



Universidad de León

TESIS DOCTORAL

Modelos de infección *in vitro* para el análisis de la respuesta inmunológica frente a micobacterias

Doctorando: Sara Luisa Blanco Conde

Programa de doctorado: Biomedicina y Ciencias de la Salud

Tutor: María Jesús Tuñón González

Director: Octavio Miguel Rivero Lezcano

León, 2022

Las investigaciones realizadas en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido financiadas por la Gerencia Regional de Salud (Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, referencia: GRS 1225/A/16), y por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR, referencia: 204/2015).

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento,

Al Dr. Octavio Miguel Rivero Lezcano, director de esta Tesis Doctoral, por su guía, tiempo y dedicación a lo largo de este proyecto. Gracias por transmitirme la curiosidad, el optimismo y entusiasmo que te caracterizan.

A la Dra. María Jesús Tuñón González, tutora de esta Tesis Doctoral, por su constante atención.

A la Dra. Cristina Díez Tascón y a la Dra. Carolina González Cortés, por su ayuda, múltiples consejos y palabras de ánimos.

Al personal del Complejo Asistencial Universitario de León y las personas voluntarias que participaron en los diferentes estudios, por la tan valiosa colaboración ofrecida

A mis padres, por el apoyo incondicional, preocupación y cariño a lo largo del camino.

A Sarai, por ser siempre mi contacto de emergencia.

A Jose, por su infinita paciencia y generosidad. Por avanzar conmigo sin soltarme la mano en ningún momento.

A todos mis familiares y amigos, por su interés. Porque con un “¿qué tal?”, “¿unas cañas?”... me ayudáis a recuperar el aliento.

GRACIAS

*“Nada en esta vida debe
asustarnos, solo debe ser comprendido.
Es tiempo de entender más,
para que temamos menos”*

Marie Curie

ÍNDICE

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i> . CLASIFICACIÓN	3
1.1. <i>Complejo Mycobacterium tuberculosis: epidemiología y clínica</i>	5
1.2. <i>Micobacterias no tuberculosas: epidemiología y clínica</i>	8
2. DIAGNÓSTICO Y GENOTIPADO	13
3. TRATAMIENTO	15
4. PATOGENIA Y FACTORES DE SUPERVIVENCIA	17
5. RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL HOSPEDADOR.....	22
5.1. <i>Sistema inmune innato</i>	22
5.2. <i>Sistema inmune adaptativo</i>	29
6. MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU ASOCIACIÓN CON BRONQUIECTASIAS.....	32
7. MODELOS DE INFECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS HUMANAS CON <i>MYCOBACTERIUM SP.</i>	37
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	47
MATERIAL Y METODOS	55
1. CEPAS BACTERIANAS.....	57
1.1. <i>Individualización de las micobacterias</i>	60
2. MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	62
2.1. <i>Modelos in vitro empleados</i>	62
2.2. <i>Infecciones in vitro</i>	66
3. ENSAYOS BIOLÓGICOS	68

3.1.	<i>Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	68
3.2.	<i>Producción de citocinas</i>	68
3.3.	<i>Ensayo de Gelatinasa</i>	70
3.4.	<i>Ensayo para la valoración de quimiotaxis</i>	73
4.	TÉCNICAS MOLECULARES	75
4.1.	<i>Extracción de ADN genómico de micobacterias</i>	75
4.2.	<i>Análisis por AFLP: ligación de adaptadores a los fragmentos de ADN</i>	76
4.3.	<i>Procesos de amplificación por PCR del ADN molde</i>	77
	RESULTADOS	83
1.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN SANGRE FRENTE A DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	85
1.1.	<i>Actividad anti-micobacteriana de macrófagos in vitro</i>	85
1.2.	<i>Actividad antimicrobiana de sangre completa frente las distintas especies micobacterianas</i>	88
1.3.	<i>Supervivencia de micobacterias en leucocitos suspendidos en plasma</i>	91
2.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN SANGRE DE FUMADORES FRENTE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	97
3.	ESTRATEGIA BASADA EN AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP) PARA GENOTIPAR MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS	99
4.	INFECCIÓN DE NEUTRÓFILOS CON <i>MYCOBACTERIUM ABSCESSUS</i> COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO EN BRONQUIECTASIAS	109
	DISCUSIÓN	123

1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MODELOS DERIVADOS DE SANGRE	125
1.1. Actividad anti-micobacteriana en modelos derivados de sangre frente a diferentes especies del género <i>Mycobacterium</i>	125
1.2. Actividad anti-micobacteriana en modelos derivados de sangre de fumadores frente <i>M. tuberculosis</i> :	129
2. ESTRATEGIA BASADA EN AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP) PARA GENOTIPAR DE FORMA RUTINARIA MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.....	133
3. MODELO DE NEUTRÓFILOS PARA REPRODUCIR FENÓMENOS INMUNOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DE BRONQUIECTASIAS	138
CONCLUSIONES	149
RESUMEN / SUMMARY	153
BIBLIOGRAFÍA	159
ÍNDICE TABLAS.....	195
ÍNDICE FIGURAS	197
ABREVIATURAS.....	199
PUBLICACIONES.....	201

REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA

Las micobacterias y los humanos han coexistido durante más de 40.000 años, siendo *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, el principal agente patógeno del género *Mycobacterium* y que más muertes ha producido. A lo largo de la historia hay numerosos escritos, repartidos por todo el mundo, describiendo las características clínicas y patológicas de la enfermedad, conocida como tisis o consunción hasta 1839, cuando J. Schoenlein la denominó tuberculosis. En los s. XVIII – XIX, coincidiendo con la revolución industrial en Europa, donde provocó una gran epidemia conocida como la “plaga blanca”, se especulaba sobre su origen infeccioso, pero no se constató hasta 1882, cuando Robert Koch aísla, identifica y cultiva por primera vez su agente causal, *Mycobacterium tuberculosis* (1,2). A partir de este momento no sólo se buscan nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas para combatir esta enfermedad, sino que se comienzan a relacionar con patología humana bacilos causantes de tuberculosis en animales (3).

1. GÉNERO *Mycobacterium*. CLASIFICACIÓN

Lehmann y Neumann en 1896, establecieron por primera vez este género, basándose en las características de cepas tipo de *M. tuberculosis*. Clásicamente,

el género *Mycobacterium* (orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*) se compone por más de 200 especies diferentes (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>), muchas de las cuales son patógenos humanos, patógenos oportunistas o se aíslan de muestras clínicas desconociéndose su asociación patológica. En la actualidad, en base a estudios filogenéticos y análisis comparativos del genoma, se propone una nueva clasificación que subdivida la familia *Mycobacteriaceae* en cinco géneros: *Mycobacterium* gen., *Mycolicibacter* gen. nov., *Mycobacteroides* gen. nov., *Mycolicibacillus* gen. nov. y *Mycolicibacterium* gen. nov. Corresponde, respectivamente, con los grupos monofiléticos “*tuberculosis-simiae*”, “*terrae*”, “*abscessus-chelonae*”, “*trivialis*” y “*fortuitum-vaccae*” (4). Esta nueva nomenclatura ha sido validada por el Comité Internacional de Sistemática de Procariontes, sin embargo, su empleo no es obligatorio (5).

Los agentes incluidos se describen como bacilos delgados, de forma recta o ligeramente curvada, aerobios inmóviles y no esporulados, con un tamaño de 0.2 a 0.6 x 1 a 10 μm , que se caracterizan por presentar una pared celular rica en lípidos y ácidos micólicos, que proporcionan una superficie hidrofóbica, además de ácido-alcohol resistencia. Debido a esta característica, requieren tinciones concretas como Ziehl-Neelsen, Kinyoun o auramina-rodamina (6).

Las diferentes especies se dividen en micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, aquellas que presentan una homología superior al 99% en su secuencia nucleotídica e idéntico ARN ribosómico 16S al de *M. tuberculosis* (7), micobacterias causantes de la lepra y no tuberculosas, el resto. Para facilitar la clasificación bacteriológica y clínica de estas últimas Runyon (1959) estableció

diferentes grupos en función de la velocidad de crecimiento y capacidad para producir pigmento en presencia o ausencia de luz (8). Actualmente, la clasificación se establece por datos epidemiológicos, patológicos, filogenéticos y fenotípicos (9) (Tabla 1).

Clasificación de las micobacterias			
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	Micobacterias de la lepra	Micobacterias no tuberculosas	
		Crecimiento lento ¹	Crecimiento rápido ²
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. leprae</i>	Complejo <i>M. avium</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. bovis BCG</i>		<i>M. xenopi</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. africanum</i>		<i>M. malmoense</i>	
<i>M. canettii</i>		<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. caprae</i>		<i>M. genovense</i>	
<i>M. microti</i>		<i>M. marinum</i>	
<i>M. pinnipedi</i>		<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. orygis</i>		<i>M. szulgoi</i>	
<i>M. mungi</i>		<i>M. scrofulaceum</i>	

Tabla 1. Clasificación de las micobacterias. Micobacterias no tuberculosas: ejemplos de las más relevantes desde un punto de vista patogénico.

Tiempo de crecimiento en cultivo más de 7 días¹, menos de 7 días².

1.1. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiología y clínica

Las especies del complejo *M. tuberculosis* son patógenos obligados, agentes causales de la tuberculosis en humanos y animales. *M. tuberculosis* es la especie más relevante en patología humana, siendo el hombre su único reservorio y la vía aérea su modo de transmisión principal.

Con el desarrollo de la vacuna BCG a principios del s. XX, por Calmette y Guerin, para la prevención de la infección tuberculosa, y el posterior descubrimiento de fármacos micobactericidas como la estreptomina, isoniazida y rifampicina (1,2,10), la incidencia de la tuberculosis descendió hasta los años 80. La aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las crecientes zonas de vulnerabilidad sanitaria y la propagación de cepas multirresistentes, favorecidas por los incumplimientos terapéuticos y la globalización, han promovido el aumento de nuevos casos (10).

En la actualidad, la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública, a pesar de ser una enfermedad curable y prevenible. Con el plan de acción propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014 ("Estrategia Fin a la Tuberculosis") la incidencia acumulada anual ha descendido progresivamente. Sin embargo, se sitúa como decimotercera causa de muerte global y la segunda por enfermedad infecciosa, solamente por detrás de la Covid-19. Se estima que, en el año 2020 cerca de 10 millones de personas estaban enfermas de tuberculosis, de las cuales, 1,3 millones fallecieron (11).

En Asia y África se concentran las regiones con mayor número de casos nuevos (Figura 1) (11). A nivel europeo, España ocupa la novena posición con una tasa de incidencia de 9.3 casos/100.000 habitantes (12). Las Comunidades Autónomas con más casos notificados son: Galicia, Ceuta y Cataluña (13). En Castilla y León, la provincia de León registra la mayor tasa de incidencia, superior a la media nacional (16,16 casos/100.000 habitantes) (14).

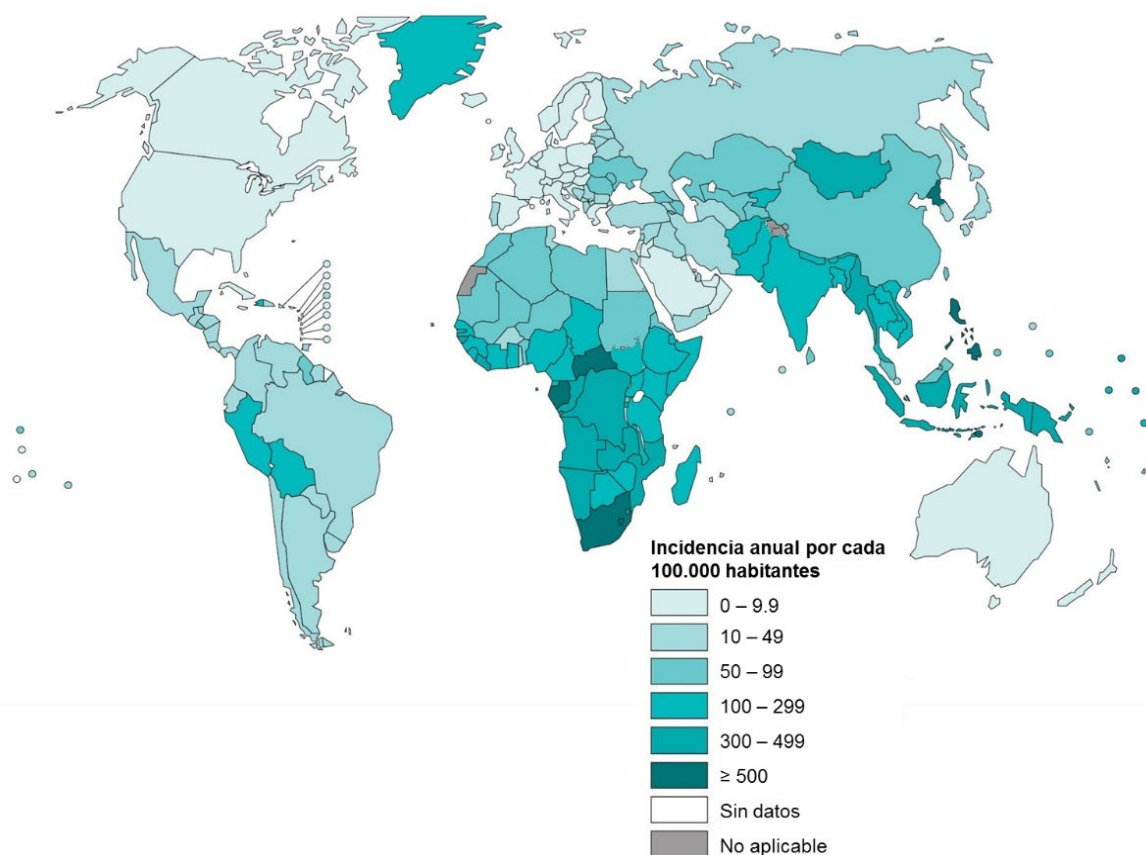


Figura 1. Incidencia mundial de tuberculosis en el año 2020 (11).

La tuberculosis es una enfermedad granulomatosa, en la cual el principal órgano afectado es el pulmón. En la infección primaria los pacientes pueden permanecer asintomáticos o presentar síntomas leves inespecíficos. El más característico es la fiebre y/o la presencia de linfadenopatías intratorácicas. Aparecen infiltrados pulmonares en lóbulo superior que, si progresan, se suceden lesiones cavitadas, fibróticas y finalmente calcificadas. En la infección posprimaria, debida a una reactivación de los bacilos que pudieran permanecer activos en las lesiones fibróticas de la infección primaria, la sintomatología es muy variable, siendo la tos el síntoma más frecuente. La infección también se puede desarrollar

a otros niveles, aunque en menor frecuencia, tales como: pleural, linfático (escrófula), sistema genitourinario, digestivo, óseo (enfermedad de Pott), nerviosos central, pericárdico; o de forma diseminada, tuberculosis miliar (15).

1.2. Micobacterias no tuberculosas: epidemiología y clínica

Las micobacterias no tuberculosas (MNT), son un conjunto de especies oportunistas, ampliamente distribuidas en el medio (agua, suelo). Actualmente, el número de especies incluidas en este grupo aumenta con el avance de técnicas para su identificación y caracterización. El desarrollo de la infección se produce por la inhalación de las bacterias suspendidas en aerosoles procedentes del ambiente. La transmisión vía aérea humano-humano o a través de fómites no parece relevante, aunque se consideran estas posibilidades en el curso de brotes, particularmente en población inmunocomprometida o afecta de fibrosis quística (16,17).

No es hasta las últimas décadas cuando adquieren importancia epidemiológica, pues, aunque no se disponen de datos oficiales por no tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria, cada vez hay más evidencias de su asociación con enfermedad infecciosa pulmonar a nivel mundial, especialmente en zonas no endémicas de tuberculosis (18)(19)(20).

La prevalencia en el número de casos y en la especie micobacteriana implicada, varía en las distintas áreas geográficas (Figura 2) (21). A nivel global, las especies del complejo *M. avium* (MAC) son las que se aíslan con mayor frecuencia, predominando en Australia, norte América y Asia en contraposición con Europa, donde su frecuencia es menor y destacan otras especies como *M. kansasii*, *M.*

xenopi y *M. malmoense* (21,22). En España, a lo largo de los últimos años, se ha incrementado el número de aislamientos de *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum* y *M. abscessus*, aunque de manera variable dependiendo de la localización geográfica del estudio (23,24). Estas diferencias epidemiológicas se relacionan con el cambio en las condiciones climatológicas y geológicas, las diferentes características poblacionales (25,26) o con las campañas de vacunación con *M. bovis* BCG llevadas a cabo en algunos países, por lo que se postula que pudiera existir una protección cruzada frente a este grupo de micobacterias (27,28).

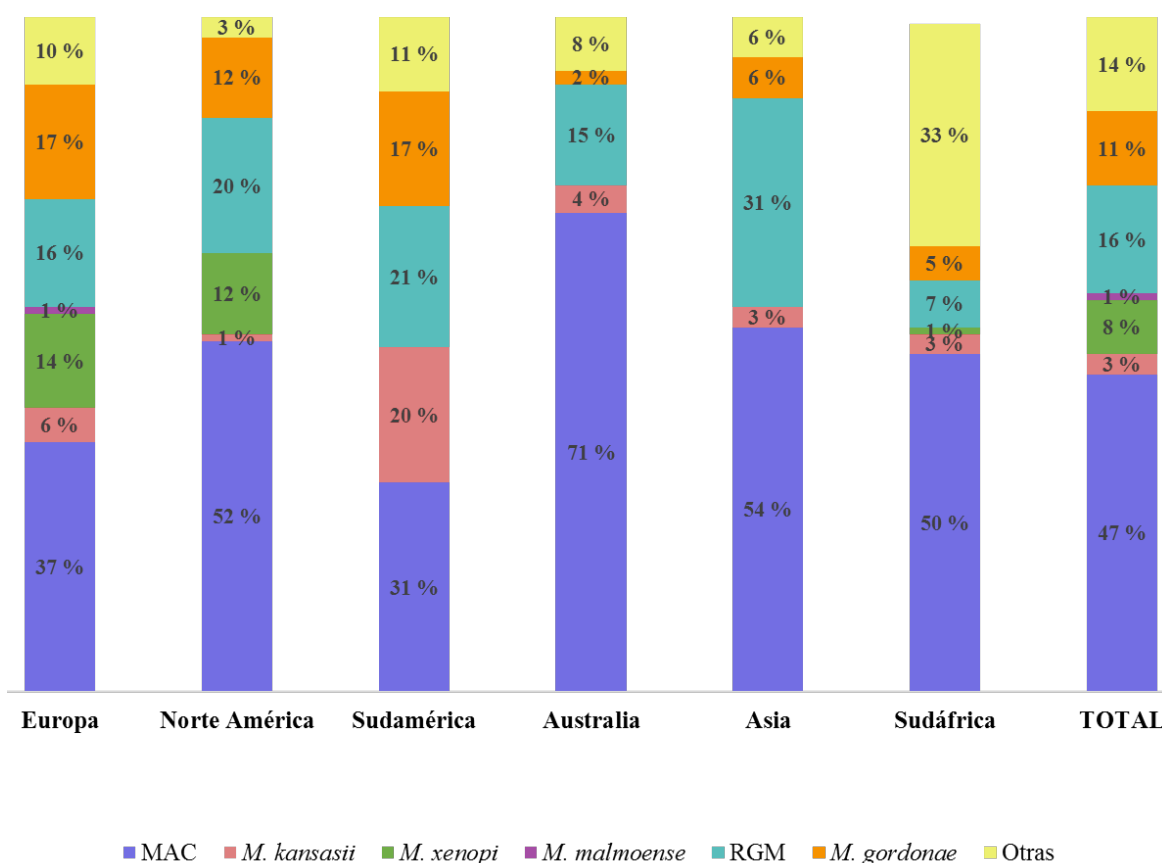


Figura 2. Distribución global de las especies más frecuentes de MNT (21). MAC: Complejo *Mycobacterium avium*. RGM: micobacterias de crecimiento rápido.

Las manifestaciones clínicas son variables en función de la especie, su capacidad patógena y del estado inmunológico del hospedador, asociándose las formas localizadas a pacientes inmunocompetentes y formas diseminadas de la infección a pacientes inmunocomprometidos (29,30), en los que se aíslan con mayor frecuencia especies del grupo MAC (31).

Hay determinadas condiciones predisponentes propias del huésped que favorecen el desarrollo de la infección, entre ellas, la edad (población mayor de 60 años con bajo índice de masa corporal) (22,32) y comorbilidades pulmonares tales como tuberculosis previa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquiectasias (26,33–35). El tratamiento de estas dos enfermedades con corticoides supone un factor de riesgo añadido (26,35). Otros factores son alteraciones genéticas, como la fibrosis quística, la discinesia ciliar primaria (36) y el déficit de α 1-antitripsina (37), o defectos en genes relacionados con la inmunidad (susceptibilidad mendeliana a enfermedades micobacterianas), como la mediada por el eje IL12/IFN γ (38). También influyen los estados de inmunosupresión primarios y adquiridos por infección con el VIH, enfermedades oncológicas, trasplante de órganos, así como por los tratamientos de enfermedades autoinmunes, como los fármacos anti-TNF α para el tratamiento de la artritis reumatoide, psoriasis o enfermedad de Crohn u otros fármacos inmunosupresores para el tratamiento del Síndrome de Sjögren (30,39,40).

Por su patogenicidad o frecuencia de aislamiento destacan:

- *M. kansasii* es la sexta especie más aislada a nivel mundial, aunque en Eslovaquia y Polonia representa un 35% de los aislamientos de MNT (21).

Típicamente produce lesiones pulmonares similares a las observadas en tuberculosis (41,42).

- *M. gordonae* es una de las especies menos virulentas. Su aislamiento en muestras clínicas se suele considerar contaminación ambiental (43).

- El complejo *M. avium* está integrado por *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. vulneris*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. yongonense*, *M. timonense*, *M. marseillense*, *M. paraintracellulare*, *M. lapraemurium*, *M. intracellulare* y *M. avium* (subsp *avium*, subsp *paratuberculosis*, subsp *silvaticum*). Estas dos últimas especies son las de mayor relevancia clínica y epidemiológica, responsables de brotes hospitalarios (44) y extrahospitalarios (45). *M. avium* es más prevalente en Europa y América, *M. intracellulare* en Sudáfrica y Australia (21,46). En adultos inmunocompetentes las manifestaciones pulmonares son las más frecuentes, asociándose una evolución clínica más tórpida en *M. intracellulare* (47). En hombres de mediana edad con antecedentes de consumo de tabaco o alcohol, predomina un patrón fibrocavitario (48), mientras que, en mujeres posmenopáusicas, delgadas, sin antecedentes de patología pulmonar previa ni de hábito tabáquico, el patrón es nodular-bronquiectásico, denominado Síndrome de Lady Windermere (49).

- El complejo *M. fortuitum* está compuesto por numerosas especies y subespecies, entre las que se incluyen *M. fortuitum* y *M. mageritense* (4). *M. fortuitum* es una de las micobacterias de crecimiento rápido más aislada en el mundo, con predominio en zonas del este asiático (21). Las manifestaciones clínicas más frecuentes son nódulos y abscesos a nivel cutáneo, tejidos blandos u

óseos (50)(51). *M. mageritense* se relaciona con poca frecuencia a patología, pero cuando sucede, la clínica es similar a *M. fortuitum* (50,52–54).

- *M. chelonae* también se relaciona con infecciones cutáneas localizadas o diseminadas en pacientes con tratamientos crónicos con corticoesteroides. Se ha relacionado con casos de queratitis tras cirugía ocular o por el uso de lentillas (48,55,56).

- *M. abscessus* se compone de 3 subespecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *masiliense* y *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Es la especie micobacteriana de crecimiento rápido más aislada a nivel global, predominando en Corea del Sur (21). Este complejo se caracteriza por ser resistente a un amplio espectro de antibióticos. Las infecciones respiratorias son las más frecuentes, sobre todo en pacientes con fibrosis quística, bronquiectasias o tuberculosis previa. También se relaciona a menudo con infecciones de tejidos blandos tras procedimientos cosméticos o como manifestación de una infección diseminada en personas inmunodeprimidas (48,57).

2. DIAGNÓSTICO Y GENOTIPADO

La infección por micobacterias se define según criterios clínicos, microbiológicos y radiológicos. En el caso de *M. tuberculosis*, la infección siempre va ligada a enfermedad y para establecer el diagnóstico solamente es necesario su aislamiento de un cultivo de esputo (58). Sin embargo, en las MNT es importante discernir entre una colonización o contaminación ambiental y un estado de enfermedad. Para concluir que la MNT es responsable de la enfermedad debe ser aislada de, al menos, dos cultivos de muestras independientes de esputo o de una muestra de lavado broncoalveolar (BAL) o biopsia pulmonar. Además, deben estar en un contexto de manifestaciones clínicas y radiológicas compatibles, tras la exclusión de otras patologías (48).

En el diagnóstico microbiológico, el primer paso lo constituyen las técnicas microscópicas (48,59) y las técnicas automatizadas de amplificación de ácidos nucleicos (60). Sin embargo, el cultivo y crecimiento en medios específicos, sólidos (Löwesteien-Jensen y Middlebrook 7H11) y líquidos (Middlebrook 7H9), han constituido el “gold estándar” (48). Actualmente, la espectrofotometría de masas por el sistema MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) se ha implantado rápidamente como método de identificación, por su alta precisión y el poco tiempo necesario para la obtención de perfiles proteicos característicos de cada especie (61,62).

No obstante, las técnicas genómicas son los métodos de referencia actuales en la identificación, con especial interés en aquellas técnicas que requieran una etapa de amplificación por PCR de una zona diana del ADN. El posterior estudio de

esas secuencias amplificadas se puede realizar por varias metodologías: observación directa de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa, para constatar la presencia o ausencia de una región genómica concreta (63), análisis del patrón electroforético de los fragmentos del gen *hsp65* generados por digestión con enzimas de restricción (PRA: PCR restriction enzyme pattern analysis) (48,64), secuenciación automática con iniciadores marcados con fluorescencia (48,65,66) o hibridación con sondas específicas inmovilizadas en fase sólida.

Como en todas las enfermedades infecciosas, en determinadas situaciones es clave hacer una distinción entre cepas para definir las vías de transmisión y diseminación: investigación de brotes, discriminación entre una reinfección exógena o una reactivación endógena, identificación de infecciones mixtas o contaminación cruzada en los laboratorios. Actualmente, se emplean métodos moleculares (67), cuya elección estará condicionada por su poder de resolución (68) y la estabilidad del marcador genético empleado (69). El complejo *M. tuberculosis* constituye un grupo homogéneo (7), mientras que las MNT muestran una variabilidad muy acusada (70). En consecuencia, solamente la secuenciación del genoma completo tendrá un poder discriminatorio muy alto en este grupo. Las técnicas más empleadas para el genotipado de MNT incluyen métodos basados en el análisis de fragmentos generados por enzimas de restricción en electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (71,72,73), secuencias de minisatélites, (MIRU-VNTR) (74,75) secuencias de ADN de elementos repetitivos (rep-PCR) (76,77), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (78), polimorfismo de la longitud de fragmentos generados por enzimas de restricción (AFLP) (79) y secuencias multilocus (MSLT) (80).

3. TRATAMIENTO

El tratamiento de las micobacteriosis se basa en la administración conjunta de dos a cuatro antibióticos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y/o etambutol, para *M. tuberculosis* (81), o para MNT una combinación variable, según la especie, de fármacos antituberculosos y un macrólido, fluoroquinolona o aminoglucósido (48), durante tiempos prolongados, que no suelen ser inferiores a 4 - 6 meses, pudiendo llegar hasta más de un año tras la negativización del cultivo.

Los regímenes de antibioterapia están bien establecidos en el caso de *M. tuberculosis* (81,82). Sin embargo, para las MNT, dada la heterogeneidad de patogenicidad y que se pueden encontrar como agentes colonizadores, la decisión terapéutica no es evidente. Aunque el paciente cumpla con los criterios diagnósticos, en algunos casos es preferible optar por un seguimiento activo, ya que el beneficio de la terapia no supera el riesgo de aparición de efectos adversos por la combinación de fármacos (hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, ototoxicidad) ni las largas pautas de administración, en las que el paciente, si no tiene buena adherencia, favorece la aparición de cepas resistentes que complica el posterior tratamiento de la recidiva (83). Incluso realizando correctamente el tratamiento, la tasa de recaídas para las MNT puede ser alta. En infecciones no complicadas, *M. kansasii* presenta muy buenos resultados, equiparables a *M. tuberculosis*, que se sitúan alrededor del 2% de recaídas (81,82,84,85), lo cual contrasta con especies del grupo MAC, en las que se describen recaídas del 48%, la mayoría debidas a reinfecciones por cepas diferentes (86), y con especies del complejo *M. abscessus*,

en las que se describen recaídas del 30% (87), relacionadas con el desarrollo de resistencias al tratamiento en un 40% a 65% de los casos (88,89).

4. PATOGENIA Y FACTORES DE SUPERVIVENCIA

El desarrollo de una infección activa por *Mycobacterium* sp, va a ser consecuencia de la inadecuada interacción entre el sistema inmune del hospedador con los bacilos, de su virulencia y del grado de exposición a los mismos (26). De esta manera, se podría explicar que solamente de un 5% a 15% de las personas infectadas por *M. tuberculosis*, considerada como la micobacteria más patógena, desarrollen una infección activa (90) y que únicamente un 25% de los aislamientos de MNT estén relacionados con enfermedad (91,92).

Se considera la vía aérea como el principal modo de transmisión en humanos de la mayor parte de las micobacterias y la enfermedad pulmonar como su principal manifestación (29,93). En el espacio broncoalveolar, el aclaramiento mucociliar (94) y la activación de macrófagos alveolares actúan en primer lugar para eliminar estos agentes infecciosos o controlar su crecimiento. Las bacterias son fagocitadas por macrófagos y se contienen en compartimentos endocíticos, que maduran formando un fagosoma, en el cual se promueve su destrucción (95).

Cuando la mucosa se encuentra alterada o la cepa bacteriana es virulenta, las bacterias pueden progresar hasta el epitelio pulmonar. Un modelo de lo que podría suceder en el parénquima, es que los macrófagos activados liberan diversas citocinas y quimiocinas que facilitan la llegada y activación de nuevas células fagocíticas (macrófagos, monocitos, neutrófilos), células natural killer (células NK), células dendríticas y linfocitos T y B, lo cual daría lugar a la formación de una estructura multicelular organizada y fibrótica que rodea el foco infeccioso, denominada granuloma (96,97). En su interior se generaría progresivamente un

microambiente hostil, con privación de nutrientes y oxígeno, que daría lugar a una heterogeneidad de subpoblaciones bacterianas, de las cuales unas no serán viables y otras entrarán un estado de latencia. Así, se suprimiría su crecimiento exponencial ralentizando su metabolismo (98–100) y evitaría la progresión de la enfermedad.

En el granuloma se establecería un equilibrio dinámico entre la respuesta inmune del hospedador y la bacteria. Cuando se produce un estado de inmunosupresión, el estrés ambiental se atenúa y las bacterias retenidas en estado de latencia se reactivarán, infectando y replicándose en el interior de las células fagocíticas que se acumularon durante el proceso de contención. Si el número de bacterias excede la carga máxima que el granuloma es capaz de retener, éste se romperá y las bacterias se diseminarán vía linfática o hematológica, por mecanismos todavía no bien establecidos, a otras zonas del pulmón o a órganos extrapulmonares, estableciéndose nuevos nichos bacterianos y una progresión activa de la enfermedad (101,102) (Figura 3).

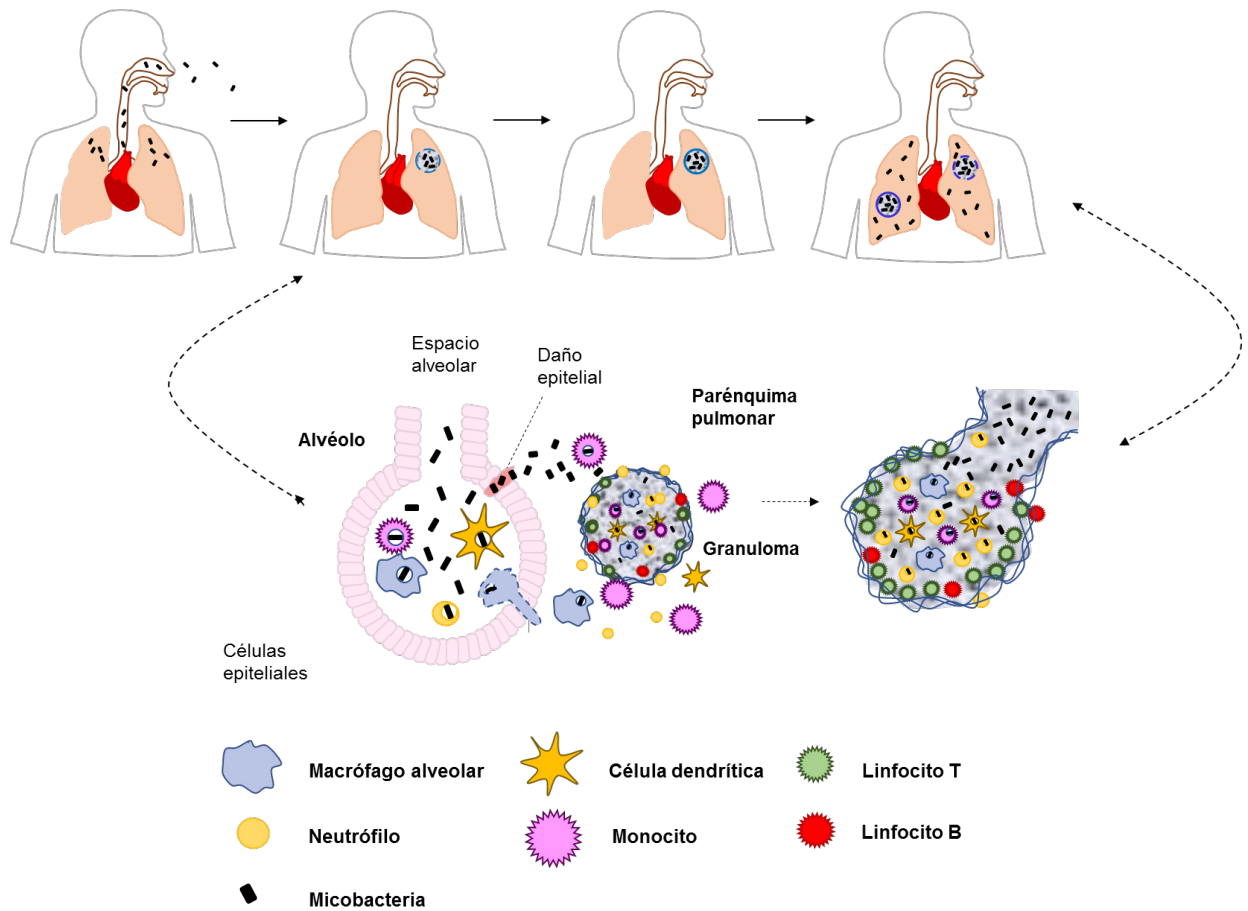


Figura 3. Mecanismo patogénico de las micobacterias. Formación del granuloma. Diseminación bacteriana y progresión activa de la enfermedad pulmonar.

El género *Mycobacterium* sp, cuenta en su membrana con un sistema especializado de secreción Tipo VII (T7SS), denominado ESAT6 (ESX) y compuesto por cinco miembros bien caracterizados que se expresan de forma variable en función de la especie. ESX-1 es el más estudiado por ser el principal factor de virulencia de *M. tuberculosis* y estar presente en otras especies patógenas, tales como *M. kansasii* o *M. fortuitum*. Está relacionado con el transporte de diversas proteínas que interfieren en la maduración e integridad de la

membrana del fagosoma y con la activación de inflamomas en el citoplasma del macrófago, que da lugar a una apoptosis (necrosis celular programada) (103–105). Este sistema facilita la replicación de la bacteria dentro del macrófago y su liberación así como la infección de nuevas células fagocíticas. En el caso de *M. abscessus*, carente de ESX-1, ESX-4 desempeña funciones análogas (106).

Otro aspecto importante en la supervivencia de la bacteria tras la fagocitosis es la adquisición de nutrientes. En concreto, metales como el hierro, necesario para la formación de biopelículas (107) y como cofactor para múltiples enzimas antioxidantes y relacionadas con procesos de síntesis de ADN. También se ha propuesto como factor determinante en la inhibición de la maduración del fagosoma en *M. avium* (108). La captación se lleva a cabo por medio de la síntesis de sideróforos, que pueden estar asociados a la pared celular de la bacteria (micobactina) o ser secretados (carboximicobactina) (109).

Las micobacterias no tuberculosas presentan, en la porción más externa de la envoltura celular, glicopeptidolípidos (GPLs), ausentes en *M. tuberculosis* (110). Al modular su biosíntesis y expresión, regulan las características hidrofóbicas de la membrana (111), limitan el reconocimiento de determinantes antigénicos por las células del sistema inmune innato (112) y manipulan la respuesta defensiva del hospedador.

La presencia o ausencia GPLs condiciona una diferenciación fenotípica en la morfología de la bacteria, como formas lisas (L) o rugosas (R), respectivamente. La transición de las formas L a las formas R, va a estar ligada a factores de estrés ambientales. Ocurre, generalmente, durante el curso de la infección activa, asociándose la morfología rugosa a una mayor virulencia. La pérdida de los GPLs

en las formas R, aumenta el carácter hidrofóbico de la bacteria, favoreciendo la aglutinación y formación de agregados bacterianos que resultan más resistentes a la acción de las células fagocíticas (113). La presencia de GPLs en las formas L generan una superficie más hidrofílica, que limita la adhesión entre bacterias y permite un movimiento deslizante que facilita la dispersión y colonización de superficies (112,114).

El proceso de biosíntesis de GPLs, además, está relacionado con la formación de biopelículas (115). Es un fenómeno mediado por quorum-sensing, un mecanismo de comunicación bacteria-bacteria en el cual las bacterias secretan una matriz polimérica que da lugar a una estructura tridimensional que las agrupa y envuelve.

Esta biopelícula confiere protección y persistencia frente a agresiones externas (como células del sistema inmune, antibióticos o ambientes desfavorables) permitiendo su dispersión hacia otras zonas con microambientes más favorables, para su posterior colonización (116).

5. RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL HOSPEDADOR

Dado el bajo porcentaje del desarrollo de micobacteriosis, suponiendo un alto grado de exposición a las MNT por su ubicuidad y la gran virulencia de las micobacterias tuberculosas, es destacable la función que ejerce el sistema inmune en el control de la infección. En la defensa inicial frente a estos patógenos, se establece una respuesta inmunitaria innata, inespecífica, en la que intervienen diferentes células y moléculas mediadoras, que eliminan al patógeno o, si este consigue persistir, promueven el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa, más específica, relevante en fases más tardías para contener la infección.

5.1. Sistema inmune innato

Células del epitelio pulmonar

El tracto respiratorio y el espacio broncoalveolar representan un único compartimiento inmunológico en que se responde en primer lugar frente al patógeno inhalado. Aparte de ejercer como barrera física, en la que las células están embebidas en mucus, impiden que las bacterias penetren en el cuerpo a través de su aclaramiento mucociliar, de la producción de péptidos y enzimas antimicrobianos (117). También modulan la respuesta inmune e inflamatoria por medio de la liberación de proteínas constituyentes del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D) (118,119) y por medio de la expresión de receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) (120) en su superficie, como los Toll-like (TLRs).

Su activación puede inducir la liberación de diversas citocinas y quimiocinas que favorecen el reclutamiento de células inmunes (neutrófilos, células dendríticas inmaduras, monocitos y linfocitos T periféricos), y contribuir al comienzo de la respuesta inmune innata y adaptativa (120,121) o bien, facilitar la internalización de la micobacteria (122,123). Diversos trabajos han descrito la capacidad de las micobacterias para invadir y replicarse en células no fagocíticas, destacando varios linajes de células epiteliales (124–126), incluidas las células alveolares tipo II A549 (127).

Monocitos y macrófagos alveolares

Los macrófagos juegan un papel esencial en el sistema inmune por la ingestión y degradación de patógenos, por el inicio la respuesta inflamatoria e instruyendo células del sistema inmune adaptativo y por resolver el proceso inflamatorio restableciendo la homeostasia. Sin embargo, también pueden actuar como células hospedadoras de las micobacterias y permitir la replicación de éstas antes de su activación (128).

Los macrófagos y monocitos son células mononucleares, fagocíticas. Los monocitos constituyen el 1-6% del total leucocitario en sangre periférica. Migran a diferentes tejidos en los cuales se diferencian a macrófagos. A nivel alveolar, los macrófagos constituyen más del 90% de las células leucocitarias. Se renuevan constantemente a partir de células precursoras en el parénquima pulmonar o a partir del reclutamiento de monocitos circulantes en sangre periférica (129). Son las primeras células fagocíticas en interaccionar con las micobacterias. Ejercen un doble papel: por un lado, controlan el crecimiento y diseminación de estos agentes

patógenos promoviendo la respuesta celular tipo Th1 y, por otro lado, pueden constituir un nicho para la replicación de las micobacterias durante la fase inicial de la infección (130,131).

Los macrófagos/monocitos presentan una amplia variedad de receptores en su superficie celular, desde receptores para citocinas y quimiocinas (TNFR, INFR, CCR2, CCR5...) (132–135) hasta PRRs, tales como receptores de complemento, Fc γ , lectina tipo C, “scavenger” y TRLs, cuyo perfil de expresión variará en función del grado de diferenciación y maduración del macrófago (136,137). Estos receptores reconocen simultáneamente numerosos ligandos, y tras la unión, coordinada y cooperativa, se activan diferentes quinasas, moléculas adaptadoras y factores de transcripción, como NF- κ B (138–140) o PPAR γ (141,142). Es entonces cuando se llevan a cabo funciones como la fagocitosis de células apoptóticas (143) o patógenos (144), la producción y liberación de mediadores proinflamatorios, como citocinas (IL-23, IL-1 β , TNF α , IL-12, IL-6 y otras) (130,145,146), ciclooxigenasa A (141) e intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y de nitrógeno (RNI) (147,148) o péptidos antimicrobianos, como catelicidina (149,150).

En el establecimiento de un granuloma estructuralmente eficiente para contener la diseminación micobacteriana participan tanto la IL-1 β (151,152) como el TNF α (153,154). La importancia del TNF α en el control del desarrollo y propagación de las micobacteriosis se ha demostrado, tanto *in vivo*, con el incremento de susceptibilidad observado en aquellos pacientes a tratamiento con fármacos anti-TNF α (155), como *in vitro*, empleando modelos animales TNF α o TNFR deficientes (156,157).

La fagocitosis es el mecanismo más característico de defensa. El fagosoma generado madura, con intervención de diferentes tipos de Rab GTPasas (158), hasta fusionarse con lisosomas. En el fagosoma inicial, no se alcanza un pH excesivamente ácido (159), aunque comienza la producción de NO y ROS vía óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa, NOX2), respectivamente (147,148). Se generan intermediarios reactivos que oxidan las estructuras micobacterianas, esta reacción está catalizada por hierro (160). En el fagosoma tardío, se alcanza un pH luminal entre 4,5 – 5,0 por la activación de ATPasas, (159,161). Se forma el fagolisosoma y se activan diferentes enzimas degradativas y péptidos antimicrobianos, adquiridos por fusión del lisosoma.

Las micobacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia a esta respuesta, siendo de *M. tuberculosis* los más estudiados. *M. tuberculosis* puede inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y lisar su membrana, así favorecer su replicación o acceso al citoplasma celular (103,104), produce catalasas, superóxido dismutasas o peroxidasas que le otorgan resistencia a ROS, así como otras reductasas y proteínas que reparan el daño oxidativo y resisten la acidez del medio por bombas de expulsión de protones (H⁺), producción de amonio o modulando la permeabilidad de la membrana (162). *M. avium* bloquea la producción de ROS, variantes lisas de *M. abscessus* restringen la acidificación del fagosoma y las variantes rugosas promueven la apoptosis y necrosis de los macrófagos, favoreciendo su diseminación extracelular (137).

Células *Natural killer* (NK)

Las células NK representan aproximadamente el 15 % de los linfocitos en sangre periférica. Se dividen en dos subpoblaciones diferentes desde un punto de vista funcional: citotóxicas e inmunorreguladoras. Expresan receptores de membrana para las citocinas liberadas por los monocitos, su activación producirá la liberación de IFN γ , TNF α , IL-10 o GM-CSF que ejercerán un proceso de retroalimentación positiva sobre células innatas y células Th1 (163). La acción protectora frente a las micobacteriosis de las células NK no está bien caracterizada *in vivo*. *In vitro* se ha observado que pueden ejercer una acción citolítica directa de monocitos infectados con *M. tuberculosis*, previa activación con IL-2 o IL-12 (164), o *M. bovis* BCG previa activación con IL-2 (165).

Células dendríticas

Las células dendríticas internalizan, procesan y presentan antígenos a células T *naive* localizadas en órganos linfoides secundarios. Además, ejercen un papel importante en la respuesta innata mediante la fagocitosis de patógenos y la producción de citocinas, tal como IL-12 (166,167).

Neutrófilos

Los neutrófilos son las células fagocíticas más abundantes en sangre periférica, suponiendo alrededor de un 60% del total leucocitario. En circulación tienen una vida media corta, de 8-12 horas, pero en tejidos alcanza los 2-5 días. Su papel en la inmunidad innata frente diferentes patógenos, está sustentado por la

alta susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas en pacientes neutropénicos (168).

Estas células fagocíticas migran desde la periferia al lugar de la infección y por medio de distintos mecanismos eliminan el patógeno. Sin embargo, esta capacidad es controvertida en el caso de infecciones por *Mycobacterium* sp. Mientras algunos autores recalcan la capacidad de los neutrófilos en estadios iniciales de la infección para eliminar los bacilos, tanto en modelos animales (169–172) como humanos (173,174), otros autores difieren, o sólo relacionan su capacidad anti-micobacteriana con cepas atenuadas o menos virulentas (175–177).

Para el control de infecciones causadas por agentes Gram positivos y Gram negativos es indispensable alcanzar una concentración alta de neutrófilos en el lugar de infección (168). En muestras de esputo, BAL y tejido cavitado de pacientes con infecciones crónicas y activas por *M. tuberculosis*, se describe un predominio de neutrófilos sobre otras células fagocíticas (178) que, empleando modelos murinos, se asociaron a un peor control de la infección y a un mayor daño tisular (179–181). De forma análoga, se ha descrito en pacientes con infecciones pulmonares por MAC, en los cuales el predominio de neutrófilos en BAL se correlaciona con patrones radiológicos más graves de enfermedad (182), y lo mismo sucede en pacientes con infecciones por *M. abscessus* (183,184).

Los neutrófilos migran en respuesta al gradiente local de quimiocinas y se activan por interacción con citocinas proinflamatorias o componentes bacterianos, procediendo a la eliminación de patógenos por mecanismos oxidativos y no oxidativos: explosión oxidativa (185) y fagocitosis, desgranulación y NETosis, respectivamente (186).

Estas células contienen en su interior vesículas secretorias y gránulos preformados que se movilizan durante su activación para fusionarse con las membranas fagosómica o plasmática y liberar su contenido (187–189). Las vesículas secretoras se componen de proteínas plasmáticas y leucolisina (MT6-MP/MMP-25) (190,191). Los gránulos neutrofilicos, en función de su contenido, se pueden diferenciar en: primarios o azurófilos, con mieloperoxidasas (MPO), defensinas y serin-proteasas (elastasa leucocitaria humana, catepsina G, proteinasa 3); secundarios o específicos, con neutrófilo gelatinasa asociada a lipocalina (NGAL) y colagenasa (MMP-8), entre otros; y terciarios, con proteína 1 de macrófagos asociada a resistencia natural (Nramp-1) o gelatinasas (190,192). La exocitosis de estas moléculas permite la eliminación del agente patógeno por diferentes vías, así como la migración celular, penetración y reparación tisular al ser liberadas extracelularmente y confinar su acción al espacio pericelular por acción de inhibidores de proteasas locales. En condiciones en las que aumenta el reclutamiento y activación de neutrófilos, se desequilibra la liberación y actividad de las proteasas y la actividad de sus inhibidores en la matriz extracelular y se produce deterioro tisular (193,194).

Un ejemplo de daño tisular asociado a un aumento de la migración neutrofílica lo constituyen las bronquiectasias, consideradas un trastorno neutrofílico primario.

Tras la fagocitosis, la maduración del fagosoma finaliza cuando las subunidades de la NADPH oxidasa se ensamblan en su membrana (195) y se generan un amplio espectro de ROS. La especie más relevante es el ácido hipocloroso (HOCl), que resulta de la acción catalítica de la MPO. Sin embargo, el

déficit de esta enzima no condiciona la defensa (196,197). El ensamblaje de NOX2 también se produce en la membrana plasmática. La liberación extracelular de ROS permite una acción microbicida sobre los patógenos no fagocitados (198).

Este mecanismo puede resultar controvertido en el caso de las micobacterias. Autores que describen actividad anti-micobacteriana de los neutrófilos la asocian a mecanismos no oxidativos (171,199). Se ha descrito que determinantes antigénicos de membrana de *M. tuberculosis* o MAC pueden bloquear la fusión de los gránulos primarios con el fagosoma (200). *M. tuberculosis* (177) o variantes rugosas de *M. abscessus* (201) son capaces de inducir cantidades elevadas de ROS y resistir a su actividad, de manera que se induce la necrosis del neutrófilo infectado y se favorece la diseminación, liberándose directamente al medio o multiplicándose en los macrófagos tras su fagocitosis (202).

Otro mecanismo de defensa neutrofílica lo constituyen las NETs (Neutrophil Extracellular Traps), estructuras extracelulares compuestas por cromatina y proteasas de gránulos neutrofílicos, que destruyen extracelularmente la bacteria evitando su diseminación (203). En estudios *in vitro* con diferentes especies micobacterianas, se demostró la inducción de NETs, aunque su contribución micobactericida o en el control de la infección permanece incierto. Algunos autores relacionan la inducción de NETs por *M. tuberculosis* o MAC con la liberación de MMPs y lo asocian a progresión de la infección y lesión tisular (204,205).

5.2. Sistema inmune adaptativo

La respuesta inmune adaptativa es fundamental para establecer una inmunidad efectiva frente enfermedades infecciosas. Se inicia con las acciones

llevadas a cabo por el sistema innato cuando resulta inefectivo contra la infección. La principal característica de esta respuesta es su acción antígeno-específica. Las células involucradas más representativas frente a las micobacterias son los linfocitos T, que serán activados por las células presentadoras de antígenos (APC).

El establecimiento de la respuesta adaptativa frente a las micobacterias es lenta, comparada con la respuesta frente otras infecciones. Una vez activados los linfocitos T en los nódulos linfáticos secundarios, migran al pulmón. La activación es el paso limitante para el establecimiento de la respuesta y depende del número de bacilos vivos que migren en el interior de las APC maduras (206). En el pulmón, las células T van a reconocer antígenos específicos micobacterianos expuestos por células innatas y tisulares infectadas (por ejemplo, ESAT-6 y Ag85b en el caso de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (207)) y van a contribuir a la actividad anti-micobacteriana o inducir tolerancia a la enfermedad, de manera que se limita el daño tisular.

Se han descrito diferentes vías por las que *M. tuberculosis* interfiere o retrasa el establecimiento de esta respuesta. Puede alterar la expresión de MCH II en las APC, interferir en la maduración de las células dendríticas, inhibir el reconocimiento directo por las células T o inducir ligandos inhibitorios que suprimen la actividad linfocitaria, entre otros (208).

Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones, los CD4⁺ o "T helper" (Th) y CD8⁺ o "T citotóxicos" (Tc). La importancia de las células CD4⁺ se manifiesta en pacientes VIH positivos con bajo recuento de las mismas, los cuales son más susceptibles a infecciones o reinfecciones micobacterianas (209). Los linfocitos T CD4⁺ interactúan con las APC infectadas, a través del MHC II, y se generarán

dos fenotipos. El fenotipo Th1, inducido tras la activación por IL-12 (210), es el principal responsable de la liberación de IFN γ , citocina imprescindible en el control de patógenos intracelulares (38). La respuesta Th1 activa las funciones de las células NK, potencia la actividad citotóxica de las células CD8⁺ y promueve la activación macrofágica. IL-12 e IFN γ coordinan todo el proceso de reconocimiento del patógeno por el sistema inmune innato y la inducción de la inmunidad específica potenciando la diferenciación Th1. El fenotipo Th2, se induce tras la interacción con IL-4 y produce fundamentalmente citocinas inhibitoras, como IL-10 o IL-4. Las respuestas Th1 y Th2 se antagonizarán recíprocamente (211,212).

Las células CD8⁺ reconocen antígenos procesados a través de MCH I e inducen la liberación de IFN γ y moléculas citolíticas, como granulicina y perforina, que favorecen la lisis de células infectadas y atacan directamente a la micobacteria (213). Además, participan en el establecimiento del equilibrio entre las respuestas Th1 / Th2 limitando la reactivación de infecciones latentes (214).

La respuesta humoral ha despertado interés desde hace décadas, cuando se demostró la presencia de anticuerpos en pacientes recuperados de tuberculosis (215). Desde entonces, los linfocitos B se han relacionado con la regulación de la respuesta inflamatoria durante las micobacteriosis activas (216) y con la regulación del establecimiento de la respuesta Th1(217).

6. MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS Y SU ASOCIACIÓN CON BRONQUIECTASIAS

Las bronquiectasias son dilataciones anormales y permanentes, de extensión variable, del bronquio. Muestran distintas manifestaciones clínicas, desde estados asintomáticos a periodos de reagudización clínica, conocidas como exacerbaciones, con aumento en la producción de esputo, tos, disnea o hemoptisis, y relacionadas con un empeoramiento de la calidad de vida de los pacientes, incremento de las hospitalizaciones y de la mortalidad (218–220), sobre todo en asociación con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (221). Actualmente, el diagnóstico de esta enfermedad está aumentando con el envejecimiento de la población. La prevalencia varía en función del área geográfica de estudio, así en Alemania, entre 2005 – 2011, los nuevos casos diagnosticados aumentaron de 8,9 a 10,6 / 100.000 personas (222) y en UK, entre 2004 – 2013, de 19,7 a 31 / 100.000 personas (223).

La teoría del círculo vicioso de Cole es la más aceptada para explicar el mecanismo fisiopatológico de las bronquiectasias. Considera que el remodelado anormal de las vías aéreas es el resultado de una sucesión de eventos que se prolongan en el tiempo de forma persistente y progresiva. Tales eventos son: daño en el aclaramiento mucociliar, retención de secreciones en las vías aéreas que alteran las barreras inmunitarias, establecimiento de infecciones crónicas y daño en el tejido pulmonar por la respuesta inflamatoria (219,224). El ciclo puede comenzar de forma variable dependiendo de la etiología subyacente de la bronquiectasia (224,225), aunque un 24 – 50% de los casos se relacionan a una

causa infecciosa (220,226,227). Sin embargo, al tratar de manera individual la causa desencadenante del ciclo, no se logra detener completamente este círculo vicioso, y con ello el desarrollo de las bronquiectasias. Actualmente, una modificación del modelo de Cole es la más utilizada para explicar el mecanismo fisiopatológico. Compara el proceso con un vórtice, de forma que cada paso contribuye a todos los demás, y consecuentemente, aboga por un tratamiento multimodal que aborde todos los aspectos de la enfermedad (Figura 4) (228).

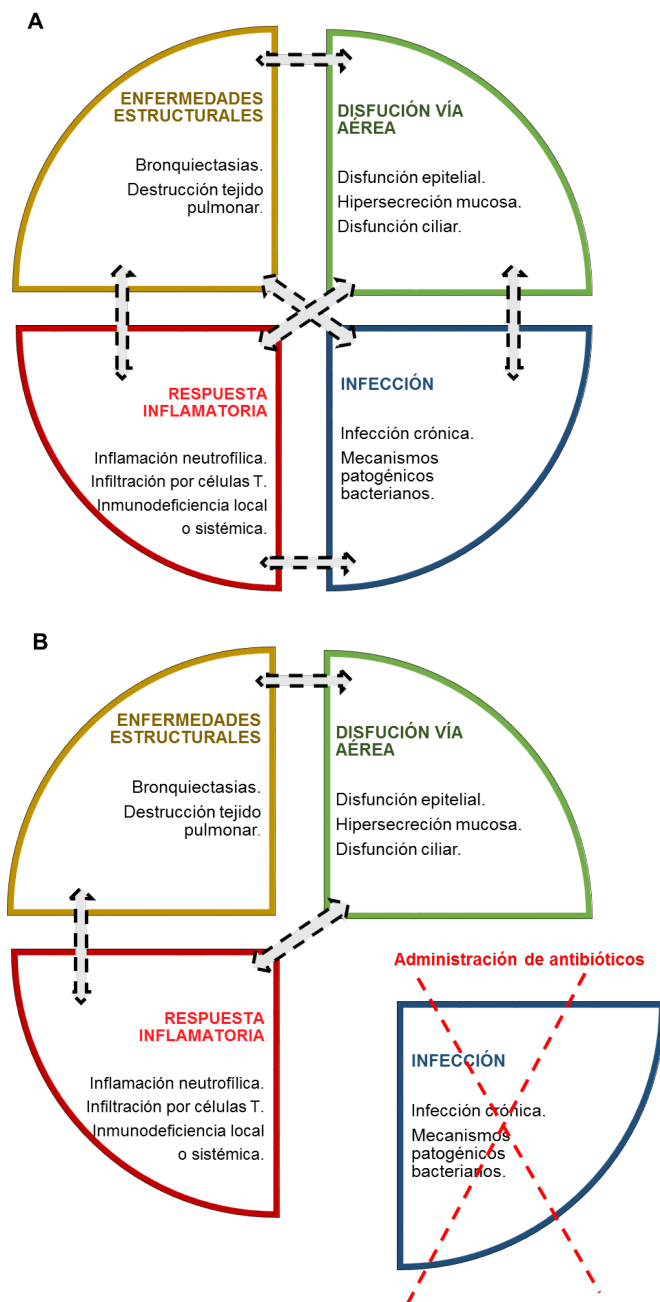


Figura 4. Modelo del vórtice que describe la patogénesis de las bronquiectasias. (A) Los diferentes eventos están conectados entre sí y promueven la persistencia y progresión a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si se produjese una alteración en el aclaramiento mucociliar y se retiene mucosidad en la vía aérea, se altera la barrera defensiva, aumentando la susceptibilidad a infecciones. Pero también puede causar una respuesta inflamatoria que ocasiona daño tisular y un remodelado anormal de las vías. (B) El tratamiento aislado de uno de los vórtices del modelo, por ejemplo, con antibióticos, no supondría un bloqueo total del ciclo, de manera que la inflamación y el daño tisular seguirían produciéndose por otros estímulos (228).

El control de las exacerbaciones es el principal objetivo terapéutico y aunque presenten un comportamiento muy heterogéneo y poco conocido, se considera de forma general que su origen es infeccioso y por ello las guías proponen el empleo de antibióticos (218). Diferentes estudios revelan que la microbiota colonizadora en las bronquiectasias está compuesta por distintas especies bacterianas, víricas y fúngicas. La pérdida de esta diversidad o el predominio de una especie sobre las otras, está ligado a un empeoramiento de la función pulmonar, aparición de más exacerbaciones, sobre todo cuando el sobrecrecimiento es por *Pseudomonas aeruginosa* (229,230), y a un aumento de la mortalidad (231).

El microorganismo predominante aislado en colonizaciones o exacerbaciones es variable según el área a estudio. En Reino Unido e Italia, al igual que en China y en Sudamérica destaca *P. aeruginosa*, mientras que en Alemania predomina *Haemophilus influenzae* (220,232,233,234). El aislamiento de MNT es muy variable, desde el 2% o menos (220,233,234) hasta el 12% (232). En contraste, en Estados Unidos las MNT suponen más del 50% de los casos relacionados con bronquiectasias, siendo las especies más frecuentes *M. avium*, *M. abscessus* y *M. chelonae* (235).

Las bronquiectasias relacionadas con MNT, comparten características con otros endotipos, como las asociadas a fibrosis quística o disfunción ciliar, lo cual sugiere que la etiología de la condición es multifactorial y que los defectos del aclaramiento mucociliar pudieran tener un papel importante (224). Sin embargo, si la enfermedad pulmonar por MNT es causa o efecto de bronquiectasias es una cuestión controvertida (236). Hay evidencias que apoyan ambas líneas. Está ampliamente aceptado el incremento de susceptibilidad a desarrollar infecciones o

colonizaciones por MNT en pacientes con bronquiectasias secundarias a fibrosis quística (237) o en pacientes con bronquiectasias posinfecciosas secundarias a una tuberculosis previa (34). Por otro lado, diversos autores asocian el desarrollo de bronquiectasias con la progresión de una infección por MNT. Fujita et al. describen los hallazgos patológicos observados en resecciones parciales de pulmón de individuos previamente diagnosticados por enfermedad pulmonar por MAC y aíslan el patógeno de las lesiones granulomatosas observadas en las bronquiectasias (238). Moore et al. realizan un estudio de la evolución de los patrones radiológicos de pacientes con enfermedad pulmonar por MAC y resaltan el empeoramiento de las bronquiectasias preexistentes, así como la aparición en nuevas localizaciones en el transcurso de la infección (239).

El reclutamiento de neutrófilos a las vías aéreas está aumentado sobre todo durante infecciones o exacerbaciones (240) pero también durante procesos de colonización (241). La inflamación producida en el parénquima pulmonar es compleja y heterogénea, por lo que los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad todavía no están bien establecidos. La desgranulación neutrofílica se ha relacionado con el daño y la remodelación tisular producida. Las serin-proteasas están implicadas en la liberación y activación directa de citocinas proinflamatorias que activan MMP y promueven la degradación de la matriz celular. Además, la proteinasa 3 activa la IL-8, quimiocina importante en el reclutamiento de neutrófilos (194,242). La elastasa leucocitaria, se relaciona con el pronóstico y la gravedad de las bronquiectasias (242,243).

7. MODELOS DE INFECCIÓN *in vitro* DE CÉLULAS HUMANAS CON *Mycobacterium sp*

Para analizar el complejo curso de una micobacteriosis es necesario el empleo de diferentes modelos de infección que reproduzcan las distintas condiciones que se van sucediendo. Para el estudio del crecimiento intracelular micobacteriano se emplean modelos de infección *in vitro*, pero los resultados obtenidos pueden estar condicionados por una amplia variedad de factores durante el diseño o desarrollo de los mismos (244). En consecuencia, se genera una falta de consenso acerca de la actividad anti-micobacteriana de las células fagocíticas que dificulta el progreso de la búsqueda de biomarcadores que permitan tanto el diagnóstico precoz de la infección y su estratificación, así como la valoración de la respuesta inmunitaria protectora durante el desarrollo de nuevas vacunas o antibióticos (245).

El modelo celular humano más empleado e importante para las infecciones de células primarias son los monocitos aislados de sangre periférica. A partir de una muestra de sangre periférica heparinizada, las células mononucleares se aíslan por sedimentación en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (246) o Lymphoprep (247), de donde se obtienen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC en inglés), compuestas por monocitos y linfocitos. Los monocitos se pueden purificar por métodos de adherencia, dada su capacidad de adhesión al plástico, mientras que los linfocitos se eliminan con sucesivos lavados (246), por centrifugación a contracorriente con un sistema elutriador (248) o por separación inmunomagnética empleando partículas marcadas con anticuerpo monoclonal anti-

CD14 (247). Con estos últimos métodos se pueden aplicar cantidades uniformes de células en cada infección. Las células se suspenden en medio de cultivo, como medio Eagle (DMEM) (249) o más frecuentemente RPMI-1640, suplementado con cantidades variables de suero, generalmente desde 1% a 20% (250). La viabilidad de las células se puede determinar por tinción con azul tripano (247,251) y la pureza por la actividad de la esterasa no específica (252), o ambas características por citometría de flujo (247,253) . El recuento de los monocitos adheridos se puede realizar mediante la tinción de los núcleos con Naphtol Blue Black, después de la lisis celular con detergentes (254).

La diferenciación a macrófagos sucede espontáneamente al adherirse al plástico de la placa (macrófagos derivados de monocitos) o por incubación con suero (255,256) o con plasma (257) y/o añadiendo factores estimulantes colonias de granulocitos y/o macrófagos (GM-CSF o M-CSF) (258) y citocinas, como TNF α (257). Se ha descrito que, al diferenciar los monocitos con suero, los macrófagos resultantes tienen menor supervivencia al ser infectados, y son, por lo tanto, peor control de crecimiento bacteriano, que empleando plasma a una concentración óptima del 40%, durante los mismos tiempos de incubación, factor que también afecta a la supervivencia celular y bacteriana. Añadiendo factores estimulantes no se mejoraba la viabilidad ni la actividad de los macrófagos diferenciados solamente con plasma (257).

Los macrófagos alveolares (250,252,259) y neutrófilos (260,261) también constituyen modelos relevantes. Los macrófagos alveolares se aíslan de BAL, tras métodos de centrifugación (252,259) o paso por filtros de tamaño de poro de 100 μ m con una solución tampón de lavado con DNAsas (250), y posterior adherencia,

al igual que los monocitos. Los neutrófilos purificados se obtienen a partir de sangre periférica total anticoagulada con heparina (261) o con citrato (260), por medio de un gradiente con dextrano y posterior gradiente de densidad con Ficoll (261) o directamente a través de un gradiente de sedimentación con Optiprep o Percoll (260,262). Se puede verificar la pureza obtenida observando los núcleos celulares tras una tinción de Wright-Giemsa y la viabilidad con tinción de azul tripano (260) o, por fluorescencia, con yoduro de propidio (263).

Otros modelos con células inmunes purificadas lo constituyen macrófagos esplénicos (259), microglía (264,265), células dendríticas (266), linfocitos T y las células NK, aunque generalmente estas últimas en cocultivo con macrófagos infectados (267,268).

Los modelos con líneas celulares se emplean ampliamente. Las más usadas son líneas monocíticas precursoras de macrófagos tras su posterior diferenciación, principalmente con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), como la THP-1 (269,270), HL60 (271) o U937 (272). Sin embargo, a pesar de eliminar la variabilidad interindividual presente con modelos celulares primarios, al interpretar los resultados hay que tener presente que carecen de algunos receptores clave y marcadores de maduración macrofágicos (273). Otras líneas no fagocíticas empleadas, para el estudio de la invasión y crecimiento de diversas micobacterias, son A549 (células del epitelio alveolar) (127), HeLa (células epiteliales del cuello uterino) (125), HULEC y HMEC-1 (células del endotelio vascular) (274) o HT-29 y HEP-2 (células del epitelio intestinal y faríngeo, respectivamente) (124).

Por último, un modelo interesante es el de sangre total en el que se representan todos los mecanismos inmunológicos, innatos y humorales, que

cooperan entre sí para eliminar a la micobacteria. El proceso de preparación previo a la infección es sencillo, comparado con la purificación de modelos celulares. Solamente es necesario realizar una dilución 1:1, generalmente con RPMI-1640, de un pequeño volumen de muestra de sangre periférica (275–277).

La infección de estos modelos se puede realizar seleccionando cepas bacterianas mantenidas en laboratorio o procedentes de aislados clínicos (259,270). Para *M. tuberculosis* las cepas empleadas con más frecuencia son H37Rv, H37Ra (“v” virulenta y “a” avirulenta) (250,252,274) y Erdman (255,257), o HN878 y CDC1551 (277). El uso de cepas procedentes de aislados clínicos complica la estandarización de los diferentes modelos por las variaciones en la expresión de factores de virulencia existentes entre cepa y cepa (270), pero tal vez reflejen más fielmente el comportamiento natural.

La pared celular de las micobacterias presenta características hidrofóbicas que favorecen la agregación de los bacilos durante su multiplicación. Los acúmulos bacterianos impiden la obtención de cultivos homogéneos y la adecuada interacción con las células fagocíticas durante el posterior proceso de infección, por lo que suele ser necesario obtener una suspensión con bacterias individualizadas antes de proceder con las infecciones correspondientes. Hoal-van Helden et al. observaron diferencias en el control del crecimiento bacteriano en función de la disgregación del inóculo alcanzada por diferentes métodos. Con una mayor presencia de acúmulos bacterianos, la mayoría de los macrófagos eran incapaces de fagocitar las bacterias y, por lo tanto, controlar su crecimiento. Sucedió lo contrario cuando se presentaban pequeñas agregaciones bacterianas o bacilos aislados (278).

Son muchos los métodos utilizados, individualmente o en combinación (127,279), por diferentes autores para prevenir, disgregar o eliminar estos acúmulos. Uno de los métodos más empleados consiste en el uso de medio líquido de cultivo en rotación (252,277) y/o con adición de detergentes: Tween, Triton X-100, Genapol (280) o Tyloxapol (281).

El Tween 80, a bajas concentraciones, se emplea de forma habitual por favorecer el crecimiento de micobacterias, tal vez porque el transporte de nutrientes se ve favorecido al alterarse la permeabilidad de la membrana por su acción detergente o por el aporte de ácido oleico al ser hidrolizado (280,282). Sin embargo, por un lado, concentraciones altas de ácido oleico pueden causar toxicidad sobre la micobacteria, lo cual se evita añadiendo albúmina. Por otro lado, la acción detergente puede afectar a la integridad de la cápsula y otros determinantes antigénicos de membrana, de manera que, se compromete la virulencia de las micobacterias y su interacción con las células inmunitarias. Además, se han descrito variaciones en la morfología de las colonias (de rugosa a lisa) en *M. paratuberculosis* (280) y MAC (283), también relacionadas con el grado de virulencia, por alteraciones en los GPLs de membrana. El uso de detergentes no hidrolizables (Genapol y Tyloxapol) evitan la interferencia metabólica, pero no la antigénica (284). Por lo tanto, el empleo de estos productos puede dificultar la interpretación de los resultados, en función de la finalidad del ensayo.

Para otros métodos, se realiza una suspensión bacteriana en medio celular, con las colonias crecidas en medios sólidos, y se procede a su agitación con bolas de vidrio de pequeño diámetro (253,285) o vórtex (286), paso a través de agujas 25G (247) o de filtros con tamaño de poro de 5 μm (287), sonicación (246,251,288),

sedimentación (289), pipeteo (278) o adición Triton X-100 (257). Con estas técnicas se logra una reducción importante de los agregados, pero no total. Sin embargo, muchos autores consideran aceptable la presencia de pequeños agregados, con menos de 5 bacilos, si existe un predominio de bacterias individualizadas (279,286).

Las micobacterias individualizadas se cuantifican por métodos turbidimétricos con ajuste a la escala McFarland (253), recuento directo en cámara Petroff-Hauser (290) o tras el crecimiento a partir de diluciones seriadas en medio sólido, 7H10 (286) o 7H11 (291), o en medio líquido empleando un microscopio invertido (292). Con estos dos últimos métodos se garantiza que el recuento solamente sea de bacterias vivas, si no, será indispensable realizar un último paso en el proceso, el análisis de la viabilidad de las micobacterias, generalmente por el kit Baclight. Posteriormente, se emplean en fresco o se conservan por congelación a -70 o -80 °C, empleando crioprotectores como el glicerol (10 – 20%) en alícuotas de un solo uso a fin de generar un amplio stock uniforme.

Durante el proceso de infección celular para valorar la actividad anti-micobacteriana dos puntos importantes a tener en cuenta son, la multiplicidad de infección (MOI) y el medio empleado en la incubación.

El empleo de MOI altas, produce apoptosis de las células y su rápida progresión a necrosis. Infectando macrófagos con *M. tuberculosis* a MOI superiores a 25, se observó a 3 h, 6 h y 20 h un porcentaje de células necróticas de 10%, 50% y 90%, respectivamente. La liberación al medio de la micobacteria tras la muerte celular por necrosis, dificulta que sea fagocitada por nuevas células y se favorece su persistencia. Lo contrario sucede con MOI por debajo de 10, en las que también se producen fenómenos de apoptosis, pero de instauración más lenta y con mejor

control del crecimiento micobacteriano por las células fagocíticas (293). Por este motivo, muchos autores seleccionan MOI bajas, generalmente de 1 a 5, con tiempos de incubación cortos, de 1h a una noche, que hacen necesario la realización de lavados posteriores, usualmente con RPMI 1460 o tampón fosfato, y/o la adición de antibióticos aminoglucósidos (amikacina o gentamicina) para eliminar las bacterias no fagocitadas o inhibir su crecimiento (252,268,286,294), respectivamente. Otros autores seleccionan MOI muy bajas, de 0,1 – 0,2, que permiten prolongar los tiempos de incubación desde 24 h hasta 2 semanas (257,270) y prescindir de más pasos o sustancias adicionales (251,257). Con estas MOI las células mantienen su viabilidad estructural (295). Para experimentos en los que la finalidad es la detección de citocinas o ROS, se suelen emplear MOI más altas, desde 10 (256,296,297) hasta 50 (298), o en los que se infecten células no fagocíticas (265,299).

En el mercado existen muchos medios de cultivo apropiados para las infecciones *in vitro*. Con células primarias el más utilizado es RPMI 1640 suplementado con cantidades variables del 5 al 30% de suero humano, autólogo o heterólogo, o suero fetal bovino (252,267,268,270,274,286) o 40% de plasma (257). Sin embargo, para que las condiciones de incubación sean reproducibles, sin interferencias por moléculas presentes, en suero o plasma, que puedan afectar a la regulación de la actividad de los fagocitos, algunos autores prefieren emplear medios comerciales sin suero (300). Las células fagocíticas presentan una amplia variedad de receptores en su superficie que interaccionan simultáneamente con diversos ligandos. No todos los receptores requieren la opsonización de la micobacteria para que se produzca la fagocitosis, por lo que el uso de suero no es

imprescindible para muchos tipos de ensayos (137,262,301). Lamhamedi et al. validaron el uso del medio comercial sin suero para macrófagos (M-SFM) infectando monocitos y macrófagos con *M. bovis* BCG. Observaron que la supervivencia y diferenciación de monocitos en macrófagos sucedía de acuerdo con los criterios morfológicos y funcionales. La actividad anti-micobacterina *in vitro* se correlacionaba con el fenotipo clínico de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y voluntarios sanos (300).

Para finalizar con la valoración de la actividad inmunológica se procede con el recuento bacteriano. El análisis del nivel de replicación intracelular se puede realizar empleando directamente tinciones específicas, como Kinyoun (246,298), y expresando el resultado en número de bacilos por célula, o mediante el recuento directo del total de bacterias fagocitadas, para lo cual, es necesario realizar un procedimiento de lisis celular que ha de ser de ser cuidadosamente seleccionado para no alterar la viabilidad bacteriana. El método más extendido es el uso de detergentes, en concreto, dodecil sulfato de sodio (SDS) y posterior neutralización con albúmina sérica (252,255,268), aunque se pueden emplear otros emulsificantes como, Triton X-100 (257,259,265), saponina (291,297,302), digitonina (303) o Tween 80 (288). Otros autores realizan lisis hipotónicas con agua destilada (261,277,304). A continuación, se realizan diluciones seriadas con las bacterias liberadas y se inoculan habitualmente en medios sólidos. Tras el tiempo de crecimiento necesario, en función de la especie empleada, se cuentan las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Una alternativa, que permite reducir el tiempo de incubación, es inocularlas en medio líquido 7H9. Por las características

hidrofóbicas de las micobacterias, se van a generar microcolonias fácilmente visibles con un microscopio invertido (292).

Se han desarrollado métodos indirectos, más sensibles y rápidos, fundamentados en la medida de fluorescencia emitida, para la detección de crecimiento micobacteriano, como los medios líquidos automatizados basados en el consumo de oxígeno (MGIT BACTEC, Becton Dickinson) (277,305) o el uso de cepas micobacterianas modificadas genéticamente, con la incorporación del gen *lux*, para la expresión de luciferasa (*M. bovis* BCG (275,303,306) o *M. tuberculosis* (276)) o plásmidos que contienen genes de proteínas fluorescentes de varios colores (302).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Las micobacteriosis causadas por MNT se consideran actualmente un desafío emergente en salud pública de enfermedades crónicas pulmonares. Si bien la tuberculosis continúa siendo una de las principales causas de muerte por enfermedad infecciosa, la incidencia de las micobacteriosis se ha visto incrementada en los últimos años, asociándose a una respuesta inflamatoria en las vías aéreas que da lugar a formas fibrocavitadas, similar al observado en tuberculosis, o a formas bronquiectásicas, causadas por un remodelado patológico del parénquima y dilataciones de las vías aéreas.

El desarrollo de la enfermedad no se produce en todas las personas que entran en contacto con las diferentes micobacterias. Aunque se ha descrito un amplio abanico de factores de riesgo, extrínsecos e intrínsecos al hospedador, que favorecen la evolución de la infección, todavía desconocemos numerosos detalles de los mecanismos inmunológicos que permiten controlar la proliferación de estos patógenos en el organismo. Entre otros factores de riesgo, destacan el tabaquismo y las bronquiectasias. Se ha comprobado que el tabaquismo aumenta el riesgo de padecer micobacteriosis, y también empeora la respuesta al tratamiento. Por otro lado, la íntima relación entre las micobacterias no tuberculosas y las bronquiectasias ha sido clínicamente reconocida desde que se ha constatado el aumento de la prevalencia de las micobacteriosis.

La diversidad de modelos empleada para el estudio *in vitro* de la infección por micobacterias no ha conseguido reproducir adecuadamente la respuesta inmune fisiológica.

PLANTEAMIENTO

Como consecuencia, ha surgido la necesidad de optimizar continuamente los modelos de infección, buscando que representen cada vez mejor la realidad clínica. Los modelos más empleados se han basado en la utilización de líneas celulares de origen hematopoiético, y de células primarias purificadas a partir de sangre.

Un modelo de infección *in vitro* poco utilizado, quizás por la complejidad de la interpretación de los resultados, es el que utiliza sangre completa. Sin embargo, cuenta con varias ventajas: contiene una representación de las células que participan en la respuesta inmune frente a las micobacterias, principalmente, monocitos, neutrófilos y linfocitos; es un espécimen relativamente fácil de obtener; su empleo directo minimiza la manipulación de la muestra; y permite el estudio de la interacción entre los factores celulares y humorales presentes en la sangre, lo que presumiblemente refleja mejor los fenómenos inmunológicos que ocurren *in vivo*.

Hay una gran heterogeneidad en la respuesta a las infecciones *in vitro*, tanto en lo relativo al origen de las células infectadas, como a las cepas de micobacterias empleadas. La utilización de líneas celulares y de cepas de referencia supone varias ventajas, incluyendo la homogeneización de las condiciones experimentales y reproducibilidad de los resultados, así como una notable simplificación de la metodología. Sin embargo, si se cuentan con los medios apropiados, es preferible reflejar la diversidad clínica empleando células primarias, obtenidas tanto de pacientes como de voluntarios sanos, y aislados clínicos, con un pequeño número de pases, para conservar sus características de virulencia. Un problema de emplear estas cepas es que debemos asegurar que son realmente distintas, y que no corresponden a un brote, al mismo aislado obtenido repetidamente del mismo paciente o, incluso, que no ha habido una contaminación cruzada. Para conseguir este propósito debemos contar con algún método de discriminación. Los más extendidos

son los de genotipado, pero son técnicamente complejos y en ocasiones, poco discriminativos.

En virtud de lo expuesto, nos planteamos :

1. Optimizar un modelo de infección *in vitro* de sangre completa para analizar la actividad antimicobacteriana frente a diversas especies del género *Mycobacterium*, seleccionadas en función de su grado de patogenicidad. Para ello, nos basamos en la hipótesis que sostiene que en la sangre se encuentran representados varios de los mecanismos responsables de la inmunidad protectora frente a la tuberculosis, y que esta respuesta sería diferente entre *M. tuberculosis* y otras micobacterias no tuberculosas, dado su distinto grado de patogenicidad.

2. Estudiar el tabaquismo como factor de riesgo, realizando infecciones *in vitro* y empleando células aisladas de sangre periférica de fumadores y no fumadores.

3. Desarrollar métodos de genotipado de cepas de micobacterias con un índice de discriminación adecuado, que permitan una rápida y sencilla caracterización de aislados clínicos.

Objetivo general

Evaluación de distintos modelos de infección con *M. tuberculosis* y otras micobacterias no tuberculosas, que permitan reproducir *in vitro* mecanismos de respuesta inmunológica a las micobacteriosis.

Objetivos específicos

1. Desarrollo de modelos *in vitro* derivados de sangre: sangre total, leucocitos, monocitos y neutrófilos.

2. Comprobación de la utilidad de los modelos de infección *in vitro*.

2.1. Comparación de la respuesta *in vitro* entre *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas.

2.2 Análisis del factor de riesgo tabaquismo.

2.3. Establecimiento de modelos de neutrófilos que reproduzcan fenómenos inmunológicos característicos de bronquiectasias.

3. Desarrollo de un método de genotipado de cepas de micobacterias para discriminar aislados clínicos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Se seleccionaron cepas de diferentes especies de *Mycobacterium* sp. aisladas en el Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE), en el Hospital Universitario del Bierzo (Ponferrada, León) y en la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias de Asturias. *M. phlei* se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Se emplearon dos cepas del complejo *M. tuberculosis*: *M. bovis* BCG-RIVM derivada de la cepa 1173-P2, utilizada en inmunoterapia en cáncer de vejiga y *M. tuberculosis* HL186T, que fue caracterizada por espoligotipado y el patrón obtenido comparado con la base de datos del Instituto Pasteur de Guadalupe. Tiene el patrón 58 del “spoligo international type” (SIT, familia T5_Madrid2), con el código octal 777777557760771. Este genotipo está incluido en el linaje Euro-americano.

Del grupo de micobacterias no tuberculosas (MNT) se seleccionaron cepas consideradas colonizantes (27, 28), exceptuando las cepas de *M. abscessus*, cuyo aislamiento sí se consideró patológico, por lo que los pacientes recibieron terapia antibiótica, incluyendo dos cepas (236ab y 237ab) aisladas de exudados oculares (Tabla 2). Se aislaron 28 cepas distintas de *M. intracellulare* y se caracterizaron por

MATERIAL Y MÉTODOS

Mycobacteria Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR, Tabla 3).

Crecimiento	Cepa	Patologías presentadas por los pacientes
Lento	<i>M. avium</i> HL70A	Leucemia linfática crónica de células B
	<i>M. kansasii</i> HL228K	Adenocarcinoma pulmonar
	<i>M. goodnae</i> HL184G	Neumoconiosis
Rápido	<i>M. chelonae</i> HL179C	Asma
	<i>M. fortuitum</i> HL253F	Fibrosarcoma
	<i>M. mageritense</i> 110mg	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
	<i>M. mageritense</i> 111mg	Neoplasia pulmonar y asma
	<i>M. phlei</i> CECT 3009	
	<i>M. abscessus</i> 236aba	Conjuntivitis
	<i>M. abscessus</i> 237aba	Conjuntivitis
	<i>M. abscessus</i> 12aba	Diabetes Mellitus 2, gammapatía monoclonal, tuberculosis previa
	<i>M. abscessus</i> 239aba	Síndrome de Kartagener
	<i>M. abscessus</i> 234aba	Síndrome del Lóbulo Medio, bronquitis crónica, tuberculosis previa

Tabla 2. Cepas de MNT empleadas. Detalle de las patologías que presentaban los pacientes, en caso de tenerlas, en el momento del aislamiento.

Cepas <i>M. intracellulare</i>	VNTR número de copias
175in	1 1 2 5 1 3 3
190in	1 1 2 5 1 3 3
210in	1 3 3 3 4 3 2
224in	1 2 3 3 1 3 3
207in	1 2 3 3 1 3 3
189in	3 3 3 4 5 3 3
202in	2 1 1 1 1 2 5
228in	1 1 1 1 0 1 2
213in	0 1 1 3 0 1 1
220in	2 1 1 1 1 2 5
218in	2 1 1 1 1 2 5
230in	2 1 1 1 1 2 5
208in	2 1 1 1 1 2 5
199in	2 1 1 1 1 2 6
186in	1 1 0 5 1 3 0
192in	0 1 0 5 1 3 0
179in	1 1 0 5 1 3 0
181in	1 1 0 5 1 3 0
182in	1 1 0 5 1 3 0
231in	0 1 0 1 1 2 0
200in	2 3 3 1 1 2 1
203in	1 1 1 1 1 2 5
180in	1 1 0 5 1 3 1
198in	2 1 1 1 1 2 6
221in	2 1 0 1 1 2 0
225in	2 2 2 1 1 1 1
201in	1 1 0 3 1 3 1
212in	1 1 1 1 1 2 0

Tabla 3. Caracterización, por MIRU-VNTR, de los 28 aislados de *M. intracellulare*.

1.1. Individualización de las micobacterias

Las micobacterias, debido a su hidrofobicidad, crecen en forma de grandes agregados. Para obtenerlas individualizadas se cultivaron en agar Middlebrook 7H11 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa, Becton Dickinson), y se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 4-(2-hidroxi-etil)-1-ácido piperazinetanosulfónico (HEPES) 25 mM. A continuación, se ultrasonicaron con un disruptor ultrasónico celular digital S-450 (Branson Ultrasonics), con pulsos de 10 s de duración a una amplitud de 10% (2W). Las bacterias sonicadas se centrifugaron a $100 \times g$ / 90 s a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante, en el cual permanecen las bacterias dispersadas. Este proceso se realizó tantas veces como fuera necesario a fin de eliminar todos los agregados posibles. Este procedimiento permite la individualización de la mayor parte de las micobacterias. Los pocos agregados que permanecieron fueron de menos de cinco bacilos. Para algunos experimentos, el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de diámetro de poro de 5 μm a fin de retener las bacterias agregadas remanentes. Para corroborar el grado de individualización y la viabilidad de las bacterias, se procedió a una tinción vital para evaluar la integridad de la membrana, empleando el kit Baclight (Molecular Probes). Las bacterias vivas se tiñen con Syto 9 (verdes), y las muertas con ioduro de propidio (rojas). La conservación y almacenamiento de las micobacterias se realizó a -80°C con un 20% de glicerol en alícuotas de un solo uso. Para cuantificarlas, se inocularon diluciones decimales por triplicado, en placas de 96 pocillos en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con ADC (albúmina, dextrosa, catalasa Becton Dickinson). La

enumeración se realizó en un microscopio invertido mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (1).

2. MUESTRAS SANGUÍNEAS

La sangre periférica fue obtenida por venopunción de voluntarios sanos en tubos Vacutainer BD Blood Collection (Becton Dickinson) unos con gel separador y otros con anticoagulante, heparina o ácido etilendiamino-tetraacético K3 (EDTA). Las extracciones se llevaron a cabo por el personal de enfermería del CAULE, previa firma del consentimiento informado, aprobado junto con el protocolo, por la Comisión Ética de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de León.

2.1. Modelos *in vitro* empleados

2.1.1. Sangre total, suero y plasma

Las muestras sanguíneas se procesaron a temperatura ambiente, en un intervalo máximo de tiempo de 3-4 horas tras la extracción. El suero se obtuvo de la muestra procedente de tubos con gel separador. Tras la formación del coágulo, se centrifugó a $1500 \times g / 10 \text{ min}$. Las muestras de sangre en tubos con anticoagulante, se homogenizaron por inversión tres o cuatro veces, antes de ser procesadas. Una fracción de la sangre total se diluyó al 40% con medio RPMI-1640. El plasma se obtuvo por una doble centrifugación, primero a $500 \times g$ durante 10 min de la sangre total; y después, el sobrenadante (plasma) a $1300 \times g / 5 \text{ min}$, para eliminar cualquier componente celular residual.

2.1.2. Leucocitos

Se purificaron por dos procesos consecutivos de hemólisis hipotónica: 1 volumen de sangre total anticoagulada se mezcló, invirtiendo el tubo suavemente, con 10 volúmenes de agua destilada durante 15-20 s, tras los que se equilibró el medio con un buffer salino de fosfato (PBS) concentrado $\times 10$. La concentración final $\times 1$ fue: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7,2 y se centrifugó a 1300 $\times g$ / 5 min. Se repitió el proceso con el sedimento obtenido. Finalmente, se consiguió un pellet que se resuspendió en medio RPMI-1640, igualando el volumen final al volumen inicial de sangre total usado para la purificación. Se procedió al recuento de leucocitos empleando una cámara Neubauer en un microscopio de contrastes de fase (Leica), asegurando que la muestra tuviese menos de un 5% de eritrocitos.

2.1.3. Macrófagos derivados de monocitos

Para la purificación de monocitos, primero se llevó a cabo un proceso de separación por sedimentación en gradiente de densidad. Una fracción de sangre total anticoagulada se diluyó en proporción 1:1 con PBS y se depositó lentamente sobre 3 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Life Science) en un tubo de 13 ml (16 \times 100, fondo redondo), aplicando 3 volúmenes de sangre diluida por 1 volumen de Ficoll. Posteriormente, se centrifugó a 400 $\times g$ / 30 min a temperatura ambiente y sin freno para evitar la mezcla de las diferentes fases (Figura 5a). Tras desechar la capa superior (plasma y plaquetas), se pipeteó cuidadosamente la capa de

células mononucleares y se depositó en un tubo limpio para la posterior realización de dos lavados con PBS. Los monocitos, células con antígenos de superficie CD14⁺, se obtuvieron por separación magnética de las células mononucleares, a través de una microcolumna, empleando un anticuerpo Anti-CD14 (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. El recuento de monocitos purificados se llevó a cabo en cámara Neubauer, en un microscopio de contraste de fases. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 con un 40% de plasma autólogo procedente de sangre heparinizada, a 37°C en 5% de CO₂.

2.1.4. Neutrófilos

Los neutrófilos también fueron obtenidos por sedimentación en gradiente de densidad, pero en este caso, con Polymorphprep (Serumwerk Bernburg AG), que produce un cambio de osmolaridad en la interfaz que favorece la separación entre células polinucleares, principalmente neutrófilos y eritrocitos. La metodología a seguir fue similar a la del proceso de separación anterior, aunque para esta técnica, se empleó el mismo volumen de sangre total anticoagulada sin diluir y de Polymorphprep; la centrifugación se realizó a 500 × g / 30 min (Figura 5b). Tras pipetear la capa de granulocitos y realizar dos lavados con PBS, se resuspendieron en el medio celular X-VIVO 15. El recuento celular se realizó en una cámara Neubauer.

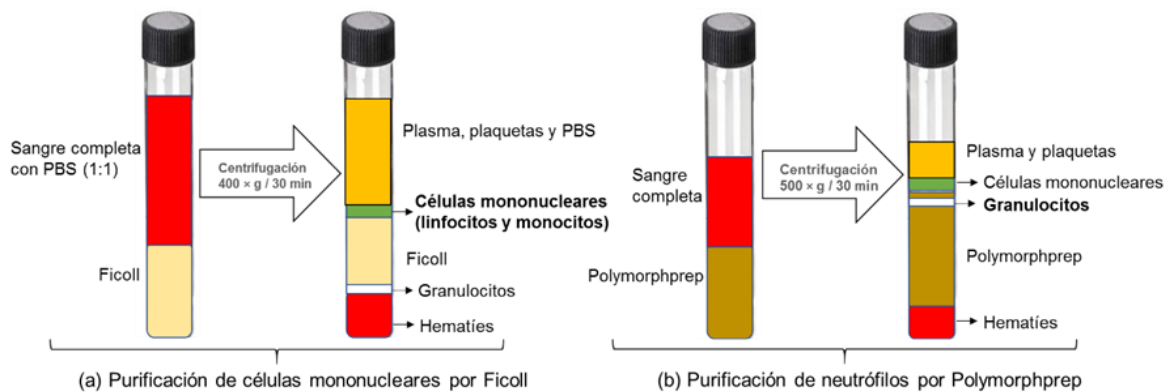


Figura 5. Purificación de células mononucleares y polinucleares. (a) Ficoll. (b) Polymorphprep.

2.1.5. Purificación de células mononucleares y granulocitos por doble gradiente de sedimentación

Las distintas fracciones celulares se purifican por sedimentación en gradientes de densidad, así para las células mononucleares se emplean soluciones con densidad = 1077 g/ml y para las células granulocíticas se usan soluciones con densidad = 1113 g/ml; sin embargo, al emplear un doble gradiente, la separación entre las bandas de ambas poblaciones celulares es mayor, minimizando la contaminación cruzada.

Inicialmente se depositó cuidadosamente, un volumen de Polymorphprep y después un volumen suficiente de Ficoll para formar una capa de 1 cm. A continuación, se añadió lentamente un volumen de sangre total sin diluir equivalente al de Polymorphprep empleado. Se centrifugó a $460 \times g / 30 \text{ min}$ a temperatura y sin freno, al igual que en las purificaciones anteriores (Figura 6). Se pipeteó cuidadosamente cada capa celular y se transfirieron a tubos diferentes para

proceder con un doble lavado con 10 volúmenes de PBS. Por último, las células se resuspendieron en un medio celular sin suero y se contaron en cámara Neubauer.

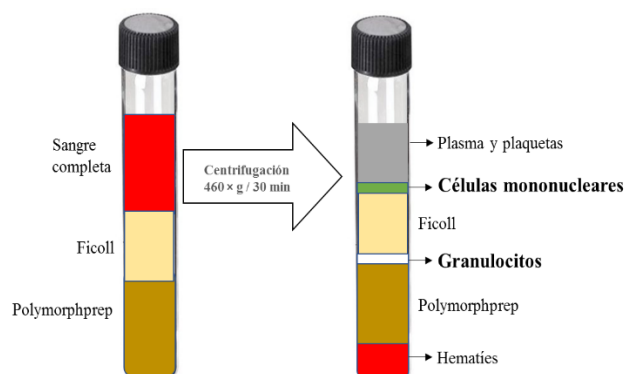


Figura 6. Purificación conjunta de células mononucleares y granulocíticas empleando un doble gradiente de sedimentación.

2.2. Infecciones *in vitro*

Cada experimento se realizó con múltiples muestras procedentes de diferentes voluntarios, de forma independiente. El volumen final de cada infección fue de 100 μ l, empleando distintas concentraciones de sangre total, monocitos, leucocitos y neutrófilos, en función de las necesidades del ensayo. La concentración de bacterias empleada también fue variable, con una MOI desde 0,03 a 0,1 bacterias por célula. Las infecciones se realizaron mezclando el inóculo bacteriano con la suspensión celular en tubos de 2 ml (sangre total) o en placas de 96 pocillos y procediendo a la incubación en una plataforma rotatoria o sobre una superficie horizontal estática, respectivamente, a 37°C los tiempos indicados en cada experimento. Transcurrido este periodo, se procedió a la lisis celular para el

análisis de micobacterias supervivientes, mediante sonicación, con una amplitud al 10% (2W) durante 3 - 5 segundos. Se inocularon por triplicado 100 µl de diluciones decimales en medio 7H9 enriquecido con ADC de cada suspensión sonicada en placa de 96 pocillos, que posteriormente fue incubada a 37°C en 5% de CO₂ durante diferentes tiempos en función del crecimiento de cada especie micobacteriana, 2-3 días en el caso de *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. mageritense*, *M. abscessus* y *M. phlei*; 5-6 días para *M. avium*; y 7-9 días para *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. gordonae* y *M. bovis* BCG. El recuento de las UFCs se realizó en la placa con un microscopio invertido DMIL (Leica) a 100 × aumentos (1).

3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción intracelular de ROS se midió mediante una reacción química empleando como sustrato el luminol, el cual tras reaccionar con los agentes oxidantes del medio y formar un anión electrónicamente excitado, regresa a su estado fundamental con emisión de fotones (quimioluminiscencia). La luz emitida es proporcional a la producción de ROS. Se mezclaron leucocitos (40 μ l), plasma autólogo procedente de sangre heparinizada o anticoagulada con EDTA (40 μ l), luminol 500 μ M (Sigma-Aldrich) y solución de Hanks equilibrada con sal (HBSS) (0,185 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,098 g/L MgSO_4 ; 0,4 g/L KCl; 0,06 g/L KH_2PO_4 ; 0,048 g/L NaHCO_3 ; 8 g/L NaCl; 0,048 g/L Na_2HPO_4 ; 1 g/L D-Glucosa y 0,35 g/L NaHCO_3 ; pH = 7,2 – 7,6), hasta un volumen final de 100 μ l. Como control positivo de la reacción se empleó lipopolisacárido de *E. coli* 0111:B4 (LPS, 20 μ g/ml, Sigma-Aldrich). Se incubó durante 30 min a 37 °C y se dispensó en una placa opaca de 96 pocillos. La luz emitida se midió a 21 °C en un detector TopCount-NXT microplate scintillation and luminescence counter (Packard Instrument Company). La formación de ROS se expresó como fotones contados por segundo (cps).

3.2. Producción de citocinas

La producción de citocinas se determinó por ELISA tipo sándwich. Se trata de una técnica colorimétrica en la que un anticuerpo de captura, unido a los pocillos de la placa, interacciona con la molécula en estudio cuando se deposita la muestra.

A continuación, se añade un anticuerpo de detección biotinilado, que también se une a la molécula previamente ligada al anticuerpo de captura. Al añadir estreptavidina-peroxidasa, esta reacciona con la biotina del anticuerpo de detección facilitando la reacción del enzima con el sustrato de la peroxidasa, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Figura 7). Se produce un cambio de color, cuantificado por espectrofotometría, que es directamente proporcional a la concentración de citocina a estudio. Se empleó una mezcla de leucocitos (360 μ l), plasma autólogo heparinizado o con EDTA (360 μ l) y RPMI-1640 hasta un volumen final de 900 μ l, que se incubó toda la noche a 37°C en un agitador orbital. Como control positivo se empleó LPS (20 μ g/ml). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14.000 g / 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante, se volvió a centrifugar a 10.000 \times g / 3 min a temperatura ambiente en ultrafree MC filter units (Millipore ibérica) con un tamaño de poro de 0,45 μ m, para eliminar las micobacterias residuales, y el filtrado se congeló a -80°C hasta el análisis. La medida de citocinas se realizó empleando los kits de inmunoensayos IL-1 β ELISA, TNF- α ELISA e IL-6 ELISA (Diacclone), siguiendo las instrucciones del fabricante.

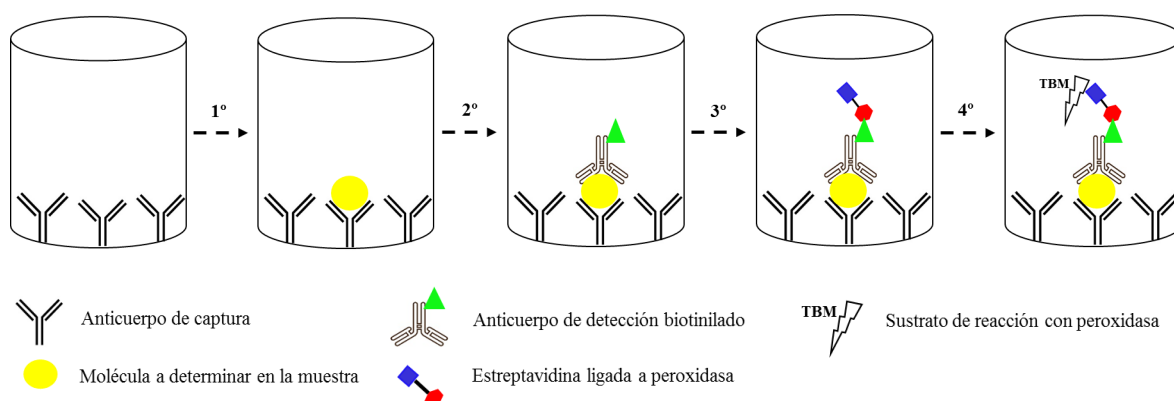


Figura 7. Determinación de citocinas mediante ensayo de ELISA tipo sándwich.

3.3. Ensayo de Gelatinasa

Para determinar la actividad proteolítica de las enzimas liberadas desde los gránulos de neutrófilos activados e involucradas en la remodelación de la matriz, se empleó el modelo descrito por Ratnikov et al, con algunas modificaciones (2) (Figura 8).

A las 24h de incubación de la infección correspondiente, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a $10.000 \times g / 3 \text{ min}$ a temperatura ambiente en ultrafree MC filter units (Millipore ibérica) con un tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$. Se congelaron a -80°C hasta el análisis.

Para generar gelatina biotinilada, se disolvió en $180 \mu\text{l}$ de agua, 1 mg de EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin (Pierce Biotechnology), y se añadieron 4 ml de gelatina al 10% en PBS. Se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Para eliminar los residuos de biotina no ligados, se pasaron 4 ml de gelatina biotinizada diluida en PBS 1/100 por una columna Zeba Spin Desalting (7 K, 10 ml , Pierce Biotechnology). El resultante, se congeló a -40°C .

Placas con estreptavidina ligada (Nunc), se hidrataron depositando $300 \mu\text{l}$ de solución de lavado (PBS - $0,05\%$ Tween 20) en cada pocillo durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 5 veces con la misma solución.

Para proceder con el análisis de proteasas, $93 \mu\text{l}$ del sobrenadante de la infección se mezclaron con $7 \mu\text{l}$ ($1,2 \mu\text{g}$ en el stock de gelatina obtenido) de gelatina biotinilada y se añadieron a la placa con estreptavidina hidratada. Se incubaron durante 2 h a 37°C . Finalmente, los pocillos se lavaron cinco veces para eliminar los restos hidrolizados no unidos y se añadieron $100 \mu\text{l}$ de TMB ELISA peroxidase substrate (Rockland). Las reacciones colorimétricas se pararon con $100 \mu\text{l}$ de

H₃PO₄ 1M y se procedió a la medida a una longitud de onda de 450 nm usando el lector ELISA Reader Opsys MR (Dynex).

Considerando que 1,2 µg de gelatina biotinizada es el 100%, se realizó una curva patrón con siete puntos diluyendo con PBS a 2/3, del 100% al 8,8%. Los sobrenadantes con mayor actividad proteolítica producen menor señal, al permanecer menos gelatina biotinizada hidrolizada unida a la estreptavidina tras los lavados.

MATERIAL Y MÉTODOS

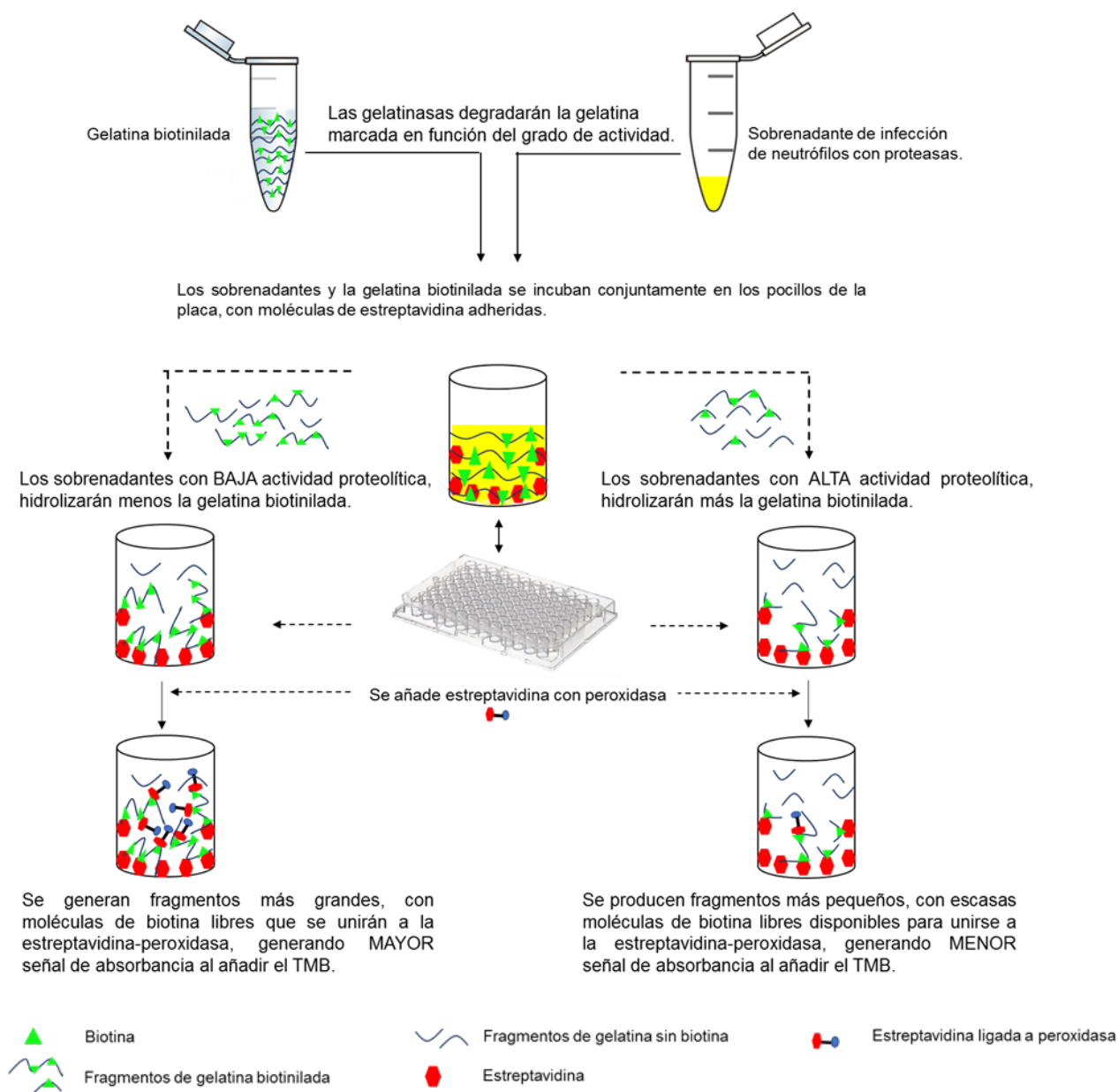


Figura 8. Ensayo de gelatinasa. Determinación de la actividad proteolítica.

3.4. Ensayo para la valoración de quimiotaxis

La respuesta inflamatoria normal, requiere la migración de leucocitos a través de los vasos sanguíneos al sitio de infección en respuesta a la liberación de factores quimiotácticos en dicho lugar. Para realizar esta valoración *in vitro* se partió del sobrenadante resultante de la infección de 10^5 leucocitos (50 μ l) con 10^3 bacterias (450 μ l) en un volumen final de 500 μ l, tras 24h de incubación en placas de 48 pocillos.

Se inocularon 235 μ l de sobrenadante en dos pocillos de una placa HTS Transwell con insertos permeables de 8 μ m de tamaño de poro (Corning). Se purificaron neutrófilos de individuos sanos (10^5 en 75 μ l) que se depositaron sobre el soporte de cada uno de los dos pocillos de la placa. Trascorridas 2h de incubación se extrajeron los insertos y se procedió al recuento de las células que migraron usando una cámara Neubauer (Figura 9). La normalización de las células migradas se realizó comparando el recuento obtenido de neutrófilos del pocillo correspondiente a los sobrenadantes de leucocitos no infectados.

MATERIAL Y MÉTODOS

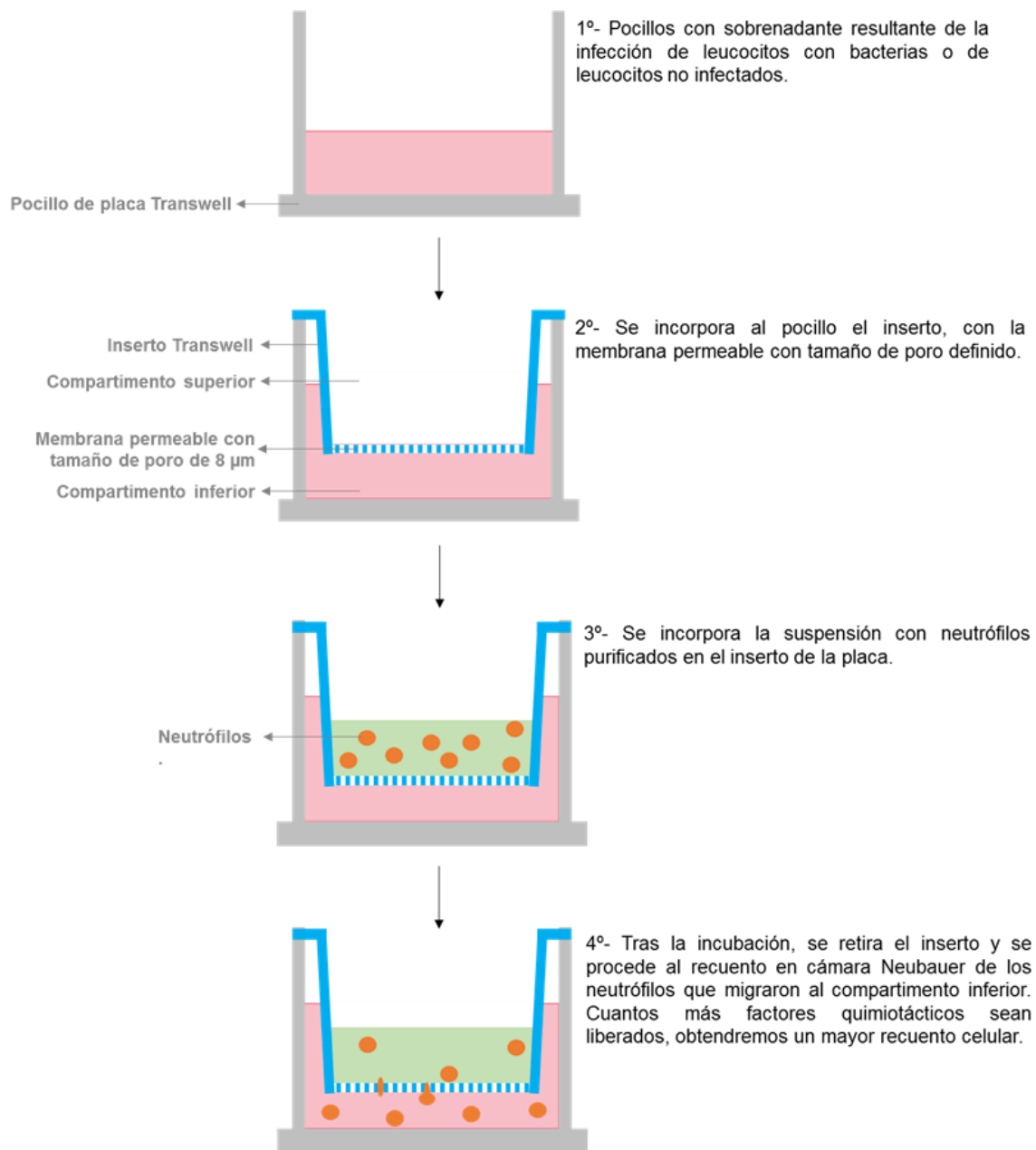


Figura 9. Ensayo para la valoración de quimiotaxis.

4. TÉCNICAS MOLECULARES

4.1. Extracción de ADN genómico de micobacterias

Las colonias crecidas en medio sólido 7H11 enriquecido con OADC se recogieron con un asa desechable estéril y se suspendieron en 400 µl de tampón T₁₀E₁ (10 mM Tris-HCl, pH = 8 /1 mM EDTA). A continuación, las bacterias se inactivaron por calor en un bloque térmico (Bioblock Scientific), durante 30 min a 85°C.

Tras dejar enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de lisozima (10 mg/ml), se agitó con vórtex y se incubó al menos 1h a 37°C. Pasado ese tiempo se añadieron 75 µl de la solución SDS/Proteinasa K (72,5 µl de dodecil sulfato de sodio al 10% y 2,5 µl de Proteinasa K, 20 mg/ml). Se mezcló fuertemente e incubó a 65°C durante 10 min.

Posteriormente se añadieron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de solución CTAB/NaCl (10 g de CTAB, bromuro de amonio trimetil cetílico y 4,1 g de NaCl en 100 ml de agua destilada). Se mezcló fuertemente hasta que tomó un aspecto lechoso. Se incubó a 65°C durante 10 min.

Se añadieron 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló con vórtex 10 s. Se centrifugó a temperatura ambiente a 12.000 × g, 5 min. Evitando cuidadosamente la interfase blanca, se recogió la fase acuosa (sobrenadante), se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga y se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol, para precipitar los ácidos nucleicos. Se dejó a -20°C durante un

mínimo de 30 min y se centrifugó a $12.000 \times g$, 5 min. El isopropanol se decantó y sobre el pellet se añadió 1 ml de etanol frío al 70%. Se mezcló suavemente por inversión para lavar el pellet y se procedió a otro ciclo de centrifuga a $14.000 \times g$, 5 min.

Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 50 μ l de la solución tampón T₁₀E₁. La concentración de ADN se estimó espectrofotométricamente a 260/280 nm.

4.2. Análisis por AFLP: ligación de adaptadores a los fragmentos de ADN

Para el genotipado se procedió a la amplificación de fragmentos de ADN tras digestión con enzimas de restricción en base al trabajo publicado por Janssen et al (3)(Figura 10). Partiendo de una alícuota de ADN total bacteriano de 3 μ l (50 - 200ng), se procedió a su digestión durante 180 min a 37°C con las enzimas de restricción *Sac* I (3U) y *Bgl* II (2U) (Fermentas) en solución tampón Tango \times 2, incluido en el kit comercial, en un volumen final de 7,5 μ l.

Para preparar los adaptadores, se combinaron en solución tampón T₁₀E₁ los oligonucleótidos (1,6 μ M de cada uno) Sac-1 (5'- GACGATGAGTCCTGACAGCT - 3'), Sac-2 (5'- GTCAGGACTCATCG - 3') y NaCl 50 mM para hibridarlos en un termociclador, empleando un gradiente de temperatura de 90°C a 20°C, descendiendo 1°C por minuto. Las condiciones de la hibridación para Bgl-1 (5'- GACGATGAGTCCTGAG - 3') y Bgl-2 (5'-GATCCTCAGGACTCATCG - 3') fueron

las mismas. Cada uno de los adaptadores, denominados Sac y Bgl, se mezclaron en proporciones equivalentes (Sac + Bgl) y se almacenaron a -20°C.

La ligación de los adaptadores a los fragmentos de ADN resultantes de la digestión, se realizó añadiendo 0,5 µl de la mezcla de adaptadores Sac + Bgl, 1,25 unidades Weiss de T4 ligasa de ADN (Fermentas), 1 µl de tampón concentrado de ligación ($\times 10$) y 0,75 µl de agua. El volumen total de la reacción fue de 10 µl que se incubaron durante una noche a 16°C, se almacenaron a -20°C y fueron utilizados como ADN molde para la realización de la amplificación por PCR.

4.3. Procesos de amplificación por PCR del ADN molde

Amplificación de fragmentos de ADN digerido y ligado a adaptadores

Sac/Bgl

Esta reacción se llevó a cabo empleando un solo cebador, específico para la secuencia de los adaptadores empleados, de los ocho disponibles: el adaptador Sac (5'- TGAGTCCTGACAGCTCE - 3') era reconocido por cuatro cebadores, denominado ScE; y la secuencia del adaptador Bgl (5'- TGAGTCCTGAGGATCTE - 3'), reconocida por los otro cuatro, denominado BgE; donde E representa la extensión de un nucleótido (A, T, C o G); de forma que el cebador que se une al adaptador Bgl ampliado con el oligo G se nombra BgG (5'- TGAGTCCTGAGGATCTG - 3') (Figura 10).

La amplificación se realizó en 5 µl de MyTaq Mix (Bioline), 1 µl de ADN molde y 4 µl de cebador (2,5 µM) en un termociclador C1000 (BioRad), siguiendo las

MATERIAL Y MÉTODOS

condiciones para los ciclos de temperatura previamente publicadas (3), aunque adaptadas a las condiciones de MyTaq Mix kit y ampliadas a 30 ciclos (Ciclo 1: 75 s a 95°C, 15 s a 65°C y 30 s a 72°C; ciclos 2 - 12: 15 s a 95°C, 15 s a la temperatura de hibridación 0,7°C más baja que el ciclo anterior, empezando a 64,3°C y 30 s a 72°C; ciclos 13 - 30: 15 s a 95°C; 15 s a 56°C y 30 s a 72°C).

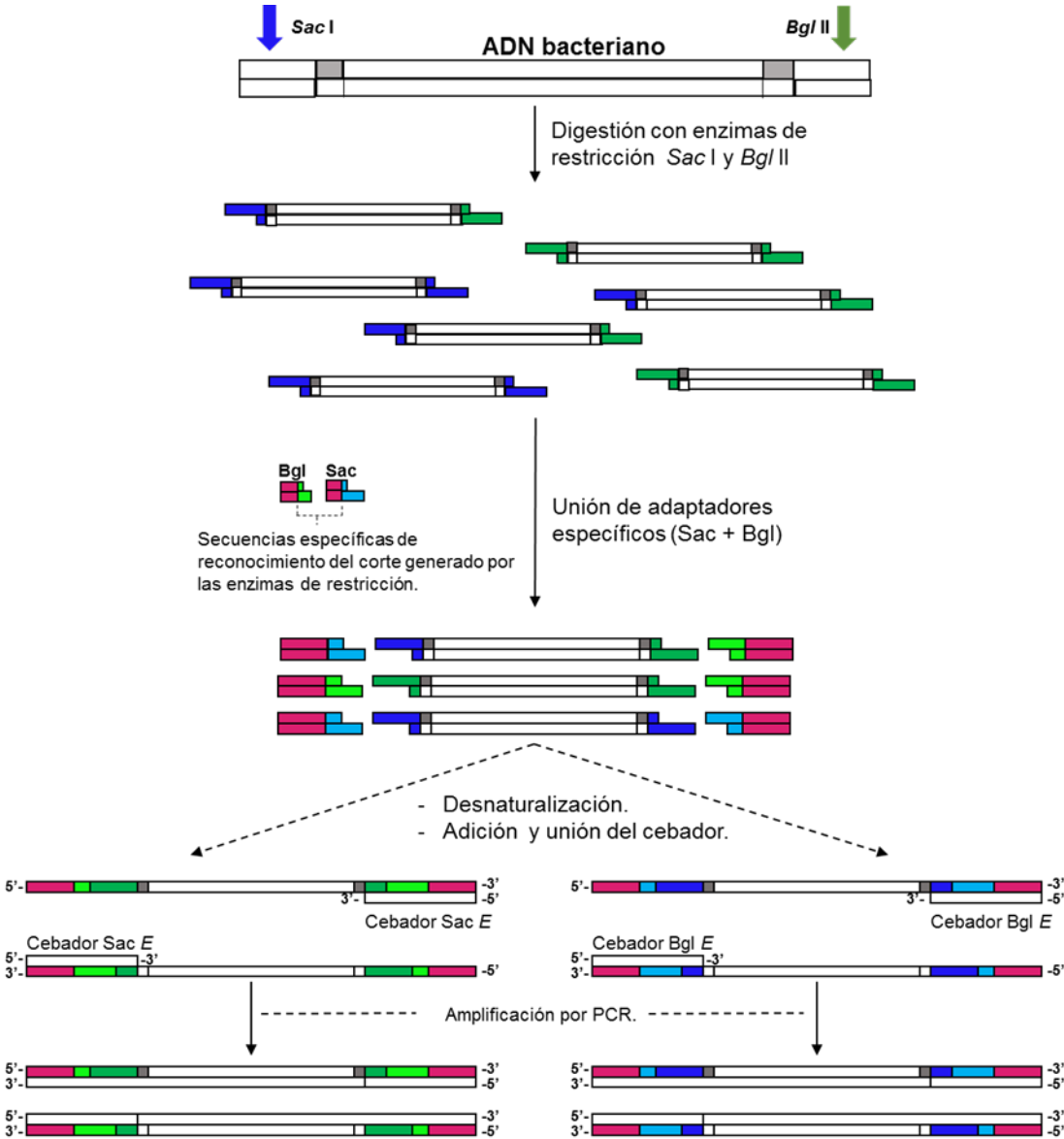


Figura 10. Método AFLP y amplificación de los fragmentos de ADN. En la reacción final de amplificación se emplea un solo cebador, que puede ser ScE (ScA, ScC o ScT) o BgE (BgA, BgC, BgG o BgT).

Amplificación del fragmento hsp65 (gen codificante de la proteína de choque térmico de 65KDa)

Se emplearon los cebadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') y Tb12 (5'-CTTGTCTGAACCGCATACCCT-3'), descritos en el trabajo de Telenti et al (4). Se empleó como control de la PCR para descartar la presencia de inhibidores.

Amplificación de Mycobacteria Interspersed Repetitive Unit – Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR)

Se llevó a cabo mezclando 5µl de MyTaq Mix (Bioline), 1 µl de ADN molde, 2 µl de betaína (5 M, VWR Life Science) y 2 µl de cebadores (0,5 µM). La secuencia de los cebadores empleados (Tabla 4), así como las condiciones de los ciclos térmicos para la reacción (ciclo 1: 94°C / 5 min; ciclos 2-40: 30 s a 94°C, 30 s a 58°C y 30 s a 72°C; ciclo 41: 72°C / 7min) son los publicados previamente por Dauchy et al (5) para el genotipado de *M. intracellulare*.

Secuencia de oligonucleótidos de los cebadores			
Cebador directo	Cebador inverso	Tamaño de repetición (pb)	Tamaño de amplicones (rango pb)
5'-ACATTCACCCTGTCCATTC-3'	5'-CCTCCTTACGGAGCAGGAA-3'	53	200-350
5'-GCCGAACCATTTGGCGAAC-3'	5'-GGATTCCGGCCGCGCAATTC-3'	56	200-500
5'-CATGGTTCCGCCCTCTACAC-3'	5'-TAGGGGCAGGTCATCGAAG-3'	53	200-380
5'-GCTGAGCTACAGCCTCGAC-3'	5'-CGACGCCGATGACGTAAAC-3'	55	320-620
5'-TCAGGAATGGGTCCGGTTC-3'	5'-AGCTCGTGACGACGGAAAC-3'	57	200-450
5'-CGACCGCATCCAGAAACAG-3'	5'-GCTCTATGACGACCTCAAG-3'	57	280-420
5'-GTGACGTTCAACCACGAAC-3'	5'-GGCGTTGAACACGTTGGTG-3'	54	350-750

Tabla 4. Secuencia y características de cebadores descritos por Dauchy et al (5) empleados en la amplificación de ADN por MIRU-VNTR para identificación de *M. intracellulare* a nivel de subespecies. pb: pares de bases.

Tras el proceso de amplificación, no se realizaron pasos intermedios para la purificación del ADN o la inactivación de las enzimas de restricción.

Finalmente, la evaluación de los fragmentos amplificados, se realizó por observación y comparación del patrón de bandas obtenido tras una separación electroforética convencional en gel de agarosa (1,8%, wt/vol. Agarose D1 LE Low EEOO, Intron Biotechnology), sumergido en 1 x TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). La tinción se realizó con SimplySafe (EURx) y el

MATERIAL Y MÉTODOS

marcador de pesos moleculares empleado fue el Perfect 100 bp ADN ladder (EURx). Las imágenes de los geles se obtuvieron con luz UV.

RESULTADOS

1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN SANGRE FRENTE A DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *Mycobacterium*

Uno de los puntos clave en el desarrollo de las micobacteriosis es el grado de patogenicidad que exhiben las diferentes especies que interaccionan con el sistema inmune del hospedador. Con el objeto de comprobar la supervivencia de distintas especies frente a células inmunes de origen sanguíneo, se ensayaron en infecciones *in vitro* varias combinaciones de tipos celulares y especies de micobacterias. Los experimentos se enfocaron en la respuesta innata de las células fagocíticas, por lo que se seleccionaron solamente voluntarios cuyo resultado fue negativo en el test QuantiFERON-TB Gold ELISA (Cellestis), y así minimizar la interferencia de linfocitos específicos.

1.1. Actividad anti-micobacteriana de macrófagos *in vitro*

Comparar la respuesta inmune frente a micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas, puede ofrecer información que permita entender la diferente evolución clínica tras la infección por cada una; sin embargo, muchos autores han observado dificultades para evaluar dicha actividad

RESULTADOS

anti-micobacteriana en el modelo de infección de macrófagos derivados de monocitos, el más empleado experimentalmente.

Tras infectar monocitos con diferentes especies micobacterianas, se cuantificó el número de bacterias viables el mismo día de la infección (T0) y tras 4 días de incubación, sin obtener diferencias significativas en el caso de la infección con *M. avium* y *M. kansasii*, o incluso produciéndose un aumento del recuento de bacterias, como en el caso de *M. bovis* BCG, *M. gordonae* y *M. tuberculosis*, lo que llama la atención dado la baja patogenicidad que muestran *in vivo* *M. bovis* BCG y *M. gordonae*. Al cuantificar la variación de UFC de *M. chelonae*, la única micobacteria de crecimiento rápido empleada en este experimento, observamos que el recuento de UFC tras el periodo de incubación era cuatro unidades logarítmicas mayor que el del inóculo (Figura 11). Estos resultados nos permiten concluir que los macrófagos derivados de monocitos, en las condiciones empleadas, no muestran actividad micobactericida.

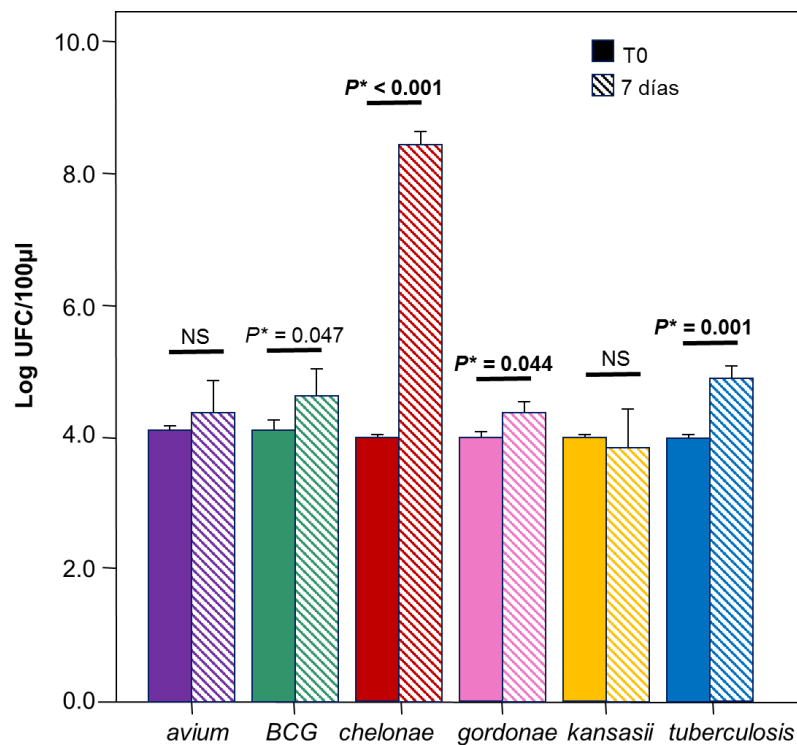


Figura 11. Infección de macrófagos derivados de monocitos con *Mycobacterium sp.* 10^5 monocitos se infectaron, durante 7 días en placas de 96 pocillos, con 10^4 UFC/100 μ l (MOI = 0.1 bacterias por célula) de *M. avium*, *M. bovis* BCG, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. tuberculosis*, en medio RPMI-1640 suplementado con un 40% de plasma obtenido de sangre anticoagulada con heparina. Los datos representan la media de \log_{10} UFC + SD y fueron analizados por el test *t*- Student pareado ($n = 5$). $P^* < 0,05$ se consideró significativo.

1.2. Actividad antimicrobiana de sangre completa frente las distintas especies micobacterianas

Para valorar la actividad anti-micobacteriana de un modelo alternativo, la sangre completa, se realizó el recuento de UFC en sangre con heparina y con EDTA el día de la infección (T0), a los días 1, 2, 4 y 7 de incubación.

Con sangre heparinizada, se observó una ligera disminución del número de bacterias a los 2 días, a partir de los cuales se incrementaron las UFC obtenidas hasta los 7 días que, comparándolas con el inóculo inicial, no supone una diferencia significativa para *M. avium*, *M. kansasii* y *M. gordonae*, o fueron significativamente superiores para *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, de forma similar a lo descrito previamente en el modelo de infección de macrófagos para estas dos micobacterias. En el caso de *M. chelonae*, también se produjo un incremento acusado de UFC a los 7 días en este modelo significativamente diferente con el resto de las especies (Figura 12A).

Al emplear sangre anticoagulada con EDTA se originó un cambio de patrón en la curva de tiempo, de tal manera, que se observó un descenso en el recuento de bacterias a los 7 días en todas las especies, siendo significativo para *M. bovis* BCG, *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. avium* (Figura 12B).

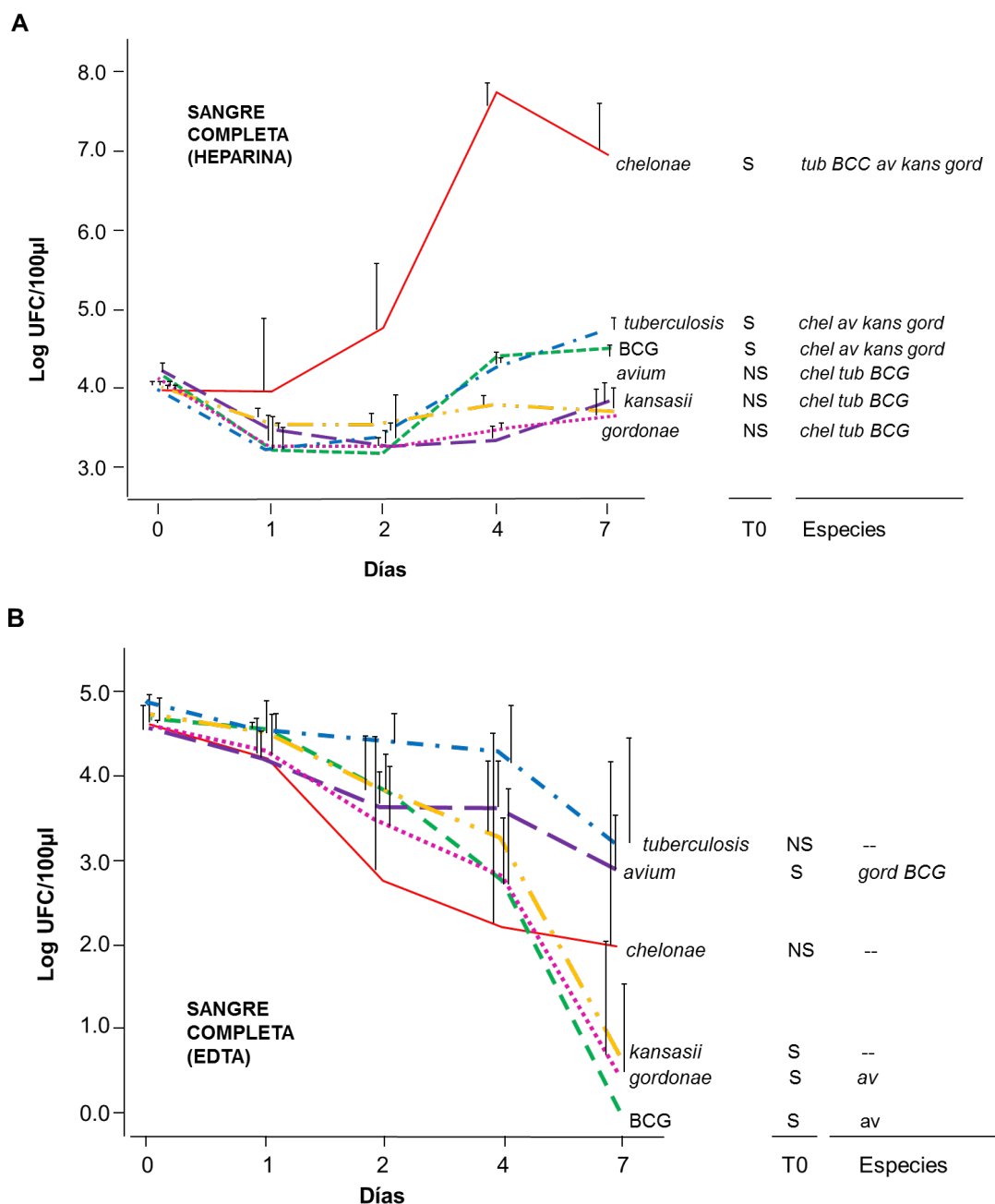


Figura 12. Curva de tiempo de actividad antibacteriana de sangre completa frente *Mycobacterium* sp. 40% de sangre-heparina (a) o sangre-EDTA (b) se diluyó con un 60% de medio RPMI-1640 y se infectó con las distintas especies señaladas. Los datos representan la media del log₁₀ UFC + SD. La comparación estadística (prueba *t* de Student pareada) se realizó entre la UFC del día del inóculo y tras 7 días, indicándose en la columna T0. S para diferencias significativas y NS para no significativas. El número de UFC a los 7 días de las distintas especies indicadas en la columna de “Especies” es significativamente diferente comparada con la bacteria concreta representada en la curva (ANOVA con el test post-hoc Games-Howell, n = 5). *P** < 0,05 se considera significativo.

RESULTADOS

La diferencia observada en el nivel de multiplicación de las distintas especies para el modelo de sangre completa obtenida con EDTA o con heparina, induce a analizar el efecto que ejerce el EDTA sobre las mismas. Por ello, se incubó *M. chelonae*, micobacteria con mayor nivel de multiplicación en sangre heparinizada, en medio 7H9 suplementado con EDTA 0,5 mM. Las muestras control (T0) se diluyeron inmediatamente (1/10) con 7H9. Se incubaron durante cuatro días, tras los cuales se apreciaron colonias visibles en las muestras control, pero no en las muestras no diluidas. Así mismo, la mitad de las muestras no diluidas inicialmente, se diluyeron como las muestras control y se volvieron a incubar cuatro días, observando el mismo crecimiento que en las muestras control. En las muestras que se mantuvo la concentración inicial de EDTA no se obtuvieron colonias (Figura 13).

Este experimento también se realizó, de la misma manera, con *M. tuberculosis*, obteniendo idénticos resultados.

Se pone de manifiesto que el EDTA no afecta la viabilidad de las micobacterias, sino que ejerce un efecto bacteriostático sobre estas.

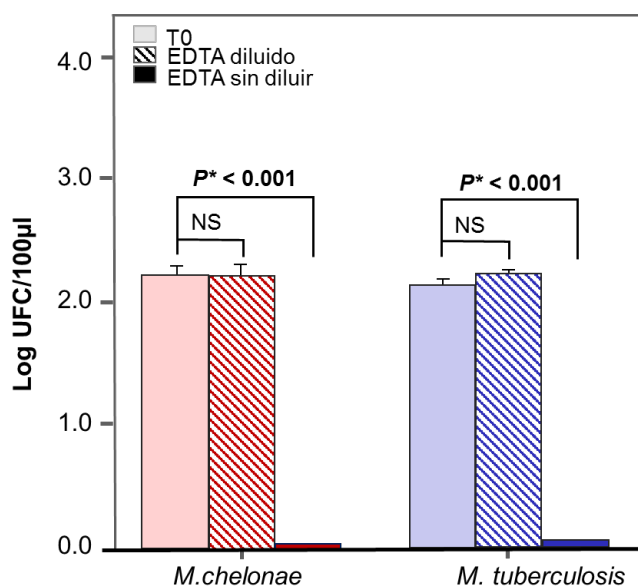


Figura 13. Efecto del EDTA en el crecimiento micobacteriano. 10^3 bacterias/100 μ l de *M. chelonae* y *M. tuberculosis* se incubaron en medio 7H9 suplementado con EDTA 0,5 mM en las muestras indicadas. Las muestras control, sin EDTA, en 7H9, se diluyeron (1/10) el día del inóculo con medio 7H9 (T0). La mitad de las muestras con EDTA se diluyeron (1/10) tras 4 días (EDTA *diluido*) con 7H9 y la otra mitad permanecieron sin diluir (EDTA *sin diluir*). Los datos representan la media del \log_{10} UFC + SD y se analizaron por ANOVA con el test de Games-Howell post-hoc (n = 4). $P^* < 0,05$ se considera significativo.

1.3. Supervivencia de micobacterias en leucocitos suspendidos en plasma

Para averiguar el efecto que el tipo de anticoagulante tiene sobre la actividad celular, se infectaron leucocitos en presencia de plasma obtenido de sangre

RESULTADOS

anticoagulada con heparina o EDTA. Los recuentos de colonias obtenidos a los 7 días de incubación se compararon con el inóculo inicial.

En la infección con plasma-heparina, se observó un aumento en el recuento final de *M. chelonae*, pero en el resto de las especies se observó una disminución del crecimiento, sin haber diferencias significativas entre estas, independientemente de su nivel de patogenicidad (Figura 14A).

Al realizar la infección con plasma-EDTA, el comportamiento observado fue totalmente diferente (Figura 14B). Para *M. avium*, el número de bacterias finales se mantuvo similar al número del inóculo; sin embargo, para el resto de las especies fue significativamente inferior. También se observaron diferencias significativas entre especies, de manera que, para *M. avium* y *M. tuberculosis*, las UFCs tras los días de incubación fueron mayores que para *M. kansasii*, *M. chelonae* y *M. gordonae*.

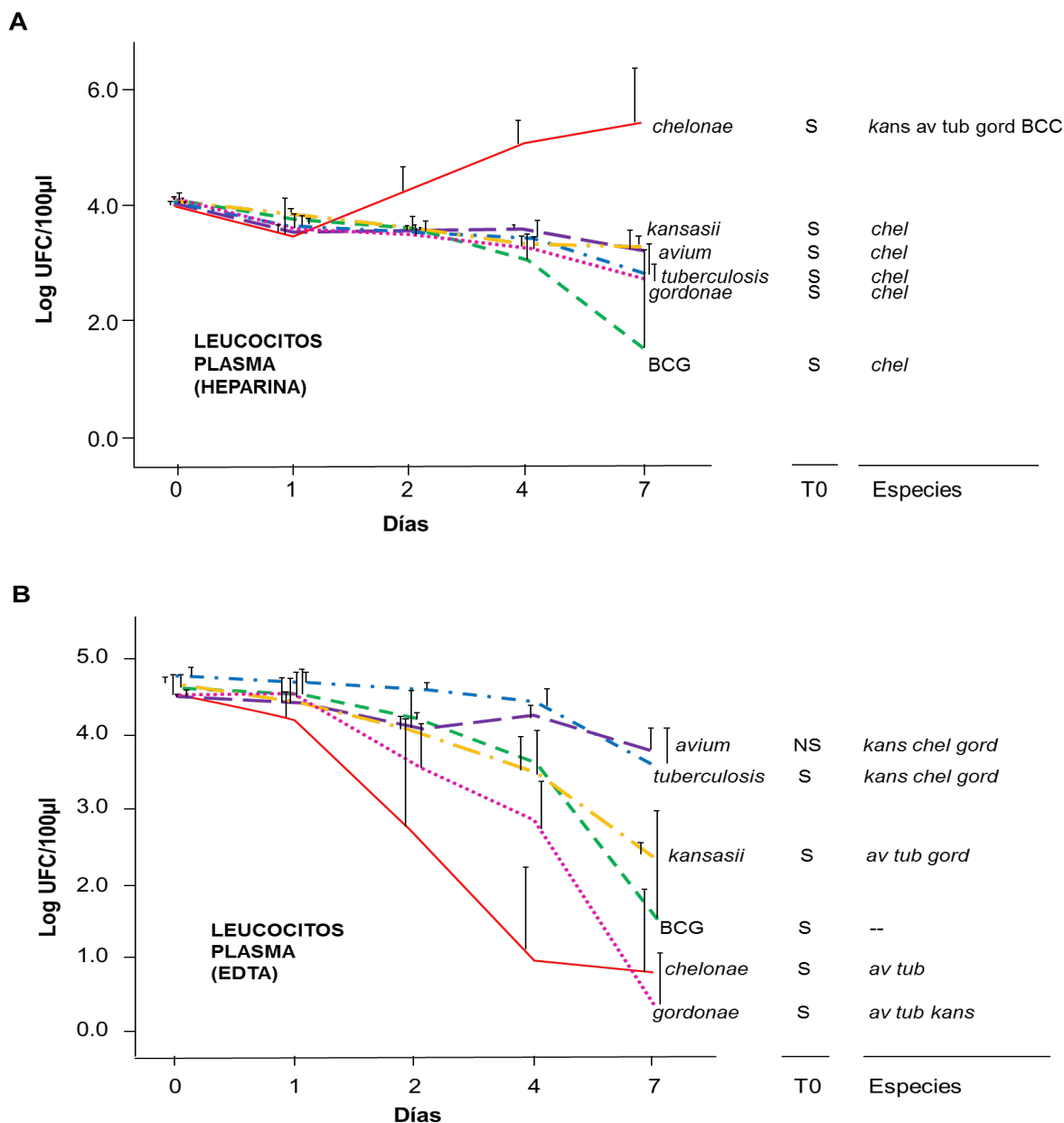


Figura 14. Curva de tiempo de la actividad antibacteriana de leucocitos frente *Mycobacterium* sp. Un 40% de leucocitos en un 40% de plasma-heparina (a) o plasma de sangre anticoagulada con EDTA (b) se diluyó con RPMI-1640 (20%) y se inocularon las especies indicadas. Los datos representan los \log_{10} UFC + SD. Los resultados de la comparación estadística (prueba *t* de Student pareada) entre las UFC el día de la infección y a los 7 días de incubación se indican en la columna "T0". S para resultados estadísticamente significativos y NS para no significativos. El número de UFC a los 7 días de las diferentes especies de micobacterias indicadas en la columna de "Especies" es significativamente diferente con la especie concreta indicada en la curva de tiempo (prueba ANOVA con el test post-hoc Games-Howell, $n=5$). $P^* < 0,05$ se considera significativo.

RESULTADOS

Del mismo modo que el EDTA actúa directamente sobre la capacidad de multiplicación bacteriana, también podría tener un efecto adicional sobre las células inmunes. Para testar esta posibilidad, se procedió a la medida de citocinas proinflamatorias y a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) previa activación leucocitaria, por incubación durante una noche, con lipopolisacárido de *E. coli*, en presencia de plasma heparinizado o de plasma-EDTA (Figura 15). La producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6 fue significativamente inferior en presencia de EDTA. Lo mismo se observó con la producción de ROS, comparando los leucocitos incubados en plasma procedente de sangre heparinizada (media = 15030 cps, SD 5205) y los incubados con plasma procedente de sangre con EDTA (media = 447 cps, SD 464) (diferencia media = 14583 cps [CI 95%: 6206-22960], n = 3, t-test, $P^* = 0,008$).

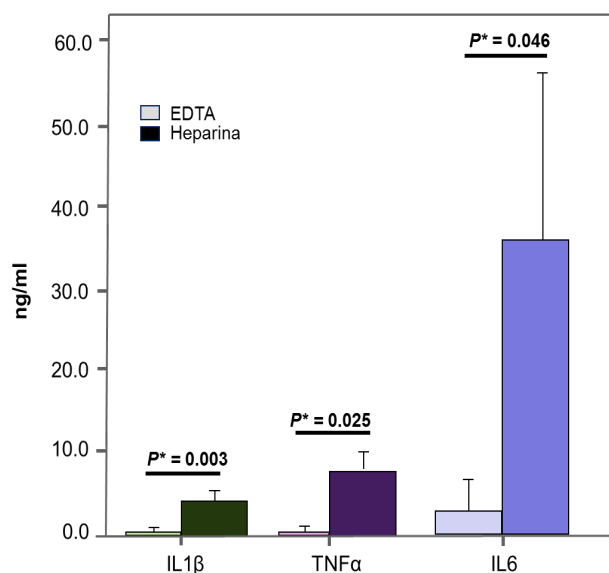


Figura 15. Influencia del EDTA en la producción de citocinas. Un 40% de leucocitos y un 40% de plasma precedente de sangre anticoagulada con heparina o con EDTA, se diluyó con RPMI-1640 (20%) y se incubaron durante una noche con LPS de *E. coli* (20 μ g/ml) en una plataforma rotatoria a 37° C. Las citocinas mencionadas se midieron por ensayos de ELISA específicos. Los datos representan la concentración de citocinas (ng/ml) + SD y el análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student (n=3). $P^* < 0,05$ se consideró significativo.

A pesar de no obtener una diferencia estadísticamente significativa, *M. avium* mostró ser menos sensible a la actividad leucocitaria que *M. tuberculosis*, siendo esta última más patogénica. Para potenciar el poder estadístico, estas dos especies se incubaron con leucocitos aislados y se comparó el crecimiento de ambas en un experimento independiente. Se calculó la diferencia de UFC tras 7 días de incubación y el día de la infección (\log_{10} UFC t = 7d – \log_{10} UFC t = 0d). Al cotejar *M. avium* (media = -0,71 SD 0,14) con *M. tuberculosis* (media = -1,47 SD 0,59), se corroboró la resistencia de *M. avium* (media de la diferencia = 0,76 [CI 95%: 0,21-1,30], n = 7, t-test pareada, $P^* = 0,015$).

La diferencia observada más notable entre las distintas especies, fue el alto nivel de multiplicación de *M. chelonae* tanto en la infección realizada con sangre heparinizada como en la suspensión de leucocitos en plasma-heparina. *M. chelonae* fue la única micobacteria de crecimiento rápido empleada, por lo que para constatar si este comportamiento es común a otras micobacterias con esta característica, se procedió a realizar infecciones de sangre total y leucocitos con *M. fortuitum* y *M. phlei*. Se utilizaron a modo de controles *M. avium* (micobacteria de crecimiento lento y sensible a la actividad inmunológica) y *M. chelonae*. Como anteriormente se describió, *M. avium* mostró una restricción de su crecimiento en presencia de leucocitos, mientras que *M. chelonae* se multiplicó en ambos modelos de infección, al igual que *M. fortuitum* y *M. phlei*, aunque en el caso de esta última la diferencia en el número de colonias entre el inóculo y tras la incubación con leucocitos no fue significativa (Figura 16). Por lo tanto, se puede verificar que las micobacterias de crecimiento rápido muestran un patrón de multiplicación similar en estos dos modelos de infección *in vitro*.

RESULTADOS

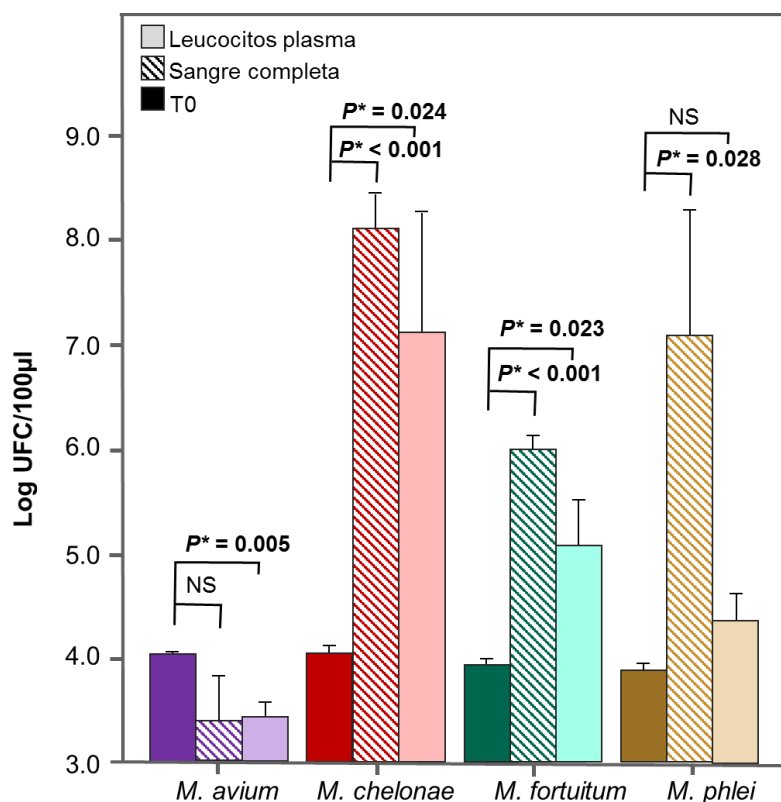


Figura 16. Actividad antibacteriana contra micobacterias de crecimiento rápido. Un 40% de sangre total heparinizada (*Sangre completa*) o un 40% de leucocitos suspendidos en un 40% de plasma-heparina (*Leucocitos. plasma*) se diluyeron con RPMI-1640 y se infectaron con 10^4 UFC / 100µl de cada una de las especies indicadas. *M. avium* se empleó como control. Los datos representan \log_{10} UFC + SD y se analizaron con la prueba ANOVA con el test post-hoc Games-Howell (n = 4). $P^* < 0,05$ se consideró significativo.

2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN SANGRE DE FUMADORES FRENTE *M. tuberculosis*

El tabaco constituye uno de los mayores riesgos para desarrollar una tuberculosis activa, estando asociado a 1 de cada 6 casos (1). Son muchos los estudios que establecen una relación causal entre tabaco y el desarrollo de la infección, así como de una peor respuesta al tratamiento (2). Dadas las repercusiones que tiene el tabaco sobre el sistema inmune del hospedador, no sólo a nivel pulmonar sino también sistémico, parece apropiado estudiar la diferente respuesta inmunológica entre una población susceptible, como es la fumadora, y la no fumadora tras la infección por *M. tuberculosis* para comprender los mecanismos implicados en la defensa frente a la micobacteria.

Se infectó con *M. tuberculosis* sangre total, leucocitos, células mononucleares periféricas (PBMC), neutrófilos y monocitos de 19 fumadores activos, con un consumo diario mínimo de 10 cigarrillos durante más de 6 meses y 20 no fumadores, que fueron empleados como controles. Tras 4 días de incubación, el recuento de UFC obtenido en sangre total de ambos grupos, fue mayor respecto al resto de fracciones, sin embargo, al compararlo entre sí, no se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0,335$), lo mismo sucedió con el resto de los modelos, a pesar que con leucocitos y células mononucleadas en fumadores se observó un ligero aumento de UFCs ($p = 0,407$ y $p = 0,579$ respectivamente) (Figura 17). Estos resultados no permiten concluir que haya diferencias en la actividad antimicobacteriana entre células aisladas de fumadores y no fumadores.

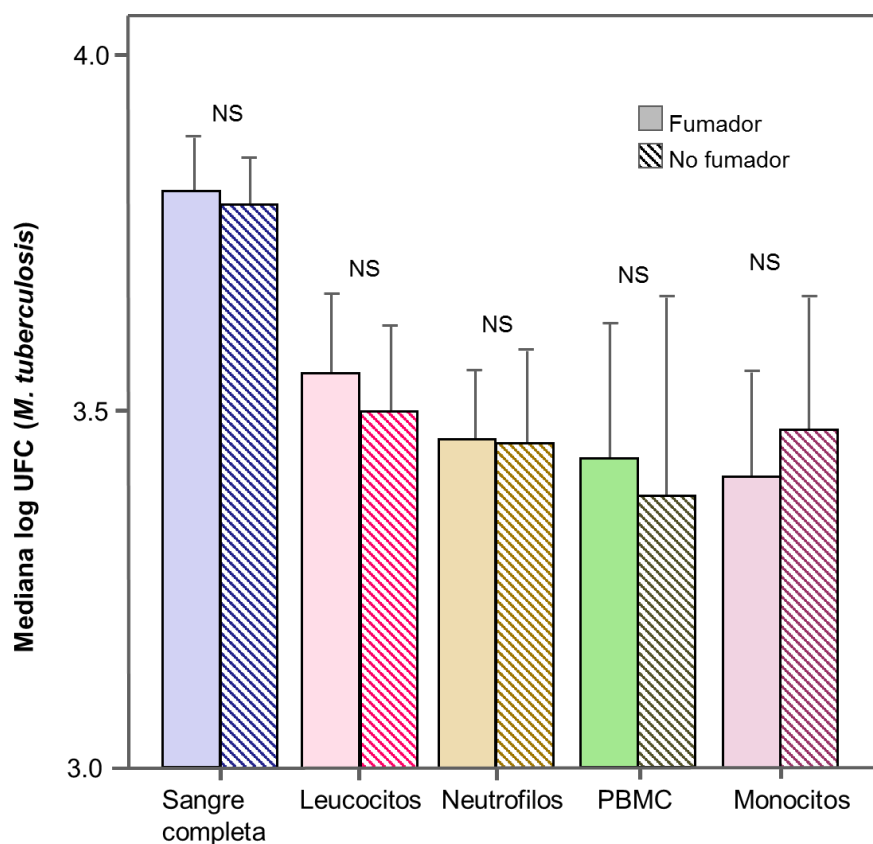


Figura 17. Actividad anti-micobacteriana en sangre de fumadores frente *M. tuberculosis*. Una fracción de sangre total con EDTA, un 40% de leucocitos en 40% de plasma-EDTA autólogo diluido con RPMI-1640 (20%), 10^5 neutrófilos obtenidos por purificación mediante un gradiente con Polymorphprep, monocitos y células mononucleares purificados en un gradiente con Ficoll y suspendidos en medio RPMI-1640 suplementados con un 40% de plasma-EDTA autólogo, se infectaron durante 4 días en placas de 96 pocillos con 10^4 UFC/100 μ l (MOI = 0,1) de *M. tuberculosis*. Los datos representan la mediana de \log_{10} UFC y se analizaron por la prueba Mann-Whitney, comparando de grupos de muestras independientes. $P > 0.05$ se consideró no significativo (NS).

3. ESTRATEGIA BASADA EN Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) PARA GENOTIPAR MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

La caracterización de aislados de la misma especie de MNT no es frecuente en la práctica clínica, a pesar de que, en determinadas situaciones, tales como brotes hospitalarios o aislamientos repetidos en un mismo paciente con mala respuesta terapéutica, estaría indicada. Uno de los principales motivos es el elevado coste y el tiempo de interpretación de dichos análisis. El objetivo de este experimento es la puesta a punto de una técnica molecular basada en AFLP sencilla, económica y eficaz, así como establecer un protocolo para su aplicación.

Para proceder con este experimento, se aisló el ADN de 28 cepas de *M. intracellulare*, procedentes de diferentes aislados clínicos y se seleccionaron las enzimas de restricción más apropiadas para el propósito. Se realizaron ensayos preliminares con enzimas que se emplean frecuentemente: *Apal*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *MluI* y *SacI*. Se eligieron dos que mostraban un alto poder de discriminación con un número moderado de bandas (entre 0 y 10 en nuestro grupo de muestras): *SacI* y *BglII* (3). El cebador ScG generó un patrón de bandas difuso que resultó inadecuado. Con el cebador BgA, se generaron patrones muy sencillos, de 0-3 bandas (Figura 18A), en consecuencia, se obtuvo un Índice Discriminatorio de Gaston Hunter bajo (IDGH = 0,844) (3), pero que mostraba patrones diferentes y únicos en 12 cepas de las 28 testadas. En los aislados 5 y 16 se reveló una banda débil en 1600 y 1920 pb, respectivamente, que no siempre aparecieron en los análisis y se descartaron.

RESULTADOS

Las cepas 1 - 8 formaron un grupo, con una única banda. Las cepas 9 - 16 otro, en las que no se mostraba ninguna banda; para descartar que esto sucediera por la presencia de inhibidores de la PCR, se realizaron reacciones independientes con los cebadores Tb11 y Tb12, empleando el mismo ADN molde. En todos los casos se reflejó la banda (Figura 18A).

Las cepas 17, 18 y 19, se englobaron en un tercer grupo, ya que no se pudieron diferenciar usando los siete cebadores disponibles, incluso empleando cebadores diseñados para el resto de las enzimas de restricción mencionadas.

Las cepas incluidas en los dos primeros grupos, se continuaron analizando con los cebadores ScC y ScA (Figura 18B). Las cepas relacionadas entre sí se consiguieron discriminar por la aparición de 1 - 3 bandas extra:

Con ScC el índice discriminatorio aumentó ($IDGH = 0,958$), pero no se consideró suficiente, ya que las cepas 1 - 5 y 11 - 13 no se pudieron diferenciar unas de otras. Algunas de las bandas obtenidas tenían una intensidad inconstante en las diferentes muestras, de forma que, aunque las bandas que se podían apreciar en la cepa 3 eran sutiles, manifestaban el mismo patrón que en las cepas 1, 2, 4 y 5. Esta variabilidad en la intensidad de las bandas también se observó en otros casos (muestra 13 con el cebador ScC) posiblemente relacionado con la concentración o calidad del ADN.

Con ScA, se obtuvo un poder discriminatorio alto ($IDGH = 0,984$), pero no se pudo hacer la distinción entre las cepas 1 y 2; 4 y 5; así como entre 11 y 12. El análisis empleando el cebador BgG (Figura 18B) permitió diferenciar dos de las parejas ($IDGH = 0,989$), sin poder separar las cepas 1 y 2.

Los tamaños de las bandas de los diferentes patrones originados por cada cebador se representan en la Tabla 5.

Cada aislado en que se reflejaba un patrón específico, se eliminó del análisis con el siguiente cebador. Los grupos de cepas 17-18-19 y 1-2 no se pudieron diferenciar con ninguno de los cebadores restantes (ScT, BgC y BgT). Tras varios intentos para conseguir una discriminación entre las cepas 1 y 2, se encontró que aparecía una nueva banda en la cepa 1, cuando se digería el ADN bacteriano sólo con *Bgl*II y se usaba como cebador BgT (Figura 18B), indicando que *Sac*I no permite esta amplificación.

RESULTADOS

Cebador	Patrón	Tamaño de bandas (pares de bases)	Aislados
BgA			
	I	1120	1,2,3,4,5,6,7,8
	II	0	9,10,11,12,13,14,15,16
	III	2100,1880,1690	17,18,19
	IV	1420	20
	V	1300,260	21
	VI	2240,1140,770	22
	VII	1100,740	23
	VIII	770,410	24
	IX	1990,1480	25
	X	590	26
	XI	2760 (extrapolado),2010,1200	27
	XII	2140	28
ScC			
	I	1690,1280,1040,870,610,420	1,2,3,4,5
	II	Patrón I + 680	6
	III	Patrón I - 870 + 450	8
	IV	Patrón III + 650	9
	V	1740,1560,800,720	7
	VI	1820,1740,1290,1120,880,640,580,450,420,310	10
	VII	Patrón VI - 1740 + 1550 - 580	11,12,13
	VIII	Patrón VI - 580	14
	IX	1700,1300	15
	X	1830,1210,940,330	16
ScA			
	I	1650,880,680,540,340,310	1,2
	II	Patrón I - 340 + 320 - 310	3
	III	Patrón I + 790 - 340	4,5
	IV	Patrón III - 1650	11,12
	V	Patrón IV + 730	13
BgG			
	I	760,750	1,2
	II	Patrón I + 950	4
	III	Patrón I + 1770	5
	IV	1910,1760,1110,820,740,410	11
	V	Patrón IV - 1110	12

Tabla 5. Patrón de bandas de las cepas de *M. intracellulare* generado por AFLP (*SacI*-BgIII) usando los cebadores BgA, ScC, ScA y BgG.

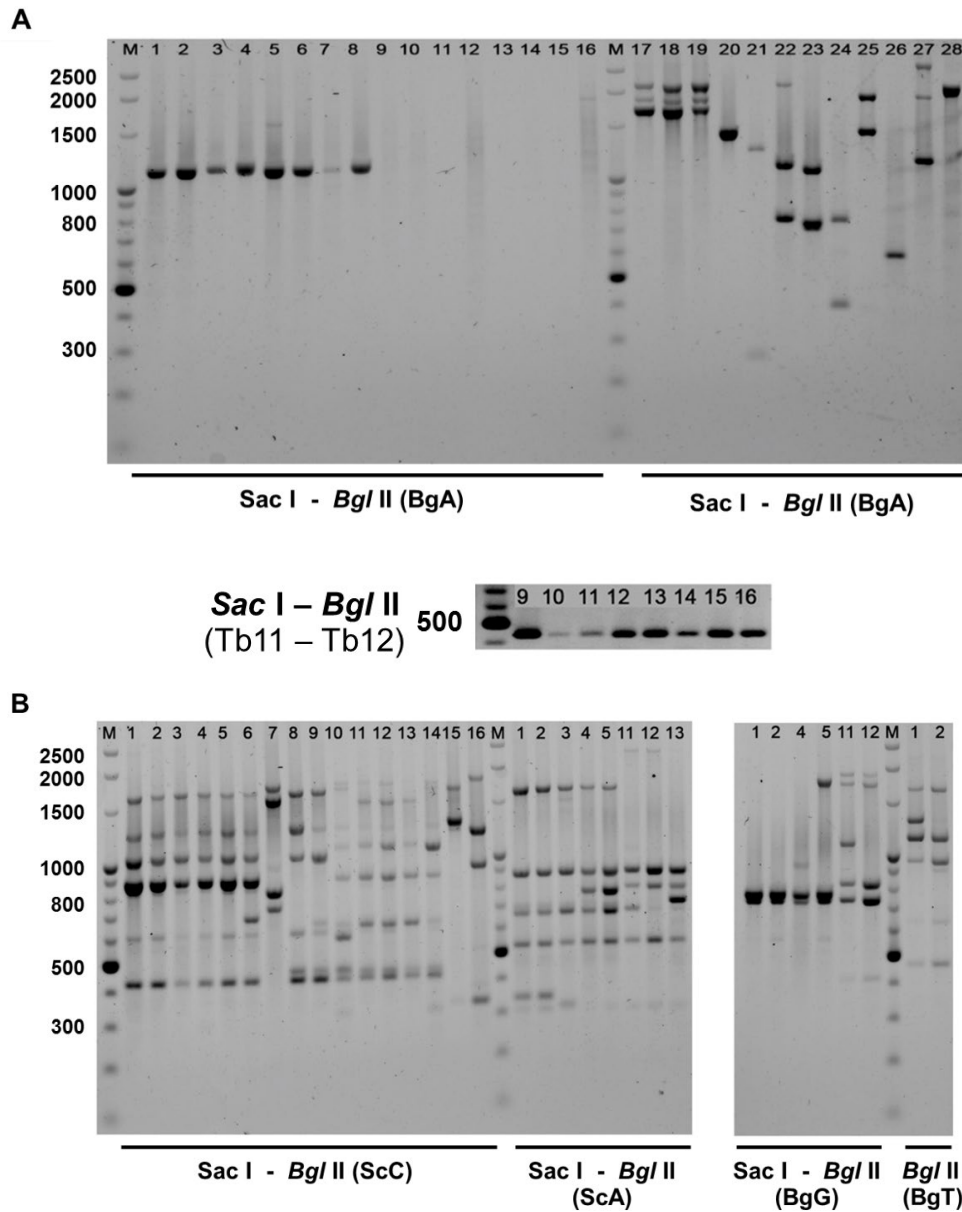


Figura 18. Patrones AFLP. Patrones de bandas por análisis con AFLP de ADN de cepas de *M. intracellulare* (1-28), digerido con *SacI*-*BglIII* o *BglIII*. Los adaptadores *Sac* y *Bgl* se ligaron con los extremos del ADN digerido. Un único cebador, entre paréntesis, se hibridó a uno de los adaptadores usados en cada reacción de amplificación: BgA, ScC, ScA, BgG, y BgT. La columna M, es un marcador de pesos moleculares. (a) Amplificación de ADN molde de 28 cepas de *M. intracellulare* usando el cebador BgA. (b) ADN molde de las cepas que no se pudieron distinguir con BgA, se amplificó con ScC; aquellas que seguía compartiendo patrón de bandas, se continuaron amplificando con ScA. El ADN de las últimas cepas que permanecían sin distinguirse, se amplificó usando BgG. Finalmente, para conseguir discernir entre las cepas 1 y 2, se empleó BgT, y empleando únicamente la enzima de restricción *BglIII*, en lugar de *SacI*-*BglIII*.

RESULTADOS

Para poder realizar una comparación del método con otros previamente disponibles, se llevó a cabo la realización de MIRU-VNTR con el método designado por Dauchy et al. (4), el más empleado para *M. intracellulare*. El índice de discriminación de esta técnica de genotipado fue de 0,950, menor que el obtenido por el método de AFLP. Se calcularon dendogramas para cada método, usando para AFLP el perfil de bandas obtenido para todos los aislados con los siete cebadores, incluidos ScT y BgG, que no se muestran en la Figura 18. Con AFLP se generaron 25 perfiles diferentes (Figura 19A), mientras que MIRU-VNTR sólo 18 (Figura 19B). En general, se observó cierta concordancia entre ambos métodos y la relación entre las diferentes cepas: con MIRU, el perfil resultante para los aislados 7, 10, 11, 12 y 13 es el mismo, y con AFLP, los perfiles para las cepas 10, 11, 12 y 13 parecen estar estrechamente relacionados.

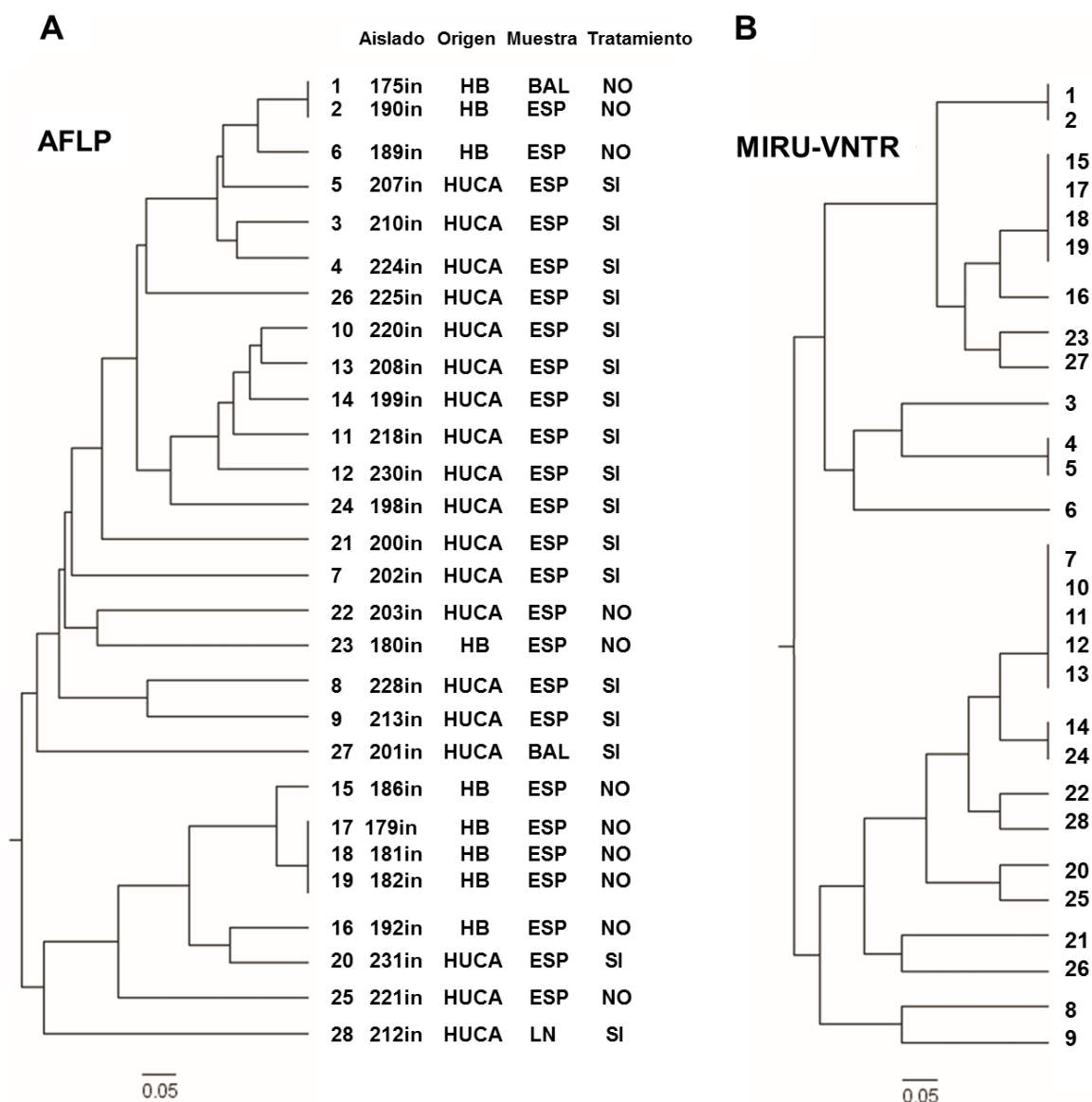


Figura 19. Dendrograma que refleja las relaciones entre los patrones de las cepas de *M. intracellulare* obtenidos por AFLP (A) y MIRU-VNTR (B). BAL: lavado broncoalveolar, ESP: esputo, LN: nódulo linfático, HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias, HB: Hospital Universitario del Bierzo. Los pacientes indicados como “Tratamiento SI” recibieron antibioterapia.

Para verificar la correcta funcionalidad del método, se testaron simultáneamente los siete cebadores en cuatro cepas de *M. abscessus* (Figura 20),

RESULTADOS

dos de las cuales se aislaron del mismo paciente con 45 días de diferencia, 236ab y 237ab. De forma similar a *M. intracellulare*, con el cebador BgA se generaron solamente 2 o 3 bandas, con las cuales se pudo diferenciar a la cepa 234ab del resto. Con ScC y ScA se pudieron distinguir los aislados 239ab y 234ab de los aislados 236ab y 237ab. Estos últimos dos aislados no se pudieron discriminar con ninguno de los cebadores empleados. La cepa 239ab estaba estrechamente relacionada con 236ab y 237ab, ya que mostraron un patrón de bandas idéntico para los cebadores ScT, BgC y BgT. Tras analizar estos patrones en un único gel, se pudiera concluir que los aislados 236ab y 237ab eran muy probablemente la misma cepa y diferentes de las cepas 239ab y 234ab.

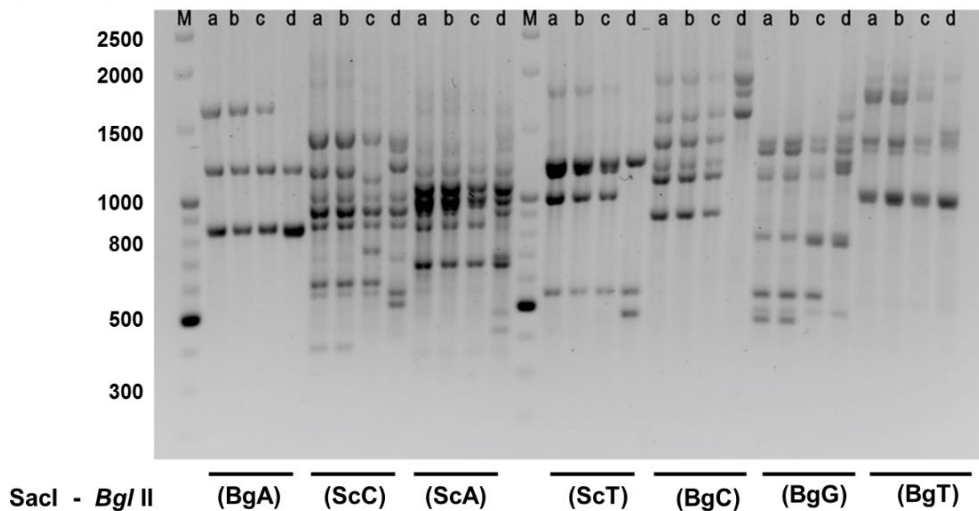


Figura 20. Patrones AFLP. Bandas de AFLP de ADN de cepas de *M. abscessus* (a, b, c, d), digeridas con SacI-BgIII. Los adaptadores Sac y Bgl se ligaron con los extremos del ADN digerido. Un único cebador, entre paréntesis, se hibridó a uno de los adaptadores usados en cada reacción de amplificación: BgA, ScC, ScA, ScT, BgC, BgG, y BgT. La columna M, es un marcador de tamaño molecular. Amplificación del ADN molde de cuatro cepas de *M. abscessus*: 236ab (a), 237ab (b), 239ab (c) y 234ab (d).

En base a estos resultados, se ha diseñado una estrategia para genotipar MNT, resumida en un diagrama de flujo (Figura 21), que no requiere emplear un software para el análisis de las imágenes resultantes.

El número de aislados a analizar, va a depender del número de pocillos disponibles en el gel de agarosa, considerando que cada uno va a requerir siete sitios (uno por cada cebador). Para un número bajo, de 2 a 8 cepas, los siete cebadores se pueden analizar simultáneamente en un único gel (Figura 21A); esta fue la opción seleccionada para el análisis de los aislados de *M. abscessus* estudiados en este trabajo. Cuando sea necesario genotipar más aislados, en orden de 50 a 60, los diferentes cebadores tendrán que usarse de forma reiterada, necesitando varios geles de agarosa (Figura 21B), como se ilustra para *M. intracellulare* en la Figura 18A y 18B. Finalmente, si el microbiólogo necesita analizar un número más elevado de aislados clínicos, el patrón de bandas originado por el cebador BgA es útil para agrupar cepas muy relacionadas entre sí (Figura 21C). El número reducido de bandas que genera, permite determinar visualmente el patrón específico para BgA de una cepa diferente y seleccionar el control apropiado, con ese mismo patrón, de la colección de micobacterias. Este control deberá incluirse para cada uno de los cebadores que se vaya a seleccionar para el análisis.

RESULTADOS

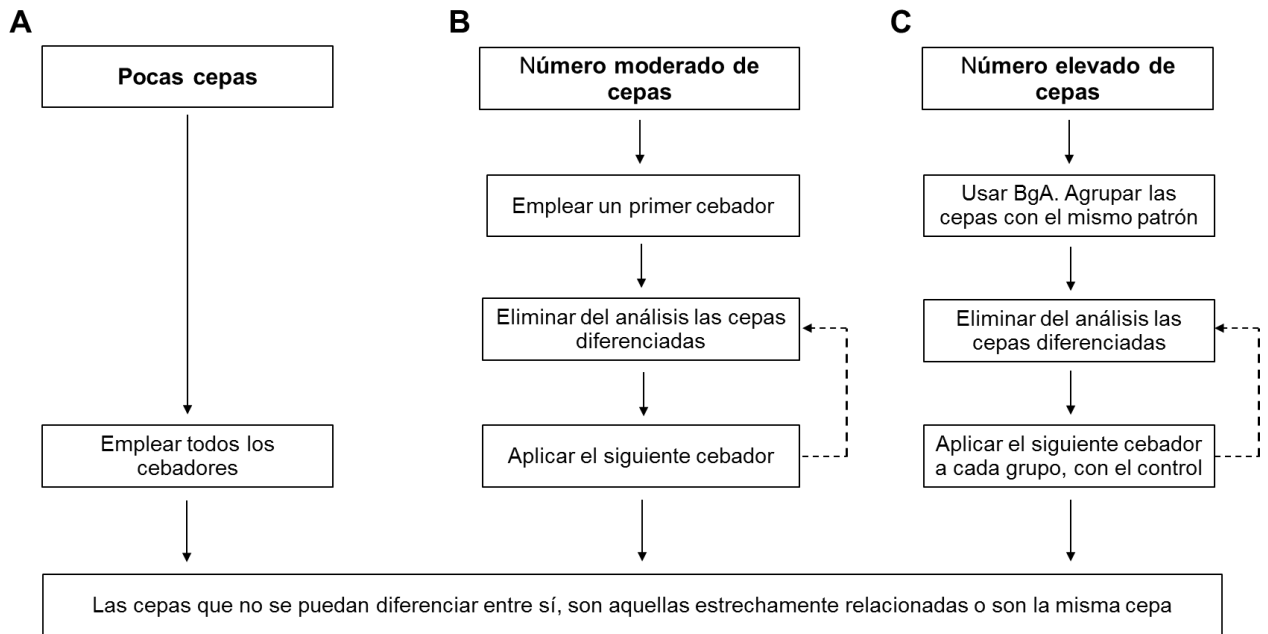


Figura 21. Diagrama de flujo de trabajo para el genotipado por AFLP (SacI-BgIII).

4. INFECCIÓN DE NEUTRÓFILOS CON *Mycobacterium abscessus* COMO MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO EN BRONQUIECTASIAS

El objetivo de este experimento fue reproducir *in vitro* algunos de los sucesos producidos en el pulmón cuando se inhala *M. abscessus* en el contexto de una respuesta inflamatoria neutrofílica, característica en las bronquiectasias.

La purificación celular en este ensayo se realizó por doble gradiente de densidad, sin embargo, a pesar de obtener un enriquecimiento de neutrófilos alto (>50%), se observó un alto porcentaje de contaminación con eritrocitos. Para proceder a su eliminación, en vez de emplear una lisis hipotónica, se realizó un segundo gradiente de sedimentación exclusivamente con Polymorphoprep de los neutrófilos previamente obtenidos diluidos con PBS o suero autólogo, resultando en un recuento de hematíes inferior al 5% (Tabla 6).

Fracción celular	Contaminación eritrocitaria (%)
Células mononucleares periféricas	1,14 SD 0,84
Neutrófilos (primera purificación)	38,76 SD 20,30
Neutrófilos (segunda purificación)	3,28 SD 2,91 **

Tabla 6. Porcentaje de contaminación con eritrocitos tras cada proceso de purificación de células mononucleares y neutrófilos. ** $P = 0.007$. Media de la primera y segunda purificación de neutrófilos comparada por *t*-test de Student ($n=6$). SD: desviación estándar.

RESULTADOS

Para verificar si los hematíes remanentes interfieren en nuestro ensayo, se realizó la purificación de PBMC y neutrófilos (PMN 1) empleando un gradiente de Ficoll y Polymorphoprep. Tras el lavado de las células, la mitad de los neutrófilos obtenidos se suspendieron en suero autólogo y se depositaron en un nuevo tubo con un volumen equivalente solamente de Polymorphoprep. Los neutrófilos obtenidos tras este gradiente adicional (PMN 2) y el resto de las fracciones (PBMC y PMN 1) se suspendieron en un medio sin suero. Posteriormente se procedió a la inoculación de cantidades crecientes de *M. abscessus* individualizada (cepa 239aba) en placa de 96 pocillos con 10^5 células y se incubó durante 3 días. Las colonias en las células infectadas se contaron bajo microscopio invertido (Figura 22).

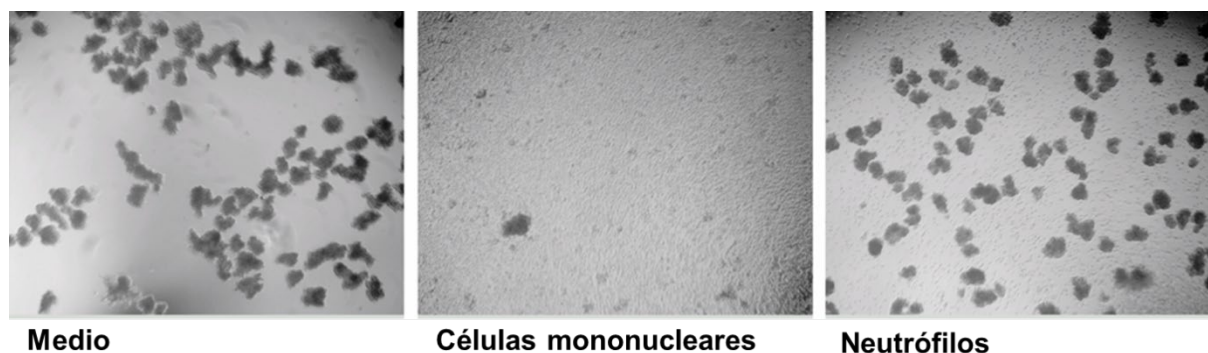
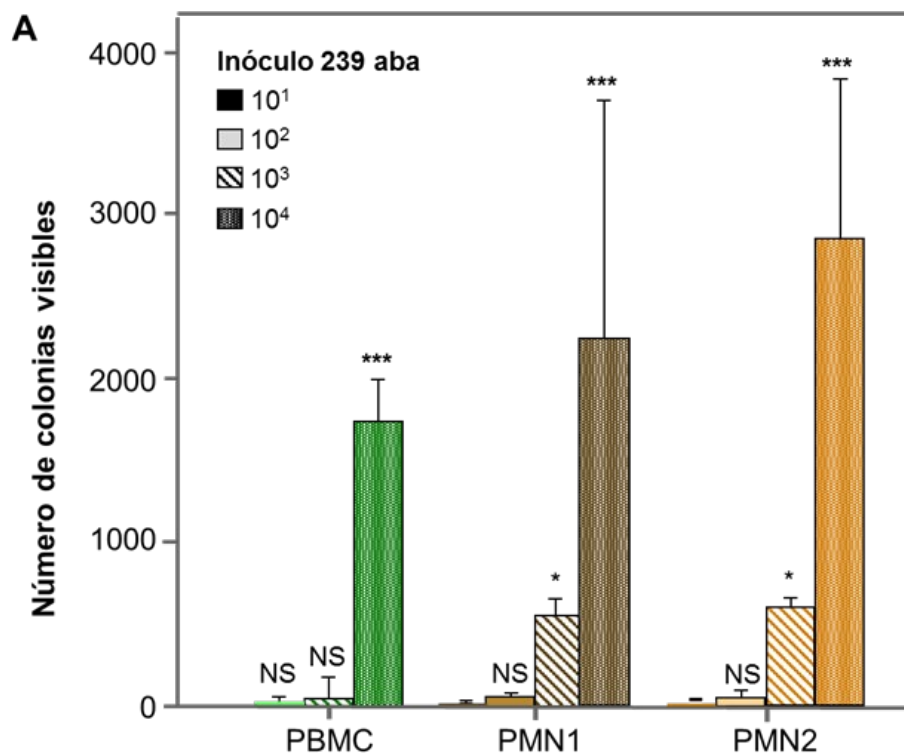


Figura 22. Colonias formadas en medio o células infectadas. Medio, células mononucleares o neutrófilos (10^5 células) se inocularon con 10^2 UFC de *M. abscessus* 239aba e incubadas durante 3 días a 37°C / $5\% \text{CO}_2$.

Se observaron unas pocas colonias cuando se inocularon 10^1 o 10^2 micobacterias. El patrón de colonias visibles tras la infección de PMN 1 y PMN 2

resultó muy similar (Figura 23A). Tras realizar la lisis por sonicación e incubación durante 1,5 – 2 días, se procedió al recuento de UFC. Incluso en los pocillos en los que no se apreciaban colonias micobacterianas, se obtuvieron más de 10^4 UFC tras la lisis celular (Figura 23B). En este paso los patrones obtenidos de las fracciones de PMN 1 y PMN 2 también resultaron muy similares.

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que para nuestro ensayo de infección *in vitro* los eritrocitos no interfieren, pudiendo prescindir de una manipulación adicional en la purificación celular.



RESULTADOS

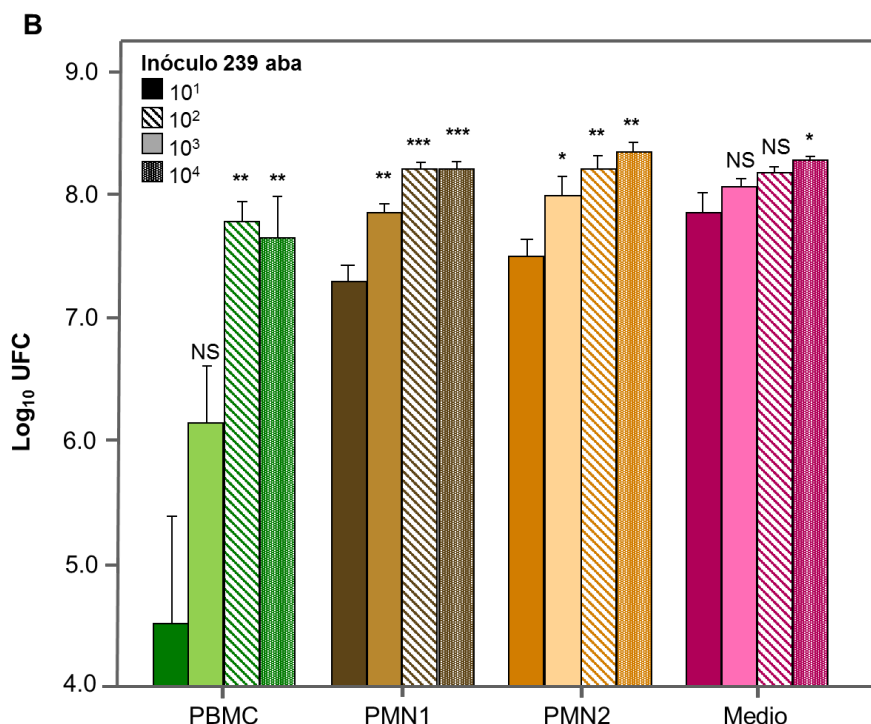


Figura 23. Multiplicación micobacteriana y formación de colonias en PBMC y PMN. Los PBMC se purificaron empleando un gradiente de Ficoll y los PMN dos gradientes sucesivos de Polymorphprep. La primera purificación incluye una capa de Ficoll (PMN 1), pero la segunda se realizó solamente con Polymorphprep (PMN 2). Se añadieron de 10^1 a 10^4 micobacterias individualizadas (*M. abscessus* 239aba) a pocillos con 10^5 células. (A) Número de colonias visibles bajo microscopio invertido tras 3 días de crecimiento. Los datos representan la mediana con un 95% de intervalo de confianza (n=6). La comparación de grupos se realizó mediante el test de Kruskal Wallis y la comparación por pares con el grupo 10^1 por el test de Dunn. $P < 0,05$ se consideró significativo. (B) Tras el recuento de colonias visibles, las células se lisaron por sonicación y se realizaron diluciones decimales de los lisados en medio 7H9 en placa de 96 pocillos con un volumen final de 100 μ l. Tras 36 – 48h, las UFC se contaron. Los datos representan la media y desviación estándar del \log_{10} UFC (n=6). La comparación de grupos se realizó con el test de ANOVA y la comparación pareada con el grupo 10^1 con el test de Tukey. $P < 0,05$ se consideró significativo. $P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$. NS: no significativo.

Para proseguir con el objetivo final de este experimento, se realizaron infecciones con diferentes concentraciones de neutrófilos empleando *M. abscessus*. Se empleó como control del crecimiento bacteriano, micobacterias

suspendidas en medio X-VIVO 15 sin suero en ausencia de neutrófilos. No se observaron diferencias significativas en la multiplicación de *M. abscessus* tras un día de incubación al compararlas con el control (Figura 24). Sin embargo, a los 2 días de incubación, sí se observó un descenso significativo del crecimiento en las infecciones con mayor concentración de neutrófilos (2 y 3×10^5 neutrófilos). Estas diferencias se acentuaron más a los 3 días. Hay que tener en cuenta, que hablamos siempre de inhibición de crecimiento micobacteriano y no de actividad micobactericida.

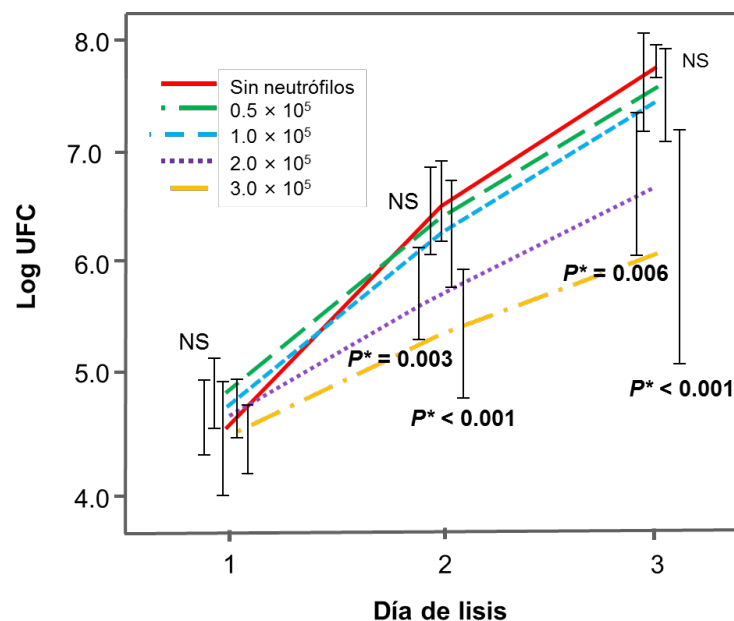


Figura 24. Influencia de la concentración de neutrófilos en el crecimiento de *M. abscessus*. Infección de neutrófilos con 10^3 micobacterias (cepa 239aba). La inoculación de micobacterias en medio X-VIVO 15 (“Sin neutrófilos”) se empleó como control de crecimiento ($n = 12$) en la multiplicación bacteriana en presencia de concentraciones crecientes de neutrófilos ($n = 6$). Las infecciones se lisaron a los 1, 2 y 3 días; y las UFC se contaron. El análisis estadístico de los grupos en cada día de lisis se realizó por ANOVA de una vía. La comparación por parejas se realizó con la prueba post-hoc de Dunnet, comparando cada concentración de neutrófilos con el control.

RESULTADOS

Para saber si los resultados obtenidos son extrapolables a otras cepas y a otras especies, se realizaron infecciones *in vitro* con dos cepas adicionales de *M. abscessus* y dos cepas de *M. mageritense* (Figura 25A), especie que no suele relacionarse con bronquiectasias. En todos los casos, el crecimiento de las micobacterias se inhibió significativamente a los dos días en las infecciones con concentraciones de neutrófilos de 3×10^5 . No se observaron diferencias significativas en el grado de inhibición al realizar la comparación entre las dos especies y entre las cepas empleadas para la infección (Figura 25B), con lo que cabe pensar que la actividad de los neutrófilos frente a las distintas micobacterias es similar.

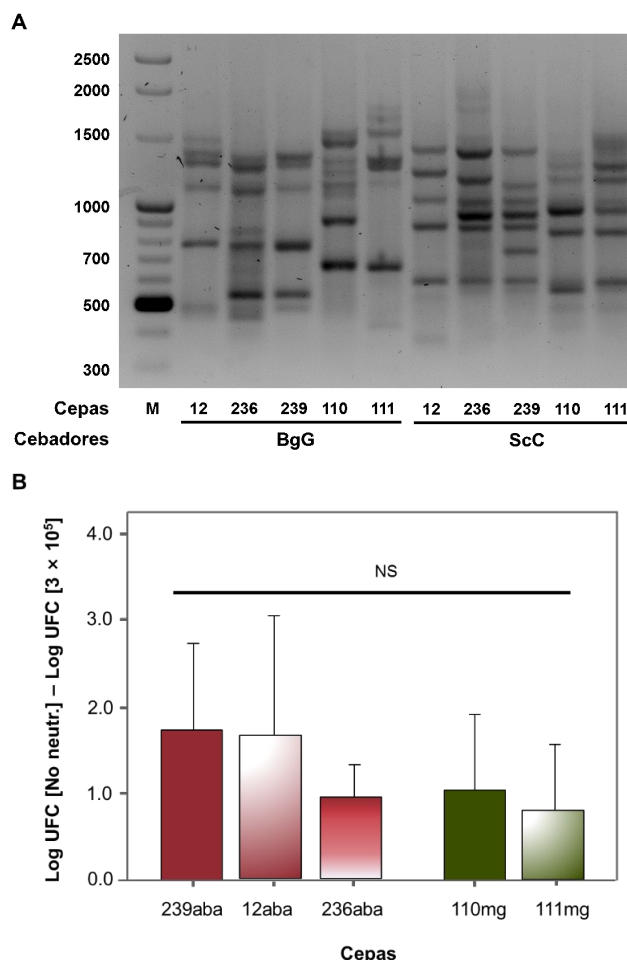


Figura 25. Actividad antimicrobacteriana frente a distintas cepas de *M. abscessus* y *M. mageritense*. (A) AFLP de las cepas de *M. abscessus* (12aba, 236aba, 239aba) y *M. mageritense* (110mg, 111mg), empleado los cebadores BgG y ScC. M: marcador de tamaño molecular (B). La actividad neutrofílica contra las diferentes cepas se comparó midiendo la diferencia de crecimiento micobacteriano entre el grupo “Sin neutrófilos” y el grupo con 3×10^5 neutrófilos ($n = 6$). Para el análisis estadístico se usó ANOVA de una vía y el test post-hoc de Tukey. Los resultados se representaron como media y desviación estándar de las UFCs transformadas a unidad \log_{10} . NS, no significativo. $P^* < 0,05$ se consideró significativo.

El pulmón es un órgano con una gran superficie de intercambio. Ante un estímulo inflamatorio, se produce una migración de leucocitos desde los capilares hasta el parénquima pulmonar. Para simular la continua llegada de neutrófilos al sitio de la infección, se añadieron *in vitro* neutrófilos recién purificados en los pocillos de las infecciones al día siguiente o a los dos días (Figura 26). Se observó una menor tasa de multiplicación de *M. abscessus* cuando las células se lisaban en los 2 o 3 días posteriores a la infección si durante el primer día se adicionaban neutrófilos nuevos, aunque las diferencias solamente fueron significativas en el tercer día. Cuando los neutrófilos “frescos” se incorporaron en el día 2 de

RESULTADOS

incubación no se observó inhibición de crecimiento al día 3 al comparar con la infección sin adición de neutrófilos nuevos. La incorporación de neutrófilos extra potencia la inhibición en el crecimiento micobacteriano observado a altas concentraciones de neutrófilos, pero este efecto desaparece si las bacterias se multiplican durante los dos días previos a la adición.

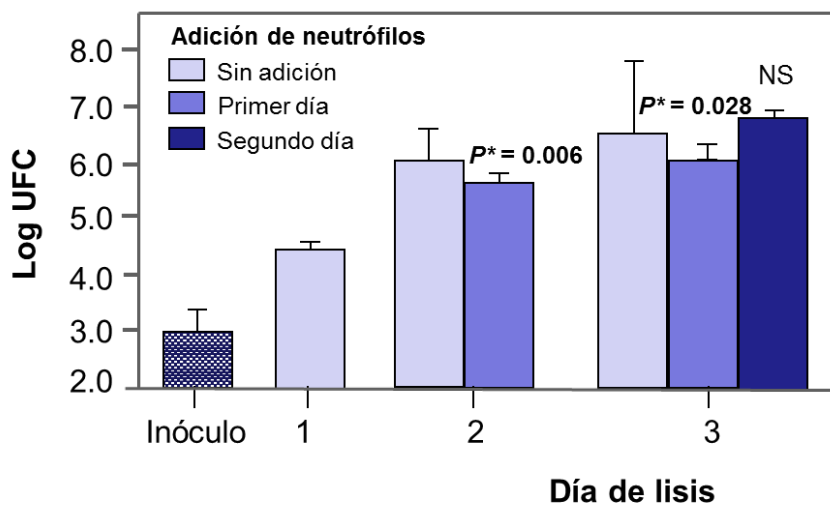


Figura 26. Efecto de la adición en las infecciones in vitro de neutrófilos recién purificados. 3×10^5 neutrófilos se infectaron con 10^3 micobacterias (cepa 239aba). En los pocillos indicados se añadieron 3×10^5 neutrófilos recién aislados tras 1 o 2 días. El análisis estadístico de los grupos en cada día de lisis celular se realizó con la prueba *t* de Student (día 2) o ANOVA de una vía (día 3). La comparación por pares con el control ("Sin adición") se realizó con el test post-hoc de Tukey. Los resultados se representaron como media y desviación típica de UFC transformadas a unidades \log_{10} ($n = 6$). NS, no significativo. $P^* < 0,05$ se consideró significativo

En cuanto a las distintas concentraciones de neutrófilos empleadas, no se encontraron diferencias significativas en el recuento final de colonias de *M. abscessus* tras dos días de infección con 0 y 1×10^5 neutrófilos. Sin embargo, no

se observaron colonias a concentraciones de neutrófilos de 2 o 3×10^5 (Figura 27A), aunque este patrón no siempre se mantuvo en estudios preliminares. Dependiendo del voluntario a partir del cual se obtenían los neutrófilos, se observó desde un desarrollo de colonias en infecciones con alta concentración de neutrófilos (aunque en menor número y más pequeñas) hasta una completa inhibición de crecimiento en infecciones con bajos números de células inmunes.

Tras 6 días de incubación sin reemplazo de neutrófilos, se observó que las colonias se desarrollaban y formaban agregados por confluencia, incluso a concentraciones altas de neutrófilos (3×10^5) aunque en menor número, más pequeñas y sin confluir (Figura 27B). La formación de colonias no resultó ser dependiente del número de bacterias, ya que la media de \log_{10} UFC en los pocillos con 1×10^5 neutrófilos tras 2 días fue similar a la obtenida en los pocillos con 2×10^5 neutrófilos tras 3 días (6,33 SD 0,48 vs 6,77 SD 0,67), pero las colonias solamente fueron visibles en la primera.

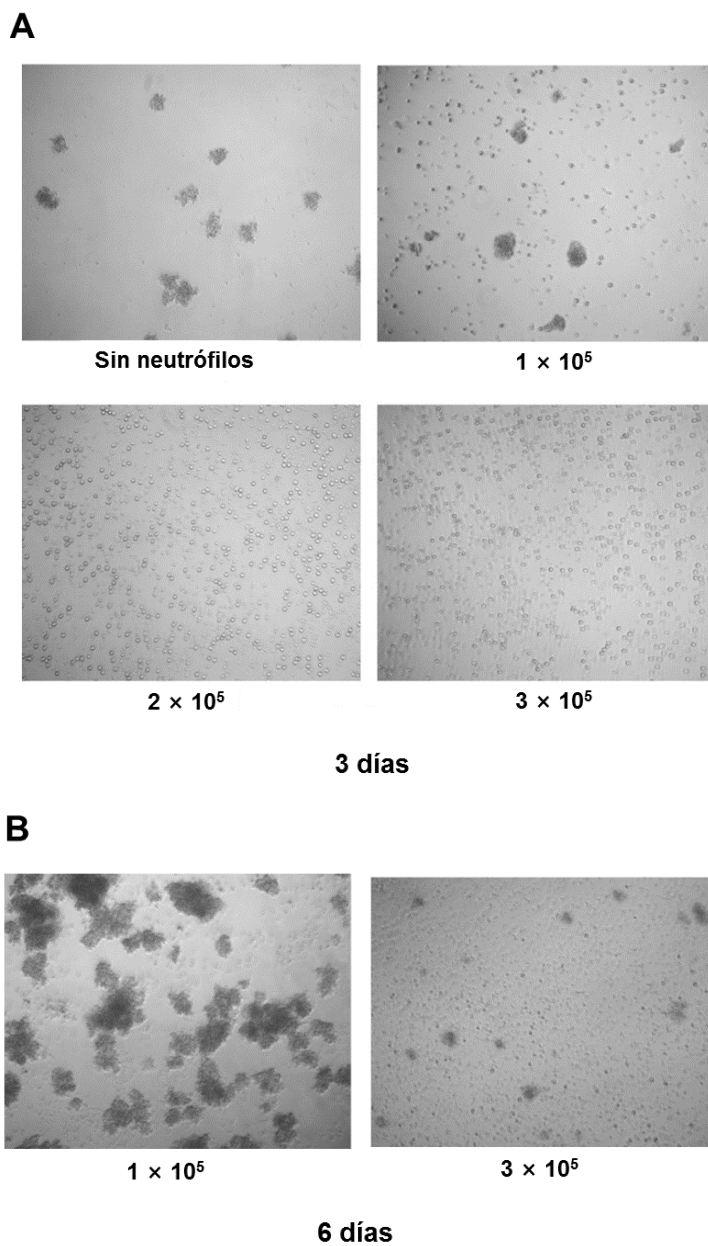


Figura 27. Formación de colonias de *M. abscessus* 239aba en concentraciones diferentes de neutrófilos. La infección de neutrófilos se dejó incubando durante 3 días (A) o durante 6 días (B). Las microfotografías se tomaron a 100 × aumentos.

Las bronquiectasias se consideran un trastorno inflamatorio crónico de las vías aéreas impulsado principalmente por neutrófilos. Cuando estos se estimulan,

se incrementa la liberación de gránulos con proteasas que pueden ocasionar daño tisular (5). Para investigar esta actividad proteolítica se empleó un ensayo de actividad gelatinasa. Se obtuvieron colonias de menor y mayor tamaño de micobacteria tras un crecimiento de 30 horas o 5 días, respectivamente. Adicionalmente, se inocularon bacterias individualizadas el día que se procedió a la infección de neutrófilos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de gelatina sin digerir cuando los neutrófilos se enfrentaron con bacterias individualizadas o con colonias pequeñas (Figura 28). Por otro lado, las colonias de mayor tamaño ocasionaron una mayor hidrólisis de gelatina, reflejando la existencia de una mayor actividad proteolítica y que ésta es dosis dependiente.

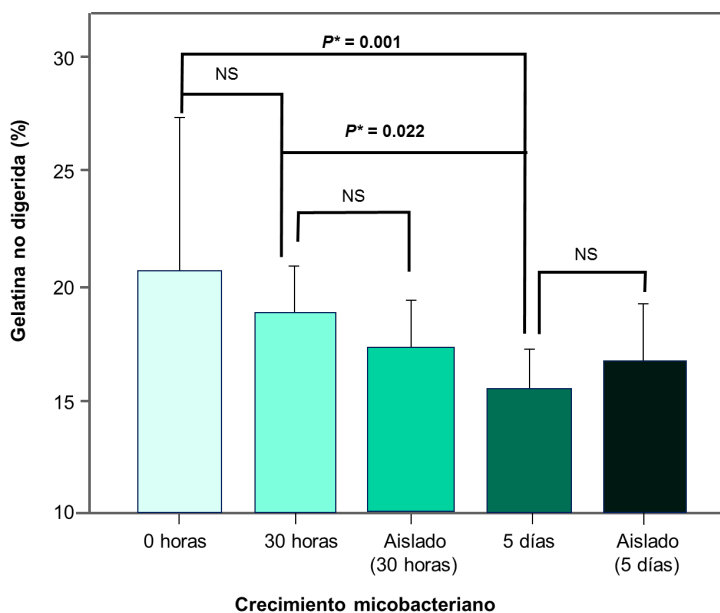


Figura 28. Actividad proteolítica en el sobrenadante de las infecciones de neutrófilos con *M. abscessus*. 3×10^3 bacterias crecieron durante 5 días, 30 horas o 0 horas; o el número correspondiente de bacterias aisladas (10^6 bacterias a las 30h o 7×10^7 bacterias a los 5 días) en 300 μ l (placas de 48 pocillos) de medio X-VIVO 15. Tras este tiempo, 6×10^5 neutrófilos en 200 μ l se añadieron a cada pocillo, se dejaron incubar durante 24 horas más y se

recogieron los sobrenadantes. La actividad gelatinasa de los sobrenadantes se midió como la proporción de gelatina no hidrolizada que permaneció unida a la estreptovidina que recubría los pocillos después de lavar los péptidos proteolizados. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA de una vía y posteriormente se usó el test post-hoc de Tukey. Los resultados se presentaron como medias y desviación estándar ($n = 6$). NS, no significativo. $P^* < 0,05$ se consideró significativo.

Cabe también preguntarse si la infección de células inmunes da lugar a la inducción de quimiotaxis en neutrófilos, que si se prolongase en el tiempo puede ser una de las razones de la cronificación del proceso. Para analizar la migración de los neutrófilos al foco de la infección, se emplearon en un ensayo de quimiotaxis los sobrenadantes resultantes de la infección de leucocitos con bacterias individualizadas y colonias de 5 días de crecimiento (Figura 29). Las cepas de *M. abscessus* estimularon una quimiotaxis similar en ambos puntos; sin embargo, al compararlas con las colonias más crecidas (5 días) de *M. mageritense* se vio que estas últimas inducían un grado de quimiotaxis significativamente mayor. Por lo que estos hallazgos apuntan que la respuesta inflamatoria provocada por *M. mageritense* atrae más neutrófilos a nivel local que la provocada por *M. abscessus*.

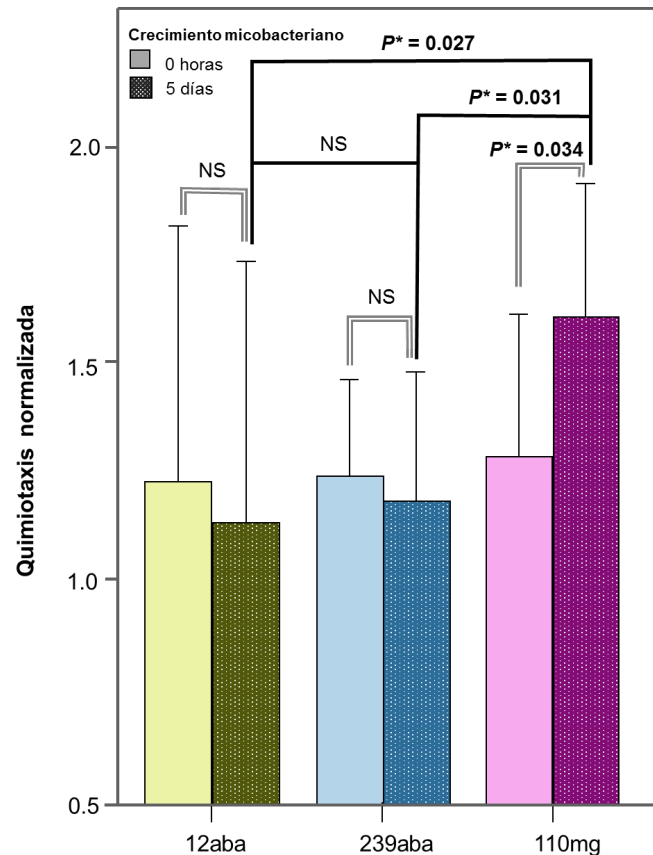


Figura 29. Regulación del reclutamiento neutrofílico. 10^3 bacterias (*M. abscessus* o *M. mageritense*) crecieron durante 5 días, 30 horas o 0 horas en 450 μ l de medio X-VIVO 15 antes de añadir, a cada pocillo, 10^5 leucocitos ($n = 6$). Posteriormente, tras 24 horas de incubación, los sobrenadantes se recogieron y congelaron. Los sobrenadantes ($n = 6$) se inocularon en 96 pocillos Transwell. Cada sobrenadante se testó con dos preparaciones de neutrófilos (10^5 en 75 μ l aislados de dos donantes sanos). El ensayo se incubó durante dos horas antes de cuantificar las células que migraron usando una cámara Neubauer. El número de células migradas se normalizó por comparación con neutrófilos migrados tras incubación con sobrenadantes procedente de leucocitos no infectados. Los resultados se representaron como las medianas e intervalos de confianza del 95% ($n = 6 \times 2$). La comparación entre las 0 horas y los 5 días se realizó por el test de Mann-Whitney (líneas finas). La comparación de las 3 cepas a los 5 días se realizó por la prueba de Kruskal-Wallis (líneas gruesas). Por último, se empleó el test post-hoc de Dunn. NS, no significativo. $P^* < 0,05$ se consideró significativo.

DISCUSIÓN

Existen muchas discordancias en los resultados obtenidos en diferentes estudios para valorar la misma actividad anti-micobacteriana. La mayor parte debidos a la gran heterogeneidad de métodos empleados para las infecciones *in vitro*. Por ello, el objetivo general de este trabajo es buscar y mejorar modelos de infección con micobacterias que permitan reproducir mecanismos de respuesta inmunológica, fundamentalmente de la respuesta innata, frente a las micobacteriosis. Para alcanzarlo proponemos un análisis de distintas variables con el fin de ser lo más fidelignos posibles a los sucesos que ocurren *in vivo*.

1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MODELOS DERIVADOS DE SANGRE

1.1. Actividad anti-micobacteriana en modelos derivados de sangre frente a diferentes especies del género *Mycobacterium*

El modelo *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos es el más empleado para el análisis de infecciones micobacterianas por tratarse de la principal célula implicada en el establecimiento de la respuesta inmunológica frente a las

micobacterias, incluso de erradicar la infección en estadios tempranos, antes de establecerse una respuesta adaptativa (1,2), aunque también constituyen las principales células hospedadoras para estos agentes, facilitando su supervivencia y replicación (3).

Empleando diferentes especies de micobacterias con diversos grados de virulencia, no pudimos poner de manifiesto la actividad micobactericida de estas células fagocíticas por sí mismas, incluso se observó replicación en especies como *M. Bovis* BCG, *M. tuberculosis*, *M. gordonae* y *M. chelonae*, siendo más acusada en esta última, por ser una micobacteria de crecimiento rápido. Estos resultados ya se observaron en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo empleando *M. gordonae* (4) y están en consonancia con los resultados obtenidos por Robertson et al. usando *M. phlei*, micobacteria no patogénica (5) o Mahamed et al. en infecciones con *M. tuberculosis* de macrófagos alveolares y derivados de monocitos previamente estimulados con IFN γ (6).

La acción inmunológica frente a las micobacterias depende de la interacción, directa o a través de factores solubles, entre todas las fracciones celulares, por lo que se han buscado modelos de infección más representativos del proceso *in vivo*. El modelo de sangre completa, a pesar de ser más complejo, ha reflejado efecto bactericida correlacionado con diferentes grados de virulencia en la evaluación tras la vacunación frente *M. tuberculosis* (7) o tras el uso de antimicobacterianos orales (8), por lo que se propuso este modelo como marcador alternativo en el desarrollo de futuros agentes terapéuticos antimicobacterianos.

En los modelos empleamos sangre total anticoagulada con EDTA y leucocitos totales suspendidos en plasma-EDTA. El EDTA es un compuesto quelante fundamentalmente de cationes divalentes, usado como agente terapéutico en la intoxicación por metales (9) o como anticoagulante en muestras hematológicas. La implicación de iones metálicos, como el hierro, en el establecimiento de las micobacteriosis y otras infecciones está ampliamente descrito (10,11), por lo que limitar su captación por el patógeno empleando sustancias quelantes se propuso como posible diana terapéutica frente a micobacterias (12,13). A pesar de no concretar el mecanismo de acción del EDTA, comprobamos que su acción es bacteriostática y pudiera prevenir el crecimiento extracelular de las micobacterias, de manera que las bacterias obtenidas en los recuentos finales se corresponderían a aquellas capaces de resistir los mecanismos anti-micobacterianos intracelulares, explicándose la asociación entre patogenicidad y supervivencia en el modelo de sangre. Si bien, el EDTA, no sólo afecta al crecimiento bacteriano. La quelación de Fe^{+2} y de otros iones, como el Ca^{+2} , Zn^{+2} o Mg^{+2} , implicados en diferentes vías de señalización y activación celulares (11,14), también pudiera estar relacionada con la alteración de algunos mecanismos anti-micobacterianos, como la inhibición en la producción de ROS y citocinas observada (15).

Al realizar una comparación entre los dos modelos se observaron patrones de resistencia diferentes en presencia de EDTA. En el modelo de leucocitos, *M. avium* es ligeramente más resistente que *M. tuberculosis*, contrariamente a lo que sucede en el modelo de sangre total. Durante el proceso de infección en el modelo de sangre pudieran producirse fenómenos de hemólisis, liberándose hemoglobina que puede ser utilizada por *M. tuberculosis* como fuente adicional de hierro,

favoreciendo su resistencia (16,17). Igualmente resulta llamativo que *M. bovis* BCG sea más resistente que *M. chelonae* en leucocitos suspendidos en plasma-EDTA pero no en sangre total. Sin embargo, los resultados obtenidos con *M. bovis* BCG al comparar ambos modelos en presencia de heparina también resultaron dispares, pudiendo deberse a que fue la única micobacteria empleada atenuada en laboratorio y desarrollase un comportamiento diferente, adaptado a la supervivencia *in vitro*.

La especie en la que se observó un patrón más acusado de resistencia en los diferentes modelos fue *M. chelonae*. Si el EDTA inhibe la multiplicación extracelular de las micobacterias, el descenso obtenido pudiera ser una representación de mecanismos anti-micobacterianos intracelulares no artefactados por el quelante. En las muestras heparinizadas se observó una mayor multiplicación de la micobacteria que resultó ser más acusada en el caso de la sangre total en comparación con leucocitos. Este mismo comportamiento también se observó con otras micobacterias de crecimiento rápido. De igual manera que pudiera suceder en el caso de *M. tuberculosis*, la presencia de eritrocitos pudieran favorecer este crecimiento.

Las mayores manifestaciones clínicas del desarrollo de una micobacteriosis son las pulmonares. Debemos tener presente que el parénquima pulmonar es un compartimento inmunológico diferente cuya composición inicial varía respecto a la periférica y es representada en un 90% por macrófagos (18). Los mecanismos antibacterianos de esta fracción celular se irán activando, tras la inhalación de la bacteria y conforme persista en el espacio pulmonar, generándose

progresivamente un ambiente exudativo, en el cual células inmunológicas periféricas se infiltran para hacer frente a la infección. La eficacia de esta respuesta dinámica y la interacción de los diferentes tipos celulares entre sí y con la bacteria, determinará el curso de la infección. En este ensayo se evidencia que los complejos modelos *in vitro*, como sangre total o la fracción leucocitaria de sangre periférica suspendida en plasma, que representan todas las fracciones celulares y el componente humoral, pueden reflejar la respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium* sp mejor que la fracción de macrófagos derivados de monocitos aislada y purificada, por lo que pueden suponer modelos apropiados para evaluar la respuesta inmune en casos de resistencia o de individuos susceptibles.

1.2. Actividad anti-micobacteriana en modelos derivados de sangre de fumadores frente *M. tuberculosis*:

El papel del sistema inmune del hospedador es fundamental para contener o eliminar el bacilo tuberculoso, por lo que factores que repercuten en la inmunidad, como el tabaquismo, favorecen la colonización y el desarrollo de la infección. De hecho, se estima que el riesgo relativo de las personas fumadoras puede llegar a ser el doble que en las no fumadoras (19).

El impacto del tabaco sobre la inmunidad es complejo y variable, en función del nivel y tiempo de exposición. Las alteraciones ocasionadas en el sistema innato y adaptativo, tanto a nivel pulmonar como periférico, son consecuencia de una disfunción celular y una reducción en la secreción de citocinas efectoras (20).

Empleando los modelos de sangre total y leucocitos suspendidos en plasma, propuestos en el experimento anterior como candidatos para el estudio de individuos susceptibles, no hemos obtenido resultados estadísticamente significativos que pusieran de manifiesto la influencia tabáquica en la inmunidad periférica. Tampoco en los modelos adicionales empleados de neutrófilos, células mononucleares periféricas o macrófagos derivados de monocitos. Estos resultados contrastan con los observados por otros autores que describen un incremento de resistencia bacteriana en la población fumadora secundario a un déficit en la actividad inmunitaria.

Elisia et al. emplearon el modelo *in vitro* de sangre total de fumadores y no fumadores para comparar la respuesta frente *E. coli* (21). Observaron que la producción de citocinas, tras la estimulación con el patógeno, se reducía de forma más acusada en las muestras de fumadores, suponiendo que esta alteración pudiera ser en parte responsable de la susceptibilidad a infecciones, pero sin realizar más estudios para demostrar la supervivencia de la bacteria. Van Zyl-Smitt et al. estudiaron el efecto de la exposición de extracto de tabaco sobre macrófagos alveolares y derivados de monocitos frente a la infección con *M. bovis* BCG (22). Corroboraron los resultados obtenidos en modelo de sangre sobre la producción de citocinas, y además, realizaron estudios de fagocitosis y resistencia antibacteriana. No observaron alteraciones en la capacidad fagocítica de las células, pero tras la exposición a extracto de tabaco observaron mayores concentraciones del bacilo tras 5 días de incubación. Estos autores relacionaron la alteración en la producción de citocinas con el fallo en la contención del crecimiento bacteriano por las células monocíticas/macrofágicas. Sin embargo, emplearon una micobacteria no patógena,

que pudiera no manifestar el mismo comportamiento que una más virulenta. Shang et al. empleando *M. tuberculosis* H37Rv correlacionaron los efectos del tabaco *in vivo* en modelo murino, con los efectos *in vitro* sobre células THP-1 o macrófagos alveares expuestas a extracto de tabaco (23). En los tres modelos ensayados obtuvieron mayor resistencia de *M. tuberculosis* tras la exposición a tabaco o a extracto y obtuvieron resultados comparables a los anteriores autores en cuanto a fagocitosis y producción de citocinas.

Desconocemos si con los modelos de estudio propuestos habría diferencias en la producción de citocinas entre ambas poblaciones, de ser así, estas no reflejarían defectos significativos en la actividad frente a *M. tuberculosis* de la población fumadora. Exponer los diferentes tipos celulares directamente a extracto de tabaco, quizás no sea el modelo más representativo de los sucesos *in vivo* a nivel periférico. Si bien los macrófagos alveolares tiene una exposición más directa al humo del tabaco, las células periféricas estarán expuestas a una concentración menor de aquellas sustancias absorbibles por el parénquima pulmonar y considerando que no sufran ningún tipo de metabolismo. Además, desconocemos si la exposición directa a las sustancias oxidantes del tabaco pudiera producir alteraciones más acusadas en las membranas externas celulares, que aunque no comprometan su viabilidad, produzcan cambios morfológicos que alteren la interacción de los antígenos bacterianos con los receptores celulares correspondientes.

A pesar de estar ampliamente aceptado que el hábito tabáquico aumenta la susceptibilidad al desarrollo de tuberculosis, todavía es necesaria la búsqueda de

modelos *in vitro* más representativos del proceso, que nos permitan dilucidar los mecanismos implicados.

2. ESTRATEGIA BASADA EN Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) PARA GENOTIPAR DE FORMA RUTINARIA MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

En los experimentos previos para valorar los otros modelos de infección, se tuvo en cuenta el nivel de patogenicidad de las especies empleadas, pero solamente se empleó un aislado clínico de cada especie. En determinadas condiciones patológicas, como en las bronquiectasias, es muy común el desarrollo crónico de infecciones, pudiendo deberse a reinfecciones por cepas diferentes. Está descrito que diferentes cepas de una misma especie pueden manifestar diferente resistencia a la actividad anti-micobacteriana (24–26), por lo que resulta interesante emplear distintas cepas en este modelo, además, esto nos va a permitir obtener resultados más representativos del comportamiento inmunológico frente a la especie empleada. Sin embargo, garantizar que las cepas de MNT obtenidas de aislados clínicos no son iguales entre sí, puede suponer un reto ya que la discriminación genotípica en este grupo micobacteriano no es habitual en la práctica clínica.

En últimos años se han desarrollado múltiples métodos moleculares en su mayoría enfocados a la caracterización de cepas de *M. tuberculosis* que posteriormente son adaptados para especies específicas de MNT (27). No obstante, dado el nivel de diversidad genética y la falta de datos para establecer el grado de discriminación de muchos métodos genotípicos para este grupo micobacteriano, es preciso recurrir a la secuenciación del genoma completo cuando

se requiere una caracterización completa, lo cual supone una complejidad y un coste inasumible de forma rutinaria.

Nuestro objetivo fue diseñar un método accesible y flexible, que se adapte a un pequeño número de cepas, que permita diferenciarlas completamente y que sea apropiado para analizar múltiples especies. Para valorar el poder discriminatorio del método, se empleó el Índice Discriminatorio de Gaston Hunter (IDGH) (28), considerando el rango 0,90 – 0,99 propuesto por Mokrousov et al. para garantizar una buena resolución, en base a las sobreestimaciones observadas en el IDGH en múltiples estudios consecuencia del número de loci empleados en el método, el área geográfica que abarca el estudio y el número de cepas circulantes en la misma (29).

El método AFLP descrito por Vos et al. (30) fue aplicado en la tipificación bacteriana por Janssen et al. Emplearon dos enzimas de restricción, una de “corte raro”, que reconoce un sitio de corte de 6 pares de bases, y otra de “corte frecuente”, que reconoce 4 pares de bases, con sus dos correspondientes adaptadores, uno para cada sitio de restricción generado. Con este método se obtienen de 30 a 50 bandas con un tamaño de fragmento de ADN de 80-550 pb (31) cuya interpretación es compleja, requiriendo el uso de gel de poliacrilamida para mejorar la resolución de las bandas en la electroforesis y de un programa informático de análisis de imagen para interpretar los distintos patrones. Posteriormente diferentes autores realizaron modificaciones de este método con el fin de simplificarlo y emplearlo en la distinción de cepas micobacterianas.

En el caso concreto del genotipado de micobacterias, Gaafar et al. analizaron diferentes cepas de *M. kansasii*, empleando una sola enzima de restricción de “corte raro” (*Apal*) que reconoce un sitio de restricción que solo incluye los nucleótidos C y G (GGGCC↓C), lo cual fue considerado apropiado para el análisis de genomas con alto contenido en nucleóticos C+G, como es el caso de las micobacterias. También añadieron el adaptador oportuno y tres cebadores, cada uno con diferente extensión de nucleótido (A, C o T) que se emplearon individualmente en la PCR (32). El resultado fue un patrón sencillo, de 3 a 7 bandas en función del cebador, y tamaños de fragmentos de ADN mayores, que permitió diferenciar las bandas visualmente en gel de agarosa. Las 253 cepas empleadas se separaron en 12 grupos con patrones diferentes. Un 48% de las cepas pertenecían a un mismo grupo, sin poder discriminarse, lo cual invalida el método.

Viader-Salvadó et al., modificaron el método para caracterizar aislados de *M. tuberculosis*. Emplearon una enzima de restricción de “corte raro” (*XhoI*), escogido porque escinde la secuencia de inserción IS6110, y un solo cebador extendido con un único nucleótido (G) (33). Obtuvieron diferentes patrones de bandas, sencillos y fácilmente identificables en gel de agarosa, para cada aislado utilizado. Sin embargo, otros autores no lograron reproducir el poder discriminatorio de este método, proponiéndolo como una técnica de cribado inicial (34).

Las diferencias en cada trabajo fueron los criterios empleados en la selección de las enzimas de restricción. Nosotros empleamos dos enzimas de restricción de “corte raro” seleccionados de forma empírica en estudios previos por su alta

capacidad discriminativa, *SacI* y *BglII*, lo que nos permitió aumentar el número de cebadores disponibles. Pudimos discriminar 24 de las 28 cepas empleadas.

Las cepas 17, 18 y 19 consideramos que pudieran tratarse de la misma y ser el resultado de una contaminación cruzada, ya que se aislaron en el mismo laboratorio en el intervalo de un mes, mostraron un antibiograma muy similar y fueron aisladas una sola vez en esputo de pacientes no relacionados.

Las cepas 1 y 2 las pudimos diferenciar empleando como cebador *BgT* tras digerir el ADN solamente con *BglII*. Con el método propuesto, cortando con los dos enzimas habríamos considerado que pudieran tratarse de la misma cepa o que estuvieran estrechamente relacionadas, cuando en realidad, son distintas. Con criterios más laxos empleados por otros autores, pudiéramos seguir pensando que igualmente se tratasen de la misma cepa (35–37). Sin embargo, con el bajo número de bandas que se generan con nuestro método, optamos por utilizar criterios más restrictivos seguidos por otros autores (sólo pertenecen a la misma agrupación las cepas que tiene idéntico patrón de bandas) (38,39). En el momento de interpretar el patrón de bandas obtenido, debemos tener presente que el poder discriminatorio de los métodos genotípicos no es perfecto (40,41) y dos cepas distintas pueden compartir un mismo patrón. Unido a que no hay unos límites bien establecidos para definir una agrupación (42) cada investigador deberá elegir los criterios más adecuados para su estudio.

Las situaciones más habituales en la práctica clínica en las que sería apropiado recurrir a técnicas de genotipado, se limita a un número reducido de cepas e incluyen la necesidad de determinar si la micobacteriosis persistente de un

paciente es producto de la misma cepa o de una infección mixta o, por otro lado, determinar si el origen de un brote es nosocomial. Con el método propuesto, emplearíamos los siete cebadores simultáneamente en el mismo gel. Por razones no aclaradas, con BgA obtenemos un número muy pequeño de bandas que nos permitirían agrupar fácilmente aislados relacionados. Con los cebadores ScC y ScA se obtienen perfiles más polimórficos con los que se pueden diferenciar los aislados de cada grupo. Es necesario correr todas las muestras a comparar en un único gel porque se facilita la comparación visual de las bandas generadas, sobre todo de aquellas con tamaños similares, como es el caso de las cepas 22 y 23.

Jeon et al. caracterizaron 44 aislados de *M. intracellulare* por cuatro métodos de genotipado y obtuvieron el Índice Discriminatorio (ID) para cada uno: Multilocus Sequence Typing (MLST) (ID = 0,965) , Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) (ID = 0,992), VNRT (ID = 0,985) y MIRU-VNRT (ID = 0,884) (43). Con la técnica que hemos diseñado, obtuvimos un poder discriminatorio aceptable (ID = 0,989) (29), sólo superado ligeramente por la PFGE, pero suficiente para el objetivo clínico deseado y con la ventaja de ser un método técnicamente poco demandante con el que obtener resultados de forma sencilla y rápidamente interpretables.

3. MODELO DE NEUTRÓFILOS PARA REPRODUCIR FENÓMENOS INMUNOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DE BRONQUIECTASIAS

El hecho de emplear como muestra sangre periférica, resulta atractivo por la facilidad que supone obtenerla. Con el modelo de sangre completa, no se requieren manipulaciones adicionales de purificación celular, previas a la infección correspondiente. No obstante, debido a la grandes cantidades de eritrocitos presentes, no se mimetiza el ambiente en el que las bacterias van a interactuar con las células inmunitarias. Con el modelo de leucocitos suspendidos en plasma se requieren pasos adicionales para obtener la fracción leucocitaria, pero la presencia de eritrocitos es muy reducida, por lo que este modelo pudiera ser más adecuado. A pesar de que con estos dos modelos se pudiera representar de forma global el proceso inmunológico, los resultados se deben interpretar y extrapolar con precaución. Un ejemplo de ello, fueron los resultados obtenidos al ensayarlo con sujetos fumadores.

En determinadas circunstancias, la migración a pulmón de un tipo celular predomina sobre los otros, como en el caso de las bronquiectasias, caracterizadas por una infiltración neutrofílica (44). Por lo que, para representar los fenómenos que se desarrollan en las mismas, el modelo de neutrófilos puede ser relevante.

Las bronquiectasias son una patología crónica con manifestaciones clínicas muy heterogéneas cuyas exacerbaciones repercuten negativamente en el pronóstico y calidad de vida del paciente. El interés por esclarecer los mecanismos fisiopatológicos subyacentes implicados en el desarrollo de las bronquiectasias

cada día es mayor y los neutrófilos se consideran las principales células implicadas en este deterioro, conjuntamente con el desequilibrio de la microbiota pulmonar (45,46). Actualmente la asociación de esta patología con MNT está ampliamente aceptada, y cada vez se aíslan con mayor frecuencia especies pertenecientes al complejo *M. avium* y *M. abscessus* (47,48), aunque menos de lo que cabría esperar dada la ubicuidad ambiental de estos agentes. En la literatura todavía existe mucha controversia acerca de la actividad anti-micobacteriana de los neutrófilos, y a pesar de suponer que pudieran ejercer algún papel, todavía está poco caracterizado (49–51).

Se desarrolló un modelo de neutrófilos purificados en el que incluimos diferentes modificaciones respecto a los protocolos de infección habituales que minimizan la variabilidad técnica, para tratar de representar lo más fielmente posible los eventos sucedidos *in vivo* en el transcurso de una infección crónica (Figura 30). Las infecciones se realizaron empleando *M. abscessus*, basándonos en el nivel de resistencia que las micobacterias de crecimiento rápido manifestaron en experimentos anteriores, además del interés de esta especie por su complicado manejo clínico y terapéutico. Para obtener una mejor extrapolación de los resultados, se compararon tres cepas diferentes de aislados clínicos, de morfología lisa en agar 7H11, forma relacionada con la habilidad de deslizarse sobre superficies y generar biopelículas como mecanismo de resistencia, ambos factores que favorecen la colonización, paso inicial necesario para desencadenar una infección (52,53).

En nuestro modelo, el proceso de individualización bacteriana se realizó siguiendo un protocolo estandarizado por nuestro laboratorio, y común a los experimentos anteriores. Se llevó a cabo por sonicación, con posterior verificación de que no se comprometía la viabilidad de las bacterias, y crecimiento en medio sólido suplementado, evitando el empleo de medios líquidos con adición de detergentes (Figura 30A). El uso de emulsificantes es estándar en la práctica para disminuir la agregación de las micobacterias y obtener cultivos más homogéneos. Sin embargo, su utilización altera el crecimiento de las micobacterias de forma variable en función de la especie y la composición lipídica de la pared celular, que repercute en la morfología y en los determinantes antigénicos de superficie, y con ello, puede artefactar la interacción del patógeno con las células inmunitarias *in vitro* (54).

La purificación celular se realizó por un doble gradiente de densidad, que nos permitió mejorar la eficacia, en un único paso, de la separación de las fracciones de células mononucleares y polinucleares, siendo estas últimas objeto de este experimento (Figura 30B). El rendimiento en la recuperación de neutrófilos fue alto aunque también fue elevada la presencia de eritrocitos y, a pesar de observar que esta fracción remanente no interfiere en nuestros ensayos *in vitro*, optamos por realizar una separación adicional con Polymorphprep para minimizar la contaminación eritrocitaria, en vez de inducir su lisis. En el mercado existen varios reactivos de lisis eritrocitaria, pero su elección ha de ser cuidadosa ya que algunos pueden aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática, afectando a la actividad celular (55). Una técnica rápida, sencilla y económica incluida frecuentemente en los protocolos, es el choque hipoosmótico con agua desionizada

(56). Pero además de presentar una alta variabilidad en su recuperación como consecuencia del ajuste del tiempo de lisis diferente para cada donante (57,58), Pan et al. describieron modificaciones morfológicas en la población leucocitaria, más acusadas en la población granulocítica (58), de las cuales desconocemos las repercusiones que pudieran tener en nuestras infecciones.

En el proceso de infección destaca el empleo de medio celular sin suero. En experimentos previos comprobamos que *M. abscessus* crece en este medio en 2 – 3 días, y esta capacidad va a permitir la multiplicación extracelular de las bacterias resistentes a la actividad celular. Generalmente en los cultivos se emplea medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino o suero humano. La presencia de suero puede favorecer la opsonización de la micobacteria incrementando su fagocitosis aunque no es imprescindible (59). Además de la variabilidad biológica en componentes séricos, tales como IgG o factores del complemento, que podría complicar la valoración y/o extrapolación de los resultados, Fuch et al. describen una inhibición dosis-dependiente en la formación de NETs al incubar neutrófilos con concentraciones crecientes de suero (60), siendo este un mecanismo antibacteriano relevante. El uso de medio sin suero permite la supervivencia y actividad celular en condiciones reproducibles y bien establecidas, permitiendo incrementar la uniformidad de los ensayos (61). En función de la finalidad de cada experimento, incluir los factores humorales sería factible. Sin embargo, el objetivo propuesto en este ensayo es desarrollar un método robusto que nos permita reflejar el papel de los neutrófilos en las bronquiectasias durante una infección por *M. abscessus*, asumiendo el grado de variabilidad interindividual que pudiera existir al

emplear células de donantes, en vez de líneas celulares, homogéneas pero con limitada representatividad de las células normales por ser de origen tumoral.

Otro punto a tener en cuenta en las infecciones realizadas es la MOI. Empleamos una MOI muy baja, que nos permite optimizar la fagocitosis de las bacterias (Figura 30C). Muchas células no estarán infectadas, suponiendo que esto es lo que sucede al inicio de las micobacteriosis o con el flujo continuo de neutrófilos durante la cronificación. En otros protocolos en los que se usan MOI de 1 a 100, permanecerán sin fagocitar gran número de bacterias y los investigadores intentan eliminarlas mediante lavados celulares y la posterior adición de antibióticos (62) u otras sustancias (63), aumentando la manipulación de la muestra y pudiendo introducir variaciones técnicas adicionales. En nuestro caso, las bacterias extracelulares que pudieran quedar podrán influir en los resultados finales, pero no de forma tan acusada por lo que podrá solventarse empleando como controles las micobacterias inoculadas en el medio sin presencia de neutrófilos, sin ser necesario añadir más pasos al proceso.

Por último, en los experimentos cuya finalidad sea determinar la resistencia de las micobacterias en las células inmunitarias, se va a requerir establecer un método de marcaje bacteriano para la posterior medida indirecta de micobacterias viables o un método de liberación celular para el recuento directo de las micobacterias supervivientes en medios de cultivo. Hay una gran variedad de métodos que se emplean para la lisis celular, desde métodos químicos empleando detergentes, como dodecil sulfato de sodio (SDS) y posterior neutralización con albúmina sérica bovina (64) o Triton-X100 (64,65), hasta métodos físicos mediante

la lisis hipoosmótica (56) o sonicación. En nuestros modelos optamos por emplear este último, ya que no afecta a la viabilidad de las bacterias y nos permite minimizar infraestimaciones en el posterior recuento de UFCs, además, no requiere incluir reactivos adicionales a las infecciones y a la par de la lisis celular, se produce una disgregación de los pequeños acúmulos bacterianos. Sin embargo, para este modelo de neutrófilos, y basándonos en la capacidad de *M. abscessus* de crecer en el medio empleado, aplicamos una forma alternativa de medida de la inhibición del crecimiento micobacteriano por las células, enumerando directamente las UFC en la infección *in vitro*, de manera que podemos prescindir de este último paso.

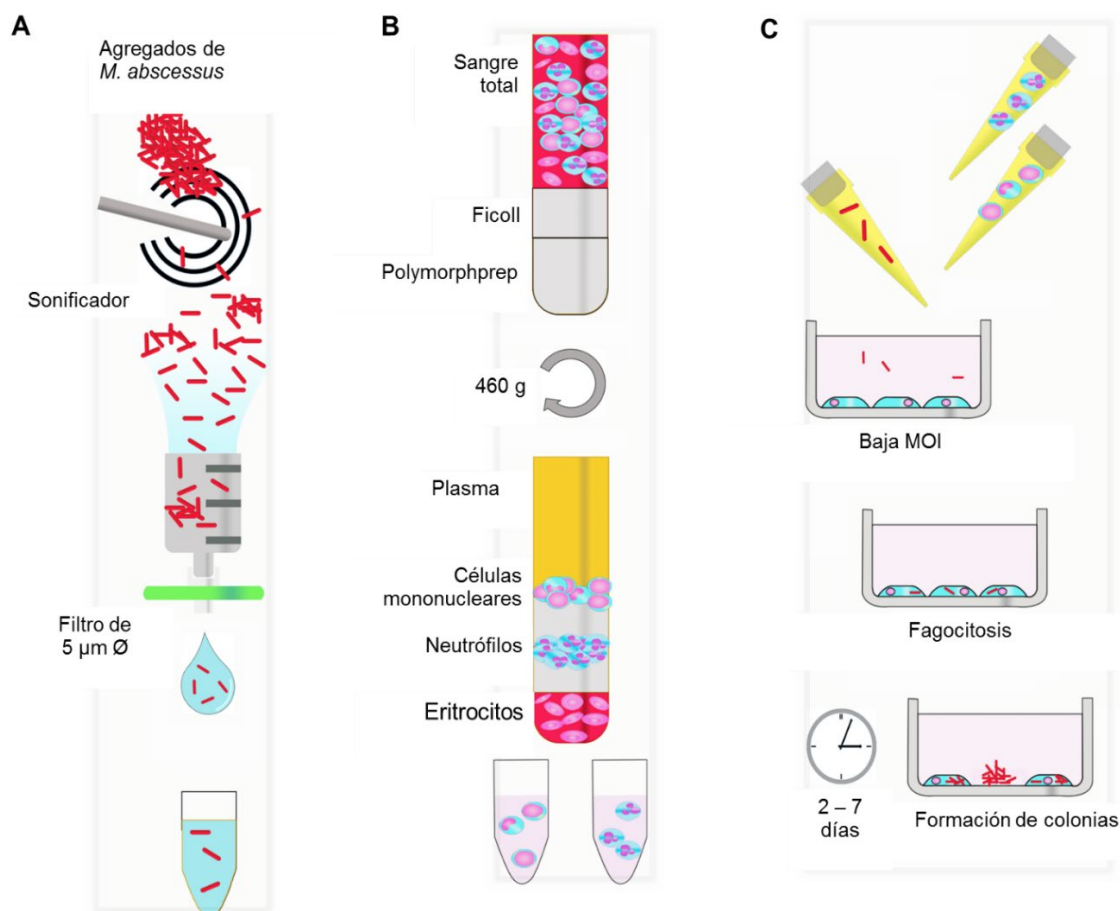


Figura 30. Modelo de neutrófilos desarrollado. (A) Individualización bacteriana. (B) Purificación celular. (C) Proceso de infección.

En estudios previos empleando aislados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* Li et al. pusieron de manifiesto que la capacidad bactericida de los neutrófilos depende de su concentración inicial y no de la relación neutrófilos/bacteria (66). En consonancia con esta premisa, hemos observado que a partir del segundo día de incubación se produce una limitación significativa del crecimiento de *M. abscessus* al emplear concentraciones iniciales de neutrófilos más elevadas. Este comportamiento fue común a todas las cepas de *M. abscessus* y *M. mageritense* empleadas. El número de bacterias recuperadas en cada punto

de las curvas de tiempo a cada concentración de neutrófilos fue mayor con respecto al punto anterior y al inóculo inicial, de lo cual se concluye que no ejercen actividad micobactericida.

Al sexto día de incubación las colonias observadas en todos los cultivos pudieran ser resultado de la limitada viabilidad de los neutrófilos, dada su corta vida media. *In vivo*, se produce una llegada continua de neutrófilos al foco infeccioso mientras este persiste. Al simularla mediante la adición de neutrófilos frescos, observamos menor multiplicación de *M. abscessus* cuando las células se lisaron a los 2 o 3 días, si se añadieron desde el primer día. Estos datos sugieren que la continua infiltración de neutrófilos desde estadios iniciales de la infección, es necesaria para limitar la multiplicación bacteriana.

En la literatura se ha descrito que *M. abscessus* puede persistir *in vivo* en forma de biopelículas en las paredes alveolares, así como en microagregados en el espacio intersticial pulmonar (67). Esta forma de resistencia, está relacionada con la persistencia de la infección y la resistencia a fármacos. Malcolm et al., estudiando la respuesta neutrofílica frente *M. abscessus* sugieren que el ambiente inflamatorio generado por la presencia de neutrófilos, favorece que *M. abscessus* desarrolle biopelículas más rápido, y con ello, su resistencia (68). Aunque el modelo de infección empleado por estos autores podría estar limitado por un corto periodo de incubación, de horas, y por la alta MOI, que podría desbordar la actividad de los neutrófilos. Con las observaciones aportadas con nuestros experimentos, podemos resaltar la importancia de la concentración inicial de neutrófilos y el tiempo de su reclutamiento en el establecimiento o eliminación de la infección. Desconocemos la

implicación y la actividad de los neutrófilos durante este proceso. Podríamos hipotetizar que si los neutrófilos no se encuentran en una cantidad suficiente, la activación no alcanza un umbral mínimo determinado necesario para desencadenar la respuesta antibacteriana, por lo que la bacteria dispondrá de tiempo para crecer y formar agregados, que seguirán creciendo, siendo posteriormente más complicados de ser fagocitados por los neutrófilos. De forma similar sucedería si se produce un retraso en el flujo de neutrófilos frescos. Resultados semejantes obtuvieron Ghimire et al., en su trabajo sobre el estudio de la formación de biopelículas por *Staphylococcus aureus* en dispositivos biomédicos (69). Estos autores realizaron infecciones a concentraciones variables de neutrófilos e infecciones preincubando las bacterias antes de añadir neutrófilos. Observaron que los neutrófilos, siempre que estuvieran en una concentración adecuada, eran capaces de fagocitar las bacterias presentes, aisladas o en muy pequeños agregados, previniendo la formación de las biopelículas. Si los agregados bacterianos crecían lo suficiente antes de añadir los neutrófilos, estos no podían ser fagocitados y continuaban creciendo.

Estudiamos la quimiotaxis inducida por los sobrenadantes de leucocitos, en los que se incluyen todas las fracciones celulares sanguíneas que liberan quimiocinas, previamente infectados por micobacterias aisladas (sin tiempo de crecimiento suficiente para formar colonias) o con micobacterias agregadas (colonias obtenidas tras 5 días de crecimiento). Con las cepas de *M. abscessus* se produjo una migración celular similar con ambos sobrenadantes. Por el contrario, los agregados de *M. mageritense* produjeron un nivel de reclutamiento celular mayor que las cepas de *M. abscessus*. Tal vez esta variabilidad pudiera explicar

por qué *M. mageritense* no sea una micobacteria asociada generalmente a bronquiectasias. Es concebible que el mayor flujo de neutrófilos inicial son capaces de limitar su crecimiento, o si este ya se ha empezado a establecer, los pequeños agregados pudieran ser atacados por más de un neutrófilo, produciendo su disgregación y posterior eliminación.

Finalmente, se estudió el grado de liberación de proteasas por los neutrófilos, por ser, hipotéticamente, las principales causantes del remodelado tisular característico de las bronquiectasias (45). No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando los neutrófilos se infectaron con micobacterias aisladas o con colonias de pequeño tamaño de *M. abscessus*. En oposición, la actividad proteolítica resultó ser más acusada cuando se infectaron con grandes colonias de 5 días de crecimiento. Esto puede ser indicativo de que el daño es proporcional al crecimiento de la micobacteria, con lo que si la bacteria no llega a multiplicarse hasta ese nivel, es posible que no se descompense la actividad neutrofílica y no se produzca el daño en el parénquima.

Con el modelo diseñado, hemos observado que los neutrófilos tienen un papel importante en el control de las infecciones por *M. abscessus*, limitando su crecimiento y fundamentalmente, la formación de agregados; sin estar ligados, *per se*, a daño en el tejido pulmonar. Podemos hipotetizar que la exposición a las MNT, al ser micobacterias ambientales, es muy frecuente. En la mayoría de los casos no resultan dañinas, pudiendo incluso, llegar a ser parte la microbiota pulmonar. Sin embargo, en determinados grupos poblacionales susceptibles, su crecimiento se desregula y puede ocasionar la exacerbación neutrofílica con la consecuente

DISCUSIÓN

generación de bronquiectasias (Figura 31). Como consecuencia, especulamos que no sería necesario erradicar a *M. abscessus*, sino evitar que crezca hasta la formación de biopelículas en forma de agregados.

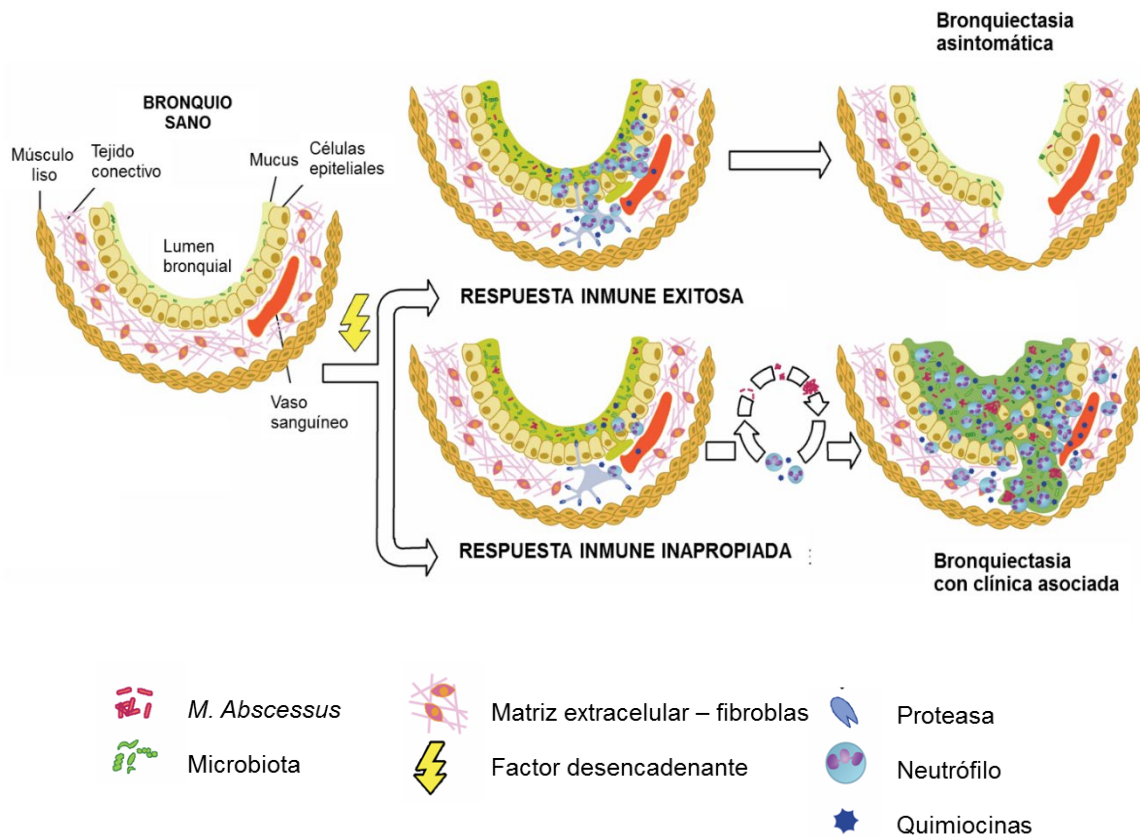


Figura 31. Modelo hipotético propuesto del proceso fisiopatológico de las bronquiectasias.

CONCLUSIONES

Primera: La metodología diseñada para la infección celular permite reducir interferencias técnicas. Sus principales características son el empleo de pocas bacterias por célula, la incubación en medio sin suero, y la lisis celular mediante sonicación. En ocasiones no se lisan las células para permitir la formación de agregados bacterianos.

Segunda: El método optimizado de genotipado por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) se puede aplicar eficazmente en la rutina para el genotipado de un pequeño número de cepas de micobacterias no tuberculosas.

Tercera: Los modelos de sangre completa y leucocitos totales pueden representar mejor el comportamiento inmunológico frente las diferentes especies micobacterianas.

Cuarta: No se observó actividad micobactericida en ninguno de los modelos celulares empleados.

Quinta: En infecciones *in vitro*, el EDTA ejerce una acción bacteriostática sobre las micobacterias extracelulares.

Sexta: No se observó mayor susceptibilidad de células purificadas de individuos fumadores a la infección por *M. tuberculosis*.

Séptima: Los neutrófilos, en altas concentraciones, limitan el crecimiento y la agregación micobacteriana.

Octava: La liberación de enzimas proteolíticas depende del grado de agregación micobacteriana.

Novena: Los sobrenadantes de células infectadas con *M. mageritense* inducen mayor grado de quimiotaxis que empleando *M. abscessus*.

RESUMEN / SUMMARY

M. tuberculosis es la especie del género *Mycobacterium* sp que más infecciones causa en todo el mundo. Sin embargo, en las últimas décadas ha aumentado considerablemente la prevalencia de infecciones por micobacterias no tuberculosas (MNT), fundamentalmente la forma pulmonar asociada a patologías crónicas, como bronquiectasias. Todavía se desconocen todos los mecanismos inmunológicos implicados en estas infecciones, en parte por la diversidad de ensayos *in vitro* disponibles, que no logran reproducir adecuadamente la respuesta fisiológica. En el presente trabajo, optimizamos diversos modelos derivados de células sanguíneas para analizar la actividad anti-micobacteriana frente a diferentes especies del género, seleccionadas en función de su nivel de patogenicidad, para reproducir los fenómenos sucedidos *in vivo* en poblaciones susceptibles, como fumadores o pacientes con bronquiectasias.

La purificación celular se realizó, generalmente, por doble gradiente de sedimentación y la individualización bacteriana, por sonicación. En la infección *in vitro* se empleó un bajo número de bacterias por célula, que se incubaron en medio sin suero. Para poder asegurar que los aislados clínicos correspondían a cepas diferentes, diseñamos un método sencillo de genotipado, basado en la técnica “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP, en inglés), que nos permitió obtener resultados fácilmente interpretables, con buen nivel de discriminación.

En el modelo de macrófagos derivados de monocitos no se observó actividad micobactericida. Sin embargo, con los modelos de leucocitos totales y sangre completa, que comprenden todas las fracciones celulares inmunitarias y el componente humoral, obtuvimos diferentes patrones de resistencia en función de la patogenicidad de las cepas infectantes. En estos modelos se comprobó la restricción de crecimiento en todas las especies empleando EDTA como anticoagulante, relacionada con su actividad bacteriostática. También se emplearon para valorar la respuesta inmunitaria de la población fumadora frente a *M. tuberculosis*, sin observar diferencias con el grupo control (no fumadores), en los distintos modelos celulares empleados (neutrófilos, células mononucleares de sangre periférica o monocitos).

Para reproducir aspectos de la respuesta inmunológica en las bronquiectasias empleamos un modelo de neutrófilos con diferentes cepas de *M. abscessus* y de *M. mageritense* procedentes de aislados clínicos. No observamos actividad micobactericida contra ninguna especie, pero sí una limitación del crecimiento y agregación de *M. abscessus* al emplear altas concentraciones celulares, que se potenciaba al añadir, en el

RESUMEN

tiempo, neutrófilos frescos, antes de que se iniciara la multiplicación bacteriana. Si la agregación llegaba a producirse, comprobamos que se incrementaba la liberación de enzimas proteolíticas, relacionadas con el daño tisular en esta patología. Si bien los sobrenadantes de células infectadas con *M. mageritense* aumentaron la quimiotaxis de los neutrófilos, este efecto no se observó empleando *M. abscessus*.

M. tuberculosis is the species of the genus *Mycobacterium* sp that causes most infections worldwide. However, in recent decades, the prevalence of nontuberculous mycobacterial (NTM) infections has increased considerably, mainly the pulmonary form associated with chronic pathologies, such as bronchiectasis. Many immunological mechanisms involved in these infections are still unknown, partly due to the diversity of available *in vitro* assays, which fail to adequately reproduce the physiological response. In the present work, we optimized several blood cell derived models to analyze the anti-mycobacterial activity against different species of the genus, selected based on their level of pathogenicity, in order to reproduce the phenomena occurring *in vivo* in susceptible populations, such as smokers or patients with bronchiectasis.

Cell purification was, generally, performed by double gradient sedimentation and bacterial individualization by sonication. *In vitro* infection used a low number of bacteria per cell, which were incubated in serum-free medium. In order to ensure that clinical isolates corresponded to different strains, we designed a simple genotyping method based on the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique, which allowed us to obtain easily interpretable results with a good level of discrimination.

No mycobactericidal activity was observed in the monocyte-derived macrophage model. However, with the total leukocyte and whole blood models, with all the immune cell fractions and humoral components, we obtained different resistance patterns depending on the pathogenicity of the infecting strains. In these models, growth restriction was observed in all species using EDTA as anticoagulant, related to their bacteriostatic activity. These models were also used to evaluate the immune response of the smoking population against *M. tuberculosis*, without observing differences with the control group (non-smokers) in the different cellular models analyzed (neutrophils, peripheral blood mononuclear cells or monocytes).

To reproduce aspects of the immune response in bronchiectasis, we used a neutrophil model with different clinical isolates of *M. abscessus* and *M. mageritense*. We did not observe mycobactericidal activity against any species, but did observe a limitation of *M. abscessus* growth and aggregation when high cellular concentrations were used, which was enhanced by the addition of fresh neutrophils over time, before bacterial multiplication occurred. When mycobacteria aggregated, the release of proteolytic enzymes, related to tissue damage in this pathology, was increased. While supernatants

SUMMARY

from cells infected with *M. mageritense* increased neutrophil chemotaxis, this effect was not observed using *M. abscessus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006 Nov; 100(11):1862–70.
2. Riccardi N, Canetti D, Martini M, Diaw MM, di Biagio A, Codecasa L, et al. The evolution of a neglected disease: tuberculosis discoveries in the centuries. *J Prev Med Hyg*. 2020 Mar 1;61(1): E9–12.
3. Branch A. Avian tubercle bacillus infection in man and its association with Hodgkin's Disease. *Can Med Assoc J*. 1931 Nov;25(5):598-600.
4. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front Microbiol*. 2018 Feb 13;9:67.
5. Tortoli E, Brown-Elliott BA, Chalmers JD, et al. Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *Eur Respir J* 2019; 54(1):1900795.
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. Elsevier Mosby; 2005. 963p.
7. Brosch R, Gordon S v, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Mar 19;99(6):3684-9.
8. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*. 1959;43(1):273–90.
9. Tortoli E, Fedrizzi T, Meehan CJ, Trovato A, Grottola A, Giacobazzi E, et al. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: the old and the news. *Infect Genet Evol*. 2017 Dec;56:19-25.
10. Bañuls AL, Sanou A, van Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol*. 2015 Nov;64(11):1261-69.
11. World Health Organization. *Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing*. WHO report 2021. Geneva, Switzerland, WHO/HTM/TB/2021.411.
12. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. *tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021 – 2019 data*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2021.

BIBLIOGRAFÍA

13. Plan para la prevención y control de la tuberculosis en España. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, marzo 2019.
14. Informes Epidemiológicos sobre la tuberculosis en Castilla y León año 2017. Servicio de Epidemiología. Dirección general de Salud Pública. Consejería de Sanidad; 2019.
15. Golpe-Gómez AL, Lado-Lado FL, Cabarcos-Ortiz-Barrón A, Ferreiro-Regueiro MJ. Clínica de la tuberculosis. Monográfico. Med Integral 2002;39(5):181-91.
16. Aitken M, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss C, Tonelli M. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *masiliense* in a lung transplant and Cystic Fibrosis center. Am J Respir Crit. 2012;185:231-32.
17. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, Everall I, Brown KP, Moreno P, et al. Emergence and spread of a human transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. Science. 2016 Nov 11;354(6313):751-57.
18. Marras TK, Mendelson D, Marchand-Austin A, May K, Jamieson FB. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998-2010. Emerg Infect Dis. 2013 Nov;19(11):1889-91.
19. Lai CC, Tan CK, Chou CH, Hsu HL, Liao CH, Huang YT, et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. Emerg Infect Dis. 2010 Feb;16(2):294-6.
20. Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, Drobniowski F, Abubakar I. Increasing reports of nontuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. BMC Public Health. 2010;10:612
21. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Ångeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 2013 Dec 1;42(6):1604-13.
22. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria a review. Vol. 36, Clin Chest Med. 2015 Mar;36(1):13-34.
23. López-Roa P, Aznar E, Cacho J, Cogollos-Agruña R, Domingo D, García-Arata M, et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in Madrid, Spain, from 2013 to 2017. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Jun 1;39(6):1089-94.

24. Santin M, Barrabeig I, Malchair P, Gonzalez-Luquero L, Benitez MA, Sabria J, et al. Pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria, Catalonia, Spain, 1994–2014. *Emerg Infect Dis*. 2018 Jun 1;24(6):1091–4.
25. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Falkinham JO, Holland SM, Prevots DR. Spatial clusters of nontuberculous mycobacterial lung disease in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Sep 15;186(6):553–8.
26. Dirac MA, Horan KL, Doody DR, Meschke JS, Park DR, Jackson LA, et al. Environment or host? A case-control study of risk factors for *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Oct 1;186(7):684–91.
27. Trnka L, Dahkovfi D, Handova? E. Six years' experience with the discontinuation of BCG vaccination for protective effect of BCG vaccination against the *Mycobacterium avium intracellulare* complex. *Tuber Lung Dis*. 1994 Oct;75(5):348-52.
28. Abate G, Hamzabegovic F, Eickhoff CS, Hoft DF. BCG Vaccination Induces *M. avium* and *M. abscessus* Cross-Protective Immunity. *Front. Immunol* (2019)10:234. doi:10.3389/fimmu.2019.00234.
29. Brode SK, Marchand-Austin A, Jamieson FB, Marras TK. Pulmonary versus nonpulmonary nontuberculous mycobacteria, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2017 Nov 1;23(11):1898–901.
30. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med*. 2015 Mar;36(1):91-9.
31. Greene JB, Sidhu GS, Lewin S, Levine JF, Masur H, Simberkoff MS, et al. *Mycobacterium avium-intracellulare*: A Cause of Disseminated Life-Threatening Infection in Homosexuals and Drug Abusers. *Ann Intern Med*. 1982 Oct;97(4):539-46.
32. Mirsaeidi M, Hadid W, Ericsoussi B, Rodgers D, Sadikot RT. Non-tuberculous mycobacterial disease is common in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Int J Infect Dis*. 2013 Nov;17(11):e1000–4.
33. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Holland SM, Prevots DR. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Apr 15;185(8):881–6.

BIBLIOGRAFÍA

34. Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, Marshall-Olson A, Morris C, Cassidy M, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct 1;182(7):977–82.
35. Andréjak C, Nielsen R, Thomsen V, Duhaut P, Sørensen HT, Thomsen RW. Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of nontuberculous mycobacteriosis. *Thorax*. 2013 Mar;68(3):256–62.
36. Fowler CJ, Olivier KN, Leung JM, Smith CC, Huth AG, Root H, et al. Abnormal nasal nitric oxide production, ciliary beat frequency, and toll-like receptor response in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jun 15;187(12):1374–81.
37. Bai X, Bai A, Honda JR, Eichstaedt C, Musheyev A, Feng Z, et al. Alpha-1-Antitrypsin Enhances Primary Human Macrophage Immunity against nontuberculous mycobacteria. *Front Immunol*. 2019 Jun 10:1417. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01417
38. Rosain J, Kong XF, Martinez-Barricarte R, Oleaga-Quintas C, Ramirez-Alejo N, Markle J, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update. *Immunol Cell Biol*. 2019 Apr;97(4):360-367.
39. Brode SK, Jamieson FB, Ng R, Campitelli MA, Kwong JC, Paterson JM, et al. Risk of mycobacterial infections associated with rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. *Chest*. 2014 Sep 1;146(3):563–72.
40. Chao WC, Lin CH, Liao TL, Chen YM, Hsu CY, Chen JP, et al. The risk of nontuberculous mycobacterial infection in patients with Sjögren's syndrome: A nationwide, population-based cohort study. *BMC Infect Dis*. 2017 Dec 28;17(1).
41. Bakula Z, Kościuch J, Safianowska A, Proboszcz M, Bielecki J, van Ingen J, et al. Clinical, radiological and molecular features of *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease. *Respir Med*. 2018 Jun;139:91–100.
42. Matveychuk A, Fuks L, Priess R, Hahim I, Shitrit D. Clinical and radiological features of *Mycobacterium kansasii* and other NTM infections. *Respir Med*. 2012 Oct;106(10):1472–7.
43. Arnow PM, Bakir M, Thompson K, Bova JL. Endemic Contamination of Clinical Specimens by *Mycobacterium gordonae*. *Clin Infect Dis*. 2000 Aug;31(2):472-6.

44. Tobin-D'Angelo M, Blass MA, Rio C, Halvosa S, Blumberg HM, Horsburgh CR. Hospital Water as a Source of *Mycobacterium avium* Complex Isolates in Respiratory Specimens. *J Infect Dis.* 2004 Jan; 189(1):98-104.
45. Sugita Y, Ishii N, Katsuno M, Yamada R, Nakajima H. Familial cluster of cutaneous *Mycobacterium avium* infection resulting from use of a circulating, constantly heated bath water system. *Br J Dermatol.* 2000 Apr;142(4):789-93.
46. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous micobacteria: a review. *Clin Chest Med.* 2015 Mar;36(1):13-34.
47. Koh WJ, Jeong BH, Jeon K, Lee NY, Lee KS, Woo SY, et al. Clinical significance of the differentiation between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M. avium* complex lung disease. *Chest.* 2012 Dec;142(6):1482–8.
48. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.
49. Blanco-Conde S, Nebreda-Mayoral T, Labayru-Echeverría C, Brezmes-Valdivieso MF, López-Medrano R, Nogueira-González B. Lady Windermere syndrome in Castile and León. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018 Dec 1;36(10):644–7.
50. Vugia DJ, Jang Y, Zizek C, Ely J, Winthrop KL, Desmond E. Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. *Emerg Infect Dis.* 2005 Apr; 11(4): 616–18.
51. Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct; 15(4): 716–76.
52. Park AM, Hathaway NE, Wright KT. *Mycobacterium mageritense* tattoo infection: a known complication with a novel species. *Dermatol Online J.* 2020 Apr 15;26(4):13030/qt40j5t8qd.
53. Wallace RJ, Brown-Elliott BA, Hall L, Roberts G, Wilson RW, Mann LB, et al. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium mageritense*. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug 1;40(8):2930–5.
54. Shah BS, Toshniwal H, Ray HSP, Shah PS, Shah ND, Khatri NB et al. Infection of *Mycobacterium mageritense* at surgical site: A first case report of India. *J Drug Deliv.* 2019 Feb; 9(1s):369-73.

BIBLIOGRAFÍA

55. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson MC, Salfinger M, et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Apr; 31(2): e00038-17.
56. Bhandari V, Sriganesh, Relekar K. An unusual case of nonhealing granulomatous keratitis caused by *Mycobacterium chelonae* in a healthy middle aged adult . *Case Rep Ophthalmol Med.* 2015 Dec;2015:1–3.
57. Lee MR, Sheng WH, Hung CC, Yu CJ, Lee LN, Hsueh PR. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerg Infect Dis.* 2015 Sep 1;21(9):1638–46.
58. Lewinsohn DM, Leonard MK, Lobue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis.* 2017 Jan 15;64(2):111-15.
59. Somoskovi A, Mester J, Hale YM, Parsons LM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002 Sep; 23(3):585-97.
60. WHO Global TB Programme. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. 79 p.
61. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2013 Sep;51(9):2875–9.
62. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):1963–70.
63. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskövi Á, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2339–45.
64. Varma-Basil M, Pathak R, Singh K, Kumar S, Dwivedi D, Garima K, et al. Direct Early Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis from Clinical Samples. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2010 Jan;63(1):55-7.

65. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr 1;41(4):1447–53.
66. Patel JB, Leonard DGB, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. Sequence-Based Identification of *Mycobacterium* sp Using the MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification System. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):246-51.
67. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res Int.* 2014 Jan;2014:645802.
68. Glynn JR, Bauer J, de Boer AS, Borgdorff MW, Fine PEM, Godfrey-Faussett P, et al. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999 Dec;3(12):1055-60.
69. van der Spuy GD, Warren RM, Richardson M, Beyers N, Behr MA, van Helden PD. Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5640–4.
70. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PDR, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 2008 May;18(5):729–41.
71. Zhang Y, Mann LB, Wilson RW, Brown-Elliott BA, Vincent V, Iinuma Y, et al. Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* Isolates from the United States. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):119–25.
72. Mazurek GH, Hartman S, Zhang Y, Brown BA, Hector JSR, Murphy D, et al. Large DNA Restriction Fragment Polymorphism in the *Mycobacterium avium-M. intracellulare* Complex: a Potential Epidemiologic Tool. *J Clin Microbiol.* 1993 Feb; 31(2): 390–94.
73. Wallace RJ, Zhang Y, Brown BA, Fraser V, Mazurek GH, Maloney S. DNA Large Restriction Fragment Patterns of sporadic and epidemic nosocomial strains of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol.* 1993 Oct;31(10):2697-701.
74. Ocepek M, Špičić S, Cvetnić Ž, Duvnjak S, Zdelar-Tuk M, Ferme D, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp *avium* from animals in Croatia using IS901 RFLP and MIRU-VNTR typing. *Slov Vet Res* 2010 Jan; 47 (1): 21-8.

BIBLIOGRAFÍA

75. Dauchy FA, Dégrange S, Charron A, Dupon M, Xin Y, Bébéar C, et al. Variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium intracellulare* strains isolated in humans. *BMC Microbiol.* 2010 Mar;10:93.
76. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, et al. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol.* 2009 Jul;47(7):1985–95.
77. Cangelosi GA, Freeman RJ, Lewis KN, Livingston-Rosanoff D, Shah KS, Milan SJ, et al. Evaluation of a high-throughput repetitive-sequence-based PCR system for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex strains. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2685–93.
78. Zhang Y, Rajagopalan M, Brown BA, Wallace RJ. Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3132-9.
79. Van Coppenraet B, Savelkoul PHM, Buffing N, van der Bijl MW, Woudenberg J, Lindeboom JA, et al. Amplified fragment length polymorphism analysis of human clinical isolates of *Mycobacterium haemophilum* from different continents. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Oct;15(10):924-30.
80. Turenne CY, Collins DM, Alexander DC, Behr MA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *J Bacteriol.* 2008 Apr;190(7):2479–87.
81. Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: treatment of drug-susceptible tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2019 Oct 1;63(7): e147-e195.
82. Coll P. Active drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Oct;27(8):474–80.
83. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: An official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clin Infect Dis.* 2020 Aug 15;71(4):e1–e36.

84. Moon SM, Choe J, Jhun BW, Jeon K, Kwon OJ, Huh HJ, et al. Treatment with a macrolide-containing regimen for *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease. *Respir Med*. 2019 Mar 1;148:37–42.
85. Santin M, Dorca J, Alcaide F, Gonzalez L, Casas S, Lopez M, et al. Long-term relapses after 12 month treatment for *Mycobacterium kansasii* lung disease. *Eur Respir J*. 2009 Jan;33(1):148–52.
86. Wallace RJ, Brown-Elliott BA, McNulty S, Philley JV, Killingley J, Wilson RW, et al. Macrolide/azalide therapy for nodular/bronchiectatic *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Chest*. 2014 Aug;146(2):276–82.
87. Huang YC, Liu MF, Shen GH, Lin CF, Kao CC, Liu PY, et al. Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Oct;43(5):401–6.
88. Koh WJ, Jeon K, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 1;183(3):405–10.
89. Harada T, Akiyama Y, Kurashima A, Nagai H, Tsuyuguchi K, Fujii T, et al. Clinical and microbiological differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* lung diseases. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3556–61.
90. Drain PK, Bajema KL, Dowdy D, Dheda K, Naidoo K, Schumacher SG, et al. Incipient and subclinical tuberculosis: a clinical review of early stages and progression of Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Jul 18;31(4):e00021-18.
91. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YK, et al. Clinical significance of non-tuberculous mycobacteria Isolated from respiratory specimens in Korea. *Chest*. 2006 Feb;129(2):341-48.
92. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WCM, Hoefsloot W, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, et al. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax*. 2009 Jun;64(6):502–6.
93. Banta JE, Ani C, Bvute KM, Lloren JIC, Darnell TA. Pulmonary vs. extra-pulmonary tuberculosis hospitalizations in the US [1998–2014]. *J Infect Public Health*. 2020 Jan 1;13(1):131–9.

BIBLIOGRAFÍA

94. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. 2002 Mar 1;109(5):571–7.
95. Meena LS, Rajni T. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H 37Rv. Vol. 277, *FEBS J*. 2010 Jun;277(11):2416-27.
96. Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, Doolan DL, Reid DW, Field M, et al. The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease. Vol. 11, *Front Immunol*. 2020 Mar 11:303.
97. Deffert C, Cachat J, Krause KH. Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. *Cell Microbiol*. 2014 Aug;16(8):1168-78.
98. Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*. 1996 Jun;64(6):2062-9.
99. Manina G, Dhar N, McKinney JD. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe*. 2015 Jan 14;17(1):32–46.
100. Archuleta RJ, Hoppes PY, Primm TP. *Mycobacterium avium* enters a state of metabolic dormancy in response to starvation. *Tuberculosis (Edin)*. 2005 May;85(3):147–58.
101. Lin PL, Ford CB, Coleman MT, Myers AJ, Gawande R, Ioerger T, et al. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):75–9.
102. Moule MG, Cirillo JD. *Mycobacterium tuberculosis* dissemination plays a critical role in pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb;10:65.
103. Wong KW. The role of ESX-1 in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Microbiol Spectr*. 2017 May 19;5(3).
104. Carlsson F, Kim J, Dumitru C, Barck KH, Carano RAD, Sun M, et al. Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection. *PLoS Pathog*. 2010 May;6(5):1–12.
105. Houben ENG, Korotkov KV, Bitter W. Take five - Type VII secretion systems of mycobacteria. *Biophys Acta*. 2014 Aug;1843(8):1707–16.

106. Laencina L, Dubois V, Moigne V, Viljoen A, Majlessi L, Pritchard J, et al. Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jan 30;115(5):e1002–11.
107. Ojha A, Hatfull GF. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Mol Microbiol*. 2007 Oct;66(2):468–83.
108. Kelley VA, Schorey JS. *Mycobacterium*'s arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron. *Mol Biol Cell*. 2003 Aug 1;14(8):3366–77.
109. Chao A, Sieminski PJ, Owens CP, Goulding CW. Iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Rev*. 2019 Jan 23;119(2):1193–220.
110. Tran T, Bonham AJ, Chan ED, Honda JR. A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids compared to the tubercle bacillus. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019 Mar;115:96–107.
111. Viljoen A, Viela F, Kremer L, Dufrêne YF. Fast chemical force microscopy demonstrates that glycopeptidolipids define nanodomains of varying hydrophobicity on mycobacteria. *Nanoscale Horiz*. 2020 Jun 1;5(6):944–53.
112. Davidson LB, Nessar R, Kempaiah P, Perkins DJ, Byrd TF. *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by H β D2 gene expression and IL-8 release. *PLoS One*. 2011 Dec 21;6(12):e29148.
113. Bernut A, Herrmann JL, Kissa K, Dubremetz JF, Gaillard JL, Lutfalla G, et al. *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 11;111(10).
114. Ferrell KC, Johansen MD, Triccas JA, Counoupas C. Virulence mechanisms of *Mycobacterium abscessus*: current knowledge and implications for vaccine design. *Front Microbiol*. 2022 Mar 3;13.
115. Recht J, Kolter R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2001 Oct;183(19):5718–24.
116. Martínez LC, Vadyvaloo V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2014 Mar;4:38.

BIBLIOGRAFÍA

117. Travis SM, Conway BAD, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *J Cell Mol Biol.* 1999 Dec;20:872-79.
118. Levine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans MS, et al. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):3934–40.
119. Sato K, Tomioka H, Shimizu T, Gonda T, Ota F, Sano C. Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. *J Infect Dis.* 2002 Apr 15;185(8):1139-47.
120. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Sep;31(3):358–64.
121. Koff JL, Shao MXG, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Jun;294(6):L1068-75.
122. Lee HM, Shin DM, Choi DK, Lee ZW, Kim KH, Yuk JM, et al. Innate immune responses to *Mycobacterium ulcerans* via toll-like receptors and dectin-1 in human keratinocytes. *Cell Microbiol.* 2009 Apr;11(4):678–92.
123. Lee HM, Yuk JM, Shin DM, Jo EK. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. *J Clin Immunol.* 2009 Nov;29(6):795–805.
124. Bermudez LE, Young LS. Factors affecting invasion of HT-29 and HEP-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* Complex. *Infect Immun.* 1994 May; 62(5): 2021–26.
125. Les C, Shepard C. Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other micobacteria in HeLa cells. *J Exp Med.* 1957 Jan 1;105(1):39-48.
126. Reddy VM, Kumar B. Interaction of *Mycobacterium avium* Complex with human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis.* 2000 Mar;181(3):1189-93.
127. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within Type II Alveolar cells. *Infect Immun.* 1996 Apr;64(4):1400-6.
128. Leemans JC, Thepen T, Weijer S, Florquin S, Rooijen N, Winkel JG, et al. Macrophages play a dual role during pulmonary tuberculosis in mice. *J Infect Dis.* 2005 Jan;191(1):65-74.

129. Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):3488–94.
130. Verreck FAW, Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23 producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Mar 30;101(13):4560-5
131. Goyal S, Klassert TE, Slevogt H. C-type lectin receptors in tuberculosis: what we know. *Med Microbiol Immunol*. 2016 Dec;205(6):513-35.
132. Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AEI, Plachý J, et al. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4697–704.
133. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):745-56.
134. Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:41-56.
135. Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2003 Feb;5(2):151-8.
136. Ernst JD. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1277-81.
137. Shamaei M, Mirsaeidi M. Nontuberculous mycobacteria, macrophages, and host innate immune response. *Infect Immun*. 2021 Jul 15;89(8):e0081220.
138. Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans*. 2003 Jun;31(Pt 3):637-42.
139. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 2001 Apr;1(4):625-35.
140. Yadav M, Schorey JS. The-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3168-75.

BIBLIOGRAFÍA

141. Rajaram MVS, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor γ linking Mannose Receptor recognition to regulation of immune responses . J Immunol. 2010 Jul 15;185(2):929–42.
142. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D'Avila H, Dezsö B, et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and activation: functions in Inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis . J Immunol. 2009 Jul 15;183(2):1337–45.
143. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and Mannose Binding Lectin engagement of cell Surface calreticulin and CD19 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med. 2001 Sep;194(6):781-95.
144. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. Immunity. 2016 Mar 15;44(3):463-475.
145. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017 Jul;2:17023.
146. Marakalala MJ, Ndlovu H. Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. PLoS Pathog. 2017 Jun;13(6):e1006333.
147. Bogdan C, Röllinghoff M, Röllinghoff A. Regulation of NO production Cytokines. Curr Opin Immunol. 2000 Oct;12:604-19.
148. Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN- γ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. Science. 2011 May 6;332(6030):717–21.
149. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. Science. 2006 Mar 24;311(5768):1770–3.
150. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, et al. IFN- γ - and TNF-Independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of Cathelicidin LL-37. J Immunol. 2007 Jun 1;178(11):7190–8.
151. Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y, Yoneya I, Soezima K, Ide H, et al. Direct evidence for granuloma-inducing activity of Interleukin-1 induction of experimental pulmonary granuloma formation in mice by interleukin-1-coupled beads. Am J Pathol. 1988 Mar;130(3):629-38.

152. Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182(3):902-8.
153. Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates Chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4620-7.
154. Algood HMS, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug 1;41(suppl 3):S189-93.
155. Winthrop KL, Baxter R, Liu L, Varley CD, Curtis JR, Baddley JW, et al. Mycobacterial diseases and antitumour necrosis factor therapy in USA. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jan;72(1):37-42.
156. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*. 2003 Mar;3:148-55.
157. Ehlers S, Benini J, Kutsch S, Endres R, Rietschel ET, Pfeffer K. Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*. 1999 Jul;67(7):3571-9.
158. Zhen Y, Stenmark H. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci*. 2015 Sep 1;128(17):3171-6.
159. Eldridge BF, Lanzaro GC, Campbell GL, Reeves WC, Hardy JL, Lindsey HS, et al. Mosquito pools were assayed for virus according to the method described by method described by lack of acidification in mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *J Exp Biol Med Sci*. 1994 Feb;263:678-81.
160. Schaible UE, Kaufmann SHE. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Dec;2(12):946-53.
161. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, Tsai O, et al. Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-ATPases. *J Biol Chem*. 1997 Nov 21;272(47):29810-20.

BIBLIOGRAFÍA

162. Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defence against host stresses. *Cell Microbiol.* 2009 Aug;11(8):1170-8.
163. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *TRENDS Immunol.* 2001 Nov;22(11):633-40.
164. Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of Natural Killer cells towards *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol.* 1994;156:529-36.
165. Mouoy A, Meyn PA, Smith KD, Kaplan G. Recognition and destruction of Bacillus Calmette-Guerin-infected human monocytes. *J Exp Med.* 1993 Jun 1;177(6):1691-8.
166. Marino S, Pawar S, Fuller CL, Reinhart TA, Flynn JL, Kirschner DE. Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):494–506.
167. Tian T, Woodworth J, Sköld M, Behar SM. In Vivo depletion of CD11c+ cells delays the CD4+ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection . *J Immunol.* 2005 Sep 1;175(5):3268–72.
168. Li Y, Karlin A, Loike JD, Silverstein SC. A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspensión. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Jun 11;99(12):8289-94.
169. Sugawara I, Udagawa T, Yamada H. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect Immun.* 2004 Mar;72(3):1804–6.
170. Petrofsky M, Bermudez LE. Neutrophils from *Mycobacterium avium*-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 and have a putative role in early host response. *Clin Immunol.* 1999 Jun;91(3):354-8.
171. Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):577-83.
172. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, Ramakrishnan L. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe.* 2012 Sep 13;12(3):301–12.

173. Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR. Capacity of Human Neutrophils to Kill *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 1987 Dec;156(6):985-9.
174. Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Kampmann B, Hall BM, Nawroly N, et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. J Clin Investig. 2007 Jul 2;117(7):1988–94.
175. Reyes-Ruvalcaba D, González-Cortés C, Rivero-Lezcano OM. Human phagocytes lack the ability to kill *Mycobacterium gordonae*, a non-pathogenic mycobacteria. Immunol Lett. 2008 Feb 15;116(1):72–8.
176. Appelberg R, Antonio AA, Castro G, Gomes S, Pedrosa J, Silva MT. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. Infect Immun. 1995 Sep;63(9):3381-7.
177. Corleis B, Korbelt D, Wilson R, Bylund J, Chee R, Schaible UE. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. Cell Microbiol. 2012 Jul;14(7):1109–21.
178. Eum SY, Kong JH, Hong MS, Lee YJ, Kim JH, Hwang SH, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. Chest. 2010 Jan 1;137(1):122–8.
179. Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. J Exp Med. 2011 Oct 24;208(11):2251–62.
180. Eruslanov EB, Lyadova I v., Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov I v., Orlova MO, et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. Infect Immun. 2005 Mar;73(3):1744–53.
181. Mishra BB, Lovewell RR, Olive AJ, Zhang G, Wang W, Eugenin E, et al. Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. Nat Microbiol. 2017 May 15;2:17072.
182. Inomata T, Konno S, Nagai K, Suzuki M, Nishimura M. Neutrophil predominance in bronchoalveolar lavage fluid is associated with disease severity and progression of HRCT findings in pulmonary *Mycobacterium avium* infection. PLoS One. 2018 Feb 1;13(2): e0190189.
183. Choi H, Kim Y il, Na CH, Kim MS, Shin BS. *Mycobacterium abscessus* skin infection associated with shaving activity in a 75-year-old man. Ann Geriatr Med Res. 2018 Dec 1;22(4):204–7.

BIBLIOGRAFÍA

184. Chuang AY, Tsou MH, Chang SJ, Yang LY, Shih CC, Tsai MP, et al. *Mycobacterium abscessus* granulomatous prostatitis. *Am J Surg Pathol*. 2012 Mar;36(3):418-22.
185. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScues: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Aug;7:373.
186. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2020 Jul;108(1):377-96.
187. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1299-306.
188. Tapper H, Furuya W, Grinstein S. Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5287–96.
189. Martín-Martín B, Nabokina SM, Blasi J, Lazo PA, Mollinedo F. Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2574-83.
190. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1317-27.
191. Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, et al. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276(24):21960–8.
192. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999 Feb;65(2):137-50.
193. Sepper R, Kontinen YT, Buo L, Eklund KK, Lauhio A, Sorsa T, et al. Potentiative effects of neutral proteinases in an inflamed lung: relationship of neutrophil procollagenase (proMMP-8) to plasmin, cathepsin G and tryptase in bronchiectasis in vivo. *Eur Respir J*. 1997 Dec;10(12):2788–93.
194. Oriano M, Amati F, Gramegna A, Soyza A, Mantero M, Sibila O, et al. Protease–antiprotease imbalance in bronchiectasis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun;22(11):5996.
195. Amati F, Simonetta E, Gramegna A, Tarsia P, Contarini M, Blasi F, et al. The biology of pulmonary exacerbations in bronchiectasis. *Eur Respir Rev*. 2019 Dec 31;28(154):190055.

196. Li XJ, Tian W, Stull ND, Grinstein S, Atkinson S, Dinauer MC, et al. A Fluorescently tagged C-Terminal Fragment of p47 phox detects NADPH Oxidase dynamics during phagocytosis. *Mol Biol Cell*. 2009 Mar;20(5):1520–32.
197. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Feb 20;18(6):642-60.
198. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85:765–92.
199. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013 Oct;94(4):657–70.
200. González-Cortés C, Reyes-Ruvalcaba D, Diez-Tascón C, Rivero-Lezcano OM. Apoptosis and oxidative burst in neutrophils infected with *Mycobacterium* spp. *Immunol Lett*. 2009 Sep 22;126(1-2):16-21.
201. Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, Kinoshita T, Mauri L, Prinetti A, et al. Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci Signal*. 2016 Oct 11;9(449):ra101.S
202. Malcolm KC, Caceres SM, Pohl K, Poch KR, Bernut A, Kremer L, et al. Neutrophil killing of *Mycobacterium abscessus* by intra- and extracellular mechanisms. *PLoS One*. 2018 Apr 1;13(4):e0196120.
203. Dallenga T, Repnik U, Corleis B, Eich J, Reimer R, Griffiths GW, et al. *M. tuberculosis*-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. *Cell Host Microbe*. 2017 Oct 11;22(4):519-530.e3.
204. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
205. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Jan;89(1):29–37.
206. Nakamura K, Nakayama H, Sasaki S, Takahashi K, Iwabuchi K. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex promote release of pro-inflammatory enzymes matrix metalloproteinases by inducing neutrophil extracellular trap formation. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).

BIBLIOGRAFÍA

207. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):105–15.
208. Yang JD, Mott D, Sutiwisesak R, Lu YJ, Raso F, Stowell B, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ and CD8+ T cells differ in their capacity to recognize infected macrophages. *PLoS Pathog*. 2018 May 1;14(5):e1007060.
209. Ankley L, Thomas S, Olive AJ. Fighting persistence: how chronic infections with *Mycobacterium tuberculosis* evade T cell-mediated clearance and new strategies to defeat them. *Infect Immun*. 2020 Jul 1;88(7).
210. Flynn JL, Chan J. immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
211. Mihret A, Mamo G, Tafesse M, Hailu A, Parida S. Dendritic cells activate and mature after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Res Notes*. 2011 Jul;4: 247.
212. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163–89.
213. Barber-Mayer KD, Barber DL. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Dec 1;5(12):a018424.
214. Mihret A. The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence*. 2012 Nov 15;3(7):654-9.
215. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiol Spectr*. 2019 Jul 19;7(4):10.1128/microbiolspec.
216. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun*. 1998 Aug;66(8):3936-40.
217. Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):7222–34.
218. Maglione PJ, Xu J, Casadevall A, Chan J. Fc γ receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection . *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3329–38.

219. Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, Aliberti S, Marshall SE, Loebinger MR, et al. European Respiratory Society Guidelines for the Management of Adult Bronchiectasis. *Eur Respir J*. 2017 Sep 9;50(3):1700629.
220. Martinez-Garcia MÁ, Athanazio R, Grambicka G, Corso M, Cavalcanti Lundgren F, Fernandes de Figueiredo M, et al. Prognostic value of frequent exacerbations in bronchiectasis: the relationship with disease severity. *Arch Bronconeumol*. 2019 Feb 1;55(2):81–7.
221. Goeminne PC, Nawrot TS, Ruttens D, Seys S, Dupont LJ. Mortality in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective cohort analysis. *Respir Med*. 2014 Feb;108(2):287–96.
222. Ringshausen FC, de Roux A, Pletz MW, Hämäläinen N, Welte T, Rademacher J. Bronchiectasis-associated hospitalizations in Germany, 2005-2011: a population-based study of disease burden and trends. *PLoS One*. 2013 Aug 1;8(8):e71109.
223. Quint JK, Millett ERC, Joshi M, Navaratnam V, Thomas SL, Hurst JR, et al. Changes in the incidence, prevalence and mortality of bronchiectasis in the UK from 2004 to 2013: a population-based cohort study. *Eur Respir J*. 2016 Jan 1;47(1):186–93.
224. Flume PA, Chalmers JD, Olivier KN. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity. *Lancet*. 2018 Sep 8;392(10150):880-90.
225. Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. *Eur Respir J*. 2015 May 1;45(5):1446–62.
226. Anwar GA, McDonnell MJ, Worthy SA, Bourke SC, Afolabi G, Lordan J, et al. Phenotyping adults with non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective observational cohort study. *Respir Med*. 2013 Jul;107(7):1001–7.
227. Shoemark A, Ozerovitch L, Wilson R. Aetiology in adult patients with bronchiectasis. *Respir Med*. 2007 Jun;101(6):1163–70.
228. Flume PA, Chalmers JD, Olivier KN. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity. *Lancet*. 2018 Sep 8;392:880-890
229. Rogers GB, Zain NMM, Bruce KD, Burr LD, Chen AC, Rivett DW, et al. A novel microbiota stratification system predicts future exacerbations in bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 May;11(4):496–503.

BIBLIOGRAFÍA

230. Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, Drain M, Klem ER, Cardwell C, et al. Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 May 15;187(10):1118–26.
231. Chalmers JD, Goeminne P, Aliberti S, McDonnell MJ, Lonni S, Davidson J, et al. The bronchiectasis severity index an international derivation and validation study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Mar 1;189(5):576–85.
232. Faverio P, Stainer A, Bonaiti G, Zucchetti SC, Simonetta E, Lapadula G, et al. Characterizing non-tuberculous mycobacteria infection in bronchiectasis. *Int J Mol Sci*. 2016 Nov 16;17(11).
233. McDonnell MJ, Jary HR, Perry A, Macfarlane JG, Hester KLM, Small T, et al. Non cystic fibrosis bronchiectasis: a longitudinal retrospective observational cohort study of *Pseudomonas* sp persistence and resistance. *Respir Med*. 2015 Jun 1;109(6):716–26.
234. Wang H, Ji X bin, Mao B, Li CW, Lu HW, Xu JF. *Pseudomonas aeruginosa* isolation in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: a retrospective study. *BMJ Open*. 2018 Mar 1;8(3):e014613
235. Aksamit TR, O'Donnell AE, Barker A, Olivier KN, Winthrop KL, Daniels MLA, et al. Adult patients with bronchiectasis: a first look at the US Bronchiectasis Research Registry. *Chest*. 2017 May 1;151(5):982–92.
236. Griffith DE, Aksamit TR. Bronchiectasis and nontuberculous mycobacterial disease. *Chest Med*. 2012 Jun;33(2):283-95.
237. Skolnik K, Kirkpatrick G, Quon BS. Nontuberculous mycobacteria in Cystic Fibrosis. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2016 Dec;8(4):259–74.
238. Fujita J, Ohtsuki Y, Shigeto E, Suemitsu I, Yamadori I, Bandoh S, et al. Pathological findings of bronchiectases caused by *Mycobacterium avium intracellulare* complex. *Respir Med*. 2003 Aug 1;97(8):933–8.
239. Moore EH. Atypical mycobacterial infection in the Lung: CT Appearance. *Radiology*. 1993 Jun;187(3):777-82.
240. Watt AP, Brown V, Courtney J, Kelly M, Garske L, Elborn JS, et al. Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis. *Thorax*. 2004 Mar;59(3):231–6.

241. Chalmers JD, Smith MP, McHugh BJ, Doherty C, Govan JR, Hill AT. Short- and long-term antibiotic treatment reduces airway and systemic inflammation in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Oct 1;186(7):657–65.
242. Gramegna A, Amati F, Terranova L, Sotgiu G, Tarsia P, Miglietta D, et al. Neutrophil elastase in bronchiectasis. *Respir Res*. 2017 Dec;18:211.
243. Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrie E, et al. Neutrophil elastase activity is associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 May 15;195(10):1384–93.
244. Parish T. In vitro drug discovery models for *Mycobacterium tuberculosis* relevant for host infection. *Expert Opin Drug Discov*. 2020 Mar;15(3):349-58.
245. Doherty M, Wallis RS, Zumla A. Biomarkers for tuberculosis disease status and diagnosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2009 May;15(3):181-7.
246. Toba H, Crawford JT, Ellner JJ. Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activating factor activity of gamma interferon. *Infect Immun*. 1989 Jan;57(1):239-44.
247. Torres M, Herrera MT, Fabián-San-Miguel G, Gonzalez Y. The intracellular growth of *M. tuberculosis* is more associated with high glucose levels than with impaired responses of monocytes from T2D Patients. *J Immunol Res*. 2019 Nov 14;2019:1462098.
248. Grage-Griebenow E, Loremen D, Fetting R, Fettinga R, Mada HD, Ernsta M, et al. Phenotypical and functional characterization of Fcy receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur. J. Immunol*. 1993. 23: 3126-35.
249. Jung JY, Madan-Lala R, Georgieva M, Rengarajan J, Sohaskey CD, Bange FC, et al. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect Immun*. 2013 Sep;81(9):3198–209.
250. Kiemer AK, Senaratne RH, Hoppstädter J, Diesel B, Riley LW, Tabeta K, et al. Attenuated activation of macrophage TLR9 by DNA from virulent mycobacteria. *J Innate Immun*. 2008 Aug;1(1):29–45.
251. Kapoor N, Pawar S, Sirakova TD, Deb C, Warren WL, Kolattukudy PE. Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation. *PLoS One*. 2013 Jan 15;8(1) :e53657.

BIBLIOGRAFÍA

252. Silver RF, Li Q, Ellner JJ. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun*. 1998 Mar;66(3):1190-9.
253. Huang Z, Luo Q, Guo Y, Chen J, Xiong G, Peng Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro. *PLoS One*. 2015 Jun 19;10(6):e0129744.
254. Nakagawara A, Nathan CF, Cohn ZA. Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro. *J Clin Invest*. 1981 Nov;68(5):1243-52.
255. Crowle AJ, Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect Immunol*. 1990 Mar;58(3):632-38.
256. Wagner D, Sangari FJ, Kim S, Petrofsky M, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* infection of macrophages results in progressive suppression of interleukin-12 production in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 2002 Jan;71(1):80-8.
257. Vogt G, Nathan C. In vitro differentiation of human macrophages with enhanced antimycobacterial activity. *J Clin Investig*. 2011 Oct 3;121(10):3889–901.
258. Kiliñç G, Walburg KV, Franken KLMC, Valkenburg ML, Aubry A, Haks MC, et al. Development of human cell-based in vitro infection models to determine the intracellular survival of *Mycobacterium avium*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jun 24;12.
259. Duque C, Arroyo L, Ortega H, Montúfar F, Ortíz B, Rojas M, et al. Different responses of human mononuclear phagocyte populations to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2014 Mar;94(2):111–22.
260. Wang J, Zhou X, Pan B, Yang L, Yin X, Xu B, et al. Investigation of the effect of *Mycobacterium bovis* infection on bovine neutrophils functions. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013 Nov;93(6):675–87.
261. Yang K, Azoulay E, Attalah L, Zahar JR, van de Louw A, Cerf C, et al. Bactericidal activity response of blood neutrophils from critically ill patients to in vitro granulocyte colony-stimulating factor stimulation. *Intensive Care Med*. 2003 Mar 1;29(3):396–402.
262. Miralda I, Klaes CK, Graham JE, Uriarte SM. Human neutrophil granule exocytosis in response to *Mycobacterium smegmatis*. *Pathogens*. 2020 Feb 1;9(2) :123.

263. O'Leary SM, Coleman MM, Chew WM, Morrow C, McLaughlin AM, Gleeson LE, et al. Cigarette smoking impairs human pulmonary immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Dec 15;190(12):1430–6.
264. Peterson PK, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Anderson WR, Ulevitch RJ, et al. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect Immun*. 1995 Apr; 63(4): 1598–1602.
265. Randall PJ, Hsu NJ, Lang D, Cooper S, Sebesho B, Allie N, et al. Neurons are host cells for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2014 May;82(5):1880–90.
266. Ryan RCM, O'Sullivan MP, Keane J. *Mycobacterium tuberculosis* infection induces non-apoptotic cell death of human dendritic cells. *BMC Microbiol*. 2011 Oct;11:237.
267. Yoneda T, Ellner JJ. CD4+ T Cell and Natural Killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Aug;158(2):395-403.
268. Brill KJ, Li Q, Larkin R, Canaday DH, Kaplan DR, Boom WH, et al. Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1755–65.
269. Rindi L, Lari N, Garzelli C. Virulence of *Mycobacterium avium* Subsp. *Hominissuis* human isolates in an in vitro macrophage infection model. *Int J Mycobacteriol*. 2018 Jan 1;7(1):48–52.
270. Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Nishiuchi Y, Yoshimura M, Kang J, et al. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb Pathog*. 2009 Jan;46(1):6–12.
271. Wei J, Dahl JL, Moulder JW, Roberts EA, O'gaora P, Young DB, et al. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages. *J Bacteriol*. 2000 Jan;182(2):377-84.
272. Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AVS, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-Like cell line. *Infect Immun*. 1998 Nov;66(11):5314-21.
273. Keiser TL, Purdy GE. Killing *Mycobacterium tuberculosis* in vitro: what model systems can teach us. *Microbiol Spectr*. 2017 Jun; 5(3):10.1128/microbiolspec.TBTB2-0028-2016.

BIBLIOGRAFÍA

274. Mehta PK, Karls RK, White EH, Ades EW, Quinn FD. Entry and intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured human microvascular endothelial cells. *Microb Pathog.* 2006 Aug;41(2–3):119–24.
275. Burl S, Holder BS, Lo BKM, Kampmann B. Optimisation of a functional mycobacterial growth-inhibition assay to improve its suitability for infant TB vaccine studies. *J Immunol Methods.* 2013 Aug 30;394(1–2):121–4.
276. Al-Attayah R, El-Shazly A, Mustafa AS. Assessment of in vitro immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in a human peripheral blood infection model using a luciferase reporter construct of *M. tuberculosis* H37Rv. *Clin Exp Immunol.* 2006 Sep;145(3):520–7.
277. Baguma R, Penn-Nicholson A, Smit E, Erasmus M, Day J, Makhetha L, et al. Application of a whole blood mycobacterial growth inhibition assay to study immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis burden population. *PLoS One.* 2017 Sep 1;12(9):e0184563.
278. Hoal-Van Helden EG, Hon D, Lewis LA, Beyers N, van Helden PD. Mycobacterial growth in human macrophages: Variation according to donor, inoculum and bacterial strain. *Cell Biol Int.* 2001;25(1):71–81.
279. Bouchonnet F, Boechat N, Bonay M, Hance AJ. Alpha/Beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2002 Jun;70(6):3020–5.
280. Van Boxtel RM, Lambrecht RS, Collins MT. Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*. *APMIS.* 1990 Oct;98(10):901–8.
281. Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, Nathan CF, Ehrt S. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med.* 2008 aug;14(8):849-54.
282. Dubos RJ, Davis BD. Factors affecting the grow of tubercle bacilli in liquid media. *J Exp Med.* 1946 Apr 30;83(5):409-23.
283. Masaki S, Sugimori G, Okamoto A, Imose J, Hayashi Y. Effect of Tween 80 on formation of the superficial L1 layer of the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* Complex. *J Clin Microbiol.* 1991 Jul;29(7):1453-6.

284. Leisching G, Pietersen RD, Wiid I, Baker B. Virulence, biochemistry, morphology and host-interacting properties of detergent-free cultured mycobacteria: an update. *Tuberculosis* (Edinb). 2016 Sep; 100:53-60.
285. Torrado E, Fraga AG, Castro AG, Stragier P, Meyers WM, Portaels F, et al. Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun*. 2007 Feb; 75(2):977-87.
286. Mehta PK, King CH, White EH, Murtagh JJ, Quinn FD. Comparison of in vitro models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. *Infect Immun*. 1996 Jul; 64(7):2673-2679.
287. Sani M, Houben ENG, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, et al. Direct visualization by Cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog*. 2010 Mar;6(3):e1000794.
288. Bodnar KA, Serbina N v., Flynn JL. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect Immun*. 2001 Feb;69(2):800-9.
289. Cywes C, Godenir NL, Hoppe HC, Scholle RR, Steyn LM, Kirsch RE, et al. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor Type 3 expressed in chinese hamster ovary cells. *Infect Immun*. 1996 Dec;64(12):5373-83.
290. Boechat N, Bouchonnet F, Bonay M, Grodet A, Pelicic V, Gicquel B, et al. Culture at high density improves the ability of human macrophages to control mycobacterial growth. *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6203-11.
291. Britton WJ, Meadows N, Rathjen DA, Roach DR, Briscoe AH. A tumor necrosis factor mimetic peptide activates a murine macrophage cell line to inhibit mycobacterial growth in a nitric oxide-dependent fashion. *Infect Immun*. 1998 May;66(5):2122-7.
292. Fazal N, Bartlett R, Lammas DA, Kumararatne DS. A comparison of the different methods available for determining BCG-macrophage interactions in vitro, including a new method of colony counting in broth. *FEMS Microbiol Lett*. 1992 Dec;105(5-6):355-62.
293. Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol*. 2006 Apr 1;176(7):4267-74.

BIBLIOGRAFÍA

294. Blumenthal A, Ehlers S, Ernst M, Flad HD, Reiling N. Control of mycobacterial replication in human macrophages: roles of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):4961–7.
295. Chávez-Galán L, Vesin D, Martinvalet D, Garcia I. Low dose BCG Infection as a model for macrophage activation maintaining cell viability. *J Immunol Res*. 2016;2016:4048235.
296. Sada-Ovalle I, Chávez-Galán L, Torre-Bouscoulet L, Nava-Gamiño L, Barrera L, Jayaraman P, et al. The Tim3–Galectin 9 pathway induces antibacterial activity in human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5896–902.
297. Jung JY, Madan-Lala R, Georgieva M, Rengarajan J, Sohaskey CD, Bange FC, et al. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect Immun*. 2013 Sep;81(9):3198–209.
298. Henao J, Sánchez D, Muñoz CH, Mejía N, Arias MA, García LF, et al. Human splenic macrophages as a model for *in vitro* infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007 Nov;87(6):509–17.
299. Birkness KA, Swords WE, Huang PH, White EH, Dezzutti CS, Lal RB, et al. Observed differences in virulence-associated phenotypes between a human clinical isolate and a veterinary isolate of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4895-901.
300. Lamhamedi-Cherradia S, Chastellier C, Casanova JL. Growth of *Mycobacterium bovis*, Bacille Calmette-Guerin, with in human monocytes-macrophages cultured in serum-free medium. *J Immunol Methods*. 1999;225:75–86.
301. Borkute RR, Woelke S, Pei G, Dorhoi A. Neutrophils in tuberculosis: cell biology, cellular networking and multitasking in host defense. *Int. J. Mol. Sci*. 2021 Apr;22(9):4801.
302. Queval CJ, Fearn A, Botella L, Smyth A, Schnettger L, Mitermite M, et al. Macrophage-specific responses to human and animal-adapted tubercle bacilli reveal pathogen and host factors driving multinucleated cell formation. *PLoS Pathog*. 2021 Mar 1;17(3):e1009410.
303. Bonay M, Bouchonnet F, Pelicic V, Lagier B, Grandsaigne M, Lecossier D, et al. Effect of stimulation of human macrophages on intracellular survival of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin evaluation with a mycobacterial reporter strain. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 (May);159(5 Pt 1):1629-37.

304. Lachmandas E, Vrieling F, Wilson LG, Joosten SA, Netea MG, Ottenhoff TH, et al. The effect of hyperglycaemia on *in vitro* cytokine production and macrophage infection with *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2015 Feb 10;10(2):e0117941.
305. Bobadilla-del-Valle M, Leal-Vega F, Torres-Gonzalez P, Ordaz-Vazquez A, Garcia-Garcia M de L, Tovar-Vargas M de los A, et al. Mycobacterial Growth Inhibition Assay (MGIA) as a host directed diagnostic tool for the evaluation of the immune response in subjects living with type 2 Diabetes Mellitus. Front Cell Infect Microbiol. 2021 May 18;11:640707.
306. Kampmann B, Gaora PÓ, Snewin VA, Gares MP, Young DB, Levin M. Evaluation of human antimycobacterial immunity using recombinant reporter micobacteria. J Infect Dis. 2000 Aug. 2000;182-901.
307. Ratnikov B, Deryugina E, Leng J, Marchenko G, Dembrow D, Strongin A. Determination of matrix metalloproteinase activity using biotinylated gelatin. Anal Biochem. 2000 Nov 1;286(1):149–55.
308. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology (Reading). 1996 Jul;142 (Pt 7):1881-93.
309. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Botrger EC, Bodmer1 T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and Restriction Enzyme Analysis. J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31(2): 175–178.
310. Amere GA, Nayak P, Salindri AD, Narayan KMV, Magee MJ. Contribution of smoking to tuberculosis incidence and mortality in high-tuberculosis-burden countries. Am J Epidemiol. 2018 Sep 1;187(9):1846–55.
311. Slama K, Chiang CY, Enarson DA, Hassmiller K, Fanning A, Gupta P, et al. Tobacco and tuberculosis: a qualitative systematic review and meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2007 Oct;11(10):1049-61.
312. Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465-6.
313. Verrall AJ, G. Netea M, Alisjahbana B, Hill PC, Crevel R. Early clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: a new frontier in prevention. Immunology. 2014 Apr; 141(4): 506–513.

BIBLIOGRAFÍA

314. Srivastava S, Ernst JD, Desvignes L. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunol Rev.* 2014 Nov;262(1):179-92.
315. Robertson AK, Andrew PW, Robertson AK. Interferon gamma fails to activate human monocyte-derived macrophages to kill or inhibit the replication of a non-pathogenic mycobacterial species. *Microb Pathog.* 1991 Oct;11(4):283-8.
316. Mahamed D, Boulle M, Ganga Y, Mc Arthur C, Skroch S, Oom L, et al. Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife.* 2017 Jan 28;6:e22028.
317. Cheon SH, Kampmann B, Hise AG, Phillips M, Song HY, Landen K, et al. Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Jul;9(4):901-7.
318. Wallis RS, Palaci M, Vinhas S, Hise AG, Ribeiro FC, Landen K, et al. A whole blood bactericidal assay for tuberculosis. *J Infect Dis.* 2001 Apr 15;183(8):1300-3.
319. Sears ME. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification - a review. *ScientificWorldJournal.* 2013 Apr 18;2013:219840.
320. Silva-Gomes S, Vale-Costa S, Appelberg R, Gomes MS. Iron in intracellular infection: to provide or to deprive?. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Dec 9;3:96.
321. Meyer D. Iron chelation as therapy for HIV and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection under conditions of iron overload. *Curr Pharm Des.* 2006;12(16):1943-7.
322. Chaigne-Delalande B, Lenardo MJ. Divalent cation signaling in immune cells. *Trends Immunol.* 2014 Jul;35(7):3322-44.
323. Jones CM, Niederweis M. *Mycobacterium tuberculosis* can utilize heme as an iron source. *J Bacteriol.* 2011 Apr;193(7):1767-70.
324. Nambu S, Matsui T, Goulding CW, Takahashi S, Ikeda-Saito M. A new way to degrade heme: the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. *J Biol Chem.* 2013 Apr 5;288(14):10101-9.
325. Schwander S, Dheda K. Human lung immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: insights into pathogenesis and protection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 15;183(6):696-707.

326. Jiang C, Chen Q, Xie M. Smoking increases the risk of infectious diseases: a narrative review. *Tob Induc Dis.* 2020 Jul 14;18:60.
327. Elisia I, Lam V, Cho B, Hay M, Li MY, Yeung M, et al. The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1):19480.
328. Van Zyl-Smit RN, Binder A, Meldau R, Semple PL, Evans A, Smith P, et al. Cigarette smoke impairs cytokine responses and BCG containment in alveolar macrophages. *Thorax.* 2014 Apr;69(4):363–70.
329. Shang S, Ordway D, Henao-Tamayo M, Bai X, Oberley-Deegan R, Shanley C, et al. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis - evidence from in vivo and *in vitro* models. *J Infect Dis.* 2011 May 1;203(9):1240–8.
330. Ohkusu K, Bermudez LE, Nash KA, Macgregor RR, Inderlied CB. Differential virulence of *Mycobacterium avium* strains isolated from HIV-infected patients with disseminated *M. avium* Complex Disease. *J Infect Dis.* 2004 Oct 1;190(7):1347-54.
331. Guirado E, Arcos J, Knaup R, Reeder R, Betz B, Cotton C, et al. Characterization of clinical and environmental *Mycobacterium avium* spp. isolates and their Interaction with human macrophages. *PLoS One.* 2012 Sep 19;7(9):e45411.
332. Janulionis E, Sofer C, Schwander SK, Nevels D, Kreiswirth B, Shashkina E, et al. Survival and replication of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the context of human innate immunity. *Infect Immun.* 2005 May;73(5):2595–601.
333. Mokrousov I. Revisiting the Hunter Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change. *Tuberculosis (Edinb).* 2017 May 1;104:20–3.
334. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Homes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995 Nov 11;23(21):4407-14
335. Gaafar A, Unzaga MJ, Cisterna R, Clavo FE, Urra E, Ayarza R, et al. Evaluation of a modified single-enzyme amplified-fragment length polymorphism technique for fingerprinting and differentiating of *Mycobacterium kansasii* type I isolates. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug 1;41(8):3846–50.
336. Viader-Salvadó JM, Flores-Gracia J, Vega-Alonso AS, Treviño-Alvarado VM, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L, et al. Simplified Amplified-Fragment Length Polymorphism method for

BIBLIOGRAFÍA

- genotyping *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Microbiol Methods. 2009 Sep;78(3):331–8.
337. Jiménez Arias AP, Lahiguera MJ, Borrás R, Cardona CG, Grijalva Silva M, Vallejo López MJ, et al. Comparative study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Simplified Amplified Fragment Length Polymorphism and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat Analysis. Rev Ecuat Med Cienc Biol. 2018 May 21;39(1):63-71.
338. Harris KA, Kenna DTD, Blauwendraat C, Hartley JC, Turton JF, Aurora P, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium abscessus* strains in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2012 May;50(5):1758–61.
339. Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Peñafiel T, Bonillo MDC, et al. Prospective universal application of Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. J Clin Microbiol. 2009 Jul;47(7):2026–32.
340. Cave MD, Yang ZH, Stefanova R, Fomukong N, Ijaz K, Bates J, et al. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. J Clin Microbiol. 2005 Mar;43(3):1228–33.
341. Diel R, Schneider S, Meywald-Walter K, Ruf CM, Rüsche-Gerdes S, Niemann S. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):532–9.
342. Quitugua TN, Seaworth BJ, Weis SE, Taylor JP, Gillette JS, Rosas II, et al. Transmission of drug-resistant tuberculosis in Texas and Mexico. J Clin Microbiol. 2002 Aug 1;40(8):2716–24.
343. Trovato A, Baldan R, Costa D, Simonetti TM, Cirillo DM, Tortoli E. Molecular typing of *Mycobacterium abscessus* isolated from cystic fibrosis patients. Int J Mycobacteriol. 2017 Apr 1;6(2):138–41.
344. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, et al. Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. PLoS Med. 2013;10(2): e1001387.
345. Glynn JR, Bauer J, de Boer AS, Borgdorff MW, Fine PEM, Godfrey-Faussett P, et al. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 1999 Dec;3(12):1055-60.

346. Jeon S, Lim N, Kwon S, Shim T, Park M, Kim BJ, et al. Molecular typing of *Mycobacterium intracellulare* using Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, Mycobacteria Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing, and Multilocus Sequence Typing: molecular characterization and comparison of each typing methods. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014 Jun;5(3):119–30.
347. Dente FL, Bilotta M, Bartoli ML, Bacci E, Cianchetti S, Latorre M, et al. Neutrophilic bronchial inflammation correlates with clinical and functional findings in patients with Noncystic Fibrosis Bronchiectasis. *Mediators Inflamm*. 2015;2015: 642503.
348. Faverio P, Stainer A, Bonaiti G, Zucchetti SC, Simonetta E, Lapadula G, et al. Characterizing non-tuberculous mycobacteria infection in bronchiectasis. *Int J Mol Sci*. 2016 Nov 16;17(11):1913.
349. Rankin AN, Hendrix S v., Naik SK, Stallings CL. Exploring the role of low-density neutrophils during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jun 21;12:901590.
350. Parker HA, Forrester L, Kaldor CD, Dickerhof N, Hampton MB. Antimicrobial activity of neutrophils against mycobacteria. *Front Immuno*. 2021 Dec 23;12:782495.
351. Hilda JN, Das S, Tripathy SP, Hanna LE. Role of neutrophils in tuberculosis: a bird's eye view. *Innate Immun*. 2020 May;26(4):240-47.
352. Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, et al. 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 (Reading)*. 2006 Jun;152(Pt 6):1581-1590.
353. Jönsson BE, Gilljam M, Lindblad A, Ridell M, Wold AE, Welinder-Ölsson C. Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2007 May;45(5):1497–504.
354. Vuorte J, Jansson SE, Repo H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH Assay. *Cytometry*. 2001 Apr 1;43(4):290–6.
355. Kuhns DB, Priel DAL, Chu J, Zarembek KA. Isolation and functional analysis of human neutrophils. *Curr Protoc Immunol*. 2015 Nov 1;111(1):7.23.1-7.23.16.

BIBLIOGRAFÍA

356. Desmeules P, Dufour M, Fernandes MJG. A rapid flow cytometry assay for the assessment of calcium mobilization in human neutrophils in a small volume of lysed whole-blood. *J Immunol Methods*. 2009 Jan 30;340(2):154–7.
357. Pan Q, Ye L, Deng Z, Li L, Liu H. Effects of red blood cell lysing solutions on the detection of peripheral basophils of healthy normals and SLE patients by flow cytometry. *J Immunoassay Immunochem*. 2014 Oct 2;35(4):368–77.
358. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
359. Douvas GS, Looker DL, Vatter AE, Crowle1 AJ. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun*. 1985 Oct;50(1):1-8.
360. Brodlie M, Aseeri A, Lordan JL, Robertson AGN, McKean MC, Corris PA, et al. Bile acid aspiration in people with cystic fibrosis before and after lung transplantation. *Eur Respir J*. 2015 Dec; 46(6): 1820–1823.
361. Malcolm KC, Nichols EM, Caceres SM, Kret JE, Martiniano SL, Sagel SD, et al. *Mycobacterium abscessus* Induces a limited pattern of neutrophil activation that promotes pathogen survival. *PLoS One*. 2013 Feb 25;8(2): e57402.
362. Ghimire N, Pettygrove BA, Pallister KB, Stangeland J, Stanhope S, Klapper I, et al. Direct microscopic observation of human neutrophil-*Staphylococcus aureus* interaction *in vitro* suggests a potential mechanism for initiation of biofilm infection on an implanted medical device. *Infect Immun*. 2019 Dec 1;87(12):e00745-19

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las micobacterias	5
Tabla 2. Cepas de MNT empleadas	58
Tabla 3. Caracterización, por MIRU-VNTR, de los 28 aislados de <i>M. intracellulare</i>	59
Tabla 4. Secuencia y características de cebadores descritos por Dauchy et al (5) empleados en la amplificación de ADN por MIRU-VNTR para identificación de <i>M. intracellulare</i> a nivel de subespecies.....	81
Tabla 5. Patrón de bandas de las cepas de <i>M. intracellulare</i> generado por AFLP (Sacl-BgII) usando los cebadores BgA, ScC, ScA y BgG.....	102
Tabla 6. Porcentaje de contaminación con eritrocitos tras cada proceso de purificación de células mononucleares y neutrófilos	109

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Incidencia mundial de tuberculosis en el año 2020.	7
Figura 2. Distribución global de las especies más frecuentes de MNT.	9
Figura 3. Mecanismo patogénico de las micobacterias	19
Figura 4. Modelo del vórtice que describe la patogénesis de las bronquiectasias	34
Figura 5. Purificación de células mononucleares y polinucleares	65
Figura 6. Purificación conjunta de células mononucleares y granulocíticas empleando un doble gradiente de sedimentación.	66
Figura 7. Determinación de citocinas mediante ensayo de ELISA tipo sándwich.	69
Figura 8. Ensayo de gelatinasa	72
Figura 9. Ensayo para la valoración de quimiotaxis.....	74
Figura 10. Método AFLP y amplificación de los fragmentos de ADN.....	79
Figura 11. Infección de macrófagos derivados de monocitos con <i>Mycobacterium</i> sp.....	87
Figura 12. Curva de tiempo de actividad antibacteriana de sangre completa frente <i>Mycobacterium</i> sp.....	89
Figura 13. Efecto del EDTA en el crecimiento micobacteriano.	91
Figura 14. Curva de tiempo de la actividad antibacteriana de leucocitos frente <i>Mycobacterium</i> sp.....	93
Figura 15. Influencia del EDTA en la producción de citocinas	94
Figura 16. Actividad antibacteriana contra micobacterias de crecimiento rápido.....	96

Figura 17. Actividad anti-micobacteriana en sangre de fumadores frente <i>M. tuberculosis</i>	98
Figura 18. Patrones AFLP. Patrones de bandas por análisis con AFLP de ADN de cepas de <i>M. intracelulare</i> (1-28), digerido con SacI-BglII o BglII.....	103
Figura 19. Dendograma que refleja las relaciones entre los patrones de las cepas de <i>M. intracelulare</i>	105
Figura 20. Patrones AFLP. Bandas de AFLP de ADN de cepas de <i>M. abscessus</i> (a, b, c, d), digeridas con SacI-BglII	106
Figura 21. Diagrama de flujo de trabajo para el genotipado por AFLP (SacI-BglII).	108
Figura 22. Colonias formadas en medio o células infectadas.	110
Figura 23. Multiplicación micobacteriana y formación de colonias en PBMC y PMN	112
Figura 24. Influencia de la concentración de neutrófilos en el crecimiento de <i>M. abscessus</i>	113
Figura 25. Actividad antimicobacteriana frente a distintas cepas de <i>M. abscessus</i> y <i>M. mageritense</i>	115
Figura 26. Efecto de la adición en las infecciones in vitro de neutrófilos recién purificados.....	116
Figura 27. Formación de colonias de <i>M. abscessus</i> 239aba en concentraciones diferentes de neutrófilos	118
Figura 28. Actividad proteolítica en el sobrenadante de las infecciones de neutrófilos con <i>M. abscessus</i>	119
Figura 29. Regulación del reclutamiento neutrofílico	121
Figura 30. Modelo de neutrófilos desarrollado.	144
Figura 31. Modelo hipotético propuesto del proceso fisiopatológico de las bronquiectasias	148

ABREVIATURAS

ADC	Albúmina, dextrosa y catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados.
APC	Células presentadoras de antígenos
BAL	Lavado broncoalveolar
Células NK	Células asesinas naturales
cps	Cuentas por segundo
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
FORMAS L y R	Fenotipo Liso y Rugoso
GM-CSF	Factor estimulante de crecimiento de granulocitos y macrófagos
GPLs	Glicopeptidolípidos
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
Hsp65	Gen codificante de la proteína de choque térmico de 65KDa
IDGH	Índice de Gaston Hunter
IL	Interleucina
INFγ	Interferón gamma
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
MHC I y II	Complejo mayor de histocompatibilidad I y II
MIRU-VNTR	Análisis de múltiples locus de repeticiones tándem de número variable
MOI	Múltiplicidad de infección
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH oxidase, NOX2	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NETs	Trampas extracelulares neutrofílicas
NF-kB	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO	Óxido nítrico
OADC	Ácido Oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
PBMC	Células mononucleares periféricas
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados.
PMN	Células polimorfonucleares
PPARγ	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas.
PRRs	Receptores de patrón de reconocimiento de patógenos
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
T₁₀E₁	Tampón Tris-HCl, EDTA
TLRs	Receptores Toll Like
TMB	3,5 - Tetrametilbenzidina
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor de factor de necrosis tumoral
UFCs	Unidades formadoras de colonias

PUBLICACIONES

1. Rivero-Lezcano OM, Blanco-Conde S, López-Medrano R, López-Fidalgo E, Caño-Herrero M, Nebreda-Mayoral T. Blood antimicrobial activity varies against different *Mycobacterium* spp. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017 Dec;107:80-7.
2. Blanco-Conde S, González-Cortés C, López-Medrano R, Palacios-Gutiérrez JJ, Díez-Tascón C, Nebreda-Mayoral T, et al. A strategy based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) for routine genotyping of nontuberculous mycobacteria at the clinical laboratory. *Mol Biol Rep*. 2020 May 1;47(5):3397–405.
3. Blanco-Conde S, González-Cortés C, López-Medrano R, Carazo-Fernández L, Díez-Tascón C, Marcos-Benavides MF, et al. *Mycobacterium abscessus* infected neutrophils as an *in vitro* model for bronchiectasis. Neutrophils prevent mycobacterial aggregation. *Arch Bronconeumol*. 2022 Jul;58(7):578-81.
4. Presentación formato póster: Actividad anti-micobacteriana en sangre de fumadores frente *M. tuberculosis*. XVI Congreso Nacional del Laboratorio clínico. Málaga 19-21 Octubre 2022.

