



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE LA SOBREVIVENCIA DE MORFOTIPOS DE
Mycobacterium abscessus Y *Mycobacterium fortuitum*
EN CÉLULAS NO FAGOCÍTICAS**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

P R E S E N T A
AGUILAR HERNÁNDEZ NAYELI

BAJO LA DIRECCIÓN DE
Dra. JULIETA LUNA HERRERA



MÉXICO D.F.

Octubre 2016

Este trabajo se realizó en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio de Inmunquímica II perteneciente al Departamento de Inmunología, bajo la dirección de la Dra. Julieta Luna Herrera. Este trabajo contó con financiamiento de los proyectos SIP20144218 y CONACYT CB-180401. El autor agradece al Centro de Nanociencias Micro y Nanotecnologías del IPN por la obtención de las imágenes de AFM de las micobacterias estudiadas en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN	vii
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Género <i>Mycobacterium</i>	1
1.2 Micobacterias no tuberculosas (MNT)	3
1.2.1 MNT crecimiento lento	4
1.2.2 MNT de rápido crecimiento	6
1.2.3 IMPORTANCIA DE MNT	6
1.2.4 Importancia de MNT de crecimiento rápido	9
1.3 <i>Mycobacterium abscessus</i>	11
1.4 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	12
2.0 ANTECEDENTES	13
2.1 Morfotipos liso y rugoso en micobacterias	13
2.2 Hipervirulencia del morfotipo rugoso	14
2.3 Estudio de invasividad de micobacterias en fibroblastos	15
3.0 JUSTIFICACIÓN.....	16
4.0 HIPÓTESIS	17
5.0 OBJETIVO GENERAL.....	18
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1 Especies micobacterianas	19
6.2 Caracterización de la morfología colonial	20
6.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	20
6.4 Línea celular	21
6.5 Preparación de las monocapas celulares para la infección.....	21
6.6 Cinéticas de infección de los cultivos de células A 549 por micobacterias.....	22
6.7 Ensayo colorimétrico para la cuantificación del Óxido Nítrico por el método de Griess	23
6.8 Microscopía confocal	23

7.0 RESULTADOS	26
7.1 Caracterización fenotípica de los morfotipos coloniales liso y rugoso de <i>Mycobacterium abscessus</i> y <i>Mycobacterium fortuitum</i>	26
7.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	29
7.3 Cinéticas de infección de los cultivos de células A 549 por micobacterias.....	31
7.4 Evaluación de los cambios en el rearreglo de citoesqueleto de células A549 durante la infección por los morfotipos coloniales <i>M. abscessus</i> y <i>M. fortuitum</i> , mediante inmunofluorescencia.....	34
7.5 Ensayo colorimétrico para la cuantificación del Óxido Nítrico por el método de Griess.	36
8.0 DISCUSIÓN.....	37
9.0 CONCLUSIONES	42
10.0 REFERENCIAS	43
11.0 ANEXOS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular micobacteriana.	1
Figura 2. Interacciones MNT-humano.	3
Figura 3. Patogenicidad relativa de tuberculosis y MNT comúnmente aisladas clínicamente.	7
Figura 4. Incremento en la prevalencia de MNT a través del tiempo.	8
Figura 5. Frecuencia relativa de las especies de micobacterias no tuberculosas.	10
Figura 6. Morfología de aislados lisos y rugosos de <i>Mycobacterium abscessus</i> .	13
Figura 7. Apariencia microscópica de las microcolonias.	15
Figura 8. Diagrama general de trabajo.	19
Figura 9. Comparativo del crecimiento de las MNT trabajadas en medio sólido 7H10.	27
Figura 10. Morfología microscópica de colonias de MNT fenotipo liso y rugoso.	28
Figura 11. Rugosidad de las diferentes cepas micobacterianas.	29
Figura 12. Imágenes de MNT obtenidas mediante AFM.	30
Figura 13. Cinética de infección de los morfotipos coloniales liso y rugoso de <i>M. abscessus</i> y morfotipo rugoso de <i>M. fortuitum</i> en células A549.	31
Figura 14. Cinética de infecciones de los morfotipos coloniales lisos de <i>M. abscessus</i> y <i>M. fortuitum</i> y rugosos de <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> y <i>M. smegmatis</i> en células A549.	32
Figura 15. Infectividad de los morfotipos coloniales liso y rugoso de las cepas micobacterianas utilizadas en células A549.	33
Figura 16. Distribución de los filamentos de actina en células epiteliales de pulmón humano en presencia de los morfotipos liso y rugoso de <i>M. abscessus</i> y <i>M. fortuitum</i> con un tiempo de infección de 3h.	34
Figura 17. Distribución de los microtúbulos en células epiteliales de pulmón humano en presencia de los morfotipos liso y rugoso de <i>M. abscessus</i> y <i>M. fortuitum</i> con un tiempo de infección de 3h.	35
Figura 18. Producción de NO durante la infección con los morfotipos coloniales	36

liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* en células A549.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales grupos de microorganismos pertenecientes al género <i>Mycobacterium</i>	2
Tabla 2	Clasificación de MNT de Runyon	4
Tabla 3.	Características de las principales MNT de crecimiento lento	5
Tabla 4.	Tipos comunes de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido.	6
Tabla 5	Morfología colonial de los morfotipos liso y rugoso de <i>Mycobacterium abscessus</i> y <i>Mycobacterium fortuitum</i> en agar 7H11	26

ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio de Dulbecco's modificado por Eagle
FQ	Fibrosis quística
GPL	Glicopeptidolípido
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks
IFN	Interferón
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avuim.</i>
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MOI	Multiplicidad de infección
NO	Óxido nítrico
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RGM	Micobacterias de rápido crecimiento
ROS	Especies Reactivas del oxígeno
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal de bovino
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Las micobacterias no tuberculosas causan diversos tipos de enfermedades en personas con y sin compromiso inmunológico. Dentro de este grupo de organismos, las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR) son uno de los grupos más asociados a patologías y son aisladas con frecuencia en el laboratorio. Dos de las especies pertenecientes a este grupo asociadas a infecciones son *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum*, en ambas especies se ha encontrado relación entre el fenotipo colonial y su grado de capacidad invasiva, sin embargo, a pesar de la importancia de estas bacterias como patógenos humanos, hay relativamente pocos estudios que han investigado la presencia de factores de patogenicidad asociados a los morfotipos de estas dos especies micobacterianas. Sobre todo estableciendo su capacidad de sobrevivencia e infectividad en células de epitelio pulmonar. **OBJETIVO GENERAL.** Caracterizar y determinar la sobrevivencia e infectividad de las variantes lisa y rugosa de micobacterias no tuberculosas *M. abscessus* y *M. fortuitum* en células epiteliales humanas de pulmón (A549). **MATERIAL Y MÉTODOS.** Se realizó la caracterización microscópica y colonial de las variantes lisa y rugosa de *M. abscessus* y *M. fortuitum*. Se realizaron cinéticas de infección con los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* en células A549 determinando su capacidad infectiva y de sobrevivencia intracelular cuantificando las unidades formadoras de colonia (UFC) a diferentes tiempos de infección. Se evaluó el rearrreglo del citoesqueleto. Adicionalmente, se determinó el óxido nítrico (NO) producido durante la infección con los distintos fenotipos de ambas especies. **RESULTADOS.** Las variantes lisa y rugosa de *M. abscessus* y *M. fortuitum* presentaron diferencias en su morfología colonial, siendo las colonias de las variantes lisas más pequeñas, de borde entero, aspecto húmedo, brillantes y de consistencia butirosa; en comparación, las variantes rugosas que presentaron un aspecto seco, opacas, de borde irregular y consistencia friable. Para investigar la relación entre la morfología colonial y una infección persistente, se infectaron células epiteliales humanas de pulmón (A549), observando que las variantes lisas de *M. abscessus* y *M. fortuitum* mostraron un patrón similar causando una infección persistente y progresiva al multiplicarse intracelularmente habiendo un aumento de más de dos logaritmos; mientras que los valores obtenidos en la variante rugosa demostraron que no hubo replicación intracelular al mantenerse constante el número UFC durante el tiempo de infección. Se presentaron cambios morfológicos en los microtúbulos y filamentos de actina debidos a la infección por ambas especies de MNT, observándose despolimerización y cambios en su distribución en células A549. Las células hospederas produjeron menos NO cuando se infectaron por los morfotipos liso y rugoso de ambas especies micobacterianas. **CONCLUSIONES.** *M. abscessus* y *M. fortuitum* presentan los morfotipos coloniales liso y rugoso. El morfotipo liso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* es más infectivo y se multiplica en mayor cantidad que el morfotipo rugoso en células epiteliales de pulmón humano. La interacción de ambos morfotipos de micobacterias con las células A549 indujo cambios en la distribución de los filamentos de actina y tubulina, además de ocasionar una disminución en la producción de NO en las mismas.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* es el único en la familia *Mycobacteriaceae* y está relacionado con otros géneros que contienen ácidos micólicos. El alto contenido de G+C presente en el DNA de las especies de *Mycobacterium* (61-71%) está dentro del rango de aquellos miembros de otros géneros que contienen ácidos micólicos, *Gordonia* (63-69%), *Nocardia* (64-72%), y *Rhodococcus* (63-73%) (Pfyffer *et al.*, 2009).

Es un género muy particular, de ahí el nombre de *myco* que significa similar a los hongos, que proviene de que en ocasiones muestran un crecimiento filamentoso. Varias de las características de las micobacterias, como la tinción de ácido-alcohol resistencia, la resistencia a ciertos fármacos y la patogenicidad, se relaciona con su pared celular distintiva a la de otras bacterias, en la cual la capa más externa está compuesta por ácidos micólicos que la hacen muy resistente (Figura 1), esto explica la resistencia de estas bacterias ante condiciones adversas como la desecación y la introducción de fármacos. Son bacilos aerobios que no forman esporas (Tortora *et al.*, 2007).

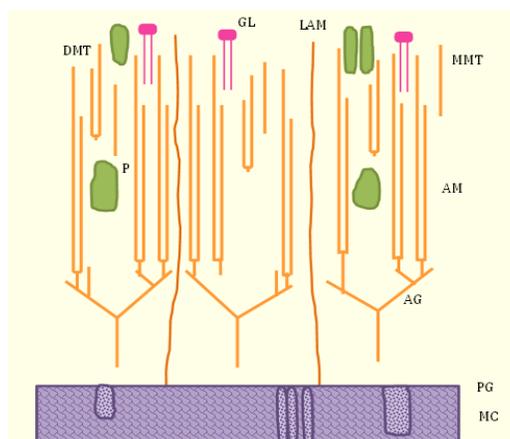


Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular micobacteriana La figura representa el modelo común de la pared celular micobacteriana con sus varios componentes. Membrana celular MC; P-porinas y otras proteínas de la envoltura celular; PG-peptidoglicano; AG-arabinogalactano; AM-ácidos micólicos; MMT-Monomicolato de trealosa; DMT dimicolato de trealosa; GL glycolípido; LAM lipoarabinomana

En general las micobacterias se pueden clasificar en dos grupos principales sobre la base de diferencias fundamentales en su gran importancia epidemiológica y en su asociación con la enfermedad: las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*) y las denominadas micobacterias no tuberculosas o MNT (Tabla 1) (Lee, 2009).

Tabla 1 Principales grupos de microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium**

<p>COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. bovis BCG</i> <i>M. africanum</i></p>	
<p>MICOBACTERIAS QUE NO CAUSAN TUBERCULOSIS De crecimiento lento No fotocromógenas: Complejo <i>M. avium</i> <i>M. celatum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. xenopi</i> Fotocromógenas: <i>M. kansasii</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. intermedium</i> Escotocromógenas: <i>M. sxulgai</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. bohemicum</i> No cultivable: <i>M. leprae</i></p>	<p>De crecimiento rápido con potencial patógeno: <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. immunogenum</i> <i>M. mucogenicum</i> Complejo <i>M. fortuitum</i> tercera Biovariedad sorbitol-positivo¹ Complejo <i>M. fortuitum</i> tercera Biovariedad sorbitol-negativo¹ <i>M. septicum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. canariense</i> Rara vez patógenas o aún no asociadas con infección: <i>M. agri</i>, <i>M. aichiense</i>, <i>M. austroafricanum</i>, <i>M. burum</i>, <i>M. brumae</i>, <i>M. chitae</i>, <i>M.</i> <i>chubuense</i>, <i>M. diemhoferi</i>, <i>M. duvalii</i>, <i>M. fallax</i>, <i>M. flavescens</i>, <i>M. obuense</i>, <i>M. parafortuitum</i>, <i>M. phlei</i>, <i>M. pulveris</i>, <i>M. rhodesiae</i>,</p>

*Esta tabla no está completa sino que presenta las principales micobacterias aisladas de seres humanos. Tomado de Bailey & Scott, 2007

1.2 Micobacterias no tuberculosas (MNT)

Se denominan MNT a todas las especies del género *Mycobacterium* que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* ni al complejo *M. leprae*. Este grupo de micobacterias ha recibido varios nombres como son: atípicas, tuberculoides, ambientales, oportunistas, anónimas, no clasificadas o MOTT (por sus siglas en inglés de micobacterias distintas del bacilo de la tuberculosis) (Rom *et al.*, 2004).

Las MNT están ampliamente distribuidas en el ambiente incluyendo fuentes de aguas tratadas o no (presentando o no biofilms), suelo y animales, y en ocasiones colonizan la piel, el tubo digestivo y las vías respiratorias de personas sanas. Se sabe muy poco acerca de la forma de contagio de la infección, pero algunas enfermedades causadas por las MNT parecen adquirirse directamente de las fuentes ambientales por traumatismos, por inhalación de los aerosoles contaminados o por ingestión (Figura 2). A diferencia de los organismos del complejo *M. tuberculosis*, las MNT por lo general no se transmiten entre personas y su aislamiento no siempre significa que estén asociadas con un proceso patológico (Falkinham, 1996).



Figura 2. Interacciones MNT-humano

En la figura se representa la vía de entrada de las micobacterias (representado por el lado derecho) y sus efectos diferentes en los seres humanos (lado izquierdo). Tomado de Todd *et al.*, 2004

En 1959 Runyon clasificó a las MNT en cuatro grupos con base en las características fenotípicas de las diversas especies, en particular la velocidad de crecimiento y la pigmentación de las colonias (Tabla 2) (Stahl & Urbance, 1990).

Tabla 2. Clasificación de MNT de Runyon

Número de Runyon	Nombre del grupo	Descripción
I	Fotocromógenos	Colonias de MNT que producen pigmento tras la exposición a la luz después de crecer en la oscuridad y tardan más de 7 días en crecer en medios sólidos
II	Escotocromógenos	Colonias de MNT que producen pigmento en la oscuridad o la luz y tardan más de 7 días en crecer en medios sólidos
III	No Fotocromógenos	Colonias de MNT que carecen de pigmento sin importar que se cultiven en la luz o la oscuridad y que tardan más de 7 días en crecer en medios sólidos
IV	De crecimiento rápido	Colonias de MNT que crecen en medios sólidos en menos de 7 días

Modificado de Bailey & Scott. 2007

1.2.1 MNT crecimiento lento

Algunas micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento tienen la capacidad de producir carotenoides (un grupo de pigmentos que va desde al amarillo hasta el rojo) en cantidades variables y se dividen por categorías en tres grupos, de acuerdo a la producción de estos pigmentos. Algunas de estas MNT son potencialmente patógenas para el ser humano (Tabla 3) (Restrepo *et al.*, 2003).

Tabla 3. Características de las principales MNT de crecimiento lento

Microorganismo	Epidemiología	Tipos de infección
Fotocromógenas		
<i>M. kansasii</i>	El reservorio natural es agua corriente con participación de aerosoles en la transmisión.	Enfermedad pulmonar crónica, linfadenitis cervical y enfermedad cutánea
<i>M. marinum</i>	Transmisión por contacto con agua contaminada y entrada de microorganismos por traumatismos	Enfermedad cutánea; bacteriemia
Escotocromógenas		
<i>M. szulgai</i>	Agua y suelo	Enfermedad pulmonar, sobre todo en varones adultos; adenitis cervical, bursitis
<i>M. scrofulaceum</i>	Leche cruda, suelo, agua, productos lácteos	Adenitis cervical en niños; bacteriemia; enfermedad pulmonar, lesiones cutáneas
No fotocromógenas		
<i>Complejo M. avium</i>	Fuentes ambientales que incluyen aguas de fuentes naturales; suelo	Pacientes sin SIDA: infecciones pulmonares en pacientes con enfermedad pulmonar preexistente; linfadenitis cervical; enfermedad diseminada . Pacientes con SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida): enfermedad diseminada
<i>M. xenopi</i>	Agua sobre todo de grifos de agua caliente en hospitales; se cree que se transmite por aerosoles	Sobre todo infecciones pulmonares en adultos. Menos frecuentes: infecciones extrapulmonares (hueso, ganglios linfáticos, senos paranasales) y enfermedad diseminada
<i>M. ulcerans</i>	Aguas tropicales estancadas	Infecciones cutáneas y subcutáneas indolentes
<i>M. malmoense</i>	La mayoría de los casos provienen de Inglaterra, Gales y Suecia, hasta el presente solo se aisló de seres humanos y armadillos en cautiverio	Infecciones pulmonares crónicas sobre todo en pacientes con enfermedad preexistente; linfadenitis cervical en niños

Modificado de: Bailey & Scott, 2007

1.2.2 MNT de rápido crecimiento

Las micobacterias de rápido crecimiento son definidas generalmente como especies no tuberculosas que crecen en un intervalo de 7 días en medio de cultivo. Las especies o grupos más significativos (patogénicos) clínicamente son no pigmentados, sólo un grupo patogénico (grupo *M. smegmatis*) es pigmentado el cual desarrolla un aparentemente lento o tardío pigmento (Tabla 4) (Brown & Wallace, 2002).

Tabla 4 Tipos comunes de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido.

Microorganismo	Tipos comunes de infección
<i>M. abscessus</i>	Enfermedad diseminada, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, infecciones de la piel y los tejidos blandos, infecciones pulmonares e infecciones posoperatorias.
<i>M. fortuitum</i>	Infecciones posoperatorias en intervenciones de aumento del volumen mamario y esternotomías medianas; infecciones de la piel y los tejidos blandos.
<i>M. chelonae</i>	Infecciones de la piel y los tejidos blandos; infecciones posoperatorias de heridas; queratitis.
Complejo <i>M. fortuitum</i> Tercera biovariedad Sorbitol-positivo O sorbitol negativo	Infecciones de la piel y los tejidos blandos.
<i>M. peregrinum</i>	Infecciones de la piel y los tejidos blandos, bacteriemias.
<i>M. mucogenicum</i>	Infecciones de heridas postraumáticas, sepsis relacionada con catéteres.
<i>M. smegmatis</i>	Infecciones de la piel o los tejidos blandos.

Modificado de: Bailey & Scott, 2007

1.2.3 IMPORTANCIA DE MNT

Este grupo de micobacterias tradicionalmente han sido consideradas clínicamente menos importantes que *M. tuberculosis* por lo que en muchas ocasiones no se requiere su reporte a autoridades públicas de salud, sin embargo se ha incrementado su incidencia y prevalencia en los últimos años. Algunas de las

causas principales de este incremento incluyen el mejoramiento de técnicas de diagnóstico, incremento en el reconocimiento de MNT en pacientes inmunocomprometidos e incremento en la expectativa de vida (se ha visto gran incidencia en pacientes de la tercera edad) (Weiss & Glassroth, 2012).

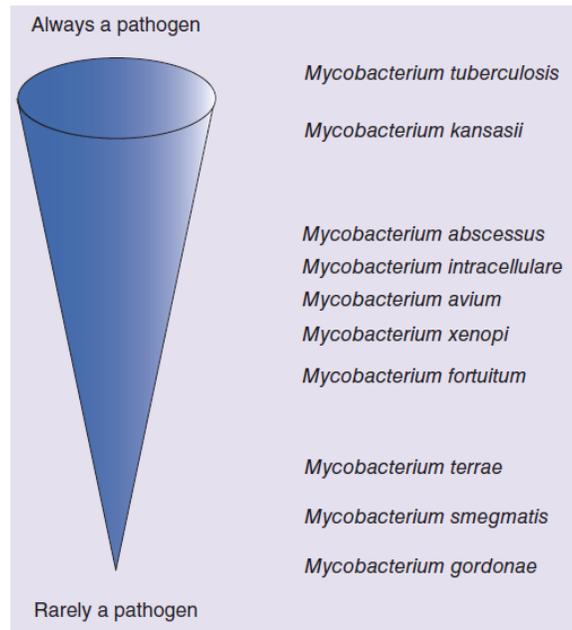


Figura 3. Patogenicidad relativa de tuberculosis y MNT frecuentemente aisladas de muestras clínicas.

En el caso de infecciones pulmonares provocadas por NMT, se ha observado un incremento notablemente en su prevalencia e incidencia en forma global en la década pasada (Figura 4) (Bar *et al.*, 2015). En cuanto a enfermedades asociadas a tejidos blandos e infecciones diseminadas es difícil establecer índices estadísticos ya que como se ha mencionado usualmente no son reportadas a autoridades públicas.

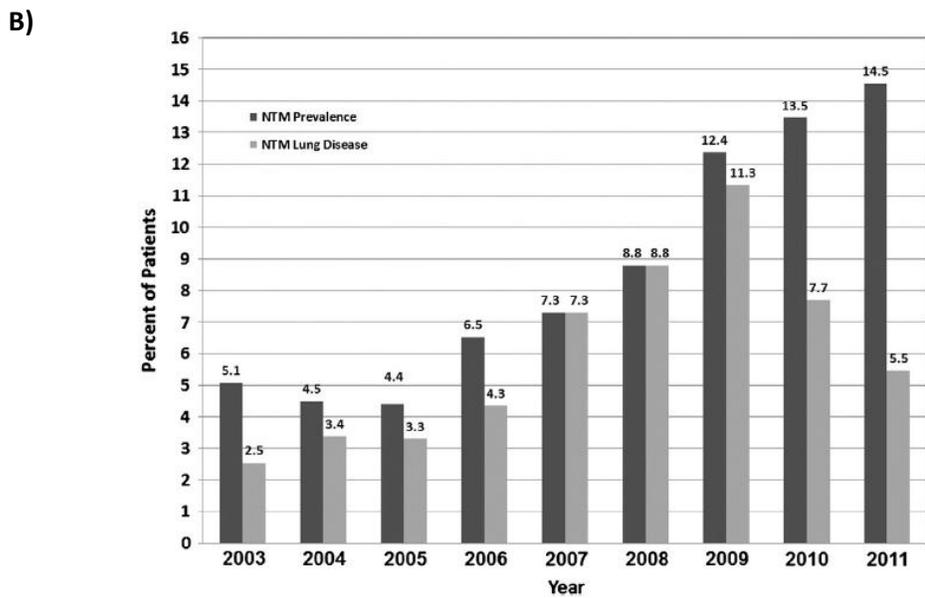
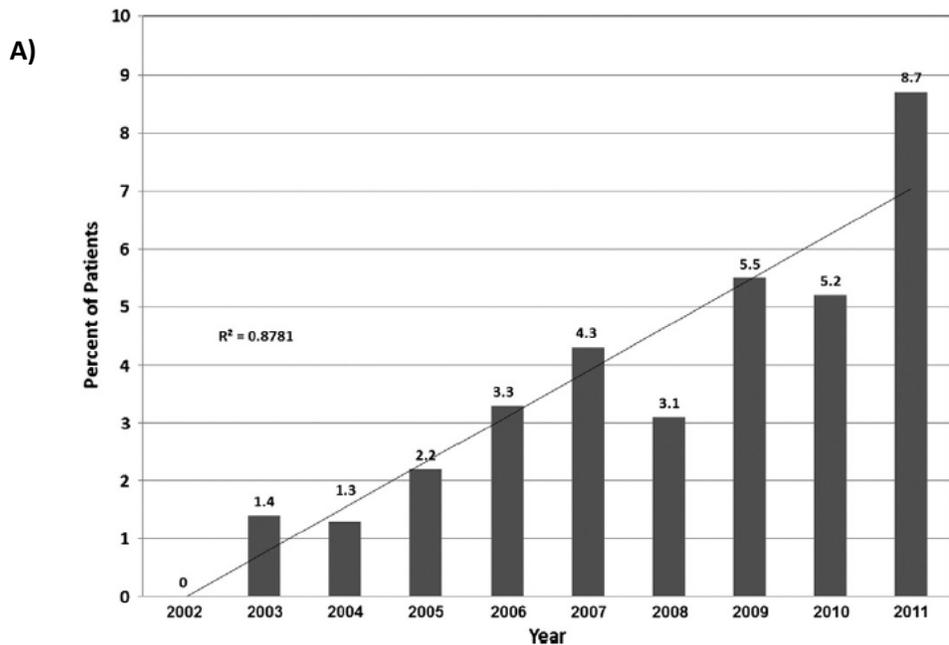


Figura 4. Incremento en la prevalencia de MNT a través del tiempo. A) Incremento de la tasa de incidencia (% de pacientes recientemente infectados del total de pacientes por año) de nuevas infecciones con MNT del año 2003 al año 2011. **B)** Incremento de la prevalencia de MNT del año 2003 al año 2011. Graub CF center, SCMCI Israel. Tomado de Bar *et al.*, 2015.

Su amplia distribución en el ambiente y lo poco que se sabe acerca de los mecanismos de infectividad y patogénesis de estas bacterias, hace que sea un problema su identificación, tratamiento y control.

Existen 3 grupos de riesgo:

1. pacientes con irritación o lesión previa a nivel pulmonar, para micobacteriosis pulmonar;
2. empleados de piscinas y acuarios para las afecciones cutáneas;
3. pacientes inmunodeprimidos, especialmente con SIDA, que se han convertido en el grupo de riesgo más importante (Shastri, 2011).

1.2.4 Importancia de MNT de crecimiento rápido

Durante las últimas décadas, ha habido una conciencia creciente sobre las infecciones causadas por las micobacterias no tuberculosas (MNT), incluyendo las de rápido crecimiento (RGM), de las cuales son varias las especies y grupos filogenéticos que están claramente establecidos como patógenos humanos. Entre este grupo de organismos, las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido se encuentran entre las especies aisladas con mayor frecuencia en el laboratorio, además son la causa de varios síndromes tales como infección en heridas y tejidos blandos, tracto respiratorio, infecciones osteoarticulares y bacteriemias relacionadas con el uso de catéteres (Esteban, *et al.*, 2006).

Las tres especies de RGM de mayor importancia clínica responsables de enfermedades en humanos incluyen *M. fortuitum*, *M. chelonae*, y *M. abscessus* las cuales como puede observarse en la Figura 5 abarcan más de la mitad de las especies aisladas con mayor frecuencia en enfermedades pulmonares en los años comprendidos del 2002 hasta el 2011 (Brown, *et al.*, 2009; Bar *et al.* 2015).

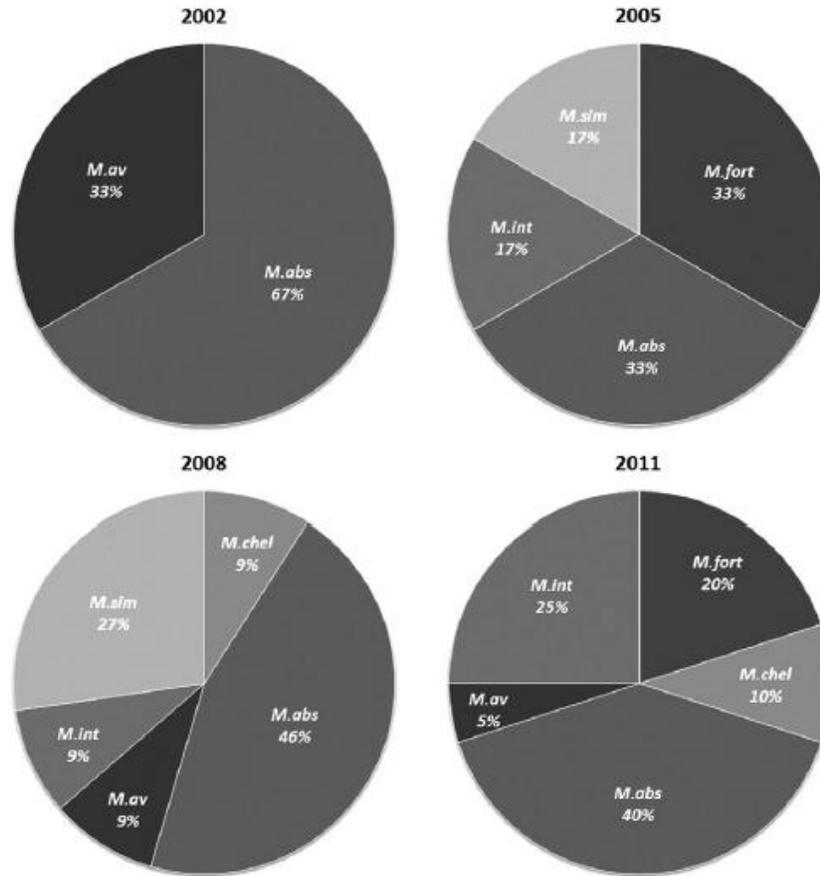


Figura 5. Frecuencia relativa de las especies de micobacterias no tuberculosas. Frecuencia relativa de las especies de MNT aisladas de casos pulmonares durante el periodo comprendido entre los años 2001 a 2011; *M.av*-*Mycobacterium avium*, *M.abs*-*Mycobacterium abscessus*, *M.int*-*Mycobacterium intracellulare*, *M.sim*-*Mycobacterium simiae*, *M.fort*-*Mycobacterium fortuitum*, *M.chel*-*Mycobacterium chelonae*. Graub CF center, SCMCI Israel. Tomado de Bar *et al.*, 2015.

Algunas MNT, particularmente de rápido crecimiento han mostrado ser resistentes a desinfectantes de uso común, químicos utilizados en esterilización de equipo médico y antisépticos tópicos. Esta resistencia se ha atribuido a propiedades en los lipopolisacáridos y otros glicolípidos presentes en la envoltura celular de varias de estas especies (Weiss & Glassroth, 2012).

1.3 *Mycobacterium abscessus*

El complejo *Mycobacterium abscessus* comprende 3 especies, *M. abscessus*, *M. mageritense* y *M. bolletii*, que están estrechamente relacionadas y causan un espectro similar de infecciones en humanos. Se encuentran distribuidas ampliamente en el ambiente principalmente en suelo y ambientes acuáticos (Ade & Drancourt, 2004).

M. abscessus es la RGM aislada con mayor frecuencia en infecciones en humanos, es responsable de infecciones pulmonares principalmente, pero no exclusivamente en pacientes con lesiones pulmonares previas, *M. abscessus* causa infecciones pulmonares frecuentemente en pacientes con fibrosis quística (FQ), incluyendo niños, lo que la está convirtiendo en un problema importante en la mayoría de los centros de tratamiento y atención de FQ en todo el mundo. Esta micobacteria también se ha visto involucrada en casos epidémicos de infecciones en piel y tejidos blandos.

M. abscessus causa infecciones severas post quirúrgicas y se ha asociado a infecciones fatales post transplantes. Esta bacteria tiene la habilidad de cruzar la barrera hemato-encefálica y causar meningitis en pacientes inmunocomprometidos (Medjahed, *et al.*, 2009).

Es extremadamente poco sensible a antibióticos y adquiere resistencia a ellos con facilidad lo que hace que las infecciones con *M. abscessus* sean particularmente difíciles de tratar y con una alta probabilidad de fallo, esta resistencia se ha asociado a el complejo hidrofóbico con el que está equipada su envoltura celular lo cual la provee de una barrera impermeable a moléculas hidrofílicas, incluyendo antibióticos. Esta micobacteria es normalmente sensible *in vitro* a amikacina, cefoxitina y claritromicina, pero *in vivo* la eficiencia de estos antibióticos puede variar por lo que se opta por un tratamiento combinado (Griffith, *et al.*, 2007).

1.4 *Mycobacterium fortuitum*

El complejo *Mycobacterium fortuitum* incluye un diversas especies entre ellas *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. houstonense* y *M. boenickei*, entre otras, las cuales sólo pueden diferenciarse por técnicas moleculares.

Como la mayoría de las MNT son saprófitos y se pueden aislar del suelo y ambientes húmedos en prácticamente todo el mundo.

Las patologías causadas por este microorganismo son similares a las de *M. abscessus* causando enfermedades pulmonares, infecciones en piel y tejidos blandos en sujetos con o sin compromiso inmunológico (Driffith & Wallace, 1993).

M. fortuitum usualmente es susceptible a antibióticos como amikacina, ciprofloxacina, sulfonamidas, cefoxitina, imipenem y doxiciclina. Estudios recientes revelan que algunas especies de este complejo contienen una metilasa inducible que le confiere resistencia a macrólidos por lo que tienen que ser usados con precaución en el tratamiento de afecciones con esta bacteria. El tratamiento usualmente es largo e implica la combinación de al menos dos antibióticos (Griffith, *et al.*, 2007).

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Morfotipos liso y rugoso en micobacterias

Se ha visto que diversas MNT presentan los fenotipos liso y rugoso en sus colonias (Fig.6) en las cuales el pase de un morfotipo a otro parece ser espontáneo (Belisle, *et al.*, 1993). Estudios realizados muestran que la morfología colonial de NTM está influenciado por el glicopeptidolípido (GPL) presente en su pared ya que se ha encontrado en menos proporción en las colonias rugosas (Bodil & Malin, 2012; Nessar, *et al.*2011), el cual a su vez ha sido asociado con el deslizamiento y la capacidad de formar biofilms (Recht, *et al.*, 2001, Martinez, *et al.*,1999), características que juegan un papel importante en la colonización bacteriana (Schorey & Sweet, 2008).

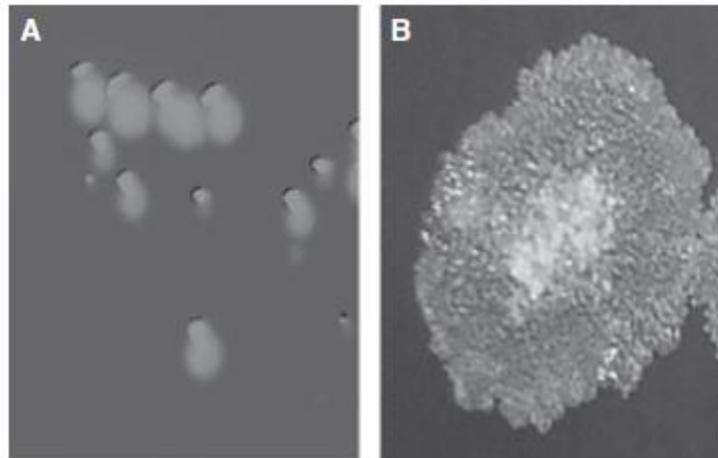


Figura 6. Morfología de aislados lisos y rugosos de *Mycobacterium abscessus*; A) Colonia lisa; B) Colonia rugosa. Tomado de Howard, *et al.*, 2006

Varios reportes han descrito la correlación entre el morfotipo colonial y la virulencia, en el que las variantes rugosas generalmente son más virulentas que las variantes lisas (Howard, *et al.*, 2006).

2.2 Hipervirulencia del morfotipo rugoso

Se han realizado algunos estudios que analizaron y compararon *in vitro* la capacidad invasiva de los morfotipos coloniales liso y rugoso de *M. abscessus*, en líneas celulares de monocitos. Se encontró que el morfotipo rugoso presentó mayor capacidad de persistir y multiplicarse que el morfotipo liso (Byrd & Ricklyons, 1999; Howard, *et al*, 2006), patrón que se repite *in vivo* en ratones infectados vía intravenosa (Byrd & Ricklyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007).

En el caso de *M. fortuitum* no se han reportado estudios sobre el comportamiento de sus morfotipos coloniales.

2.3 Estudio de invasividad de micobacterias en fibroblastos

La invasividad de diversas cepas micobacterianas se ha analizado en modelos *in vitro*, uno de estos utiliza el modelo de infectividad en cultivo celular y la observación en la formación de microcolonias en fibroblastos, que como se muestra en la figura 7 permite observar las características de dichas colonias (Byrd & Ricklyons, 1999, Esteban *et al.*, 2006).

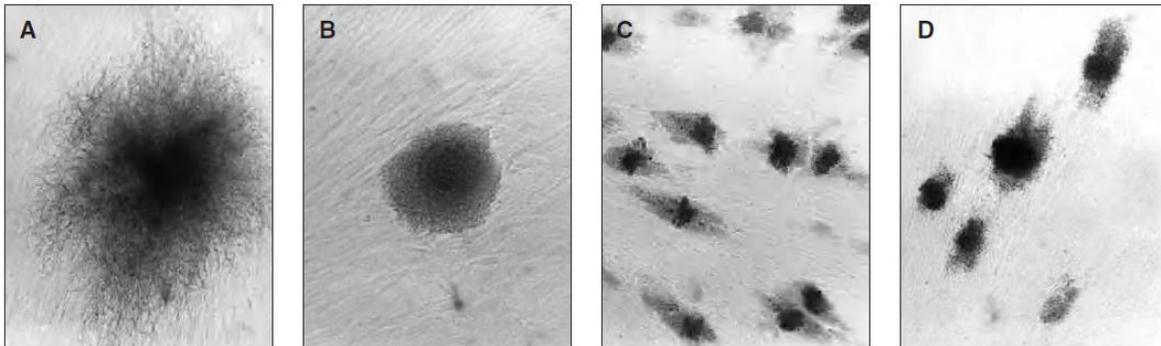


Figura 7. Apariencia microscópica de las microcolonias de micobacterias no tuberculosas. A) Colonia con aspecto deshilachado, característica del grupo *Mycobacterium fortuitum*. Cepa FJD24. B) Colonia redondeada característica del grupo *Mycobacterium chelonae*. Cepa FJD133. Aumento $\times 20$. C) Microcolonias alargadas, cepa FJD176. D) Microcolonias alargadas, cepa FJD25. Aumento $\times 10$. Tomada de Esteban *et al.*, 2006.

3.0 JUSTIFICACIÓN

Las micobacterias no tuberculosas causan diversos tipos de enfermedades en personas con y sin compromiso inmunológico. Entre este grupo de organismos, las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (RGM) se encuentran entre las especies más frecuentemente aisladas a partir de casos clínicos. Dos de las especies pertenecientes a este grupo son *M. abscessus* y *M. fortuitum*. Ambas especies presentan el fenómeno de isogenia, consistente en la capacidad de expresar diferentes morfotipos coloniales encontrándose relación entre el fenotipo colonial y su grado de capacidad invasiva. Sin embargo, a pesar de la importancia de estas bacterias como patógenos humanos, hay muy pocos estudios que han investigado las características de patogenicidad asociados a esta característica en células no fagocíticas como los neumocitos tipo II, por lo que en este trabajo se pretende tomar como modelo a estas dos especies micobacterianas para estudiar la sobrevivencia e infectividad asociada al morfotipo liso y rugoso en células de epitelio pulmonar.

4.0 HIPÓTESIS

Si *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum* presentan diferentes morfotipos coloniales entonces presentarán diferentes características de infectividad y sobrevivencia en células no fagocíticas.

5.0 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y determinar la sobrevivencia e infectividad de las variantes lisa y rugosa de micobacterias no tuberculosas *M. abscessus* y *M. fortuitum* (MNT) así como su efecto sobre el citoesqueleto y la producción de óxido nítrico.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Caracterizar la morfología colonial de los morfotipos liso y rugoso de los aislados clínicos de *M. abscessus* y *M. fortuitum*.
- 2) Estandarizar una técnica que permita determinar cuantitativamente el grado de rugosidad de los fenotipos de micobacterias así como su observación en alta resolución empleando microscopía de fuerza atómica (AFM).
- 3) Determinar la infectividad y la sobrevivencia intracelular de los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* en células epiteliales de pulmón de humano (células A549).
- 4) Evaluar cambios en el rearrreglo de citoesqueleto de células A549 durante la infección por los morfotipos coloniales *M. abscessus* y *M. fortuitum*, mediante inmunofluorescencia.
- 5) Determinar la producción de óxido nítrico (NO) durante la infección por los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo desarrollado en este estudio, se realizó siguiendo el diagrama de flujo mostrado en la figura 8.

M. abscessus variantes lisa y rugosa

M. fortuitum variantes lisa y rugosa

M. abscessus de referencia ATCC 19977 presenta fenotipo liso

M. smegmatis ATCC mc² 155 presenta fenotipo rugoso

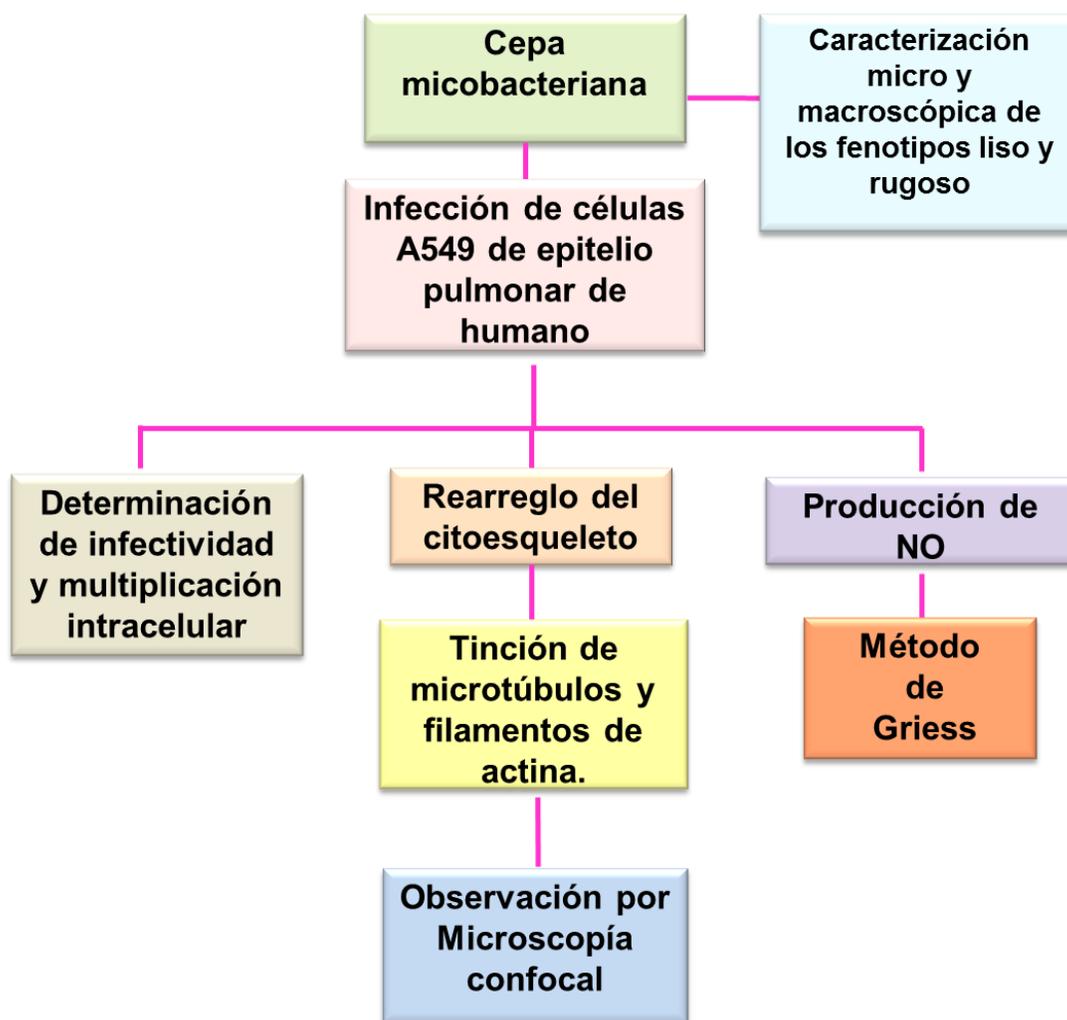


Figura 8. Diagrama general de trabajo

6.1 Especies micobacterianas

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas micobacterianas: *Mycobacterium abscessus* (cepa de referencia ATCC 1997®), *Mycobacterium abscessus* variante lisa aislada de un caso clínico de endoftalmitis; *Mycobacterium abscessus* variante rugosa obtenida de la variante lisa anteriormente mencionada; *M. fortuitum* variante rugosa y *M. fortuitum* variante lisa, ambas obtenidas de aislados clínicos de infecciones de tejido blando y donadas gentilmente por el Dr. Jacobus de Waard de la Universidad Central de Venezuela y *M. smegmatis* (cepa de referencia ATCC mc²155®). Las micobacterias se cultivaron en caldo Middlebrook 7H9 (DIFCO®) a 37°C y se utilizaron en su fase logarítmica de crecimiento.

6.2 Caracterización de la morfología colonial

Se realizó el aislamiento por estría cruzada de cada cepa micobacteriana en medio sólido de cultivo Middlebrook 7H11 (DIFCO®), se incubaron de 72-96 h a 37°C y se procedió a determinar su morfología colonial macroscópicamente y microscópicamente con ayuda de un microscopio invertido Zeiss a un aumento de 10X.

6.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Se prepararon los portaobjetos de 1cm x 1cm sumergiéndolos en una solución de etanol/HCl (70/1 v/v) toda la noche, después de eso, los portaobjetos se lavaron por sonicación durante 10 minutos en agua desionizada dos veces, después de los lavados, los portaobjetos se colocaron en placas petri y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente y se guardaron hasta su uso.

Antes de su fijación, las micobacterias se lavaron dos veces en PBS estéril, las micobacterias lavadas se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 2 h o paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, ambas condiciones se realizaron a temperatura ambiente. Se corroboró que después de los procedimientos de fijación las micobacterias estuvieran muertas, esto se hizo sembrando una alícuota de suspensión bacteriana en caldo 7H9 incubando hasta 2 semanas y revisando periódicamente el cultivo. Después de la fijación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se re-suspendieron en agua ultrapura para evitar la formación de cristales de sal durante el proceso de secado y su probable interferencia en las

medidas de AFM. Finalmente, 10 μ L de las soluciones bacterianas preparadas fueron colocadas en los portaobjetos previamente preparados y se dejaron secar al aire. Todas las muestras se guardaron a 4°C hasta su observación en el microscopio de fuerza atómica.

Las preparaciones se observaron en un Microscopio de Fuerza Atómica NanoScope IV de Digital Instruments en modo Tapping usando puntas de nitruro de silicio, el análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el programa NanoScope Analysis 1.5 determinando la rugosidad de las micobacterias observadas.

6.4 Línea celular

El estudio se realizó con una estirpe de células no fagocíticas: las células epiteliales de pulmón humano (línea celular A549), cuyas características se describen a continuación:

Línea celular A549 (Células epiteliales, neumocitos tipo II) se obtuvo de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA®) y se mantuvo en medio de cultivo Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco®) suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado (SFB, Gibco® Sera, USA) y una mezcla de antibióticos consistente en 5 mg/ml de gentamicina y 50,000 U/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St Louis, USA®) en botellas de cultivo celular.

6.5 Preparación de las monocapas celulares para la infección.

Cuando se observó que en las botellas de cultivo celular se tuvo aproximadamente el 100% de confluencia se procedió a retirar el medio de las botellas de cultivo y se agregó aproximadamente de 0.7 a 1.0 mL de una solución atemperada de tripsina-verseno al 5% (Sigma®) por botella de cultivo y se dejó actuar durante 3 a 4 min manteniendo la caja en movimiento para que la tripsina cubriera toda la superficie de la botella, posteriormente ya que las células se desprendieron de la superficie de la botella se agregó un mililitro de medio Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco®) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) para inhibir la acción de

la tripsina, se mezcló y la suspensión se colocó en tubos cónicos de 15 mL para centrifuga, los cuales se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min. Después del tiempo de centrifugación, se retiró el sobrenadante de los tubos y el botón celular se resuspendió en 5 mL de medio para cultivo celular Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco®) 10% SFB fresco y se procedió a contar el número de células obtenidas por el método de exclusión con azul de tripano (0.4% en PBS). Una vez determinado el número de células, se realizaron los cálculos correspondientes para colocar 100,000 células/ml por pozo, en placas de 24 pozos. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante toda la noche.

6.6 Cinéticas de infección de los cultivos de células A 549 por micobacterias.

Las monocapas celulares que se prepararon en las placas de 24 pozos, se lavaron 2 veces con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, Sigma®), para eliminar las células no adheridas. A cada uno de los pozos se les adicionaron 100 µL de las suspensiones bacterianas correspondientes ajustadas al tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland, para obtener una MOI de 10:1. Las monocapas celulares se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ siguiendo una cinética de post-infección (2, 24, 48, 72 y 96 h), transcurrido el periodo de infección (3h), los pozos se lavaron 2 veces con HBSS y se trataron con una solución de amikacina a una concentración de 80 µg/mL y se incubaron durante 2 h para eliminar a las micobacterias extracelulares, transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar 2 veces con HBSS y posteriormente se sustituyó por medio F12 conteniendo amikacina a una concentración de 15 µg/ml para evitar el crecimiento extracelular de las micobacterias. Transcurrido cada tiempo post-infección, se adicionaron 0.5 ml de solución estéril de duodecil sulfato de sodio (SDS, BIO-RAD®) al 0.25%, durante 5 min para lisar las células, después de este tiempo se agregaron 0.5 mL de albúmina sérica bovina (BSA) para neutralizar el efecto del SDS, se homogenizó la suspensión durante 30 segundos y se colocó en microtubos debidamente etiquetados para luego conservarlos en congelación a una temperatura de -70°C hasta su uso. Para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC), los lisados se descongelaron, se homogeneizaron y se prepararon diluciones seriadas con factor de 10 en agua estéril, a cada uno de

los lisados y se sembraron 20 μL de cada dilución en placas de agar Middlebrook 7H11 (DIFCO®), se incubaron a 37°C hasta observar el crecimiento de las colonias. Para determinar el porcentaje de infectividad de cada micobacteria se determinaron también las UFC de la suspensión bacteriana usada para la infección (inóculo).

6.7 Ensayo colorimétrico para la cuantificación del Óxido Nítrico por el método de Griess

Se preparó una monocapa de células A549 en placas de 24 pozos como se describió anteriormente, posteriormente se refrigeraron durante 10 min para sincronizar el metabolismo celular. Cumplido este tiempo, se infectaron con las cepas de micobacterias a una MOI de 10:1 y se realizó una cinética de infección de 2, 6, 24 y 48h, al irse cumpliendo cada uno de los tiempos de infección, se colectaron los sobrenadantes en microtubos de 1.5 mL y se guardaron a -70°C hasta su uso.

Una vez recolectados todos los tiempos, se colocó en una placa de 96 pozos 100 μL de cada sobrenadante y 50 μL de la Solución A (sulfonamida [Sigma] 0.8% en ácido acético 5N) y 50 μL de la Solución B (α naftilamida [Sigma®] 0.1% en ácido acético 5N), posteriormente, se determinó su absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. Simultáneamente se realizó una curva de calibración utilizando una solución de nitrato de sodio (Sigma®) a las concentraciones de 10^{-1} a 10^{-5} $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se interpolaron las absorbancias de los sobrenadantes para determinar la concentración de nitratos en cada tiempo de infección expresando los resultados en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.8 Microscopía confocal

Las monocapas celulares se realizaron en placas de 6 pozos colocando 50, 000 células por pozo en los que anteriormente se colocó un cubreobjetos previamente desengrasado y esterilizado para que las células se adhirieran sobre este, luego se agregó medio F12 Nutrient Mixture (Gibco®) conteniendo 10% de SFB en

cantidad suficiente para cubrir las monocapas y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ por 24 h.

Pasado el tiempo de incubación, las monocapas se lavaron dos veces con HBSS y se infectaron con las micobacterias en estudio usando una MOI de 10:1. La infección se permitió durante 3h, transcurrido este periodo se eliminaron las bacterias no interiorizadas lavando las monocapas 3 veces con HBSS. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 0.5 ml de paraformaldehído al 4% durante 30 minutos para fijar las células, transcurrido este tiempo se lavaron 3 veces todos los pozos con HBSS para eliminar el exceso de fijador.

Para la observación de la participación de los filamentos de actina durante la infección por las cepas micobacterianas se usó la toxina faloidina acoplada con el fluorocromo rodamina (Bioscience ®), dicha toxina tiene la capacidad para unirse a la forma polimérica de la actina (actina F) (Dancker *et al.*, 1975). Se colocó sobre las monocapas el conjugado faloidina-rodamina a una concentración de 50 ng/μL por pozo durante 20 minutos protegido de la luz, pasado este tiempo de incubación se lavaron las monocapas 5 veces con PBS y se montaron con 10μL de Vectashield-DAPI (Vector®) sobre un portaobjetos y se guardaron las preparaciones hasta su observación a 4°C protegidas de la luz.

Para la tinción de los microtúbulos a partir de las monocapas previamente fijadas, se procedió a permeabilizarlas con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se lavaron las monocapas 2 veces con PBS y se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% en PBS, durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se lavaron nuevamente las monocapas 3 veces con PBS y se colocó el anticuerpo primario α-tubulina (ZYMED®) diluido 1:250 en PBS, durante toda la noche a 4°C, después de este tiempo se lavaron las monocapas con PBS y se colocó el anticuerpo secundario conjugado con rodamina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA®) por 2 h a temperatura ambiente protegiendo las monocapas de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las monocapas y al igual que en la tinción con actina se montaron sobre un portaobjetos con Vectashield DAPI (Vector ®) y se guardaron a 4°C en oscuridad.

Las preparaciones se observaron y analizaron en un sistema confocal acoplado a un microscopio invertido (marca ZEISS®, modelo axiovert 200M con el programa LSM Pascal 5).

7.0 RESULTADOS

7.1 Caracterización fenotípica de los morfotipos coloniales liso y rugoso de *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum*

Las variantes lisa y rugosa de *M. abscessus* y *M. fortuitum* como su nombre lo indica presentan diferencias en su morfología colonial (Tabla 5), siendo las colonias de las variantes lisas más pequeñas, de borde entero, aspecto húmedo, brillantes y de consistencia butirosa; a diferencia de las variantes rugosas que presentan aspecto seco, opacas, de borde irregular y consistencia friable (Figura 9).

Tabla 5. Morfología colonial de los morfotipos liso y rugoso de *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum* en agar 7H11

Característica	<i>Mycobacterium abscessus</i> (morfotipo)		<i>Mycobacterium fortuitum</i> (morfotipo)	
	Liso	Rugoso	Liso	Rugoso
Tamaño	3mm	4mm	2mm	3mm
Color	Crema	Crema	Blanco	Blanco
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Plana	Convexa	Plana	Convexa
Superficie	Lisa	Rugosa	Lisa	Rugosa
Aspecto	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco
Borde	Entero	Irregular	Entero	Irregular
Luz Transmitida	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Luz reflejada	Brillante	Mate	Brillante	Mate
Consistencia	Butirosa	Friable	Butirosa	Friable
Pigmento difusible	No	No	No	No

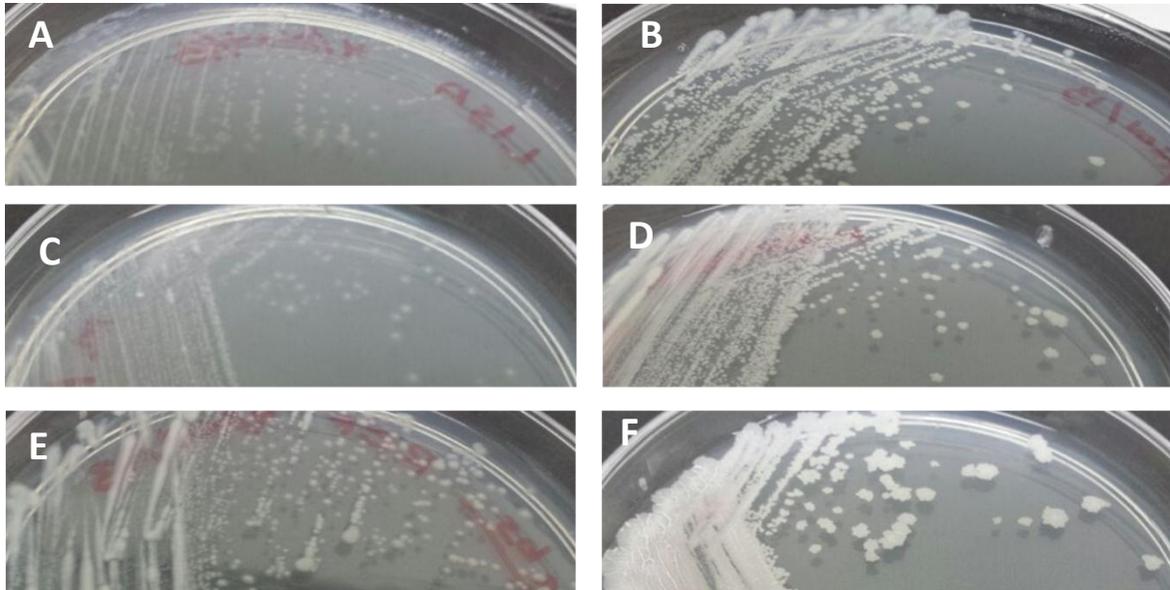


Figura 9. Comparativo del crecimiento de las MNT trabajadas en medio sólido 7H10. A) morfotipo liso y B) morfotipo rugoso de *Mycobacterium abscessus*; C) morfotipo liso y D) morfotipo rugoso de *Mycobacterium fortuitum*; E) Cepa lisa de referencia *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977; F) Cepa rugosa de referencia *Mycobacterium smegmatis* ATCC mc² 155

Al observar microscópicamente las colonias lisas, éstas mostraron un borde translúcido e irregular y fueron planas; mientras que las colonias rugosas se observaron con elevación convexa y opacas, muy parecidas a las que producen las cepas de referencia rugosa (*Mycobacterium smegmatis* ATCC mc²155) y lisa (*Mycobacterium abscessus* ATCC 19977) (Figura 10).

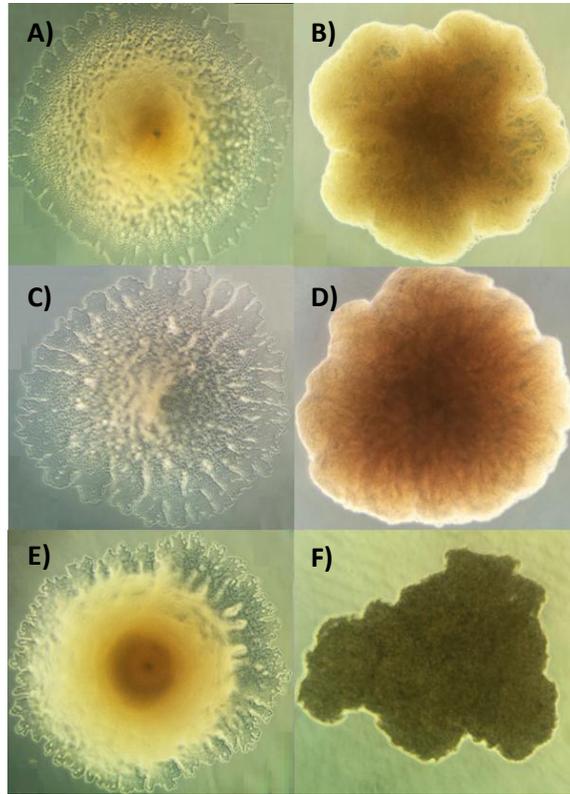


Figura 10. Morfología microscópica de colonias de MNT fenotipo liso y rugoso.
A) morfotipo rugoso y B) morfotipo liso de *Mycobacterium abscessus*; C) morfotipo rugoso y D) morfotipo liso de *Mycobacterium fortuitum*; E) Cepa lisa de referencia *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977; F) Cepa rugosa de referencia *Mycobacterium smegmatis* ATCC mc² 155 (10X)

7.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Con la finalidad de determinar el grado de rugosidad de las micobacterias estudiadas, se realizó la observación de las mismas mediante microscopía de fuerza atómica, los resultados permiten observar a detalle la superficie de las micobacterias y calcular el valor de rugosidad mediante la determinación del perfil de superficie Z es decir la altura de picos presentes en la superficie (Figura 11) (De Oliveira *et al.*, 2012). Con los resultados obtenidos a partir de las determinaciones antes mencionadas, se pudo realizar la comparación entre el nivel de rugosidad de cada cepa micobacteriana observando que la cepa con menor grado de rugosidad fue *M. abscessus* de referencia, seguida de *M. abscessus* fenotipo liso, *M. fortuitum* fenotipo liso, *M. fortuitum* fenotipo rugoso, *M. abscessus* fenotipo rugoso y *M. smegmatis* en orden creciente de rugosidad (Figuras 11 y 12).

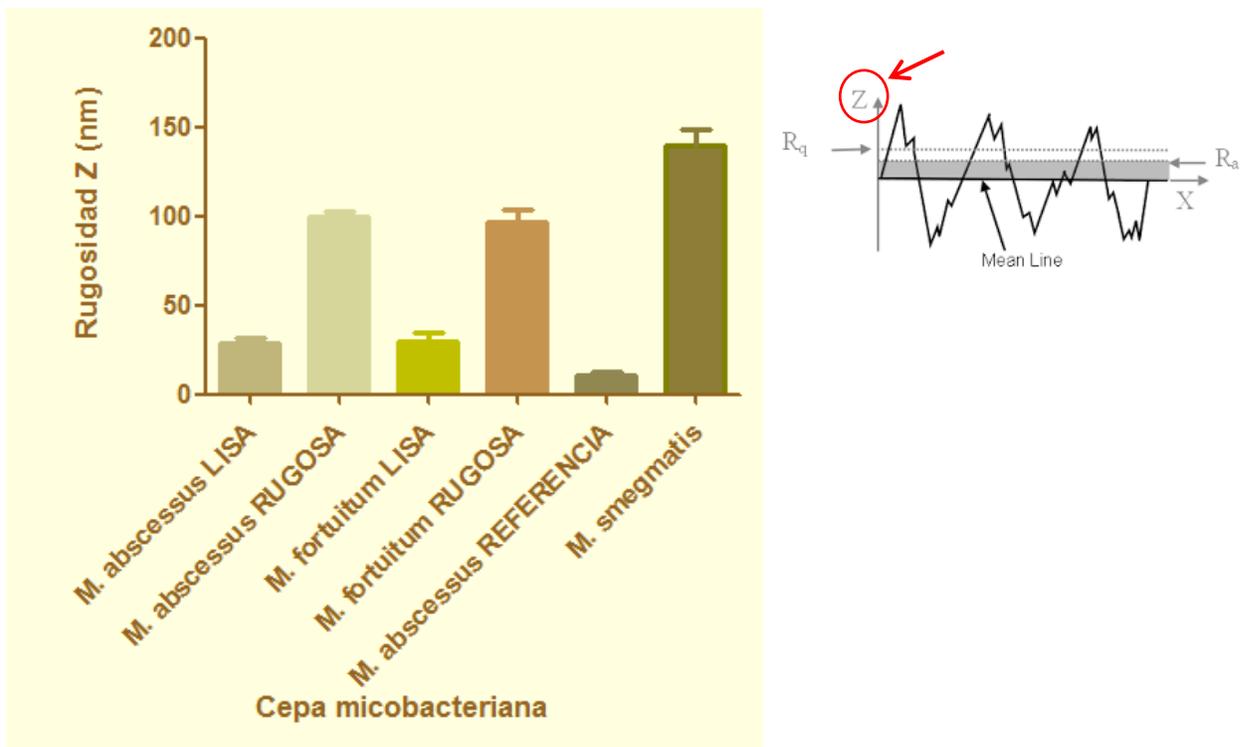


Figura 11. Rugosidad de las diferentes cepas micobacterianas. Se determinó el valor de Rugosidad Z para cada cepa micobacteriana a partir de las imágenes obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica con ayuda del programa NanoScope Analysis 1.5.

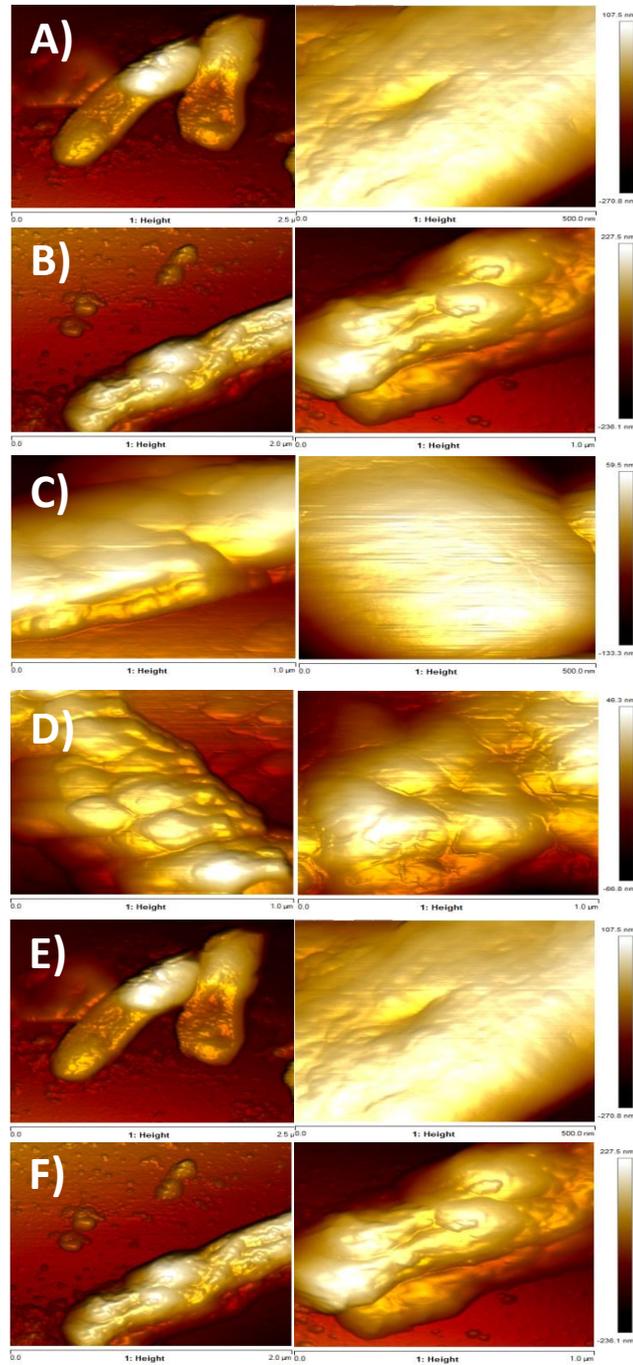


Figura 12. Imágenes de MNT obtenidas mediante AFM. A) *M. abscessus* morfotipo liso; B) *M. abscessus* morfotipo rugoso; C) *M. fortuitum* morfotipo liso; D) *M. fortuitum* morfotipo rugoso; E) *M. abscessus* de referencia; F) *M. smegmatis*

7.3 Cinéticas de infección de los cultivos de células A 549 por micobacterias

Para investigar la relación entre la morfología colonial y las características de infección y sobrevivencia intracelular, persistente, se infectaron las monocapas de células epiteliales humanas de pulmón, observando que las variantes lisas de *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum* presentaron un patrón similar causando una infección persistente y progresiva logrando una multiplicación intracelular; mientras que los valores obtenidos en las variantes rugosas demostraron que no hubo replicación intracelular en los diferentes tiempos de infección (Figuras 13 y 14).

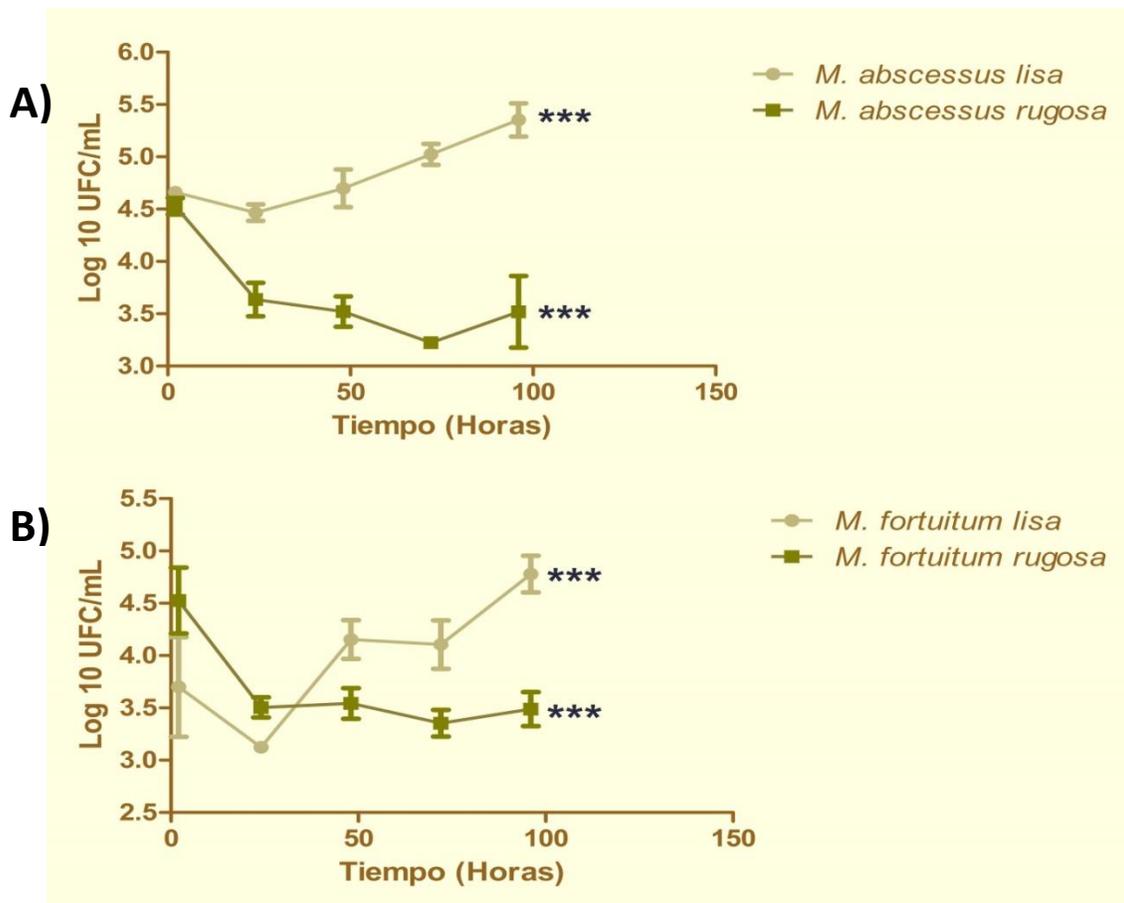


Figura 13. Cinética de infección de los morfotipos coloniales liso y rugoso de A) *M. abscessus* y B) *M. fortuitum* en células A549. Células A549 de epitelio pulmonar humano fueron infectadas con las diferentes cepas de *M. abscessus* y *M. fortuitum*. Las UFC de las bacterias obtenidas después de los lisados celulares fueron determinadas a los intervalos indicados.

***Diferencia estadística morfotipo liso vs rugoso $p < 0.001$

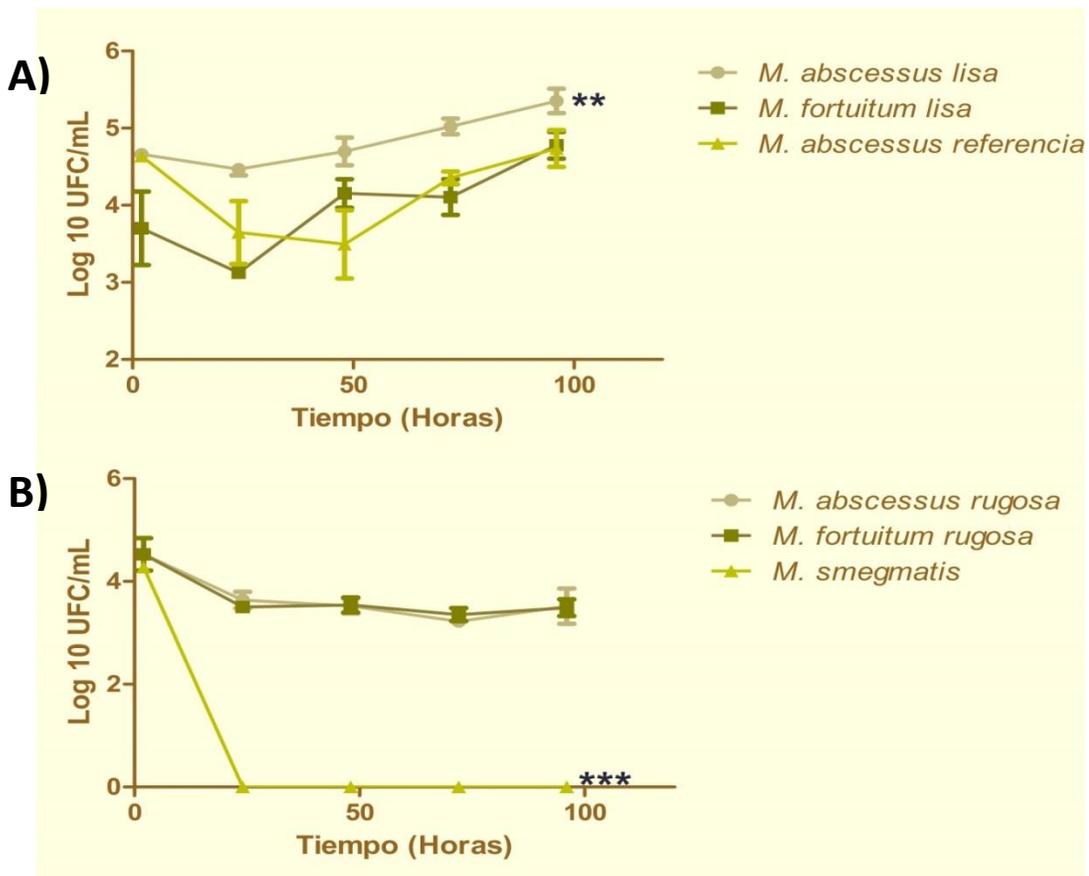


Figura 14. Cinética de infección de los morfotipos coloniales A) lisos de *M. abscessus* y *M. fortuitum* y B) rugosos de *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. smegmatis* en células A549. Células A549 de epitelio pulmonar humano fueron infectadas con las diferentes cepas de *M. abscessus*. y *M. fortuitum*. Las UFC de las bacterias obtenidas después de los lisados celulares fueron determinadas a los intervalos indicados.

**Diferencia estadística morfotipo liso de *M. abscessus* vs morfotipo liso de *M. fortuitum* y *M. abscessus* de referencia $p < 0.01$

***Diferencia estadística de *M. smegmatis* vs morfotipo rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* $p < 0.001$

En cuanto a la infectividad definida como la capacidad de la bacteria para interiorizarse en las primeras 2 horas de infección, la tendencia es la misma, los morfotipos lisos de *M. abscessus* y *M. fortuitum* presentaron un mayor grado de infectividad que los fenotipos rugosos, además se observó que el morfotipo liso de *Mycobacterium abscessus* es significativamente más infectiva que las otras micobacterias estudiadas (Figura 15).

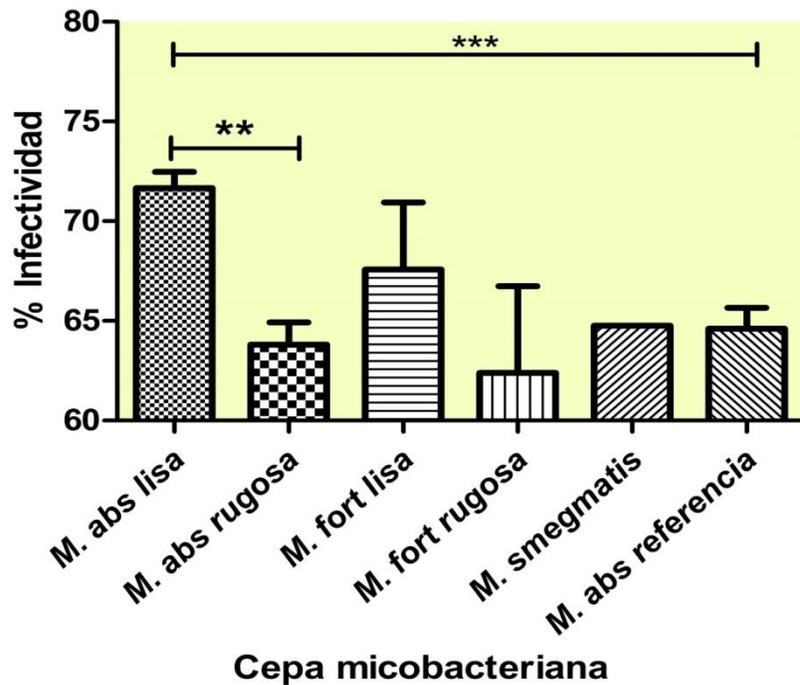


Figura 15. Infectividad de los morfotipos coloniales liso y rugoso de las cepas bacterianas utilizadas en células A549. Células A549 de epitelio pulmonar humano fueron infectadas con las diferentes cepas de *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. smegmatis*. Las UFC de las bacterias obtenidas después de los lisados celulares fueron determinadas a las 2h de infección.

*** Diferencia estadística *M. abscessus* morfotipo liso vs *M. abscessus* de referencia $p < 0.001$

** Diferencia estadística *M. abscessus* morfotipo liso vs *M. abscessus* morfotipo rugoso $p < 0.01$

7.4 Evaluación de los cambios en el rearreglo de citoesqueleto de células A549 durante la infección por los morfotipos coloniales *M. abscessus* y *M. fortuitum*, mediante inmunofluorescencia.

Los filamentos de actina en las células epiteliales se encuentran dispersos por todo el citoplasma; pero se concentran fundamentalmente por debajo de la membrana plasmática hacia la periferia celular, proporcionando apoyo mecánico y participando en la morfología celular (Alberts *et al.* 2010).

Se observó que las células epiteliales (neumocitos tipo II), de forma aislada, sin infectar (testigo) presentaron una morfología fusiforme y la disposición de los filamentos es paralela entre sí en toda la célula, formando las denominadas fibras de estrés (Alberts *et al.* 2010). Se observaron cambios morfológicos debidos a la infección por los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum*, aunque de forma general es observaron cambios más profundos con los morfotipos lisos. Se observó la pérdida de la forma original de las células, la emisión de extensiones membranales principalmente con los morfotipos lisos, y una marcada redistribución de los filamentos de actina, o pérdida de las fibras de estrés con ambos morfotipos de ambas especies (Figura 16).

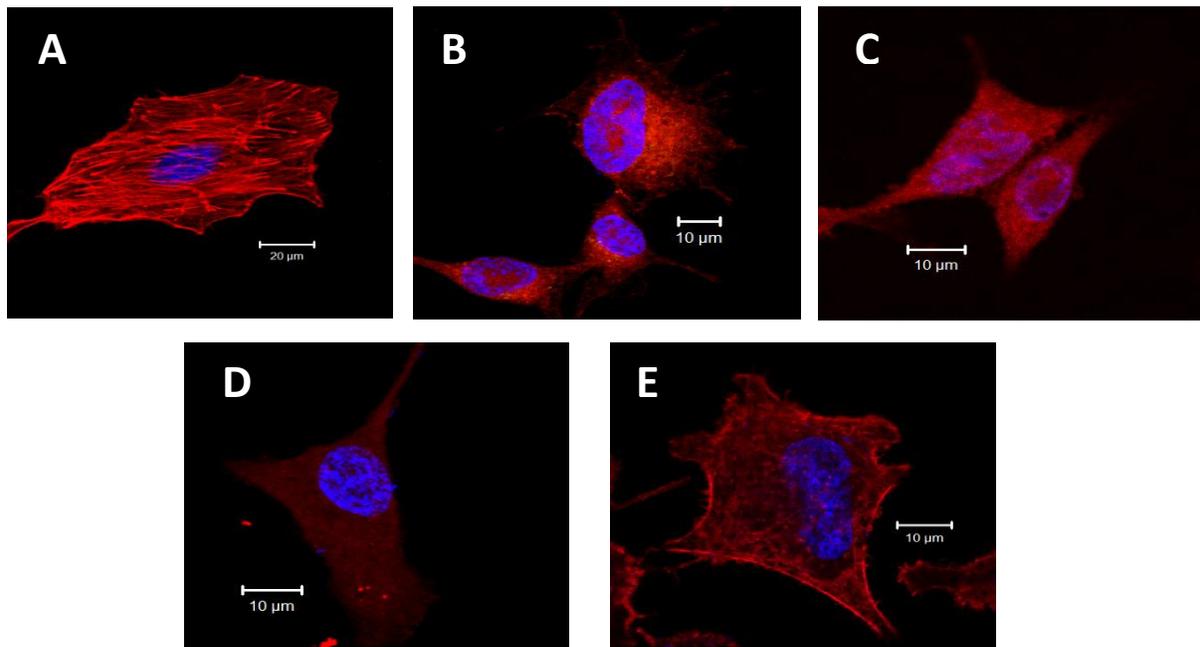


Figura 16. Distribución de los filamentos de actina en células epiteliales de pulmón humano en presencia de los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* con un tiempo de infección de 3h. A) Testigo; B) Infección con *M. abscessus* morfotipo liso; C) Infección con *M. abscessus* morfotipo rugoso; D) Infección con *M. fortuitum* morfotipo liso y E) Infección con *M. fortuitum* morfotipo rugoso.

Por otro lado, los microtúbulos compuestos por tubulina además de ayudar a mantener la forma de la célula, participan activamente en el transporte citoplásmico de partículas, tales como vesículas, organelos, cromosomas, etcétera (Alberts *et al.* 2010).

La infección con ambas especies y morfotipos de micobacterias provocaron un cambio moderado en la distribución de los microtúbulos en comparación con la distribución observada en células sin infectar (Figura 17). Sin embargo se observaron cambios en la intensidad de la tinción de estas estructuras, en especial se observó una menor tinción de los microtúbulos de las células infectadas con *M. abscessus*, mientras que en las células infectadas con *M. fortuitum* la intensidad de la tinción fue mucho menor.

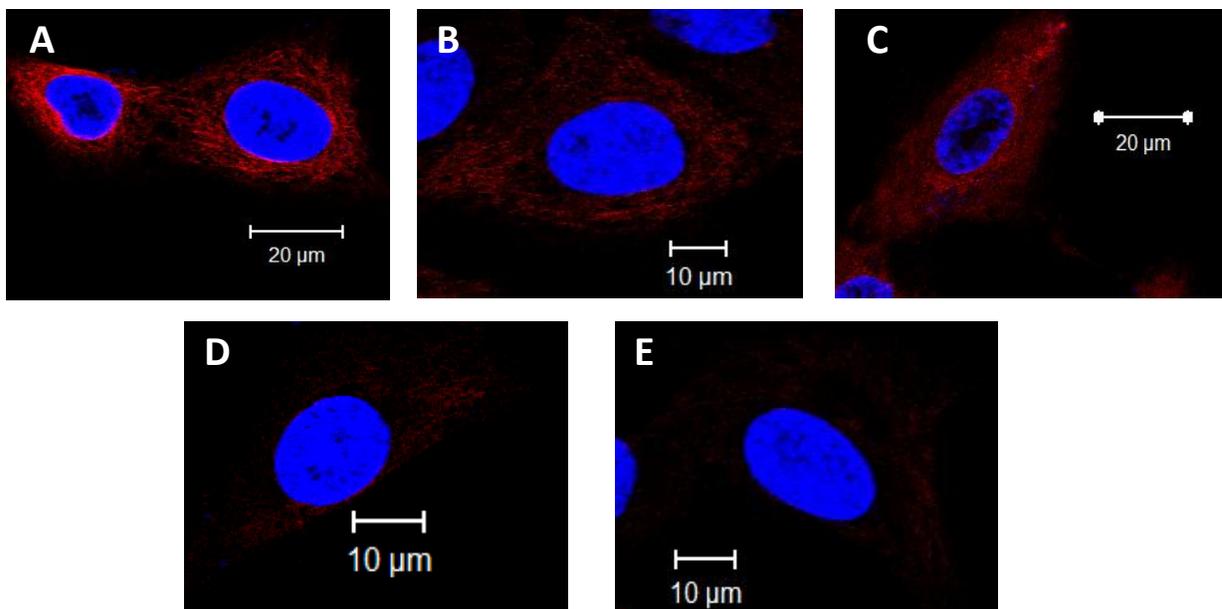


Figura 17. Distribución de los microtúbulos en células epiteliales de pulmón humano en presencia de los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* con un tiempo de infección de 3h. A) Testigo; B) Infección con *M. abscessus* morfotipo liso; C) Infección con *M. abscessus* morfotipo rugoso; D) Infección con *M. fortuitum* morfotipo liso y E) Infección con *M. fortuitum* morfotipo rugoso.

7.5 Ensayo colorimétrico para la cuantificación del Óxido Nítrico por el método de Griess.

Las monocapas de células A549 se infectaron con las diferentes cepas de micobacterias a una MOI de 10:1, se realizó una cinética de infección de 2, 6, 24 y 48h; al cumplirse cada tiempo de infección se tomó el sobrenadante y se añadió el reactivo de Griess para determinar la cantidad de NO producido durante la infección. Las lecturas se realizaron midiendo la absorbancia a 540nm.

Todas las cepas micobacterianas utilizadas provocaron una disminución en la producción de NO por las células infectadas la cual puede observarse a partir de las 24h de infección, no se apreció ninguna diferencia significativa entre fenotipos o entre especies (Figura 18).

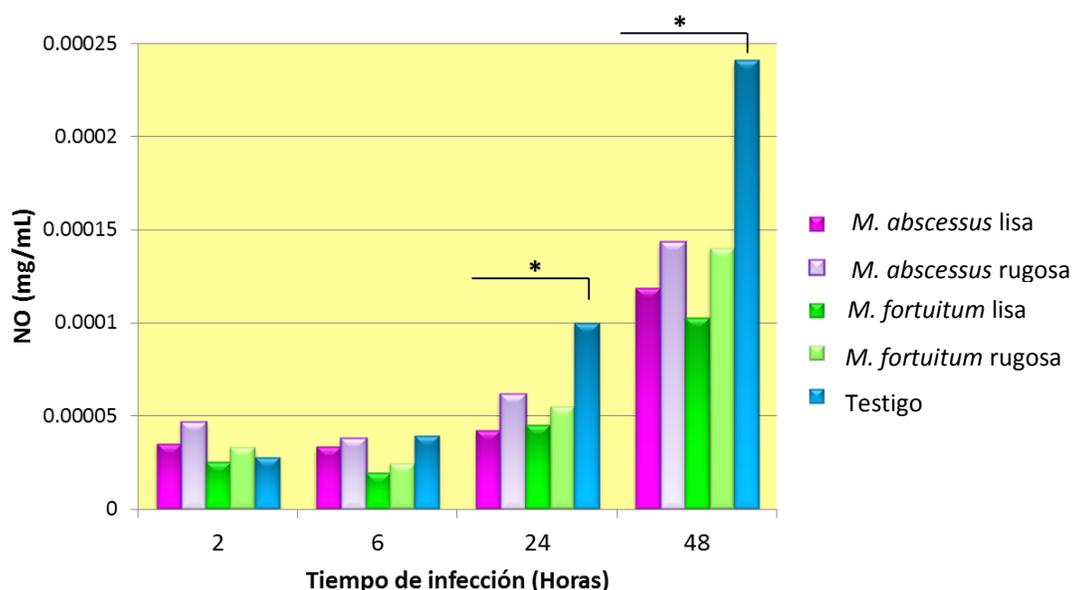


Figura 18. Producción de NO durante la infección con los morfotipos coloniales liso y rugoso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* en células A549. Células A549 de epitelio pulmonar humano fueron infectadas con las diferentes cepas de *M. abscessus*. y *M. fortuitum*. El NO producido fue determinado a los intervalos indicados.

*Diferencia estadística testigo vs cepas micobacterianas $p < 0.05$

8.0 DISCUSIÓN

Desde hace algunos años se ha reconocido la patogenicidad potencial de diversas especies de micobacterias no tuberculosas (MNT), entre ellas *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium fortuitum*, las cuales se ha observado que presentan los fenotipos liso y rugoso en sus colonias (Fregnan & Smith, 1962). Posterior a su reconocimiento como morfotipos, se ha demostrado que la morfología colonial en diversas MNT está influenciada por el glicopeptidolipido (GLP) presente en su pared celular, encontrándose en mayor proporción en las variantes lisas (Barrow & Brennan, 1982).

Estas especies de micobacterias tienen la potencialidad de pasar de un morfotipo a otro incrementando o disminuyendo la producción de GLP por un mecanismo que actualmente es desconocido, el cual se podría implicar inestabilidad genética debida a la presencia de elementos móviles como en *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium avium* (Belisle *et al.*, 1993). La hipótesis actual es que quizá el GPL solo es requerido por estas micobacterias bajo ciertas condiciones en ciertos hábitats, pero en otros no; pudiendo ser necesario para la formación de biopelículas en ambientes acuáticos, pero no determinantes para la invasión en humano.

Mycobacterium abscessus y *Mycobacterium fortuitum* al igual que *Mycobacterium tuberculosis* son patógenos intracelulares, lo que facilita el uso de estrategias para su estudio *in vitro* (líneas celulares de macrófagos y células epiteliales).

El mecanismo de patogenicidad de este tipo de micobacterias no es sabido del todo, sin embargo, trabajos realizados con modelos murinos knock-out específicos han mostrado que el interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF), son necesarios para el control de la infección por *M. abscessus* (Rottman *et al.*, 2007).

Algunos autores han asociado los morfotipos liso y rugoso de *M. abscessus* a las severidad de la infección, siendo el morfotipo rugoso el que se ha asociado a infecciones más severas (Rottman *et al.*, 2007) o a infecciones pulmonares (Jönsson *et al.*, 2007). Estudios más recientes han señalado una situación

opuesta y han cuestionado la asociación entre la virulencia y las asociación a las variantes lisas, en este sentido, en el estudio de Rüger *et al.*, (2014), demostró una recuperación casi similar de aislados lisos y rugosos de aislados de *M. abscessus*, y también encontraron que en un alto porcentaje de los casos se recuperaron aislados con ambas morfologías presentes de forma simultánea. En dicho trabajo los autores también hicieron un análisis a nivel de subespecies de las cepas de *M. abscessus* y encontraron que los aislados rugosos pertenecían a *M. abscessus* subespecie *abscessus*, mientras que la mayoría de los morfotipos lisos pertenecían a *M. abscessus* subespecie *bolletti*.

En el análisis de la morfología colonial del aislado de *M. abscessus* motivo de nuestro estudio, mostró un morfotipo liso. Esta bacteria fue recuperada de un caso de infección ocular de un paciente atendido en el Instituto para la Prevención de la Ceguera y fue donado gentilmente por la Dra. Virginia Vanzzini, este aislado ha sido analizado por nosotros y ha mostrado ser muy virulento en los estudios celulares que realizamos (García-Pérez *et al.*, 2011; Castañeda-Sánchez *et al.*, 2013), mostrando una alta capacidad infectiva y de multiplicación intracelular en los diversos modelos celulares incluyendo células endoteliales y fibroblastos. De este aislado clínico se pudo recuperar la variante rugosa a partir de un cultivo viejo (más de dos meses de crecimiento). Nuestros resultados demostraron que la variante lisa fue más infectiva y demostró una mayor multiplicidad en las células del epitelio pulmonar que el fenotipo rugoso y estos resultados concordaron con los trabajos previos del grupo (García-Pérez *et al.*, 2011; Castañeda-Sánchez *et al.*, 2013), a la fecha desconocemos si este aislado pertenece a la subespecie *bolletti*, pero estamos por realizar estudios para corroborar este punto.

Adicionalmente, las cepas de morfotipo liso se caracterizan por presentar en su superficie celular el lípido conocido como glicopeptidolípido (GPL) (Barrow & Brennan, 1982). Este metabolito es de gran importancia para la micobacteria ya que se ha asociado con su movilidad, y capacidad de formar biopelícula (Villeneuve *et al.*, 2003). Además, en otras especies de micobacterias como las del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) se ha visto una correlación entre una

mayor patogenicidad con los morfotipos lisos, propiedad que se ha atribuido a la presencia de GPL presente en las variantes lisas. Se ha descrito que los GPL de MAC, ayudan a la sobrevivencia intracelular funcionando como barrera protectora contra enzimas lisosomales o interfiriendo con la biogénesis del fagolisosoma (Vergne *et al.*, 1995). También se ha visto que algunos tipos de GPL específicos son capaces de inducir la producción de mediadores proinflamatorios como prostaglandinas, leucotrienos, IL-1 y TNF α siendo este último necesario para que se dé la infección por *M. abscessus* (Sweet & Schorey, 2006; Schorey & Sweet, 2008).

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, encaminados a la caracterización de los lípidos de los morfotipos liso y rugoso de las cepas motivo de este estudio, demostraron que la cepa lisa de *M. abscessus* presentó una mayor cantidad de glicopeptidolípidos que su contraparte rugosa; de igual manera, la variante lisa de *M. fortuitum* también presentó una mayor cantidad y variedad de glicopeptidolípidos y glicolípidos que su variante rugosa (Catalán-González, 2015). Las observaciones de Catalán-González (2015), podrían sustentar la participación de estos lípidos en la sobrevivencia bacteriana mostrada por los morfotipos lisos en nuestro modelo de estudio.

La fisiología pulmonar alterada de los pacientes con fibrosis quística, la hace particularmente susceptible a la colonización por bacterias formadoras de *biofilm*, la colonización crónica por micobacterias de las especies *M. fortuitum* y especialmente *M. abscessus*, en los pulmones de esos pacientes, puede estar favorecida para cepas con fenotipo liso debido a la expresión de GPL y su formación de *biofilm*, mientras que la cepa rugosa de estas especies puede emerger posteriormente en pacientes con fibrosis quística crónicamente colonizados con la variante lisa (Boucher, 2004; Howard *et al.*, 2006; Rüger *et al.*, 2014). Por estas razones, pudiera ser probable que al trabajar con una línea celular epitelial pulmonar, la cual representa la primera barrera del pulmón contra patógenos, sea mayormente susceptible a variantes capaces de establecer la infección primaria como es el caso de las cepas formadoras de *biofilm*.

Cabe destacar que a todo lo anterior se suma la variedad de glicopeptidolípidos que son específicos de los serotipos, los cuales pueden depender de modificaciones en la región carbohidrato de la molécula, en MAC se ha estudiado la diferencia en los tipos de GPL entre serovares, sin embargo en los casos de *M. abscessus* y especialmente en el caso de *M. fortuitum*, aún falta mucho por esclarecer tanto en su composición de lípidos como en su participación en la patogénesis (Chatterjee & Khoo, 2001).

La endocitosis es un proceso que involucra la participación de diferentes elementos celulares para poder interiorizar en la célula líquidos y partículas (Alberts *et al.*, 2010). En las células eucariontes se han reportado diferentes tipos de endocitosis de elementos particulados (como bacterias o levaduras), como la fagocitosis y la macropinocitosis los cuales requieren la participación de proteínas del citoesqueleto (Alberts *et al.*, 2010). Trabajos anteriores han demostrado que la macropinocitosis es el mecanismo principal que utilizan diversas micobacterias tuberculosas y no tuberculosas para internalizarse en células no fagocíticas, como las células de epitelio pulmonar en el que los filamentos de actina intervienen de manera importante durante este proceso (García-Pérez *et al.*, 2011; Baltierra-Uribe *et al.*, 2014).

Al infectar la línea celular modelo de estudio de este trabajo (células epiteliales pulmonares de humano, A549) con ambos morfotipos de las MNT, se observó que en todos los casos se perdió la distribución paralela y ordenada de los filamentos de actina (fibras de estrés) (Narumiya *et al.*, 1997). Aunque los cambios en el citoesqueleto de actina se observaron con todas las infecciones, los cambios fueron más evidentes en la infección con *M. abscessus* morfotipo liso, y el morfotipo rugoso de *M. fortuitum*, perdiéndose la forma celular y observándose la formación de protrusiones membranales de manera importante con el morfotipo liso de *M. abscessus* (Figura 17). Estos cambios sugieren que es probable que se esté llevando a cabo el mecanismo de macropinocitosis y que éste mecanismo sea el responsable de la interiorización bacteriana, aunque no se descartan otros

mecanismos de interiorización, como la endocitosis en caveosomas (Baltierra-Urbe *et al.*, 2014).

Los microtúbulos también mostraron un cambio discreto el cual se ha observado anteriormente durante la infección con *M. abscessus* y otras especies de micobacterias como *M. tuberculosis* (Baltierra-Urbe *et al.*, 2014).

La asociación entre la producción de NO y el citoesqueleto es crítica para las células epiteliales y endoteliales, se considera que interviene durante el proceso de polimerización de actina y tubulina (Su *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2005), por lo que puede explicarse la disminución en la producción de este metabolito durante la infección con las cepas micobacterianas ya que al haber una marcada pérdida en la forma celular debido a la despolimerización de actina y a la modificación la estructura de la tubulina ocasionada por las micobacterias.

9.0 CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar una técnica de medición y visualización microscópica del grado de rugosidad de micobacterias utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM).
- El morfotipo liso de *M. abscessus* y *M. fortuitum* es más infeccioso y presenta mayor capacidad de multiplicación intracelular que su variante rugosa en células epiteliales de pulmón humano.
- La infección con ambos morfotipos de *M. abscessus* y *M. fortuitum* ocasiona una redistribución de los filamentos de actina y de los microtúbulos en células A549.
- Ambos morfotipos de las especies de NTM estudiadas provocan una disminución en la producción de óxido nítrico en células epiteliales de pulmón lo cual correlaciona con la despolimerización de los filamentos de actina y la incapacidad de eliminar a las micobacterias por parte de la célula.

10.0 REFERENCIAS

1. Ade Kambi T, Drancourt M. 2004. *Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hap65, soda, recA and rpoB gene sequencing*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54; 2095-2105.
2. Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith y Walter Peter. 2010. *Biología Molecular de la Célula*. 5ª ed. Editorial Omega ISBN : 9788428215077.
3. Bailey & Scott. 2007. *Diagnóstico Microbiológico*. 12a ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. p. 478-486.
4. Baltierra-Uribe Shantal Lizbeth, García-Vasquez Manuel de Jesús, Castrejón-Jiménez Nayeli, Estrella-Piñón Mayra Patricia, Luna-Herrera Julieta, García-Pérez Blanca Estela. 2006. *Mycobacteria entry and trafficking into endothelial cells*. Can. J. Microbiol. 60: 1-9.
5. Bar On Ophir, Musaffi Huda, Mei Meir, Prais Dario, Steuer Guy, Stafler Patrick, Hananya Shai, Blau Hannah. 2015. *Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis*. Journal of Cystic Fibrosis 14:2015, 53-62.
6. Barrow, W. W. & Brennan, P. J. (1982). *Isolation in high frequency of rough variants of Mycobacterium intracellulare lacking C-mycoside glycopeptidolipids antigens*. J Bacteriol 150, 381–384.
7. Belisle, J. T., K. Klaczkiwicz, P. J. Brennan, W. R. Jacobs, Jr., and J. M. Inamine. 1993. *Rough morphological variants of Mycobacterium avium. Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression*. The Journal of Biological Chemistry. 268:10517–10523.
8. Belisle, J.T. (1993) *Rough morphological variants of Mycobacterium avium. Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression*. J. Biol. Chem. 268, 10517–10523
9. Bodil Jönsson, Malin Ridell. 2012. *Phagocytosis and cytokine response to rough and smooth colony variants of Mycobacterium abscessus by human peripheral blood mononuclear cells*. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 121, 45-55.

10. Boucher R. C. 2004. *New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease*. Eur Respir J. 23:, 146–158.
11. Brown Elliot Barbara A., Wallace Richard J. 2002. *Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria*. Clinical Microbiology Reviews. 15: 716–746.
12. Brown Elliot Barbara A., Wallace Richard J. 2009. *Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria*. p. 589-596.
13. Byrd Thomas F., Ricklyons C. 1999. *Preliminary Characterization of a Mycobacterium abscessus Mutant in Human and Murine Models of Infection*. Infection and Immunity. 67:4700-4707
14. Castañeda-Sánchez JI, García Pérez BE, Muñoz-Duarte AR, Baltierra-Uribe SL, Mejía-López H, López-López C, Bautista-De Lucio VM, Robles-Contreras A, Luna-Herrera J. 2013. *Defensin production by human limbo-corneal fibroblasts infected with micobacteria*. Pathogens. 2(1):13-32.
15. Catalán-González Lucero. 2015. *Estudios químicos y biológicos de lípidos de Mycobacterium abscessus y Mycobacterium fortuitum*. Tesis de Licenciatura ENCB, IPN. México.
16. Catherinot E., Clarissou J., Etienne G., Ripoll F., Emile F., Daffé M., Perronne C., Soudais C., Gaillard J., Rottman M. 2007. *Hypervirulence od a Rough Variant of Mycobacterium abscessus Type Strain*. Infection and Immunity. 1057-1058.
17. Chatterjee D, Khoo KH. 2001. *The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: Structures and biological properties*. Cell Mol Life Sci. 58:2018–2042.
18. Dancker P., Low I., Hasselbach W., Wieland TH. 1975. *Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin*. Biochimica et Biophysica 400, 407-414
19. De Oliveira R., Albuquerque D., Yamaji F., Leite F. 2012. *Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications, Atomic Force Microscopy – Imaging*. InTech. ISBN 978-953-51-0414-8.

20. Esteban Jaime, Gadea Ignacio, Zamora Nieves, Ortiz Alberto, Fernández-Roblas Ricardo. 2006. *Evaluación de la capacidad invasiva de las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido mediante el estudio de la morfología de las microcolonias en fibroblastos*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24, 551-555.
21. Falkinham, J. O. III. 1996. *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria*. *Clinical Microbiology Reviews*. 9:177–215.
22. Fregnan, G. B. & Smith, D. W. (1962). *Description of various colony forms of mycobacteria*. *J Bacteriol* 83, 819–826.
23. García-Pérez BE, Villagómez-Palatto DA, Castañeda-Sánchez JI, Coral-Vázquez RM, Ramírez-Sánchez I, Ordoñez.Razo RM, Luna-Herrera J. 2011. *Innate response of human endothelial cells infected with mycobacteria*. *Inmunobiology*. 216:925-935.
24. Griffith David E, Wallace Richard J. 1993. *Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing micobacteria: an analysis of 154 patients*. *Am Rev. Respir. Dis*. 1993; 147-1271.
25. Griffith David E., Aksamit Timothy, Brown Elliot Bárbara A., Catanzaro Antonino, Daley Charles, Grodin Fred, Holland Ateven, Horsburgh Robert, Hultt Gwen, Iademarco Michael, Iseman Michael, Olivier Kenneth, Ruoss Stephen, Wallace Richard J., Winthrop Kevin. 2007. *An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Preventios of Nontuberculous Mycobacterial Diseases*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 175; 367-416.
26. Howard Susan T., Recht Elizabeth, Recht Judith, Pang Xiuhua, Alsup Anny, Kolter Roberto, Lyons Rick, Byrd Thomas F. 2006. *Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype*. *Microbiology*, 152, 1581-1590.
27. Jönsson Bodil E., Gilljam Marita, Lindblad Anders, Ridell Malin, Wold Agnes E., Welinder-Olsson Christina. 2007. *Molecular Epidemiology of Mycobacterium abscessus, with Focus on Cystic Fibrosis*. *Journal of Clinical Mycobiology*. 45:5 1497-1504.

28. Lee Mary. 2009. *Basic Skills in interpreting laboratory data*. 4a ed. American Society of Health-System Pharmacist, Inc. U.S. p. 426-429.
29. Martinez A, Torello S, Kolter R. 1999. *Sliding motility in mycobacteria*. Journal of Bacteriology. 181:7331–7338.
30. Medjahed Halima, Gaillard Jean L., Reyrat Jean M. 2009. *Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field*. Trends in Microbiology. 18:3 117-123.
31. Narumuya Shuh, Ishizaki Toshimasa, Watanabe Naoki. 1997. *Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton*. FEBS Letters. 410 68-72.
32. Nessar Rachid, J Reyrat Jean-Marc, Davidson Lisa B., Byrd Thomas F. 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. 157:1187–1195.
33. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller .*Medical microbiology*, 6a ed. Elsevier. Washington, D.C.
34. Pfyffer Gaby E., Brown Barbara A., Wallace Richard J. Wallace. 2009. *Mycobacterium: General characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*. p. 543-586. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller .*Medical microbiology*, 6a ed. Elsevier. Washington, D.C.
35. Recht J, Martinez A, Torello S, Kolter R. 2001. *Sliding motility and biofilm formation in mycobacteria*. Acta Científica Venezolana. 52:45–49.
36. Restrepo Angela M., Robledo Jaime, Leiderman Eduardo W., Restrepo Marcos I., Botero David, Victoria Bedoya Inés. 2003. *Enfermedades Infecciosas*. 6ª ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. p. 491-506.
37. Rom William N., Garay Stuart M.. 2004. *Tuberculosis*. 2a ed. Lippincott Williams &Wilkins. USA. p 584.
38. Rottman, M., Catherinot Emile, Hochedez Patrick, Emile Jean Francois, Casanova Laurent, Gaillard Jean Luois, Soudais Claire. 2007. *Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower Mycobacterium abscessus in C57BL/6 mice*. Infect. Immun. 75, 5898–5907

39. Ruger Kai, Hampel Annegret, Billing Sandra, Rucker Nadine, Suerbaum Sebastian, Bange Franz-Cristoph. 2014. *Characterization of Rough and Smooth Morphotypes of Mycobacterium abscessus Isolates from Clinical Specimens*. Journal of Clinical Microbiology. 52:1 244-250.
40. Schorey Jeffrey S, Sweet Lindsay. 2008. *The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis*. Glycobiology.18: 832–841.
41. Shastri Set R, J.2011. *Laboratory aspects of clinically significant rapidly growing mycobacteria*. Indian Journal of Medical Microbiology. 29:343-52.
42. Stahl David A., Urbance John W. 1990. *The Division between Fast- and Slow-Growing Species Corresponds to Natural Relationships among the Mycobacteria*. Journal of Bacteriology. 172:116-124.
43. Su Y., Edwards-Bennett S., Bubb M.R., Block E.R. 2003. *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284: 1542–1549.
44. Su Y., Kondrikov, D., Block E.R. 2005. *Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase*. Cell Biochem. Biophys. 43, 439–449.
45. Sweet Lindsay, Schorey Jeffrey S. 2006. *Glycopeptidolipids from Mycobacterium avium promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner*. J Leukoc Biol. 80:415–423
46. Todd P. Primm, Christie A. Lucero, and Joseph O. Falkinham III. 2004. *Health Impacts of Environmental Mycobacteria*. Clinical Microbiology Reviews. 17:98–106.
47. Tortora, Funke, Case. 2007. *Introducci3n a la Microbiologa*.9^a ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. p. 334.
48. Vergne I, Prats M, Tocanne JF, Laneelle G. 1995. *Mycobacterial glycopeptidolipid interactions with membranes: A monolayer study*. FEBS Lett. 375:254-258.
49. Villeneuve, Christelle. Gilles Etienne, Abadir Valérie, Montrozier Henri, Bordier Christine, Laval Francoise, Daffe Mamadou, Maridonneau Isabelle, Dequeker Catherine. 2003. *Surface-exposed glycopeptidolipids of Mycobacterium*

smegmatis specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. J. Biol. Chem. 278, 51291–51300

50. Weiss Curtis h., Glassroth Jeffrey. 2012. *Pulmonary disease caused by nontuberculous micobacteria*. Expert Rev. Respir. Med. 6:6, 597-613.

11.0 ANEXOS

1) Caldo Middlebrock 7H9

Medio de cultivo	4.7g
Tween 80	0.5mL
Glicerol	2.0mL
Agua Destilada	900mL

Mezclar perfectamente los ingredientes. Esterilizar a 121-124°C por 10 minutos.

2) Agar Middlebrock 7H11

Medio de cultivo	19g
Glicerol	5mL
Agua destilada	900mL

Mexclar perfectamente los ingredientes. Esterilizar a 121-124°C por 10 minutos.

3) Solución salina balanceada de Hanks (HBSS)

- A 900mL de agua destilada adicional el contenido de sales, agitar hasta disolver, sin calentar.
- Adicionar 0.35g de bicarbonato de sodio (SIGMA®).
- Ajustar el pH agitamdo la mezcla 0.1 a 0.3 unidades de pH por debajo del valor deseado. Usar HCl o NaOH 1N.
- Aforar a 1L con agua destilada.
- Esterilizar por filtración de membrana 0.22µm de diámetro de poro.
- Hacer alícuotas en contenedores estériles.
- Almacenar hasta su uso a 2-8°C.

4) Verseno

EDTA	0.05g
NaCl	0.80g
KCl	0.02g

Na₂HPO₄·12H₂O 0.29g

Glucosa 0.02g

Agua destilada 100mL

Agitar hasta disolver los componentes y esterilizar a 15lb de presión durante 15min.

5) Tripsina 5%

Tripsina (SIGMA®) 1g

Agua destilada 20mL

Agitar hasta disolver y esterilizar por filtración utilizando una membrana 0.22µm de diámetro de poro.

6) Tripsina-verseno

Tripsina 5% 1mL

Verseno 100mL

En condiciones asépticas adicionar la solución de tripsina al verseno.

7) Penicilina-gentamicina

Gentamicina 50µg/mL

Penicilina 100U/mL

Aforar a un volumen final de 4mL con agua destilada, esterilizar por filtración (0-22µm Ø)

8) BSA 1%

PBS 100mL

Albúmina sérica bovina 1g

Disolver por agitación suave.

9) Paraformaldehído 4%

PBS 10mL

Paraformaldehído 0.4g

Calentar 4 segundos en horno de microondas y agregar gota a gota NaOH 1N hasta disolver.

10) Tritón X-100 al 0.2%

PBS 10mL

Tritón X-100 0.02mL

Disolver por agitación.

11) Azul de tripano

PBS 10mL

Azul de tripano 0.04g

Agitar hasta disolver los componentes.

12) Reactivos de Griess

a) Solución A

Sulfanilamida 1g

Agua destilada 100mL

Calentar hasta solubilizar.

b) Solución B

N-(1-naftil) etilendiamina 0.1g

Ácido fosfórico 2.5% 100mL

Disolver por agitación suave.