



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Departamento de Genética y de Microbiología

Facultad de Ciencias

**Estudio de la formación de cuerdas microscópicas en el género  
*Mycobacterium* y su implicación en la virulencia de  
*Mycobacterium abscessus***

**Cecília Helena Toledo Brambilla**

**2015**

---

---

---



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Departamento de Genética y de Microbiología

Facultad de Ciencias

**Estudio de la formación de cuerdas microscópicas en el género  
*Mycobacterium* y su implicación en la virulencia de  
*Mycobacterium abscessus***

Trabajo realizado para optar al grado de Doctora en Microbiología por  
la Universidad Autónoma de Barcelona, por Cecília Helena Toledo Brambilla.

VºBº de la Directora de la tesis,

**Dra. Marina Luquin Fernández**

**Bellaterra, Septiembre de 2015**

---

---

---

---

A Pol, a Marc y a Xavi

---

---

---

---

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

Louis Pasteur

---

---

---

---

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>ÍNDICE TABLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ACRÓNIMOS</b> .....	<b>11</b>
<b>PRESENTACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>PRESENTATION</b> .....	<b>17</b>
<b>A.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
A.1. Género <i>Mycobacterium</i> .....	21
A.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
A.3. Tuberculosis .....	23
A.4. Pared celular de las micobacterias .....	24
A.4.1. Peptidoglicano .....	26
A.4.2. Arabinogalactano .....	26
A.4.3. Ácidos micólicos .....	27
A.4.4. Lípidos libres .....	29
A.4.4.1. Menaquinonas y dimicocerosatos de tiocerol .....	29
A.4.5. Glicolípidos libres .....	30
A.4.5.1. Acetiltrehalosa .....	30
A.4.5.1.1. Dimicolato de trealosa y monomicolato de trealosa .....	30
A.4.5.1.2. Diaciltrehalosa y triaciltrehalosa .....	31
A.4.5.1.3. Sulfolípidos .....	32
A.4.5.2. Lipooligosacáridos .....	33
A.4.5.3. Glicolípidos fenólicos .....	33
A.4.5.4. Glicopeptidolípidos .....	33
A.4.5.5. Fosfatidilinositolmanosido .....	35
A.4.5.6. Lipoarabinomanano y lipomanano .....	35
A.5. La resistencia a los antibióticos en el género <i>Mycobacterium</i> .....	35
A.6. Estudio de la virulencia .....	36

---

A.6.1. La virulencia y la formación de cuerdas .....	36
A.6.2 La virulencia y la morfología colonial.....	38
A.7. Micobacterias no tuberculosas .....	41
A.8. <i>Mycobacterium abscessus</i> complex .....	43
A.8.1. <i>Mycobacterium abscessus</i> (sensu strictu).....	43
A.9. Motilidad .....	46
A.10. Interacción macrófago - micobacteria .....	47
A.11. Citocinas .....	47
A.11.1. Factor de necrosis tumoral .....	48
A.11.2. Interleucina-6.....	49
A.12. Justificación .....	50
<b>B. OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>C. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
C.1. Microorganismos .....	57
C.1.1. Condiciones de cultivo .....	58
C.1.2. Mantenimiento de las cepas.....	58
C.2. Medios de cultivo y tampones .....	59
C.2.1. Middlebrook 7H9 suplementado con ADC .....	59
C.2.2. Middlebrook 7H10 suplementado con OADC.....	60
C.2.3. TSB - triptona y soja caldo .....	60
C.2.4. TSA - triptona y soja agar.....	60
C.2.5. Medio de cultivo para la prueba de motilidad .....	61
C.2.6. Tampón fosfato salino .....	61
C.2.7. Tampón carbonato de sodio / bicarbonato de sodio.....	61
C.3. Análisis de la morfología colonial .....	62
C.4. Análisis de la formación de cuerdas microscópicas .....	62
C.4.1. Microscopía óptica - tinción de Ziehl Neelsen .....	63
C.4.2. Microscopia electrónica de barrido.....	63
C.5. Análisis del patrón de los ácidos micólicos.....	64
C.5.1. Extracción de AM - metanólisis ácida .....	64

---

C.5.2. Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía de capa fina analítica .....	65
C.5.3. Precipitación de los ésteres metílicos en metanol frío.....	65
C.5.4. Aislamiento del $\alpha$ -micolatos .....	65
C.5.5. Purificación de ésteres metílicos por cromatografía en columna .....	66
C.6. Análisis de la presencia de GPL.....	67
C.7. Extracción del TDM .....	67
C.8. Precipitación del TDM en metanol frío.....	68
C.9. Purificación del TDM por cromatografía de columna.....	68
C.10. Análisis de los ésteres metílicos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	69
C.11. Crecimiento de <i>M. abscessus</i> .....	70
C.12. Motilidad .....	71
C.13. Resistencia a la desecación .....	71
C.14. Susceptibilidad a antibióticos.....	72
C.14.1. Procedimiento para la placa Sensititre RAPMYCOI (Termo Scientific) .....	72
C.14.2. Sistema de macrodilución en caldo Mueller-Hinton para ensayo de sensibilidad a la gentamicina.....	73
C.15. Preparación de la suspensión bacteriana para infectar el cultivo de macrófagos .....	75
C.16. Análisis del tamaño de los agregados en la suspensión bacteriana y dentro de los macrófagos infectados para evaluar la capacidad de los macrófagos de fagocitar bacilos aislados o agregados.....	76
C.16.1. Condiciones de captación y análisis de las imágenes .....	76
C.17. Línea celular .....	77
C.17.1. Cultivo celular.....	78
C.17.2. Controles de contaminación por micoplasma.....	78
C.17.3. Congelación de las células eucariotas .....	78
C.17.4. Descongelación de las células eucariotas.....	78

---

C.17.5. Pases celulares .....	79
C.17.6. Preparación de las células .....	80
C.18. Infección de los macrófagos .....	80
C.19. Ensayo de fagocitosis.....	81
C.19.1. Condiciones de captación y análisis de las imágenes .....	81
C.20. Viabilidad de los macrófagos infectados .....	82
C.20.1. Viabilidad - Azul Tripano .....	82
C.20.2. Viabilidad – CLSM .....	84
C.20.2.1. Condiciones de captación y análisis de las imágenes.....	84
C.20.3. Viabilidad – cristal violeta .....	85
C.21. Análisis microscópica de la interacción macrófago – micobacteria .....	86
C.21.1. Microscopia óptica .....	86
C.21.2. Microscopia electrónica de barrido.....	86
C.21.3. Microscopia electrónica de transmisión.....	87
C.21.3.1. Estudio de las bacterias en el interior del macrófago .....	88
C.22. Actividad biológica del TDM de <i>M. abscessus</i> para evaluar si el tamaño de los agregados bacterianos puede afectar la respuesta inmune de los macrófagos .....	88
C.22.1. Recubrimiento de las microesferas con TDM.....	89
C.22.2. Comprobación del recubrimiento .....	89
C.22.3. Microesferas en contacto con los macrófagos .....	89
C.23. Análisis de la inducción de citocinas .....	90
C.24. Análisis estadístico y gráficas .....	90
C.25. Reactivos, Disolventes .....	91
<b>D.RESULTADOS .....</b>	<b>93</b>
D.1. Análisis de la morfología colonial de las diferentes cepas.....	95
D.2. Análisis de la formación de cuerdas microscópicas .....	96
D.3. Análisis del patrón de los ácidos micólicos por CCF .....	108
D.4. Análisis de la presencia de GPL.....	110
D.5. Análisis de los ésteres metílicos por resonancia magnética nuclear .....	111

---

D.6. Curva de crecimiento de <i>M. abscessus</i> .....	114
D.7. Motilidad .....	117
D.8 Resistencia a la desecación .....	119
D.9. Estudio de sensibilidad a los antibióticos .....	121
D.10. Análisis del tamaño de los agregados en la suspensión bacteriana y dentro de los macrófagos infectados para evaluar la capacidad de los macrófagos de fagocitar bacilos aislados o agregados.....	124
D.11. Ensayo de fagocitosis.....	126
D.12. Viabilidad de los macrófagos.....	128
D.12.1. Viabilidad - Azul Tripano .....	128
D.12.2. Viabilidad – CLSM.....	130
D.12.3. Viabilidad – Cristal Violeta.....	133
D.13. Análisis microscópica de la interacción macrófago – micobacteria .....	134
D.13.1 Microscopia óptica .....	135
D.13.2. Microscopia electrónica de barrido.....	137
D.13.3. Microscopia electrónica de transmisión.....	139
D.13.3.1. Estudio de las bacterias en el interior de los macrófagos .....	140
D.14. Análisis de la inducción de citocinas por las diferentes cepas de <i>M. abscessus</i> .....	144
D.15. Actividad biológica del TDM de <i>M. abscessus</i> para evaluar si el tamaño de los agregados bacterianos puede afectar la respuesta inmune de los macrófagos .....	145
<b>E. DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>F. CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>G. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>165</b>
<b>H. ANEXOS.....</b>	<b>187</b>
<b>I. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>191</b>

---

## ÍNDICE TABLAS

Tabla A.1. Clasificación científica del Género <i>Mycobacterium</i> .....	21
Tabla A.2. Diferentes especies de micobacterias y las enfermedades clínicas que producen con mayor frecuencia .....	42
Tabla C.1. Diferentes cepas utilizadas en este estudio .....	57
Tabla C.2. Condiciones de cultivo .....	58
Tabla C.3. Referencia de la placa Sensititre RAPMYCOI .....	74
Tabla C.4. Criterios para evaluar el aislamiento o agregación de los bacilos en la suspensión bacteriana .....	77
Tabla C.5. Reactivos y disolventes utilizados.....	91
Tabla D.1. Relaciones molares relativas de las fracciones moleculares <i>cis</i> doble enlace, <i>trans</i> doble enlace, <i>cis</i> ciclopropano, <i>trans</i> ciclopropano de los ésteres metílicos de los ácidos micólicos de <i>M. abscessus</i> .....	114
Tabla D.2. Resistencia a los antibióticos de las diferentes variantes de <i>M. abscessus</i> .....	122
Tabla D.3. Porcentaje de bacilos aislados o formando agregados en la suspensión bacteriana y dentro de los macrófagos infectados .....	125

## ÍNDICE FIGURAS

Figura A.1. Las tasas de incidencia estimadas de tuberculosis, 2013 .....	23
Figura A.2. Progresión histológica del granuloma humano de la tuberculosis .....	25
Figura A.3. Pared celular del género <i>Mycobacterium</i> .....	26
Figura A.4. Estructura general de los ácidos micólicos .....	27
Figura A.5. Estructura de los diferentes tipos de ácidos micólicos.....	29
Figura A.6. Estructura del TDM .....	31
Figura A.7. Formación de cuerdas en el género <i>Mycobacterium</i> .....	37
Figura A.8. Estructura de los ácidos $\alpha$ -micólicos.....	38
Figura A.9. Diferentes morfologías coloniales de <i>M. abscessus</i> .....	39
Figura C.1. Imagen de la cámara de Neubauer con una suspensión de macrófagos.....	83
Figura D.1. Morfología colonial de las diferentes cepas crecidas en 7H10 .....	95
Figura D.2. Morfología colonial de las diferentes cepas de <i>M. abscessus</i> .....	96
Figura D.3. Diferentes morfologías coloniales de la cepa 44196S de <i>M. abscessus</i> .....	96
Figura D.4. Formación de cuerdas microscópicas de las diferentes micobacterias .....	98
Figura D.5. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M. brumae</i> .	99
Figura D.6. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M. fallax</i> ...	100
Figura D.7. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M. bovis</i> BCG Japan .....	101
Figura D.8. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M. marinum</i> .....	102
Figura D.9. MEB micrografías muestran los bacilos no alineados de las cepas lisas .....	103
Figura D.10. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M.</i> <i>abscessus</i> 390R.....	104
Figura D.11. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M.</i> <i>abscessus</i> 44196R.....	105
Figura D.12. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M.</i> <i>abscessus</i> BE37R.....	106

---

Figura D.13. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de <i>M. abscessus</i> BE48R.....	107
Figura D.14. Patrón de los ácidos micólicos de las diferentes micobacterias .....	108
Figura D.15. CCF del patrón de ácidos micólicos de las diferentes variantes de <i>M. abscessus</i> .....	109
Figura D.16. CCF del extracto crudo de las diferentes cepas de <i>M. abscessus</i> ..	110
Figura D.17. Espectro <sup>1</sup> H-NMR de los α-micolatos purificados por CCF.....	112
Figura D.18. Espectro <sup>1</sup> H-NMR de los metil éster de los ácidos micólicos purificados de <i>M. abscessus</i> .....	113
Figura D.19. Curva de crecimiento.....	115
Figura D.20. Correlación lineal entre la turbidez y CFU/ml para la cepa 44196S .....	116
Figura D.21. Correlación lineal entre la turbidez y CFU/ml para la cepa 44196R .....	116
Figura D.22. Motilidad de las colonias de las diferentes variantes lisa y rugosa en medio semi-sólido .....	118
Figura D.23. Resistencia a la desecación de las diferentes variantes de <i>M. abscessus</i> .....	120
Figura D.24. Estudio de sensibilidad a los antibióticos mediante método de microdilución .....	121
Figura D.25. Estudio de sensibilidad a gentamicina mediante método de microdilución. ....	123
Figura D.26. CLSM imágenes muestran las bacterias aisladas o formando agregados en la suspensión bacteriana.....	125
Figura D.27. <i>M. abscessus</i> fagocitado por los macrófagos después de 3 horas de infección .....	127
Figura D.28. Cuantificación de macrófagos infectados .....	128
Figura D.29. Viabilidad de los macrófagos infectados por diferentes cepas de <i>M. abscessus</i> por el método de azul tripano .....	129
Figura D.30. Viabilidad de los macrófagos por CLSM.....	131
Figura D.31. Viabilidad de los macrófagos por CLSM.....	132
Figura D.32. Viabilidad de los macrófagos infectados por diferentes cepas de <i>M. abscessus</i> utilizando el método de la tinción por cristal violeta.....	134

---

Figura D.33. Progresión de la infección. Los macrófagos infectados con las diferentes variantes de <i>M. abscessus</i> visualizados con microscopio óptico .....	135
Figura D.34. Progresión de la infección. Observación por el método de ZN .....	136
Figura D.35. Macrófagos infectados con la cepa 390R a diferentes tiempos pos infección .....	137
Figura D.36. Micrografías de los macrófagos infectados con las variantes formadoras y no formadoras de cuerdas de <i>M. abscessus</i> .....	138
Figura D.37. MEB imágenes de los macrófagos infectados con las variantes rugosas de <i>M. abscessus</i> .....	139
Figura D.38. MET imágenes de los macrófagos infectados con diferentes cepas no formadoras de cuerdas de <i>M. abscessus</i> .....	141
Figura D.39. MET imágenes de los macrófagos infectados con diferentes cepas formadoras de cuerdas de <i>M. abscessus</i> .....	142
Figura D.40. Cambios morfológicos de los bacilos en el interior de los macrófagos .....	143
Figura D.41. Producción de TNF- $\alpha$ y IL-6 por los macrófagos estimulados con diferentes cepas de <i>M. abscessus</i> .....	145
Figura D.42. Producción de TNF- $\alpha$ y IL-6 por parte de los macrófagos incubados con microesferas recubiertas con TDM 390R después de 48 horas de incubación .....	146

---

---

**ACRÓNIMOS**

AAR	ácido alcohol resistente
AG	arabinogalactano
AM	ácidos micólicos
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo ( <i>American Type Culture Collection</i> )
BCG	bacilo de Calmette y Guèrin
BD	Becton & Dickinson
BSA	albúmina sérica bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
CCF	cromatografía en capa fina unidimensional
CF	fator cuerda ( <i>cord fator</i> )
CFU	unidades formadoras de colonias ( <i>colony forming units</i> )
CLSM	microscopia láser confocal de barrido ( <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
DAT	diaciltrealosa
DIM	dimicocerosatos de tiocerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	dimetilsulfóxido
DSMZ	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares ( <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> )
EDTA	ácido etildiaminotetraacético

ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva
FBS	suero bovino fetal ( <i>fetal bovine serum</i> )
FL	fosfolípidos
GL	glicolípidos
GPL	glicopeptidolípidos
<sup>1</sup> H RMN	resonancia magnética nuclear de protón
IL	interleucina
IFN-γ	interferón gamma
LAM	lipoarabinomanano
LM	lipomanano
LOS	lipooligosacáridos
mAGP	micolilarabinogalactano-peptidoglicano
MEB	microscopia electrónica de barrido (SEM - <i>scanning electron microscopy</i> )
MET	microscopia electrónica de transmisión (TEM - <i>transmission electron microscopy</i> )
MIC	concentración mínima inhibitoria ( <i>minimum inhibitory concentration</i> )
MOI	multiplicidad de infección ( <i>multiplicity of infection</i> )
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

MK	menaquinonas
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NTM	micobacterias no tuberculosas ( <i>nontuberculous mycobacteria</i> )
OADC	ácido oleico-albumina-dextrosa-catalasa
OD	densidad óptica ( <i>optical density</i> )
PB	tampón fosfato
PBS	tampón fosfato salino ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PG	peptidoglicano
PGL	glicolípidos fenólicos
PIM	fosfatidilinositolmanosido
RGM	micobacterias de crecimiento rápido ( <i>rapidly growing mycobacteria</i> )
RMN	resonancia magnética nuclear
SD	desviación estándar ( <i>standard deviation</i> )
SGM	micobacterias de crecimiento lento ( <i>slowly growing mycobacteria</i> )
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SL	sulfolípidos
TAT	triaciltrealosas
TB	tuberculosis
TDM	dimicolato de trehalosa
TMM	monomicolato de trehalosa

TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral-alfa ( <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
TSA	agar de triptona de soja ( <i>tryptic soy agar</i> )
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
WHO	Organización Mundial de Salud ( <i>World Health Organization</i> )
ZN	Ziehl-Nielsen

## Presentación

La formación de cuerdas en *Mycobacterium tuberculosis* fue identificada por primera vez en 1882 por Robert Koch. Esta formación es una característica relacionada con la virulencia en el género *Mycobacterium*, además de ser utilizada como un método de diagnóstico e identificación de *M. tuberculosis* en la actualidad, en países en vías de desarrollo. Es aún desconocido el compuesto responsable de la formación de cuerdas, pero se sabe que no es una característica exclusiva de *M. tuberculosis*, puesto que fueron descritas diferentes especies del género *Mycobacterium* que presentan esa característica tan peculiar.

La formación de cuerdas fue relacionada con la composición del ácido  $\alpha$ -micólico en *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* BCG. Más concretamente con la presencia de un anillo de *cis* ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico. La controversia es que hay diferentes especies de micobacterias que no poseen tal anillo de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico y que también fueron descritas como formadoras de cuerdas.

Actualmente existe un gran interés por las micobacterias no tuberculosas como agentes causales de enfermedades en humanos. En general las enfermedades provocadas por las micobacterias están asociadas a diversas enfermedades como por ejemplo: fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva y VIH. Entre estas especies encontramos *Mycobacterium abscessus*, que es un patógeno emergente, que presenta alta resistencia a antibióticos, lo que agrava su tratamiento clínico.

Por una parte, se centró el trabajo en investigar si es correcta la relación entre la formación de cuerdas y la presencia del anillo de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico utilizando especies como *Mycobacterium brumae* y *Mycobacterium fallax* que fueron descritas anteriormente como formadoras de cuerdas y no poseen el anillo de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico. Además de investigar la presencia del anillo de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico de *M. abscessus*, y si ambas variantes de *M. abscessus*, con morfología colonial lisa y rugosa, son

capaces de formar cuerdas y presentan diferencias en la composición de sus ácidos micólicos.

Por otra parte, se decidió investigar la relación entre la virulencia de las diferentes variantes de *M. abscessus*. Adicionalmente, se investigaron si habían diferencias entre estas variantes, tales como: la motilidad, la sensibilidad a antibióticos, la resistencia a desecación o el crecimiento bacteriano.

The cord formation in *Mycobacterium tuberculosis* was identified in 1882 for the first time by Robert Koch. This formation characteristic is related with the virulence within the *Mycobacterium* species as well as being also used as a diagnose method and way to identify *M. tuberculosis* in the current time in developing countries. It is still unknown though, the compost which originates the cord formation but, it is already affirmed it is not an exclusive *M. tuberculosis* characteristic as there were different *Mycobacterium* species already presenting that peculiar fact.

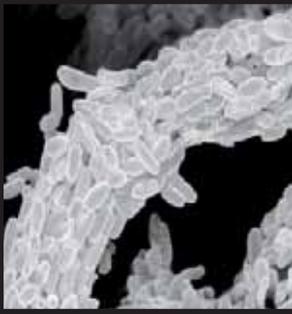
The cord formation was related to  $\alpha$ -mycolic acids in *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. Most concretely, due to the detection of a proximal cyclopropane ring in  $\alpha$ -mycolic acids. The controversy here exists as there are different species of *Mycobacterium* lacking cyclopropane in their  $\alpha$ -mycolic acids and also identified as a cord forms.

Nowadays, there is a huge interest in non tuberculous mycobacteria as a major causing agent from human diseases. Generally, the diseases caused by *Mycobacterium* are associated to different illnesses such as: cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease and HIV. In these bacterial species group, the *Mycobacterium abscessus* is considered an emergent pathogen that shows high resistance to antibiotics and consequently, worsen its clinic treatment.

On one hand, the investigation was focused on investigating if the relation between the cord formation and the presence of a cyclopropane ring in the  $\alpha$ -mycolic acids was correct, using species like *M. brumae* and *M. fallax* - described previously as cord forms and the lack of a cyclopropane ring in their  $\alpha$ -mycolic acids. Besides figuring out if both *M. abscessus* variants - smooth and rough morphology, - are able to form cords and not show differences in the  $\alpha$ -mycolic acids. On the other hand, was decided to investigate the relation between the virulence from the *M. abscessus* variants too in addition to study the differences between these variants such as motility, antibiotic sensitivity, dryness resistance and bacterial growth.

---

---



## A. INTRODUCCIÓN

---

---

## A.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* es el único género dentro de la familia *Mycobacteriaceae* y se encuentra en el suborden *Corynebacterineae* dentro del orden de los *Actinomycetales* (tabla A.1) (Hartmans *et al.*, 2006).

**Tabla A.1.** Clasificación científica del Género *Mycobacterium*.

<b>Dominio</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Filo</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Orden</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>Suborden</b>	<i>Corynebacterineae</i>
<b>Familia</b>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Mycobacterium</i>

Este género está formado por cocobacilos o bacilos ligeramente encorvados que miden de 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$  de largo y de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho (Wayne & Kubica, 1986). Son aerobios o microaerofilos y no poseen flagelos, cápsulas o esporas. Son ácido alcohol resistente (AAR) es decir, que con la tinción de Ziehl–Neelsen (ZN) no se decoloran con la solución de ácido alcohol. Esta propiedad se debe a la composición lipídica de la pared celular, más específicamente a los lípidos denominados ácidos micólicos, factor importante para la identificación de las micobacterias (Rogall *et al.*, 1990) y que les confiere resistencia a agentes químicos y físicos (Rastogi, 1991).

Los criterios importantes a considerar en la hora de caracterizar nuevas especies dentro del género *Mycobacterium* son: su ácido alcohol resistencia, la presencia de los ácidos micólicos, y el contenido adecuado de guanina- citosina en el ADN (G + C) entre 62 y 70% (Lévy-Frébault & Portaels, 1992).

En los últimos años el número de especies descritas viene aumentando considerablemente debido al desarrollo de técnicas moleculares para su identificación (Hartmans *et al.*, 2006). En 1980 había cerca de 40 especies descritas, actualmente en el género *Mycobacterium* hay descritas 172 especies (<http://www.bacterio.net/index.html>, 2015). Entre ellas encontramos el *Mycobacterium tuberculosis* que es un patógeno obligatorio. *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium cannetti* (causadores de la

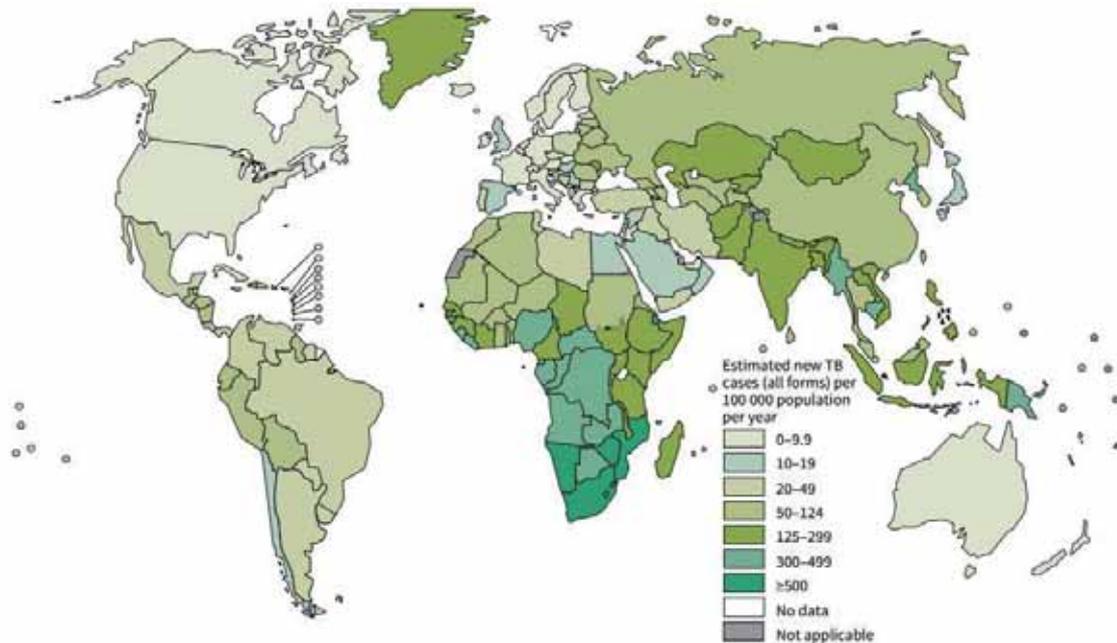
tuberculosis (TB) en humanos) juntamente con *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo Calmette Guérin), *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium pinnipedii* (causadores de tuberculosis en animales y ocasionalmente en humanos), forman parte del grupo conocido como *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). Otra especie que también es un patógeno obligatorio es el *M. leprae*, agente causal de la lepra en humanos.

Existe un gran número de especies que no pertenecen al MTC, que son denominadas micobacterias no tuberculosas más conocidas como NTM (del inglés, nontuberculous mycobacterial). Las NTM son especies ambientales o atípicas, y a diferencia de las micobacterias del grupo MTC o *M. leprae* pueden ser patógenos no obligatorios, oportunistas o saprofitas, y viven en el suelo, en el agua y son ubicuas (Primm *et al.*, 2004). Estas micobacterias ambientales son capaces de causar enfermedad, pero su patogenicidad varía entre las diferentes especies. Al mismo tiempo que aumenta el número de NTM descritas se van describiendo nuevas especies capaces de producir enfermedades en humanos.

## **A.2. *Mycobacterium tuberculosis***

Según datos de la Organización Mundial de Salud (WHO 2014 web site) en 2013, 9.000.000 personas enfermaron de tuberculosis (TB) y 1,5 millones murieron a causa de la enfermedad. Más del 95 % de las muertes por TB se produjeron en países en vía de desarrollo (Figura A.1). *M. tuberculosis* es el segundo agente infeccioso que causa más muertes en el mundo, sólo es superado por el VIH.

El número de personas que enferman por TB está disminuyendo lentamente. La tasa de mortalidad por TB se redujo un 45% entre 1990 y 2013. Se estima que unos 37 millones de vidas fueron salvadas a través del diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis entre 2000 y 2013.



**Figura A.1.** Las tasas de incidencia estimadas de tuberculosis, 2013. (Global Tuberculosis Report. WHO, 2014).

### A.3. Tuberculosis (TB)

La infección por *M. tuberculosis* se inicia con la inhalación del bacilo de la TB, que se deposita en el alveolo y posteriormente es fagocitado por el macrófago alveolar. Estas células son requeridas para fagocitar partículas tóxicas e inflamatorias para minimizar el daño potencial para el tejido pulmonar a través de respuestas proinflamatorias. Cuando los bacilos se encuentran dentro del fagosoma del macrófago, *M. tuberculosis* modula la respuesta fagosomal impidiendo la fusión fagosoma-lisosoma y seguidamente se inicia un crecimiento rápido y exponencial del bacilo, hasta la aparición de la respuesta inmune adquirida. Juntamente a este proceso se da la formación del granuloma para la contención de la infección (Figura A.2).

Las etapas iniciales de la formación del granuloma son dependientes de la producción del factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) por los macrófagos. Se requiere la señalización del TNF- $\alpha$  para mantener las concentraciones de quimioquinas para el reclutamiento celular y retención de estos bacilos. El desarrollo de la respuesta inmune adquirida se promueve a través de la

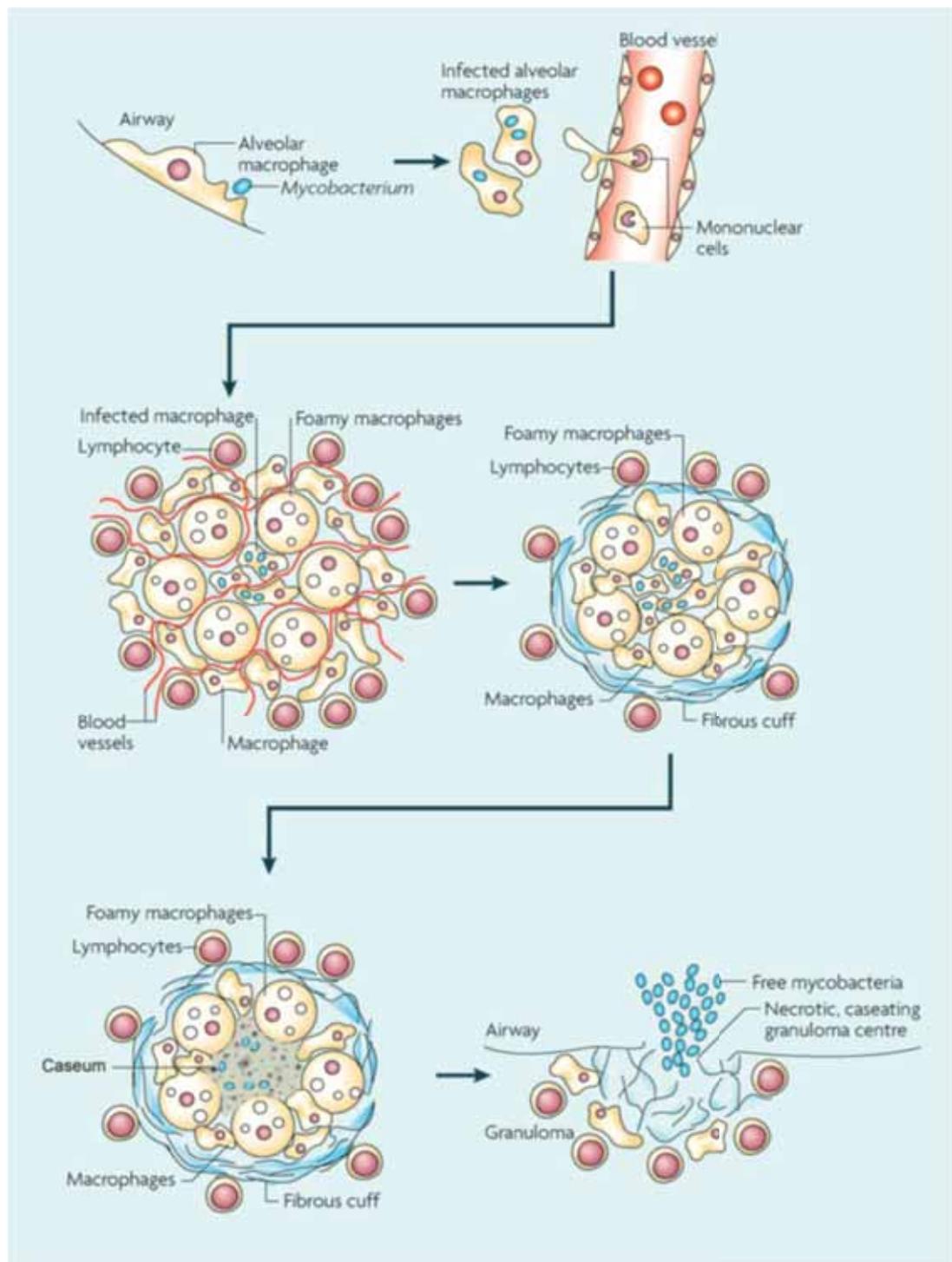
acumulación de células dendríticas infectadas en los nodos linfáticos regionales. Esta respuesta inmune se basa principalmente en la inducción de células T capaces de reconocer a los macrófagos infectados y activarlos mediante la secreción de interferón IFN- $\gamma$ . Una vez que se estabiliza el crecimiento bacilar, la presencia de células T es importante para la producción de IFN- $\gamma$  y el aumento en la actividad citotóxica. Este es un período de estancamiento donde la carga bacilar permanece relativamente constante y la infección está en un estado de "latencia".

El granuloma puede proceder a la esterilización localizada de la infección por la mineralización (calcificación) y fibrosis de la lesión, lo que reduce el nivel de nutrientes y oxígeno a los bacilos que están en el centro del granuloma, o después de un cambio en el sistema inmunitario del hospedero, ocurre la caseación en el centro del granuloma y necrosis lo que libera los bacilos infecciosos a las vías respiratorias (Russell *et al.*, 2009).

#### **A.4. Pared celular de las micobacterias**

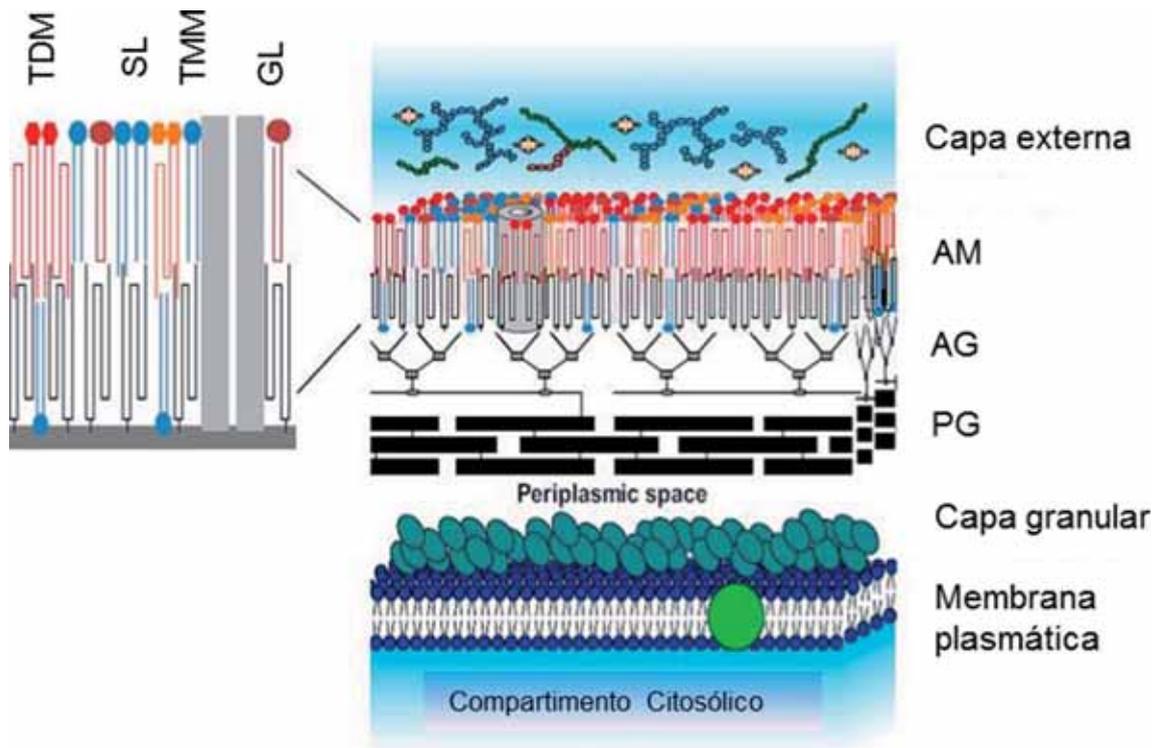
El envoltorio celular de las micobacterias está compuesto por una membrana plasmática, una pared celular y una capa más externa también denominada "capsula". En la pared celular se encuentra el arabinogalactano (AG), el peptidoglicano (PG) y los ácidos micólicos (AM) lo que le confiere a las micobacterias una estructura muy característica (Figura A.3). Estos lípidos y glicolípidos son mayoritarios en la pared micobacteriana representando hasta un 60% del peso seco del bacilo (Minnikin *et al.*, 1980). Estas tres macromoléculas juntas forman el complejo micolilarabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) que es esencial para la viabilidad de las micobacterias (Alderwick *et al.*, 2007).

Además de estos lípidos y glicolípidos también forman parte de la pared micobacteriana, pero en menor abundancia, otros lípidos y glicolípidos que pueden estar unidos al complejo (mAGP) de forma covalente o de forma no covalente (libres) (Brennan & Nikaido, 1995; Draper, 1998).



**Figura A.2.** Progresión histológica del granuloma humano de la tuberculosis (Russell *et al.*, 2009).

La pared de las micobacterias forma una capa protectora que confiere a la micobacterias resistencia a la desecación, además de ser una protección importante frente a los antibióticos y a los desinfectantes (Primm *et al.*, 2004).



**Figura A.3.** Pared celular del género *Mycobacterium*. (AM) ácidos micólicos, (AG) arabinogalactano, (PG) peptidoglicano, (TDM) dimicolato de trehalosa, (SL) sulfolípidos, (TMM) monomicolato de trehalosa, (GL) glicolípidos. Adaptado de (Marrakchi *et al.*, 2014).

#### A.4.1. Peptidoglicano (PG)

El PG está compuesto de cadenas lineales de N-acetilglucosamina y ácido murámico modificado que se entrecruzan por péptidos de cadenas laterales unidas a otros glicanos. PG es un polímero complejo que forma una capa rígida por encima de la membrana plasmática, proporcionando la forma celular y la fuerza necesaria para soportar la presión osmótica (Crick & Brennan, 2008).

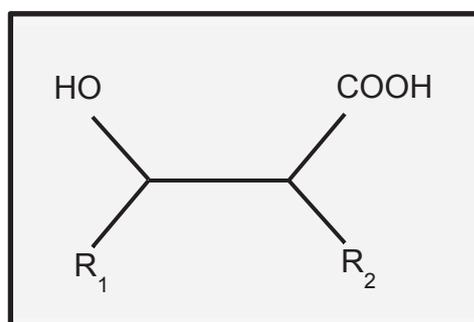
#### A.4.2. Arabinogalactano (AG)

En 1950 el AG fue reconocido como el principal polisacárido de la pared celular de las micobacterias.

El AG es un heteropolisacárido que está compuesto en su totalidad de arabinosa y galactosa en configuración furanosa. Este heteropolisacárido está unido a los ácidos micólicos y al peptidoglicano formando el complejo (mAGP).

### A.4.3. Ácidos micólicos (AM)

Los ácidos micólicos de *M. tuberculosis* fueron descritos por primera vez en 1950 por Asselineau y Lederer como una cadena linear muy larga de ácidos grasos  $\alpha$ -ramificado y  $\beta$ -hidroxilado. Estos ácidos muestran una gran diversidad de longitud de cadena (entre 60 a 90 átomos de carbono) y funciones químicas que definen las diferentes clases de ácidos micólicos (Daffé *et al.*, 1983). Estos lípidos se encuentran en la pared celular de todas las micobacterias y se han descrito sustancias de estructura similar en los miembros de la orden *Corynebacteriales*. Los ácidos micólicos están unidos covalentemente al arabinogalactano o esterificados con la trehalosa. En ambas formas desempeñan un papel importante en la arquitectura y la impermeabilidad de la envoltura celular de las micobacterias (Marrakchi *et al.*, 2014). También se han descrito la presencia de moléculas de glicerol esterificadas con ácidos micólicos en la pared de *M. smegmatis* (Chen *et al.*, 2006), así como la liberación de ácidos micólicos libres del dimicolato de trehalosa (TDM) para formar la matriz del biofilm formado por *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (Ojha *et al.*, 2010, 2008).



**Figura A.4.** Estructura general de los ácidos micólicos.

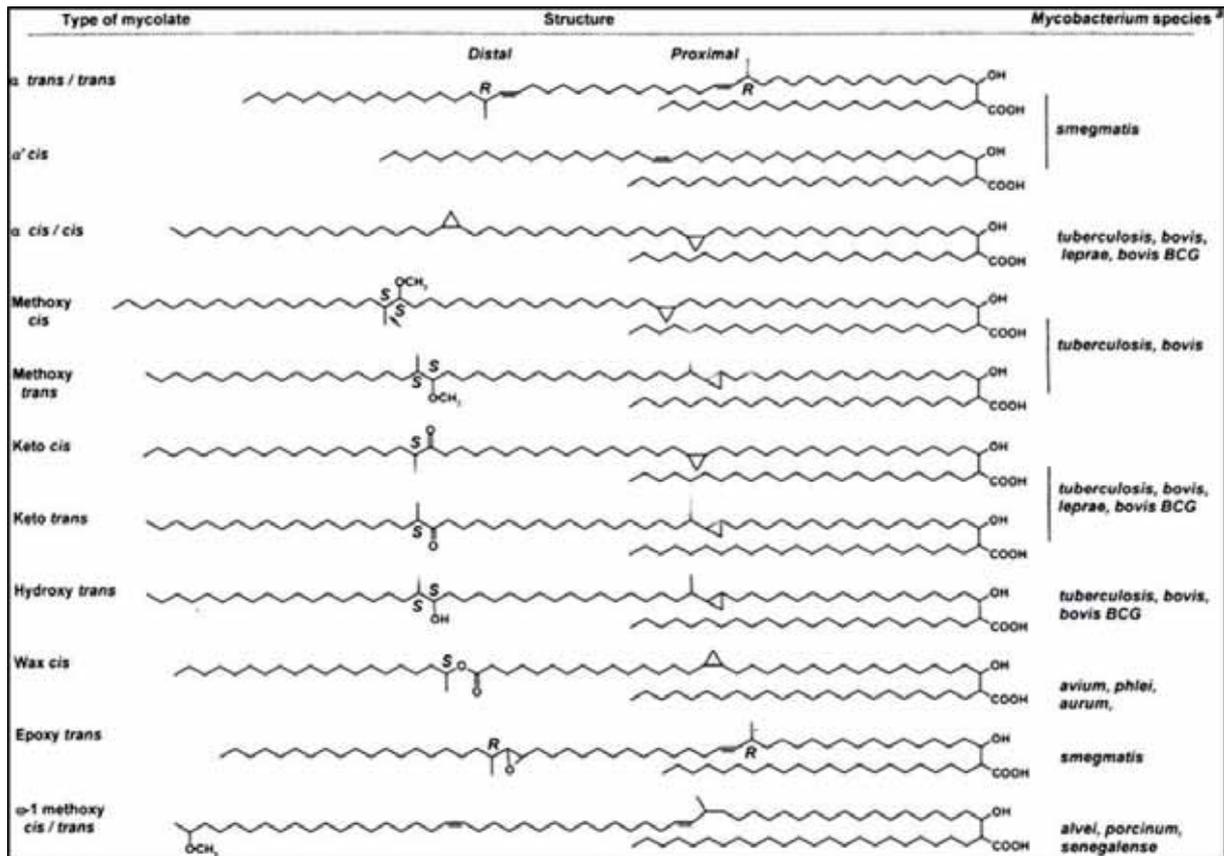
La estructura general de los AM está compuesta por una cadena larga alifática (abierta), que normalmente tiene entre 50-56 átomos de carbono que se

denomina meromicolato ( $R_1$ ). El meromicolato presenta diferentes grupos funcionales, como por ejemplo: metoxi, ceto, epoxi, cliclopropanos, ramificaciones metil o dobles enlaces. Además, presenta también una cadena corta alifática, que tiene entre 22-24 átomos de carbono ( $R_2$ ) (Figura A.4) (Steck *et al.*, 1978).

Se conocen actualmente siete tipos de ácidos micólicos:  $\alpha$ -micolatos,  $\alpha'$ -micolatos, metoxi-micolatos, ceto-micolatos, epoxi-micolatos, carboxi-micolatos y  $\omega$ -1-metoxi-micolatos (Figura A.5) (Daffé *et al.*, 1983; Marrakchi *et al.*, 2014; Minnikin *et al.*, 1983; Rafidinarivo *et al.*, 1985).

El ácido micólico que está presente en todas las especies de micobacterias es el  $\alpha$ -micolato. Es el más apolar de los ácidos micólicos y tiene en su estructura entre 74 y 80 átomos de carbono que pueden variar en la presencia de dos dobles enlaces (con configuración *cis* o *trans*) o dos *cis* cliclopropanos localizados en la cadena meromicolatos. El  $\alpha'$ -micolatos tiene entre 60 y 62 átomos de carbono y contiene solamente uno o dos *cis* doble enlaces. Los demás ácidos micólicos tienen funciones oxigenadas en la parte distal de la cadena meromicolato (Marrakchi *et al.*, 2008).

Los compuestos que contienen ácidos micólicos se han relacionado con la formación de cuerdas, formación de biofilms y la aparición de macrófagos espumosos en los granulomas de tuberculosis (Marrakchi *et al.*, 2014).



**Figura A.5.** Estructura de los diferentes tipos de ácidos micólicos. Las configuraciones de los doble enlaces o anillos de ciclopropano están indicados por *cis/trans* en la posición proximal o distal (Marrakchi *et al.*, 2008).

#### A.4.4. Lípidos libres

Los lípidos libres están unidos a la parte más externa de la pared de las micobacterias de forma no covalente y se extraen fácilmente con disolventes orgánicos (Daffé & Draper, 1998).

##### A.4.4.1. Menaquinonas (MK) y dimicocerosatos de tiocerol (DIM)

Las MK y los DIM son los lípidos libres mayoritarios en la pared de las micobacterias. Las MK están presentes en todas las especies de micobacterias, y los DIM se encuentran en todas las especies del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) y también en otras pocas especies de micobacterias patógenas

(Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Diferentes estudios han demostrado que los DIM están relacionados con la virulencia de *M. tuberculosis* (Camacho *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2004). Goren y colaboradores observaron que una cepa de *M. tuberculosis* que producía pocas cantidades de DIM tenía niveles más bajos de replicación pulmonar que una cepa productora de DIM (Goren *et al.*, 1974).

#### **A.4.5. Glicolípidos libres**

Los glicolípidos libres están unidos de forma no covalente a la pared de las micobacterias. Entre ellos encontramos las acetiltrealosas, los lipooligosacáridos, los glicolípidos fenólicos y los glicopeptidolípidos.

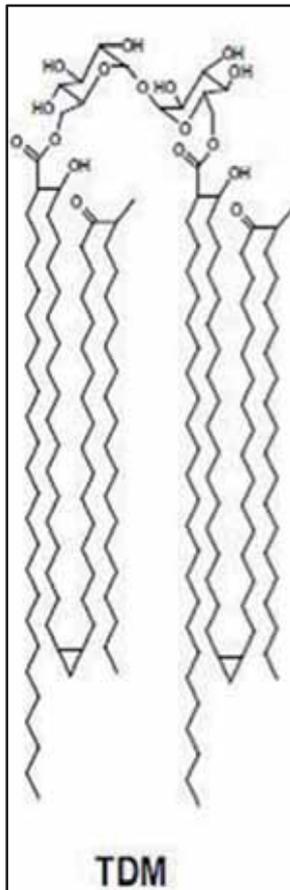
##### **A.4.5.1. Acetiltrealosa**

Las acetiltrealosas son compuestos que comparten una misma molécula. Esta molécula es la trehalosa que puede estar esterificada por los ácidos micólicos u otros ácidos grasos. Entre estos compuestos podemos tener el dimicolato de trehalosa, el monomicolato de trehalosa, el sulfolípidos, la diaciltrealosa y la triaciltrealosa.

##### **A.4.5.1.1. Dimicolato de trehalosa (TDM) y monomicolato de trehalosa (TMM)**

TDM es un glicolípidos producido por el género *Mycobacterium* (excepto *M. leprae*, que produce solamente TMM), el género *Corynebacterium* y el género *Nocardia*. Su estructura química consiste en una molécula de trehalosa esterificada por dos ácidos micólicos (Figura A.6). La estructura de los ácidos micólicos ligados al TDM es idéntica a la estructura encontrada en la capa de ácidos micólicos esterificados. La estructura del TDM difiere sustancialmente entre especies debido a la diferencia en la composición de los ácidos micólicos de

cada especie (Glickman, 2008). Estudios con TDM aislado de diferentes especies revelan que los dos ácidos micólicos del TDM pueden presentarse en múltiples combinaciones en función de los ácidos micólicos presentes en la micobacteria (Fujita *et al.*, 2005; Michael Strain *et al.*, 1977).



**Figura A.6.** Estructura del TDM. La trehalosa está esterificada por dos cadenas largas de ácidos micólicos. Adaptada de (Marrakchi *et al.*, 2014).

Este compuesto es también conocido como factor cuerda (cord factor - CF) debido a que cuando fue descubierto le caracterizaron como el compuesto responsable de la formación de cuerdas en las micobacterias (Bloch *et al.*, 1953). En la actualidad no se sabe cuál es el compuesto responsable de la formación de cuerdas en el género *Mycobacterium*, dado que todas las micobacterias presentan TDM en su pared, con excepción de *M. leprae* que presenta TMM, y no todas son capaces de formar cuerdas (Dhariwal *et al.*, 1987).

TDM es el lípido más abundante en *M. tuberculosis* virulenta, y pueden cambiar de una sustancia no tóxica a altamente tóxica según los cambios que presenta en su conformación molecular. Si el TDM presenta conformación micelar, no es tóxico y protege a los organismos de las defensas del huésped. Si se encuentra en la conformación en monocapa se convierte en altamente tóxico e inmunogénico. En un estudio donde se inyectó TDM directamente en ratones se observó que son capaces de producir granulomas caseificantes (Hunter *et al.*, 2006).

El TDM está directamente relacionado con la inducción en la producción de citocinas y con la formación del granuloma. Diferentes autores estimularon macrófagos con TDM y observaron la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, entre otras citocinas. (Behling *et al.*, 1993; Indrigo *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2006, 2005). La inducción de estas citocinas produce la inflamación

granulomatosa en ratones (Hunter *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2000), en conejos (Hamasaki *et al.*, 2000) y en conejillos de india (Sugawara *et al.*, 2002).

El TMM a diferencia del TDM está formado por una molécula de trehalosa unida a un único ácido micólico.

#### **A.4.5.1.2. Diaciltrehalosa (DAT) y triaciltrehalosa (TAT)**

Las DAT son glicolípidos que están formados por la trehalosa esterificada por dos moléculas de ácidos grasos polimetilramificados (Baer, 1993). DAT es capaz de inducir una respuesta inmune humoral en humanos y capaz de inhibir la proliferación de células T y la secreción de citocinas en ratones (Saavedra *et al.*, 2001).

Las TAT tienen una estructura similar a la de las DAT pero presenta una tercera molécula de ácidos grasos esterificando a la trehalosa (Muñoz *et al.*, 1997).

#### **A.4.5.1.3. Sulfolípidos (SL)**

Los SL son compuestos formados por la trehalosa sulfatada y esterificada por grupos acilo, que consisten en un ácido graso saturado de cadena corta (ácido palmítico o ácido esteárico) y diferentes combinaciones de ácidos grasos metil-ramificados de cadena larga (ácido phthioceranic y ácido hydroxyphthioceranic) (Goren, 1970). Los SL están presentes sólo en el *M. tuberculosis*, pero solamente están presentes en la cepa virulenta de *M. tuberculosis* (H37R<sub>v</sub>) y ausentes en la cepa avirulenta (H37R<sub>a</sub>) (Middlebrook *et al.*, 1947). Además, se demostró que los SL previenen la fusión del fagosoma-lisosoma en cultivos de macrófagos, lo que les confiere un papel importante en la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Goren, 1970).

#### **A.4.5.2. Lipooligosacáridos (LOS)**

Los LOS están formados por una molécula de trehalosa poliacilada por ácidos grasos de cadena larga y glicosilada, con un alto contenido en manosa (Draper, 1998). Se describió la implicación de los LOS en la morfología colonial de *Mycobacterium kansasii*, donde solamente las cepas con morfología colonial lisa producían estos glicolípidos (Belisle & Brennan, 1989). Collins y Cunningham describieron que las colonias con morfología colonial rugosa LOS - deficiente producían infecciones crónicas, y que las cepas con morfología colonial lisa y que presentan LOS eran rápidamente eliminadas (Collins & Cunningham, 1981).

#### **A.4.5.3. Glicolípidos fenólicos (PGL)**

Los PGL están formados por un núcleo lipídico compuesto por un grupo fenol y un tiocerol esterificados por dos ácidos polimetil ramificados (ácidos micocerósicos o tioceránicos). Este núcleo lipídico está unido por un grupo fenol a una parte glucosídica que puede tener un entre uno y cuatro azúcares (mono-, di-, tri- o tetrasacárido). Estos PGL son encontrados en *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. bovis* y *Mycobacterium marinum* entre otras micobacterias patógenas. También se ha descrito su implicación en la virulencia (Yu *et al.*, 2012).

#### **A.4.5.4. Glicopeptidolípidos (GPL)**

Los GPL comparten un núcleo lipopeptídico de ácidos grasos formados por una cadena de aminoácidos D-fenilalanina, D-treonina y D-alanina. Son una clase de glicolípidos importantes, sintetizados por varias NTM como por ejemplo: *Mycobacterium avium Complex* (MAC), *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium xenopi*. Se localizan en la parte más exterior del envoltorio celular, y la presencia o ausencia de GPL está relacionado con varios cambios fenotípicos, incluyendo la

morfología colonial, la hidrofobicidad, la agregación, la motilidad y la formación de biofilms (Pang *et al.*, 2013).

En NTM se cree que los GPL contribuyen a la formación del biofilm o motilidad. En *M. smegmatis*, la formación de biofilm se ve afectada significativamente por la supresión o cambios de los GPL. Lo mismo se observó en *M. avium* (Martínez *et al.*, 1999) y *M. abscessus* (Howard *et al.*, 2006).

Los GPL también podrían desempeñar un papel en la resistencia a antibióticos. En *M. smegmatis*, la ausencia de GPL aumenta la absorción de quenodesoxicolato (la sal del ácido quenodesoxicólico producido en el hígado, utilizada para evaluar la fluidez de los lípidos de la pared celular de las micobacterias) (Liu *et al.*, 1996), lo que indica que los GPL pueden funcionar como una barrera para la permeabilidad (Etienne *et al.*, 2002). Pero se encontró también que la cepa GPL deficiente presentaba la misma susceptibilidad a la rifampicina, estreptomicona, isoniacida y capreomicina que la cepa productora de GPL, lo que aún no deja claro el papel del GPL como una barrera de permeabilidad en la pared de las micobacterias (Pang *et al.*, 2013).

Otro factor a destacar es el papel de los GPL en la virulencia de las micobacterias. En *M. avium* se ha descrito que los GPL tienen un importante papel en la patogénesis. Los macrófagos infectados con *M. avium* GPL deficiente producen más citocinas y quimiocinas antiinflamatorias como factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12p40 (IL-12p40) que los macrófagos infectados con *M. avium* productor de GPL (Bhatnagar & Schorey, 2006). Con *M. abscessus* se describió un resultado similar en cuanto a la producción de TNF- $\alpha$ , donde se observó que los macrófagos infectados con *M. abscessus* GPL deficiente producen niveles mucho mayores de TNF- $\alpha$  que el *M. abscessus* productor de GPL (Catherinot *et al.*, 2007).

#### **A.4.5.5. Fosfatidilinositolmanosido (PIM)**

Los PIM juntamente con el fosfatidilinositol (PI) son los fosfolípidos principales en la membrana y pared celular de las micobacterias. Funcionan como ancla a lípidos como lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM) (Salman *et al.*, 1999).

Los PIM están formados por un anillo de inositol unidos a moléculas de D-manosa (Asselineau & Lanéelle, 1998). Entre sus funciones podemos destacar la inhibición de la activación de los macrófagos (Court *et al.*, 2011).

#### **A.4.5.6. Lipoarabinomanano (LAM) lipomanano (LM)**

La biosíntesis del LAM y LM se basa en el fosfatidilinositol (PI), y probablemente se originan en los PIM (Besra *et al.*, 1997). Están compuestos por una molécula de PI asociada a sucesivas moléculas de manosa. Además, el LAM está unido al polisacárido D-arabinomanano (Nigou *et al.*, 2003). LAM ha surgido como un importante modulador de la respuesta inmune del en *M. tuberculosis* y *M. leprae*, a través de una supresión de la inmunidad generalizada (Sibley *et al.*, 1988), la inducción de la producción de citocinas inflamatorias (Roach *et al.*, 1993), y la neutralización del potencial citotóxico de los O<sub>2</sub> radicales libres (Chan *et al.*, 1991).

### **A.5. La resistencia a los antibióticos en el género *Mycobacterium***

La resistencia a los antibióticos en el género *Mycobacterium* es atribuida a la impermeabilidad de su envoltorio celular rico en ácidos micólicos (Jarlier & Nikaido, 1990). Cabe resaltar que esta barrera impermeable no es suficiente para explicar plenamente los altos niveles de resistencia a los fármacos, lo que sugiere que debe haber sistemas sinérgicos eficaces contra la actuación de los fármacos

que penetran el envoltorio de las micobacterias. Eso puede ser debido a la presencia de varios genes que no están relacionados directamente con la síntesis del envoltorio celular y que tienen un papel importante relacionado con la resistencia a antibióticos de amplio espectro (Aínsa *et al.*, 1998; Doucet-Populaire *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2005).

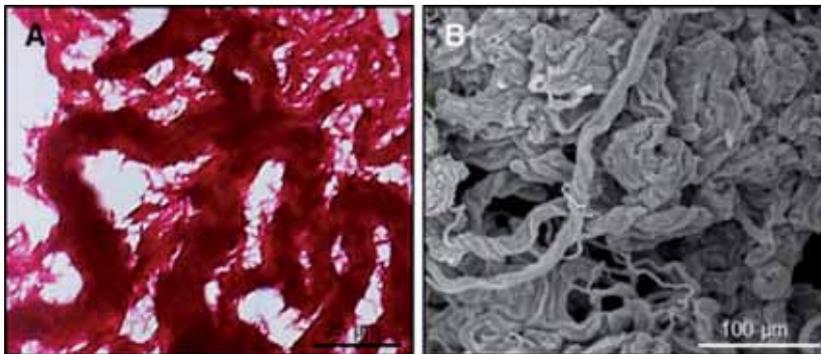
## **A.6. Estudio de la virulencia**

La virulencia se puede definir como el grado de patogenicidad de un microorganismo según las tasas de mortalidad y/o su capacidad para invadir los tejidos del huésped, produciendo efectos patológicos. Se puede cuantificar de dos formas: el porcentaje de animales infectados que se mueren y también el tiempo necesario para que un animal se muera después de ser infectado. La otra forma es medir la carga bacteriana (número de bacterias) que se encuentra en el huésped infectado después de la infección, lo que permite comparar la habilidad de diferentes cepas bacterianas de sobrevivir en el hospedero durante la infección (Smith, 2003).

### **A.6.1. La virulencia y la formación de cuerdas**

Investigaciones intensivas sobre los factores de virulencia de *M. tuberculosis* se están realizando desde el descubrimiento del bacilo de la TB. Una de las primeras características fenotípicas que se relacionó con la virulencia fue la formación de cuerdas. Cuando *M. tuberculosis* crece en medio líquido forma unas estructuras alargadas donde los bacilos se orientan paralelamente al eje más largo de dicha estructura asemejándose a cuerdas (Figura A.7). La primera observación microscópica de las cuerdas de *M. tuberculosis* fue realizada por Robert Koch en 1882 (Koch, 1982), pero su relevancia se incrementó considerablemente con los estudios posteriores de Middlebrook y colaboradores (1947). Estos autores compararon dos cepas de *M. tuberculosis*, la cepa H37Rv (virulenta en el animal de experimentación) y la cepa H37Ra (avirulenta). Estas

dos cepas provenían de la cepa virulenta H37 y se habían originado por sucesivos pases de la misma en medio de cultivo. Ellos describieron que la cepa avirulenta H37Ra había perdido la capacidad de formar cuerdas (Middlebrook *et al.*, 1947).



**Figura A.7.** Formación de cuerdas en el género *Mycobacterium*.

(A) *Mycobacterium marinum*, microscopía óptica, tinción de Ziehl-Nielsen.

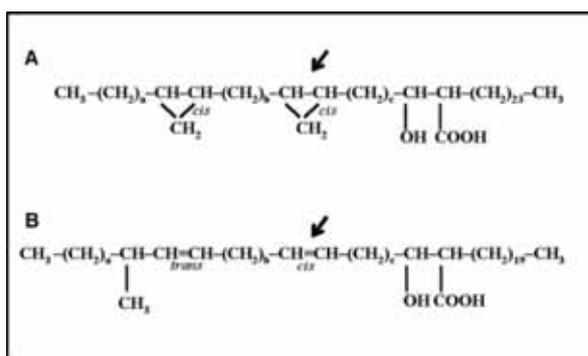
(B) *M. abscessus*, microscopía electrónica de barrido (MEB).

Posteriormente, en 1953, Bloch investigando la formación de las cuerdas, utilizó diferentes disolventes orgánicos y consiguió deshacer rápidamente las cuerdas con éter de petróleo y extraer una sustancia que era letal en ratones (Bloch *et al.*, 1953). Ese glicolípido tóxico de la pared de *M. tuberculosis* que se relacionó con la virulencia del bacilo y con la formación de las cuerdas fue llamado cord-factor (CF) y unos años más tarde fue identificado como TDM (Noll & Bloch, 1955; Noll *et al.*, 1956). El TDM fue considerado el primer factor de virulencia en *M. tuberculosis*. Sin embargo se descubrió posteriormente que el TDM estaba presente en todas las micobacterias patógenas y no patógenas (excepto *M. leprae*) (Dhariwal *et al.*, 1987).

Diferentes investigadores que trabajaban con mutantes naturales o contruidos de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. marinum* y *M. abscessus* constataron que la disminución de la virulencia de los mutantes estaba relacionada con la pérdida de la capacidad de formación de cuerdas de los mismos (Bhatt *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2003, 2004; Glickman *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2006; Makinoshima & Glickman, 2005).

Numerosos estudios sobre TDM revelaron la actividad proinflamatoria en células animales y confirmaron su potencial determinante en la virulencia de *M. tuberculosis* (Hunter *et al.*, 2006; Indrigo *et al.*, 2003, 2002).

Un importante estudio de Glickman y colaboradores (2000), tuvo en cuenta que la estructura del TDM puede variar sustancialmente entre especies debido a la composición de los ácidos micólicos y observó que la estructura fina del ácido  $\alpha$ -micólico (presente en todas las especies de micobacterias) podría ser el responsable por la formación de cuerdas. En este estudio se identificó el gene *pcaA*, que es necesario para la síntesis del anillo de ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG y consecuentemente para la formación de las cuerdas. Esta última es una cepa atenuada del *M. bovis*. Esta atenuación resulta de múltiples deleciones genéticas. Sin embargo, *M. bovis* BCG conserva la capacidad de replicarse en seres humanos, ratones y es capaz de formar cuerdas (Behr *et al.*, 1999; Glickman *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003; Makinoshima & Glickman, 2005; Pym *et al.*, 2002). Glickman y colaboradores demostraron que el mutante *pcaA* no formador de cuerdas tenía un doble enlace en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico en lugar del anillo de *cis* ciclopropano presente en la cepa salvaje formadora de cuerdas, cuando se restauró el mutante *pcaA* este volvió a formar cuerdas (Glickman *et al.*, 2000). En la figura A.8 a continuación se puede observar las diferentes estructuras de los ácidos micólicos que contienen anillos de ciclopropano o doble enlaces.



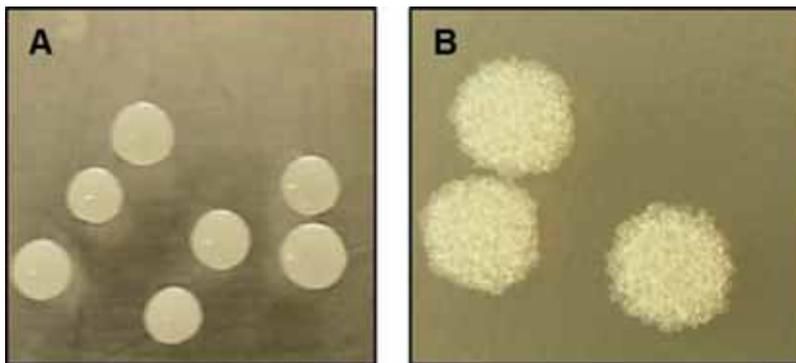
**Figura A.8.** Estructura de los ácidos  $\alpha$ -micólicos. (A) *Mycobacterium bovis* BCG Japan presenta dos anillos de *cis* ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico. (B) *Mycobacterium brumae* presenta un *cis* doble enlace en la posición proximal y un *trans* doble enlace en la posición distal del ácido  $\alpha$ -micólico. La flecha negra indica la posición proximal del *cis* ciclopropano (A) y del *cis* doble enlace (B). Figura adaptada de (Brambilla *et al.*, 2012).

*M. marinum* es una especie filogenéticamente relacionada con *M. tuberculosis*, también es formadora de cuerdas y tiene el anillo de ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico (Daffé *et al.*, 1991; Staropoli & Branda, 2008). Más recientemente se ha descrito la formación de cuerdas en diferentes especies de micobacterias ambientales como: *Mycobacterium chubuense*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum* y

*Mycobacterium vaccae* (Julián *et al.*, 2010); *Mycobacterium haemophilum* (Clement *et al.*, 2011); *M. brumae* (Luquin *et al.*, 1993); *M. fallax* (Daffé *et al.*, 1983); *M. abscessus* (Howard *et al.*, 2006; Sánchez-Chardi *et al.*, 2011).

### A.6.2 La virulencia y la morfología colonial

Las micobacterias pueden presentar diferentes tipos de morfologías coloniales. Estas morfologías pueden ser opacas o translúcidas, lisas o rugosas, y además presentar un aspecto seco o húmedo (Figura A.9). Los cambios en la morfología colonial se deben a diferentes componentes que pueden o no estar presentes en la pared celular de las micobacterias.



**Figura A.9.** Diferentes morfologías coloniales de *M. abscessus*. (A) Morfología colonial lisa, translúcida y con aspecto húmedo. (B) Morfología colonial rugosa, opaca y con aspecto seco.

En un estudio sobre las diferentes morfologías coloniales de *M. kansasii* se compararon la composición glicolípida de la pared de las diferentes variantes, y demostraron que la variante con morfología colonial lisa presenta en su superficie lipooligosacáridos (LOS), mientras que la variante con morfología colonial rugosa carece de ello (Belisle & Brennan, 1989). Estudios previos realizados por otros autores habían demostrado que las variantes con morfología colonial rugosa de *M. kansasii* persisten por más tiempo en ratones infectados experimentalmente que las variantes con morfología colonial lisa (Collins & Cunningham, 1981).

En *M. avium* las cepas que presentan morfología colonial rugosa son más virulentas que las cepas con morfología colonial lisa cuando infectan pollos y ratones (Schaefer *et al.*, 1970). Investigando la virulencia y su relación con las diferentes morfologías coloniales de *M. avium* Complex (MAC) se observó que

cuando se infectaron los animales con la cepa con morfología colonial lisa y transparente (SmT), se pudo recuperar dos tipos de morfologías coloniales, y la nueva morfología era rugosa y transparente (RgT). En estudios con modelos animales la variante con morfología RgT se multiplicó mucho más rápidamente que los bacilos de la variante con morfología colonial SmT, causando la mortalidad del 60-80% de los animales en comparación con el 10% de mortalidad observada en los ratones infectados con SmT (Kansal *et al.*, 1998). La diferencia entre estas variantes, es que la variante lisa sintetiza GPL, y la variante rugosa carece de GPL.

En *M. abscessus* se reportó una relación intrínseca entre la morfología colonial y la virulencia. Se constató que la cepa rugosa de *M. abscessus* podía persistir y multiplicarse en los pulmones de los ratones infectados mientras que su variante lisa desapareció rápidamente (Byrd & Lyons, 1999). En otro estudio de Catherinot y colaboradores se demostró que las cepas rugosas de *M. abscessus* deficientes en GPL mataron en pocos días a un gran número de ratones infectados mediante inyección intravenosa, mientras que, los ratones infectados con las variantes lisas seguían vivos a los 90 días (Catherinot *et al.*, 2007). También se demostró con el análisis de datos clínicos y epidemiológicos que las cepas rugosas de *M. abscessus* eran más virulentas que las cepas lisas en humanos (Catherinot *et al.*, 2009; Jönsson *et al.*, 2007; Sanguinetti *et al.*, 2001).

En un estudio con *M. vaccae*, se observó que la variante con morfología colonial lisa presentaba un poliéster saturado de cadena larga en su superficie, que no fue observado en la variante con morfología rugosa (Rodríguez-Güell *et al.*, 2006). En otro estudio se relacionó la morfología colonial de *M. vaccae* con la formación de cuerdas y la virulencia, donde se demostró que la variante rugosa de *M. vaccae* era capaz de persistir por más tiempo en macrófagos de ratones infectados que la variante lisa, además de tener la capacidad de formar cuerdas, y esa capacidad no se observó en la variante con morfología colonial lisa. (Julián *et al.*, 2010).

## A.7. Micobacterias no tuberculosas (NTM)

En 1959 Runyon propuso la clasificación del grupo de NTM según la velocidad de crecimiento, micobacterias de crecimiento rápido (rapidly growing mycobacteria - RGM) si las colonias son visibles en menos de 7 días y micobacterias de crecimiento lento (slowly growing mycobacteria - SGM) si necesitan más de 7 días para dar colonias visibles. En cuanto a la pigmentación, de la colonia las micobacterias fueron clasificadas en: no cromógenas (micobacterias que no producen pigmentos), escotocromógenas (producen pigmento) y fotocromógenas (producen pigmentos solamente en presencia de luz) (Runyon, 1959).

Existe un creciente interés por las (NTM) como agentes causantes de diversas enfermedades. Generalmente los casos de NTM están asociados a pacientes con fibrosis quística (Cullen *et al.*, 2000; Jönsson *et al.*, 2007; Sanguinetti *et al.*, 2001), enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC) (Kotilainen *et al.*, 2015), VIH y otras enfermedades inmunosupresoras (Hoefsloot *et al.*, 2013). Las infecciones por NTM son más frecuentemente localizadas en los pulmones, pero también pueden encontrarse en los ganglios linfáticos, en la piel, en los tejidos blandos y en los huesos y las articulaciones.

En la actualidad aún es difícil analizar la situación epidemiológica de las enfermedades producidas por NTM, puesto que la enfermedad no es de notificación obligatoria en la mayoría de los países de la Unión Europea (UE) y del Espacio Económico Europeo (EEE).

En un reciente estudio realizado en 10 países de la Unión Europea (Croacia, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Alemania, Grecia, Italia, Luxemburgo, Países Bajos y Eslovenia) fueron identificadas un total de 99 especies de NTM, siendo las más frecuentes: *M. avium*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. chelonae* y *M. abscessus* (van der Werf *et al.*, 2014). Se puede observar a continuación en la tabla 2 las diferentes especies de micobacterias y las enfermedades asociadas.

**Tabla A.2.** Diferentes especies de micobacterias y las enfermedades clínicas que producen con mayor frecuencia. Tabla adaptada de (Wallace *et al.*, 2002).

<b>Especies</b>	<b>Personas sanas</b>	<b>Personas inmunodeprimidas</b>
<i>M. avium grupo</i>	Infección pulmonar	Infección pulmonar Infección diseminada en órganos como: hígado, bazo, médula ósea.
<i>M. gordonae</i>	Infección pulmonar	Infecciones pulmonares, seguidas de las óseas y de las de tejidos blandos
<i>M. xenopi</i>		Infección pulmonar Infección diseminada
<i>M. fortuitum</i>	Infección en herida pos traumática, Infección en catéter Infección en herida quirúrgica (mamoplastia y cirugía cardiaca)	Infección en catéter
<i>M. kansasii</i>	Infección pulmonar	Infección pulmonar Infección diseminada en órganos como: hígado, bazo, médula ósea.
<i>M. chelonae</i>	Infección en herida pos traumática, Infección en catéter Infección en herida quirúrgica (córneas)	Infección diseminada en la piel y en pacientes con órganos trasplantados Infección en catéter
<i>M. abscessus</i>	Infección pulmonar crónica Infección en herida pos traumática Infección en herida quirúrgica Infección en catéter Otitis crónica	Infección diseminada en la piel y en pacientes con órganos trasplantados Infección en catéter
<i>M. smegmatis</i>	Infección en herida pos traumática Infección en herida quirúrgica Osteomielitis en fracturas abiertas Infección pulmonar	
<i>M. mucogenicum</i>	Contaminación en sputum	Infección en catéter

## **A.8. *Mycobacterium abscessus* complex**

El *M. abscessus* complex está compuesto por 3 diferentes subespecies de *M. abscessus*: *M. abscessus* subespecie *abscessus* (sensu estricto). *M. abscessus* subespecie *bolletii* (*M. bolletii*) y *M. abscessus* subespecie *massiliense* (*M. massiliense*). Estas subespecies tienen una secuencia idéntica en la porción 16S rRNA del gen. Esta porción se utiliza para diferenciar entre especies de RGM. Lo que realmente diferencia *M. bolletii* y *M. massiliense* de *M. abscessus* sensu estricto (ATCC 19977<sup>T</sup>) son las diferencias en los nucleótidos *rpoB*, *hsp65*, *recA* y *sodA* (Howard, 2013).

### **A.8.1. *Mycobacterium abscessus* (sensu estrictu)**

*Mycobacterium abscessus* es una micobacteria de crecimiento rápido (RGM) y fue descrita inicialmente en 1953 por More y Frerichs como *M. chelonae* subespecie *abscessus* (Moore & Frerichs, 1953). No fue hasta 1992, después de su separación del grupo *M. chelonae*, que *M. abscessus* adquirió el reconocimiento como un importante patógeno humano responsable de un amplio espectro de infecciones (Kusunoki & Ezaki, 1992). Es una micobacteria ambiental ubicua presente en ríos, aguas residuales y aguas municipales para consumo humano. A partir de estas fuentes llega a los seres humanos a través de aerosoles o fómites contaminados con dicha bacteria. No hay registro de transmisión entre pacientes infectados (Petrini, 2006; Primm *et al.*, 2004).

Actualmente *M. abscessus* es reconocido como un patógeno emergente, y es cada vez más identificado como agente causal de infecciones pulmonar, sobre todo en enfermos con fibrosis quística. Ha sido reconocido recientemente como la causa del incremento del número de infecciones humanas, siendo la segunda (NTM) más diagnosticado en Korea (Lee *et al.*, 2010) y la tercera diagnosticada con mayor frecuencia de aislados respiratorios en Estados Unidos, llegando a representar el 80% de las micobacterias RGM aisladas de muestras respiratorias (Griffith *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 2002). Esta situación se ve agravada por su

alta resistencia a antibióticos, lo que causa grandes complicaciones en el tratamiento (Greendyke & Byrd, 2008; Medjahed *et al.*, 2010).

Entre sus características fenotípicas destacamos que es una micobacteria no pigmentada y presenta morfología colonial lisa y rugosa. Ambas variantes de *M. abscessus* lisa y rugosa, pueden ocurrir en aislados de casos clínicos, con predominio del fenotipo rugoso en pacientes con infección pulmonar crónica (Catherinot *et al.*, 2009; Cullen *et al.*, 2000; Jönsson *et al.*, 2007; Rüger *et al.*, 2014).

Investigando la relación entre la virulencia y la morfología colonial se ha concluido que la variante rugosa 390R es capaz de subsistir y multiplicarse en modelo murino de infección pulmonar y en los monocitos humanos a diferencia de la variante lisa 390S que carece de estas habilidades (Byrd & Lyons, 1999). Además la variante rugosa es letal en ratones infectados por vía intravenosa, e induce altos niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en macrófagos murinos derivados de médula ósea (Catherinot *et al.*, 2007). En otros estudios se observó que la cepa CIP 104536<sup>T</sup>-R era letal en ratones y embriones de pez-cebra, en cambio la cepa salvaje con morfología colonial lisa CIP 104536<sup>T</sup>-S fue incapaz de producir infección en ambos modelos experimentales (Bernut *et al.*, 2014; Catherinot *et al.*, 2007).

La gran diferencia observada entre la variante con morfología colonial lisa y la variante con morfología colonial rugosa es que la variante lisa presenta gran cantidad de GPL en la pared celular, sin embargo la variante rugosa puede producir muy poca cantidad de GPL en comparación con las grandes cantidades producidas por la variante lisa (Howard *et al.*, 2006). Estos GPL que recubren la superficie de la pared celular micobacteriana enmascararán los lípidos subyacentes de la pared, implicados en la estimulación de la respuesta inmune del huésped. Cuando se pierden o se reducen las cantidades de GPL, los lípidos bioactivos subyacentes son expuestos e interactúan con el sistema inmune del huésped (Nessar *et al.*, 2011; Rhoades *et al.*, 2009). A diferencia de *M. avium*, que presenta un cambio de morfología irreversible, en *M. abscessus* el cambio de morfología colonial es bidireccional, lo que indica un mecanismo reversible en la

síntesis de GPL. Otra característica que se puede observar en relación a la presencia de estos GPL en *M. abscessus* es la motilidad y la formación de biofilms, donde la cepa GPL deficiente no presenta motilidad y no es capaz de formar biofilms. (Howard *et al.*, 2006).

En un análisis del genoma de *M. abscessus* para entender las bases del cambio fenotípico de morfología colonial lisa a rugosa se observaron diferentes inserciones, pequeñas delecciones o polimorfismos de un único nucleótido dentro del gen péptido sintetasa no ribosomal (*mps1-mps2-gap* o *mmp14b*) en las variantes rugosas en acuerdo con las diferencias transcripcionales identificadas dentro de este locus genómico implicadas en la síntesis y transporte del GPL (Pawlik *et al.*, 2013).

Es muy estudiada la resistencia a antibióticos de *M. abscessus* (Greendyke & Byrd, 2008; Pawlik *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2000).

*M. abscessus* tiene una alta resistencia a los macrólidos debido a la presencia del gen *erm(41)* metilasa inducible (Nash *et al.*, 2009). También es conocida la resistencia de *M. abscessus* a las fluoroquinolonas, la doxiciclina y la minociclina (Wallace *et al.*, 2002). La amikacina y la cefoxitina son antibióticos de primera línea muy utilizados en el tratamiento de infecciones por *M. abscessus* debido a que esta micobacteria es susceptible a estos antibióticos (Brown-Elliott *et al.*, 2012).

En un reciente estudio de Rüger y colaboradores se analizó la resistencia a diferentes antibióticos en diferentes cepas de *M. abscessus* aisladas del sistema respiratorio de los enfermos. Estos aislados clínicos presentaban morfologías coloniales lisas y rugosas. Se observó que la alta resistencia a la claritromicina debido al gen *erm(41)* metilasa inducible o debido a las mutaciones en el gen *rrl* se produjo independientemente del morfotipo colonial presentado. También constataron que las MIC50s de amikacina y cefoxitina fueron idénticas para ambos morfotipos, mientras que la MIC50s de tigeciclina fue de 0,25 µg/ml para el

morfotipo colonial rugoso y de 2,0 µg/ml para el morfotipo colonial liso (Rüger *et al.*, 2014).

### **A.9. Motilidad**

La motilidad de los microorganismos podría desempeñar un papel importante en la colonización de superficies por micobacterias en el medio ambiente, así como en el huésped. Las micobacterias son microorganismos no flagelados, que en un principio se consideraban inmóviles. Martínez y colaboradores demostraron que *M. smegmatis* puede moverse sobre la superficie del medio de cultivo sólido por un mecanismo de deslizamiento. Esta capacidad de desplazarse se correlacionó con la presencia del GPL situado en su envoltura más externa de la pared del bacilo. La misma capacidad de desplazamiento se encontró *M. avium* que también presenta GPL en su pared celular (Martínez *et al.*, 1999).

En el ambiente natural, las micobacterias pueden colonizar y difundirse mediante motilidad por deslizamiento o por la formación de biopelículas (biofilm) (Pang *et al.*, 2013).

En un estudio de Howard y colaboradores, cuando analizaron la capacidad de motilidad en las diferentes variantes de *M. abscessus*, constataron que solamente la variante con morfología colonial lisa presentaba motilidad. La variante con morfología colonial rugosa no tenía esta capacidad. Eso se debió a que la variante con morfología colonial lisa presentaba GPL en su pared celular, y la variante con morfología colonial rugosa en cambio era GPL deficiente. (Howard *et al.*, 2006).

Agustí y colaboradores demostraron la capacidad de *M. vaccae* para desplazarse en medio sólido de cultivo. A diferencia de *M. abscessus*, *M. avium* o *M. smegmatis*, esta micobacteria no sintetiza GPL pero sí un poliéster saturado que está presente solamente en las variantes de morfología colonial lisa. En este estudio se investigó la capacidad de motilidad de otras especies filogenéticamente relacionadas con *M. vaccae* como es el caso de *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M.*

*obuense* y *M. parafortuitum* y en todas las especies que presentaban morfología colonial lisa también se observó la motilidad (Agustí *et al.*, 2008).

### **A.10. Interacción Macrófago - Micobacteria**

Los macrófagos desempeñan un papel muy importante en el control de las infecciones causadas por los microorganismos. Los macrófagos alveolares (en los pulmones) son las primeras células en fagocitar los microorganismos inhalados. Son células derivadas de los monocitos sanguíneos que salen del corriente sanguíneo y alcanzan su maduración en diferentes órganos bajo la influencia de los diferentes tejidos (Lohmann-Matthes *et al.*, 1994).

Las micobacterias, patogénicas o no, son interiorizadas por el macrófago dentro del fagosoma. Las bacterias no patógenas son destruidas por el macrófago, y las patógenas sobreviven y son capaces de multiplicarse dentro del macrófago (Jordao *et al.*, 2008). Eso se debe al hecho de que las micobacterias patógenas, como es el caso de *M. tuberculosis*, son capaces de impedir la fusión del fagosoma con el lisosoma, impidiendo así la actuación de las enzimas del lisosoma que actuarían en la destrucción del bacilo (Vergne *et al.*, 2004).

Para entender el mecanismo de acción de las micobacterias patógenas, numerosos investigadores utilizan la línea celular de macrófagos de ratón J774 que permite la realización de estudios comparativos de virulencia en cepas micobacterianas. Estos macrófagos son ampliamente utilizados para estudios de patogenicidad de especies del género *Mycobacterium* (Gao *et al.*, 2003; Indrigo *et al.*, 2003; Julián *et al.*, 2010; Ramakrishnan & Falkow, 1994).

### **A.11. Citocinas**

Las citocinas son un conjunto de proteínas que regulan las interacciones entre las células del sistema inmune. Su función inmunorreguladora es la clave de la respuesta inmune.

### A.11.1. Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ )

El factor de necrosis tumoral (del inglés tumor necrosis factor TNF, también conocido como TNF- $\alpha$ ) fue identificado en 1975 como una glicoproteína inducida por la endotoxina, lo que provocó una necrosis hemorrágica de los sarcomas que habían sido trasplantados en ratones (Carswell *et al.*, 1975). Se observó que tras la activación del sistema inmunológico se inicia la producción del TNF- $\alpha$ , que es capaz de iniciar una respuesta citotóxica significativa en muchas líneas celulares tumorales y causa necrosis tumoral en algunos modelos animales (Wajant *et al.*, 2003). Una de las principales funciones biológicas del TNF- $\alpha$  es la defensa del huésped frente a las infecciones bacterianas, virales y parasitarias.

El TNF- $\alpha$  es producido principalmente por los macrófagos, pero también hay una amplia variedad de otros tipos celulares incluyendo las células linfoides, células endoteliales, fibroblastos y tejido neuronal que son capaces de producir TNF- $\alpha$ . En respuesta a la exposición a diferentes productos bacterianos, como pueden ser los lipopolisacáridos, los macrófagos producen grandes cantidades de TNF- $\alpha$ . En conjunto con otras citocinas, el TNF- $\alpha$  tiene un papel clave en el desarrollo del shock-séptico (Männel & Echtenacher, 2000). Mientras que las altas concentraciones de TNF- $\alpha$  inducen síntomas parecidos al shock, la exposición prolongada a bajas concentraciones de TNF- $\alpha$  puede dar lugar a un síndrome de desgaste denominado caquexia. En efecto, el mediador biológico de la caquexia, originalmente descrito en un modelo animal de infección por *Trypanosoma* y por lo tanto llamado caquectina, ha sido más tarde identificado como TNF- $\alpha$  (Beutler *et al.*, 1985).

TNF- $\alpha$  es esencial para el control de *M. tuberculosis* en los seres humanos y en animales de experimentación, aunque TNF- $\alpha$  es una citoquina pleiotrópica (capaz de actuar en múltiples tipos celulares), sus actividades predominantes en la inmunidad de la tuberculosis son: contribuir a la activación de los macrófagos para que estos maten las micobacterias intracelulares y modular la apoptosis de las células infectadas. El TNF- $\alpha$  también puede actuar juntamente con el IFN- $\gamma$ , activar los macrófagos para el control óptimo del crecimiento de *M. tuberculosis*. Sin embargo, el exceso de TNF- $\alpha$  también contribuye a la inmunopatología de TB,

la óptima inmunidad con un daño mínimo del tejido es un importante elemento de la biología de TNF- $\alpha$  en TB (Philips & Ernst, 2012).

En el caso específico de la formación del granuloma en la enfermedad tuberculosa se demostró que los macrófagos inician la formación del granuloma cuando son estimulados por el TNF- $\alpha$ , y que las cepas virulentas de *M. tuberculosis* inducen a la producción por parte de los macrófagos de niveles de TNF- $\alpha$  significativamente más elevados que las cepas atenuadas (Philips & Ernst, 2012).

#### **A.11.2. Interleucina-6 (IL-6)**

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina multifuncional que desempeña un papel central en la defensa del huésped debido a su amplia gama de actividades inmunes y hematopoyéticas además de su potente capacidad para inducir una respuesta de fase aguda. La sobreexpresión de IL-6 ha sido implicada en la patología de una serie de enfermedades incluyendo el mieloma múltiple, la artritis reumatoide, la psoriasis, la osteoporosis post-menopáusica y la enfermedad de Castleman (Simpson *et al.*, 1997).

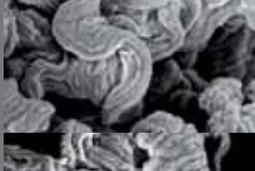
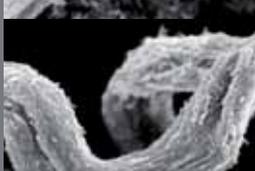
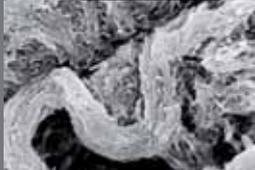
*M. tuberculosis* regula la producción de IL-6 por parte del huésped para inhibir la producción del Interferón de tipo I (que aumenta la susceptibilidad de los macrófagos a estímulos inductores de la apoptosis) y consecuentemente la progresión de la enfermedad (Martinez *et al.*, 2013). También se describió la importancia de la IL-6 en el mantenimiento del granuloma (Welsh *et al.* 2008).

## A.12. Justificación

La formación de cuerdas es una característica directamente relacionada con la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias patógenas. El compuesto responsable de la formación de cuerdas todavía es desconocido. Hay evidencias que demuestran que la formación de cuerdas podría estar relacionada directamente con la estructura fina de los ácidos micólicos. En un estudio con *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG se demostró que para la formación de cuerdas era necesaria la presencia de un anillo de *cis* ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico. La controversia es que otros autores describieron distintas especies de micobacterias que no tenían el anillo de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico como formadoras de cuerdas. Debido a esa discrepancia se decidió estudiar si para la formación de cuerdas era realmente necesaria la presencia de un anillo de ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico.

En diferentes estudios con *M. abscessus* se describieron dos variantes con morfologías distintas, y que estas morfologías estaban directamente relacionadas con la virulencia de estas variantes, donde la variante con morfología colonial rugosa era más virulenta que la variante con morfología colonial lisa. Con el intento de relacionar la virulencia de estas variantes y la formación de cuerdas se decidió investigar si las diferentes variantes de *M. abscessus* eran capaces de formar cuerdas, además de analizar la composición de los ácidos micólicos de *M. abscessus* para identificar la presencia o no del anillo de ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico.

Por otro lado, para comprender mejor los mecanismos de virulencia de *Mycobacterium abscessus*, se realizaron distintos estudios con la finalidad de encontrar diferencias entre las variantes. Para ello se realizó el estudio de la progresión de la infección de macrófagos, se analizó la inducción de la producción de citocinas por parte de los macrófagos infectados y la actividad biológica del TDM de *M. abscessus*, y adicionalmente se hicieron estudios exhaustivos a nivel microscópico para analizar la interacción macrófago-micobacteria. Además de comparar la capacidad de motilidad, desecación, la sensibilidad a antibióticos y la curva de crecimiento de las diferentes variantes.



---

## B. OBJETIVOS

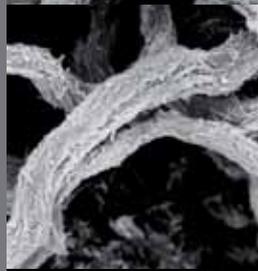
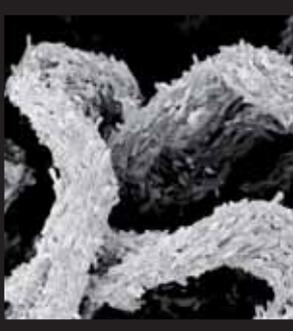
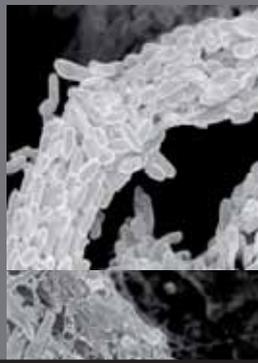
---

---

1. Analizar la capacidad de formar cuerdas de las diferentes cepas: *M. brumae*, *M. fallax*, *M. marinum*, *M. bovis* BCG Japan, *M. abscessus* 390S, *M. abscessus* 390R, *M. abscessus* 44196S, *M. abscessus* 44196R, *M. abscessus* BE37R y *M. abscessus* BE48R.
2. Investigar si las micobacterias que no tienen el anillo de *cis*-ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico son capaces de formar cuerdas.
3. Analizar si hay diferencias en la composición del ácido  $\alpha$ -micólico en las diferentes variantes lisas y rugosas de *M. abscessus*.
4. Estudiar la agregación de los bacilos en las variantes lisa y rugosa de *M. abscessus*.
5. Estudiar la virulencia de las diferentes variantes lisas y rugosas de *M. abscessus* y la interacción de las mismas con el macrófago murino mediante la utilización de diferentes técnicas de microscopia y el análisis de la inducción de la producción de citocinas.
6. Investigar la actividad biológica del TDM de *M. abscessus*.
7. Analizar y comparar la capacidad de motilidad, desecación, la sensibilidad a antibióticos y la curva de crecimiento de las diferentes variantes lisas y rugosas de *M. abscessus*.

---

---



---

## C. MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

## C.1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este estudio se ven reflejados a continuación en la tabla 1.

**Tabla C.1.** Diferentes cepas utilizadas en este estudio.

Cepas	Aislados	Morfología colonial	Nivel de seguridad biológica
<i>M. abscessus</i> 44196S	ATCC 19977 <sup>T</sup> , DSMZ 44196 <sup>T</sup>	Lisa	2
<i>M. abscessus</i> 44196R	Mutante natural de la cepa 44196 <sup>T</sup>	Rugosa	2
<i>M. abscessus</i> 390R	Aislado de un granuloma ileal en un paciente con enfermedad de Crohn	Rugosa	2
<i>M. abscessus</i> 390S	Mutante natural de la cepa 390R	Lisa	2
<i>M. abscessus</i> BE37R	Aislado en esputo de un paciente con enfermedad pulmonar grave	Rugosa	2
<i>M. abscessus</i> BE48R	Aislado en esputo de un paciente con enfermedad pulmonar grave	Rugosa	2
<i>M. brumae</i>	ATCC51384 <sup>T</sup> , DSMZ 44177 <sup>T</sup> ,	Rugosa	1
<i>M. bovis</i> BCG Japan	ATCC 35737 <sup>T</sup>	Rugosa	2
<i>M. fallax</i>	ATCC35219 <sup>T</sup> , DSM44179 <sup>T</sup>	Rugosa	1
<i>M. marinum</i>	ATCC927 <sup>T</sup>	Rugosa	2
<i>M. vaccae</i> S	ATCC 15483 <sup>T</sup> , DSMZ 43292 <sup>T</sup>	Lisa	2
<i>M. vaccae</i> R	Mutante natural de la cepa 15483 <sup>T</sup>	Rugosa	2

La cepa 390R fue aislada de un paciente con Enfermedad de Crohn. La cepa 390S fue obtenida después de pases seriados de la cepa 390R en laboratorio. Ambas cepas fueron cedidas por el Dr. Thomas F. Byrd, de la University of New Mexico School of Medicine, New Mexico, E.U.A.

Las cepas BE37R y BE48R fueron aisladas de pacientes con enfermedad pulmonar. Ambas cepas fueron cedidas por el Dr. Fernando Alcaide, Hospital Universitari de Bellvitge - IDIBELL, Universitat de Barcelona, España.

La cepa DSMZ 44196<sup>T</sup> R fue obtenida a través de pases seriados de la cepa tipo *M. abscessus* DSMZ 44196<sup>T</sup>S, en laboratorio de Micobacteriología de la Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, España.

### C.1.1. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo de las diferentes cepas se reflejan a en la tabla 2.

**Tabla C.2.** Condiciones de cultivo.

Micobacterias	Medio cultivo	Temperatura	Tiempo incubación
<i>M. abscessus</i>	TSA	37 °C	15 días
<i>M. bovis BCG-Japan</i>	7H10 + OADC	37 °C	30 días
<i>M. brumae</i>	TSA	37 °C	15 días
<i>M. fallax</i>	TSA	37 °C	15 días
<i>M. marinum</i>	7H10 + OADC	30 °C	15 días
<i>M. vaccae</i>	TSA	37 °C	15 días

### C.1.2. Mantenimiento de las cepas

Las cepas se mantuvieron en medio de congelación a – 40 °C.

Medio de congelación de bacterias:

1. 100 ml de agua destilada.
2. 20 g de leche desnatada en polvo.
3. Se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 10 min.

4. Se prepararon alícuotas de 1 ml de medio de congelación en un eppendorf con aproximadamente 5 a 10 colonias aisladas.

Después de descongelar las cepas se realizaron al menos un pase para confirmar que estas mantenían la morfología colonial esperada.

Para los estudios realizados con las cepas lisas de *M. abscessus*, se descongelaron los viales antes de cada experimento, evitando así la mutación espontánea de las mismas y que estas pasasen a una morfología colonial rugosa.

## **C.2. Medios de cultivo y tampones**

### **C.2.1. Middlebrook 7H9 suplementado con ADC**

#### Preparación del ADC

1. Para 100 ml de agua destilada se añadió:

Albumina suero bovino (BSA) fracción V	5 g
Catalasa	4 mg
NaCl	0.85 g
Glucosa	2 g

2. Se mezclaron todos los componentes y se esterilizaron mediante filtración.

3. Se encubó a 37 °C durante 24 horas.

4. Una vez se observó que no hubo crecimiento microbiológico, se prosiguió a la preparación del 7H9.

#### Preparación del medio 7H9

Para 1000ml de agua destilada se añadió:

Glicerol	5 ml
Middelbrook 7H9 Agar	19 g

5. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 10 minutos.
6. Cuando el medio alcanzó la temperatura de 60 °C, se suplementó con el ADC y se dispensó en botellas estériles.

### **C.2.2. Middlebrook 7H10 suplementado con OADC**

Este medio es una modificación del medio anterior. En la preparación del (ADC) se añade 0.05 g de Ácido oleico, teniendo así (OADC). Para preparar el medio sólido se utilizó 19 g de 7H10 Agar en 1000 ml de H<sub>2</sub>O.

### **C.2.3. TSB - triptona y soja caldo**

1. Para 1000 ml de agua destilada se añadió:

NaCl	5 g
Peptona	5 g
Triptona	15 g

2. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **C.2.4. TSA - triptona y soja agar**

1. Para 1000 ml de agua destilada se añadió:

Agar	5 g
NaCl	5 g
Peptona	5 g
Triptona	5 g

2. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez templado, se dispense en placas de Petri.

### C.2.5. Medio de cultivo para la prueba de motilidad

7H9 a 0,3% de agarosa

1. Para 1000 ml de agua destilada se añadió:

7H9 19 g

Agarosa 3 g

2. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez templado, se dispuso en placas de Petri.

Se esperó un mínimo de 24 horas para su utilización.

### C.2.6. Tampón fosfato salino (PBS)

1. Para 1000 ml de agua destilada se añadió:

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,16 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g

2. Se ajustó el pH a 7,4.

3. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

### C.2.7. Tampón Carbonato de sodio / Bicarbonato de sodio

1. Para 1000 ml de agua desmineralizada se añadió:

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - (8mM) 0,848 g

NaHCO<sub>3</sub> - (17 mM) 1,428 g

2. Se ajustó el pH entre 9,6 y 10.

3. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **C.3. Análisis de la morfología colonial**

Para analizar la morfología colonial de las diferentes cepas estudiadas, estas se cultivaron en medios de cultivo sólidos.

Las cepas *M. brumae*, *M. fallax* y las diferentes cepas de *M. abscessus* se cultivaron en TSA durante 7 días. *M. brumae*, *M. fallax* se incubaron a 30 °C y las diferentes cepas de *M. abscessus* a 37 °C.

*M. marinum* y *M. bovis* BCG Japan se cultivaron en 7H10. La primera se incubó a 30 °C y la segunda a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron imágenes de las colonias con una cámara fotográfica digital Nikon.

### **C.4. Análisis de la formación de cuerdas microscópicas**

Para analizar la formación de cuerdas microscópicas en las cepas estudiadas se prepararon muestras para observación por microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

Las cepas *M. brumae*, *M. fallax*, *M. marinum* y BCG Japan se cultivaron en el medio líquido 7H9 y se incubaron a 37 °C excepto *M. marinum* que se incubó a 30 °C, sin agitación. Las cepas se incubaron durante dos semanas con excepción de *M. bovis* que se incubó durante 4 semanas.

Las diferentes cepas de *M. abscessus* se cultivaron en medio líquido TSB a 37 °C, sin agitación durante dos semanas.

Una vez crecido el cultivo se procedió a la preparación de las muestras para la microscopía óptica o microscopía electrónica.

#### **C.4.1. Microscopía óptica - tinción de Ziehl Neelsen**

1. Se añadieron 10 µl de agua destilada en un porta objetos y se hizo un frotis de la muestra.
2. Se dejó secar al aire (dentro de la cabina de seguridad biológica) y después se fijó con calor cubriendo la muestra con etanol 96° y quemándola.
3. Se cubrió toda la superficie del portaobjetos con fucsina básica fenicada y se calentó la muestra pasándola por la llama del Bunsen.
4. Se esperaron 7 min y se repitió el procedimiento dos veces más.
5. Se eliminó la fucsina con agua a baja presión.
6. Se cubrió la superficie total del portaobjetos con decolorante alcohol 96° - ácido clorhídrico al (97:3, v:v) y se esperó 2 minutos.
7. Se lavó el portaobjetos con agua para retirar el decolorante.
8. Se cubrió el extendido durante 1 minuto con solución de azul de metileno.
9. Se hizo un aclarado y se secó a temperatura ambiente.
10. Se montó el porta objetos con un cubre objetos y se observó en un microscopio óptico (DMRBE – Leica, Alemania) a un aumento de 100X con aceite de inmersión.

#### **C.4.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

1. Después del tiempo necesario de incubación, se formó una película bacteriana en la interfase líquido-aire, que se recogió con un filtro de membrana nucleopore con 0,2 µm de tamaño de poro (Whatman, UK) y se procesó para análisis por MEB.
2. Se fijaron las muestras en 2,5% (vol/vol) de glutaraldehído en 0,1 M de tampón fosfato (PB) a un pH 7,4 durante 24 h una temperatura de 4 °C.
3. Transcurrido el tiempo de fijado se hicieron 4 lavados de 10 minutos cada con 0,1 M PB.
4. Seguidamente se hizo el pos-fijado con 1% (wt/vol) tetraóxido de osmio con 0,7 % de ferrocianuro en PB durante 2 horas a 4 °C.

5. Se realizó otro lavado con agua desionizada y se procedió a la deshidratación seriada con series crecientes de etanol en H<sub>2</sub>O desionizada (30, 50, 70, 90, 95 y 100%) con un tiempo de duración de 15 min cada serie.

6. Para finalizar el proceso de deshidratación se realizó el punto crítico con CO<sub>2</sub> (CPD030 – Baltec, Alemania).

7. Las muestras se metalizaron con oro en el E5000 Sputter Coater (Emitech).

8. Se observaron las muestras en el microscopio electrónico de barrido (MEB) S-570 (Hitachi, Japan) operando a 15 kV.

Los análisis de Microscopia se realizaron en el Servei de Microscòpia de la Universidad Autònoma de Barcelona.

## **C.5. Análisis del patrón de los ácidos micólicos (AM)**

Para realizar el análisis del patrón de los AM de las diferentes cepas estudiadas, se hizo la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos micólicos mediante el proceso de metanólisis ácida (Minnikin *et al.*, 1980).

### **C.5.1. Extracción de AM - metanólisis ácida**

1. En tubos con tapón de teflón (9 ml) se añadieron 2ml de solución metanol:tolueno:ácido sulfúrico (30:15:1, v:v:v) y 50mg (peso seco) de material celular.

2. Se mezcló con vortéx (IKA, modelo Genius 3) hasta que todo el material celular estuviera en contacto con la solución.

3. La mezcla se mantuvo en baño seco (J.P.Selecta, modelo multiplaces) a 80 °C durante 16 horas.

4. La mezcla se dejó enfriar y se añadieron 2ml de *n*-hexano, se mezcló con vórtex, y se dejó formar dos fases (5min aproximadamente), se recuperó la fase superior, que es correspondiente al *n*-hexano. Se repitió este paso una vez más.

5. Se evaporó el *n*-hexano bajo corriente de nitrógeno a 40 °C.

### **C.5.2. Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía de capa fina (CCF) analítica**

El patrón de los ésteres metílicos de los ácidos micólicos se analizó mediante CCF analítica unidimensional en placas de CCF sílica gel 60 (0,25mm x 20cm x 20cm, Merck).

1. Se resuspendieron los ésteres metílicos obtenidos a partir de la metanólisis ácida en 0,5 ml de *n*-hexano.
2. Se añadieron 10 µl de cada muestra a la superficie de la placa con un capilar de vidrio.
3. Se eluyó la placa 3 veces con *n*-hexano-éter etílico (85:15; v:v).
4. Las muestras se revelaron por pulverización con ácido fosfomolibdico al 10 % (p/v) en etanol absoluto y calentando 128 °C en una placa calefactora.

### **C.5.3. Precipitación de los ésteres metílicos en metanol frio**

1. Se diluyeron los ésteres metílicos en una mínima cantidad de *n*-hexano.
2. Se añadieron 3ml de metanol.
3. La muestra se mantuvo toda la noche a 4 °C.
4. Se centrifugó la muestra a 1509g 10min 4 °C.
5. Se retiró el sobrenadante (metanol + ácidos grasos) y se evaporó el contenido restante del tubo bajo corriente de nitrógeno a 35 °C.

### **C.5.4. Aislamiento del α-micolatos**

1. Se resuspendieron los ésteres metílicos obtenidos a partir de la metanólisis ácida en 0,5 ml de *n*-hexano.

2. Se añadieron 10  $\mu$ l de la muestra a la superficie de la placa placas de CCF sílica gel 60 (0,25 mm x 20 cm x 20 cm, Merck) con zona de pre-concentración con un capilar de vidrio.
3. Se eluyó la placa 3 veces con *n*-hexano-éter etílico (85:15; v:v).
4. Se reveló la placa con vapores de yodo.
5. Se marcó la zona de interés.
6. Se esperó que el yodo se evaporase por completo.
7. Se rascó la zona de sílica donde se veían los patrones del  $\alpha$ -micolatos.
8. Se recuperaron los ésteres metílicos de la sílica con éter etílico (5 ml) 3 veces.
9. Se evaporó la muestra bajo corriente de nitrógeno a 40 °C hasta la sequedad.
10. Se analizó nuevamente la muestra mediante CCF analítica para comprobar el total aislamiento del  $\alpha$ -micolatos.

#### **C.5.5. Purificación de ésteres metílicos por cromatografía en columna**

Los ésteres metílicos fueron fraccionados mediante cromatografía en columna, equilibrada con *n*-hexano y utilizando diferentes gradientes de concentración de éter etílico en *n*-hexano como eluyente. La separación fue monitorizada mediante CCF analítica.

1. Se preparó una columna cromatográfica con sílica gel 60 (0.063-0.200 mm) (Merck) equilibrada con 100% de *n*-hexano.
2. Se utilizaron diferentes gradientes de concentración de éter etílico en *n*-hexano.
3. Se añadió una pequeña cantidad de lana de vidrio lavada (Panreac) en el fondo de la columna.
4. Para una columna de aproximadamente 10 cm se añadió 4 g de sílica.
5. Se resuspendió la sílica en 20 ml de *n*-hexano y se montó la columna.

6. Se eluyeron diferentes concentraciones de disolventes: 100% *n*-hexano, 95% *n*-hexano -5% éter etílico, 90% *n*-hexano -10% éter etílico, 80% *n*-hexano -20% éter etílico, cada concentración en un volumen final de 20ml.

7. Se recuperó la muestra en la fracción *n*-hexano - éter etílico (95:5, v:v).

8. Se comprobó en qué fracción estaba la muestra mediante CCF analítica.

### **C.6. Análisis de la presencia de GPL**

Se hizo la extracción de GPL de las siguientes cepas estudiadas *M. abscessus* 390S, 390R, 44196S, 44196R, BE37R y BE48R.

1. Se añadió en un Erlenmeyer 2 g de micobacterias crecidas en placa TSA y se mezcló con cloroformo/metanol (1:2, v:v).

2. Se dejó en agitación 24 h a temperatura ambiente.

3. Se filtró la muestra con papel Whatman, y se añadió cloroformo/metanol (2:1, v:v) para una segunda extracción, repitiendo el paso anterior.

4. Se juntaron los extractos de las dos extracciones, y se evaporaron hasta la sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C.

5. Se comprobó el resultado de la extracción mediante CCF analítica con cloroformo/metanol/agua (90:10:1, v:v:v) y se revelaron los patrones de GPL por pulverización con antrona al 1% en ácido sulfúrico y calentando a 128 °C en una placa calefactora.

### **C.7. Extracción del TDM**

Se hizo la extracción del TDM de las cepas 390S y 390R.

1. Se añadió en un Erlenmeyer 2 g de micobacterias crecidas en placa TSA y se mezcló con cloroformo/metanol (1:2, v:v).

2. Se dejó en agitación 24 h a temperatura ambiente.

3. Se filtró la muestra con papel Whatman, y se añadió cloroformo/metanol (2:1, v:v) para una segunda extracción, repitiendo el paso anterior.

4. Se juntaron los extractos de las dos extracciones, y se evaporaron hasta la sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C.

5. Se comprobó el resultado de la extracción mediante CCF analítica con cloroformo/metanol/agua (90:10:1, v:v:v) y se revelaron los patrones del TDM por pulverización con antrona al 1% en ácido sulfúrico y calentando a 128 °C en una placa calefactora.

### **C.8. Precipitación del TDM en metanol frio**

1. Se añadieron a los extractos evaporados 3ml de metanol.

2. La muestra se mantuvo toda la noche a 4 °C

3. Se centrifugó la muestra a 1509g 10min 4 °C.

4. Se retiró el sobrenadante (metanol + lípidos libres) y se evaporó bajo corriente de nitrógeno a 35 °C.

6. Se comprobó el resultado de la extracción mediante CCF analítica con cloroformo/metanol/agua (90:10:1, v:v:v) y se revelaron los patrones del TDM por pulverización con antrona al 1% en ácido sulfúrico y calentando a 128 °C en una placa calefactora.

### **C.9. Purificación del TDM por cromatografía en columna**

El TDM fue fraccionado mediante cromatografía en columna equilibrada con cloroformo, utilizando diferentes gradientes de concentración de metanol en *n*-cloroformo como eluyente. La separación fue monitoreada mediante CCF analítica.

1. Se preparó una columna cromatográfica con sílica gel 60 (0.063-0.200 mm) (Merck) equilibrada con 100% de cloroformo.

2. Se utilizaron diferentes gradientes de concentración de metanol en cloroformo.

3. Se añadió una pequeña cantidad de lana de vidrio lavada (Panreac) en el fondo de la columna.
4. Para una columna de aproximadamente 10 cm añadir 4 g de sílica.
5. Se resuspendió la sílica en 20 ml de cloroformo y se montó la columna.
6. Se eluyeron diferentes concentraciones de disolventes: 100% cloroformo, 99% cloroformo -1% metanol, 98% cloroformo -2% metanol, 95% cloroformo -5% metanol, 90% cloroformo -10% metanol, 80% cloroformo -20% metanol, cada concentración en un volumen final de 20ml.
7. Se recuperó la muestra en la fracción cloroformo:metanol (95:5, v:v)
8. Se comprobó en qué fracción estaba la muestra mediante CCF analítica.

### **C.10. Análisis de los ésteres metílicos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los extractos de los ésteres metílicos purificados fueron disueltos en 600  $\mu$ l de deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$  al 99.80 %) y transferidos a un tubo (5 mm diámetro) de RMN.

Los análisis se realizaron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance II 600 (Bruker Biospin, Alemania) equipado con una sonda TBI de 5 mm y gradientes en el eje Z, que funciona a una frecuencia de 600,13 megahertz (MHz) para protón ( $^1\text{H}$ -RMN) i y a una temperatura de 298,0 K.  $^1\text{D}$   $^1\text{H}$  RMN espectros fueron adquiridos utilizando una secuencia de pulsos pulso de adquisición de  $90^\circ$ , con un tiempo de adquisición de 1,71 segundos y un retraso de relajación de 2 segundos. Los datos se recogieron en 32 K puntos, con una anchura espectral de 9590 Hz (Hertz) y con la suma de 128 transitorios. Todos los espectros fueron calibrados utilizando la señal residual del disolvente cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) en desplazamiento químico ( $\delta$ ) 7,27 ppm. Los datos de desplazamiento químico se expresan en valores constantes de acoplamiento (J) ppm y en Hz. La multiplicidad de picos se abrevia como d (doblete) y t (tripleto).

Los análisis de RMN se realizaron en el Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### **C.11. Crecimiento de *M. abscessus***

Para determinar si hay diferencias en crecimiento de las variantes lisa y rugosa de *M. abscessus* se realizó el estudio de la curva de crecimiento, comparando densidad óptica y unidad formadora de colonias (CFU) (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013).

Para este estudio se utilizaron las cepas de 44196S y 44196R.

1. Se preparó una suspensión bacteriana a una turbidez 1 de la escala McFarland.
2. Se inocularon 200 µl de la suspensión bacteriana en 20 ml de 7H9 enriquecido con OADC.
3. Se incubaron en un baño orbital termostático (HT Infors – Aquatron) a 250 rpm y a una temperatura de 37 °C durante 8 días.
4. Se cogieron muestras cada 24 horas.
5. Las muestras se sembraron en 7H10 a diferentes diluciones.
6. Paralelamente se determinó la densidad óptica de la muestra a 600 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic- Genesys20).
7. Este estudio fue realizado por triplicado.
8. Los resultados se expresaron en promedio de los triplicados.

## C.12. Motilidad

Para estudiar la capacidad de desplazarse de las diferentes variantes de *M. abscessus* se hicieron siembras en medios de cultivo semi-sólidos (Martínez *et al.*, 1999).

Se utilizaron las diferentes cepas de *M. abscessus*: 390R, 390S, 44196R, DSMZ 44196S, BE37R, BE48R, y se añadió las cepas de *M. vaccae* S y *M. vaccae* R como control del correcto funcionamiento del medio de cultivo, puesto que estas cepas ya tenían su motilidad descrita anteriormente (Agustí *et al.*, 2008).

1. Se preparó una suspensión bacteriana a una turbidez 1 de la escala McFarland.
2. Se inocularon 10 µl de la suspensión en el centro de la placa.
3. Se incubaron 7 días a 37 °C.
4. Transcurridos los 7 días de incubación se analizaron los resultados y se escanearon las placas para obtener imágenes.

## C.13. Resistencia a la desecación

Con la finalidad de estudiar si hay diferencia o no en la resistencia a la desecación entre las diferentes variantes de *M. abscessus* se realizó el siguiente procedimiento (Aranda *et al.*, 2011).

1. Se preparó una suspensión bacteriana y se ajustó a una turbidez 1 McFarland.
2. Se añadieron 10 µl de la suspensión bacteriana a diferentes diluciones (0, -1, -2) en un filtro de celulosa estéril con poro de 0.45µm (Nahita, Spain).
3. Los filtros se incubaron dentro de placas de Petri estériles durante diferentes tiempos (0, 3, 6, 24 y 48 h) a 37 °C.

4. Pasado el tiempo de incubación se colocaron los filtros en placas - TSA, se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 37 °C durante 7 días.

5. Transcurridos los 7 días se analizaron los resultados y se escanearon las placas.

## **C.14. Susceptibilidad a antibióticos**

Para el estudio de susceptibilidad de las diferentes variantes de *M. abscessus* a diferentes antibióticos se utilizó el sistema Sensititre de microdilución y un para la Gentamicina un sistema de macrodilución en Caldo Mueller-Hinton.

### **C.14.1. Procedimiento para la placa Sensititre RAPMYCOI (Termo Scientific).**

1. Se preparó una suspensión bacteriana que se ajustó a un estándar McFarland 1,0.

2. Se transfirió 50 µl de la suspensión a un tubo de caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados y con solución amortiguadora TES, obteniendo un inóculo de  $5 \times 10^5$  cfu/ml.

3. Se añadió 100 µl del caldo Muller Hilton que contenía las bacterias en cada pocillo de la placa Sensititre.

4. Se taparon todos los pocillos con una lámina adhesiva.

5. Se incubaron las placas aeróbicamente a 37 °C.

6. A las 96 horas se comprobó si hubo crecimiento.

7. Transcurridas 96 horas, se hizo la lectura de los resultados y se añadió 20 µl de una solución de resazurina al 0,01% en agua milli-Q estéril y se incubó 24 horas más.

8. Se comprobó el resultado de la resazurina para corroborar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. Si el resultado fue rosa significó que hubo crecimiento y si fue azul/violeta no hubo crecimiento.

9. Las directrices de interpretación de las MIC vienen dadas por CLSI (García-Martos *et al*, 2012):

#### **C.14.2. Sistema de macrodilución en caldo Mueller-Hinton para ensayo de sensibilidad la a gentamicina**

Para el estudio de sensibilidad a la gentamicina se utilizó el método de macrodilución en caldo Mueller-Hinton en tubos de vidrio

Se ensayaron 9 concentraciones diferentes de gentamicina (Sigma) (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 µg/ml).

A cada dilución se le agregó un inóculo bacteriano ajustado a la escala 0.5 de McFarland. Se incubó durante 96 horas a 37 °C y se determinó la CMI (concentración mínima inhibitoria) mediante la observación de la menor dilución del antibiótico en la que se observa inhibición del crecimiento visible bacteriano.

**Tabla C.3.** Referencia de la placa Sensititre RAPMYCOI (Sensititre, 2013). El rango de concentración de los diferentes antibióticos está expresado en µg/ml.

**SENSITITRE  
RAPMYCOI  
Mycobacterium Reference Card**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	<b>ANTIMICROBICS</b>	
A	SXT 0.25/4.75	SXT 0.5/9.5	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	SXT 8/152	LZD 1	LZD 2	LZD 4	LZD 8	LZD 16	LZD 32	SXT	Trimethoprim / sulfamethoxazole
B	CIP 0.12	CIP 0.25	CIP 0.5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	IMI 32	IMI 64	CIP	Ciprofloxacin
C	MXF 0.25	MXF 0.5	MXF 1	MXF 2	MXF 4	MXF 8	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FEP 32	MXF	Moxifloxacin
D	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	FOX 128	AUG2 2/1	AUG2 4/2	AUG2 8/4	AUG2 16/8	AUG2 32/16	AUG2 64/32	FOX	Cefoxitin
E	AMI 1	AMI 2	AMI 4	AMI 8	AMI 16	AMI 32	AMI 64	AXO 4	AXO 8	AXO 16	AXO 32	AXO 64	AMI	Amikacin
F	DOX 0.12	DOX 0.25	DOX 0.5	DOX 1	DOX 2	DOX 4	DOX 8	DOX 16	MIN 1	MIN 2	MIN 4	MIN 8	DOX	Doxycycline
G	TGC 0.015	TGC 0.03	TGC 0.06	TGC 0.12	TGC 0.25	TGC 0.5	TGC 1	TGC 2	TGC 4	TOB 1	TOB 2	TOB 4	TGC	Tigecycline
H	CLA 0.06	CLA 0.12	CLA 0.25	CLA 0.5	CLA 1	CLA 2	CLA 4	CLA 8	CLA 16	TOB 8	TOB 16	POS CON	CLA	Clarithromycin
													LZD	Linezolid
													IMI	Imipenem
													FEP	Cefepime
													AUG2	Amoxicillin / clavulanic acid 2:1 ratio
													AXO	Ceftriaxone
													MIN	Minocycline
													TOB	Tobramycin
													POS	Positive Control

### **C.15. Preparación de la suspensión bacteriana para infectar el cultivo de macrófagos**

Para la preparación de la suspensión bacteriana se utilizó el protocolo estándar para disgregar al máximo las micobacterias y no alterar su viabilidad (Stokes *et al.*, 2004).

1. Se añadieron 3-4 nansas de microorganismos crecidos (7 días) en placa TSA, en un tubo de vidrio con esferas de vidrio estéril.
2. Se agitó vigorosamente con la ayuda de un vórtex para que las bacterias se disgregarasen.
3. Se añadieron 4ml de PBS y se agitaron con el vórtex hasta conseguir una suspensión bacteriana más homogénea posible.
4. Se dejó reposar durante 10 minutos para que se precipitasen los agregados grandes.
5. En otro tubo de vidrio se diluyó la suspensión bacteriana con PBS hasta conseguir una turbidez correspondiente al McFarland 1,0 de la escala de turbidez.
6. Se centrifugó a 1500 g, 10 minutos a 4 °C.
7. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en DMEM sin antibióticos.
8. Para terminar de romper los agregados se puso la suspensión en un baño de ultrasonidos 3 veces durante 30 segundos a temperatura ambiente.
9. Para saber cuánto correspondía el McFarland 1,0 de la escala para cada microorganismo se sembraron en placas TSA o 7H10 a diferentes diluciones y se hicieron recuentos de las unidades formadoras de colonias (UFC).
10. Cada vez que se realizaba un experimento se sembraba la suspensión bacteriana para comprobar que se correspondía a las UFCs estimadas.

## **C.16. Análisis del tamaño de los agregados en la suspensión bacteriana y dentro de los macrófagos infectados para evaluar la capacidad de los macrófagos de fagocitar bacilos aislados o agregados**

Para comprobar si la suspensión bacteriana era homogénea y si había o no la presencia de agregados en la suspensión, se hizo un análisis de la misma mediante CLSM. Para este análisis se utilizaron las diferentes cepas de *M. abscessus*.

1. La suspensión bacteriana se preparó como descrita anteriormente.
2. Se tiñeron las bacterias con Syto 9 durante 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad.
3. Las bacterias se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C.
4. Se hicieron 2 lavados con PBS.
5. Se resuspendieron en PBS y se sonicaron en el baño de ultrasonidos 3 veces durante 30 segundos a temperatura ambiente.
6. Se añadieron 10 µl de la suspensión bacteriana a porta objetos y se cubrieron con un cubre de vidrio.

### **C.16.1. Condiciones de captación y análisis de las imágenes**

1. Se utilizó el microscopio CLSM (TCS-SPS, Leica), usando un objetivo de 63x y un plano de apertura numérica de 1.8 en aceite de inmersión.
2. El Syto 9 fue excitado a una longitud de onda de 488 nm y emite a una longitud de 510 nm.
3. Se generaron imágenes en secuencias Z.
4. Se captaron 20 planos aleatorios por muestra.
5. Se midieron la intensidad de fluorescencia y el área de los bacilos o agregados.

6. Primero se calculó la intensidad y el área media de 1 bacilo aislado. Para ello se midieron 60 bacilos de cada cepa.

7. Posteriormente se midieron la intensidad de fluorescencia y las áreas de los agregados de cada cepa.

8. En función de los análisis de la intensidad de fluorescencia y del área de los bacilos aislados se siguió el siguiente criterio de clasificación: área  $< 3 \mu\text{m}^2$  se consideró que tenía 1 a 2 bacilos; área entre  $3-6 \mu\text{m}^2$  se consideró que tenía entre 3 a 4 bacilos, e para áreas  $> 6 \mu\text{m}^2$  se consideró un agregado con 5 o más bacilos (Tabla 4).

9. Posteriormente se analizó el área de los agregados dentro de los macrófagos infectados con las diferentes cepas después de 3 horas de infección para determinar si los macrófagos fueron capaces de fagocitar agregados.

**Tabla C.4.** Criterios para evaluar el aislamiento o agregación de los bacilos en la suspensión bacteriana.

<b>Área de los agregados</b>	$<3\mu\text{m}^2$	$3-6\mu\text{m}^2$	$>6 \mu\text{m}^2$
<b>Número de bacilos</b>	1-2	3-4	$\geq 5$

Se analizaron las imágenes en el programa ImageJ (National Institutes of Health, US) utilizando una macro automatizada para medir el área de los agregados.

### C.17. Línea celular

Para los diferentes estudios de virulencia se utilizó la línea celular de macrófagos de ratón J774 (DSMZ ACC 170).

### **C.17.1. Cultivo celular**

Los macrófagos se cultivaron en DMEM con L-glutamina y alto contenido de glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina G, estreptomicina y se mantuvieron a 37 °C y a una atmosfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para la realización del trabajo experimental se utilizaron células con un máximo de 10 pases.

### **C.17.2. Controles de contaminación por micoplasma**

Se hicieron controles periódicos en los cultivos celulares para descartar contaminación por micoplasma.

### **C.17.3. Congelación de las células eucariotas**

Las células se congelaron en el medio de congelación compuesto por SBF descomplementado (57 °C durante 30 minutos) con 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente filtrado con un filtro de 22 µm (Millipore). Este medio se mantuvo a 4 °C hasta su utilización. Las células fueron diluidas en medio de congelación a una concentración de  $1 \times 10^7$  células por mililitro y puestas en crioviales (Nunc). Los crioviales se mantuvieron mínimo 24 horas dentro del Mr. Frosty (Nalgene) con 2-propanol para que el proceso de congelación fuera lento y no dañase las células. Posteriormente se guardaron las células directamente en el congelador a - 80 °C, donde se mantuvieron hasta su uso.

### **C.17.4. Descongelación de las células eucariotas**

Para descongelar las células para su utilización se procedió de la siguiente manera:

1. En un flascón de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) se añadió 5 ml de medio DMEM con antibiótico.

2. Se descongelaron las células en el baño caliente a 37 °C. Una vez descongeladas se vertió el contenido del criovial al flascón.

3. Se incubaron a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas.

4. Transcurrido el tiempo necesario para que las células se engancharan al flascón, se hizo un cambio de medio de cultivo celular, descartando el medio que estaba en el flascón y añadiendo 5 ml de medio de cultivo con antibiótico nuevo.

#### **C.17.5. Pases celulares**

1. Para el mantenimiento del cultivo celular se hicieron pases cuando el cultivo estaba a un 90% de confluencia.

2. Se descartó el medio de cultivo del flascón.

3. Se hizo un lavado de las células con tampón fosfato salino (PBS) a 37 °C.

4. Se añadió 1x tripsina EDTA. Se movió el flascón para que la tripsina cubriera toda la superficie y se descartó el excedente de tripsina.

5. Se incubó el flascón a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 a 10 minutos.

6. Transcurrido el tiempo de acción de la tripsina se añadió DMEM con antibióticos, se resuspendieron las células con la ayuda de una pipeta serológica y se hizo un pase de 1 ml a un flascón nuevo previamente preparado con 14 ml de DMEM con antibióticos.

7. Se incubó el flascón a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **C.17.6. Preparación de las células**

1. Una vez desenganchadas las células, se resuspendieron en 10 ml de DMEM sin antibióticos y se procedió al recuento celular.
2. Se cogieron 10  $\mu$ l de la suspensión celular y se resuspendieron el 10  $\mu$ L de azul tripano.
3. Se cargaron 10  $\mu$ l de la suspensión celular a la cámara de Neubauer (Brand).
4. Después de contar el número total de células en los 10 ml, se centrifugaron las células a 250 g, 10 minutos a 25 °C.
5. Se diluyeron las células en el volumen necesario para obtener una concentración de  $6 \times 10^4$  células en 400  $\mu$ l de DMEM.
6. Se añadieron 400  $\mu$ l de suspensión celular en cada pozo (placa de 48 pozos – Nunc).
7. Se incubó la placa durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **C.18. Infección de los macrófagos**

1. Una vez preparada la placa se procedió a la infección.
2. Se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la placa.
3. Se ajustó la suspensión bacteriana a una multiplicidad de infección (MOI) 10:1 (10 bacterias/macrófago) o 100:1 (100 bacterias/macrófago).
4. Se incubó durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.
5. Después del periodo de incubación se hicieron 3 lavados con DMEM sin antibióticos para eliminar las bacterias extracelulares, y se completó con DMEM sin antibióticos y se incubó nuevamente.
6. Se recogieron muestras de los sobrenadantes a cada tiempo estipulado de pos-infección (3, 24, 48, 72 y 96 horas).

7. Los sobrenadantes se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y se guardaron a -40 °C para posteriores análisis de la producción de citocinas.

### **C.19. Ensayo de fagocitosis**

Para el análisis de la fagocitosis se realizó el protocolo de infección estándar descrito anteriormente con algunas modificaciones.

1. Se añadieron  $5 \times 10^5$  células en placas (Mat Teck).
2. Después de 24 horas, los macrófagos fueron infectados a una MOI 100:1 para cepas no formadoras de cuerdas y a una MOI 10:1 para las cepas formadoras de cuerdas.
3. Pasadas las 3 horas de infección se removió el DMEM y se hicieron 3 lavados con DMEM sin antibióticos.
4. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos.
5. Se retiró el fijador y se hizo un lavado con PBS y se dejó secar la muestra durante 30 minutos
6. Las micobacterias fueron teñidas con *Mycobacteria* Fluorescent Stain (Fluka) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
7. Los macrófagos se marcaron el con Cell Mask a una concentración de 1  $\mu$ l/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

#### **C.19.1. Condiciones de captación y análisis de las imágenes**

1. Se utilizó el microscopio confocal láser de barrido (CLSM) (TCS-SPS, Leica), usando un objetivo de 63x y un plano de apertura numérica de 3.0 en aceite de inmersión.
2. La Auramina Fenólica y el Cell Mask fueron excitados a una longitud de onda de 488 nm y 649 nm, y fueron emitidos a una longitud de onda de 510 nm y 666 nm respectivamente.
3. Se generaron imágenes en secuencias Z.

4. Se capturaron 10 planos aleatorios por muestra.
5. Se analizaron las imágenes con el programa Imaris 7.4.2 Scientific Software (Bitplane).
6. Para obtener el porcentaje de macrófagos infectados se contaran un total de 200 macrófagos por condición.
7. El experimento se realizó por duplicado en diferentes días.

Para los siguientes protocolos de infección se hicieron lavados cada 24 horas para reducir el crecimiento de las bacterias extracelulares en el medio de cultivo ya que este no tenía antibióticos.

## **C.20. Viabilidad de los macrófagos infectados**

Para analizar la viabilidad de los macrófagos infectados con las diferentes cepas de *M. abscessus* se utilizaron técnicas de recuento directo e indirecto. Para el recuento directo se utilizaron las técnicas de tinción por exclusión con Azul Tripano y el marcaje por fluorescencia utilizando el kit de Viabilidad/Citotoxicidad mediante el análisis por CLSM, y para el recuento indirecto se utilizó la técnica del Cristal Violeta.

### **C.20.1. Viabilidad - Azul Tripano**

El método de tinción por exclusión con Azul Tripano nos permite diferenciar las células viables de las no viables, ya que las células viables tienen la membrana intacta y esta no incorpora la tinción azul en su interior, de tal manera que las vemos reflectantes bajo el microscopio. En cambio, en las células dañadas la tinción atraviesa la membrana y estas se ven teñidas de azul (Figura C.1) (Strober, 2001).

Transcurrido el tiempo de infección se procedió de la siguiente manera:

1. Se retiraron los sobrenadantes de los pozos.
2. Se hizo un lavado con 500  $\mu$ l de PBS a cada pozo.

3. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de tripsina 1x en cada pozo y seguidamente se retiraron 170  $\mu\text{l}$  de la misma, y se incubó la placa a 37  $^{\circ}\text{C}$  y al 5% de  $\text{CO}_2$  durante 10 minutos.

4. Pasados los 10 minutos, los macrófagos se resuspendieron con los 30  $\mu\text{l}$  de tripsina 1x que quedaban en la placa con la ayuda de una micropipeta para que los macrófagos se desenganchasen por completo del fondo del pocillo.

5. Se añadieron 470  $\mu\text{l}$  de DMEM sin antibióticos en los pocillos y se mezclaron bien.

6. Se cogieron 10  $\mu\text{l}$  del volumen total del pocillo y se añadieron a un eppendorf con 10  $\mu\text{l}$  de Azul Tripano (Gibco).

7. Se procedió al recuento utilizando la cámara de Neubauer.

Fórmula Cámara de Neubauer Brand:

<b>Partículas por <math>\mu\text{l}</math> de volumen:</b> $\frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad cámara (mm)} \times \text{dilución}}$
---

Los resultados se expresaron en promedio del número de macrófagos viables por pozo. El experimento se hizo por triplicado.



**Figura C.1.** Imagen de la cámara de Neubauer cargada con una suspensión de macrófagos. Las flechas indican los macrófagos no viables teñidos con azul tripano. Los puntos reflectantes son los macrófagos viables que no se tiñen con azul tripano ya que estos no tienen la membrana plasmática dañada.

### **C.20.2. Viabilidad – CLSM**

El estudio de la viabilidad de los macrófagos con el Kit de Viabilidad/Citotoxicidad fue realizado con marcadores celulares fluorescentes que permiten distinguir entre células viables y no viables. Para ello se utilizó la calceína AM que no es fluorescente, pero después de penetrar en una célula viva pasa a serlo por la actividad de la esterasa intracelular que convierte la calceína AM en un marcador polianiónico. Este marcador es retenido por las células vivas y se observa en color verde. El Etidio –homodimero lo que revela es la integridad de la membrana celular, ya que este solo es capaz de penetrar en células con la membrana dañana, y este se observa en color rojo.

1. Se añadieron  $5 \times 10^5$  células en placas (Mat Teck).
2. Después de 24 horas, los macrófagos fueron infectados a una MOI 100:1 para cepas con morfología colonial lisa y a una MOI 10:1 para las cepas con morfología colonial rugosa.
3. Transcurridas las 3 horas de infección se removió el DMEM y se hicieron 3 lavados con DMEM sin antibióticos.
4. Se volvió a completar los pozos con DMEM fresco y se incubó a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>
5. Las muestras se procesaron a diferentes tiempos (3, 24, 48, 72 y 96 horas).
6. Los macrófagos se marcaron con el Kit de Viabilidad/Citotoxicidad añadieron 0,5 µl/ml de 4 mM Calcein acetoxymethyl y 0,2 µl/ml de 2 mM Ethidium homodimer-1, durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
7. Se hizo un lavado con DMEM y se añadieron 1 ml de DMEM para observación al microscopio.

#### **C.20.2.1. Condiciones de captación y análisis de las imágenes**

1. Se utilizó un microscopio confocal láser de barrido (CLSM) (FV1000-Olympus, Japan), usando un objetivo de 20x y un plano de apertura numérica de 1,5.

2. La Calcein y el Ethidium fueron excitados a una longitud de onda de 494 nm y 517 nm, y fueron emitidos a una longitud de onda de 517 nm y 617 nm respectivamente.

3. Se generaron imágenes en secuencias Z.

4. Se captaron 10 campos aleatorios por muestra.

5. Se analizaron las imágenes con el programa ImageJ (National Institutes of Health, US), utilizando una macro automatizada para contar las células.

6. El resultado se expresó en el promedio de macrófagos viables por campo.

7. El experimento se realizó por duplicado.

### **C.20.3. Viabilidad – cristal violeta**

El segundo método colorimétrico utilizado para cuantificar la viabilidad celular fue el Cristal Violeta. El cristal violeta (trifenilmetano (4 - [(4-dimetilaminofenil) -fenil-metil] -N, N-dimetil-anilina)), también conocido como violeta genciana es utilizado para cuantificar el crecimiento celular en cultivos en monocapa en función de la absorbancia del colorante absorbido por las células (Gillies et al., 1986).

Transcurrido el tiempo de infección se procedió de la siguiente manera:

1. Se retiró el sobrenadante.

2. Se fijaron las células durante 30 minutos añadiendo 200 µl de glutaraldehído al 4% in PBS.

3. Se retiró el fijador y se hicieron 3 lavados con H<sub>2</sub>O destilada.

4. Se añadieron 200 µl de Cristal Violeta al 1% en H<sub>2</sub>O destilada.

5. Después de 30 minutos se hicieron 3 lavados con H<sub>2</sub>O destilada.

6. Se dejó secar la muestra por completo.

7. Después de seca se añadió 100 µl ácido acético al 10% en H<sub>2</sub>O destilada y se dejó en agitación 10 minutos a 4 °C.

8. Se añadieron 100 µl/pozo de la muestra a una placa de 96 pozos (Nunc) y se determinó la absorbancia a 560 nm.

## **C.21. Análisis microscópica de la interacción macrófago – micobacteria**

Para analizar la interacción entre la micobacteria y el macrófago a nivel microscópico y ultra-estructural se utilizaron diferentes técnicas de Microscopia.

### **C.21.1. Microscopia óptica**

1. Se añadieron  $6 \times 10^4$  células/pozo en placas (Thermo Fisher Scientific).
2. Después de 24 horas se infectaron los macrófagos, siguiendo el protocolo estándar de infección.
3. Transcurridas las 3 horas de infección se removió el DMEM y se hicieron 3 lavados con DMEM sin antibióticos.
4. A continuación se procesaron muestras a diferentes tiempos (3, 24 y 48 horas) para análisis por microscopia óptica realizando una Tinción de Ziehl – Neelsen.

### **C.21.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

1. En una placa de cultivo celular (NUNC) de 24 pocillos se añadió un cubre objetos de 13mm de diámetro (Nahita, Spain) en cada pozo.
2. Se añadieron  $1,2 \times 10^5$  células/pozo en un volumen total de 1000  $\mu$ l de DMEM sin antibióticos.
3. Después de 24 horas se infectaron los macrófagos, siguiendo el protocolo estándar de infección.
4. Se procesaron muestras para MEB a diferentes tiempos pos-infección (3, 24 y 48h).

### **C.21.3. Microscopia electrónica de transmisión (MET)**

Para el análisis de la internalización de las micobacterias en los macrófagos se utilizó MET.

1. En una placa de cultivo celular (NUNC) de 6 pocillos se añadieron un  $5 \times 10^5$  células/pozo en un volumen total de 3000  $\mu$ l de DMEM sin antibióticos.
2. Después de 24 horas se infectaron los macrófagos, siguiendo el protocolo estándar de infección.
3. Se lavaron los macrófagos 3 veces con PBS y se fijaron con 2% (w/v) paraformaldehído y 2.5% (v/v) glutaraldehído en PB 0.1M a un pH 7 durante 1 hora.
4. Los macrófagos se desengancharon de la placa con la ayuda de un rascador de células (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en una plataforma oscilante durante 2 horas.
5. A continuación se hizo un lavado con PB y se centrifugó a 1278 g durante 10 minutos.
6. Los sobrenadantes fueron descartados y los pellets resuspendidos en 1% (v/v) paraformaldehído en PB.
7. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos y lavadas 3 veces con PB.
8. Posteriormente los macrófagos fueron pos-fijados con 1% (wt/vol) tetraóxido de osmio con 0,7 % de ferrocianuro en PB 2 horas a 4 °C.
9. Se realizaron 4 lavados con agua desionizada y se procedió a la deshidratación seriada con series crecientes de acetona.
10. Después de la fijación, las muestras se incluyeron en resina polimerizada Eponate 12<sup>TM</sup> a 60 °C durante 48 horas.
11. Se procesaron las muestras por duplicado a diferentes tiempos de infección (3 y 24h).
12. Las secciones ultra-finas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol 1400 (Jeol, Japan).

### **C.21.3.1. Estudio de las bacterias en el interior del macrófago**

Para categorizar las bacterias en el interior del macrófagos se respetaron los siguientes criterios (Rohde *et al.*, 2012).

Se consideró una bacteria normal; cuando mantiene una forma de bacilo regular, una zona electro transparente, el citoplasma bien organizado y pared y membrana celular intactas.

Se consideró una bacteria alterada (dañada); cuando tiene una forma distorsionada, presenta rotura en la membrana y pared celular, tiene alteraciones a nivel citoplasmático y se detecta la presencia de gotas lipídicas dentro del bacilo.

Las bacterias fueron clasificadas según los criterios descritos anteriormente, y sus porcentajes se determinaron en función del número total de bacterias contadas.

Se contaron un total de 100 macrófagos infectados para cada condición.

## **C.22. Actividad biológica del TDM de *M. abscessus* para evaluar si el tamaño de los agregados bacterianos puede afectar la respuesta inmune de los macrófagos**

Para analizar la actividad biológica del TDM se pusieron los macrófagos en contacto con microesferas recubiertas con estos compuestos y se analizó posteriormente la producción de citocinas por parte de los macrófagos (Indrigo *et al.*, 2003).

En el mismo experimento, con la finalidad de analizar la importancia de los agregados para el proceso infeccioso de *M. abscessus* se procedió a utilizar microesferas de diferentes medidas 1,1  $\mu\text{m}$  o 20  $\mu\text{m}$ , la primera simulando bacilos aislados y la segunda, de mayor medida, simulando agregados de más de 5 bacilos.

### **C.22.1. Recubrimiento de las microesferas con TDM**

1. Se utilizaron microesferas de poliestireno de 1,1  $\mu\text{m}$  o 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sigma-Aldrich).
2. Se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión de microesferas a 1 ml de la solución tampón de carbonato/bicarbonato de sodio y se agito vigorosamente
3. Se centrifugó a 3000 g, 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se hizo un lavado con etanol al 30% y otro lavado con etanol al 1%.
4. Se añadieron a las microesferas 500  $\mu\text{g}$  de TDM o ácidos micólicos disueltos en 2-propanol y se ajustó al volumen final de 1 ml.
5. Se incubó a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante 6 h en suave agitación orbital.
6. Finalizado el período de incubación se centrifugó y se hizo 1 lavado con PBS y 1 lavado más con medio de cultivo celular (DMEM sin antibiótico).
7. Se realizaron los mismos procedimientos con las microesferas control que no tenían ningún tipo de recubrimiento.

### **C.22.2. Comprobación del recubrimiento**

1. Se cogió una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  y se extrajo con 1 ml de cloroformo. Se repitió la extracción 1 vez más.
2. Se evaporó el extracto de cloroformo hasta la sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40  $^{\circ}\text{C}$ .
3. Se disolvió el extracto en 20  $\mu\text{l}$  de cloroformo
4. Se examinó el extracto de TDM mediante CCF analítica utilizando cloroformo/metanol (90:10, v:v) como solvente y se reveló con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol.
5. Se realizaron los mismos procedimientos con las microesferas control y con el medio de cultivo celular DMEM.

### **C.22.3. Microesferas en contacto con los macrófagos**

1. Se utilizaron placas de 48 pocillos (Nunc)

2. Se añadieron en cada pocillo  $6 \times 10^4$  macrófagos en un volumen de 400  $\mu\text{l}$  de DMEM sin antibióticos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas.

3. Después de 24 horas de incubación se añadieron las microesferas a una proporción 1:1 para las microesferas de 20  $\mu\text{m}$  y a una proporción 100:1 para las microesferas de 1,1  $\mu\text{m}$ .

4. Se incubaron durante 48h a 37 °C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

5. Se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y se guardaron a - 40 °C para posteriores análisis de la producción de citocinas.

### **C.23. Análisis de la inducción de citocinas**

Los niveles de TNF- $\alpha$  (R&D System) y IL-6 (BD Becton Dickinson) en los diferentes ensayos se determinaron mediante kit de ELISA (del inglés Enzyne-Linked ImmunoSorbent Assay) siguiendo la recomendación de los fabricantes.

### **C.24. Análisis estadístico y gráficas**

Los datos se expresaron en promedio  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones entre pares se evaluaron con Student *t* test. Los análisis estadísticos se realizaron con el software para análisis de datos científicos PAST3 (Software libre). Para la realización de las gráficas se utilizó el Prism 6 (Graph Pad Software).

## C.25. Reactivos, Disolventes

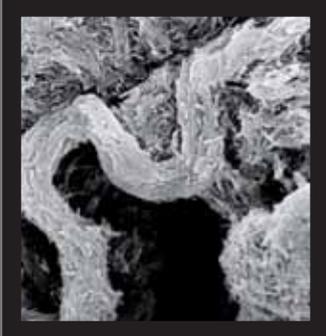
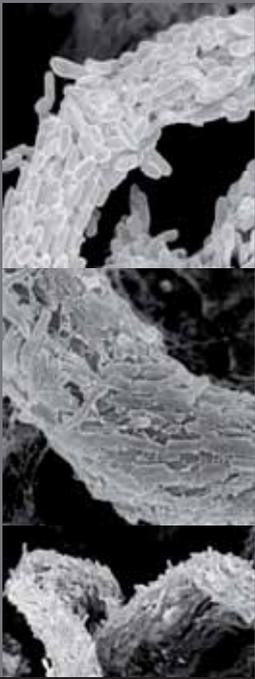
**Tabla C.5.** Reactivos y disolventes utilizados.

Reactivos	Fórmula	Marca
2-propanol	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Carlo Erba
7H10 Agar		Difco
Ácido acético	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Merck
Ácido clorhídrico	HCl	Carlo Erba
Ácido fosfomolibdico		Merck
Ácido oleico		Sigma
Ácido sulfúrico	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Carlo Erba
Agarosa		Sharlau
Albumina suero bovino fracción V		Roche Diagnostic
Antrona		Merck
Auramina Fenólica		Fluka
Azul de Metileno		
Azul Tripano		Gibco
Bicarbonato de sodio	$\text{NaHCO}_3$	Sigma- Aldrich
Calcein acetoxymethyl		Molecular Probes
Carbonato de sodio	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Sigma- Aldrich
Catalasa		Sigma
Cell Mask		Molecular Probes
Cloroformo $\text{CHCl}_3$	$\text{CHCl}_3$	VWR Chemicals
Cloruro de potasio	KCl	Panreac
Cloruro de sodio	NaCl	Panreac
Cristal Violeta		Sigma- Aldrich
Deuterocloroformo	$\text{CDCl}_3$	Cortecnet
Dimetilsulfóxido	$\text{CH}_3\text{SOCH}_3$	Merck
DMEM L-glutamina		Gibco
Estreptomina		Lab Reig Jofre
Etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Carlo Erba
Éter etílico	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	VWR Chemicals
Ethidium homodimer-1		Molecular Probes
Ferrocianuro		Sigma-Aldrich
Fosfato disódico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Panreac
Fosfato monopotásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Panreac

---

<b>Reactivos</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Marca</b>
Fucsina básica fenicada		Scharlau
Glicerol	$C_3H_8O_3$	Panreac
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	Panreac
Glutaraldehído		Merck
Iodo	$I_2$	Fluka
Metanol	$CH_4O$	Carlo Erba
Middelbrook 7H9 Agar		Difco
<i>n</i> -hexano	$C_6H_{14}$	VWR Chemicals
Paraformaldehído		EMS
Penicilina G		Lab ERN
Peptona		Scharlau
1-Propanol		Panreac
Suero bovino fetal		HyClone
Tampón fosfato		Sigma-Aldrich
Tetraóxido de osmio	$OsO_4$	TAAB Lab
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	Carlo Erba
Tripsina - EDTA		PAA
Triptona		Scharlau
Viavilidad Calcein Ethidium		Molecular Probes
Kit mycobacterium Stain		Fluka

---



---

## D. RESULTADOS

---

---

### D.1. Análisis de la morfología colonial de las diferentes cepas

Se sembraron *M. brumae*, *M. fallax*, *M. marinum*, y las diferentes cepas *M. abscessus* en medio de cultivo sólido 7H10 y se hizo la observación de la morfología colonial después de 15 días de crecimiento. En caso de *M. bovis* BCG Japan se analizó la morfología colonial después de 30 días de crecimiento.

Para las cepas *M. brumae*, *M. fallax*, *M. marinum* y BCG Japan se confirmó la morfología colonial rugosa en todas las cepas (Figura D.1). Al contrario de las cepas de *M. brumae*, *M. fallax* y BCG Japan que presentaron un aspecto rugoso y seco y opaco, la cepa de *M. marinum* presentó un aspecto húmedo y brillante, pero tenía la misma morfología rugosa que las demás cepas.



**Figura D.1.** Morfología colonial de las diferentes cepas crecidas en 7H10. (A) BCG Japan, (B) *M. marinum*, (C) *M. brumae* y (D) *M. fallax*.

Se confirmaron las morfologías rugosas, con un aspecto seco y opaco, para las cepas 390R, 44196R, BE37R y BE48R (Figura D.2).

En el caso de las cepas 390S y 44196S se confirmaron las morfologías lisas, con un aspecto húmedo y brillante (Figura D.2). Estas cepas también presentaron morfologías intermedias (Figura D.3).



**Figura D.2.** Morfología colonial de las diferentes cepas de *M. abscessus*. Las cepas crecieron en TSA a 37 °C durante 7 días. Las flechas indican cambio de morfología de lisa a rugosa.

El problema en hacer resiembras con las cepas lisas era el alto índice de mutación espontánea (Howard *et al.*, 2006), con lo que se daba fácilmente el cambio de morfología lisa a rugosa. Por eso se decidió antes de realizar cada experimento descongelar alícuotas de estas cepas y sembrarlas aislando colonias para confirmar su morfología colonial, y con ello se evitó el cambio de morfología durante la realización de un experimento.



**Figura D.3.** Diferentes morfologías coloniales de la cepa 44196S de *M. abscessus*.

## D.2. Análisis de la formación de cuerdas microscópicas

Para analizar la formación de cuerdas microscópicas en las diferentes micobacterias se hizo un primer análisis por microscopia óptica con la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) que es específica para microorganismos ácido-alcohol resistente.

Las cepas analizadas crecieron en 7H9 formando biofilms entre la interface líquido-aire.

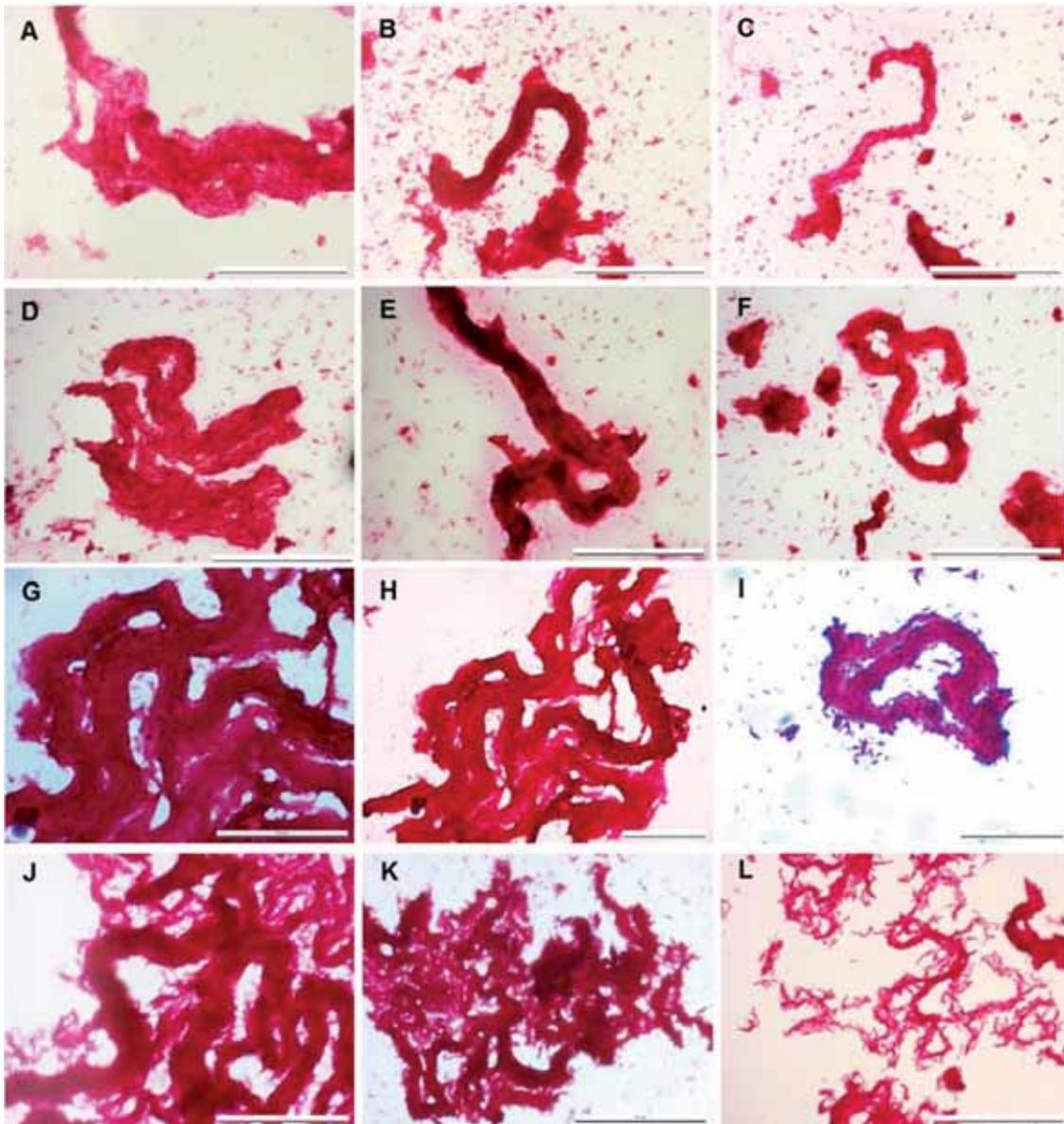
Con la tinción de Ziehl Neelsen se observó la formación de cuerdas en las diferentes micobacterias analizadas, *M. brumae*, *M. fallax* y *M. marinum*. (Figura D.4). Estos resultados están en acuerdo con los estudios previos donde se describieron estas cepas como formadoras de cuerdas (Levy-Frebault *et al.*, 1983; Luquin *et al.*, 1993; Staropoli & Branda, 2008). También se observó por primera vez la formación de cuerdas en la cepa *M. bovis* BCG Japan.

Para corroborar la formación de las cuerdas microscópicas en las diferentes cepas se utilizó la microscopia electrónica de barrido, debido a su alta resolución y la posibilidad de visualizar la formación de cuerdas al detalle.

Esta técnica fue descrita inicialmente por Julián y colaboradores en 2010, donde se desarrolló una técnica fácil y reproducible para el estudio de la formación de cuerdas en el género *Mycobacterium* (Julián *et al.*, 2010).

Mediante MEB se confirmó la formación de cuerdas microscópicas en las cepas: *M. brumae* (Figura D.5), *M. fallax* (Figura D.6), *M. bovis* BCG Japan (Figura D.7) y *M. Marinum* (Figura D.8), que se había visto previamente con microscopia óptica.

En el estudio de la formación de cuerdas de las diferentes cepas de *M. abscessus* se observó por primera vez mediante la técnica de MEB la formación de cuerdas en las cepas 390R (Figura D.10), 44196R (Figura D.11), BE37 (Figura D.12), y BE48 (Figura D.13). Se constató también que las cepas 390S y 44196S no formaban cuerdas (Figura D.9).



**Figura D.4.** Formación de cuerdas microscópicas de las diferentes micobacterias. (A-C) *M. brumae*, (D-F) *M. fallax*, (G-I) *M. bovis* BCG Japan y (J-L) *M. marinum*. Escala de 50  $\mu\text{m}$

*M. brumae*

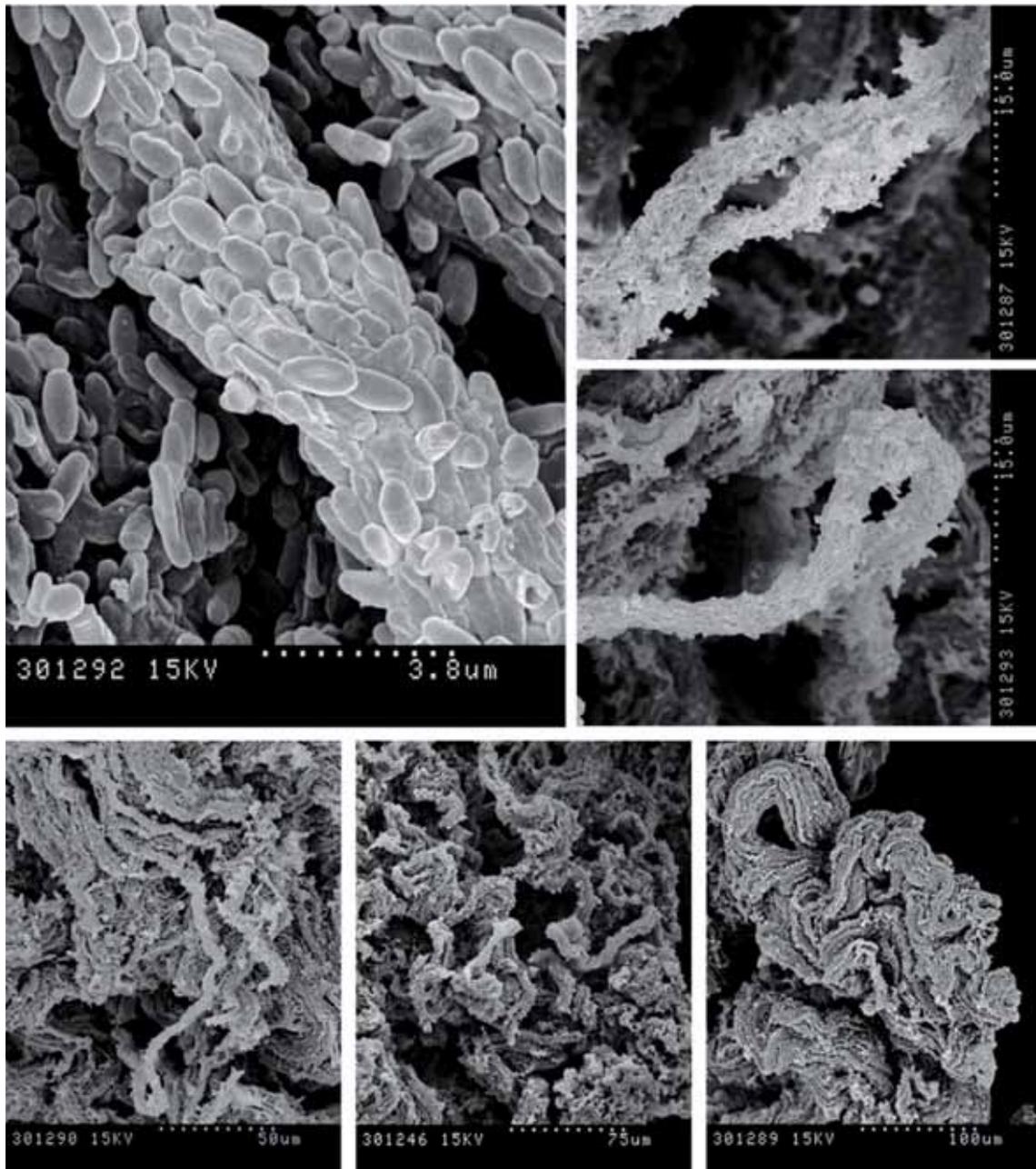


Figura D.5. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. brumae*.

*M. fallax*

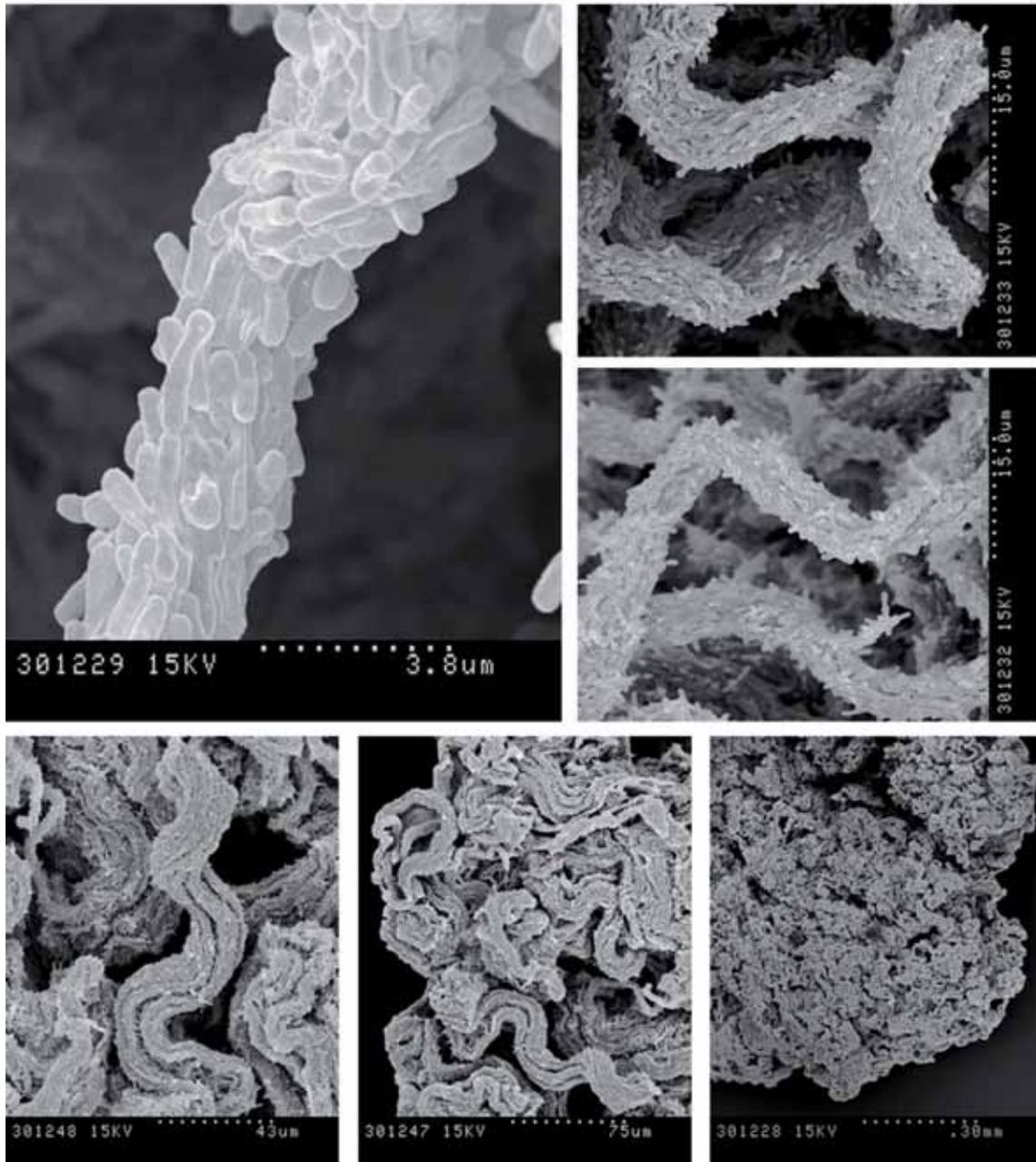


Figura D.6. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. fallax*.

*M. bovis* BCG-Japan

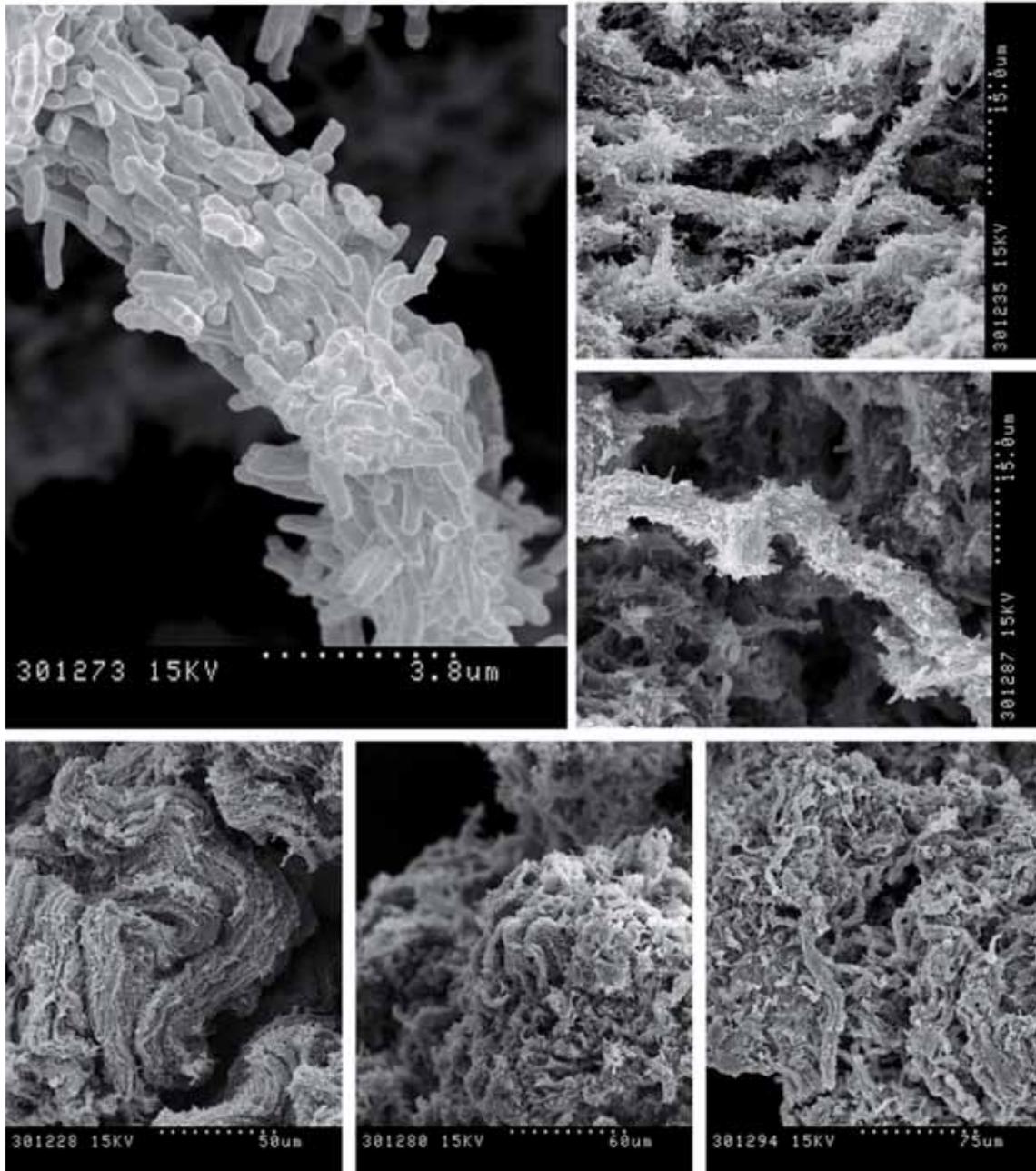


Figura D.7. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. bovis* BCG Japan.

*M. marinum*

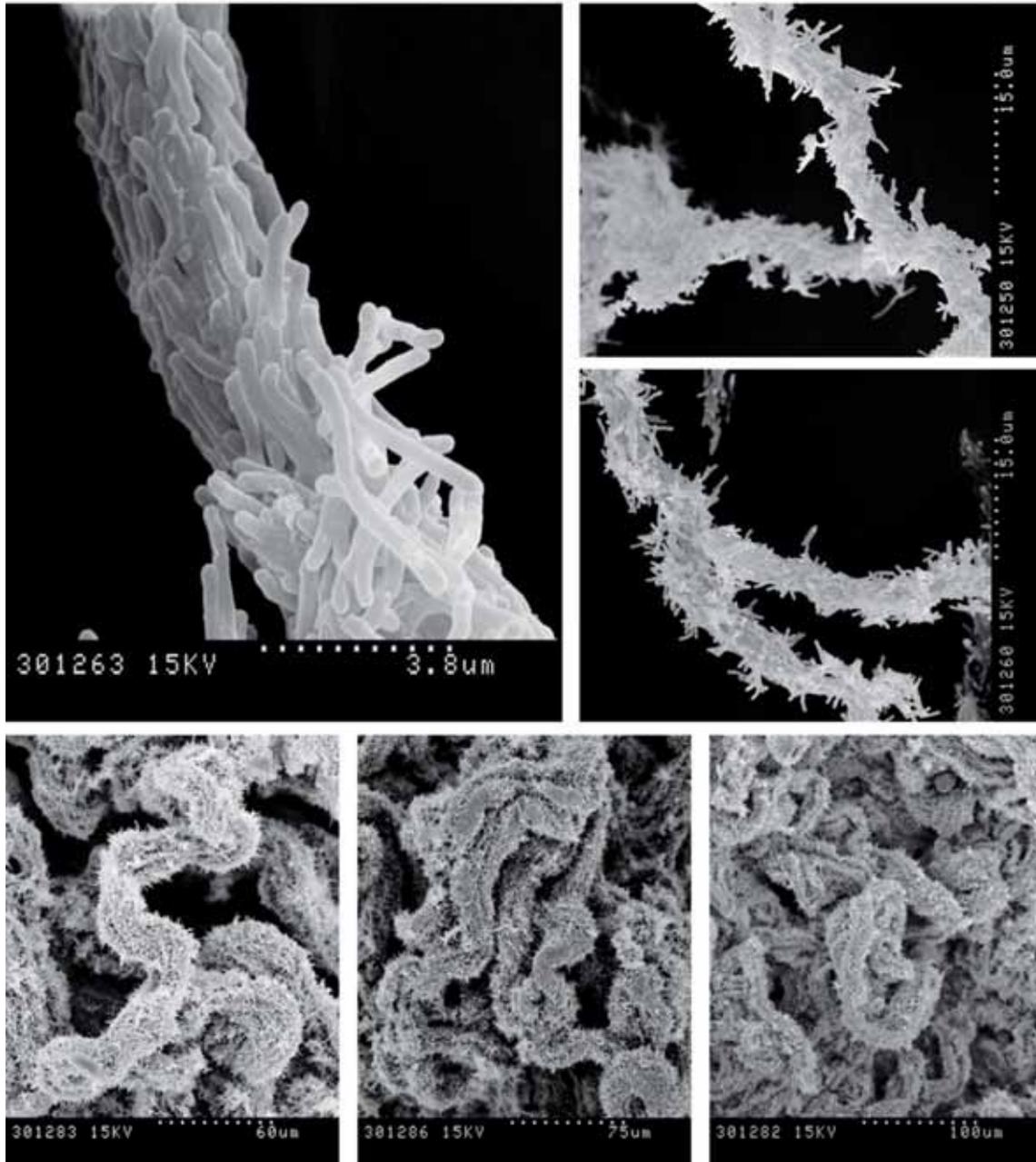
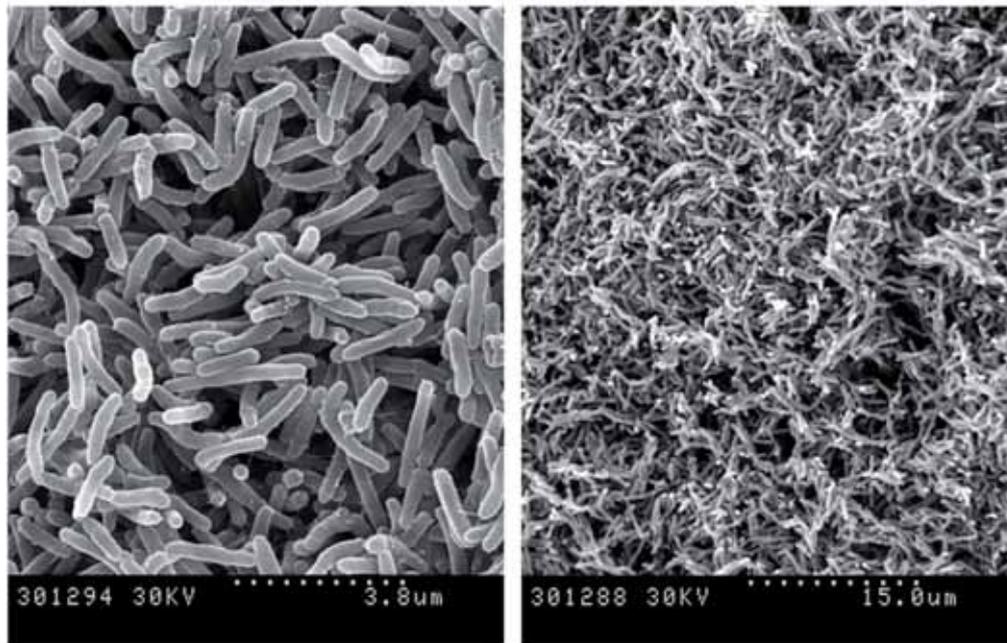


Figura D.8. MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. marinum*.

*M. abscessus* 390S



*M. abscessus* 44196S

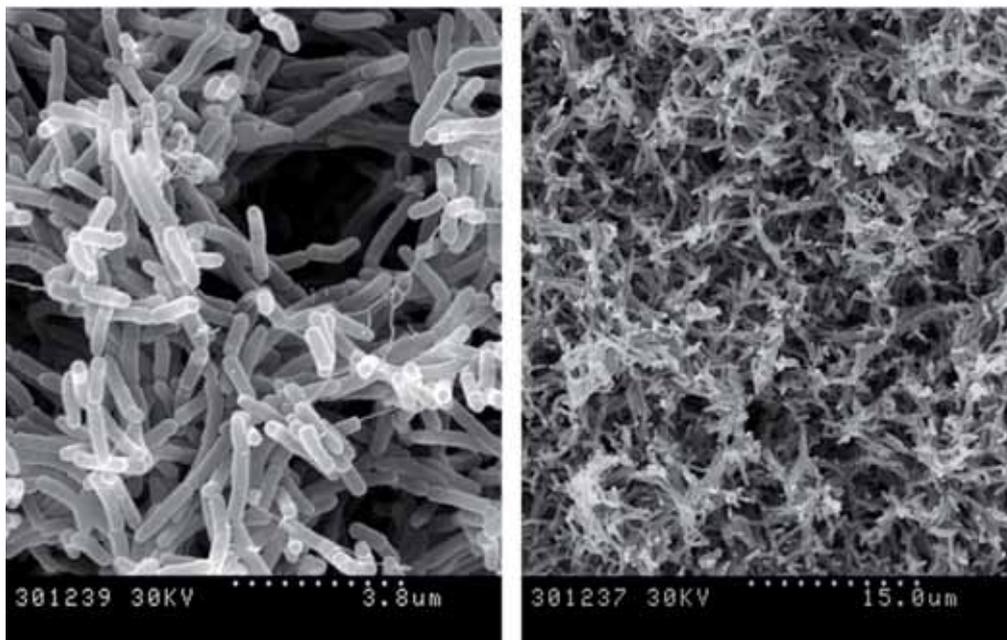
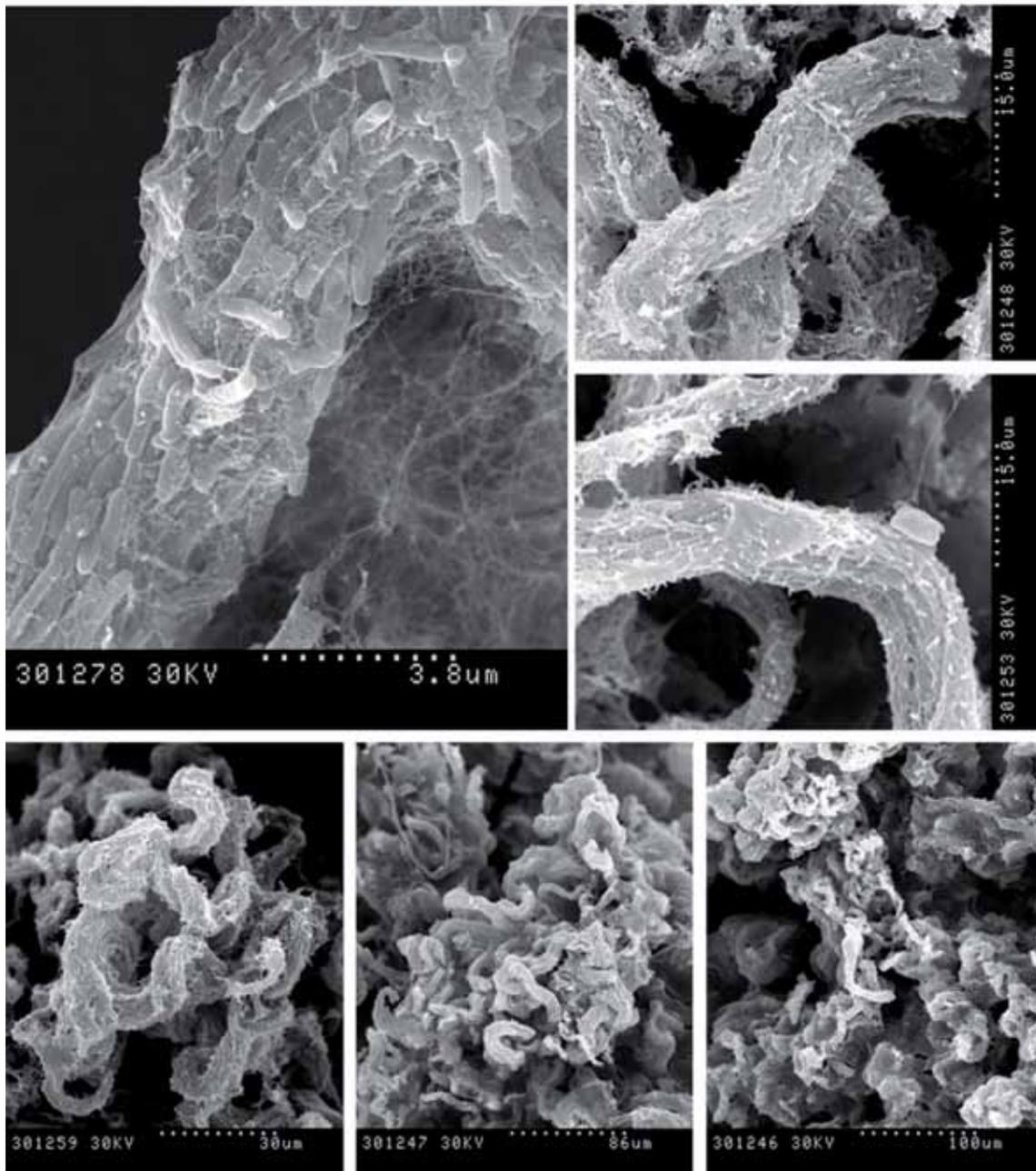
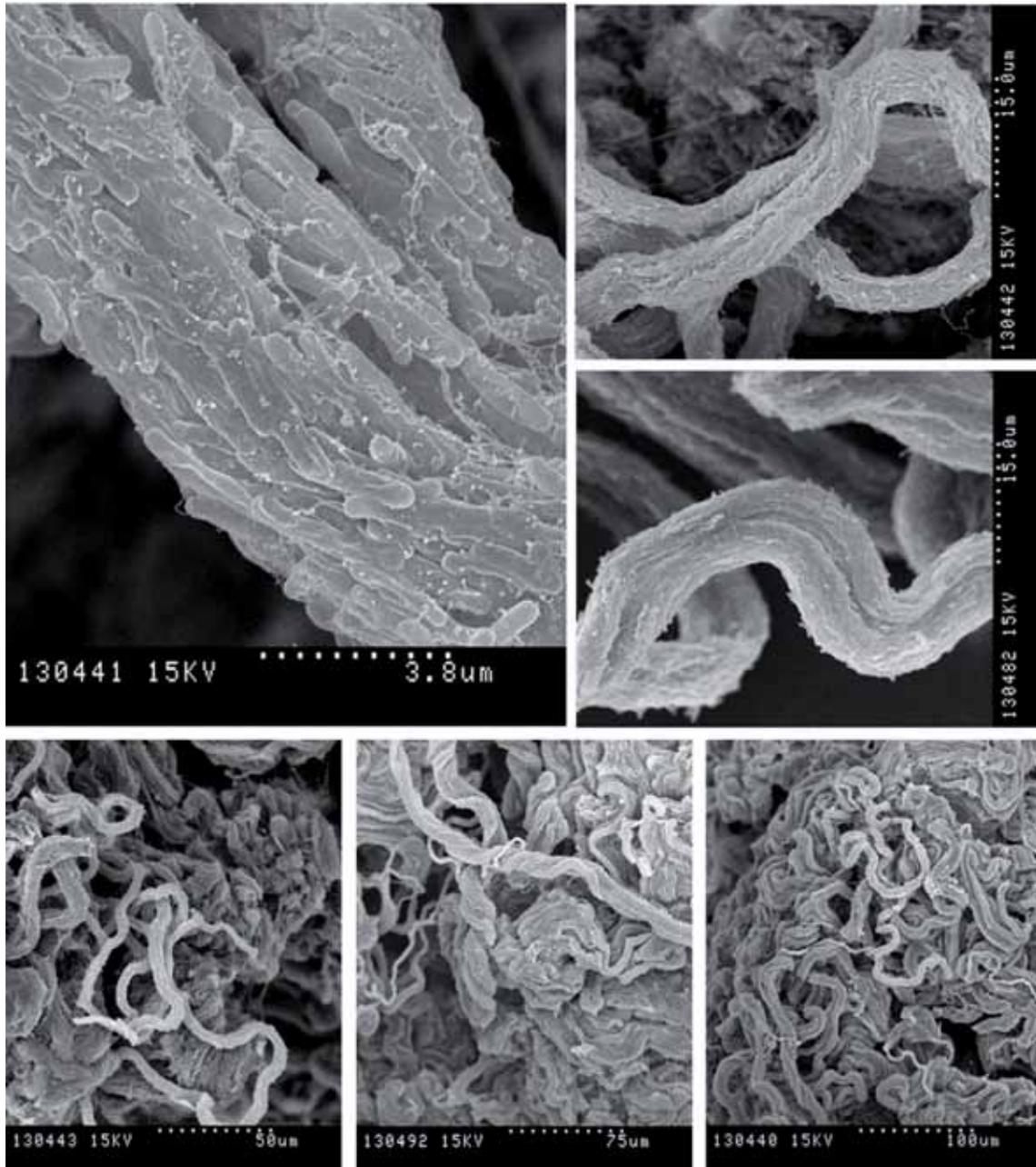


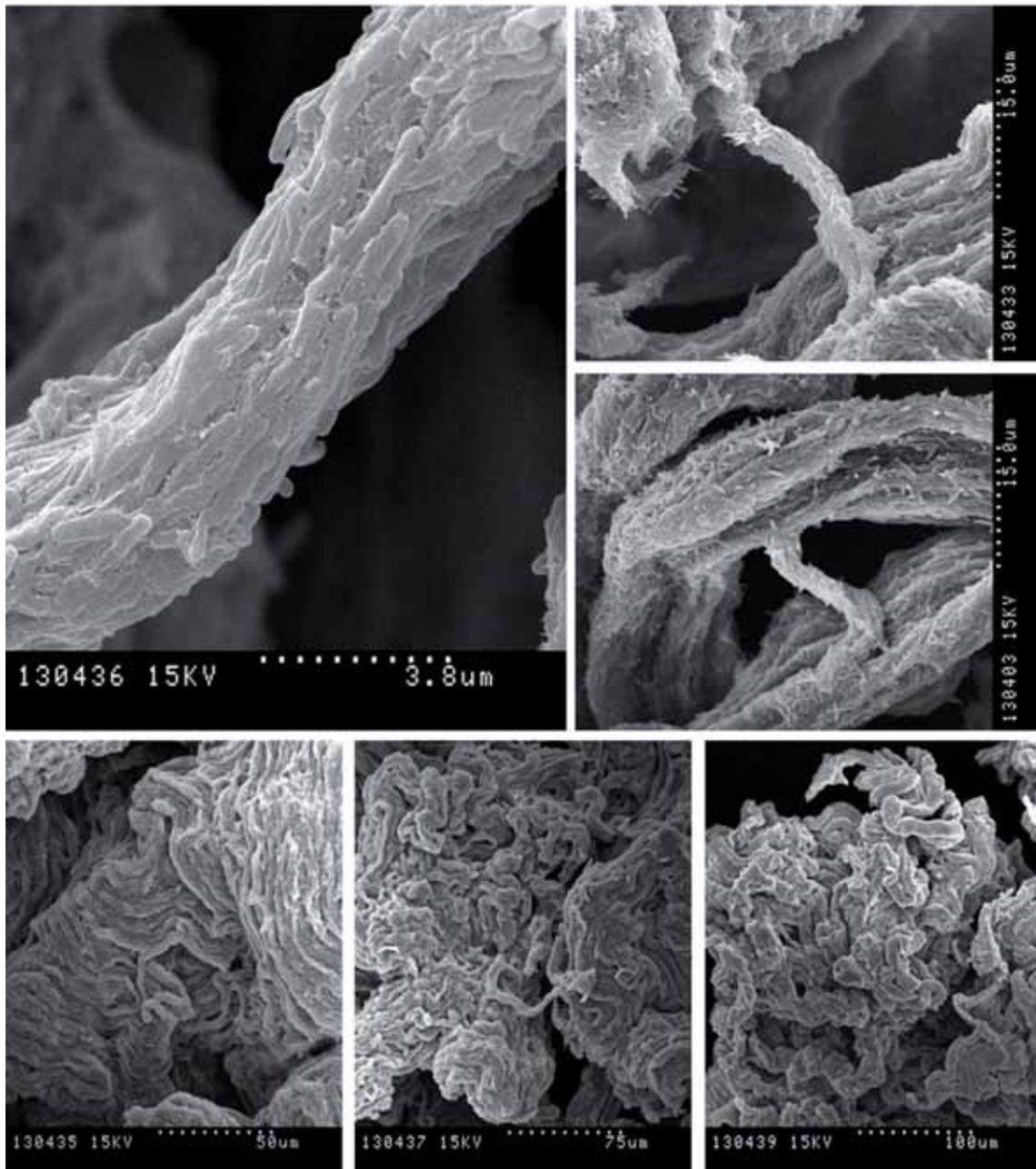
Figura D.9. MEB micrografías muestran los bacilos no alineados de las cepas lisas.

*M. abscessus* 390R

**Figura D.10.** MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. abscessus* 390R.

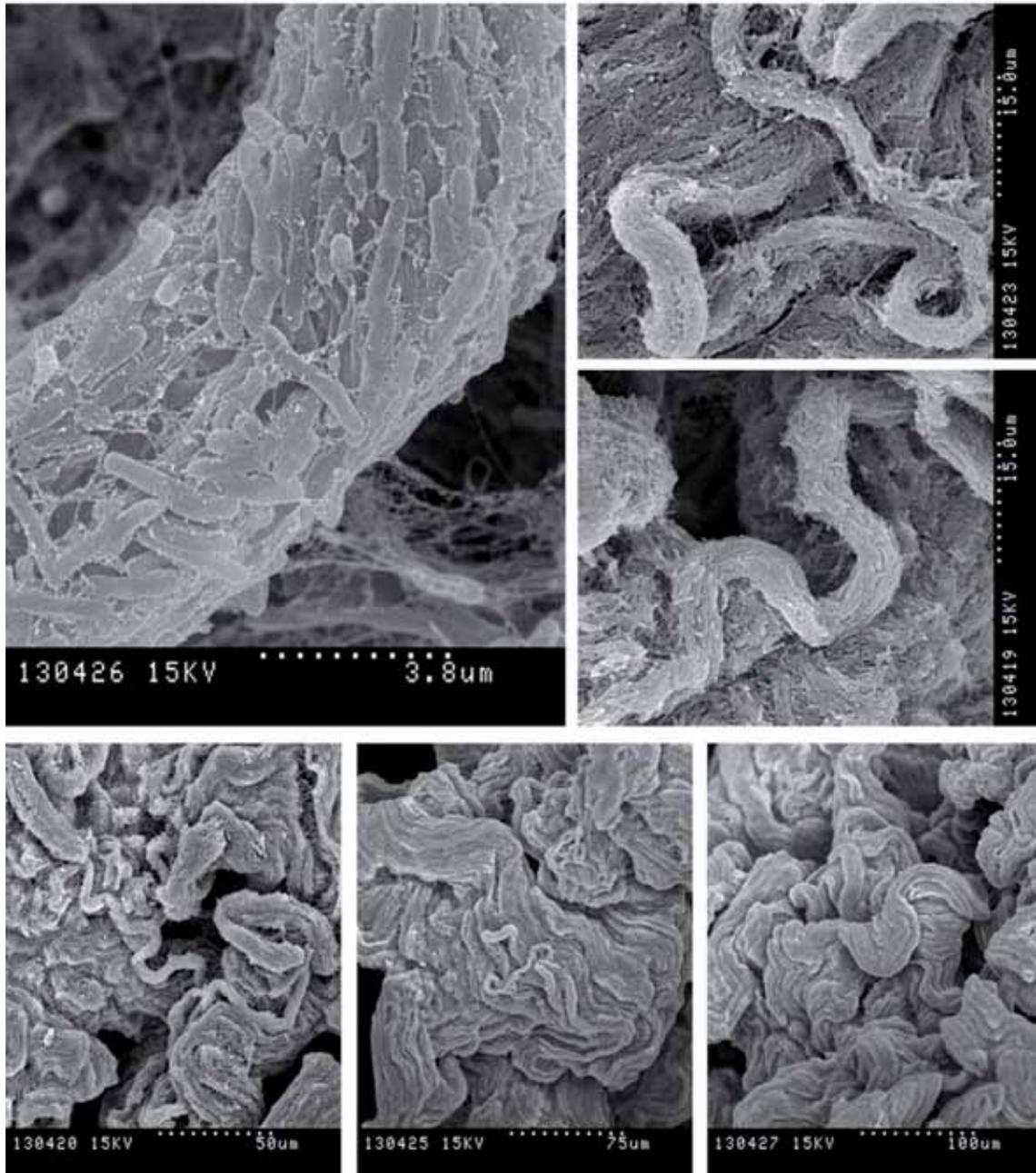
*M. abscessus* 44196R

**Figura D.11.** MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. abscessus* 44196R.

*M. abscessus* BE37R

**Figura D.12.** MEB micrografías muestran la formación de cuerdas de *M. abscessus* BE37R.

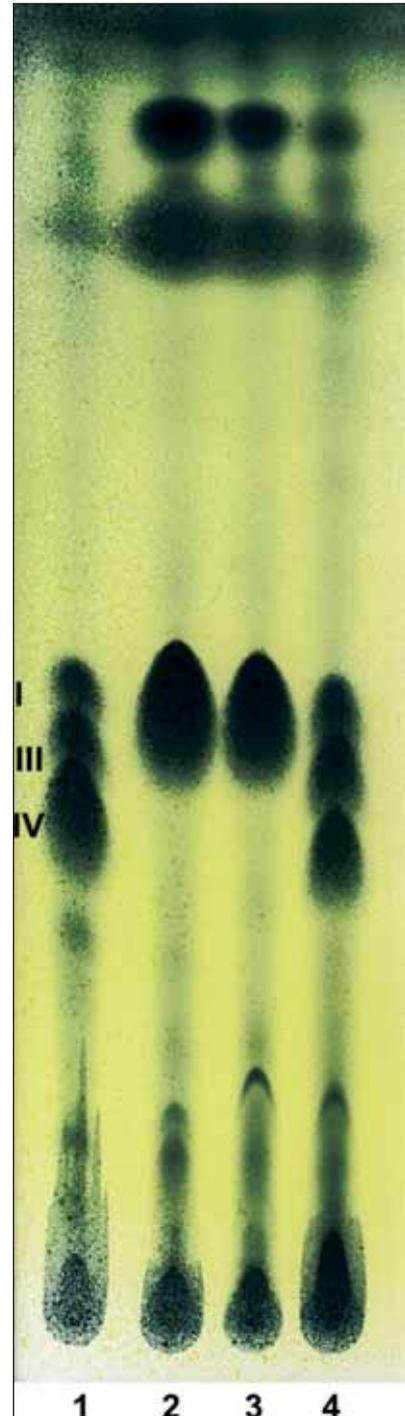
*M. abscessus* BE48R



**Figura D.13.** MEB micrograffías muestran la formación de cuerdas de *M. abscessus* BE48R.

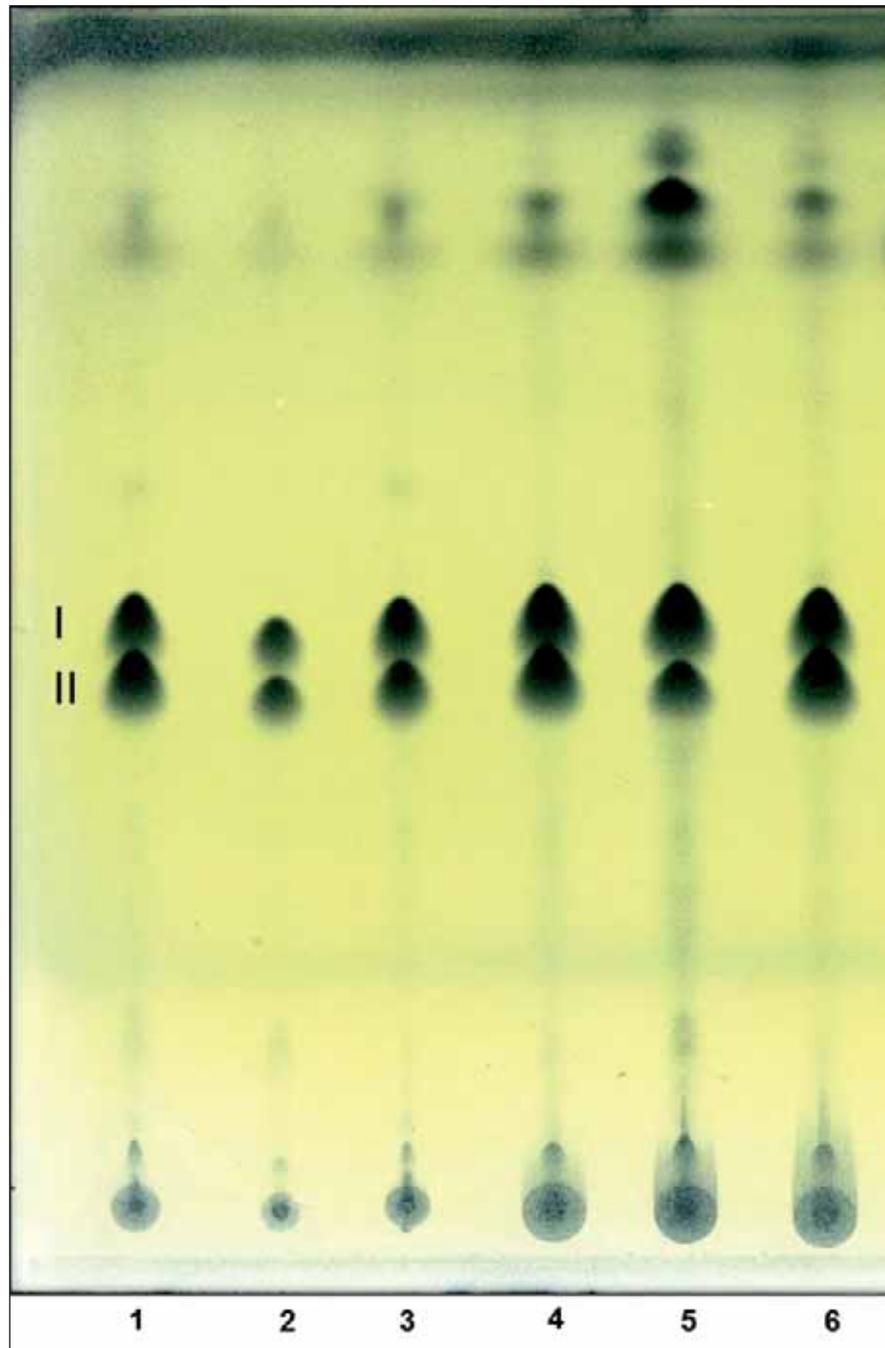
### D.3. Análisis del patrón de los ácidos micólicos por CCF

El análisis mediante CCF muestra el patrón de los ácidos micólicos extraídos mediante metanólisis ácida. Para las cepas de *M. brumae* y *M. fallax* fue encontrado solamente el  $\alpha$ -micolatos (Figura D. 14, 2 y 3). Ambos patrones habían sido descritos anteriormente (Luquin *et al.*, 1993; Rafidinarivo *et al.*, 1985). Los patrones encontrados de *M. bovis* BCG Japan y *M. marinum* fueron los siguientes:  $\alpha$ -micolatos, metoxi-micolatos y cetomicolatos (Figura D. 14, 1 y 4). Estos patrones coinciden con los patrones anteriormente descritos (Daffé *et al.*, 1991; Uenishi *et al.*, 2008).



**Figura D.14.** Patrón de los ácidos micólicos de las diferentes micobacterias. (1) *M. bovis* BCG-Japan, (2) *M. brumae*, (3) *M. fallax*, (4) *M. marinum*. Se eluyó con n-hexano: éter etílico (v:v) 3 veces y se relevó con ácido fosfomolibdico. (I)  $\alpha$ -micolatos, (III) metoximicolatos, (IV) cetomicolatos

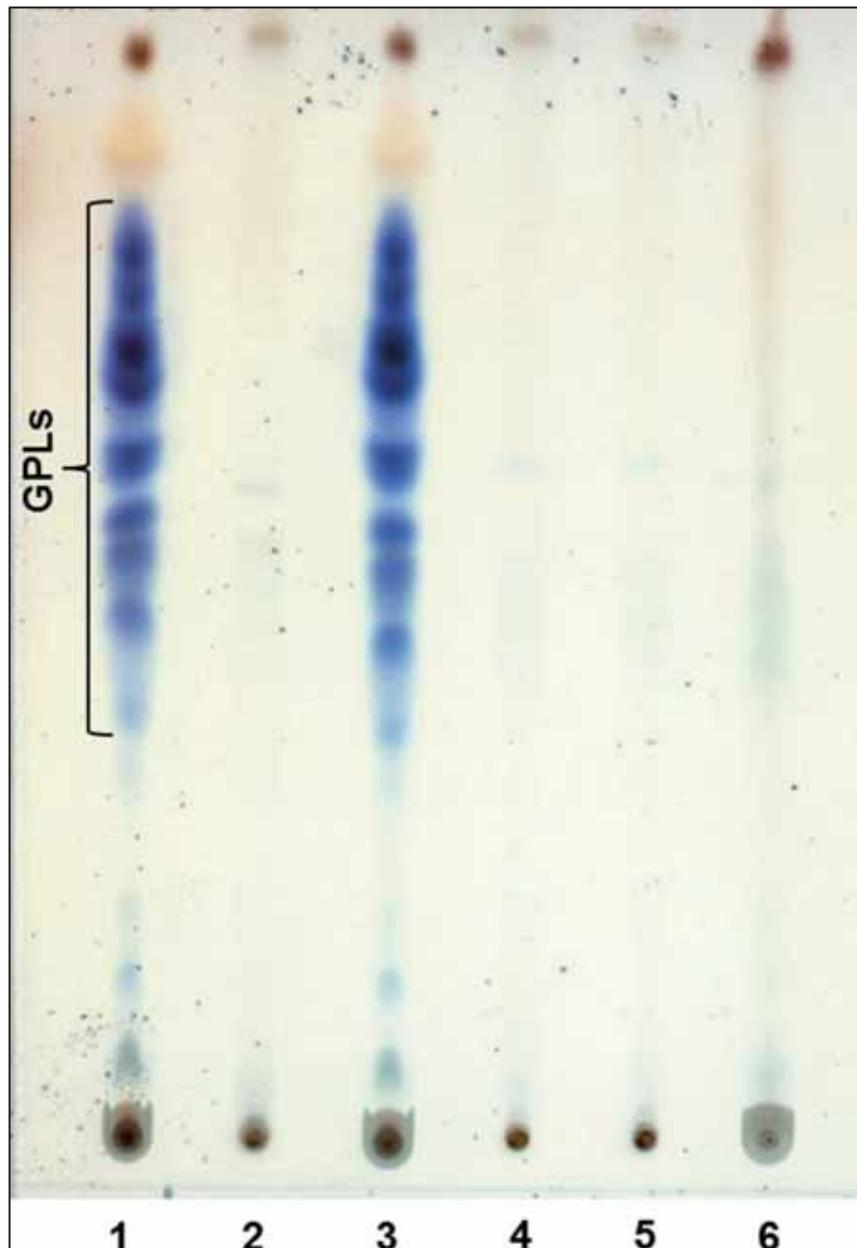
En el análisis del patrón de ácidos micólicos de las diferentes variantes de *M. abscessus* se observó el mismo patrón en las diferentes variantes (lisas y rugosas); (I)  $\alpha$ -micolatos y (II)  $\alpha'$ -micolatos (Figura D.15) coincidiendo con los patrones descritos anteriormente por Minnikin en *M. chelonae* (Minnikin *et al.*, 1982).



**Figura D.15.** CCF del patrón de ácidos micólicos de las diferentes variantes de *M. abscessus*. (1) 390S, (2) 390R, (3) 44196S, (4) 44196R, (5) BE37R, (6) BE48R. Se eluyó con n-hexano:éter etílico (85:15; V:V) 3 veces. La placa se reveló con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol (p:v) a 120 °C. (I)  $\alpha$ -micolatos, (II)  $\alpha'$ -micolatos.

#### D.4. Análisis de la presencia de GPL

Se hizo el análisis de la presencia de GPL en las diferentes cepas de *M. abscessus* mediante CCF. Se pudo observar que solamente las variantes lisas presentan grandes cantidades de GPL, y en las rugosas apenas se pudo observar la presencia de GPL (Figura D.16), como se describió anteriormente (Howard *et al.*, 2006).



**Figura D.16.** CCF del extracto crudo de las diferentes cepas de *M. abscessus*. (1) 390S, (2) 390R, (3) 44196S, (4) 44196R, (5) BE37R, (6) BE48R. Se eluyó con cloroformo:metanol:agua (90:10:1; v:v:v). Se reveló con antrona al 1% en ácido sulfúrico (p:v).

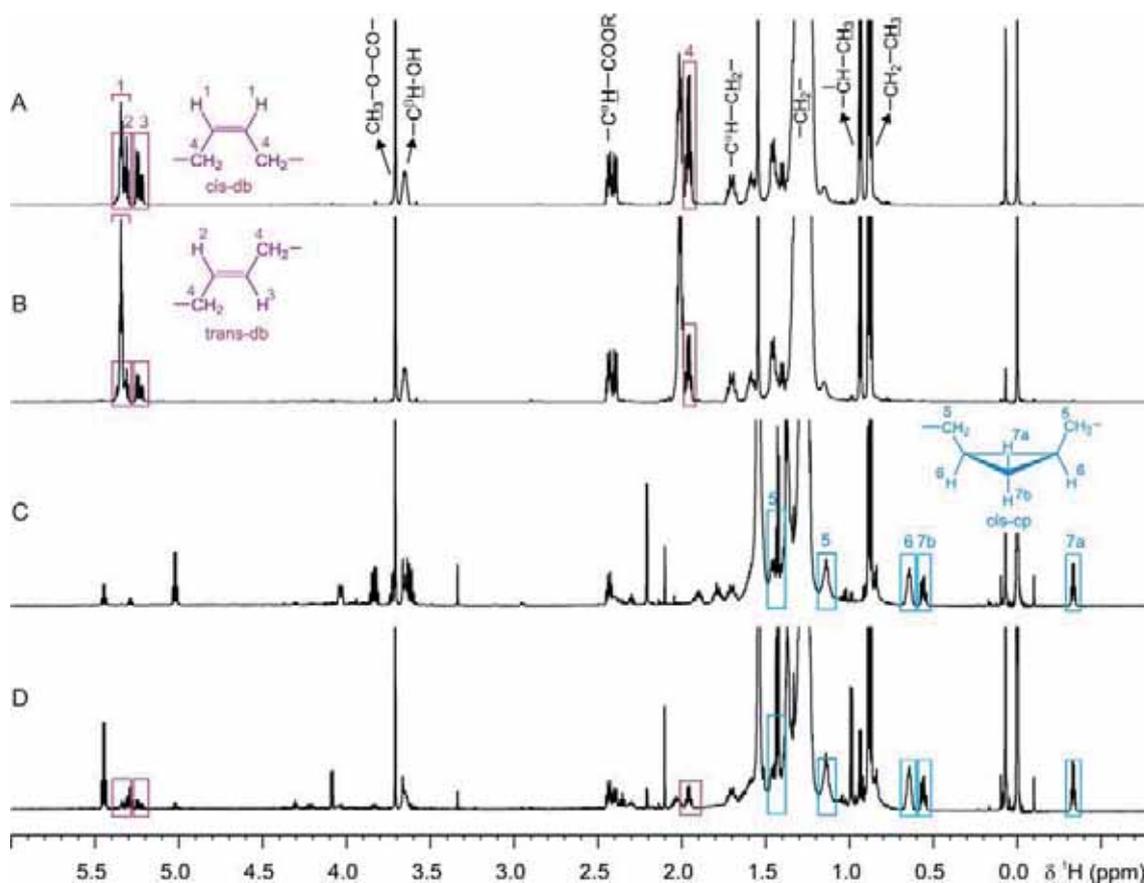
## D.5. Análisis de los ésteres metílicos por resonancia magnética nuclear (RMN)

Los análisis por RMN revelaron que los  $\alpha$ -micolatos de *M. brumae* y *M. fallax* (Figura D.17 A y B) contienen señales de *cis* doble enlace, multipletes con un desplazamiento químico de 5.35 p.p.m., y *trans* doble enlace, multipletes con desplazamiento químico de 5.34 y 5.24 p.p.m. Los picos correspondientes a los protones adyacentes al doble enlace son de 1.96 p.p.m. (Yuan & Barry, 1996). No se observó la presencia de  $^1\text{H}$ -RMN señales correspondientes a anillos de ciclopropanos.

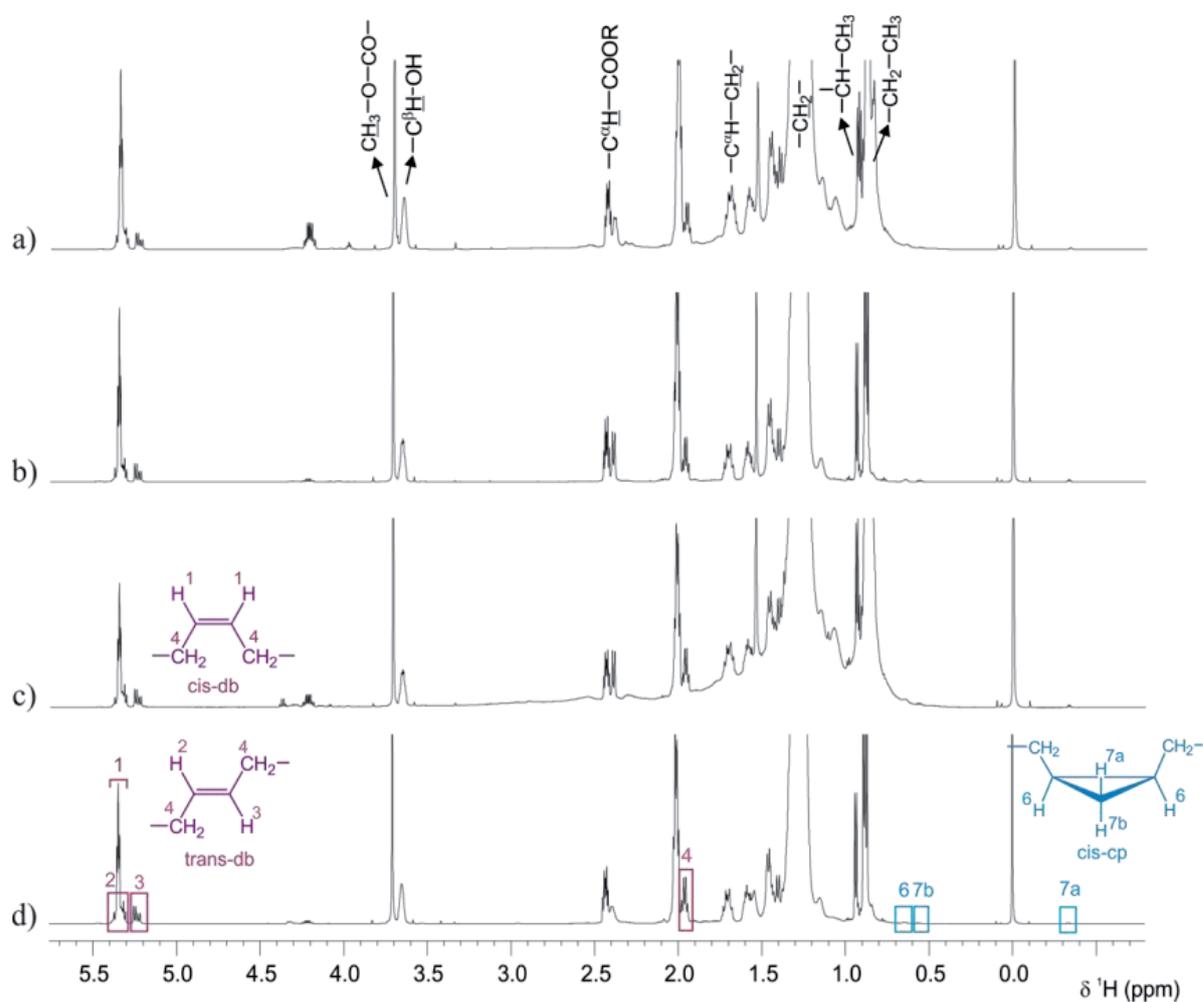
En el  $^1\text{H}$ -RMN espectro del *M. bovis* BCG-Japan (Figura D.17 C) se observaron las típicas señales correspondientes al *cis* ciclopropano, multipletes a 1.38 y 1.15 p.p.m. (Watanabe *et al.*, 1999) y no se observó ninguna señal de doble enlace de acuerdo con la estructura del ácido  $\alpha$ -micólico descrita anteriormente (Uenishi *et al.*, 2008).

El  $^1\text{H}$ -RMN espectro del  $\alpha$ -micolatos de *M. marinum* (Figura D.17 D) revelan señales correspondientes a *cis* anillos de ciclopropanos y *trans* doble enlace como previamente descrito (Daffé *et al.*, 1991).

En los análisis de la estructura fina de los ácidos micólicos de las diferentes cepas de *M. abscessus*: 390R, 390S, 44196S y 44196R se constató que los ésteres metílicos de los ácidos micólicos purificados mostraban aspectos muy similares en todas las cepas analizadas. Las cepas rugosas 390R y 44196R (Figura D.18 A y C) y las cepas lisas 390S y 44196S (Figura D.18 B y D) mostraban una cantidad muy similar de *cis* y *trans* dobles enlaces, y sólo trazas de *cis* anillos de ciclopropano fueron detectadas (Tabla D.1).



**Figura D.17.** Espectro  $^1\text{H-NMR}$  de los  $\alpha$ -micolatos purificados por CCF. (A) *M. brumae*, (B) *M. fallax*, (C) *M. bovis* BCG-Japan y (D) *M. marinum*. Las  $^1\text{H-NMR}$  señales se corresponden a: *cis* doble enlace (1) 5.35 ppm, *trans* doble enlace (2) 5.34 y (3) 5.24 ppm, protones adyacentes al doble enlace (4) 2.40 ppm, *cis* ciclopropano (6) 0.65, (7a) - 0.34, (7b) 0.56 ppm y protones adyacentes a los ciclopropanos (5) 1.38 and 1.15 ppm. El espectro se adquirió a 298.0 K y a un campo magnético de 600 MHz.



**Figura D.18.** Espectro  $^1\text{H-NMR}$  de los metil éster de los ácidos micólicos purificados de *M. abscessus*. (a) 390R, (b) 390S, (c) 44196R y (d) 44196R. Las  $^1\text{H-NMR}$  señales se corresponden a: *cis* doble enlace (1) 5.35 ppm, *trans* doble enlace (2) 5.34 y (3) 5.24 ppm, protones adyacentes al doble enlace (4) 2.40 ppm, *cis* ciclopropano (6) 0.65, (7a) - 0.34, (7b) 0.56 ppm y protones adyacentes a los ciclopropanos (5) 1.38 and 1.15 ppm. El espectro se adquirió a 298.0 K y a un campo magnético de 600 MHz.

**Tabla D.1.** Relaciones molares relativas de las fracciones moleculares *cis* doble enlace, *trans* doble enlace, *cis* ciclopropano, *trans* ciclopropano de los ésteres metílicos de los ácidos micólicos de *M. abscessus*. (n.d.) no detectado.

Muestras	Relaciones molares relativas			
	doble enlace		ciclopropano	
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>
<b>390R</b>	3,60	1,00	0,08	n.d.
<b>390S</b>	3,23	1,00	0,09	n.d.
<b>44196R</b>	2,46	1,00	0,10	n.d.
<b>44196S</b>	2,66	1,00	0,00	n.d.

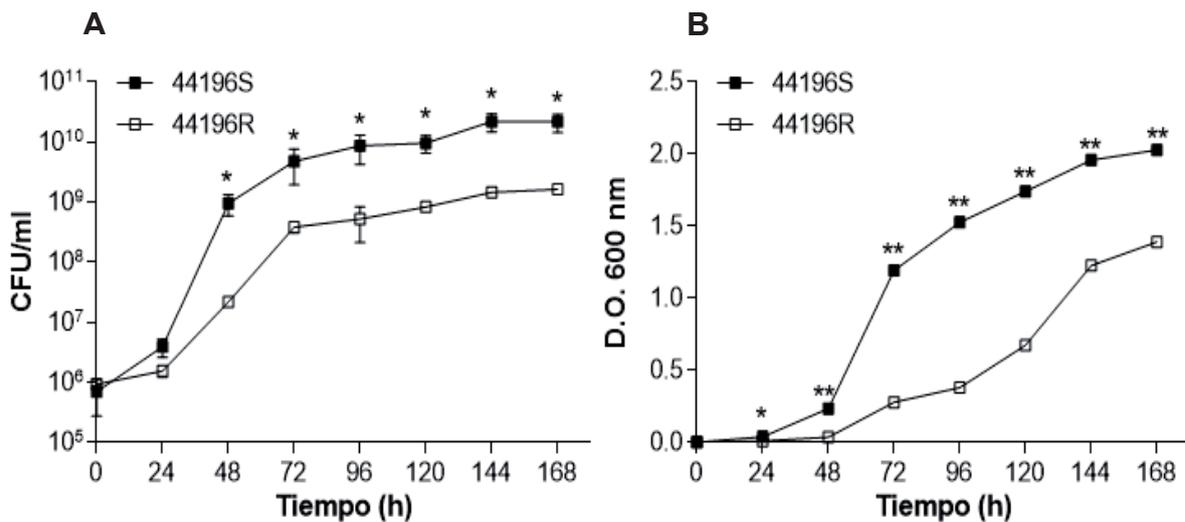
### D.6. Curva de crecimiento de *M. abscessus*

Para determinar si existe diferencia en el tiempo de generación de las variantes de *M. abscessus* se realizó el estudio de la curva de crecimiento de las cepas 44196S y 44196R, haciendo una correlación entre la densidad óptica (turbidez) y la unidad formadora de colonias (CFU).

A partir de las 48 horas de incubación se evidenció una diferencia significativa en el crecimiento de las diferentes cepas estudiadas comparando el crecimiento en CFU/ml (Figura D.19 A). En el caso de la densidad óptica esta diferencia es evidenciada a las 24 horas de crecimiento (Figura D.19 B).

Esa diferencia se debió a que la cepa 44196R que es una cepa rugosa, formadora de cuerdas, forma agregados cuando se cultiva en medio líquido. En este estudio se mantuvo el medio líquido en constante agitación, pero no fue suficiente para inhibir la agregación de los bacilos. Debido a esto, cuando se midió la turbidez o se contó las CFU no se pudo constatar el correcto resultado del crecimiento.

En este caso no se añadió ninguna sustancia detergente al medio de cultivo que facilitará la disgregación de los bacilos para no disminuir su viabilidad.

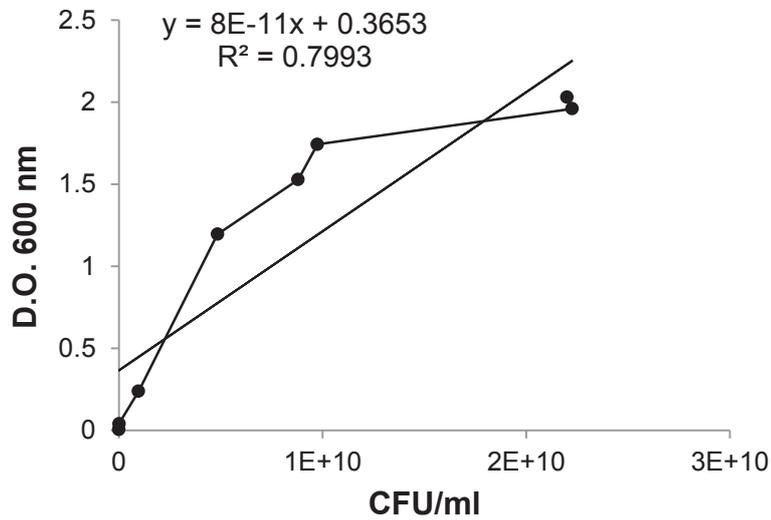


**Figura D.19.** Curva de crecimiento. (A) Recuento de CFU/ml. (B) Medida de la turbidez (densidad óptica a 600 nm). El experimento se realizó por triplicado. El resultado se expresó como el promedio de los triplicados. Los resultados son representativos de uno de dos experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  ( $t$ -Student).

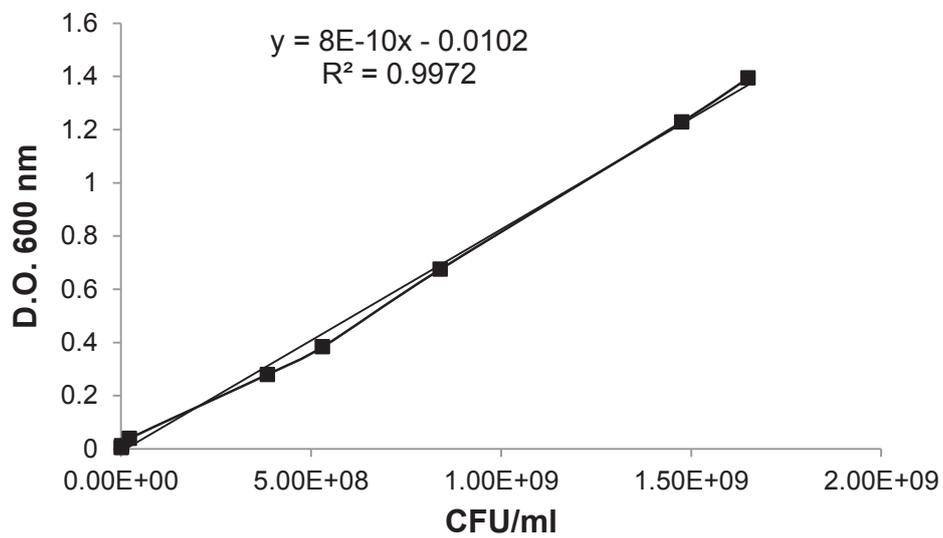
En la figura D.20 D.21 se observa la correlación entre la absorbancia y las CFUs para el crecimiento de las micobacterias hasta las 168 horas. Se constató que en el caso de la variante rugosa 44196R, el coeficiente de correlación lineal presentó un valor de 0.9972, lo cual evidenció una correlación positiva muy fuerte, más próximo a 1, en cambio el coeficiente de correlación de la cepa 44196S presentó un valor de 0,7993. Si el valor de la correlación es cercano a 1, se confirma que el método de correlación propuesto es viable para la cuantificación de *M. abscessus*. Pero, en el caso de la variante 44196R hay que tener en cuenta que hay un factor muy importante de agregación, lo impide medir el crecimiento real de esta micobacteria. El medio de cultivo no se vuelve turbio (no se evidencia crecimiento), pero los agregados son cada vez mayores. Por lo tanto no deberíamos utilizar el método de absorbancia como método de recuento de estos microorganismos.

En el caso de la variante 44196S la correlación no es tan fuerte, ya que el valor de  $R^2=0,7993$  no está tan próximo del 1. Eso se puede dar debido a que aún que se vea el medio de cultivo cada vez más turbio, no hay un incremento en el número de CFUs. La turbidez del medio puede estar relacionada con la presencia

de microorganismos no viables, lo que hace con que se detecte un aumento en la turbidez, pero no en el recuento de viables.



**Figura D.20.** Correlación lineal entre la turbidez y CFU/ml para la cepa 44196S.

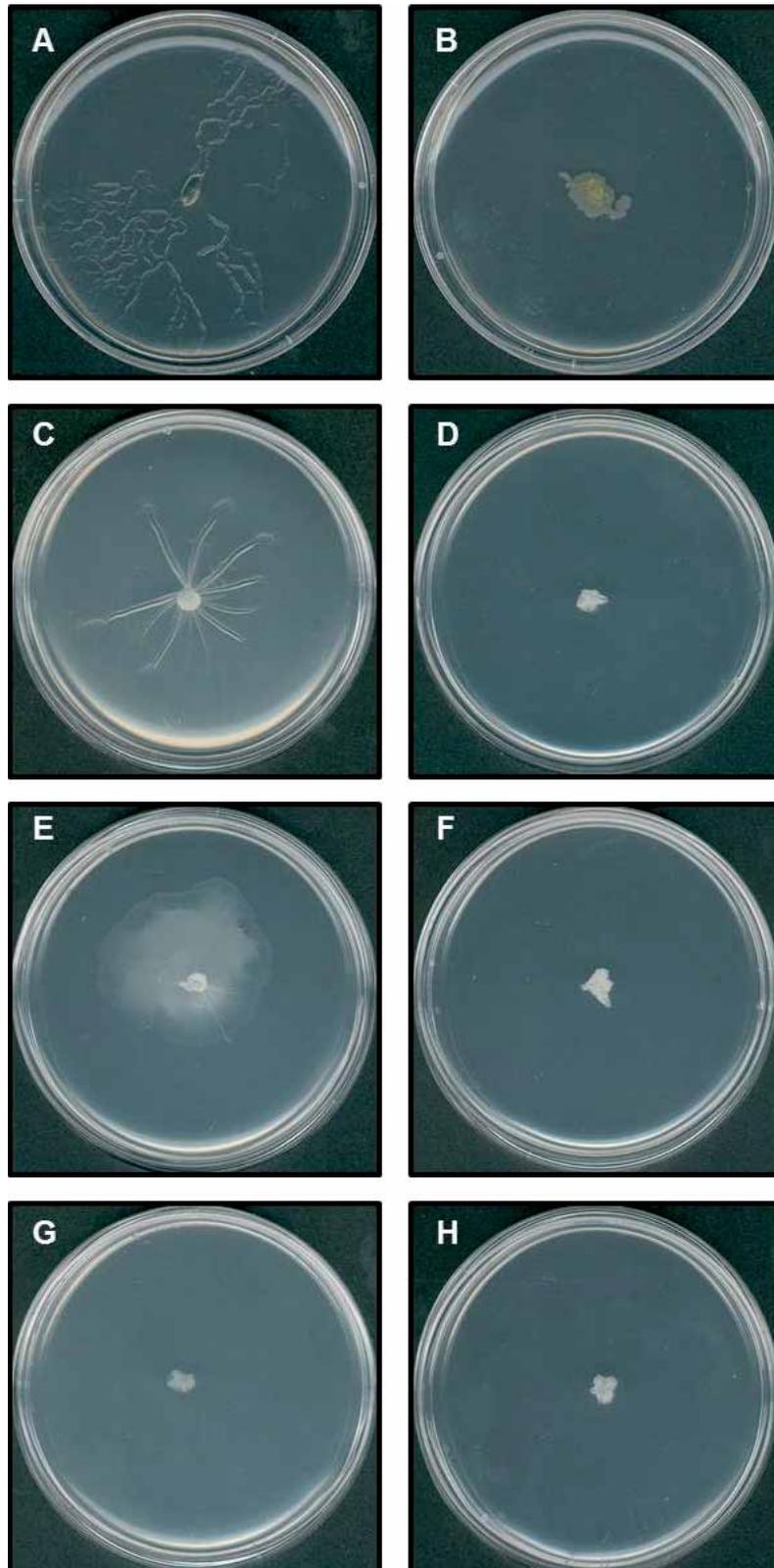


**Figura D.21.** Correlación lineal entre la turbidez y CFU/ml para la cepa 44196R.

### D.7. Motilidad

Se determinó la capacidad de motilidad de las diferentes variantes lisa y rugosa de *M. abscessus*. Para ello se utilizó el medio semi-sólido de 7H9 + 0,3% agarosa. Este medio fue considerado óptimo para la realización de estudios de motilidad en el género *Mycobacterium*. Se utilizó *M. vaccae* y sus variantes coloniales lisa y rugosa como control, puesto que ya conocíamos su motilidad (Agustí *et al.*, 2008).

Se encontró que las variantes lisas presentaban motilidad (Figura D.22 A, C y E), y esta podía ser observada a partir de las 48h de incubación, y las variantes rugosas en cambio, no presentaban motilidad (Figura D.22 B, D, F, G y H).



**Figura D.22.** Motilidad de las colonias de las diferentes variantes lisa y rugosa en medio semi-sólido (7H9 + 0,3% de agarosa). (A) *M. vaccae* S, (B) *M. vaccae* R, (C) 390S, (D) 390R, (E) 44196S, (F) 44196R, (G) BE37R y (H) BE48R. Se observó la motilidad después de 7 días de crecimiento.

## D.8 Resistencia a la desecación

Se realizó el estudio de resistencia a la desecación para ver si hay diferencias entre las variantes lisas y rugosas de *M. abscessus*. Se pudo evidenciar que la variante rugosa se mantuvo más tiempo viable que la variante lisa. A las 24h apenas se pudo observar colonias crecidas en las variantes lisas. En cambio, las variantes rugosas seguían viables a las 24 horas de incubación. No obstante, a las 48h no se observó crecimiento de la variante rugosa (Figura D.23).

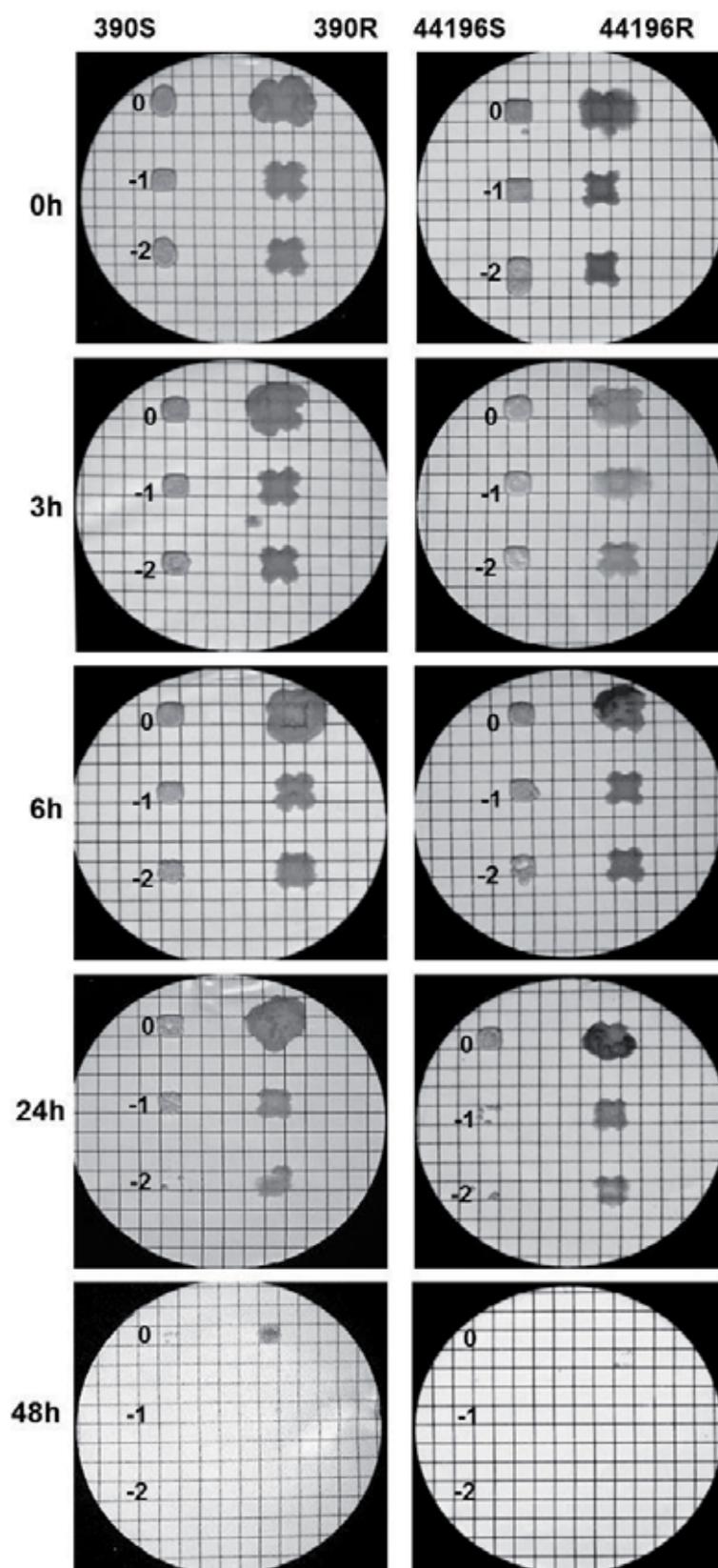


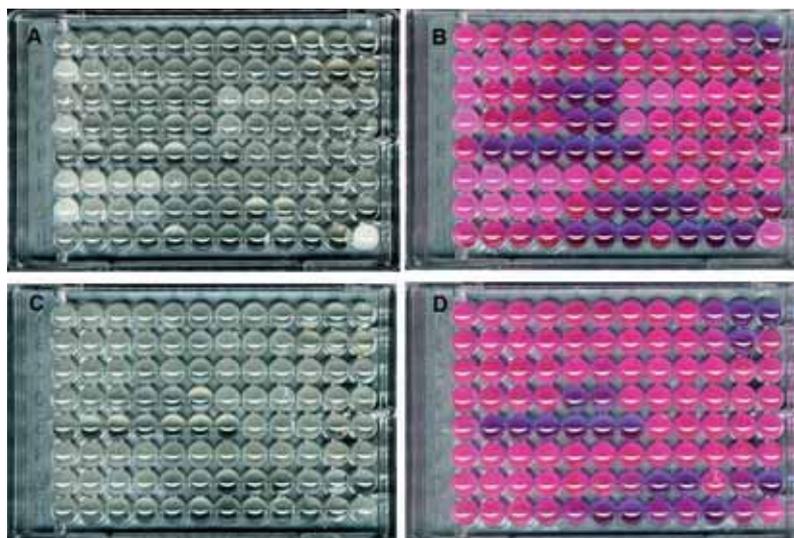
Figura D.23. Resistencia a la desecación de las diferentes variantes de *M. abscessus*.

### D.9. Estudio de sensibilidad a los antibióticos

Se realizó el estudio de la sensibilidad a los antibióticos de las diferentes variantes de *M. abscessus* (44196S y 44196R) mediante el método de microdilución en placa y el método de macrodilución en caldo.

Utilizando el método de microdilución en placa, para la interpretación de los resultados no se observó diferencia entre hacerlos con o sin resazurina, pero al añadirla a la placa es mucho más evidente la lectura de los resultados (Figura D.24).

De los diferentes antibióticos analizados, se observaron diferencias en la MIC (concentración mínima inhibitoria) para la cefoxitina que la variante lisa tubo una MIC de 64  $\mu\text{g/ml}$  y la variante rugosa una MIC de 128  $\mu\text{g/ml}$ . Para las MICs de linezoli la variante lisa 44196S dio 16  $\mu\text{g/ml}$  y la variante rugosa 32  $\mu\text{g/ml}$ . En el análisis de la MIC para la tigeciclina la MIC de la variante lisa fue de 2  $\mu\text{g/ml}$  y para la variante rugosa fue de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Para la tobramicina la variante 44196S tuvo una MIC de 4  $\mu\text{g/ml}$  y la variante 44196R una MIC de 8  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla D.2). En los demás antibióticos utilizados no se observó ninguna diferencia entre las variantes estudiadas.

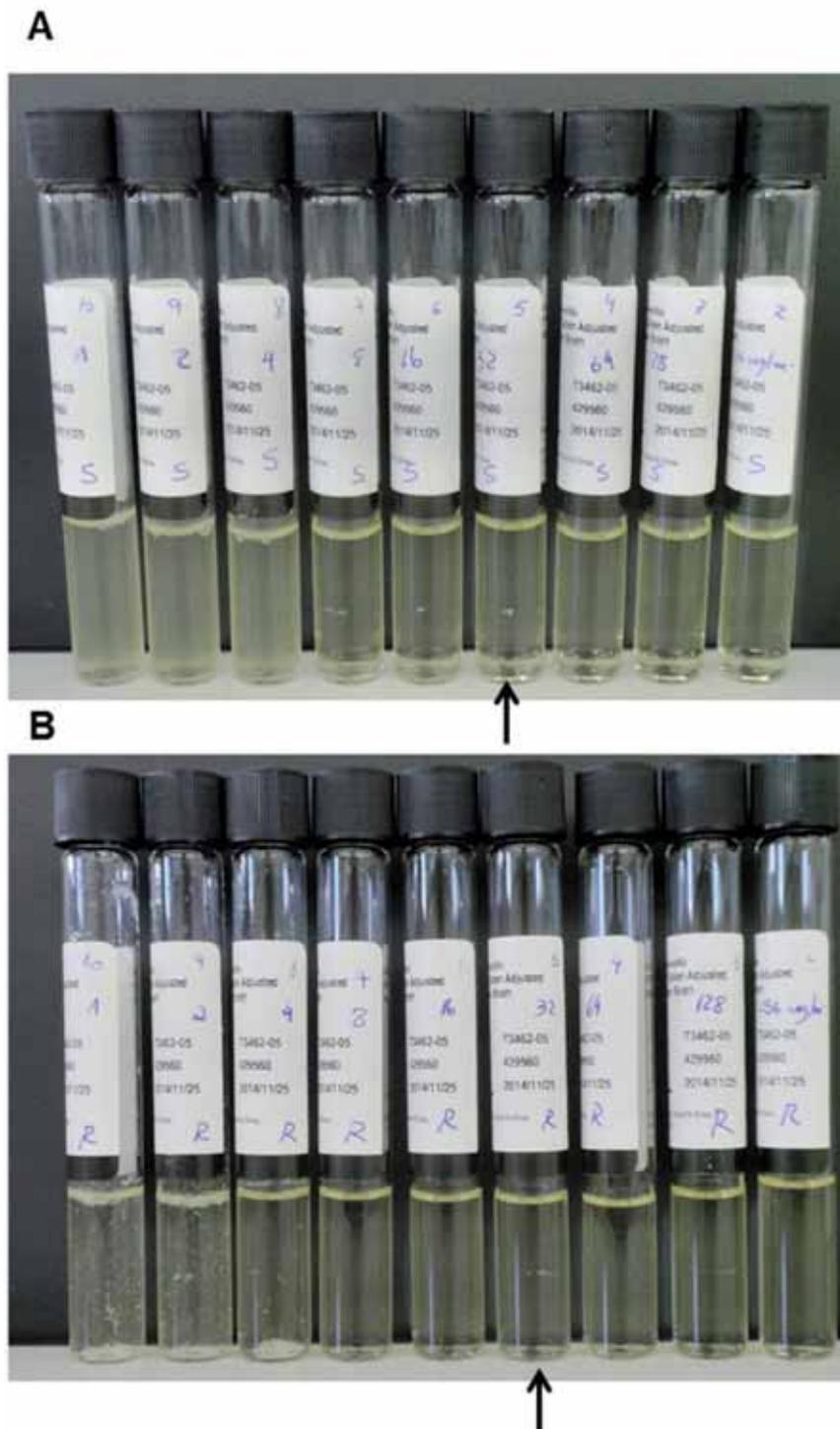


**Figura D.24.** Estudio de sensibilidad a los antibióticos mediante método de microdilución. (A y B) *M. abscessus* 44196R y (C y D) 44196S. Se hace la lectura de los resultados antes y después de añadir resazurina (placas en color rosado), lo que facilita la lectura de la prueba.

**Tabla D.2.** Resistencia a los antibióticos de las diferentes variantes de *M. abscessus*. Los valores se expresan en µg/ml. Las directrices de interpretación de las MIC vienen dadas por (García-Martos *et al.*, 2012; Set *et al.*, 2010). (R) resistente, (I) intermediario y (S) susceptible.

SENSITITRE RAPMYCOI				44196S		44196R	
Antibióticos	Susceptible	Intermediario	Resistente				
Sulfametoxazol	≤32		≥64	>8/152	R	>8/152	R
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4	>4	R	>4	R
Moxifloxacina				>8		4	
Cefoxitina	≤16	32-64	≥128	64	I	128	R
Amikacina	≤16	32	≥64	2	S	2	S
Doxiciclina	≤1	2_8	≥16	>16	R	>16	R
Tigeciclina	≤1	_	≥2	2	R	1	S
Claritromicina	≤2	4	≥8	2	S	2	S
Linezolid	≤8	16	≥32	16	I	32	R
Imipenem	≤4	8	≥16	32	R	64	R
Cefepime				>32		>32	
Amoxicilina/ clavulánico	≤8/4	16/8	≥32/16	>64/32	R	>64/32	R
Ceftriaxona	≤8	16-32	≥64	>64	R	>64	R
Minociclina	≤1	2_4	≥8	>8	R	>8	R
Tobramicina	≤4	8	≥16	4	S	8	I

Para el ensayo de sensibilidad a la gentamicina para las diferentes variantes de *M. abscessus* 44196S y 44196R se utilizó el método de macrodilución en caldo. Se consideró la MIC donde no se veía un crecimiento visible de micobacterias a 32 µg/ml de gentamicina para ambas variantes 44196S y 44196R (Figura D.25).



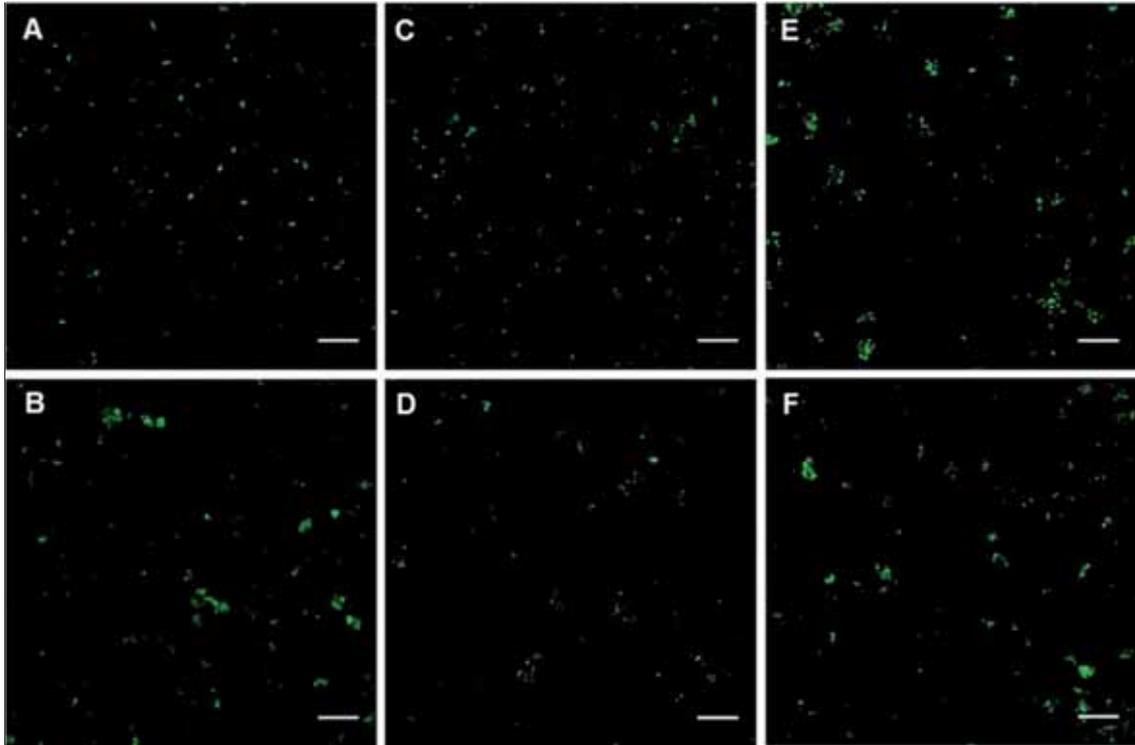
**Figura D.25.** Estudio de sensibilidad a la gentamicina mediante método de microdilución. (A) *M. abscessus* 44196S y (B) 44196R. Se hace la lectura de los resultados después de 96 horas de incubación. Flecha indica los tubos donde no se observó crecimiento (32 µg/ml).

### **D.10. Análisis del tamaño de los agregados en la suspensión bacteriana y dentro de los macrófagos infectados para evaluar la capacidad de los macrófagos de fagocitar bacilos aislados o agregados**

Se analizaron los bacilos aislados o formando agregados en la suspensión bacteriana de las diferentes cepas de *M. abscessus* mediante CLSM (Figura D.26). Para la realización de este estudio se siguió el protocolo estándar para la disgregación máxima de los bacilos descrito en el apartado de material y métodos. Las cepas con morfología colonial lisa (390S y 44196S) presentaban 89,4 y 91,7% de los bacilos aislados respectivamente, y una pequeña cantidad de bacilos agregados formados entre 3-4 bacilos que representaban 10,6% en 390S y 8,3% en 44196S (Tabla D.3).

La mayor diferencia que se observó en relación a las cepas con morfología colonial rugosa (390R, 44196R, BE37R y BE48R) es que estas cepas presentaban agregados con más de 5 bacilos, algo que no ocurrió en las variantes con morfología colonial lisa. Los porcentajes de agregados con más de 5 bacillos en el caso de la cepa 390R superaron los 20%, y en la cepa 44196R llegaron hasta un 16,1% (Tabla D.3).

Las cepas BE37R y BE48R también presentaron un porcentaje de agregados con más de 5 bacilos similar a las demás cepas rugosas, siendo para la primera de 10,8% y la segundo de 13,2%.



**Figura D.26.** CLSM imágenes muestran las bacterias aisladas o formando agregados en la suspensión bacteriana. En (A) 390S, (B) 390R, (C) 44196S, (D) 44196R, (E) BE37R y (F) BE48R. Barra de escala 15  $\mu\text{m}$ .

**Tabla D.3.** Porcentaje de bacilos aislados o formando agregados en la suspensión bacteriana y dentro de los macrófagos infectados. Los datos son representativos de uno de dos experimentos independientes.

Cepas	Agregados (%) Suspensión			Agregados (%) Dentro macrófagos			
	Tamaño área Agregado	<3 $\mu\text{m}^2$	3-6 $\mu\text{m}^2$	>6 $\mu\text{m}^2$	<3 $\mu\text{m}^2$	3-6 $\mu\text{m}^2$	>6 $\mu\text{m}^2$
	Número bacillos	1-2	3-4	$\geq 5$	1-2	3-4	$\geq 5$
390S		89.4	10.6	0.0	91.3	8.7	0.0
390R		61.5	16.5	22.0	48.7	15.2	36.1
44196S		91.7	8.3	0.0	93.2	6.8	0.0
44196R		73.2	10.7	16.1	52.8	21.2	26.0
BE37R		75.7	13.5	10.8	49.7	18.8	31.5
BE48R		69.8	17.00	13.2	53.5	22.4	24.1

Después de 3 horas de infección se observó que los macrófagos infectados con las cepas rugosas tenían entre 24 y 36% de los agregados con más de 5 bacilos, entre 15 y 22% de los agregados entre 3-4 bacilos y entre 48 y 53% de bacilos aislados (Tabla D.3). En cambio, en los macrófagos infectados con las

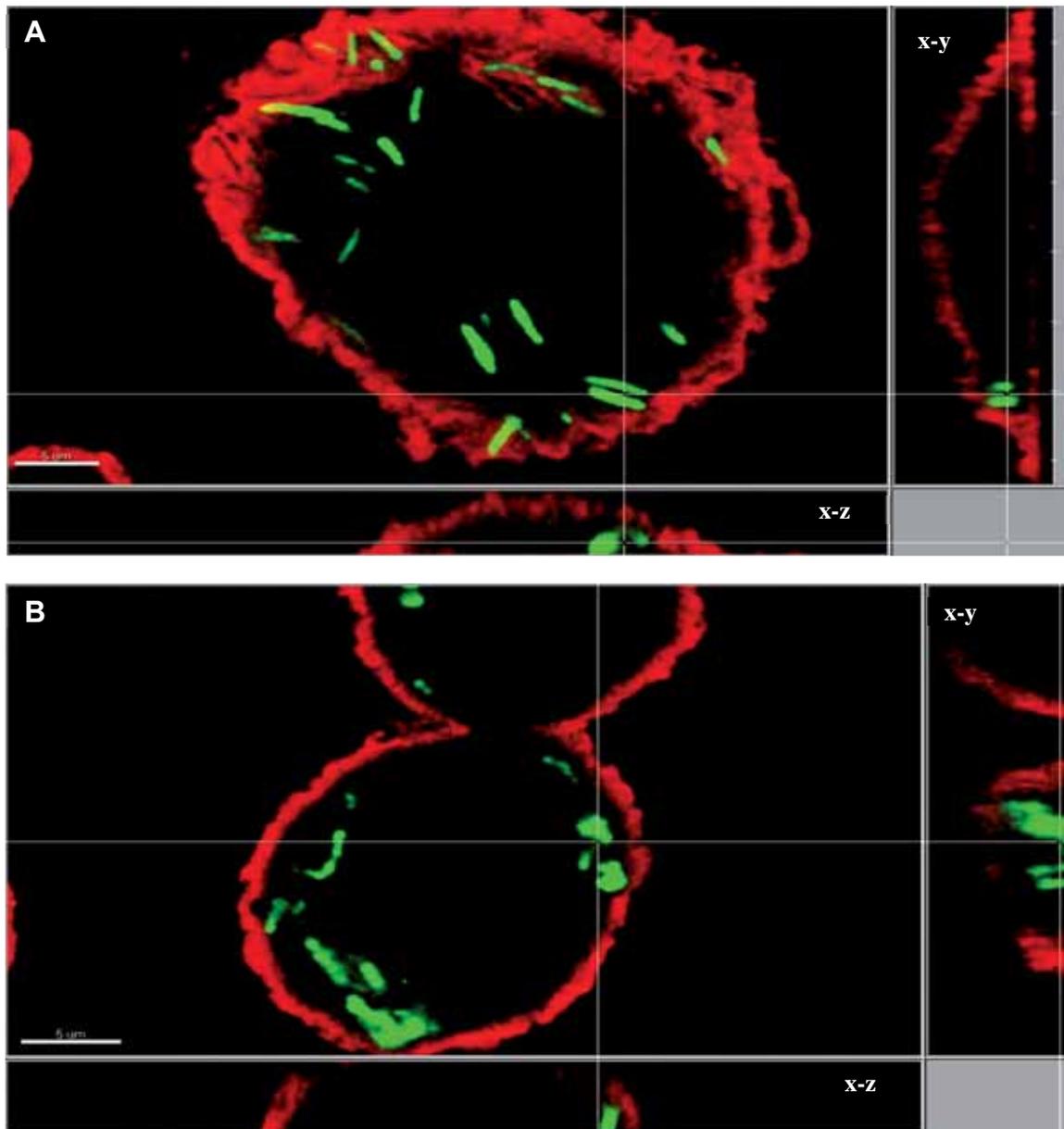
cepas con morfología colonial lisa a las 3 horas después de la infección se observaron entre 91 y 93% de bacilos aislados dentro de los macrófagos (Tabla D.3). La proporción de los macrófagos infectados a las 3 horas después de la infección fue similar para todas las cepas (entre 50 y 60%).

### **D.11. Ensayo de fagocitosis**

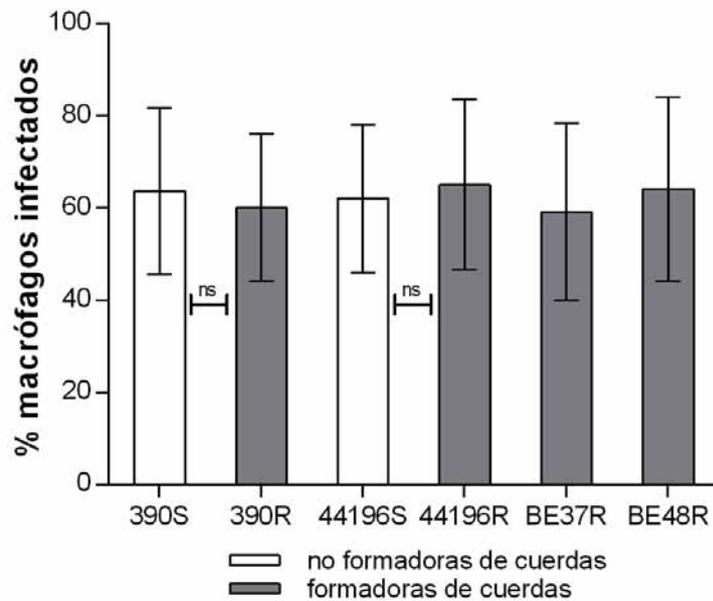
Para analizar la fagocitosis de las bacterias por parte de los macrófagos se prepararon las muestras para CLSM. Esta técnica nos permitió observar claramente las bacterias internalizadas por los macrófagos (en verde) y la membrana celular de los macrófagos marcadas (en rojo).

Después de 3 horas de infección, se observó que la mayoría de los bacilos de las cepas lisas estaban aislados dentro de los macrófagos en fagosomas independientes (Figura D.27 A) y los bacilos de las cepas rugosas estaban agregados conteniendo múltiples bacilos dentro de un fagosoma. (Figura D.27 B).

Para estandarizar la MOI de la infección se utilizó este protocolo donde se ajustó la MOI a un 60-65 % de los macrófagos infectados con las diferentes cepas consiguiendo así una igualdad de condiciones entre las diferentes cepas a la hora de realizar diferentes estudios de infección. Para los estudios de interacción entre la micobacteria y el macrófagos se utilizó una MOI 100:1 para las cepas 390S y 44196S y una MOI 10:1 para las cepas 390R, 44196R, BE37R y BE48R (Figura D.28).



**Figura D.27.** *M. abscessus* fagocitado por los macrófagos después de 3 horas de infección. CLSM imágenes muestran las bacterias fagocitadas por los macrófagos. (A) Macrófagos infectados bacilos aislados de 390S y (B) macrófagos infectados con bacilos aislados y formando agregados de 390R.



**Figura D.28.** Cuantificación de macrófagos infectados. El porcentaje de macrófagos infectados con las diferentes cepas de *M. abscessus* después de 3 horas de infección fue cuantificado por CLSM. (ns) No existen diferencias significativas entre las variantes lisas y las variantes rugosas. Los datos se representan con el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes.

## D.12. Viabilidad de los macrófagos

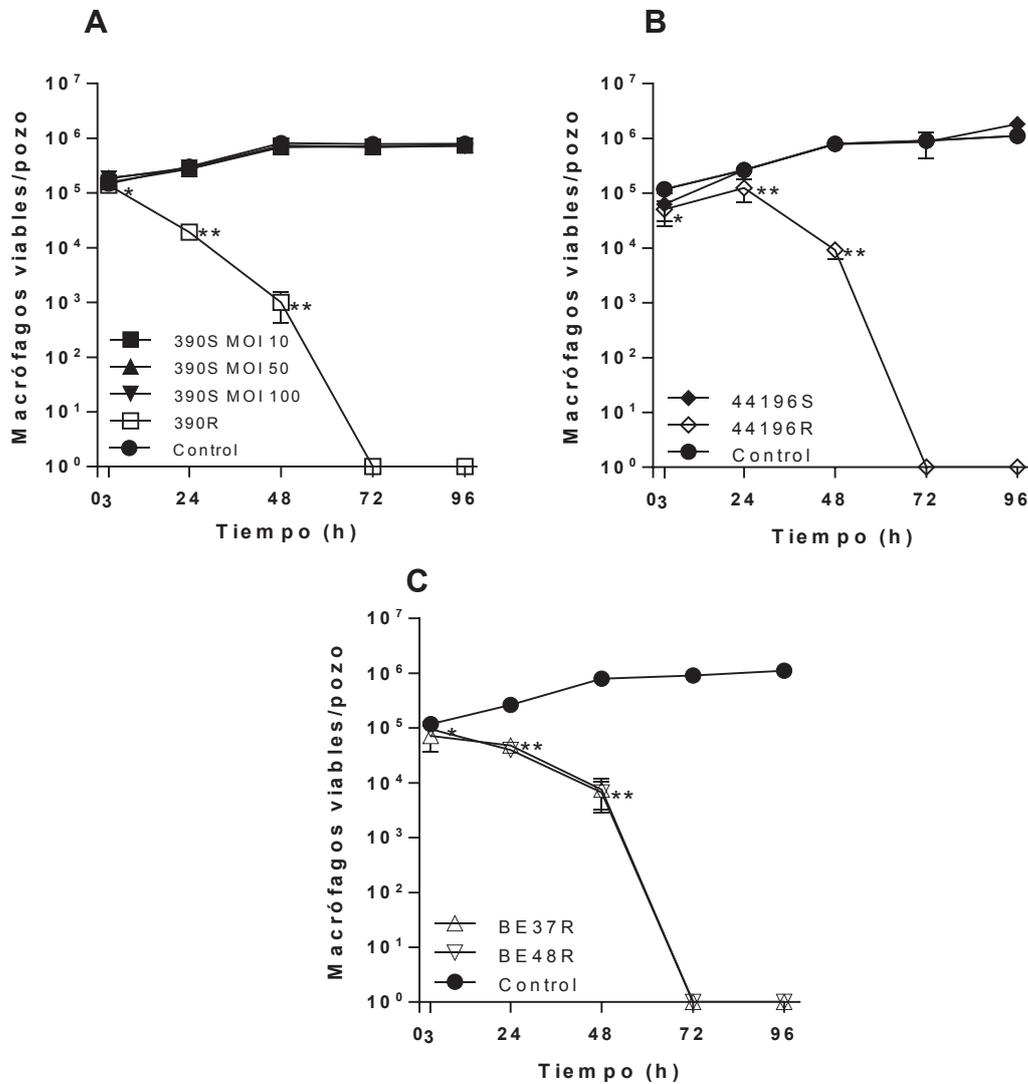
Para cuantificar la viabilidad de los macrófagos infectados con las diferentes cepas de *M. abscessus* se utilizaron técnicas de recuento directo, que contaban el número de macrófagos viables (CLSM, Azul tripano) y una técnica de recuento indirecto o colorimétrica (CV).

### D.12.1. Viabilidad - Azul Tripano

El primer método utilizado de recuento celular para cuantificar la viabilidad de los macrófagos infectados fue el método de tinción por exclusión con Azul Tripano.

Utilizando este método se pudo evidenciar que no hubo diferencias significativas entre los macrófagos infectados con las cepas 390S y 44196S (Figura D.29 A y B) y los macrófagos control (no infectados). Cuando se comparó la viabilidad de los macrófagos infectados con la cepa 390S a diferentes MOIs se observó claramente que mismo aumentado la cantidad de bacilos no hubo diferencia significativa respecto al control (Figura D.29 A).

En el caso de los macrófagos infectados con las cepas 390R, 44196R, BE37R y BE48R (Figura D.29 A, B y C), estos presentaron diferencias significativas respecto al control a partir de las 3 horas pos infección.



**Figura D.29.** Viabilidad de los macrófagos infectados con diferentes cepas de *M. abscessus* por el método de azul tripano (AT). (A) macrófagos infectados con las cepas 390S a diferentes MOIs y 390R a MOI 10. (B) macrófagos infectados con las cepas 44196S y 44196R. (C) macrófagos infectados con las cepas BE37R y BE48R. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  (Student *T* test).

### **D.12.2. Viabilidad – CLSM**

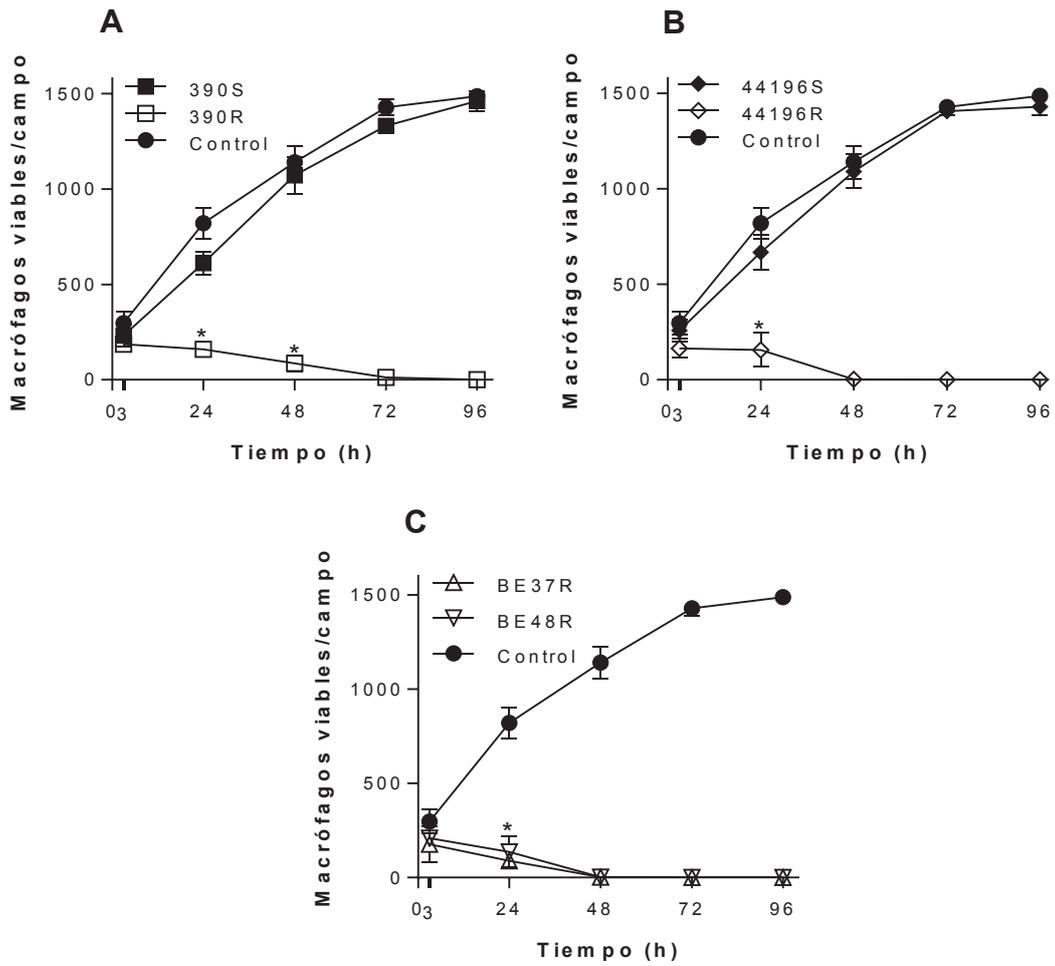
Para medir la viabilidad de los macrófagos utilizando un método de recuento celular mediante el uso de CLSM se utilizaron marcadores celulares específicos como la calceína AM que marcaba en verde las células vivas y el etidio –homodímero que marca en rojo las células muertas.

Después de 24 horas pos infección se pudo observar una diferencia significativa entre los macrófagos infectados con las cepas rugosas, formadoras de cuerdas (390R, 44196R, BE37R y BE48R) con respecto a los macrófagos control (no infectados) (Figura D.30 A, B y C). Además, se pudo ver claramente que a las 72 horas pos infección el 100% de los macrófagos infectados con las cepas rugosas (formadoras de cuerdas) eran inviables.

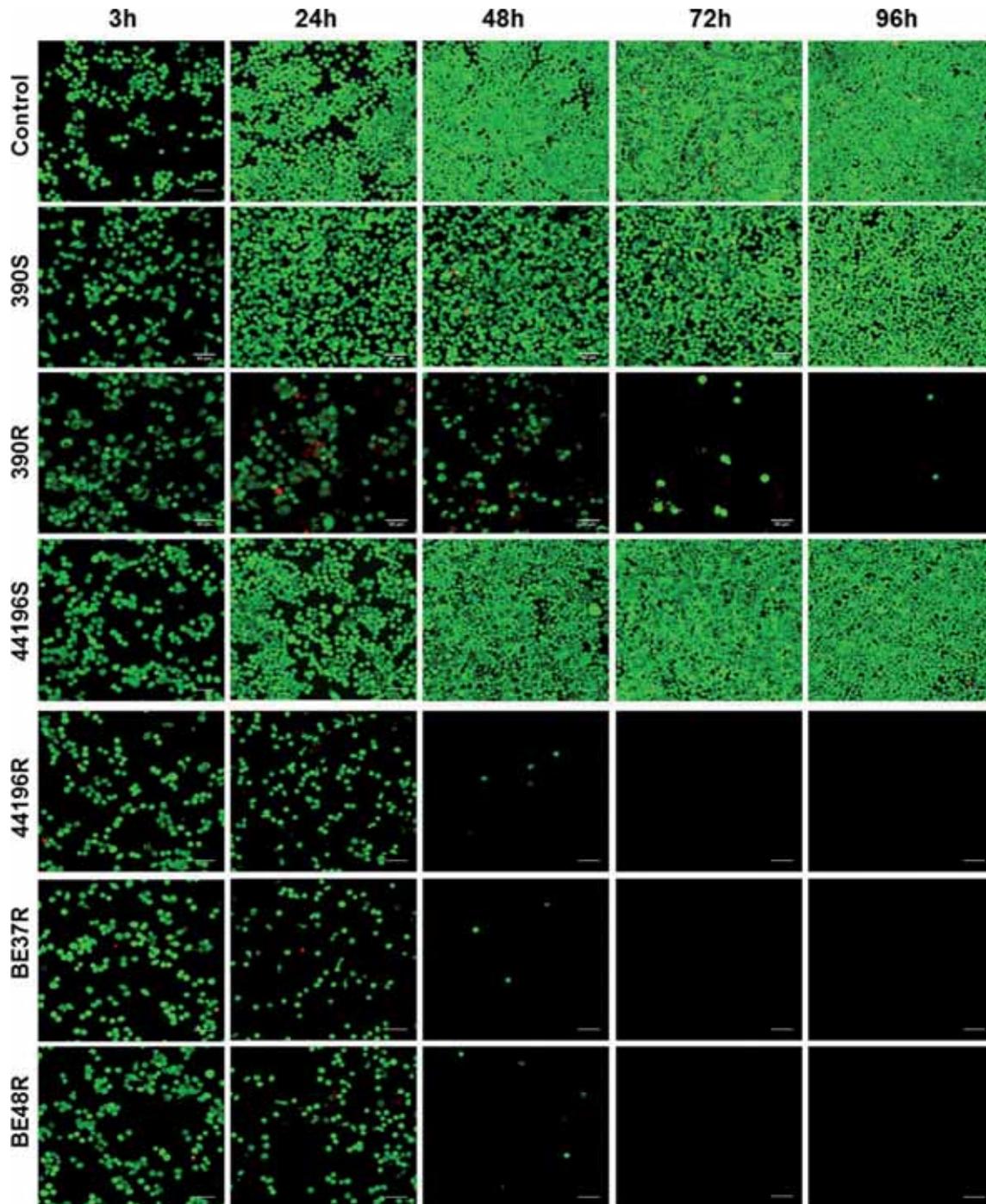
Los macrófagos infectados con las cepas lisas, no formadoras de cuerdas (390S y 44196S) se mantuvieron viables y no presentaron diferencias significativas en respecto al control (no infectados) durante todo en transcurso de la infección (Figura D.30 A y B).

Este resultado fue evidenciado cuando analizamos las imágenes obtenidas por CLSM (Figura D.31), donde se pudo observar claramente la proliferación de los macrófagos control (no infectados) o infectados con las cepas 390S y 44196S, y la disminución del número de macrófagos viables infectados con las cepas 390R, 44196R, BE37R y BE48R.

Los resultados fueron considerados a partir del recuento de los macrófagos viables por campo, visto que los macrófagos inviables (teñidos de rojo) eran rápidamente destruidos y se desenganchaban del fondo del pozo, lo que no nos permitió cuantificarlos.



**Figura D.30.** Viabilidad de los macrófagos por CLSM. Promedio de macrófagos viables por campo a diferentes horas pos infección. Diferencia significativa respecto al control (\*  $P < 0,05$  Student  $t$  test).

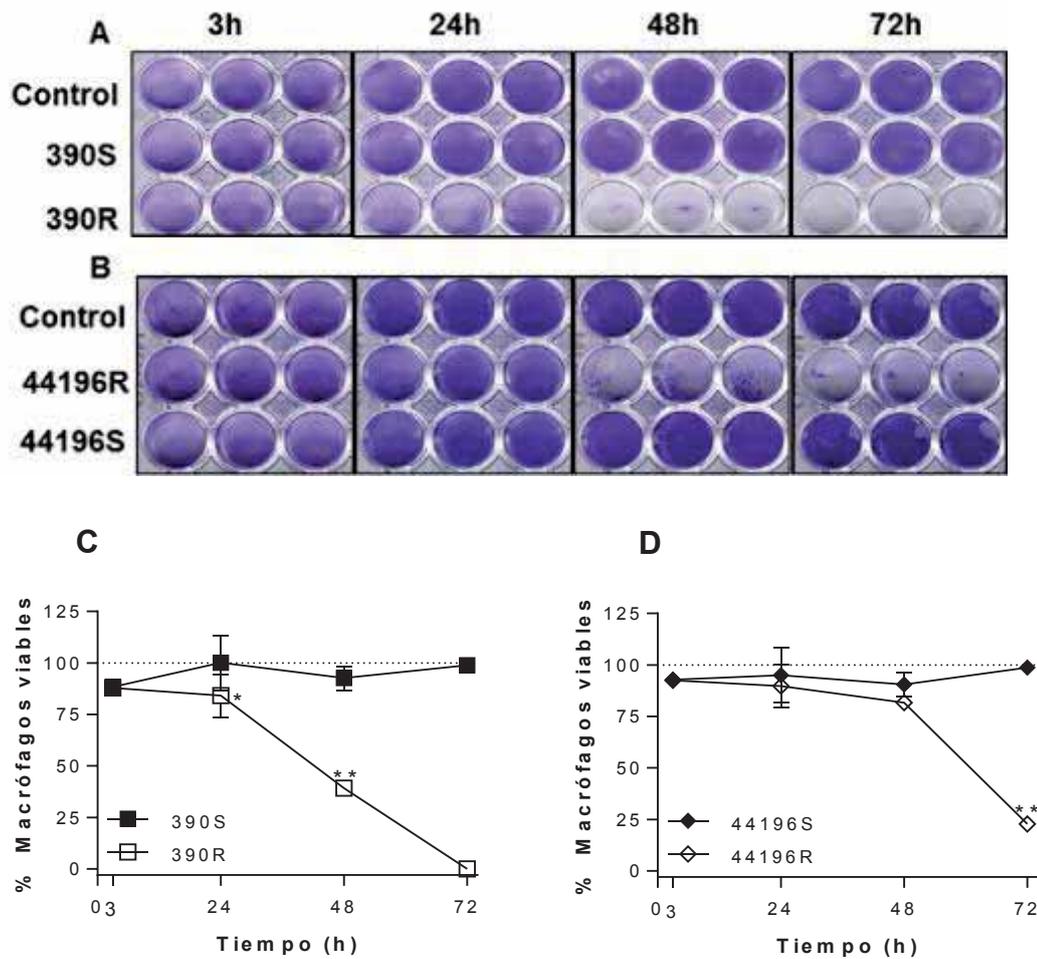


**Figura D.31.** Viabilidad de los macrófagos por CLSM. Los macrófagos viables se marcaron con la calceína AM en verde y los macrófagos inviables con el etidio – homodímero en rojo. Barra de escala 60  $\mu$ m.

### D.12.3. Viabilidad – Cristal Violeta

En el ensayo de adhesión y proliferación celular con el cristal violeta, una vez fijadas y teñidas las células se procedió a la observación bajo microscopio óptico, donde se vio claramente la proliferación celular en los pocillos donde los macrófagos estaban infectados con las cepas lisas no formadora de cuerdas 390S y 44196S (Figura D.32 A y B). La misma proliferación celular fue observada en los pocillos control (no infectados). Ya en los pocillos infectados con las cepas 390R y 44196R se observó una reducción en el número de macrófagos viables a partir de las 24 horas pos infección (Figura D.32 A y B). Y se redujo drásticamente el número de macrófagos viables con el paso del tiempo, llegando a las 72 horas sin apenas macrófagos adheridos al pocillo.

Posterior a la observación microscópica se añadió ácido acético a las células teñidas para disolver el colorante y se determinó la proliferación celular mediante absorbancia. Se pudo observar una diferencia significativa entre las cepas 390S y 390R a partir de las 24 horas pos infección (Figura D.32 C), lo que se pudo corroborar con la imagen observada por microscopio óptico. En las cepas 44196S y 44196R no se observó diferencia significativa hasta las 48 horas pos infección (Figura D.32 D), lo que no se correspondió al resultado que se observó por microscopía óptica, y eso se pudo deber al hecho de que en el pocillo quedaban agregados bacterianos adheridos, y estos también retenían la tinción por cristal violeta, lo que podía llevar a un resultado equivocado.



**Figura D.32.** Viabilidad de los macrófagos infectados por diferentes cepas de *M. abscessus* utilizando el método de la tinción por cristal violeta. (A y B) observación microscopía de los macrófagos teñidos con cristal violeta. (C) porcentaje de macrófagos viables infectados con las cepas 390S y 390R (D) porcentaje de macrófagos viables infectados con las cepas 44196S y 44196R. Diferencia significativa con respecto al control (\*  $P > 0,05$ , \*\*  $P > 0,001$ , Student *t* test).

### D.13. Análisis microscópica de la interacción macrófago – micobacteria

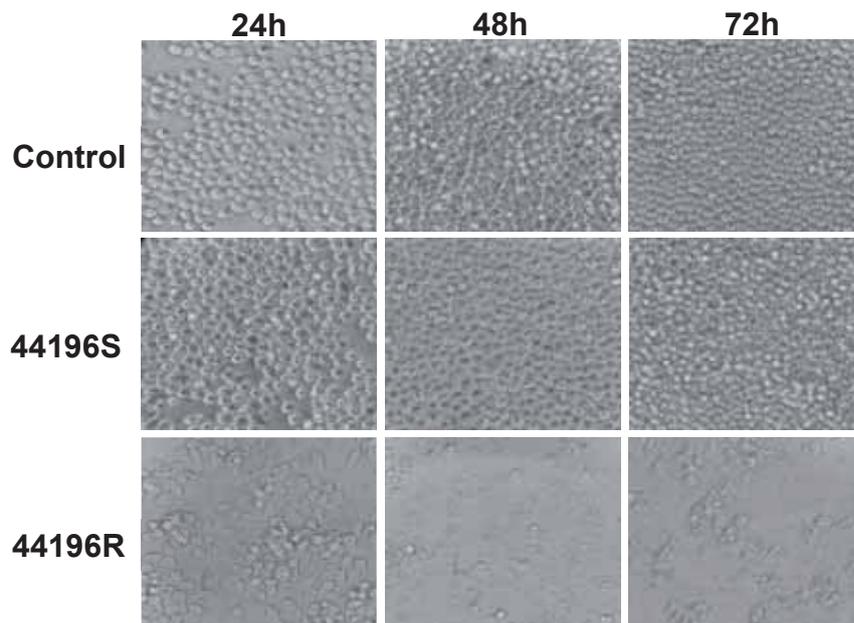
Para analizar la interacción entre la micobacteria y el macrófago a nivel microscópico y ultra-estructural se utilizaron diferentes técnicas de microscopía.

### D.13.1 Microscopia óptica

A lo largo del transcurso de la infección se pudo observar la proliferación de los macrófagos. En el caso de los macrófagos infectados con las cepas 390S y 44196S la proliferación celular fue muy similar a los macrófagos control (no infectados).

Cuándo se examinaron los de los macrófagos infectados con las cepas 390R, 44196R, BE37R y BE48R se observó no solo una disminución clara en la proliferación celular sino también como gran parte de los macrófagos estaban destrozados.

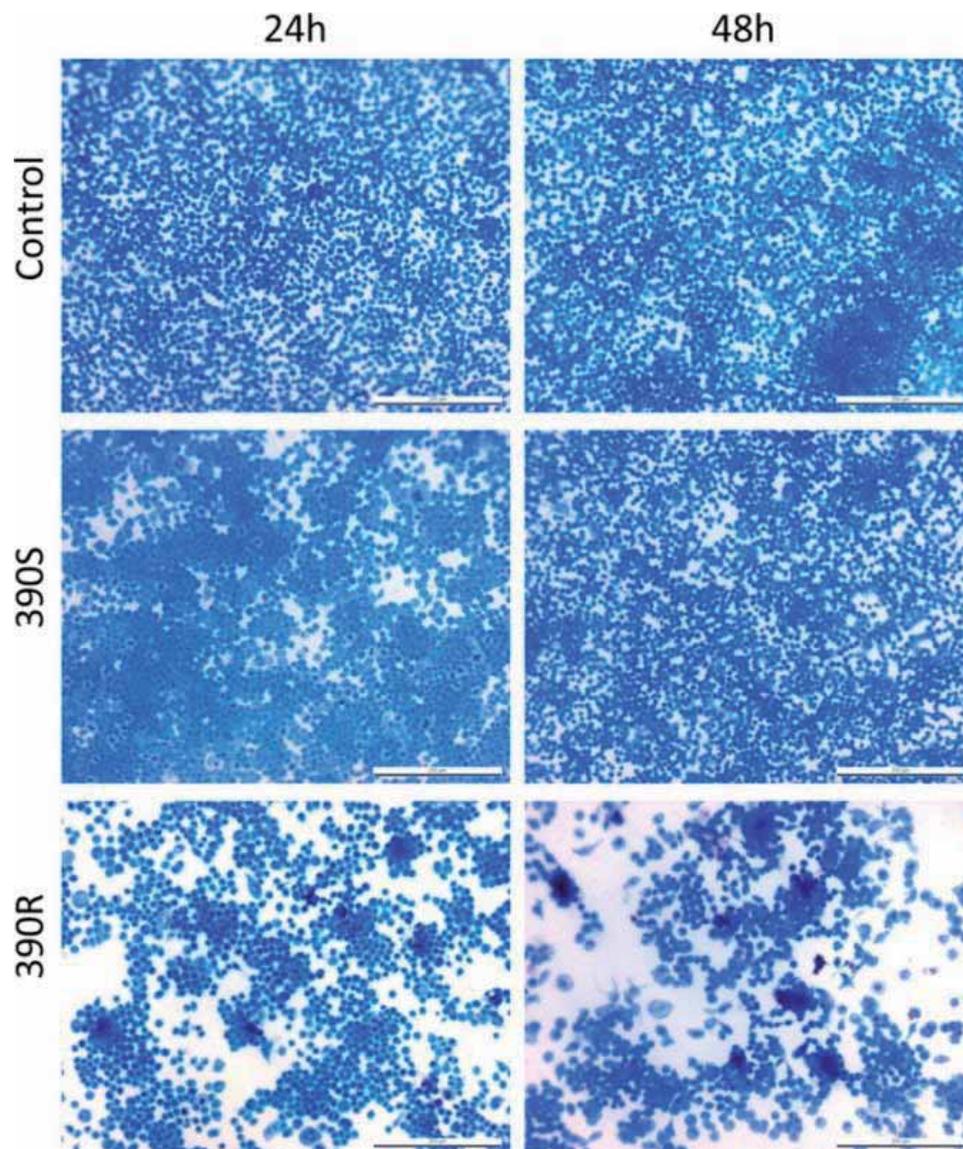
A continuación se puede observar un ejemplo claro de la proliferación de los macrófagos control o infectados con la cepa 44196S y la destrucción de los macrófagos infectados con la cepa 44196R (Figura D.33).



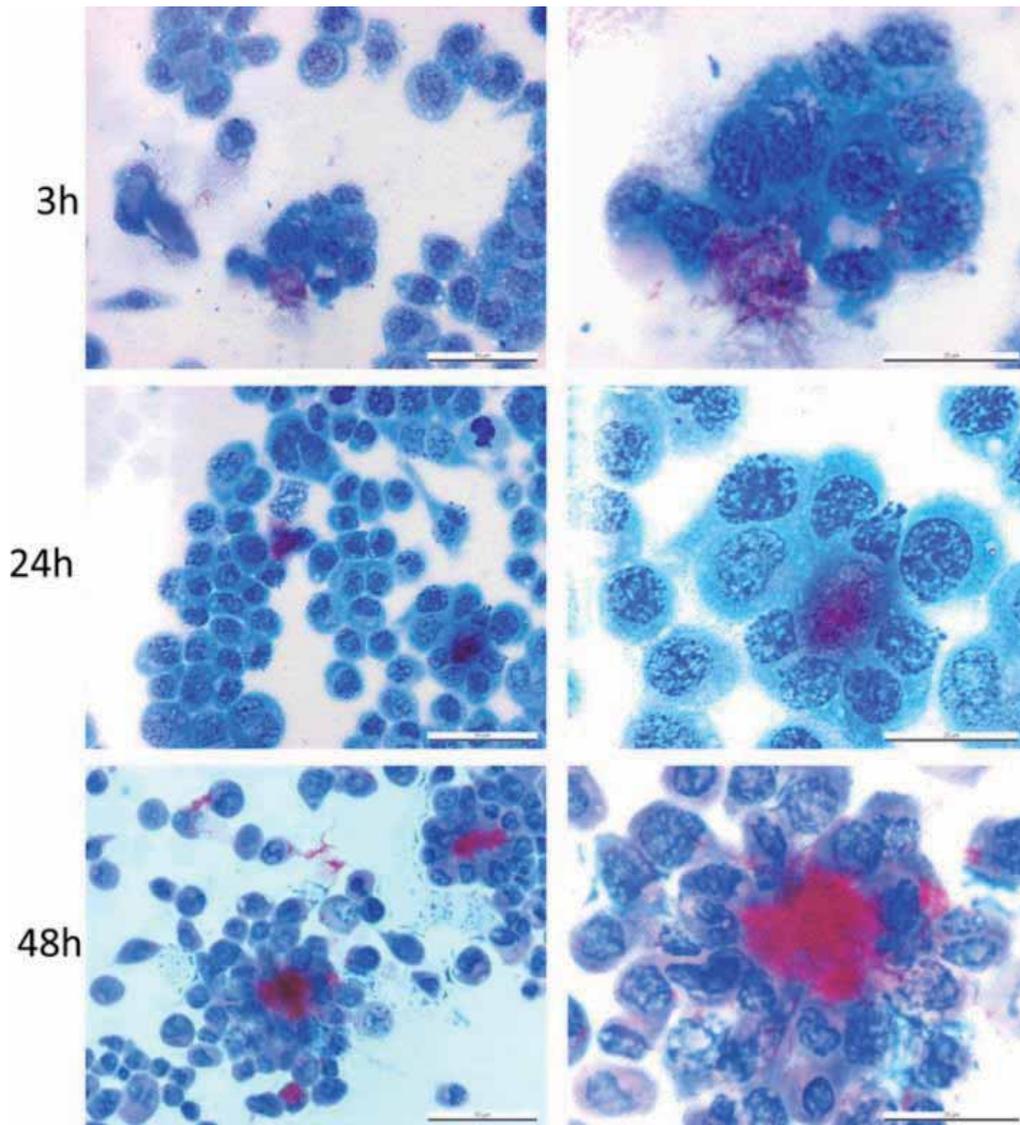
**Figura D.33.** Progresión de la infección. Los macrófagos infectados con las diferentes variantes de *M. abscessus* visualizados con microscopio óptico.

Con la tinción de ZN se pudo observar en el transcurso de la infección de los macrófagos con las diferentes variantes de *M. abscessus* la multiplicación de los macrófagos control o infectados con la cepa 390S. En el caso de los macrófagos infectados con la cepa 390R se pudo observar la disminución en el

número de macrófagos (Figura D.34), además de la formación de macrófagos agregados alrededor de las bacterias, asemejándose a un granuloma (Figura D.35). Esta formación no fue observada en los macrófagos infectados con las cepas 390S y 444196S.



**Figura D.34.** Progresión de la infección. Observación por el método de ZN. Barra de escala de 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura D.35.** Macrófagos infectados con la cepa 390R a diferentes tiempos pos infección. En azul se observan los macrófagos y en rojo las micobacterias. Barra de escala 50 µm (columna de la izquierda) y 25 µm (columna de la derecha).

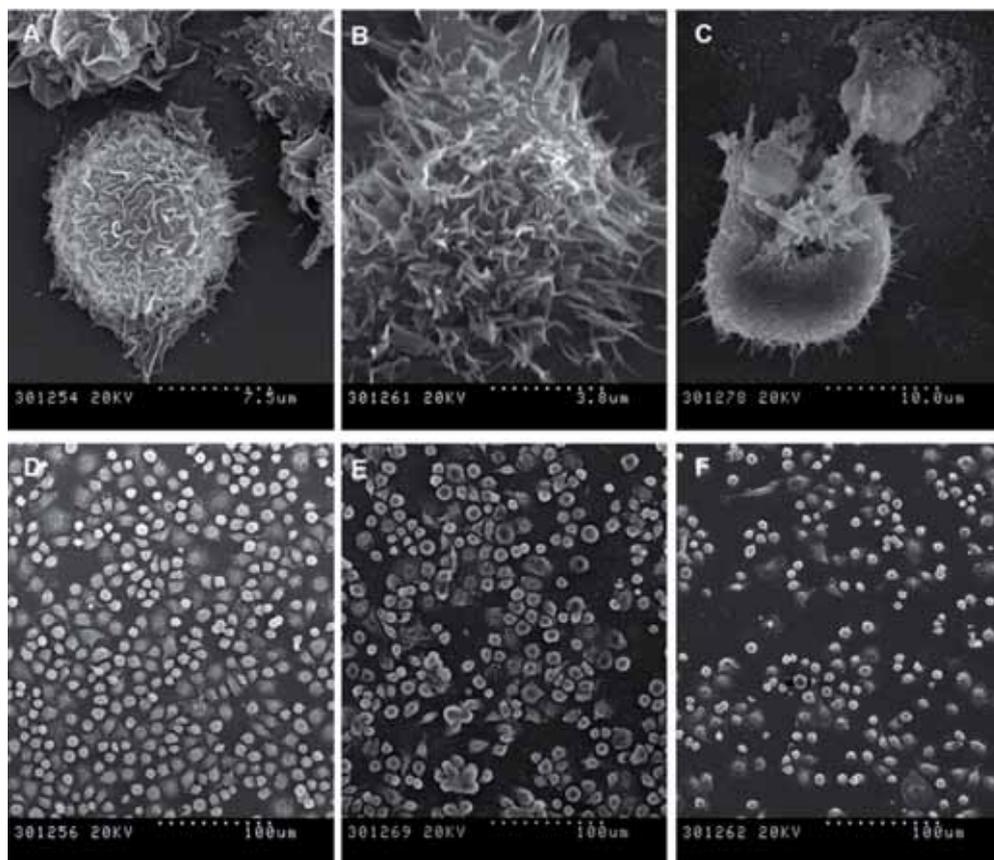
### D.13.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La utilización de la MEB permitió observar con mayor resolución la interacción entre el macrófagos y la micobacteria.

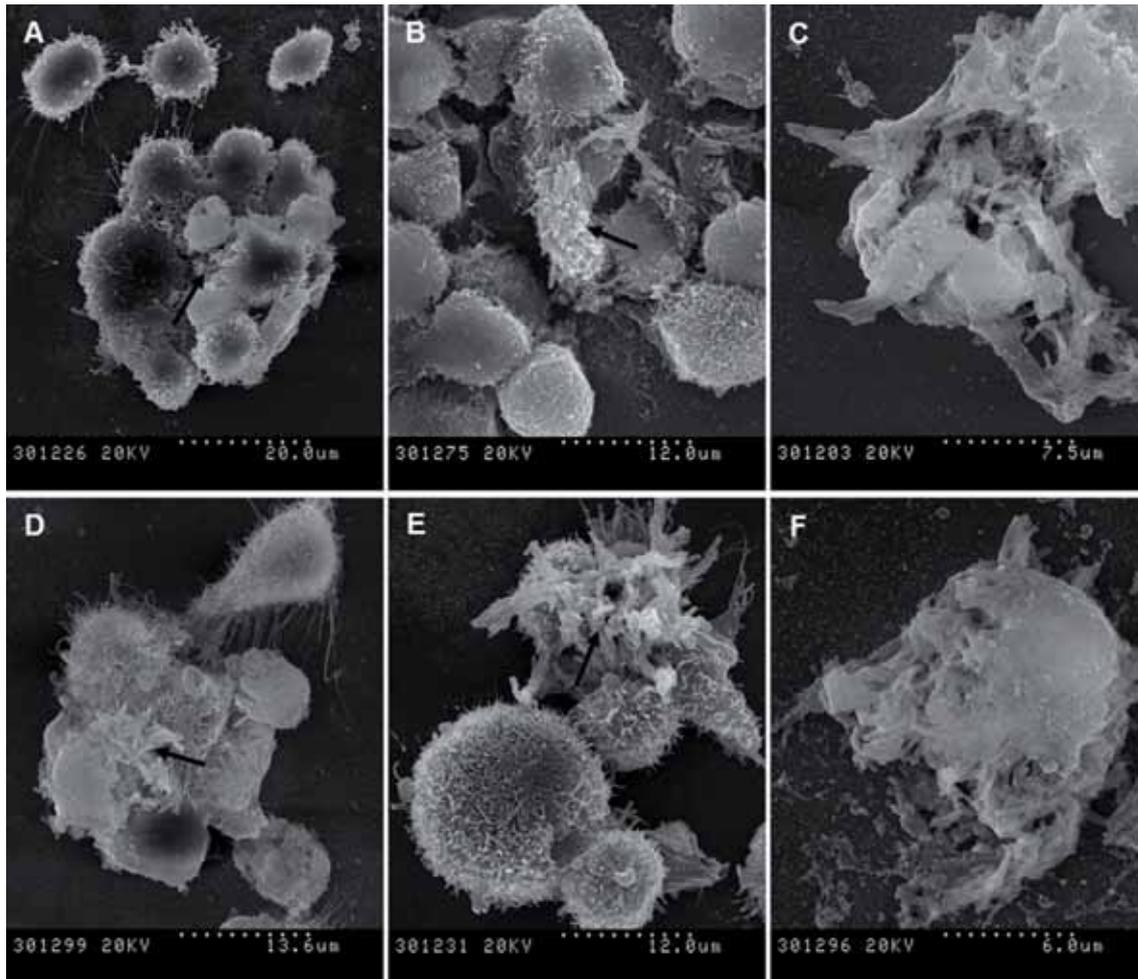
Con esta técnica se pudieron ver los cambios morfológicos que se produjeron en los macrófagos infectados con las variantes rugosas y ver claramente la disminución del número de macrófagos infectados con la cepa 44196R después de 24h pos infección (Figura D.36 F).

En la figura D.36 (D, E y F) se puede ver el aspecto general de los macrófagos después de 24 horas pos infección; se observó una reducción en el número de macrófagos en la muestra 44196R. En el caso de la los macrófagos infectados con la variante lisa su proliferación celular es muy similar a la del control (no infectado).

En la figura D.37 (A, B, D y E) se evidencia la agregación de los macrófagos alrededor de los agregados bacterianos, lo que se asemeja a la formación del granuloma en la enfermedad de la tuberculosis. En la figura D.37 (C y F) vemos al macrófago con la pared y la membrana rotas (signos claros de necrosis celular) debido a la multiplicación de la bacteria y el escape de las mismas al medio extracelular.



**Figura D.36.** Micrografías de los macrófagos infectados con las variantes formadoras y no formadoras de cuerdas de *M. abscessus*. (A y D) macrófagos no infectados, (B y E) macrófagos infectados con 44196S, (C y F) macrófagos infectados con 44196R. Las imágenes adquiridas tomadas después de 24 horas de infección.



**Figura D.37.** MEB imágenes de los macrófagos infectados con las variantes rugosas de *M. abscessus*. (A, B y C) 44196R y (D, E y F) 390R. Las imágenes fueron adquiridas después de 48 horas de infección. Las flechas negras indican los agregados bacterianos.

### D.13.3. Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Utilizando la microscopia electrónica de transmisión se puede ver al detalle la interacción macrófago-micobacteria.

Se pudo observar claramente en el caso de los macrófagos infectados con las cepas 390S y 44196S el bacilo aislado dentro de un fagosoma (Figura D.38), y en el caso de las cepas 390R, 44196R, BE37R y BE48R lo que se observó fueron varios bacilos formando agregados dentro de un mismo fagosoma (Figura D.39).

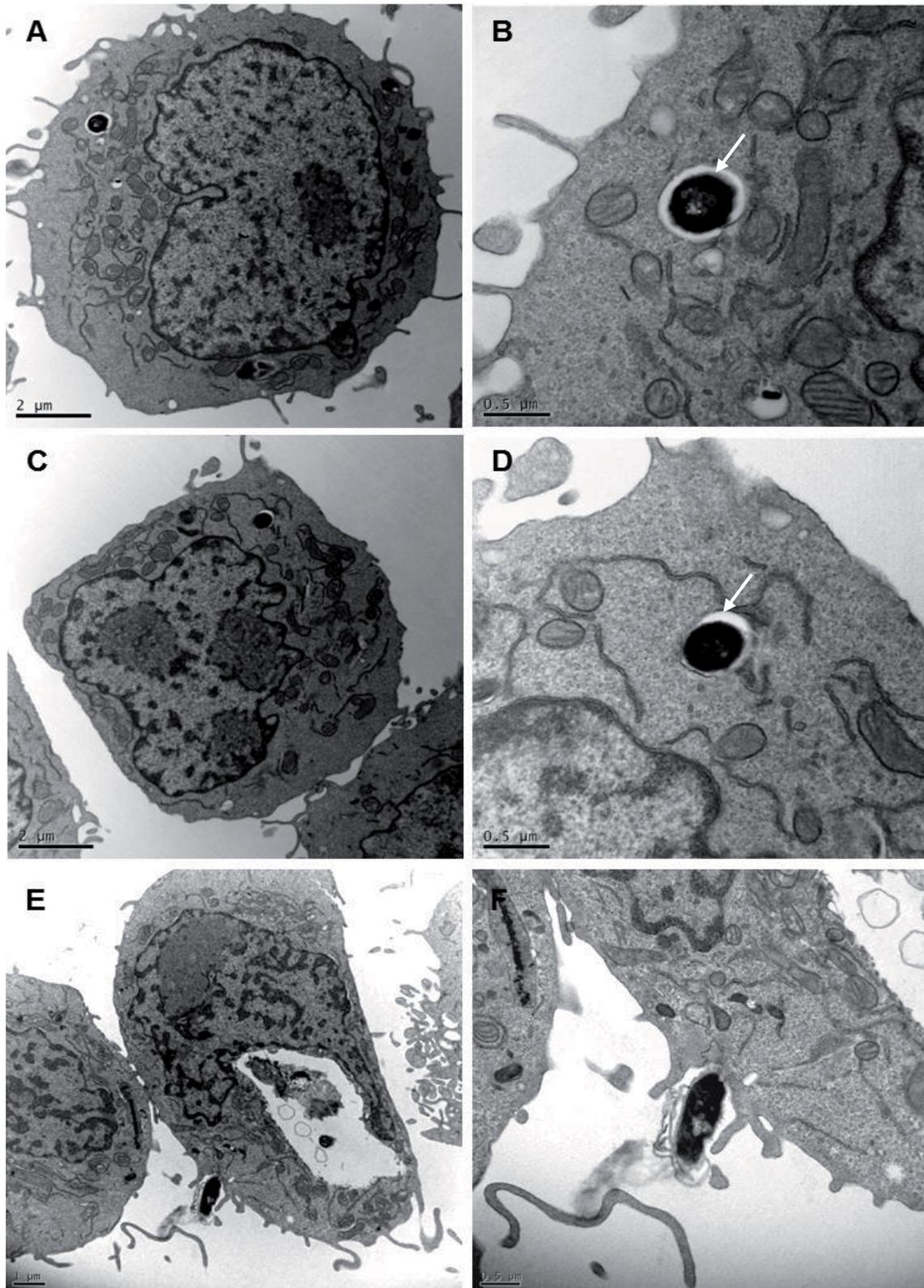
Otro resultado que se evidencia con esta técnica fue la necrosis celular. Los macrófagos infectados con las cepas rugosas, debido a la multiplicación de

las mismas en el interior del macrófago llevan a este a una necrosis celular, posibilitando la liberación de las bacterias al exterior (Figura D.38 A, B y F). Esto no se observó en los macrófagos infectados con las cepas lisas, que mantuvieron su estructura intacta, sin ninguna alteración en la membrana (Figura D.38).

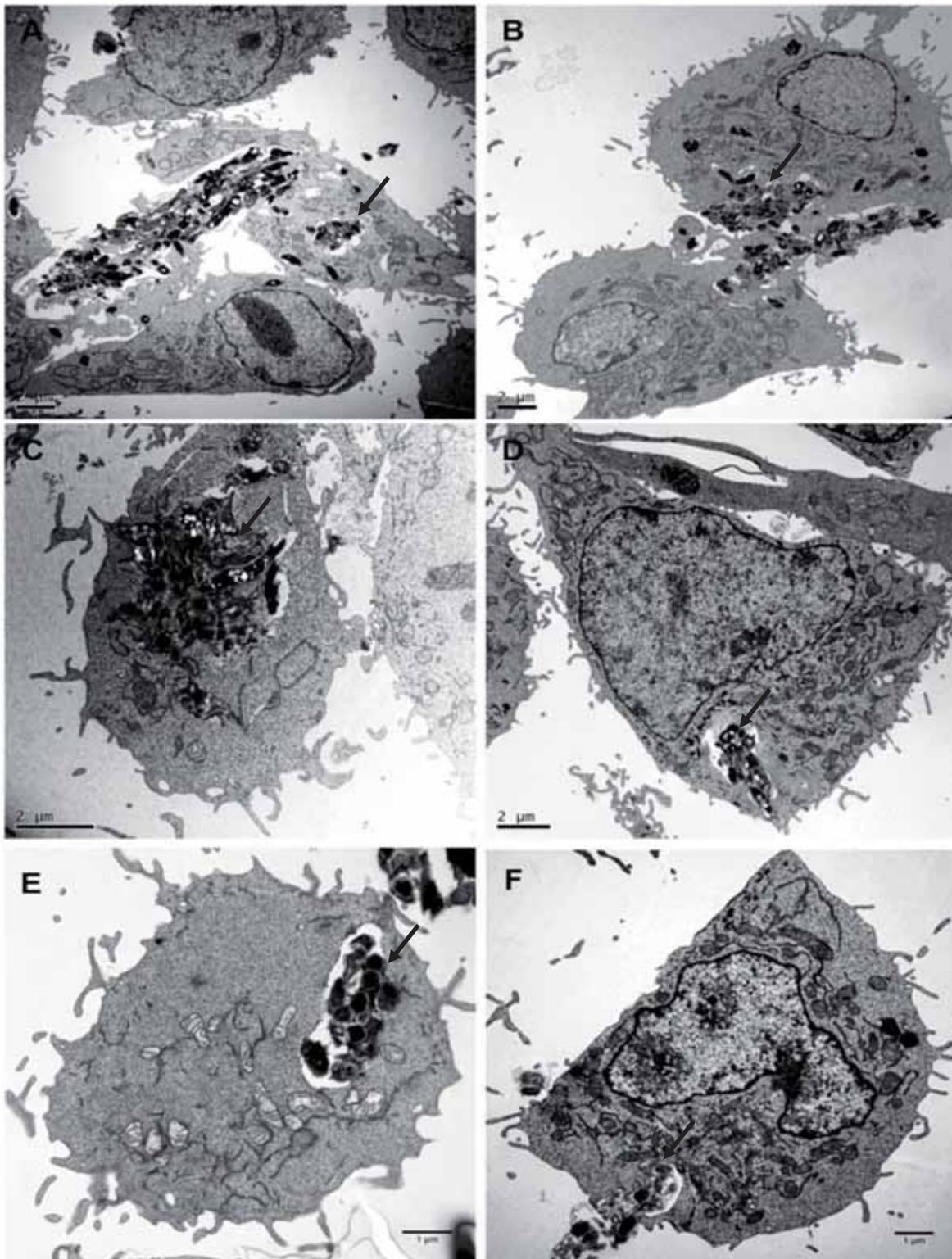
#### **D.13.3.1. Estudio de las bacterias en el interior de los macrófagos**

Mediante el uso de TEM se pudo distinguir la morfología de los bacilos dentro de los macrófagos infectados con la finalidad de observar la degradación o no de los mismos. Se clasificaron como intactos los bacilos que presentaban una morfología normal, sin alteraciones en la pared, y alterados los demás bacilos que presentaban alguna alteración. El porcentaje de bacilos intactos después de las 3 horas de infección fue muy similar para ambas cepas. Pasadas las 24 horas de infección se observó un incremento en el porcentaje de bacilos degradados de la cepa 44196S no formadora de cuerdas. En los bacilos de la cepa 44196R a las 24 horas después de la infección se mantuvo muy similar el número de macrófagos intactos (Figura D.40 E).

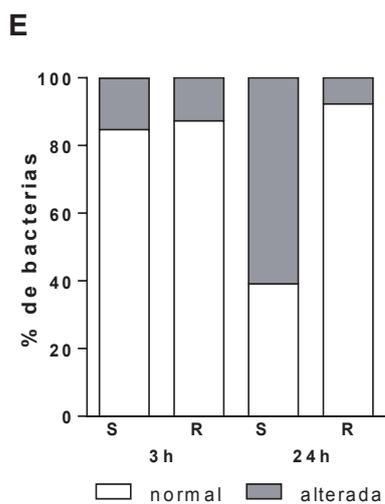
En la figura D.40 se pueden ver los cambios morfológicos de las bacterias en el interior de los macrófagos. En (A) se aprecia la desorganización del citoplasma de la bacteria de la cepa 390S y en (B) se ve claramente la degradación de la membrana plasmática y pared celular del bacilo de la cepa 44196S. También se indica en (C) los bacilos de la cepa 390S intactos. Y en (D) se observa la formación del septo, lo que indica que el bacilo de la cepa 44196R está en proceso de división celular.



**Figura D.38.** MET imágenes de los macrófagos infectados con diferentes cepas no formadoras de cuerdas de *M. abscessus*. (A y B) Macrófagos infectados con la cepa 390S después de 3 horas de infección. (C, D, E y F) Macrófagos infectados con la cepa 44196S después de 3 horas de infección. La flecha blanca indica el bacilo en el interior del fagosoma. En F se puede observar como el macrófago fagocita el bacilo.



**Figura D.39.** MET imágenes de los macrófagos infectados con diferentes cepas formadoras de cuerdas de *M. abscessus*. (A, C y E) Macrófagos infectados con la cepa 44196R. (B, D y F) Macrófagos infectados con la cepa 390R. Las flechas negras indican los agregados formados por las bacterias dentro de un fagosoma. En F se puede observar como el macrófago fagocita el agregado. En A, B y C se observan macrófagos después de 24 horas pos- infección. En D, E y F se observan macrófagos infectados después de 3 horas de infección.



**Figura D.40.** Cambios morfológicos de los bacilos en el interior de los macrófagos. (A) cepa 390S, se observa desorganización del citoplasma del bacilo (flecha blanca). (B) cepa 44196S muestra la degradación de la pared celular y membrana plasmática de los bacilos (flecha blanca). (C) cepa 390R, se observan los bacilos intactos. (D) cepa 44196R, indica formación de septo (flecha negra). Escala (A-C y G) 0,5  $\mu\text{m}$  y (H) 0,2  $\mu\text{m}$ . (E) Análisis cuantitativo del cambio morfológico de los bacilos. Se realizó el análisis después de 3 y 24 horas de infección. (S) promedio obtenido por la cepa 44196S. (R) promedio obtenido por la cepa 44196R.

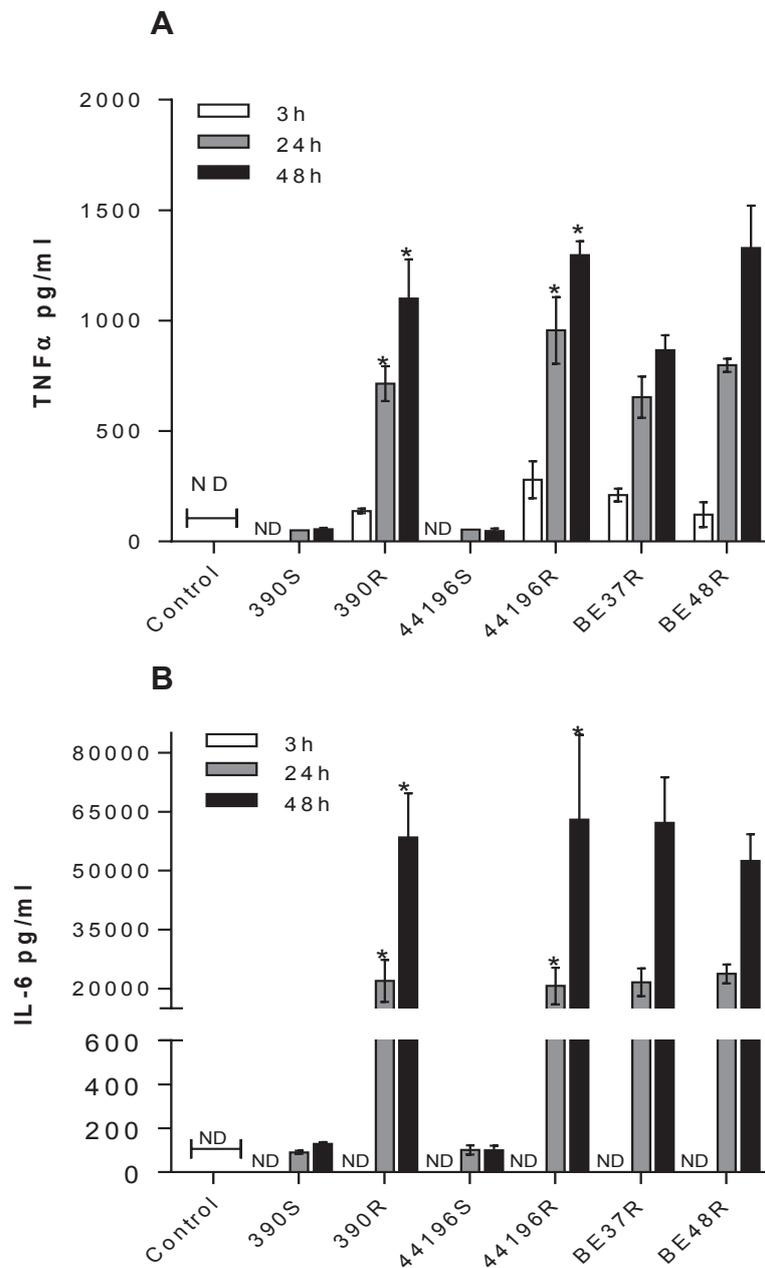
#### **D.14. Análisis de la inducción de citocinas por las diferentes cepas de *M. abscessus***

Se analizaron las citocinas TNF $\alpha$  y IL-6 debido su relación directa con la formación y mantenimiento del granuloma en la enfermedad infecciosa producida por *M. tuberculosis*.

Se pudo detectar una relación directa entre el aumento de la producción de citocinas y el tiempo de incubación de los macrófagos infectados con las cepas rugosas.

Todas las cepas de *M. abscessus* indujeron a la producción de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos a partir de las 3 horas pos infección. Se observó diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) cuando se compararon las variantes lisas con sus respectivas variantes rugosas. Las variantes rugosas produjeron niveles de TNF- $\alpha$  más elevados que las variantes lisas. Comparando las variantes lisas entre sí se percibió que estas inducían a cantidades muy similares de TNF- $\alpha$ , lo mismo ocurrió cuando se compararon las cepas rugosas entre sí (Figura D.41 A).

Las diferentes cepas de *M. abscessus* analizadas indujeron a la producción de IL-6 a partir de las 24 horas pos infección. Los resultados fueron muy similares a los de la producción de TNF- $\alpha$ , visto que las variantes lisas indujeron pequeñas cantidades de IL-6 comparándolas con las variantes rugosas (Figura D.41 B).



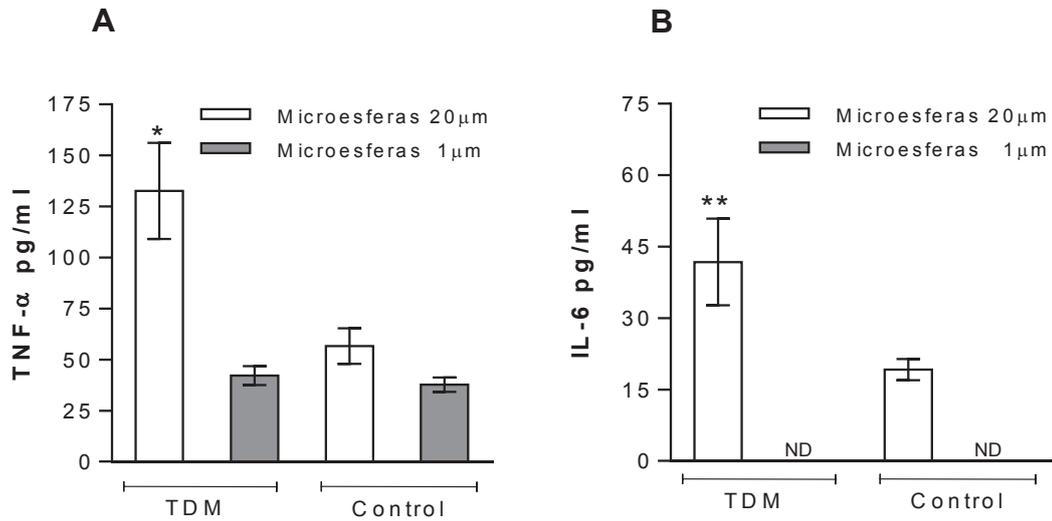
**Figura D.41.** Producción de TNF- $\alpha$  y IL-6 por los macrófagos estimulados con diferentes cepas de *M. abscessus*. La cinética en la producción de TNF- $\alpha$  (A) y IL-6 (B) fue analizada mediante ELISA. A las 3 horas pos infección el IL-6 no fue detectado. El experimento fue realizado por triplicado y el resultado se expresó por el promedio  $\pm$  SD. Los resultados son representativos de uno de tres experimentos independientes. \*  $P < 0,001$ , indica que hay diferencias significativas entre la cepa rugosa versus su variante lisa (Student's  $t$  test). ND no detectado.

### **D.15. Actividad biológica del TDM de *M. abscessus* para evaluar si el tamaño de los agregados bacterianos puede afectar la respuesta inmune de los macrófagos**

Para determinar la actividad biológica del TDM se incubaron los macrófagos con microesferas de diferentes tamaños recubiertas con TDM y se analizaron la capacidad de inducción de TNF- $\alpha$  y IL-6 mediante ELISA. Las microesferas de 20  $\mu\text{m}$  simularon los agregados de más de 5 bacilos y las microesferas de a 1,1  $\mu\text{m}$  simularon los bacilos aislados con la finalidad de evidenciar la importancia de la agregación de las micobacterias en el proceso infeccioso.

Ambas microesferas recubiertas y no recubiertas (control) con TDM indujeron a la producción de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos. Cuando se compararon las microesferas recubiertas con su respectivo control se observó una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) entre la microesfera de 20  $\mu\text{m}$  y su control sin recubrimiento. La microesfera de 1, 1  $\mu\text{m}$  no presentó diferencia significativa con respecto a su control (Figura D.42 A).

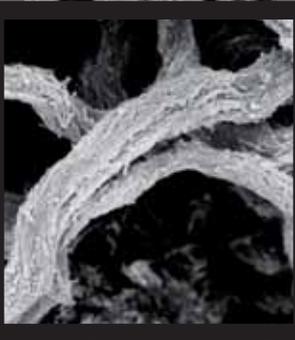
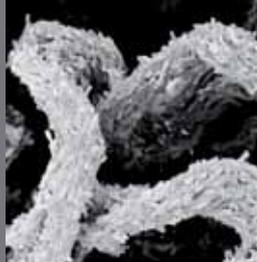
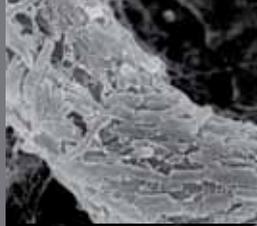
En el análisis de la inducción en la producción de IL-6, solamente las microesferas de 20  $\mu\text{m}$  indujeron a la producción de esta citocina por parte de los macrófagos. Cuando se comparó con su control se observó una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) respecto al control. (Figura D.42 B).



**Figura D.42.** Producción de TNF- $\alpha$  y IL-6 por parte de los macrófagos incubados con microesferas recubiertas con TDM 390R después de 48 horas de incubación. Las microesferas control no fueron recubiertas. El resultado se expresa por el promedio  $\pm$  SD de los triplicados del cultivo. Los resultados son representativos de uno de tres experimentos independientes. \* Indica diferencias significativas entre microesferas de 20  $\mu$ m recubiertas de TDM versus microesferas no recubiertas,  $P < 0,001$  (Student's  $t$  test). (ND) no detectado.

---

---



---

## E. DISCUSIÓN

---

---

El compuesto responsable de la formación de cuerdas en el género *Mycobacterium* es aún desconocido. Estudios realizados con mutantes alterados genéticamente han demostrado una relación directa entre los ácidos micólicos y la formación de cuerdas. La necesidad de la presencia del anillo de *cis* ciclopropano en la posición proximal del ácido  $\alpha$ -micólico sería la clave para la formación de dichas cuerdas en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Glickman *et al.*, 2000).

En la descripción de *M. brumae* y *M. fallax* se definieron estas dos especies como formadoras de cuerdas, sin embargo ambas especies no presentaban anillos de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico (Levy-Frebault *et al.*, 1983; Luquin *et al.*, 1993; Rafidinarivo *et al.*, 1985). Debido a la discrepancia de estos datos se decidió reinvestigar si *M. brumae* y *M. fallax* formaban verdaderas cuerdas microscópicas y corroborar la ausencia de los anillos de ciclopropano en los ácidos micólicos. Se comprobó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) que ambas especies no presentan anillos de ciclopropano en sus ácidos micólicos (figura D.17). Por lo tanto, se concluyó que en el caso de *M. brumae* y *M. fallax* no es necesaria la presencia de anillos de ciclopropano en la posición proximal del ácido micólico para la formación de cuerdas.

Según los resultados obtenidos en este estudio se demostró mediante el uso de la microscopia electrónica de barrido que *M. brumae*, *M. fallax* (Figuras D.5, D.6) forman cuerdas verdaderas. Esta técnica se confirma como la más adecuada para el estudio de la formación de cuerdas, puesto que se puede observar claramente el alineamiento de los bacilos de forma ordenada formando una estructura que se asemeja a una cuerda.

En el estudio realizado con las diferentes cepas de *M. abscessus*, solamente las variantes 390S y 44196S no son capaces de formar cuerdas (Figura D.9). Los aislados respiratorios de *M. abscessus* BE37R and BE48R y las variantes 390R y 44196R son capaces de formar cuerdas verdaderas (Figura D.10 - D.13). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la formación de cuerdas es un factor de virulencia importante en *M. abscessus* y que está presente en cepas que presentan morfología colonial rugosa (Figura D.2), una

característica fenotípica que está relacionada directamente con la virulencia de estas cepas (Byrd & Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2006).

La estructura química de los ácidos micólicos de *M. abscessus* era aún desconocida, por lo que se investigó la presencia de anillos de ciclopropano en los ácidos micólicos de las variantes 390S y 44196S (no formadora de cuerdas), y las variantes 390R y 44196R (formadora de cuerdas). Ambas variantes, formadoras y no formadoras de cuerdas presentaban las mismas cantidades de *cis* dobles enlaces, y presentaban anillos de ciclopropano en cantidades traza (Figura D.18). Lo que nos posibilita afirmar que los ácidos micólicos de las variantes formadoras y no formadoras de cuerdas tienen la misma estructura química, concluyendo así que en *M. abscessus* la formación de cuerdas no está relacionada con la presencia de anillos de ciclopropano en el ácido  $\alpha$ -micólico.

Otra característica fenotípica importante relacionada con la morfología colonial en *M. abscessus* es la presencia de GPL (Howard *et al.*, 2006). Las variantes 390R, 44196R y las cepas de aislados respiratorias BE37R y BE48R no presentaban GPL y tenían una morfología colonial rugosa (Figura D.2 y D.16), mientras que las variantes 390S lisas y 44196S presentaban una morfología colonial lisa (Figura D.2) y un alto contenido de GPL (Figura D.16).

La pared celular de las micobacterias está constituida por ácidos grasos de cadena larga muy hidrófobos denominados ácidos micólicos (Marrakchi *et al.*, 2014), con lo que sería lógico deducir que los GPL, que son moléculas anfifílicas con una parte hidrófoba (insoluble en agua) y otra parte hidrófila (soluble en agua), actuarían como detergente disgregando los bacilos de las variantes con morfología colonial lisa de *M. abscessus*, ya que son sustancias como jabones y detergentes que se utilizan para dispersar sustancias hidrófobas en agua y evitar la formación de grumos de partículas hidrófobas en agua (Rosen & Kunjappu, 2012). Por otra parte, la ausencia de GPL en las variantes con morfología colonial rugosa podría ser responsable de la unión y agregación de estos bacilos, manteniéndolos unidos formando grupos hidrófobos que posteriormente darían lugar a las cuerdas. Es probable que la ausencia de GPL impidiera la disgregación total de los bacilos lo que imposibilitó conseguir una suspensión

bacteriana homogénea con bacilos aislados para infectar a los macrófagos con las variantes rugosas de *M. abscessus* (Figura D.26).

Una de las diferencias claves entre las variantes de *M. abscessus*, sin embargo, fue el alto grado de citotoxicidad celular observado en las variantes rugosas, formadoras de cuerdas. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron por primera vez que las variantes rugosas eran altamente tóxicas para los macrófagos, y que el 100% de los macrófagos infectados con las cepas rugosas 390R, 44196R, BE37R y BE48R fueron destruidos después de 72 horas pos infección mientras que los macrófagos infectados con las variantes lisas, no formadora de cuerdas, proliferaron como los macrófagos control (no infectados) (Figura D.29 y D.30). Estos resultados concordan con la hipervirulencia reportada en estudios anteriores con las cepas 390R y 44196R en modelos animales en contraste con la incapacidad de sus variantes lisas 390S y 44196S para producir enfermedad (Bernut *et al.*, 2014; Byrd & Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2006). Además se pudo corroborar la misma relación de virulencia en las cepas BE37R y BE48R de los aislados respiratorios, que se comportaron de la misma manera que las demás cepas rugosas 390R y 44196R.

Para medir la citotoxicidad de las diferentes cepas de *M. abscessus* se utilizaron diferentes métodos que permitieron evaluar de diferentes maneras la viabilidad de los macrófagos mediante su proliferación celular. El método del azul tripano es una técnica sencilla y barata que nos permitió cuantificar el número de macrófagos viables por pozo (Strober, 2001). Uno de los problemas de esta técnica es sobrestimar la cantidad real de macrófagos viables, puesto que se coge una pequeña cantidad de la muestra para la cuantificación y luego se aplica la fórmula para el cálculo. Contando un número muy reducido de células al aplicar la fórmula puede que el resultado sea demasiado alto si visualmente no se observó bajo microscopio tal cantidad de células. El propio fabricante asume errores de hasta 20% a 30 %, pero sigue siendo un método bastante fiable y utilizado rutinariamente en los laboratorios. Por otro lado, si de lo que se trata es de comparar la viabilidad de los macrófagos a lo largo del tiempo el resultado es muy fiable, siendo visiblemente claro el aumento o disminución en el número de células.

Otro procedimiento utilizado fue la utilización del CLSM. Una técnica fácil pero que tiene un alto coste, puesto que se necesita de la utilización de un microscopio confocal láser de barrido. Posteriormente a la captación de las imágenes se puede calcular fácilmente el número de macrófagos viables utilizando un software libre (ImageJ) que posibilita el recuento automático de los macrófagos. El resultado se expresó en promedio de macrófagos viables por campo, ya que los macrófagos inviables se desenganchan del fondo del pocillo, lo que imposibilita su recuento. Esta técnica posibilita visualizar claramente los efectos citotóxicos de los diferentes tratamientos utilizados en las células, siempre que se compare con el respectivo control, sin tratar (sin infectar).

El ensayo de adhesión y proliferación celular con el cristal violeta es un procedimiento sencillo, rápido, de bajo coste, muy utilizado para tinción biológica general (Gillies *et al.*, 1986). Una vez teñidas las células se procede a la observación por microscopia óptica y posteriormente se disuelve el color para determinar la absorbancia de cada pozo, siempre comparando con el pozo control, no tratado. Una de las dificultades que puede tener esta técnica es cuando se trabaja con bacterias infectando a células eucarióticas, ya que las bacterias también se tiñen y pueden llevar a un falso resultado. Es una técnica muy recomendada para ensayos con fármacos, diferentes compuestos químicos y materiales.

Las diferentes técnicas de microscopia electrónica de barrido y de transmisión revelaron daños importantes en los macrófagos, en consonancia con la necrosis celular, lo que sugiere que la alta tasa de crecimiento intracelular de los bacilos de las variantes rugosas dentro de los macrófagos infectados indujo a este a la muerte por necrosis (Figuras D.37 y D.39).

Además de la destrucción de los macrófagos, la formación de granulomas y la producción de citocinas son las primeras señales de la activación de la respuesta inmune inflamatoria producida contra la infección por tuberculosis (Philips & Ernst, 2012; Russell *et al.*, 2009; Welsh *et al.*, 2008). Se pudo observar que las variantes rugosas inducen a la agregación de los macrófagos formando estructuras similares a los granulomas (Figuras D.34, D.35 y D.37), y esta

agregación no fue observada en los macrófagos infectados con las variantes lisas. También se investigó la inducción en la producción de citocinas por parte de los macrófagos infectados con las diferentes variantes. Las variantes con morfología colonial rugosa producen niveles altos de TNF- $\alpha$  y IL-6 (Figura D.41), y los macrófagos infectados con las cepas lisas producen cantidades mínimas de ambas citocinas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Catherinot, donde se vio que los macrófagos derivados de medula ósea murina infectados con las variantes rugosas producían altos niveles de TNF- $\alpha$  en comparación con las variantes lisas (Catherinot *et al.*, 2007). Estos resultados estarían en concordancia con los estudios que relacionan estas dos citocinas con la formación (TNF- $\alpha$ ) y el mantenimiento del granuloma (IL-6) (Philips & Ernst, 2012; Welsh *et al.*, 2008).

Con la finalidad de verificar si el tamaño de los agregados bacterianos puede afectar la respuesta inmune de los macrófagos se recubrieron microesferas de diferentes tamaños 20  $\mu\text{m}$  (simulando bacterias agregadas) y de 1,1  $\mu\text{m}$  (simulando bacilos aislados) con TDM extraído de *M. abscessus* y se pusieron en contacto con los macrófagos durante 48 horas. El TDM está asociado a importantes eventos en la enfermedad de tuberculosis como es la formación del granuloma y también induce a la producción de diferentes citocinas, como TNF- $\alpha$  y IL-6 (Indrigo *et al.*, 2003; Philips & Ernst, 2012; Welsh *et al.*, 2008). Se pudo confirmar la producción de cantidades significativas de TNF- $\alpha$  y IL-6 por parte de los macrófagos que estaban en contacto con las microesferas de 20  $\mu\text{m}$  recubiertas de TDM que simulaban a los grandes agregados bacterianos (Figura D. 42). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el tamaño del área de interacción de los factores de virulencia con el macrófago podría ser importante en el inicio de la infección.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio y los diferentes resultados reportados relacionando las variantes rugosas *M. abscessus* con la virulencia (Rhoades *et al.*, 2009) es factible pensar que el GPL en la porción más externa de la pared celular de *M. abscessus* enmascara los lípidos subyacentes que son los responsables de estimular la respuesta inmune innata. Cuando hay

una pérdida del GPL, la virulencia se incrementa gracias a la interacción de estos lípidos con el macrófago.

Por otra parte se demostró que las variantes rugosas forman agregados y estos no pueden ser completamente disgregados utilizando las técnicas recomendadas. Eso permitió observar que los macrófagos son capaces de fagocitar los agregados con más de 5 bacilos. Por lo que sería lógico deducir que al fagocitar agregados aumenta el número de factores de virulencia interactuando con el macrófago. Eso se pudo comprobar por CLSM y MET donde se pudo observar los grandes agregados dentro del macrófago, con un gran número de bacilos dentro de un mismo fagosoma. Lo que nos hace pensar que el aumento de la virulencia de las variantes rugosa con respecto a las variantes lisas puede ser debido a una suma de factores, como por ejemplo; la exposición de los factores de virulencia que están en la superficie de la pared de la micobacteria, que en las variantes lisas son recubiertos por el GPL, y la exposición de estos factores en gran cantidad y a través de una superficie extensa debido a la formación de los agregados.

Los GPLs, son sintetizados por varias NTM como por ejemplo: *Mycobacterium avium Complex* (MAC), *M. smegmatis*, entre otras. Y la presencia o ausencia de GPLs está relacionada con varios cambios fenotípicos, incluyendo morfología colonial, la agregación, la motilidad (Pang *et al.*, 2013).

En *M. avium* y *M. smegmatis* se correlacionó la capacidad de extenderse sobre la superficie de un medio sólido por deslizamiento (motilidad) con la presencia de glicopeptidolípido en la pared celular (Martínez *et al.*, 1999). En *M. abscessus* se observó la misma capacidad de deslizamiento con la variante lisa que era capaz de sintetizar GPL, mientras que la variante rugosa GPL deficiente no poseía esta capacidad (Howard *et al.*, 2006). En el estudio realizado con las diferentes variantes de *M. abscessus* se encontró que solamente las variantes lisas (productoras de GPL) (Figura D.22 C y E) presentaban motilidad. En el caso de las variantes rugosas (GPL deficientes) estas no presentaban motilidad (Figura D.24 D, F, G, H). Lo que confirma que solamente las variantes que son capaces de sintetizar GPL presentan motilidad.

En este estudio también se investigó si había diferencia en la resistencia a los antibióticos entre las variantes lisa y rugosa de la cepa 44196 de *M. abscessus*. En el caso de *M. smegmatis*, la ausencia de GPLs aumenta la absorción de quenodesoxicolato (Etienne *et al.*, 2002), pero en otro estudio se observó que la cepa deficiente en GPL presentaba la misma susceptibilidad a la rifampicina, estreptomicona, isoniacida y capreomicina que la cepa productora de GPL (Pang *et al.*, 2013).

En el caso de *M. abscessus* la MIC encontrada para la gentamicina (32 µg/ml) ha sido igual que la MIC reportada en estudios anteriores con aislados clínicos (Shen *et al.*, 2007), no encontrando así diferencia entre la variante lisa (que sintetiza grandes cantidades de GPL) y la variante rugosa (que sintetiza muy poca cantidad de GPL).

Dos antibióticos muy utilizados para el tratamiento de *M. abscessus* son la amikacina y la ceftoxitina, ambas variantes, lisas y rugosas presentaron la misma MIC y son sensibles a estos antibióticos. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Rüger y colaboradores (Rüger *et al.*, 2014).

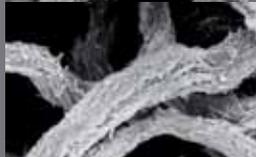
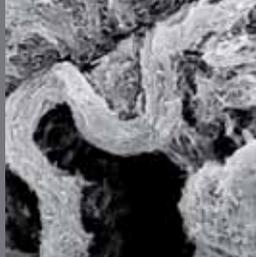
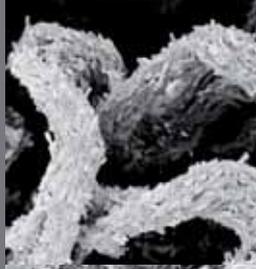
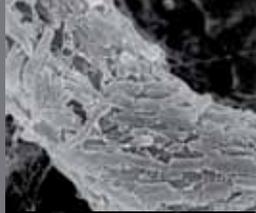
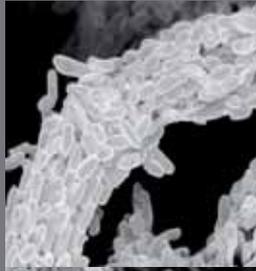
Las diferencias encontradas con respecto a la sensibilidad a ceftoxitina para las dos variantes ha sido que la MIC de la variante lisa fue de 64 µg/ml mientras que la variante rugosa presentó una MIC de 128 µg/ml. En el estudio de Rüger y colaboradores no hubo variación en la MIC de ambas variantes.

En el caso de la MIC de las variantes lisa y rugosa para la tigeciclina, la variante lisa obtuvo una MIC de 2 µg/ml y la variante rugosa una MIC de 1 µg/ml. Siendo la MIC de la variante rugosa más alta que la reportada en estudios anteriores que era de 0,25 µg/ml (Rüger *et al.*, 2014).

En vista de estos resultados es difícil afirmar que la presencia de GPL tenga un papel relevante en la resistencia a los antibióticos en *M. abscessus*.

Cuando se investigó la resistencia a la desecación de las diferentes variantes de *M. abscessus*, se observó que las variantes rugosas eran más resistentes a la desecación que las variantes lisas, pero es difícil afirmar que sea

debido a la diferencia en la composición de la pared de estas variantes o al hecho de que las variantes rugosas formen agregados y eso las mantenga más protegidas de los efectos diversos de las condiciones de cultivo, como la temperatura y la falta de humedad.



---

## F. CONCLUSIONES

---

---

1. No se detectaron ciclopropanos en los ácidos  $\alpha$ -micólicos de *M. brumae*, *M. fallax* y ambas cepas formaron cuerdas.
2. Las diferentes cepas de *M. abscessus*, 390R, 44196R, BE37R y BE48R presentaban morfología colonial rugosa y formaron cuerdas.
3. Las cepas de *M. abscessus* 390S y 44196S presentaban morfología colonial lisa y no formaron cuerdas.
4. Se reveló por primera vez que en la composición de los ácidos micólicos de *M. abscessus* no hay ciclopropanos, solamente dobles enlaces.
5. No se encontraron diferencias entre la estructura del ácido micólico de las diferentes variantes de *M. abscessus*.
6. Solamente las variantes con morfología colonial lisa de *M. abscessus* presentaban GPL.
7. En la suspensión bacteriana de *M. abscessus*, las variantes rugosas formaban agregados de más de 5 bacilos, y las variantes lisas mantenían 90% de los bacilos aislados. Los agregados de las variantes rugosas fueron fagocitados por el macrófago y se localizaban varios bacilos dentro de un mismo fagosoma. Los bacilos de las variantes lisas se encontraban aislados en distintos fagosomas.
8. Las variantes rugosas de *M. abscessus* eran más virulentas que las variantes lisas, siendo estas capaces de matar a los macrófagos infectados.
9. Mediante la utilización de diferentes técnicas de microscopia se observó claramente la interacción macrófago murino-micobacteria y se constató la destrucción del macrófago infectado por las variantes rugosas de *M. abscessus*.

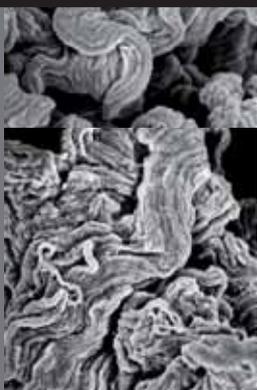
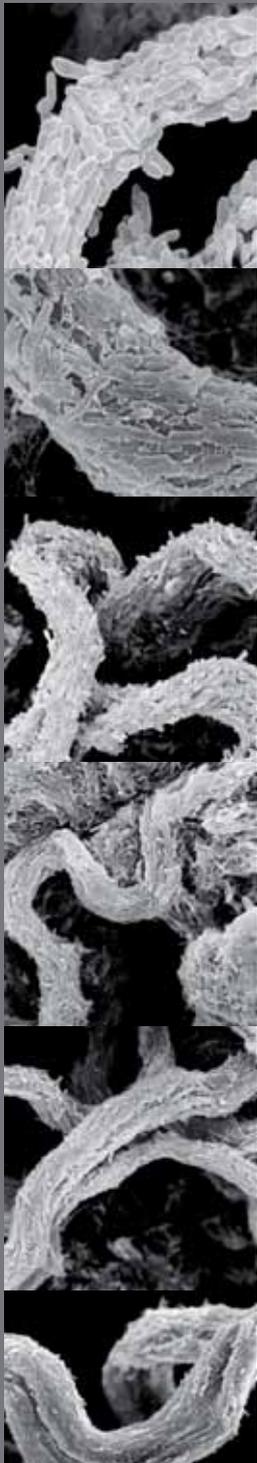
10. Solamente las variantes rugosas inducían a la formación del "granuloma".

11. Las variantes rugosas de *M. abscessus* fueron capaces de inducir la producción de altos niveles de citocinas como TNF- $\alpha$  y IL-6 por parte del macrófago infectado. Las variantes lisas no inducían a una producción significativa de estas citocinas.

12. Solamente las microesferas de 20  $\mu$ m recubiertas de TDM fueron capaces de inducir la producción de niveles significativos de TNF- $\alpha$  y IL-6 por parte del macrófago.

13. Solamente las variantes con morfología colonial lisa de *M. abscessus* presentaban motilidad.

14. No se observaron diferencias concluyentes en cuanto a la resistencia a la desecación, la sensibilidad a antibióticos o el crecimiento bacteriano en las diferentes variantes de *M. abscessus*.



---

## G. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

Agustí, G., Astola, O., Rodríguez-Güell, E., Julián, E., Luquin, M., 2008. Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies. *J. Bacteriol.* 190, 6894–902. doi:10.1128/JB.00572-08

Aínsa, J.A., Blokpoel, M.C., Otal, I., Young, D.B., De Smet, K.A., Martín, C., 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 180, 5836–43.

Alderwick, L.J., Birch, H.L., Mishra, A.K., Eggeling, L., Besra, G.S., 2007. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1325–8. doi:10.1042/BST0351325

Aranda, J., Bardina, C., Beceiro, A., Rumbo, S., Cabral, M.P., Barbé, J., Bou, G., 2011. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J. Bacteriol.* 193, 3740–7. doi:10.1128/JB.00389-11

Asselineau, J., Lanéelle, G., 1998. Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front. Biosci.* 3, e164–74.

Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F.-K., Chalut, C., Lopez, A., Guilhot, C., 2009. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog.* 5, e1000289. doi:10.1371/journal.ppat.1000289

Baer, H.H., 1993. The structure of an antigenic glycolipid (SL-IV) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Carbohydr. Res.* 240, 1–22.

- Behling, C.A., Bennett, B., Takayama, K., Hunter, R.L., 1993. Development of a trehalose 6,6'-dimycolate model which explains cord formation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 61, 2296–303.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284, 1520–3.
- Belisle, J.T., Brennan, P.J., 1989. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 171, 3465–70.
- Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., Kremer, L., 2014. *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E943–52. doi:10.1073/pnas.1321390111
- Besra, G.S., Morehouse, C.B., Rittner, C.M., Waechter, C.J., Brennan, P.J., 1997. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 272, 18460–6.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.-C.E., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A., 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552–554. doi:10.1038/316552a0
- Bhatnagar, S., Schorey, J.S., 2006. Elevated mitogen-activated protein kinase signalling and increased macrophage activation in cells infected with a glycopeptidolipid-deficient *Mycobacterium avium*. *Cell. Microbiol.* 8, 85–96. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00602.x
- Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurcha, S.S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S.A., Kobayashi, K., Besra, G.S., Jacobs, W.R., 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5157–62. doi:10.1073/pnas.0608654104

Bloch, H., Sorkin, E., Erlenmyer, H., 1953. A toxic lipid component of the tubercle bacillus (cord factor). I. Isolation from petroleum ether extracts of young bacterial cultures. *Am. Rev. Tuberc.* 67, 629–43.

Brambilla, C., Sanchez-Chardi, A., Perez-Trujillo, M., Julian, E., Luquin, M., 2012. Cyclopropanation of  $\alpha$ -mycolic acids is not required for cording in *Mycobacterium brumae* and *Mycobacterium fallax*. *Microbiology*. doi:10.1099/mic.0.057919-0

Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333

Brown-Elliott, B.A., Nash, K.A., Wallace, R.J., 2012. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 545–82. doi:10.1128/CMR.05030-11

Byrd, T.F., Lyons, C.R., 1999. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect. Immun.* 67, 4700–4707.

Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffe, M., Guilhot, C., 2001. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J. Biol. Chem.* 276, 19845–54. doi:10.1074/jbc.M100662200

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3666–70.

Catherinot, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J.F., Daffé, M., Perronne, C., Soudais, C., Gaillard, J.L., Rottman, M., 2007. Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect. Immun.* 75, 1055–1058. doi:10.1128/IAI.00835-06

Catherinot, E., Roux, A.L., Macheras, E., Hubert, D., Matmar, M., Dannhoffer, L., Chinet, T., Morand, P., Poyart, C., Heym, B., Rottman, M., Gaillard, J.L.,

- Herrmann, J.L., 2009. Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 271–274. doi:10.1128/JCM.01478-08
- Chan, J., Fan, X.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J., Bloom, B.R., 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 59, 1755–61.
- Chen, M., Gan, H., Remold, H.G., 2006. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J. Immunol.* 176, 3707–3716. doi:10.4049/jimmunol.176.6.3707
- Clement, C.G., Loeffelholz, M.J., Eltorky, M.A., Tang, Y.-W., Williams-Bouyer, N., 2011. *Mycobacterium haemophilum* and *Histoplasma capsulatum* coinfection in a renal transplant patient. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3425–8. doi:10.1128/JCM.00521-11
- Collins, F.M., Cunningham, D.S., 1981. Systemic *Mycobacterium kansasii* infection and regulation of the alloantigenic response. *Infect. Immun.* 32, 614–24.
- Court, N., Rose, S., Bourigault, M.-L., Front, S., Martin, O.R., Dowling, J.K., Kenny, E.F., O'Neill, L., Erard, F., Quesniaux, V.F.J., 2011. Mycobacterial PIMs inhibit host inflammatory responses through CD14-dependent and CD14-independent mechanisms. *PLoS One* 6, e24631. doi:10.1371/journal.pone.0024631
- Crick, D.C., Brennan, P.J., 2008. Biosynthesis of the Arabinogalactan-Peptidoglycan Complex, in: Daffé, M., Reytrat, J. (Eds.), *The Mycobacterial Cell Envelope*. ASM Press, Washington, DC, pp. 25–40.
- Cullen, A.R., Cannon, C.L., Mark, E.J., Colin, A.A., 2000. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 641–5. doi:10.1164/ajrccm.161.2.9903062
- Daffé, M., Draper, P., 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203.

Daffé, M., Lanéelle, M.A., Asselineau, C., Lévy-Frébault, V., David, H., 1983. Taxonomic value of mycobacterial fatty acids: proposal for a method of analysis. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 134B, 241–56.

Daffé, M., Lanéelle, M.A., Lacave, C., 1991. Structure and stereochemistry of mycolic acids of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *Res. Microbiol.* 142, 397–403.

Dhariwal, K.R., Yang, Y.M., Fales, H.M., Goren, M.B., 1987. Detection of trehalose monomycolate in *Mycobacterium leprae* grown in armadillo tissues. *J. Gen. Microbiol.* 133, 201–9.

Dong, D., Wang, D., Li, M., Wang, H., Yu, J., Wang, C., Liu, J., Gao, Q., 2012. PPE38 modulates the innate immune response and is required for *Mycobacterium marinum* virulence. *Infect. Immun.* 80, 43–54. doi:10.1128/IAI.05249-11

Doucet-Populaire, F., Buriánková, K., Weiser, J., Pernodet, J.-L., 2002. Natural and acquired macrolide resistance in mycobacteria. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 2, 355–70.

Draper, P., 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.* 3, D1253–61.

Etienne, G., Villeneuve, C., Billman-Jacobe, H., Astarie-Dequeker, C., Dupont, M.-A., Daffé, M., 2002. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 148, 3089–100.

Fujita, Y., Naka, T., McNeil, M.R., Yano, I., 2005. Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology* 151, 3403–16. doi:10.1099/mic.0.28158-0

Gao, L.Y., Laval, F., Lawson, E.H., Groger, R.K., Woodruff, A., Morisaki, J.H., Cox, J.S., Daffe, M., Brown, E.J., 2003. Requirement for kasB in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival:

Implications for therapy. *Mol. Microbiol.* 49, 1547–1563. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03667.x

Gao, Q., Kripke, K., Arinc, Z., Voskuil, M., Small, P., 2004. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 84, 188–96. doi:10.1016/j.tube.2003.12.013

García-Martos, P., García-Agudo, L., 2012. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 30, 192–200. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.017

Gillies, R.J., Didier, N., Denton, M., 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal. Biochem.* 159, 109–13.

Glickman, M.S., 2008. Cording, cord factors, and trehalose dimycolate, in: Daffé, M and Reyrat, J. (Ed.), *The Mycobacterial Cell Envelope*. pp. 63–73.

Glickman, M.S., Cox, J.S., Jacobs, W.R., 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* 5, 717–727. doi:10.1016/S1097-2765(00)80250-6

Goren, M.B., 1970. Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv I. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 210, 116–126. doi:10.1016/0005-2760(70)90067-6

Goren, M.B., Brokl, O., Schaefer, W.B., 1974. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: phthiocerol dimycozerosate and the attenuation indicator lipid. *Infect. Immun.* 9, 150–8.

Greendyke, R., Byrd, T.F., 2008. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2019–2026. doi:10.1128/AAC.00986-07

Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S.M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademaro, M.F., Iseman, M., Olivier, K.,

Ruoss, S., von Reyn, C.F., Wallace, R.J., Winthrop, K., 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 367–416. doi:10.1164/rccm.200604-571ST

Hamasaki, N., Isowa, K., Kamada, K., Terano, Y., Matsumoto, T., Arakawa, T., Kobayashi, K., Yano, I., 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6, 6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.* 68, 3704–9.

Hartmans, S., Bont, J.A.M. de, Stackebrandt, E., 2006. The genus *Mycobacterium* - Nonmedical, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 889–918. doi:10.1007/0-387-30743-5

Hoefsloot, W., van Ingen, J., Peters, E.J.G., Magis-Escurra, C., Dekhuijzen, P.N.R., Boeree, M.J., van Soolingen, D., 2013. *Mycobacterium genavense* in the Netherlands: an opportunistic pathogen in HIV and non-HIV immunocompromised patients. An observational study in 14 cases. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 432–7. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03817.x

Howard, S.T., 2013. Recent progress towards understanding genetic variation in the *Mycobacterium abscessus* complex. *Tuberculosis (Edinb)*. 93 Suppl, S15–20. doi:10.1016/S1472-9792(13)70005-2

Howard, S.T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., Lyons, C.R., Byrd, T.F., 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* 152, 1581–1590. doi:10.1099/mic.0.28625-0

Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M., Marks, C.B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R.G., Derrick, S.C., Collins, F.M., Morris, S.L., King, C.H., Jacobs, W.R., 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic

function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 12420–5. doi:10.1073/pnas.1635213100

<http://www.bacterio.net/index.html>, 2015. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus. *Mycobacterium*.

Hunter, R.L., Olsen, M.R., Jagannath, C., Actor, J.K., 2006. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. Ann. Clin. Lab. Sci. 36, 371–86.

Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K., 2003. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. Microbiology. doi:10.1099/mic.0.26226-0

Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K., 2002. Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. Microbiology 148, 1991–1998.

Jarlier, V., Nikaido, H., 1990. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. J. Bacteriol. 172, 1418–1423.

Jönsson, B.E., Gilljam, M., Lindblad, A., Ridell, M., Wold, A.E., Welinder-Ölsson, C., 2007. Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 45, 1497–1504. doi:10.1128/JCM.02592-06

Jordao, L., Bleck, C.K.E., Mayorga, L., Griffiths, G., Anes, E., 2008. On the killing of mycobacteria by macrophages. Cell. Microbiol. 10, 529–48. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01067.x

Julián, E., Roldán, M., Sánchez-Chardi, A., Astola, O., Agustí, G., Luquin, M., 2010. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. J. Bacteriol. 192, 1751–60. doi:10.1128/JB.01485-09

Kansal, R.G., Gomez-Flores, R., Mehta, R.T., 1998. Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the *Mycobacterium avium* complex. *Microb. Pathog.* 25, 203–14. doi:10.1006/mpat.1998.0227

Koch, R., 1982. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev. Infect. Dis.* 4, 1270–4.

Kotilainen, H., Valtonen, V., Tukiainen, P., Poussa, T., Eskola, J., Järvinen, A., 2015. Clinical findings in relation to mortality in non-tuberculous mycobacterial infections: patients with *Mycobacterium avium* complex have better survival than patients with other mycobacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 1909–18. doi:10.1007/s10096-015-2432-8

Kusunoki, S., Ezaki, T., 1992. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae subsp. abscessus* (Kubica *et al.*) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 240–5.

Lee, S.H., Min, J.-W., Um, S.-W., Han, S.-S., Han, S.K., Shim, Y.-S., Yim, J.-J., 2010. Sequential bilateral lung resection in a patient with *Mycobacterium abscessus* lung disease refractory to medical treatment. *Yonsei Med. J.* 51, 141–4. doi:10.3349/ymj.2010.51.1.141

Lévy-Frédault, V. V, Portaels, F., 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 315–23.

Levy-Frebault, V., Rafidinarivo, E., Prome, J.-C., Grandry, J., Boisvert, H., David, H.L., 1983. *Mycobacterium fallax* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* doi:10.1099/00207713-33-2-336

Liu, J., Barry, C.E., Besra, G.S., Nikaido, H., 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* 271, 29545–51.

Lohmann-Matthes, M.L., Steinmüller, C., Franke-Ullmann, G., 1994. Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* 7, 1678–89.

Luquin, M., Ausina, V., Vincent-Levy-Frebault, V., Laneelle, M.A., Belda, F., Garcia-Barcelo, M., Prats, G., Daffe, M., 1993. *Mycobacterium brumae* sp. nov., a Rapidly Growing, Nonphotochromogenic *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* doi:10.1099/00207713-43-3-405

Makinoshima, H., Glickman, M.S., 2005. Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* 436, 406–9. doi:10.1038/nature03713

Männel, D.N., Echtenacher, B., 2000. TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol.* 74, 141–61.

Marrakchi, H., Bardou, F., Lanéelle, M.-A., Daffé, M., 2008. A Comprehensive Overview of Mycolic Acid Structure and Biosynthesis, in: Daffé, M., Reyrat, J. (Eds.), *The Mycobacterial Cell Envelope*. ASM Press, Washington, DC, pp. 41–62.

Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A., Daffé, M., 2014. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* 21, 67–85. doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011

Martínez, A., Torello, S., Kolter, R., 1999. Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 181, 7331–8.

Martinez, A.N., Mehra, S., Kaushal, D., 2013. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Infect. Dis.* 207, 1253–61. doi:10.1093/infdis/jit037

Medjahed, H., Gaillard, J.L., Reyrat, J.M., 2010. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol.* doi:10.1016/j.tim.2009.12.007

Michael Strain, S., Toubiana, R., Ribi, E., Parker, R., 1977. Separation of the mixture of trehalose 6,6'-dimycolates comprising the mycobacterial glycolipid

fraction, "P3." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 449–456. doi:10.1016/S0006-291X(77)80001-6

Middlebrook, G., Dubos, R.J., Pierce, C., 1947. Virulence and Morphological Characteristics of Mammalian Tubercle Bacilli. *J. Exp. Med.* 86, 175–84.

Minnikin, D.E., Hutchinson, I.G., Caldicott, A.B., Goodfellow, M., 1980. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *J. Chromatogr. A* 188, 221–233. doi:10.1016/S0021-9673(00)88433-2

Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Dobson, G., Goodfellow, M., Portaels, F., Van Den Breen, L., Sesardic, D., 1983. Mycolic Acid Patterns of Four Vaccine Strains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* 129, 889–891. doi:10.1099/00221287-129-3-889

Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Goodfellow, M., Stanford, J.L., 1982. The mycolic acids of *Mycobacterium chelonae*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 817–22.

Moore, M., Frerichs, J.B., 1953. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J. Invest. Dermatol.* 20, 133–69.

Morris, R.P., Nguyen, L., Gatfield, J., Visconti, K., Nguyen, K., Schnappinger, D., Ehrt, S., Liu, Y., Heifets, L., Pieters, J., Schoolnik, G., Thompson, C.J., 2005. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12200–5. doi:10.1073/pnas.0505446102

Muñoz, M., Lanéelle, M.A., Luquin, M., Torrelles, J., Julián, E., Ausina, V., Daffé, M., 1997. Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 251–9.

Nash, K.A., Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J., 2009. A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium*

*abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1367–76. doi:10.1128/AAC.01275-08

Nessar, R., Reyrat, J.-M., Davidson, L.B., Byrd, T.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, 1187–95. doi:10.1099/mic.0.046557-0

Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G., 2003. Lipoarabinomannans: From structure to biosynthesis. *Biochimie.*

Noll, H., Bloch, H., 1955. Studies on the chemistry of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 214, 251–65.

Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J., Lederer, E., 1956. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 299–309.

Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., Hatfull, G.F., 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.* 69, 164–74. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x

Ojha, A.K., Trivelli, X., Guerardel, Y., Kremer, L., Hatfull, G.F., 2010. Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. *J. Biol. Chem.* 285, 17380–9. doi:10.1074/jbc.M110.112813

Pang, L., Tian, X., Pan, W., Xie, J., 2013. Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. *J. Cell. Biochem.* 114, 1705–13. doi:10.1002/jcb.24515

Pawlik, A., Garnier, G., Orgeur, M., Tong, P., Lohan, A., Le Chevalier, F., Sapriel, G., Roux, A.L., Conlon, K., Honoré, N., Dillies, M.A., Ma, L., Bouchier, C., Coppée, J.Y., Gaillard, J.L., Gordon, S. V., Loftus, B., Brosch, R., Herrmann, J.L., 2013.

Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium abscessus*. *Mol. Microbiol.* 90, 612–629. doi:10.1111/mmi.12387

Peñuelas-Urquides, K., Villarreal-Treviño, L., Silva-Ramírez, B., Rivadeneyra-Espinoza, L., Said-Fernández, S., de León, M.B., 2013. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. *Braz. J. Microbiol.* 44, 287–9. doi:10.1590/S1517-83822013000100042

Perez, R.L., Roman, J., Roser, S., Little, C., Olsen, M., Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K., 2000. Cytokine message and protein expression during lung granuloma formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 795–804. doi:10.1089/10799900050151067

Petrini, B., 2006. *Mycobacterium abscessus*: An emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS.* doi:10.1111/j.1600-0463.2006.apm\_390.x

Philips, J.A., Ernst, J.D., 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132458

Pinto, R., Saunders, B.M., Camacho, L.R., Britton, W.J., Gicquel, B., Triccas, J.A., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacille Calmette-Guérin vaccine. *J. Infect. Dis.* 189, 105–12. doi:10.1086/380413

Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham, J.O., 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 98–106.

Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., Cole, S.T., 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* 46, 709–17.

Rafidinarivo, E., Prome, J.C., Levy-Frebault, V., 1985. New kinds of unsaturated mycolic acids from *Mycobacterium fallax* sp. nov. Chem. Phys. Lipids. doi:10.1016/0009-3084(85)90003-9

Ramakrishnan, L., Falkow, S., 1994. *Mycobacterium marinum* persists in cultured mammalian cells in a temperature-restricted fashion. Infect. Immun. 62, 3222–3229.

Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A., Glickman, M.S., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. J. Exp. Med. 201, 535–43. doi:10.1084/jem.20041668

Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W.R., Glickman, M.S., 2006. Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis* -induced inflammation and virulence. J. Clin. Invest. 116, 1660–7. doi:10.1172/JCI27335

Rastogi, N., 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. Res. Microbiol. 142, 464–76.

Rhoades, E.R., Archambault, A.S., Greendyke, R., Hsu, F.-F., Streeter, C., Byrd, T.F., 2009. *Mycobacterium abscessus* Glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF-alpha by preventing interaction with TLR2. J. Immunol. 183, 1997–2007. doi:10.4049/jimmunol.0802181

Roach, T.I., Barton, C.H., Chatterjee, D., Blackwell, J.M., 1993. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha. J. Immunol. 150, 1886–96.

Rodríguez-Güell, E., Agustí, G., Corominas, M., Cardona, P.-J., Casals, I., Parella, T., Sempere, M.-A., Luquin, M., Julián, E., 2006. The production of a new extracellular putative long-chain saturated polyester by smooth variants of *Mycobacterium vaccae* interferes with Th1-cytokine production. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 93–108. doi:10.1007/s10482-006-9062-1

Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., Böttger, E.C., 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 323–30.

Rohde, K.H., Veiga, D.F.T., Caldwell, S., Balázs, G., Russell, D.G., 2012. Linking the transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis* during an extended intracellular infection. *PLoS Pathog.* 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002769

Rosen, M.A., Kunjappu, J.T., 2012. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 4 th. ed. John Wiley & Sons.

Rüger, K., Hampel, A., Billig, S., Rücker, N., Suerbaum, S., Bange, F.C., 2014. Characterization of rough and smooth morphotypes of *Mycobacterium abscessus* isolates from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 52, 244–250. doi:10.1128/JCM.01249-13

Runyon, E.H., 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am.* 43, 273–90.

Russell, D.G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S., Altare, F., 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat. Immunol.* 10, 943–8. doi:10.1038/ni.1781

Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L.A., López-Marín, L.M., 2001. Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1081–8. doi:10.1128/CDLI.8.6.1-91-1088.2001

Salman, M., Lonsdale, J.T., Besra, G.S., Brennan, P.J., 1999. Phosphatidylinositol synthesis in mycobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 437–50.

Sánchez-Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T.F., Julián, E., Brambilla, C., Luquin, M., 2011. Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: Implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2293–2295. doi:10.1128/JCM.02322-10

Sanguinetti, M., Ardito, F., Fiscarelli, E., La Sorda, M., D'Argenio, P., Ricciotti, G., Fadda, G., 2001. Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 816–9. doi:10.1128/JCM.39.2.816-819.2001

Schaefer, W.B., Davis, C.L., Cohn, M.L., 1970. Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 102, 499–506.

Set, R., Rokade, S., Agrawal, S., Shastri, J., 2010. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria by microdilution - Experience of a tertiary care centre. *Indian J. Med. Microbiol.* 28, 48. doi:10.4103/0255-0857.58729

Shen, G.-H., Wu, B.-D., Wu, K.-M., Chen, J.-H., 2007. In Vitro activities of isepamicin, other aminoglycosides, and capreomycin against clinical isolates of rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1849–51. doi:10.1128/AAC.01551-06

Sibley, L.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J., Krahenbuhl, J.L., 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* 56, 1232–6.

Simpson, R.J., Hammacher, A., Smith, D.K., Matthews, J.M., Ward, L.D., 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.* 6, 929–55. doi:10.1002/pro.5560060501

Smith, I., 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin. Microbiol. Rev. 16, 463–496. doi:10.1128/CMR.16.3.463

Staropoli, J.F., Branda, J.A., 2008. Cord formation in a clinical isolate of *Mycobacterium marinum*., Journal of clinical microbiology. doi:10.1128/JCM.00197-08

Steck, P.A., Schwartz, B.A., Rosendahl, M.S., Gray, G.R., 1978. Mycolic acids. A reinvestigation. J. Biol. Chem. 253, 5625–9.

Stokes, R.W., Norris-Jones, R., Brooks, D.E., Beveridge, T.J., Doxsee, D., Thorson, L.M., 2004. The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. Infect. Immun. 72, 5676–5686. doi:10.1128/IAI.72.10.5676-5686.2004

Strober, W., 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr. Protoc. Immunol. Appendix 3, Appendix 3B. doi:10.1002/0471142735.ima03bs21

Sugawara, I., Udagawa, T., Hua, S.C., Reza-Gholizadeh, M., Otomo, K., Saito, Y., Yamada, H., 2002. Pulmonary granulomas of guinea pigs induced by inhalation exposure of heat-treated BCG Pasteur, purified trehalose dimycolate and methyl ketomycolate. J. Med. Microbiol. 51, 131–7.

Uenishi, Y., Fujita, Y., Kusunose, N., Yano, I., Sunagawa, M., 2008. Comprehensive analysis of mycolic acid subclass and molecular species composition of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 cell wall skeleton (SMP-105). J. Microbiol. Methods 72, 149–156. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.016

Van der Werf, M.J., Ködmön, C., Katalinić-Janković, V., Kummik, T., Soini, H., Richter, E., Papaventsis, D., Tortoli, E., Perrin, M., van Soolingen, D., Zolnir-Dovč, M., Ostergaard Thomsen, V., 2014. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. BMC Infect. Dis. 14, 62. doi:10.1186/1471-2334-14-62

Vergne, I., Chua, J., Singh, S.B., Deretic, V., 2004. Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 367–94. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.114015

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189

Wallace, R.J., Brown-Elliott, B.A., Crist, C.J., Mann, L., Wilson, R.W., 2002. Comparison of the in vitro activity of the glycylicline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3164–7.

Watanabe, M., Ohta, A., Sasaki, S.I., Minnikin, D.E., 1999. Structure of a new glycolipid from the *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex. *J. Bacteriol.* 181, 2293–2297.

Wayne, L., Kubica, G., 1986. The mycobacteria, in: JG, H., PH, S., NS, M., ME, S. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore MD, pp. 1435–1457.

Welsh, K.J., Abbott, A.N., Hwang, S.A., Indrigo, J., Armitage, L.Y., Blackburn, M.R., Hunter, R.L., Actor, J.K., 2008. A role for tumour necrosis factor-alpha, complement C5 and interleukin-6 in the initiation and development of the mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate induced granulomatous response. *Microbiology* 154, 1813–1824. doi:10.1099/mic.0.2008/016923-0

WHO - World Health Organization, 2014. URL [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)

Woods, G.L., Bergmann, J.S., Witebsky, F.G., Fahle, G.A., Boulet, B., Plaunt, M., Brown, B.A., Wallace, R.J., Wanger, A., 2000. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 656–61.

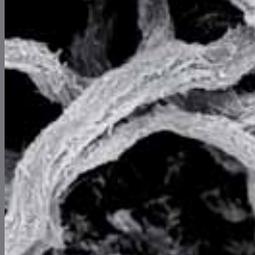
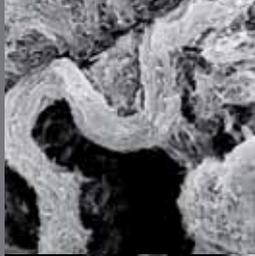
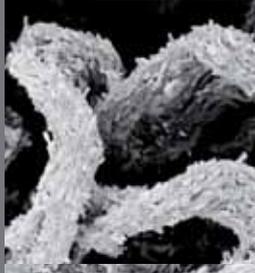
Yu, J., Tran, V., Li, M., Huang, X., Niu, C., Wang, D., Zhu, J., Wang, J., Gao, Q., Liu, J., 2012. Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are

required for virulence of *Mycobacterium marinum*. *Infect. Immun.* 80, 1381–9.  
doi:10.1128/IAI.06370-11

Yuan, Y., Barry, C.E., 1996. A common mechanism for the biosynthesis of methoxy and cyclopropyl mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12828–33.

---

---



---

**H. ANEXOS**

---

---

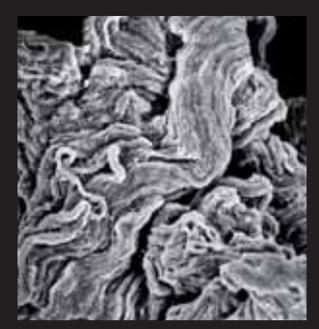
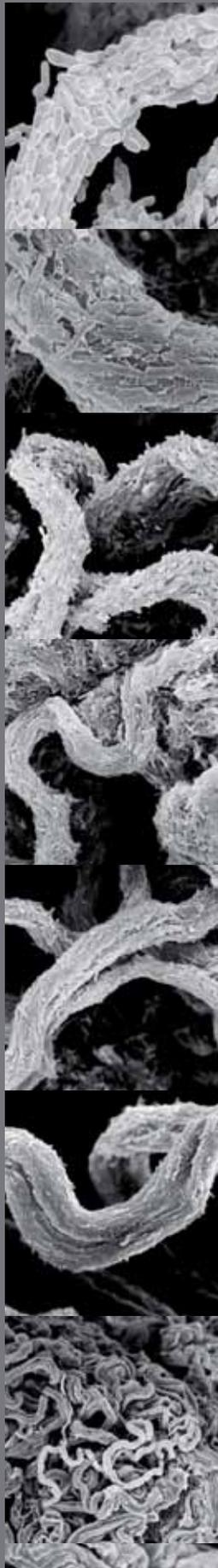
Los artículos a continuación presentan parte de los resultados de esta tesis doctoral.

1. Brambilla, C., Sanchez-Chardi, A., Perez-Trujillo, M., Julian, E., Luquin, M., 2012. Cyclopropanation of  $\alpha$ -mycolic acids is not required for cording in *Mycobacterium brumae* and *Mycobacterium fallax*. *Microbiology*. doi:10.1099/mic.0.057919-0

2. Sánchez-Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T.F., Julián, E., Brambilla, C., Luquin, M., 2011. Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: Implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2293–2295. doi:10.1128/JCM.02322-10

---

---



## I. AGRADECIMIENTOS

---

---

---

Al finalizar esta Tesis no puedo dejar de agradecer a las personas que hicieron parte de mi vida en estos últimos cinco años, y que contribuirán para la finalización de este trabajo e colaboraron para la realización de un sueño.

En primero lugar quiero agradecer a la directora de esta tesis doctoral, Dra. Marina Luquin, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por haberme dado la gran oportunidad de realizar esta tesis doctoral. No puedo olvidarme también de agradecerle por sus sabios consejos profesionales y personales. ¡Muchísimas gracias Dra. Luquin!

Quiero agradecer también a la Dra Esther Julián por su excepcional acogida en el laboratorio, por todo lo que me ha enseñado de cultivos celulares, ELISAs, etc... pero también pelos consejos de cómo ser una buena madre primeriza. Gracias por todo!!!

No podía dejar de agradecer a mis compañeros de laboratorio que de una manera u otra han estado implicados directa o indirectamente en la realización de esta tesis. Mil gracias a la Marta, a la Estela, compañeras hasta la recta final de esta tesis. Muíto obligada meninas, por la compañía, por la ayuda con el trabajo, por las galletas de Marta, los dulces de Estela, en fin por todo! Gracias también a Cristina Tomas por haber estado allí cuidando a mis células y mis bacterias mientras yo cuidaba a mi hijo. Quiero agradecer también a Gemma, Núria, Maria, Bárbara y a Jofre por los buenos momentos compartidos en el lab. No puedo olvidarme de mis compañeros de laboratorio más fugaces, por los pocos pero buenos pero momentos que hemos estado juntos, Silvia, Lluís y Hasier. Gracias también a la Cristina Sosa por la ayuda con comandas, medios y material de laboratorio.

En estos 5 años también hicieron parte de mi trayectoria los vecinos del lab de Ecología Microbiana, y me gustaría agradecer primeramente a La Dra. Isabel Esteve y al Dr. Toni Solé por la oportunidad de realizar el trabajo de investigación del master en su laboratorio. También agradecer a los compañeros de laboratorio que pasaron a ser mis queridos vecinos de lab: Juan, Elia, Zully, Massimiliano, Marina, Álvaro, Sandra, Jordi, Eduard, Anama y a la más nueva vecina Laia.

Gracias a las hermanas Escribano (Susana y Sandra) por la agradable y divertida compañía en los largos viajes diarios en ferrocarriles. Sin vosotras estos

viajes no serían tan divertidos. Por no olvidarme de mis guardaespaldas velando por mi seguridad durante el embarazo de Pol.

Quiero agradecer a todos los técnicos que me asesoraron en la realización de esta tesis: A la Dra. Miriam Pérez-Trujillo por su colaboración en los análisis por RMN, al gran equipo del Servicio de Microscopia de la UAB; Dra. Mónica Roldán, Meritxell Vendrell y Martí De Cabo, muchas gracias por la ayuda con la microscopia confocal láser de barrido. Y agradecer también al Dr. Alejandro Sánchez-Chardi por la ayuda con la microscopia electrónica de barrido y de transmisión.

Tengo que dar las gracias también al gran equipo de los Laboratorios Integrados: Iolanda, Teresa, Sandra y Eva que han hecho más fácil la vida de los profesores de prácticas. Gracias también los técnicos de la 4ª planta Joan, Nuria y Nuria por la ayuda y por la simpatía con la que siempre me habéis recibido.

No podría dejar de agradecer al personal administrativo, Conchi, Maria Josep, Maite y Elena por la ayuda con las tareas administrativas en estos cinco años.

Gracias a mi amiga Flor por prestarme a su marido David para salvarme la vida solucionándome los problemas informáticos. Gracias David por la ayuda. Muchas gracias a mi amiga Noemi por la ayuda con el castellano.

Gracias a los nuevos y queridos amigos Neli y Mauricio que compartieron en este último año de tesis momentos inolvidables. Ai que saudade do cafezinho e daquele bate-papo descontraído!

Daniel, gracias, muito obrigada, merci, por la ayuda con los detalles técnicos de la tesis.

Finalmente chegou o momento de agradecer a minha família, que sem o seu apoio incondicional eu não haveria chegado até aqui. Mãe, obrigada por trazer-me à Espanha, se não fosse por você eu não estaria aqui. Muito obrigada também pelo apoio incondicional em todas as grandes decisões da minha vida. Pai, muito obrigada, mesmo de longe sei que você sempre está torcendo por mim. Lia, Maria Luiza e Ricardo, obrigado por estarem ai, sempre do meu lado, nos bons e nos maus momentos, desde os tempos de faculdade até o doutorado.

Gracias a mis Suegros por la ayuda con Pol mientras yo estaba en el laboratorio y por las deliciosas paellas de domingo. Gracias también a Juncal por el help con el inglés y con detalles muy bonitos para este trabajo.

Pero sobre todo, gracias a Xavi, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto. Por el tiempo que me ha concedido, un tiempo robado a la familia. Gracias por haberme apoyado en todo. Por haber cuidado a Pol para que yo pudiera seguir con el doctorado. Por haberme ayudado a realizar los tres grandes sueños de mi vida: hacer el doctorado, casarme y tener hijos. Sin ti nada de eso sería posible.

Muito obligada a todos!

¡Muchas gracias a todos!

Moltes gràcies a tothom!