.

En detalle, durante la etapa crónica de la enfermedad, se observa la carga bacilar disminuye progresivamente llegando al límite de detección del método o inclusive llegando a no ser cultivable en placas de agar, elementos análogos a lo visto a modelos de infección pulmonar por Ordway *et al* 2008; Bernut *et al*, 2014; Obregón *et al.*, 2015, donde al día 60 ya no había bacterias en la placa de agar; al igual que en el cojinete plantar observado en el antecedente directo de este trabajo Bendaña (2018). De manera particular, las cepas provenientes de Francia en el día 150 pi no producen bacterias cultivables tanto en pulmón como en el cojinete plantar, mientras que las cepas de Venezuela en el día 90 p.i C3_(S), C4_(R), C6_(R) y C10_(R) presentaron carga mínima en el tejido pulmonar, mientras que no hubo detección alguna de UFCs los cojinetes. Esta observación indica que el sistema inmune es capaz de controlar la replicación de esta bacteria en este modelo de infección,

Estos puntos indican que el sistema inmune adaptativo se mantiene activo por un largo periodo y controla eficientemente la carga bacteriana en el tejido pulmonar y subcutáneo en las primeras semanas de infección, sin embargo le es difícil eliminarla por completo en un lapso corto de tiempo, esto claramente implica la utilización de la evasión de la respuesta inmune de la bacteria que deben de ser estudiados en siguientes trabajos mucho más a detalle. Esta observación es homóloga lo encontrado en *M. tuberculosis*, la cual es una micobacteria capaz de causar infecciones pulmonares que pueden persistir por un tiempo indefinido en el huésped y puede generar lesiones granulomatosas con células epiteliales gigantes y en algunos casos necrosis caseosa (Medjahed *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2009).

Además, al encontrarse tanto en el pulmón como en el tejido celular subcutáneo granulomas y pseudogranulomas que por definición son sitios metabólicamente activos con células que constantemente son reclutadas y eliminadas con el objetivo de intentar eliminar al patógeno en el sitio y evitar el daño tisular (Abebe *et al.*, 2010), podría ser un indicio de la evasión de la apoptosis a través de la

producción de citocinas e inhibición de la vía de las caspasas , como lo que observó Whang *et al.*, 2017 en un modelo *in vitro*, lo cual puede ser un mecanismo de escape como se ha probado para *Mtb* y otros patógenos. Esta hipótesis requiere de más profundización y realización de pruebas específicas que evalúen el estado de las células en un modelo *in vivo*.

Tras esta observación, se seleccionaron a las cepas más representativas de cada modelo de infección en los días más tardíos de las cinéticas (C4_(R) y C6_(R) en pulmones; C6_(R), C7_(R), C10_(R) y C20_(R) en cojinetes; 390S_(S), 390R_(R), $\Delta mmpL4b-comp_{(S)}$ y $\Delta mmpL4b_{(R)}$), y tras la detección en todas las muestras del gen *16Sr* el cual es un indicador de actividad transcripcional y por tanto de la viabilidad de la bacteria (Bowsher *et al.*, 2019), se observó que existe la banda correspondiente al gen, por lo que se comprueba la viabilidad de éstas bacterias e indica la posibilidad de que las cepas pueden permanecer en un estado VBNC o dormante tanto en pulmones como en cojinetes plantares. La posibilidad de latencia o estado VBNC es un elemento que no se ha descrito antes para Mab en un modelo *in vivo*, sin embargo sí se ha descrito para otras micobacterias como *Mtb*, *M. avium* y *M. smegmatis* (Veatch y Kaushal, 2018; Kuznetsov *et al.*, 2004; Trutneva *et al.*, 2018; Markova, 2012; Cunningham y Spredbury, 1998; Smeulders *et al.*, 1999; Cunningham y Spredbury, 1998; Berube *et al.*, 2018; Dick *et al.*, 1998; Kaprelyants *et al.*, 2012), por lo que este hallazgo puede ser una base para realizar estudios sobre la posible latencia de Mab, donde será necesario estudiar sus cambios a nivel transcripcional, metabólico y fenotípico, así como los factores que propician el inicio de esta etapa, mantenimiento y reactivación, ya que estos elementos son importantes en el seguimiento de los pacientes y del tratamiento que se les suministra. Ésta observación es relevante ya que como algunas de sus parientes filogenéticos más cercanos puede causar infecciones en estado latente que tras determinados periodos puedan reactivarse tras un estímulo y comenzar una infección aguda como sucede en el caso de otras micobacterias como *Mtb*, *M. avium* o *M. smegmatis* (Kuznetsov *et al.*, 2004; Trutneva *et al.*, 2018; Veatch y Kaushal, 2018; Markova, 2012; Gerasimova *et al.*, 2011; Cunningham y Spredbury, 1998; Berube *et al.*, 2018; Dick *et al.*, 1998). Estas observaciones pueden tener un impacto significativo en el régimen de tratamiento y seguimiento de pacientes diagnosticados con Mab que tomaron tratamientos, ya que éste método de detección permite identificar bacteria transcripcionalmente activa aun cuando las pruebas de rutina del laboratorio y PCR-spiligotyping convencionales son negativas.

Otro dato importante que surge en este experimento corresponde a lo observado en las cepas provenientes de Francia en el modelo de infección subcutánea,

donde no se observan grandes diferencias entre las cepas 390R_(R) carentes de la manufactura de GPLs con 390S_(S) y $\Delta mmpL4b-comp$ _(S) productoras de GPLs. Para encontrar explicación de este fenómeno, se recurrió a la detección por PCR del gen *mmpL4b* que como se expuso en los antecedentes es un elemento del megacomplejo enzimático que cuando es transcrito produce y exporta los GPLs a la membrana provocando una morfología lisa. Se obtuvo que las cepas lisas en realidad tras la infección dejan de transcribir *mmpL4b*, por lo que se sugiere un cambio de fenotipo dentro del huésped, lo cual explica la similitud de reacción.

En adición, cabe destacar que al momento de hacer las UFCs del pulmón así como en cojinetes plantares en placas de 7H10, se observó que independientemente del fenotipo original, había un cambio en la morfología en algunas de las colonias, tanto de S a R como de R a S, creando cultivos heterogéneos o distintos al original; suceso que también se observó durante los experimentos de Jeon *et al.*, 2009; Caverly *et al.*, 2015; Medjahed *et al.*, 2009; reafirmando así la teoría del switch fenotípico dentro de las células del hospedero mediante algún proceso aún no descrito. Sin embargo podría haber la posibilidad de que haya un estado intermedio entre fenotipo liso y rugoso, cuya cantidad de GPLs sea distinta a la de la morfología de la cepa parental (S/R), lo cual tendría un efecto en la respuesta inmune del huésped; esto explicaría las similitudes en la carga bacilar, histología y producción de citocinas que se estudiaron en este proyecto, no obstante son necesarios más estudios para identificar los factores que inducen y modulan este cambio, así como del contenido de GPLs tras una infección *in vivo*.

Por otro lado, también se observa que la cepa $\Delta mmpL4b$ _(R) a pesar de presentar un fenotipo rugoso muestra disminuidos patrones de carga bacilar, inflamación y fibrosis en relación a las cepas rugosas y 390S_(S), esto muestra que la eliminación de este gen modifica la respuesta del hospedero, lo que puede significar que *mmpL4b* puede tener algún otro efecto no descrito adicional a la producción y/o exportación de GPLs, lo cual está relacionado también con la producción de fibrosis; esta derivación es apoyada por lo encontrado en Wells y colaboradores (2013) donde obtienen que éste gen, puede transportar otras moléculas aparte de lípidos y que puede influir en el grado de virulencia que presentan, lo que en efecto debe de estudiarse mucho más a detalle.

Durante todo este proyecto, se observa un índice de mortalidad bajo para ambos modelos de infección (menor del 3%) independientemente de su origen de procedencia, morfología; y por tanto, independiente del contenido de GPLs. En apoyo al modelo de infección y a los resultados descritos en el presente trabajo,

otros estudios experimentales en ratones C57BL/6 con un inóculo elevado, la mortalidad no rebasa el 2% (Ordway *et al.*, 2008; Caverly *et al.*, 2015). Esta observación va en concordancia a los parámetros epidemiológicos encontrados para en pacientes sanos, por lo que se concuerda que Mab suele ser un patógeno que no causa una elevada tasa de mortalidad independientemente de su morfotipo (Ortegon *et al.*, 1996).

Al mismo tiempo el análisis de citocinas en los días tardíos de la infección muestra que de todas las citocinas analizadas, únicamente IL-4 y TGF- β fueron detectadas. Esto puede ser explicado debido al tamaño de la muestra y al tipo de procesamiento. Sería recomendable el uso de un método alternativo para la cuantificación y comparar la respuesta durante la fase crónica y aguda para tener una visión más completa. En divergencia, varias de las citocinas que no fueron detectadas por los métodos presentados, corresponden a la fase aguda de la infección donde la respuesta Th₂ es la que rige el momento, por ende el no encontrar citocinas de la respuesta Th₁ tiene lógica y corresponde a lo observado con otros modelos con bacterias filogenéticamente cercanas. En el caso de *Mtb*, cuando es detectado, se activa la respuesta Th₁ durante la fase aguda, donde se estimula la producción de IFN- γ , IL-12 y TNF- α (Fátima *et al.*, 2015; Flynn., 2003; Ashenafi *et al.*, 2014). No obstante, es importante continuar con éste estudio a lo largo de la cinética para evaluar más a detalle el progreso de la respuesta humoral.

Como se sabe IL-4 es una citocina pleotrópica producida principalmente por linfocitos T CD4+, basófilos, NK's y mastocitos en respuesta a la activación del receptor suprime la producción de IFN- γ modifica la producción de IgE e IgG teniendo un papel importante en el desarrollo de alergias (Nelms *et al.*, 1999) y control de la tuberculosis (Flynn, 2003); también se ha visto que la expresión de esta citocina induce la diferenciación de linfocitos T a un fenotipo TH₂ (anti inflamatorio), provocando una respuesta mayormente humoral que promueve la reparación del tejido dañado. Este suceso provoca a su vez, la producción de TGF- β , estimulando así a fibroblastos, cuya función básica es liberar fibras de colágeno y restaurar el tejido. Igualmente se ha visto que TGF- β ha está implicada en la supresión de la respuesta de las células T en pacientes con *Mtb*, es producida por monocitos tras la estimulación y participa al igual que IL-4 en la desactivación de macrófagos, inhibiendo así la producción de citocinas de la respuesta Th₁ como IFN- γ y NOS₂ (Flynn, 2003; Flynn, 2004; Pooran., 2019;)

La cuantificación de transcripción de estas citocinas en la infección pulmonar no es del todo concluyente y requiere de un análisis más profundo. Sin embargo, se

rescata que en la fase tardía de la infección por la C4_(R) (que presentó más granulomas en el día 90 pi), en comparación con la C6_(R)- se detectó mayor transcripción de *IL-4*. En perspectiva, la producción de *IL-4* pero no de TGF- β , sugiere un balance de tipo antiinflamatorio de tipo TH₂ en el pulmón, lo que explica porque no vemos una respuesta fibrótica excesiva ni infiltrado celular proinflamatorio, como en el cojinete plantar. En concordancia la elevada producción de *IL-4*, es análogo a lo que ocurre con *Mtb*, donde la respuesta inmune local en humanos es asociada a un desbalance de la respuesta Th₁/Th₁₇/Th₂ y elevada producción de *IL-4* (Hernández *et al.*, 2004), elementos que están relacionados con el fallo del control inmune en los pacientes con enfermedad pulmonar progresiva (Ashenafi *et al.*, 2014). Por otra parte algunas cepas de *Mtb* en la fase crónica consideradas MDR, bajan la expresión de IFN- γ , *IL-12* y fomentan la de *IL-4*, *IL-6* y/o TNF- α (Ashenafi *et al.*, 2014), y ya que Mab es considerada MDR podría explicar por qué no se detectaron éstas citocinas.

En particular, la infección subcutánea con las cepas de venezolanas, no se encontró la producción de TGF- β a pesar de presentar una fibrosis realmente visible, éste fenómeno puede ser explicado por los tiempos elegidos para la cinética, probablemente en un tiempo más temprano de la infección se produce más *IL-4* y TGF- β y al establecerse la fibrosis, con el paso del tiempo se disminuye la transcripción para éstas citocinas; , lo cual podría originar la súper activación de estas células causando así fibrosis deformante como se pudo observar en la histología; por ende es necesario estudiar en el futuro la expresión de citocinas en distintos puntos de la cinética y agregar días intermedios y más tardíos para estudiar. En contraste, la infección con las cepas francesas si fue posible encontrar rasgos de la transcripción de estas citocinas, sin embargo sus niveles de transcripción no son tan excesivos, éste suceso genera la suposición de que tarda más tiempo en producirse fibrosis, observación que probablemente indique que la infección dura más tiempo en el huésped, sin embargo son necesarios más estudios usando distintos métodos de detección de citocinas al igual que aumentar el tiempo de la cinética y evaluar si las áreas fibróticas aumentan, se mantienen constantes o se reducen, esto es clave ya que el entender el patrón de citocinas es crucial para evitar signos agudos de inflamación y de reparación del tejido que llevan a la producción de áreas fibróticas deformantes.

Durante la infección crónica, al encontrar una elevada transcripción de *IL-4* en conjunto con IFN- γ abajo es asociada con la respuesta activa de la tuberculosis (Ashenafi *et al.*, 2014; Abebe *et al.*, 2010; Pooran., 2019; Hernández *et al.*, 2004), lo cual brinda otra evidencia que la bacteria no es eliminada por el huésped de forma eficiente y favorece el cambio a Th₂. En concordancia, varios estudios

muestran que las células Th₂ secretan IL-4 que inhibe la respuesta Th₁ y favorece el cambio a Th₂, lo que inactiva la respuesta de los macrófagos (Fátima *et al.*, 2015; Abebe *et al.*, 2010), esto puede verse reflejado en la baja infiltración de macrófagos en los días más tardíos de la infección. A más de en *Mtb* se sugiere que los niveles elevados de IL-4, suelen promover el daño en el tejido en lugar de tener un efecto protector (Abebe *et al.*, 2010), entonces tanto la inhibición de IFN- γ como de otras citocinas de la fase Th₁ puede ser uno de los mecanismos por los que la bacteria, tal como lo hace *Mtb* (Hernández *et al.*, 2004), puede evitar ser eliminada por el sistema inmune y promueva un daño tisular.

Con respecto a los datos encontrados del análisis de citocinas, no es posible realizar una correlación del patrón de citocinas con la presencia o ausencia de GPLs; no obstante, hay evidencia que indica que en modelos *in vitro* las cepas rugosas pueden inducir mayor producción de IL-8 por la vía del TLR-2 en comparación con las cepas lisas que exponen estos glicolipopéptidos (Davidson *et al.*, 2011). Asimismo, TNF- α e IL-10 se produjo en cantidades significativamente reducidas por los monocitos estimulados con aislados de *M. abscessus* rugosos en comparación con los lisos; mientras que de forma contraria las cepas rugosas indujeron la expresión de citocinas pro inflamatorias IL-1 β (Jönsson *et al.*, 2012). Sin embargo es necesario realizar un perfil más completo sobre la relación de los GPLs con la producción de citocinas durante distintos puntos de la cinética.

Por último, los resultados encontrados durante este trabajo sientan una base firme para estudiar infecciones subcutáneas y pulmonares provocadas por distintas cepas de Mab, donde podemos entender más sobre el proceso infeccioso desde etapas tempranas hasta crónicas y proponer nuevas hipótesis como es el caso del estado de dormancia. No obstante, se requiere de muchos más experimentos para hacer afirmaciones concluyentes, éste es un campo de investigación joven que tiene muchísimas derivaciones que son sumamente interesantes para estudiar.

10. REFERENCIAS

1. Abebe, M., Kim, L., Rook, G., Aseffa, A., Wassie, L., Zewdie, M., Zumla, A., Engers, H., Andersen, P. and Doherty, T., (2011). Modulation of cell death by M. tuberculosis as a strategy for pathogen survival. *Clinical and Developmental Immunology*, pp.1-11.
2. Ashenafi, S., Aderaye, G., Bekele, A., Zewdie, M., Aseffa, G., Hoang, A., Carow, B., Habtamu, M., Wijkander, M., Rottenberg, M., Aseffa, A., Andersson, J., Svensson, M. and Brighenti, S., (2014). Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3. *Clinical Immunology*, 151(2), pp.84-99.
3. Bendaña Piñeiro, A., (2018). Evaluación de la delección del gen *mmpL4b* de *Mycobacterium abscessus* en cojinetes plantares. Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Bernut, A., Herrmann, J., Kissa, K., Dubremetz, J., Gaillard, J., Lutfalla, G. & Kremer, L. (2014). *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10), pp.E943-E952.
5. Bernut, A., Nguyen-Chi, M., Halloum, I., Herrmann, J., Lutfalla, G. & Kremer, L. (2016). *Mycobacterium abscessus*-induced granuloma formation is strictly dependent on TNF signaling and neutrophil trafficking. *PLOS Pathogens*, 12(11), p.e1005986.
6. Berube, B., Castro, L., Russell, D., Ovechkina, Y. & Parish, T., (2018). Novel screen to assess bactericidal activity of compounds against non-replicating *Mycobacterium abscessus*. *Frontiers in Microbiology*, 9.
7. Bifani, P., Moghazeh, S., Shopsin, B., Driscoll, J., Ravikovitch, A. and Kreiswirth, B., (2000). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), pp.3200-3204.
8. Bowsher, A., Kearns, P. and Shade, A., (2019). 16S rRNA/rRNA gene ratios & cell activity staining reveal consistent patterns of microbial activity in plant-associated soil. *mSystems*, 4(2).
9. Briffotiaux, J., Huang, W., Wang, X. & Gicquel, B., (2017). MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in *Mycobacterium* species. *Tuberculosis*, 107, pp.13-19.
10. Byrd, T. & Lyons, C. (1999). Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infection and Immunity*, 67(9), pp.4700-4707.
11. Cadena, A., Fortune, S. and Flynn, J., (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 17(11), pp.691-702.
12. Caverly, L., Caceres, S., Fratelli, C., Happoldt, C., Kidwell, K., Malcolm, K., Nick, J. & Nichols, D. (2015). *Mycobacterium abscessus* morphotype comparison in a murine model. *PLOS ONE*, 10(2), p.e0117657.
13. Chalut, C. (2016). MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis*, 100, pp.32-45.

14. Crespo O.M.P., Corral P.R. & 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.
15. Cullen, A., Cannon, C., Mark, E. & Colin, A., (2000). *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(2), pp.641-645.
16. Cunningham, A. & Spreadbury, C., (1998). Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog. *Journal of Bacteriology*, 180(4), pp.801-808.
17. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. (n.d.). Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, Second Edition, pp.33-72.
18. Daffé, M. & Draper, P., (1997). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology*, pp.131-203.
19. Davidson, L., Nessar, R., Kempaiah, P., Perkins, D. and Byrd, T., (2011). *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by H β D2 gene expression and IL-8 release. *PLoS ONE*, 6(12), p.e29148.
20. Del Solar M., Salomón M., Bravo F., Seas C., Gotuzzo E., Culqui D., Bolarte J. & 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.
21. Deshayes, C., Bach, H., Euphrasie, D., Attarian, R., Coureuil, M., Sougakoff, W., Laval, F., Av-Gay, Y., Daffé, M., Etienne, G. & Reyrat, J. (2010). MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*, 78(4), pp.989-1003.
22. Dick, T. (1998). Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), pp.159-164.
23. Dick, T., Lee, B. & Murugasu-Oei, B., (1998). Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), pp.159-164.
24. Domingo-Gonzalez, R., Prince, O., Cooper, A. and Khader, S., (2016). Cytokines & Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Microbiology Spectrum*, 4(5).
25. 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.
26. Falkinham, J., (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), pp.177-215.
27. Fatima, N., Shameem, M., Nabeela and Khan, H., (2015). Changes in serum levels of TNF- α & IL-4 among new, under-treatment & MDR TB patients. *British Microbiology Research Journal*, 7(4), pp.159-166.
28. Fennelly, K., Ojano-Dirain, C., Yang, Q., Liu, L., Lu, L., Progulske-Fox, A., Wang, G., Antonelli, P. & Schultz, G. (2016). Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a lung cavity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(6), pp.692-693.

29. Flynn, J. and Chan, J., (2001). Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 19(1), pp.93-129.
30. Flynn, J., (2004). Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis*, 84(1-2), pp.93-101.
31. Franco-Paredes, C., Chastain, D., Allen, L. & Henao-Martínez, A., (2018). Overview of cutaneous mycobacterial infections. *Current Tropical Medicine Reports*, 5(4), pp.228-232.
32. Gerasimova, A., Kazakov, A., Arkin, A., Dubchak, I. & Gelfand, M., (2011). Comparative genomics of the dormancy regulons in mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 193(14), pp.3446-3452.
33. Greendyke R. & 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.
34. Griffith, D., Philley, J., Brown-Elliott, B., Benwill, J., Shepherd, S., York, D. & Wallace, R. (2015). The significance of *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* isolation during *Mycobacterium avium* complex lung disease therapy. *Chest*, 147(5), pp.1369-1375.
35. Gutiérrez, A., Viljoen, A., Ghigo, E., Herrmann, J. and Kremer, L., (2018). Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* Complex. *Frontiers in Microbiology*, 9.
36. Hall S.L. & 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.
37. Hernández Pando, R., Orozco E, H., Aguilar L, D., López Casillas, F. & Rook, G., (2004). Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico XXVIII*.
38. Hernandez-Pando, R., Aguilar, D., Hernandez, M., Orozco, H. and Rook, G., (2004). Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF- α and in the regulation of fibrosis. *European Journal of Immunology*, 34(1), pp.174-183.
39. Hernández-Pando, R., Orozco, H. E., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Madrid-Marina, V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26–33
40. Hett F.C y Rubin E.J, (2008). Bacterial Growth & Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 72. No.1. pp 126-156.
41. Hoefsloot, W., van Ingen, J., Andrejak, C., Ängeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Beylis, N., Boeree, M., Cacho, J., Chihota, V., Chimara, E., Churchyard, G., Cias, R., Daza, R., Daley, C., Dekhuijzen, P., Domingo, D., Drobniewski, F., Esteban, J., Fauville-Dufaux, M., Folkvarsdén, D., Gibbons, N., Gómez-Mampaso, E., Gonzalez, R., Hoffmann, H., Hsueh, P., Indra, A., Jagielski, T., Jamieson, F., Jankovic, M., Jong, E., Keane, J., Koh, W., Lange, B., Leao, S., Macedo, R., Mannsåker, T., Marras, T., Maugein, J., Milburn, H., Mlinkó, T., Morcillo, N.,

- Morimoto, K., Papaventsis, D., Palenque, E., Paez-Peña, M., Piersimoni, C., Polanová, M., Rastogi, N., Richter, E., Ruiz-Serrano, M., Silva, A., da Silva, M., Simsek, H., van Soolingen, D., Szabó, N., Thomson, R., Tórtola Fernandez, T., Tortoli, E., Totten, S., Tyrrell, G., Vasankari, T., Villar, M., Walkiewicz, R., Winthrop, K. & Wagner, D. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*, 42(6), pp.1604-1613.
42. Howard, S. (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*, 152(6), pp.1581-1590.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Jönsson, B., Ridell, M. and Wold, A., (2012). Phagocytosis and cytokine response to rough and smooth colony variants of *Mycobacterium abscessus* by human peripheral blood mononuclear cells. *APMIS*, 121(1), pp.45-55.
 46. Jörgensen, T., Martin, E. & Burt, A. (2015). Spatial variability in habitat structure and heterogenic coral reef fish assemblages inside a small-scale marine reserve after a coral mass mortality event. *Ocean & Coastal Management*, 114, pp.32-41.
 47. Kaprelyants, A., Gottschal, J. & Kell, D. (1993). Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 104(3-4), pp.271-286.
 48. Keep, N., Ward, J., Cohen-Gonsaud, M. & Henderson, B., (2006). Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends in Microbiology*, 14(6), pp.271-276.
 49. Koh, W., Stout, J. & Yew, W., (2020). Advances in the management of pulmonary disease due to *Mycobacterium abscessus* complex. Perspectives.
 50. Kudykina, Y., Shleeva, M., Artsabanov, V., Suzina, N. & Kaprelyants, A., (2011). Generation of dormant forms by *Mycobacterium smegmatis* in the poststationary phase during gradual acidification of the medium. *Microbiology*, 80(5), pp.638-649.
 51. Kuznetsov, B., Davydova, M., Shleeva, M., Shleev, S., Kaprelyants, A. & Yaropolov, A., (2004). Electrochemical investigation of the dynamics of *Mycobacterium smegmatis* cells' transformation to dormant, nonculturable form. *Bioelectrochemistry*, 64(2), pp.125-131.
 52. Le Dantec, C., Duguet, J., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. & Vincent, V. (2002). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp.5318-5325.
 53. Llorens-Fons, M., Pérez-Trujillo, M., Julián, E., Brambilla, C., Alcaide, F., Byrd, T. & 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. *Frontiers in Microbiology*, 8.
54. López, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., Barrera, L., Kremer, K., Hernandez-Pando, R., Huygen, K. And Van Soolingen, D., (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical & Experimental Immunology*, 133(1), pp.30-37.
 55. Malcolm, K., Nichols, E., Caceres, S., Kret, J., Martiniano, S., Sagel, S., Chan, E., Caverly, L., Solomon, G., Reynolds, P., Bratton, D., Taylor-Cousar, J., Nichols, D., Saavedra, M. & Nick, J. (2013). *Mycobacterium abscessus* induces a limited pattern of neutrophil activation that promotes pathogen survival. *PLoS ONE*, 8(2), p.e57402.
 56. Markova, N., (2012). Cell wall deficiency in mycobacteria: latency and persistence. Understanding tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli, *IntechOpen*, Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Bulgaria.
 57. Medjahed H. & 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. Medjahed
 58. Meng-Rui, L., Wang-Huei, S., Chien-Ching, H., Chong-Jen, Y., Li-Na, L. & Po-Ren, H. (2015). *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. *Emerging Infectious Disease*, 21(9), pp.1638-1646.
 59. Mougari, F., Guglielmetti, L., Raskine, L., Sermet-Gaudelus, I., Veziris, N. and Cambau, E., (2016). Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 14(12), pp.1139-1154.
 60. Mukherjee, R. & Chatterji, D. (2012). Glycopeptidolipids: Immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope. *IUBMB Life*, 64(3), pp.215-225.
 61. Nelms, K., Keegan, A., Zamorano, J., Ryan, J. and Paul, W., (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual Review of Immunology*, 17(1), pp.701-738.
 62. Nessar, R., Reyrat, J., Davidson, L. & Byrd, T. (2011). 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. *Microbiology*, 157(4), pp.1187-1195.
 63. Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., Bai, X., Basaraba, R., Orme, I. & Chan, E. (2008). Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(6), pp.1502-1511.
 64. Ortégón 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.
 65. Pawlik, A., Garnier, G., Orgeur, M., Tong, P., Lohan, A., Le Chevalier, F., Sapriel, G., Roux, A., Conlon, K., Honoré, N., Dillies, M., Ma, L., Bouchier, C., Coppée, J.,

- Gaillard, J., Gordon, S., Loftus, B., Brosch, R. & Herrmann, J. (2013). Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium abscessus*. *Molecular Microbiology*, 90(3), pp.612-629.
66. Pereira S.P., Mendes S.A.P., Silva C.R.C. & Westphal D.C, (2015). *Mycobacterium abscessus* skin infection after tattooing. *Brazilian Society of Dermatology*. Vol. 90. No. 5. pp 741–743.
67. Pooran, A., Davids, M., Nel, A., Shoko, A., Blackburn, J. and Dheda, K., (2019). IL-4 subverts mycobacterial containment in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *European Respiratory Journal*, 54(2), p.1802242.
68. 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.
69. Rhoades, E., Archambault, A., Greendyke, R., Hsu, F., Streeter, C. & Byrd, T. (2009). *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF- by preventing interaction with TLR2. *The Journal of Immunology*, 183(3), pp.1997-2007.
70. Ripoll, F., Deshayes, C., Pasek, S., Laval, F., Beretti, J., Biet, F., Risler, J., Daffé, M., Etienne, G., Gaillard, J. & Reyrat, J. (2007). Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genomics*, 8(1), p.114.
71. Rook, G. and Hernandez-Pando, R., (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), pp.259-284.
72. Roux, A., Ray, A., Pawlik, A., Medjahed, H., Etienne, G., Rottman, M., Catherinot, E., Coppée, J., Chaoui, K., Monsarrat, B., Toubert, A., Daffé, M., Puzo, G., Gaillard, J., Brosch, R., Dulphy, N., Nigou, J. & Herrmann, J. (2011). Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cellular Microbiology*, 13(5), pp.692-704.
73. Roux, A., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., Deramautd, T., Rottman, M., Gaillard, J., Majlessi, L., Brosch, R., Girard-Misguich, F., Vergne, I., de Chastellier, C., Kremer, L. & Herrmann, J. (2016). The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biology*, 6(11), p.160185.
74. Ruggiero, A., Squeglia, F., Romano, M., Vitagliano, L., De Simone, A. & Berisio, R., (2016). Structure and dynamics of the multi-domain resuscitation promoting factor RpfB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(6), pp.1322-1330.
75. Saviola, B. & Bishai, W. (2006). The Genus *Mycobacterium*--Medical. *The Prokaryotes*, pp.919-933.
76. Schorey, J. & Sweet, L. (2008). The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*, 18(11), pp.832-841.

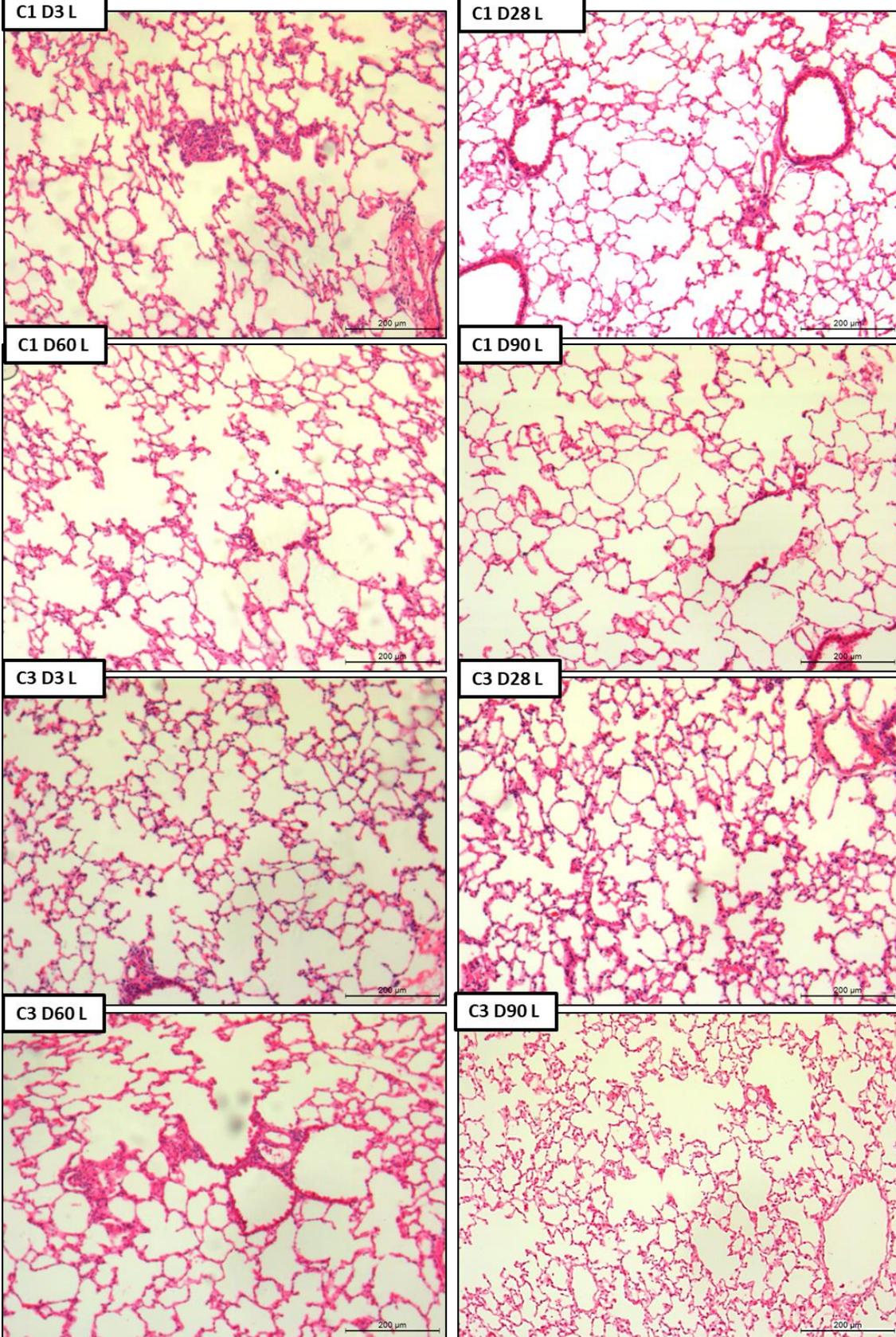
77. Smeulders, M., Keer, J., Speight, R. & Williams, H., (1999). Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 181(1), pp.270-283.
78. Székely, R. & Cole, S. (2016). Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function. *Molecular Microbiology*, 99(5), pp.831-834.
79. Tientcheu, L., Koch, A., Ndengane, M., Andoseh, G., Kampmann, B. and Wilkinson, R., (2017). Immunological consequences of strain variation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *European Journal of Immunology*, 47(3), pp.432-445.
80. Valdés F. & Cid A, (2004). Micobacterias atípicas. *Academia Española de Dermatología y Venerología*. Vol. 95 Núm.6. pp 331-357.
81. Veatch, A. & Kaushal, D., (2018). Opening Pandora's Box: Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation. *Trends in Microbiology*, 26(2), pp.145-157.
82. Verma, T., Podder, S., Mehta, M., Singh, S., Singh, A., Umapathy, S. and Nandi, D., (2019). Raman spectroscopy reveals distinct differences between two closely related bacterial strains, *Mycobacterium indicus pranii* and *Mycobacterium intracellulare*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(30), pp.7997-8009.
83. Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J. & Kremer, L. (2017). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. *Molecular Microbiology*, 104(6), pp.889-904.
84. Wang, C., Peyron, P., Mestre, O., Kaplan, G., van Soolingen, D., Gao, Q., Gicquel, B. and Neyrolles, O., (2010). Innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and other genotypes. *PLoS ONE*, 5(10), p.e13594.
85. Wells, R., Jones, C., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K., Sun, P., Wu, F., Tian, C. and Niederweis, M., (2013). Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 9(1), p.e1003120.
86. Whang, J., Back, Y., Lee, K., Fujiwara, N., Paik, S., Choi, C., Park, J. & Kim, H. (2017). *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death and Disease*, 8(8), p.e3012.
87. 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.
88. Wright, G. D. (2010). The antibiotic resistome. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(8), 779–788.
89. Wu, B., Huang, C., Garcia, L., de Leon, A., Osornio, J., Bobadilla-del-Valle, M., Ferreira, L., Canizales, S., Small, P., Kato-Maeda, M., Krensky, A. and Clayberger, C., (2007). Unique gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin. *Infection and Immunity*, 75(7), pp.3658-3664.

90. Yokoyama, T., Omotehara, T., Hirano, T., Kubota, N., Yanai, S., Hasegawa, C., Takada, T., Mantani, Y. & Hoshi, N. (2018). Identification of reference genes for quantitative PCR analyses in developing mouse gonads. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(10), pp.1534-1539.
91. Zhu, K., Kaprelyants, A., Salina, E. & Markx, G. (2019). Separation by dielectrophoresis of dormant and non dormant bacterial cells of *Mycobacterium smegmatis*. *Biomicrofluidics*, 4(2), p.022809.

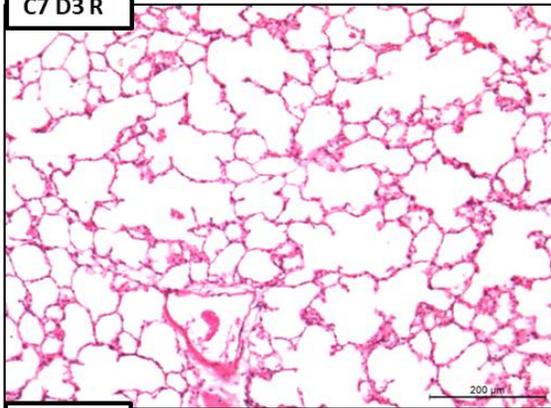
Anexo 1: Secuencias de primers utilizados

Gen	Secuencias	
<i>mmpL4b</i>	F	TGT CCG AGT TCG ACT CGT TG
	R	GAT GAA ACG GTC GGT ATC GCT
<i>TNF-α</i>	F	TCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC
	R	TTG AGA TCC ATG CCG TTG G
<i>IFN-γ</i>	F	GGT GAC ATC AAA ATC CTG CAG
	R	CCT CAA ACT TGG CAA TAC TCA TGA
<i>IL-10</i>	F	AGC ATT TGA ATT CCC TGG GTG
	R	TGC TCC ACT GCC TTG CTC TTA
<i>IL-1</i>	F	GCC ACC TTT TGA CAG TGA TGA G
	R	GAC AGC CCA GGT CAA AGG TT
<i>IL-4</i>	F	GCA GCT TAT CGA TGA ATC CAG G
	R	CGT CCT CAC AGC AAC AAC GGA GA
<i>IL-13</i>	F	CAA GGC CCC CAC TAC GGT
	R	CGT GGC GAA ACA GTI GCT TT
<i>TGF-β</i>	F	ACG CCA AAG AAG TCA CCC G
	R	AGA TTG CGT GTT GCG GTC
<i>RPLP0</i>	F	CTCTCGCTTTCTGGAGGGTG
	R	ACGCGCTTGTACCCATTGAT
<i>16Sr Mab</i>	F	GGA CCA CAC ACT TCA TGG TG
	R	GAG TCT GGG CCG TAT CTC AG
<i>Random P</i>	Promega MADISON WI USA 608-274-4330 C118A 19225304	
<i>GAPDH</i>	F	CAT TGT GGA AGG GCT CAT GA
	R	GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC

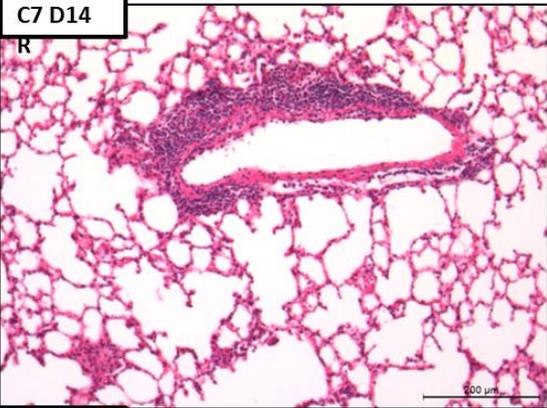
Anexo 2: Histología de pulmones-Experimento Venezuela



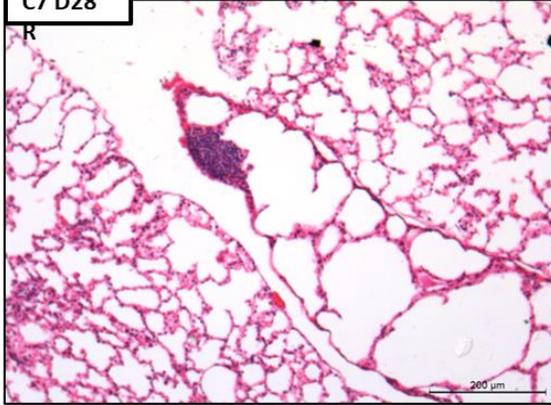
C7 D3 R



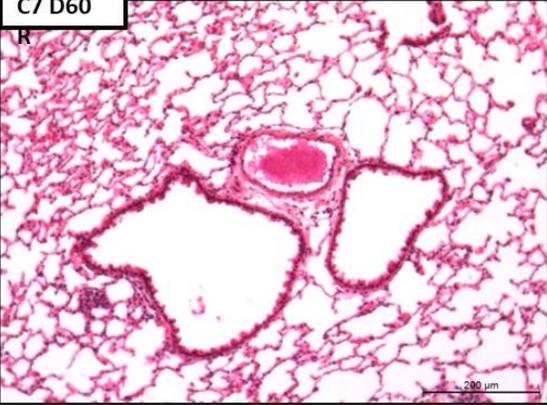
C7 D14 R



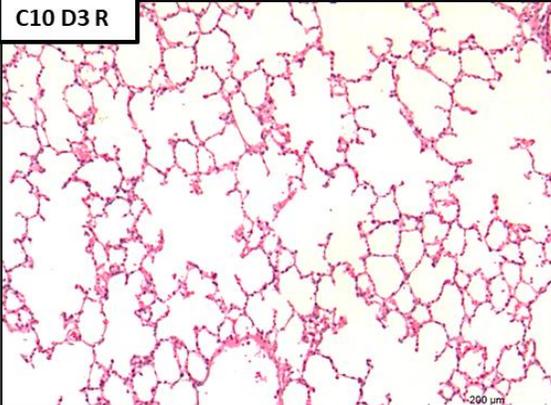
C7 D28 R



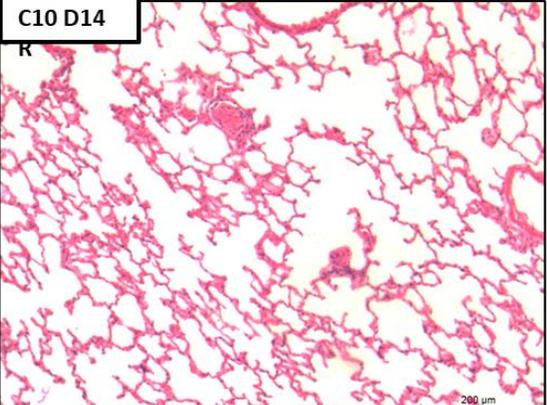
C7 D60 R



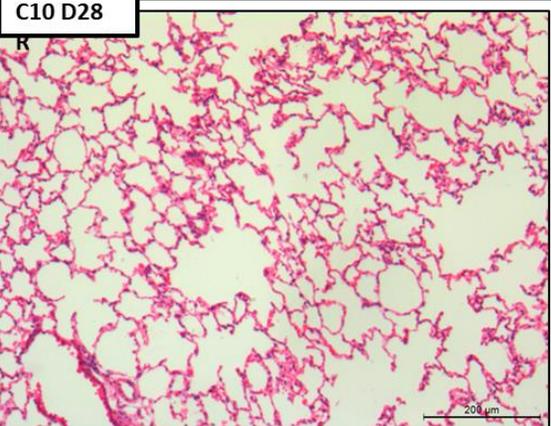
C10 D3 R



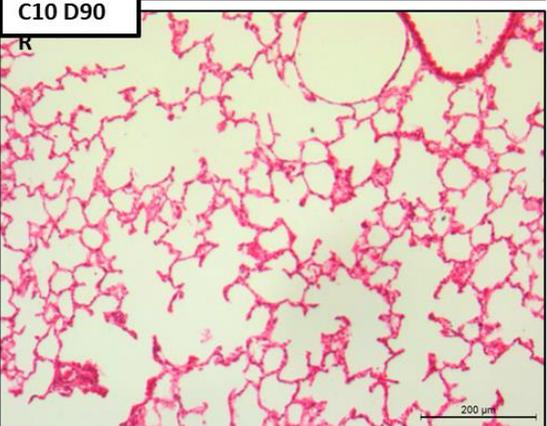
C10 D14 R

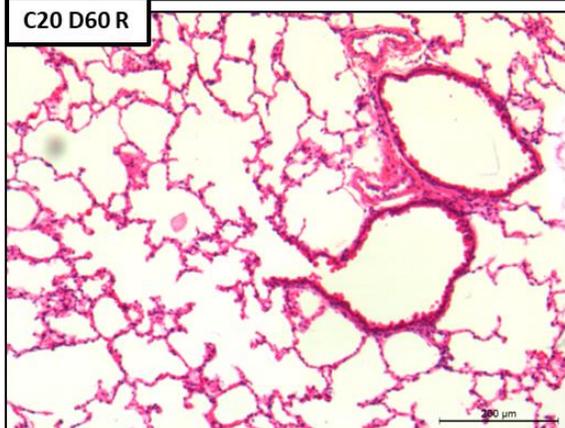
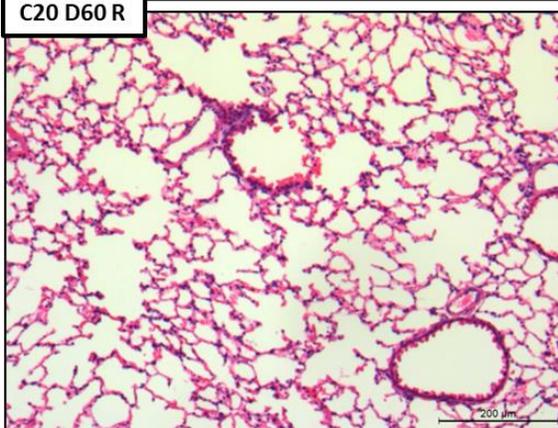
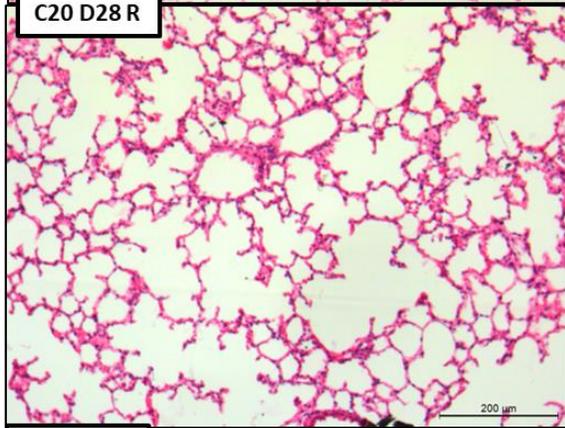
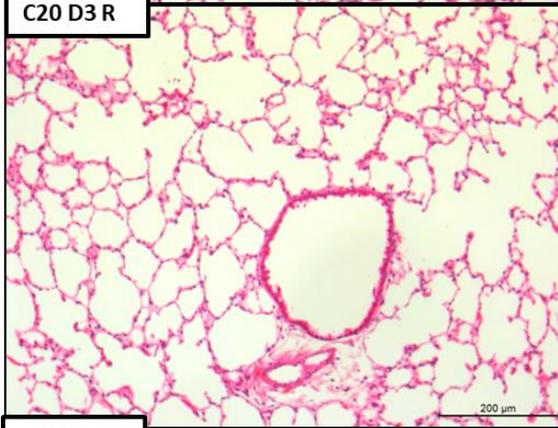
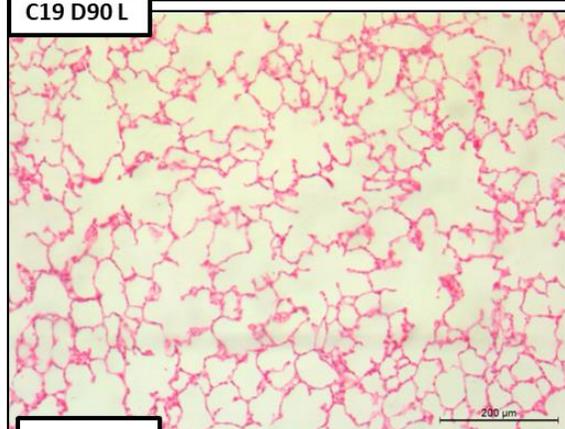
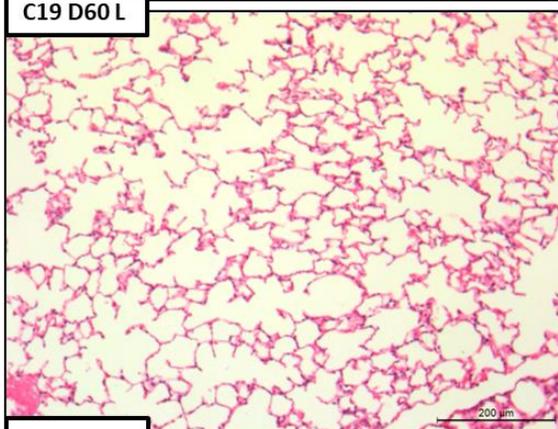
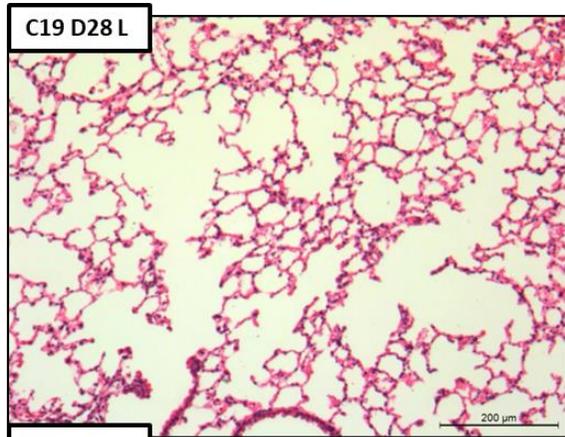
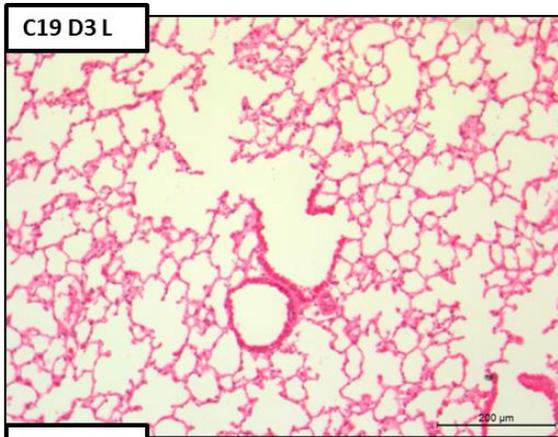


C10 D28 R



C10 D90 R





Anexo 3: Histología de cojinetes plantares D90-Experimento Venezuela



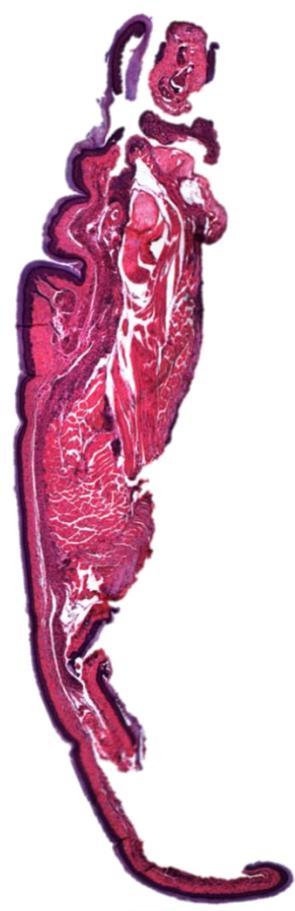
C1 D90 S



C3 D90 S



C4 D90 R



C19 D90 R

Anexo 4: Stiches respesentativos de fibrosis e inflamación en cojinetes plantares.



C6 D60 R



C7 D90 R



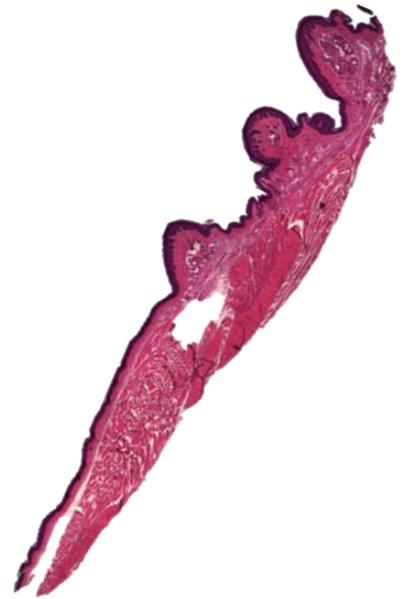
C20 D28



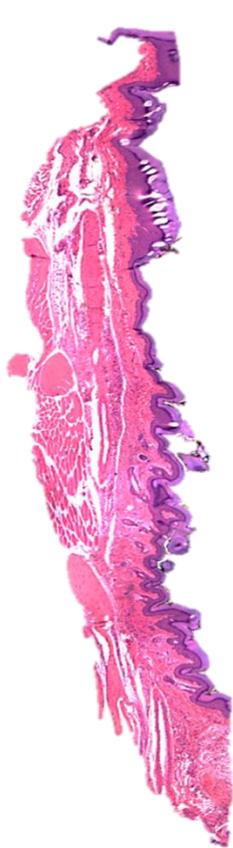
C10 D28



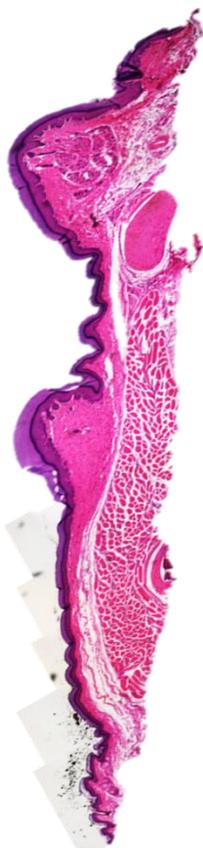
C20 D90



SS D90



390S D150



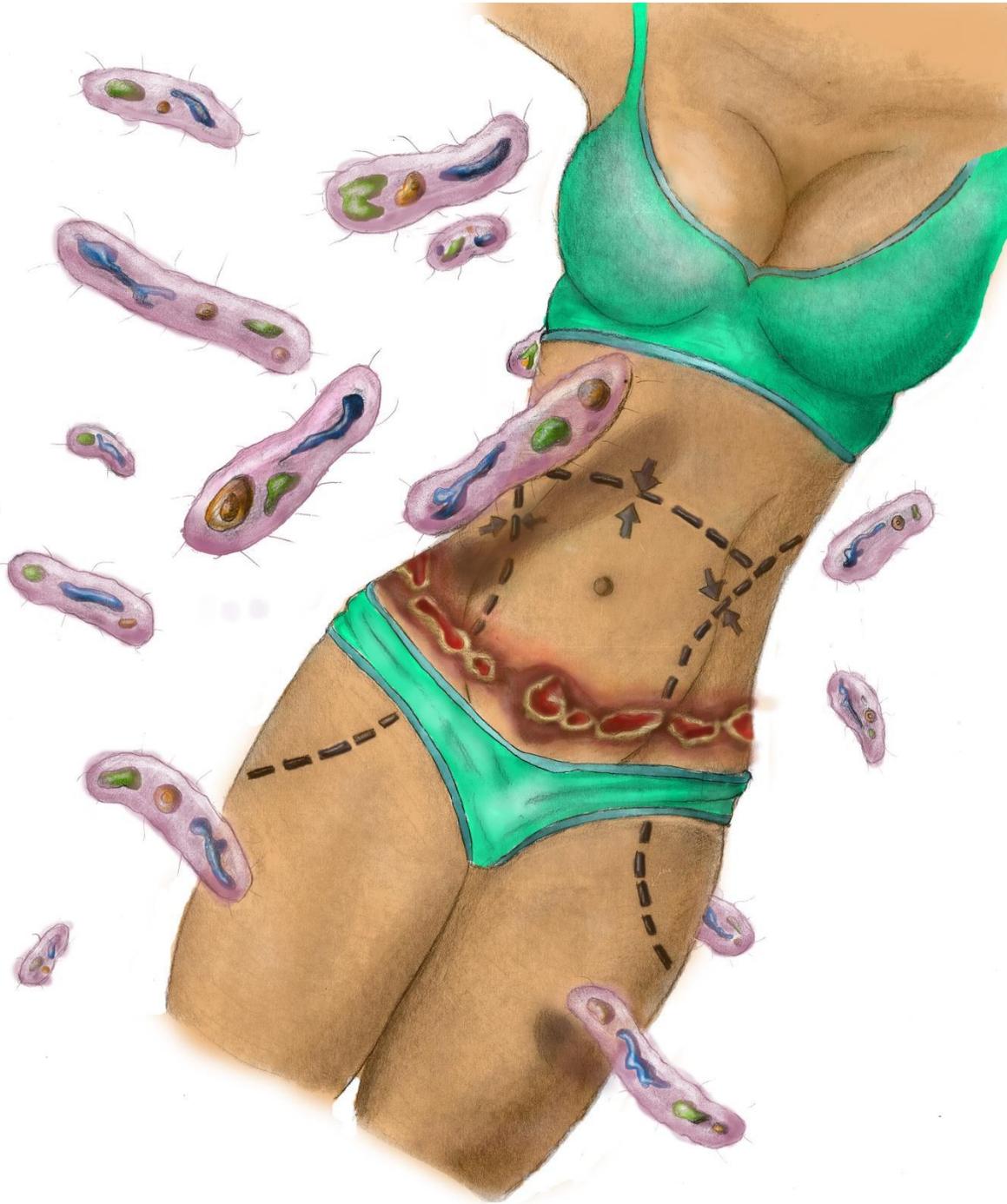
$\Delta mmpL4b$ -comp (s) D150



390R D150



$\Delta mmpL4b$ (R) D150



#Open science, science for all

El conocimiento científico le pertenece a la comunidad –Elbakyan

Luna