



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Estudio de cepas de *Mycobacterium leprae*  
colombiano causantes de múltiples episodios  
sintomáticos de lepra post poliquimioterapia**

**Bibiana Chavarro Portillo**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Programa Inter facultades – Doctorado en Biotecnología  
Bogotá D.C, Colombia  
2021**

# **Estudio de cepas de *Mycobacterium leprae* colombiano causantes de múltiples episodios sintomáticos de lepra post poliquimioterapia**

**Bibiana Chavarro Portillo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de  
**Doctor(a) en Biotecnología**

Director  
M. Sc., Ph.D., CARLOS YESID SOTO OSPINA  
Profesor Titular

Línea de Investigación:

Grupo de Investigación “Bioquímica y Biología Molecular de las  
Micobacterias - BBMM”, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

**Universidad Nacional de Colombia**  
**Facultad de Ciencias**  
**Programa Inter facultades – Doctorado en Biotecnología**  
**Bogotá D.C, Colombia**  
**2021**

*El mundo que hemos creado es un proceso de nuestro pensamiento.*

*No se puede cambiar sin cambiar nuestra forma de pensar*

*A. Einsten*

## ***Dedicado A:***

*A mi familia por su apoyo constante, paciencia infinita y complicidad eterna.*

*A mis padres que siempre han sido el mejor ejemplo de valentía y constancia,  
a mi hermana Luisa por tantas risas y colores que le ha dado a este proceso, a mi hermano  
Mario Andres y sobrino Jose Miguel que me han apoyado y animado siempre.*

*Gracias*

# Agradecimientos

Son muchos años de arduo trabajo, muchas personas y entidades que han contribuido a el. Gracias a todos quienes que aportaron a que esté escribiendo estas líneas.

Gracias a Dios y a mi familia, en especial a mis papas y hermanos que siempre han estado ahí sin importar las constantes ausencias, en pro de esta tesis y por estar dispuestos a perseguir conmigo cada una de mis metas.

A Colciencias, convocatoria de Doctorados Nacionales 727, por la financiación en mi proceso de formación y al DAAD (German Academic Exchange Service), por la beca de estudios y entrenamiento otorgada.

Al apoyo logístico, técnico científico y microbiológico del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, del grupo de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM) de la Universidad Nacional de Colombia y el Institute of Clinical Molecular Biology (IKMB), al grupo Acient DNA de la Universidad de Kiel (Alemania).

Al grupo de dermatología tropical y su línea de Hansen y muy especialmente a la Doctora Martha Inírida Guerrero, porque me acogió desde antes del inicio de este proceso de estudios y me dio la oportunidad de aprender, investigar, implementar y argumentar; no solo como mi docente y en muchas oportunidades como una mamá y amiga...Doc. *Merci de tout coeur, merci infiniment.*

Al Grupo de Investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias y al Profesor Carlos Yesid Soto porque me abrió las puertas no solo de su laboratorio sino también de su grupo en donde tuve un apoyo académico y moral constante y en donde investigar siempre fue un placer.

A mis compañeros y amigos María Irene, Paola, Milena y Marcela, por el apoyo, complicidad, lágrimas y risas; siempre fueron una excelente compañía en este camino.

Al *Acient DNA group de Kiel University* y al Dr. Ben Krause-Kyora por recibirme en su Laboratorio y darme acceso no solo a los materiales que requería para continuar con el desarrollo de la investigación, sino aun más importante por su contribución intelectual al desarrollo de este

proyecto. Al Dr. Guillermo Torres por los valiosos aportes a la experimentación y análisis de resultados del presente trabajo. Siempre serás mi amigo

En general quiero agradecer a mis grandes amigos por ayudarme a sobrellevar felizmente esta etapa de mi vida, y por hacerme sonreír cuando la ciencia no lo hacía. Aunque no tengo muchos amigos son muy afortunada de tener los más especiales que he podido encontrar en este camino, María Irene, Paola, Milena, Marcela y Guillermo.

*Gracias a todos quienes contribuyeron para llevar a feliz término este proyecto*

# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Bibiana Chavarr Portillo

30/06/2021

## Resumen

La lepra es una enfermedad dermato-neurológica crónica, causada por *Mycobacterium leprae*, que en Colombia causa cerca de 400 casos nuevos cada año. La lepra se trata con una poliquimioterapia (PQT) y su eficacia es establecida por el seguimiento de casos recurrentes de la enfermedad. Debido a que la recurrencia no puede ser diferenciada en recaída o reinfección clínicamente, en el presente estudio, usamos técnicas de secuenciación total de ADN (genoma) y ARN (transcriptoma), con el fin de conocer algunas características genómicas y transcriptómicas de cepas de *M. leprae* asociadas con múltiples episodios de lepra post-PQT en Colombia.

A partir de biopsias provenientes del diagnóstico inicial y durante la recurrencia de la enfermedad, se aisló ADN y se realizó la secuenciación total de genomas de *M. leprae* causantes de cada evento y se analizaron *in silico* los conjuntos de secuencias resultantes. Los análisis de genómica comparativa de las cepas de *M. leprae* causantes de eventos recurrentes permitieron establecer tres hallazgos importantes: i) encontrar ciertas características genómicas que podrían diferenciar una recaída de una recaída y reinfección, ii) la relación genética entre cepas colombianas y cepas antiguas y modernas, además de cepas aisladas en otros hospederos, como el armadillo de nueve bandas y ardillas de cola roja y iii) establecer posibles efectos de las mutaciones identificadas en los genomas analizados.

Por otra parte, también se pudo establecer la capacidad infectiva de cepas de *M. leprae* relacionadas con un evento inicial en comparación con cepas asociadas a eventos recurrentes en un modelo *in vitro* de infección de células de Schwann. Se pudo observar que la entrada inicial de *M. leprae* a las células de Schwann no depende de las características inherentes de las cepas (vivas o muertas, de pacientes de eventos recurrentes o nuevos) ni de la carga bacteriana usada para la infección; pero la capacidad de infectar más células a través del tiempo si depende de la viabilidad del bacilo.

Los análisis transcripcionales muestran la actividad de genes involucrados en la virulencia y supervivencia, además de los genes codificantes de proteínas de choque térmico, los cuales favorecen la supervivencia de *M. leprae* en condiciones de estrés o durante el cultivo *in vitro*. Como un marcador de patogenicidad, mediante qPCR, se evaluaron los niveles de expresión de siete genes implicados en la síntesis de PGL-1 durante la infección de células de Schwann. Los resultados mostraron una expresión diferencial de ciertos genes que se sugieren una capacidad metabólica disminuida en el caso de *M. leprae* provenientes de pacientes con recaída.

**Palabras clave:** *Mycobacterium leprae*, células de Schwann, genotipo, recaída, reinfección

## Abstract

### Study of Colombian strains of *Mycobacterium leprae* causing multiple symptomatic episodes of post-polychemotherapy leprosy

Leprosy is a chronic dermato-neurological disease caused by *Mycobacterium leprae*, which in Colombia causes about 400 new cases each year. Leprosy is treated with multidrug therapy (MDT) or polychemotherapy (PQT), and its efficacy is established by monitoring recurrent cases of the disease. Because recurrence cannot be clinically differentiated into relapse or reinfection, in the present study, we used total DNA (genome) and RNA (transcriptome) sequencing technique, in order to know some genomic and transcriptomic characteristics of *M. leprae* strains associated with multiple episodes of post-PQT leprosy in Colombia.

From biopsies of initial diagnosis and during disease recurrence, DNA was isolated, and total genomes of *M. leprae* causing each event were sequence. The resulting sets of sequences were analyzed *in silico*. The comparative genomic analyzes of the *M. leprae* strains causing recurrent events allowed to us stablish three important findings: i) find certain genomic characteristics that could differentiate between relapse and reinfection, ii) the genetic relationship between Colombian strains and ancient, modern strains and strains isolated in other hosts, non-humans and iii) establish possible effects of the mutations identified in the genomes analyzed. An *in vitro* model of Schwann cell infection could establish the infective capacity of *M. leprae* strains from initial events compared to strains associated with recurrent events. It could be observed that the initial entry of *M. leprae* into Schwann cells does not depend on the inherent characteristics of the strains of patients with recurrent or new events or the bacterial load used for infection; but the ability to infect more cells over time depends on the genomic or metabolic characteristics of the bacillus.

Transcriptional analyzes show the activity of genes involved in survival, in addition to genes encoding heat shock proteins, which favor the survival of *M. leprae* under stress conditions or during *in vitro* culture. As a marker of pathogenicity, by means of qPCR, the expression levels of seven genes involved in the synthesis of PGL-1 during the infection of Schwann cells were evaluated. The results showed a differential expression of certain genes that suggest a decreased metabolic capacity in the case of *M. leprae* from patients with relapse.

**Keywords:** *Mycobacterium leprae*, Schwann cells, genotype, relapse, reinfection

## Divulgación

### Publicaciones

Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation*. Acta Trop. 2019 Sep;197:105041. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105041. Epub 2019 May 30. PMID: 31152726.

Chavarro-Portillo B, Colorado C, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae*. **En:** Guerrero MI, Hernández CA y Rodríguez G Editores **La lepra: una enfermedad vigente**. Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta Bogotá DC, Colombia. Panamericana Formas e Impresos. 2019. p. 63-87. ISBN

Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae's Infective Capacity Is Associated with Activation of Genes Involved in PGL-I Biosynthesis in a Schwann Cells Infection Model*. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(10):8727. <https://doi.org/10.3390/ijms24108727>

Chavarro-Portillo B, Torres GG, Soto CY, Krause-Kyora B, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae strains circulating in Colombia are clustered with the 3I genotype, including isolates from a nine-banded armadillo*. Submitted for publication (2023).

Paola Santos, Milena Maya-Hoyos, Marcela López-R, Cristian Rosales, Vanessa Vásquez, Andrés Varón, **Bibiana Chavarro-Portillo**, Nelson Enrique Arenas & Carlos Y. Soto. (2023). P-Type ATPases: A Relevant Component in *Mycobacterium tuberculosis* Viability. In: Rezaei, N. (eds) Tuberculosis. Integrated Science, vol 11. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-15955-8\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-031-15955-8_22)

### Eventos científicos

Chavarro-Portillo B, Soto C, Guerrero M, **Infection capacity of *Mycobacterium leprae's* Colombian strains associated to recurrent leprosy events** en el X SLAM-TB, Reunión de la sociedad latinoamericana de tuberculosis y otras micobacteriosis, Monterrey, México 2021 (ACEPTADO)

Chavarro-Portillo B, Soto C, Guerrero M, **Infection capacity of *Mycobacterium leprae's* Colombian strains associated or not associated to recurrent leprosy events** en el XII Encuentro Investigación en Enfermedades Infecciosas y II Encuentro latinoamericano de

investigación en enfermedades infecciosas, 25 y 26 de septiembre de 2020, Modalidad Virtual, Infectio Revista de la Asociación colombiana de infectología Vol 24 N° 3 (Supl 3), Pag 45.

**B. Chavarro-Portillo**, M.I. Guerrero-Guerrero, C.Y. Soto-Ospina, A. Pinzón, Comparative genome analysis of skin disease-related Mycobacteria, 14th International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID XIV), 6-9 November, 2018, Sitges, Spain.

**B. Chavarro-Portillo**, Z. Rivera-Monroy, C.Y. Soto, M. I. Guerrero. Crude lipid extracts obtain for identification of Mycobacteria's phenolic glycolipid, FEMS 2017, 7th Congress of European microbiologists. July 9-13, Valencia, Spain, Abstract Book, Pag 120.

# Contenido

Pág.

<b>Introducción</b> .....	19
<b>I.I. Genoma de <i>Mycobacterium leprae</i></b> .....	<b>20</b>
I.I.I. Variación genómica entre cepas de <i>M. leprae</i> .....	20
I.I.II. Genoma de <i>Mycobacterium lepromatosis</i> .....	21
I.I.III. Marcadores moleculares y epidemiológicos de la lepra.....	22
I.I.IV. Filogeografía de <i>M. leprae</i> .....	23
<b>I.II. La lepra</b> .....	<b>24</b>
I.II.I. Epidemiología de la lepra.....	25
I.II.II. Inmunología de la lepra.....	26
I.II.III. Pared celular de <i>M. leprae</i> .....	27
I.II.IV. Glicolípido Fenólico-1 (PGL-1).....	28
I.II.V. El ingreso de <i>M. leprae</i> a la célula blanco y sus moléculas clave .....	29
I.II.VI. Mecanismo del daño de los nervios periféricos por <i>M. leprae</i> .....	30
I.III. El problema de las recaídas causadas por el <i>M. leprae</i> .....	31
<b>1. Características genómicas de las cepas colombianas de <i>Mycobacterium leprae</i> implicadas y no implicadas en eventos recurrentes de lepra</b> .....	<b>35</b>
1.1. Resumen .....	35
1.2. Introducción.....	36
1.3. Materiales y Métodos .....	38
1.3.1. Muestra de estudio .....	38
1.3.2. Extracción de ADN .....	40
1.3.3. Preparación de las librerías y secuenciación.....	41
1.3.4. Procesamiento de las secuencias.....	42
1.3.5. Análisis de las secuencias .....	44
1.3.6. Análisis de los datos .....	45
1.4. Resultados.....	46
1.4.1. Características clínicas, epidemiológicas y demográficas .....	46
1.4.2. Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas .....	46
1.4.3. Clasificación de casos de recaída o reinfección .....	49
1.4.4. Descripción del genoma de una cepa colombiana de <i>M. leprae</i> causante de reinfección.....	50
1.4.4.1. Relación filogenética de la cepa colombiana de <i>Mycobacterium leprae</i> COL_163 con otros genomas de <i>M. leprae</i> .....	51
1.4.4.2. Sustituciones sinónimas y no sinónimas .....	53

1.4.5. Descripción del genoma de una cepa colombiana de <i>M. leprae</i> causante de recaída.....	54
1.4.6. Descripción del genoma de cepas Colombianas de <i>M. leprae</i> no causantes de eventos recurrentes.....	55
1.4.7. Análisis filogenético de aislamientos colombianos de <i>M. leprae</i> .....	56
1.5. Discusión.....	59
1.6. Conclusiones.....	61
<b>2. Capacidad de infección de cepas colombianas de <i>Mycobacterium leprae</i> implicadas y no implicadas en eventos recurrentes de lepra.....</b>	<b>63</b>
2.1. Resumen.....	63
2.3. Materiales y Métodos.....	67
2.3.1. Selección de los pacientes que ingresaron al estudio .....	67
2.3.2. Cultivos de células de Schwann y obtención de las monocapas .....	67
2.3.3. Obtención de biopsia de piel.....	68
2.3.4. Biopsias de piel frescas incluidas en el estudio. ....	68
2.3.5. Purificación y cuantificación de <i>M. leprae</i> .....	69
2.3.6. Infección de células de Schwann con <i>M. leprae</i> .....	70
2.3.7. Estudios de microscopia.....	70
2.3.8. Evaluación del porcentaje de células infectadas .....	71
2.3.9. Evaluación del número de bacilos por célula en cada punto del tiempo .....	71
2.3.10. Análisis estadístico .....	71
2.4. Resultados.....	72
2.4.1. Obtención de los cultivos de células de Schwann en monocapa.....	72
2.4.2. Cuantificación de los bacilos obtenidos. ....	73
2.4.3. Evaluación morfológica de las células Schwann infectadas con <i>M. leprae</i> .....	73
2.4.4. Evaluación de la capacidad de infección de las células de Schwann.....	75
2.4.4.1. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas en cada punto del tiempo.....	75
2.4.4.2. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas por las cepas de <i>M. leprae</i> y su evolución en el tiempo.....	79
2.4.4.3. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas entre cepas de <i>M. leprae</i> causantes de recaída con otras cepas analizadas .....	82
2.4.5. Evaluación de la multiplicación de <i>M. leprae</i> durante la infección de las células de Schwann.....	84
2.4.5.1. Comparación del número de bacilos por célula infectada en cada punto del tiempo	84
2.4.5.2. Comparación del número de bacilos de <i>M. leprae</i> por célula de Schwann infectada y su multiplicación en el tiempo.....	88
<b>3. Perfil transcripcional en un modelo de infección de células de Schwann, de cepas de <i>Mycobacterium leprae</i> colombianas implicadas o no, en eventos de recurrencia de la lepra .....</b>	<b>95</b>
3.1. Resumen.....	95
3.2. Introducción.....	96
3.3. Materiales y métodos.....	99
3.3.1. Cultivos de células de Schwann y obtención de monocapas .....	99
3.3.2. Purificación de <i>M. leprae</i> .....	99
3.3.3. Infección células de Schwann con <i>M. leprae</i> .....	99

---

3.3.4. Extracción de ARN .....	100
3.3.5. Preparación y secuenciación de las librerías a partir de ARN total .....	100
3.3.6. Procesamiento bioinformático de las secuencias .....	100
3.3.7. PCR en tiempo real de genes involucrados en la biosíntesis de PGL-1 .....	101
3.3.8. Análisis estadístico .....	102
3.4. Resultados .....	103
3.4.1. Control de calidad del ARN obtenido durante la infección de las células de Schwann con <i>M. leprae</i> .....	103
3.4.2. Análisis de lecturas del proceso de secuenciación del ARN .....	104
3.4.3. Análisis de la expresión global de genes en <i>M. leprae</i> durante la infección de células de Schwann .....	104
3.4.4. Composición del transcriptoma de <i>M. leprae</i> asociado y no asociados con eventos recurrentes de lepra .....	105
3.4.5. Cuantificación de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PGL-1 durante la infección de células de Schwann con cepas de <i>M. leprae</i> .....	107
3.5. Discusión .....	110
3.6. Conclusiones .....	111
<b>4. Discusión general.....</b>	<b>113</b>
<b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>117</b>
5.1. Conclusiones .....	117
5.2. Recomendaciones .....	118
<b>6. Anexos.....</b>	<b>119</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>149</b>

## Lista de Figuras

	Pág.
Figura I.1. Esquema de tipificación de polimorfismos de un solo nucleótido para <i>M. leprae</i> ...	23
Figura I.2. Distribución geográfica de los diferentes tipos de SNPs de <i>M. leprae</i> .....	24
Figura I.3. Espectro clínico e inmunológico de la lepra.....	27
Figura I.4. Esquema de la envoltura celular de <i>M. leprae</i> . .....	28
Figura I.5. Estructura molecular de PGL-1 en <i>M. leprae</i> .....	29
Figura I.6. Esquema de la interacción de <i>M. leprae</i> con las células de Schwann en el nervio periférico.....	30
Figura I.7. Proceso de infección del nervio periférico por <i>M. leprae</i> .....	31
Figura 1.1. Origen geográfico de los pacientes incluidos en el estudio.....	40
Figura 1.2. Diagrama de flujo del proceso utilizado para el procesamiento de las secuencias.....	44
Figura 1.3. Cobertura de los SNPs identificados en las cepas de colombianas de <i>M. leprae</i> analizadas.....	48
Figura 1.4. Mapa circular del genoma de <i>Mycobacterium leprae</i> COL_163.....	50
Figura 1.5. Alineamiento múltiple de los genomas de las cepas de <i>Mycobacterium leprae</i> TN, COL_163 y <i>M. lepromatosis</i> .....	51
Figura 1.6. Análisis filogenético de cepas antiguas y modernas de <i>M. leprae</i> y su relación con la cepa colombiana.....	52
Figura 1.7. Distribución de las mutaciones en CDS en <i>Mycobacterium leprae</i> Col_163 por las categorías funcionales de EggNOG.....	53
Figura 1.8. Mapa circular del genoma de <i>Mycobacterium leprae</i> COL_662.....	55
Figura 1.9. Mapa circular del genoma de <i>Mycobacterium leprae</i> COL_18-2498.....	56
Figura 1.10. Filogeografía de cepas de <i>M. leprae</i> .....	57
Figura 1.11. Análisis filogenético de cepas antiguas y modernas de <i>M. leprae</i> y su relación con las cepas colombiana de pacientes nuevos.....	58
Figura 2.1. Preparación del escenario para la reprogramación de la célula hospedera: desde la diferenciación terminal hasta la desdiferenciación y las Stem cell.....	65
Figura 2.2. Esquema de la placa de cultivo utilizado en la infección.....	70
Figura 2.3. Cultivo de células de Schwann.....	72
Figura 2.4 Cultivo de células de Schwann en monocapa coloreadas con ZN.....	74

---

Figura 2.5. Porcentaje de infección de las células de Schwann infectadas con <i>M. leprae</i> de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída.....	78
Figura 2.6. Tendencia del porcentaje de células de Schwann infectadas con <i>M. leprae</i> obtenido de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída.....	82
Figura 2.7. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas con <i>M. leprae</i> obtenido de un paciente con un evento de recaída Vs <i>M. leprae</i> obtenidos de pacientes nuevos. ....	83
Figura 2.8. Comparación del número de bacilos por célula de Schwann infectada con <i>M. leprae</i> obtenido de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída en cada punto de tiempo analizado.....	87
Figura 2.9. Número de bacilos por célula de Schwann infectada con <i>M. leprae</i> obtenido de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída.....	91
Figura 3.1. Genes involucrados en la síntesis de PGL-1 de <i>M. leprae</i> y sus ortólogos en <i>M. tuberculosis</i> .....	98
Figura 3.2. Perfil transcripcional de los genes involucrados en la síntesis de PGL-1 en <i>M. leprae</i> . ....	109

## Lista de Tablas

	Pág.
Tabla I.1. Características generales de las cuatro cepas de referencia de <i>M. leprae</i> secuenciadas .....	21
Tabla I.2. Principales características de los genomas de <i>M. leprae</i> y <i>M. lepromatosis</i> y su comparación con otras micobacterias patógenas.....	22
Tabla 1.1. Información epidemiológica de los pacientes incluidos en el estudio.....	38
Tabla 1.2. Resultados de la secuenciación total del genoma de las cepas colombianas de <i>M. leprae</i> .....	47
Tabla 1.3. Resumen del análisis de la secuenciación total del genoma entre las cepas de <i>M. leprae</i> analizadas en la primera, segunda e incluso tercera aparición de la enfermedad. ....	49
Tabla 1.4. Resumen del análisis del efecto de los SNPs en la cepa colombiana de <i>M. leprae</i> Col_163 .....	51
Tabla 1.5. Resumen del análisis del efecto de los SNPs en la cepa colombiana de <i>M. leprae</i> Col_622 .....	54
Tabla 1.6. Resumen del análisis del efecto de los SNPs en las cepas colombianas de <i>M. leprae</i> COL_18-2948 y COL_18-3026 .....	55
Tabla 2.1. Principales características demográficas y clínicas de los pacientes nuevos y con sospecha de recaída.....	69
Tabla 2.2. Aislamiento de <i>M. leprae</i> a partir de pacientes con LL (Nuevos y recaída).....	73
Tabla 2.3. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 2 horas post-infección .....	75
Tabla 2.4. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 3 días post-infección .....	76
Tabla 2.5. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 7 días post-infección .....	76
Tabla 2.6. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 10 días post-infección.....	77
Tabla 2.7. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 12 días post-infección.....	77

Tabla 2.8. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por <i>M. leprae</i> (Exp 1) a través del tiempo.....	79
Tabla 2.9. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por <i>M. leprae</i> (Exp 2) a través del tiempo.....	79
Tabla 2.10. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por <i>M. leprae</i> (Exp 3) a través del tiempo...	80
Tabla 2.11. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por <i>M. leprae</i> (Exp 4) a través del tiempo...	80
Tabla 2.12. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por <i>M. leprae</i> (Exp 5) a través del tiempo...	81
Tabla 2.13. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por <i>M. leprae</i> (Exp 6) a través del tiempo...	81
Tabla 2.14. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> por célula de Schwann infectada a 2 horas post-infección .....	84
Tabla 2.15. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> por célula de Schwann infectada 3 días post-infección ....	85
Tabla 2.16. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> por célula de Schwann infectada 7 días post-infección ....	85
Tabla 2.17. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> por célula de Schwann infectada 10 días post-infección .	86
Tabla 2.18. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> por célula de Schwann infectada 12 días post-infección .	86
Tabla 2.19. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> (Exp 1) por célula a través del tiempo.....	88
Tabla 2.20. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> (Exp 2) por célula a través del tiempo.....	88
Tabla 2.21. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> (Exp 3) por célula a través del tiempo.....	89
Tabla 2.22. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> (Exp 4) por célula a través del tiempo.....	89
Tabla 2.23. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> (Exp 5) por célula a través del tiempo.....	89
Tabla 2.24. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de <i>M. leprae</i> (Exp 6) por célula a través del tiempo.....	90
Tabla 3.1. Genes implicados en la formación del dominio sacárido de PGL-1 en <i>M. leprae</i> .....	97
Tabla 3.2. Secuencias y características de los primers diseñados para la detección de genes implicados en la síntesis de PGL-1 en <i>M. leprae</i> .....	101
Tabla 3.3. Cuantificación del ARN post-infección de las células de Schwann con <i>M. leprae</i> ..	103
Tabla 3.4. Tabla del análisis de calidad de las secuencias obtenidas.....	104
Tabla 3.5. Resumen de la secuenciación del ARN de <i>M. leprae</i> .....	104
Tabla 3.6. Tabla de genes expresados por <i>M. leprae</i> proveniente del paciente con recaída durante la infección de células de Schwann.....	105

---

Tabla 3.7. Tabla de genes expresados por <i>M. leprae</i> causantes de eventos no recurrentes durante la infección de células de Schwann.....	106
---	-----

## Lista de Anexos

	Pág.
Anexo A. Protocolos utilizados en el estudio .....	119
Anexo B. Cuantificación de ADN después de la extracción y después de la preparación de las librerías.....	133
Anexo C. Programas usados para los análisis bioinformáticos .....	135
Anexo D. Resultados del análisis de SNPs por muestra .....	138
Anexo E. Lista de 42 genomas de <i>M. leprae</i> usados para inferir SNPs en casos recurrentes .	143
Anexo F. Tabla de polimorfismos en <i>M. leprae</i> Col_163 que incluyen SNP sinónimos y no sinónimos.....	144

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
AFR*	Región Africana
AMR*	Región de las Américas
BB	Borderline Borderline
BL	Borderline Lepomatosa
BT	Borderline tuberculoide
CDS*	Secuencia Codificante
DIM	Tiocerol dimicoserosato
EMR*	Región del Mediterráneo Oriental
EUR	Región Europea
EUR*	Región Europea
G1D*	Discapacidad Grado 1
G2D*	Discapacidad Grado 2
HTS*	shotgun high-throughput sequencing
IB	Índice Bacilar
InDels*	Insertion-deletion polymorphisms
LAM	Lipoarabinomanano
LL	Lepra Lepromatosa
LLD	Lepra Lepromatosa Dimorfe
LM	Lipomanano
LT	Lepra Tuberculoide
MB	Multibacilar
ML-LBP21	proteína de unión a la laminina
NGS	Next Generation Sequencing
NHDP*	Programa Nacional de Enfermedad de Hansen
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Paucibacilar
PGL-1	Glicolípido Fenólico-1
PNS*	Sistema Nervioso Periférico
PQT	Poli-quimioterapia
SEAR*	Región de Asia Sudoriental
SNPs*	Single nucleotide polymorphisms
SSBH	Solución Salina Balanceada de Hank's
STG	Secuenciación Total del Genoma
TMM	Micolato de Trehalosa
UDG*	Uracil DNA Glycosylase
USER enzyme	Uracil-Specific Excision Reagent Enzyme
VNTR*	Variable Number of Tandem Repeats
WPR	Región del Pacífico Occidental
ZN	Ziehl Neelsen

\* Abreviatura original del inglés.

## Introducción

La lepra es una de las principales causas de neuropatías periféricas no traumáticas en el mundo [1]. Hasta 2008, *Mycobacterium leprae* fue considerado como el único agente causal de la lepra, cuando se descubrió una especie llamada *Mycobacterium lepromatosis*, como causante de casos de lepra lepromatosa dimorfa (LLD) [2]. La poli-quimioterapia (PQT) para el tratamiento de la lepra utiliza diferentes combinaciones de antibióticos, diferentes dosis y tiempo de administración, que se prescriben según la clasificación clínica de la enfermedad [3]. Gracias a estos esquemas, en los últimos 60 años se ha reducido de forma drástica la carga mundial de esta patología; sin embargo, el tratamiento requiere varios meses para completarse y no revierte el daño nervioso [4]. A pesar de la PQT, la lepra sigue siendo un problema de salud pública en América del Sur, África, Sur y Sudeste de Asia y Micronesia, donde se reportan más de 200.000 casos nuevos de lepra cada año [5]. En Colombia, según datos publicados por el Instituto Nacional de Salud (INS) se han reportado anualmente en promedio 400 casos nuevos en los últimos 10 años, de los cuales el 7% ocurre en niños y el 36% presentaron algún grado de discapacidad al momento del diagnóstico [6]. Debido a un periodo de incubación extremadamente largo y a la falta de un diagnóstico temprano, la mayoría de los pacientes con lepra presentan clínicamente alguna forma de neuropatía al momento de ser diagnosticados [7,8].

*M. leprae* es un bacilo recto o ligeramente curvo, con extremos redondeados, que mide entre 1-8  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, inmóvil y no formador de esporas, que se dispone individualmente o en paquetes globulares llamados *globias* [1,2]. *M. leprae* se divide por fisión binaria, posee un tiempo de generación que oscila entre 12 y 14 días considerándose de muy lento crecimiento. *M. leprae* no es cultivable en medios artificiales, por lo que su multiplicación se ha restringido a modelos animales, especialmente en las almohadillas plantares de ratones [9]. Por otra parte, el armadillo de nueve bandas *Dasypus novemcinctus*, la ardilla de cola roja y primates no humanos, se han reportado como especies de vida silvestre que sirven de reservorio para el bacilo de la lepra [10-12]. Por todo ello, se ha dificultado realizar experimentación que responda a preguntas acerca la genética, metabolismo, patogenicidad y sensibilidad a antimicrobianos de *M. leprae* [4].

Aunque el mecanismo de transmisión del bacilo no se ha dilucidado completamente, se cree que el tracto respiratorio proporciona uno de sus puntos de entrada para el bacilo, ya que la exposición a secreciones nasales y lesiones abiertas de pacientes con la enfermedad y sin tratamiento, favorece

a largo plazo, la absorción de *M. leprae* a través de la mucosa nasal [13–16]. La transmisión depende de la capacidad infecciosa de los casos fuente y de la susceptibilidad del individuo sano, siendo esta última modulada por la inmunidad del paciente [15,16].

## I.I. Genoma de *Mycobacterium leprae*

A partir de lesiones cutáneas de un paciente con lepra proveniente de Tamil Nadu, India, se aisló *M. leprae* (cepa TN), del que a partir de su material genético se determinó su genoma y se publicó en el 2001; encontrando un tamaño de 3.268.203 pb y un contenido de G+C del 57,8% [17]. A partir de su análisis se conoció que solo el 49,5% (1.614 genes) del genoma de *M. leprae* TN está constituido por genes que codifican proteínas y un 41% (1.310) son pseudogenes reconocibles, marcos de lectura inactivos que tienen homólogos funcionales en *M. tuberculosis* [18,19]. El 9,4% restante del genoma no parece ser codificante o puede corresponder a secuencias reguladoras o restos de genes que no pueden ser reconocidos por la gran cantidad de mutaciones ocurridas [18]. Esta pérdida masiva de genes dejó a *M. leprae* con menos del 50% de genes codificantes a diferencia de *M. tuberculosis* en el que más del 90% de su genoma posee genes funcionales [18].

Tanto el número como la proporción de pseudogenes en el genoma de *M. leprae*, son excepcionales al comparar con géneros de otras células procariotas [20,21]. Dentro de las características encontradas en los pseudogenes de *M. leprae*, se tiene que un 82,3% de su secuencia conserva las características de un gen funcional, por lo que muchos de estos marcos de lectura truncados podrían en principio ser transcritos y/o traducidos [22,23]. Características importantes de los pseudogenes en *M. leprae* es la transición principalmente de C→T o G→A y la presencia de un gran número de codones de parada que van entre 1 y 40 [23–25].

### I.I.I. Variación genómica entre cepas de *M. leprae*

Hasta la fecha cuatro cepas representativas de *M. leprae*: TN (India), Tahi-53 (Tailandia), NHDP-63 (EE. UU.) Y Br4923 (Brasil) han sido caracterizadas [26]. Las comparaciones genómicas muestran que los genomas de *M. leprae* tienen un 99,95% de identidad y que las diferencias en el tamaño del genoma son menores del 0,05%, comprendiendo 289 SNPs (*Single nucleotide polymorphisms, sigla en inglés*) sitios polimórficos que incluyen SNPs y pequeños eventos de InDels (*Insertion-deletion polymorphisms, sigla en inglés*) [26,27].

La cepa Br4923, se seleccionó como una cepa de referencia debido su distancia geográfica (Brasil) con respecto a las demás cepas de *M. leprae*. El genoma de la cepa Br4923 contiene 3.268.071 pb, que comparado con el de la cepa TN, muestra 141 pb menos, hecho que se atribuyó al mayor número de copias de repeticiones en bloque o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats, sigla en inglés*) presentes en la cepa TN [26]. Estos dos genomas difieren en 241 SNP y 48 InDels, además de la presencia del pseudogen ML0825c que se ha reportado en la cepa Tahi-53 (Tabla I.1) [26,27].

**Tabla I.1. Características generales de las cuatro cepas de referencia de *M. leprae* secuenciadas**

Cepa (Tamaño del genoma en pb)	SNPs InDels	SNP subtipo	Pseudogenes adicionales (Función)	Método de secuenciación	Fuente/ origen
TN (India) (3,268,212 bp)	21	1A		ABI	Paciente de Tamil Nadu, India
Thai-53 (Tailandia)	23	1A	ML0472 – (No conocida) ML2472c – (TyrA) ML2687c – (No conocida)	Illumina	Paciente de Tailandia
NHDP63 (USA)	65	3I	ML2472c – (TyrA) ML2678c – (No conocida)	Illumina	Paciente de Texas (sin historia de residencia en el extranjero)
Br4923 (Brasil) (3,268,071 bp)	65	4P	ML0825c – (Regulador ArsR)	ABI	Paciente de Brasil

Tomado de Chavarro-Portillo y colaboradores, 2019 [24].

### I.I.II. Genoma de *Mycobacterium lepromatosis*

En el año 2008, se identificó una nueva especie denominada *M. lepromatosis*, obtenida a partir de una muestra de hígado de un hombre mexicano que murió en Arizona con LLD [2] y desde su descripción se ha identificado en pacientes de México [28], Singapur [29] y Canadá [30]. La confirmación de la identificación de esta nueva especie se obtuvo a través del análisis de una muestra de biopsia de un caso de LLD (Mx1-22A) de Monterrey, México descrito en 2011 [31]. La secuenciación total del genoma mostró que *M. lepromatosis* posee un total de 3.206.741pb, con 1477 genes codificantes y 1334 pseudogenes [32].

La comparación de las secuencias genómicas de *M. lepromatosis* y *M. leprae*, reveló que los dos genomas son notablemente similares en tamaño, organización y contenido de genes. El 94% del genoma de *M. lepromatosis* puede alinearse con el genoma de *M. leprae* TN y hay una colinealidad y sintenia casi perfectas, con un 92% de los genes y pseudogenes compartidos.

*M. lepromatosis* tiene el 95% de las CDS (*Conding sequence, sigla en inglés*) presentes en *M. leprae*, pero contiene 132 CDS presentes en *M. leprae* que se han pseudogenizado; además 26 pseudogenes de *M. leprae* tienen una contraparte funcional en *M. lepromatosis*. En promedio el 93% de los CDS comparten una identidad de secuencia de nucleótidos entre las dos especies, a diferencia de los pseudogenes que es del 82% [32]. Un resumen de las características de *M. leprae* y *M. lepromatosis* se muestran en la tabla I.2. y se comparan con otras micobacterias patógenas cercanas.

**Tabla I.2. Principales características de los genomas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* y su comparación con otras micobacterias patógenas**

	<i>M. leprae</i> TN	<i>M. lepromatosis</i> Mx1-22 <sup>a</sup>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. marinum</i> M	<i>M. ulcerans</i> Agy99
Referencia	[17]	[32]	[33]	[34]	[35]
Tamaño del genoma (ADN cromosomal Mb)	3.27	3.21	4.41	6.64	5.63
ADN extracromosomal (plasmidos)	No	No	No	pMM23	pMUM001
Contenido G+C (%)	57.79	57.89	65.6	66.08	65.73
Secuencias codificante de proteínas (CDS)	1614	1477	3998	5426	4288
Pseudogenes	1306	1334	30	57	771
Densidad de genes (bp/gene)	2036	2171	1103	.....	1313
Longitud promedio de los genes (bp)	1009	1044	1006	1097	961
Porcentaje codificante de proteínas	49.6	49	91.2	90	73.2
tRNAs	45	45	45	46	45
Genes rRNA	3	3	3	3	3
Operon rRNA	1	1	1	1	1

La tabla se adaptó al español a partir de Singh y colaboradores, 2018 [36].

### I.I.III. Marcadores moleculares y epidemiológicos de la lepra

Las micobacterias de lento crecimiento presentan una variabilidad genética muy baja y se consideran genéticamente monomórficas o clonales [37]. Un análisis realizado por Benjak A y colaboradores en el 2018, mostró que *M. leprae* presenta una tasa de sustitución menor a  $7.8 \times 10^{-9}$  por sitio en el genoma por año, convirtiéndola en una de las bacterias más conservadas [38]. Los estudios de tipificación molecular se basan en dos grupos de marcadores genéticos: Secuencias de nucleótidos cortas ubicadas en una posición adyacente entre sí en el cromosoma y que varían en el número de copias entre diferentes cepas bacterianas y se conocen VNTR y SNPs e InDel.

La comparación de los genomas de cuatro cepas de *M. leprae* provenientes de India, Brasil, Tailandia y Estados Unidos reveló 84 marcadores informativos, capaces de discriminar 4 tipos de SNP en función de tres loci distintos y 16 subtipos de SNP de *M. leprae* (Figura I.1.) [26,39]. El

mapeo de estos polimorfismos en mas de 400 cepas provenientes de 28 países, mostró que la distribución de los subtipos de SNP estaba correlacionada con el origen geográfico de los pacientes y que esta seria una herramienta solida para estudios filogeográficos y evolutivos [26].

Combination of SNPs at - SNP	14676	1642875	2935685	SNPs to determine the Subtype	SNP 8453	SNP 313361	SNP 61425	SNP 1642875		
Type 1	C	G	A	1A	T					
				1B	C	A				
				1C		G	A			
				1D			G	G		
Type 2	C	T	A	SNPs to determine the Subtype	SNP 8453	SNP 313361	SNP 61425	SNP 1642875		
				2E	A					
				2F	C	C				
				2G		G	A			
Type 3	C	T	C	SNPs to determine the Subtype	SNP 1133492	SNP 1295192	SNP 2312059	SNP 413902	SNP 20910	SNP 14676
				3I	T	A				
				3J	G	G	C			
				3K			G	G		
				3L				A	G	
Type 4	T	T	C	SNPs to determine the Subtype	978585	1476518				
				4N	DEL					
				4O	T	T				
				4P	DEL	DEL				

Figura I.1. Esquema de tipificación de polimorfismos de un solo nucleótido para *M. leprae*. Modificado y adaptado al español de [40]

Los polimorfismos VNTR son menos estables, debido a que surgen del deslizamiento de la replicación bacteriana [41]. Como los SNP son mucho mas estables y menos propensos a la variación en intervalos cortos, esta tipificación es una mejor aproximación para evaluación de transmisión de largo alcance, como la difusión a nivel nacional, mundial o en periodos de tiempo históricos [40]. Paralelamente, la secuenciación total del genoma (WGS, *por su sigla en ingles*) también fue reconocida como una poderosa herramienta para la genotipificación, ya que permite una resolución mas profunda de la variabilidad genética general de cada cepa y proporciona datos solidos para el análisis de poblaciones [40,42].

### I.I.IV. Filogeografía de *M. leprae*

El análisis inicial de los SNPs en *M. leprae* demostró que, a pesar del extenso deterioro del genoma, estos son muy raros y se presentan aproximadamente cada 28 Kb, mostrando ser altamente conservados, con < 300 SNPs entre cepas distantes y solo unos pocos entre cepas cercanas. Se han definido cuatro tipos de SNPs (Ramas 1-4) y 16 subtipos de SNPs (A-P), y sus tipos se basan en el estudio de 78 SNPs y 6 InDels [26]. De acuerdo a las ramas mencionadas anteriormente *M. leprae* se clasifica por la comparación total del genoma, reflejando una mayor complejidad [43]. La rama más ancestral, la rama 0 correspondiente parcialmente al subtipo 3K en el análisis de SNPs que se encuentra principalmente en Asia oriental (Japón, China, Nueva Caledonia). La rama 1 correspondiente al SNP tipo 1 se detecta principalmente en Asia meridional y oriental (Tailandia, India y sur de Japón) (Figura I.2.) [26,43,44].

La rama 2 que incluye el SNP tipo 2, se encuentra en el cercano Oriente y el sur de Asia [26,38]; la rama 3 correspondiente al subtipo 3I de SNP está presente en América Latina, la que se ha reportado en población de armadillos de nueve bandas del sudoeste de Estados Unidos [45] con posible transmisión zoonótica ocasional a humanos [46] y también se encuentra en otros reservorios no humanos de *M. leprae* como la ardilla roja en Inglaterra [10]. Finalmente, la rama 4 correspondiente al SNP tipo 4, está presente en África occidental y América del sur (Figura I.2.) [26,47].

Los análisis de SNPs y VNTR en cepas de *M. leprae* circulantes en Colombia que pertenecen a los SNP tipos 1 a 4 [48,49], sugiriendo una gran diversidad en el origen de nuestras cepas. Cardona y colaboradores publicaron la presencia de cepas de *M. leprae* SNP tipo 3, sugiriendo origen europeo, y los SNP tipos 2 y 4 sugiriendo a su vez un origen africano [48]. Otro estudio de Torres-Ávila y colaboradores muestra la diversidad genotípica de las cepas colombianas al analizar los genotipos VNTR, encontrado que había 22 genotipos diferentes en 161 muestras analizadas [50].



**Figura I.2. Distribución geográfica de los diferentes tipos de SNPs de *M. leprae*.** Los gráficos circulares se encuentran en el país de origen de la muestra de *M. leprae* y están codificados por colores de acuerdo con el esquema para los 16 subtipos de SNP. La distribución de colores en la muestra corresponde al porcentaje de cada subtipo. Autoría propia.

## I.II. La lepra

La lepra, es una neuropatía desmielinizante generalizada que produce lesiones inflamatorias en la piel y los nervios periféricos [51]. La lepra comprende un complejo espectro de manifestaciones clínicas que van desde las formas localizadas imperceptibles para el paciente -lepra indeterminada-

hasta las formas diseminadas con compromiso en los nervios periféricos, deformidad y discapacidad. Las manifestaciones clínicas dependen de la reacción inmunológica específica del paciente frente al bacilo [52] y se clasifican en dos formas polares: la lepra lepromatosa (LL) y lepra tuberculoide (LT) (Figura I.2) [53].

Los pacientes con LL tienen una alta carga de bacilos en las muestras de biopsia de piel, además de lesiones cutáneas generalizadas como en maculas, pápulas, placas o nódulos, nervios periféricos con anestesia que con el tiempo pueden desarrollar queratitis, uveítis, pérdida de pelo de las cejas, ulceración de la nariz, destrucción ósea, la piel engrosada y cerosa [53] debido a la infiltración por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Figura I.3) [54]. En el caso de pacientes con LT, se observa una baja carga bacteriana en la muestra de biopsia de piel se puede presentar con una sola lesión en piel con señales de anestesia, con daño en nervios periféricos [53]. En algunos casos se ha observado resolución espontánea de la enfermedad tipo LT, la cual no se produce en pacientes con LL [55].

### **I.II.I. Epidemiología de la lepra**

La prevalencia mundial de la lepra en el año 2018 fue de 208.619 casos nuevos. La tendencia de los últimos 10 años ha mostrado una lenta disminución en la detección de casos nuevos a nivel mundial, de 244.796 en el 2009 a 208.619 en 2018, para una tasa de detección de 2,74 casos por 100.000 habitantes. A escala mundial, el número de casos nuevos detectados, disminuyó en un 4% (8501 casos) desde el año 2017 [5,56].

La prevalencia de lepra mundial registrada a finales del 2017 era de 192 713 casos (0,25 / 10 000 habitantes), con un aumento de 20 765 casos más que en 2016 [5]. En 2018 en la AFR (*the African Region, sigla en ingles*) se reportaron 20.586 casos nuevos; en la AMR (*the Americas Region, sigla en ingles*) 30.957 casos representando un aumento en 1.830 con respecto al 2017. En la EMR (*the Eastern Mediterranean Region, sigla en ingles*) se notificaron 4.338 casos nuevos mostrando un aumento de 775 casos con respecto al 2017. Para la SEAR (*the South-East Asia Region, sigla en ingles*) se reportaron 148.496 casos nuevos y 4.193 casos en la WPR (*the Western Pacific Region, sigla en ingles*). En los países en la EUR (*the European Region, sigla en ingles*) se reportaron 50 casos nuevos [5,56].

Los programas nacionales evalúan el estado de discapacidad del paciente al momento del diagnóstico e informan el número de casos nuevos con algún grado de discapacidad, lo que refleja la detección temprana de casos. Indirectamente, también proporciona información sobre otros factores que influyen en la detección de casos, como el conocimiento de la comunidad sobre la lepra, la capacidad del personal de salud para reconocer los signos y síntomas tempranos y, en cierta medida, la calidad de los servicios de lepra [5]. El número de casos con G2D (*grade 2 disability, sigla en ingles*) en el momento del diagnóstico refleja directamente la falta de detección temprana de los casos; uno de los objetivos de la Estrategia Global de la lepra es, cero nuevos casos infantiles con G2D [57].

La clasificación de discapacidad fue reportada por 141 países en 2018. De estos, 60 países informaron 0 casos de G2D, 31 informaron 1-10 casos, 33 informaron de 11-100 casos y 14 países informaron de 101-1000 casos. Brasil notificó 2.109 casos, India 3.666 e Indonesia 1.118 casos. A nivel mundial, 11.323 nuevos casos de lepra se presentaron con G2D en el momento del diagnóstico en 2018 [56].

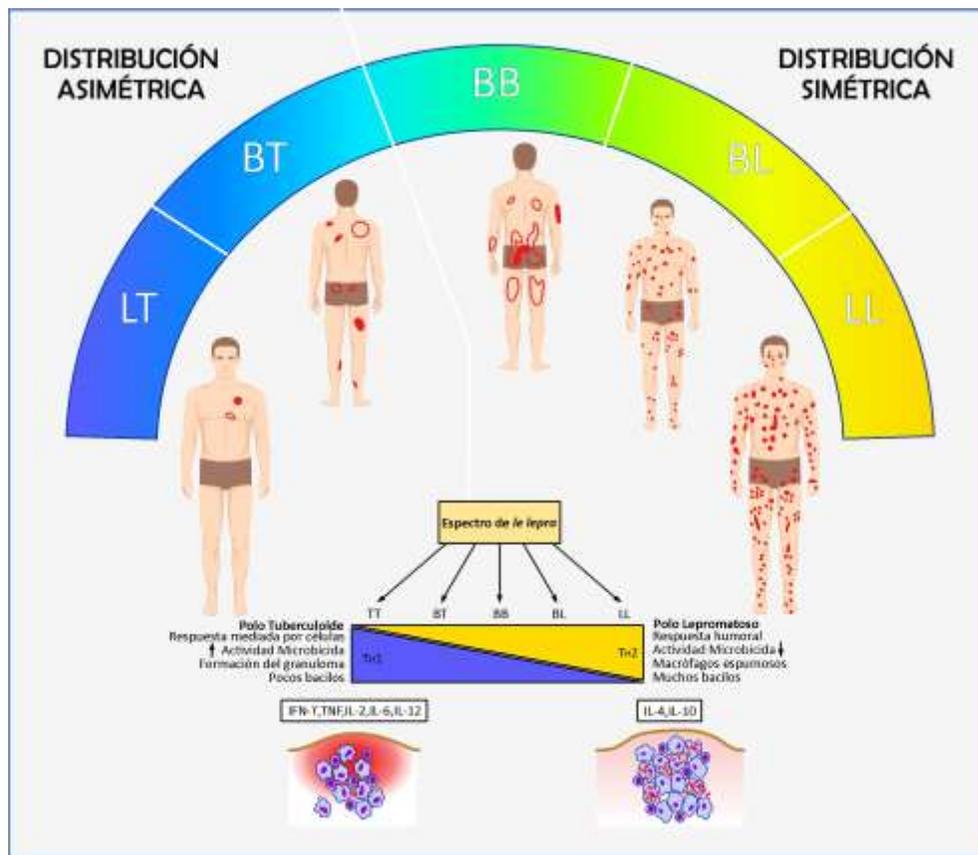
En las Américas, 24 de 35 países reportan cada año nuevos casos de la enfermedad [5]. Para el año 2018 se reportaron 30.957 de casos nuevos; el 92,3% del total eran provenientes de Brasil [56]. En Colombia entre los años 2011 y 2018 se reportaron más de 3.000 casos nuevos con un promedio de entre 345 y 443 casos por año y para el 2019 fueron de 388 casos nuevos [6]. Los Departamentos con la detección más alta de casos nuevos para el año 2019 fueron Cesar, Huila, Norte de Santander y Arauca; observado un especial aumento en Bogotá D.C., Valle, Boyacá, Cesar y Casanare. Según la clasificación clínica al ingreso del paciente, en este periodo se reportaron un 62% de casos MB y 38% de PB, mientras que los casos nuevos con G2D y G1D (*grade 1 disability, sigla en ingles*) fueron el 9,7% y el 26 % respectivamente, lo que evidencia un diagnóstico tardío [58,59]. La clasificación del grado de discapacidad, consiste en una escala de tres puntos (0, 1, 2) e involucra el análisis de incapacidad presentada en los ojos, las manos y los pies [60].

### **I.II.II. Inmunología de la lepra**

La susceptibilidad frente a la lepra está influenciada principalmente por factores como el repertorio genético del hospedero. Después de los primeros signos de infección clínica, cada paciente desarrolla una respuesta inmune adaptativa particular; por lo que la infección con *M. leprae* desencadena un espectro diverso que cumple criterios clínicos, histopatológicos e inmunológicos. Las manifestaciones clínicas de la lepra se agrupan en cinco formas diferentes: el polo tuberculoide (LT), borderline tuberculoide (BT), borderline boderline (BB), borderline lepromatosa (BL) y el polo lepromatoso (LL) [53]. El espectro clínico está determinado por el equilibrio entre la reacción inmunológica específica del individuo y el bacilo, mediado por la inmunidad celular o la inmunidad humoral (Figura I.3).

El polo LT (de tipo PB, Paucibacilar), se caracteriza porque los pacientes tienen la capacidad de desarrollar granuloma, contener la invasión bacteriana y tener una fuerte respuesta de células Th1, las cuales producen interferón gamma, TNF, IL2, IL6 e IL12 en respuesta a la presencia de *M. leprae*. En estos pacientes se activan macrófagos que eliminan o contienen el bacilo en granulomas, focalizando la invasión bacteriana [61]. El extremo opuesto del espectro; LL (un tipo MB, Multibacilar), se caracteriza la respuesta Th2 presente en el Polo LL, lo que permite una proliferación extensa del bacilo dentro y alrededor de los macrófagos y la producción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, aumentando la respuesta inmune de tipo humoral, restringiendo la eliminación o limitación en el crecimiento bacteriano (Figura I.3) [61,62]. TLR1 y TLR2 se expresan más fuertemente a nivel de las lesiones cutáneas de pacientes con LT [63]. Independiente del espectro clínico, el daño nervioso se manifiesta ampliamente en todos los grupos de pacientes con lepra [64]; la mayoría de los casos de lepra dentro del espectro, presentan un equilibrio entre las

respuesta inmune celular y humoral, lo que se conoce comúnmente como pacientes borderline [65].



**Figura I.3. Espectro clínico e inmunológico de la lepra.** Cada polo está asociado con un perfil inmune humoral o celular característico. La respuesta mediada por células (Th1) en el polo TT y se caracteriza por la eliminación o contención del bacilo en los granulomas, mientras que la respuesta humoral ineficaz en el polo LL (Th2) permite la proliferación de la micobacteria dentro y alrededor de los macrófagos. Esquema modificado y adaptado al español de Misch y colaboradores, 2010 [61] y Nunzi y Massone, 2012 [66].

### I.II.III. Pared celular de *M. leprae*

Las especies del género *Mycobacterium* pertenecen a la familia Mycobacteriaceae y son bacterias Gram positivas y se caracterizan por tener una pared celular con una estructura compleja y única, particularmente rica en lípidos (30 – 60% de su peso seco) [67]. Esta envoltura se organiza en tres compartimentos superpuestos: i) membrana plasmática, ii) esqueleto de la pared celular y iii) capsula o pseudocapsula (Figura I.4).

El tropismo tisular de un patógeno bacteriano está determinado tanto por el hospedero como por los componentes del patógeno bacteriano. En el caso de las micobacterias patógenas, se ha propuesto que la pared celular bacteriana contiene la mayoría de los elementos asociados con su patogenicidad [68]. El esqueleto de la pared celular de las micobacterias determina su forma y el

tamaño de la micobacteria. Como en otras micobacterias, la pared celular de *M. leprae* esta conformada por un esqueleto de peptidoglicano compuesto por N-acetilglucosamina y ácido murámico, que a su vez esta unido de forma covalente a una capa de arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular y forman una capa interna moderadamente electrodensa [68].

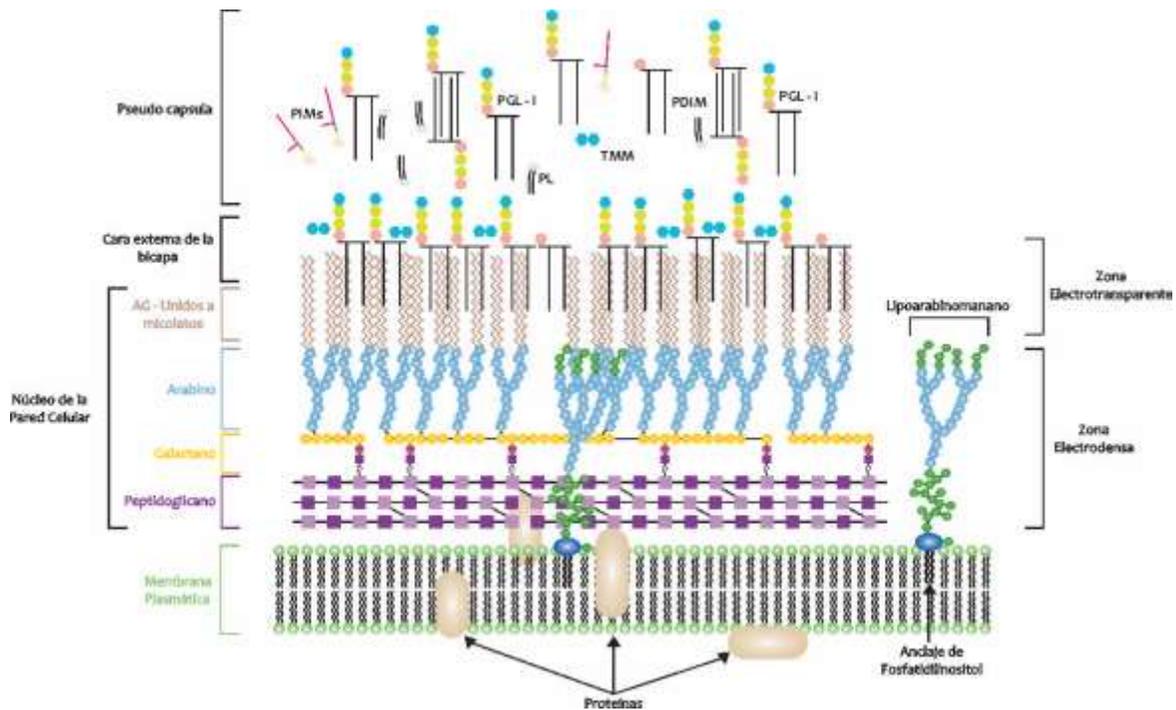


Figura I.4. Esquema de la envoltura celular de *M. leprae*. Modificado de Chavarro-Portillo B y colaboradores. [69]

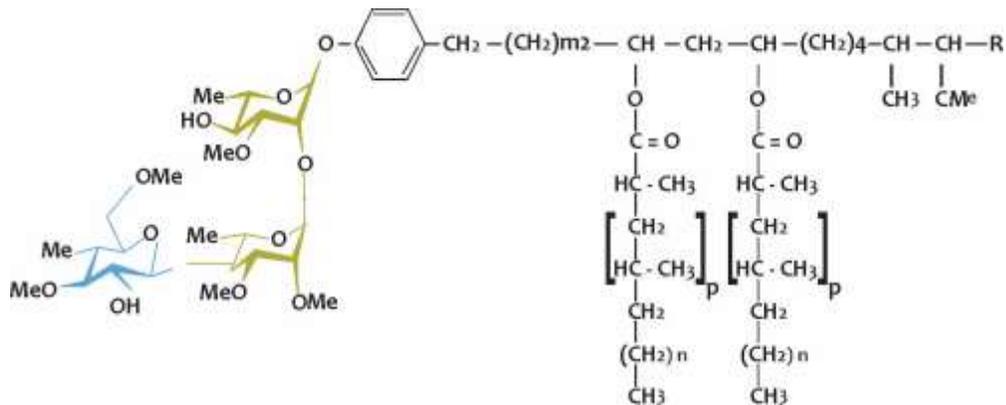
Un tercer componente de la pared son los ácidos micólicos, responsables de la baja permeabilidad y fluidez de la envoltura celular y que además hacen parte de una capa media de la pared celular que es electro-transparente [70]. La capa electro-transparente externa, compuesta, entre otros, por glicolípidos extraíbles como los de la familia de DIM (*phthiocerol dimycocerosates, sigla en ingles*) y glicolípidos fenólicos que están presentes en las micobacterias de crecimiento lento (*M. tuberculosis, M. leprae, M. bovis, M. ulcerans, M. marinum, etc.*) se conoce le permiten a las micobacterias encontrar su nicho específico (Figura I.4) [68,71]

#### I.II.IV. Glicolípido Fenólico-1 (PGL-1)

La consecuencia más severa de la lepra es el daño en los nervios periféricos que se presenta en todas las formas clínicas de la enfermedad [72]. El daño nervioso se deriva de la capacidad de *M. leprae* para infectar las células gliales o células de Schwann del sistema nervioso periférico [73]. Las células de Schwann muestran una notable plasticidad y contribuyen a la capacidad de regeneración del sistema nervioso periférico incluso después de una lesión grave [74]. Entre las

moléculas críticas para la patogénesis en lepra, se encuentra el PGL-1 (*phenolic glycolipid 1, sigla en ingles*), uno de los componentes de la pared celular de *M. leprae* que corresponde a un antígeno muy importante en la respuesta inmune humoral de los pacientes, pero irrelevante en la respuesta celular que en definitiva controla la enfermedad [4,75,76].

El PGL-1, consiste en un núcleo lipídico conformado por fenol- ptiocerol dimicoserosato (conservado entre las especies del género *Mycobacterium*), que en *M. leprae*, presenta un trisacárido terminal, ó 3,6-di-o-metil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3-di-o-metil-α-L-ramnopiranosil-(1,2)-3-o-metil-α-L-ramnopiranososa (Figura I.5.) altamente antigénico, único entre las micobacterias y exclusivo de *M. leprae* [76,77].



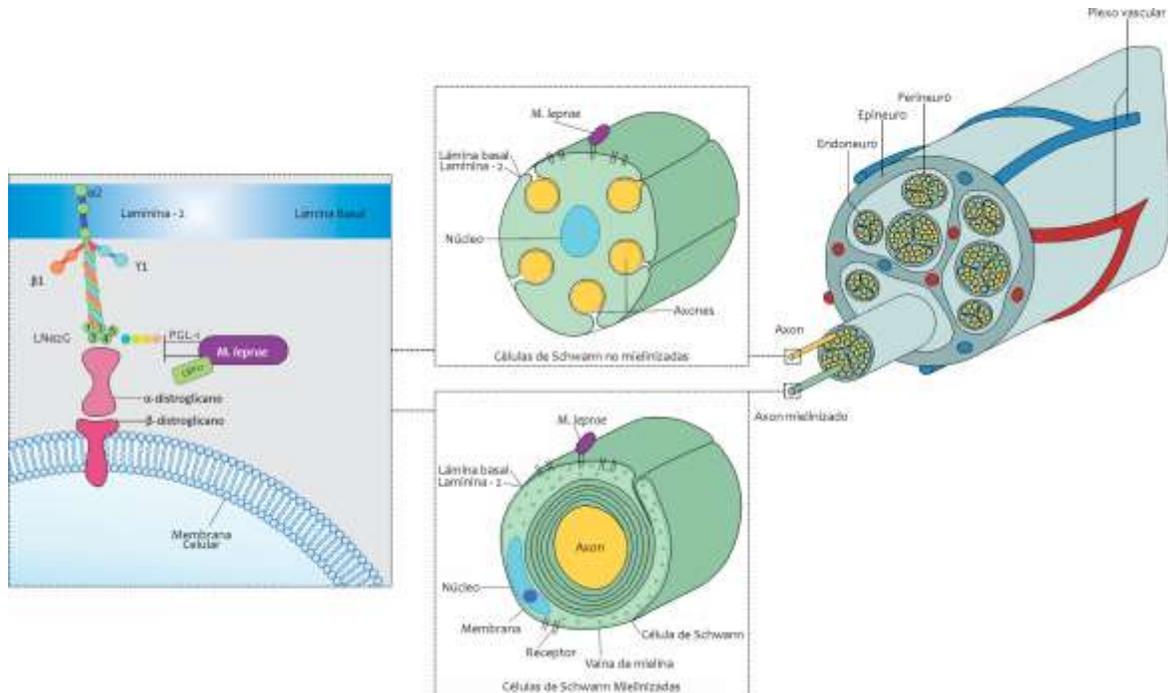
**Figura I.5. Estructura molecular de PGL-1 en *M. leprae*.** El trisacárido 3,6-di-o-metil-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3-di-o-metil-α-L-ramnopiranosil-(1,2)-3-o-metil-α-L-ramnopiranososa está unido a un anillo fenólico, que a su vez está vinculado a uno de las tres moléculas de ácido mycocerosico tetrametil-ramificado [78].

En un estudio realizado por Díaz Acosta y colaboradores en el 2018, evaluaron la participación de PGL-1 en la interacción de *M. leprae* con las células de Schwann mediante el uso de una cepa recombinante de *M. bovis* diseñada para expresar PGL-1. Se encontró que PGL-1 es esencial para la adhesión e internalización de *M. leprae* en las células de Schwann; mientras que otros glicolípidos fenólicos presentes en otras micobacterias son incapaces de mediar la internalización bacteriana en estas células [78].

### **I.II.V. El ingreso de *M. leprae* a la célula blanco y sus moléculas clave**

Las células de Schwann son el objetivo específico de la invasión por *M. leprae*; la colonización de la fibra nerviosa produce pérdida de la sensibilidad, induce la desmielinización y pérdida de la conductividad axonal [79], y como consecuencia se ven afectadas las tres funciones fisiológicas de los nervios: sensorial, motor y autonómica [74]. El tropismo de *M. leprae* hacia los nervios periféricos se debe a su capacidad para invadir las células de Schwann mediante la unión del PGL-1 presente en la superficie del bacilo, y la ML-LBP21 (*laminin-binding protein, sigla en ingles*) con el dominio G de la cadena α2 de laminina-2 presente en la lámina basal, que rodea la membrana de

las células de Schwann [73,80]. Se sabe que el ingreso de *M. leprae* a la célula ocurre cuando el complejo PGL-1-Laminina-2 interactúa con el  $\alpha$ -dístroglicano, (receptor de la laminina-2), que se encuentra en la membrana de las células de Schwann [73,80], la ML-LBP21 aumenta la avidéz de la unión desempeñando un papel secundario (Figura I.6) [73,81,82].



**Figura I.6. Esquema de la interacción de *M. leprae* con las células de Schwann en el nervio periférico.** Estructura del nervio periférico y de la unidad axón-célula de Schwann y sus moléculas clave. La interacción específica de *M. leprae* con los nervios periféricos; la ML-LBP21 (*laminin-binding protein*) y el PGL-1 (*phenolic glycolipid 1*) de la pared celular de *M. leprae* se unen a la cadena  $\alpha 2$  de la laminina-2 (LAMA2) y el  $\alpha$ -dístroglicano en la membrana de las células de Schwann; esto permite la entrada y posterior daño al nervio periférico. Autoría propia.

### I.II.VI. Mecanismo del daño de los nervios periféricos por *M. leprae*

En la patogenia de la lepra, la lesión del nervio es una sucesión dinámica de procesos de adhesión, inmunológicos e inflamatorios que implican células endoteliales [4]. La primera fase, es la localización inicial de *M. leprae* en los vasos sanguíneos y linfáticos epineurales, lo que puede implicar sucesos de adhesión selectiva entre el endotelio y *M. leprae* (o fagocitos mononucleares con *M. leprae*). La resultante acumulación de bacilos dentro y alrededor de las células endoteliales, aumenta la disponibilidad de bacilos y la probabilidad de su circulación a través de los vasos endoneurales que se ramifican en el epineuro (Figura I.7) [4].

En la segunda fase, *M. leprae* entra en el endoneuro a través de los vasos sanguíneos. La fuerte invasión de las células endoteliales en el epineuro resulta en la liberación de bacilos en los vasos sanguíneos, como consecuencia de la lesión o difusión de las células endoteliales. Esto lleva a la presencia y una concentración mayor de bacilos que circulan a través de los vasos endoneurales, ya sea de forma continua o episódica. Eventos de adhesión similares o idénticos a los que se dan en

la primera fase, pueden mediar la entrada de bacilos en las células endoteliales endoneurales. Una vez los bacilos pasan a través (o entre) las células endoteliales endoneurales, están disponibles para la fagocitosis por los macrófagos residentes y por las células de Schwann que no son fagocitos profesionales (Figura I.7) [4].



Figura I.7. Proceso de infección del nervio periférico por *M. leprae*. Autoría propia

En este modelo se propone que no se difiere entre los tipos LL y TT en las dos primeras fases de la invasión de los nervios periféricos no difieren entre los tipos de LL y TT. En ausencia de respuesta inmune efectiva como en la LL, los bacilos proliferan dentro de los macrófagos y las células de Schwann, resultando en la inflamación y engrosamiento perineural, aumentando la carga bacteriana en el epineuro y endoneuro. Si la inmunidad celular es eficaz y la hipersensibilidad retardada se da como en la LT, se produce entonces una respuesta granulomatosa en los sitios de invasión, produciendo la activación de procesos inflamatorios (granuloma) que eliminan casi en su totalidad los bacilos en el epi y perineuro. Sin embargo, los bacilos que hayan sido ingeridos por las células de Schwann están relativamente protegidos de la destrucción mediada por procesos inmunológicos, por lo que son capaces de mantener una invasión persistente durante un tiempo prolongado. Los nervios invadidos por el *M. leprae* presentan lesiones, lo que resulta en una función nerviosa deteriorada [4].

### I.III. El problema de las recaídas causadas por el *M. leprae*

La adopción de la PQT ayudo a reducir la carga de la lepra a nivel mundial [5]. Aunque se han implementado varias estrategias en todo el mundo, que buscan el diagnóstico rápido de la enfermedad y disminución de la tasa de transmisión [83], se reportan cada año miles de casos nuevos, lo que indica transmisión activa [5]. Los procesos de vigilancia establecidos en cada país

han permitido identificar manifestaciones clínicas recurrentes después de la aplicación de la PQT [84], que se pueden deber a procesos de recaída o reinfección.

Entre los mecanismos establecidos en la literatura [85,86] como factores causantes de la recurrencia de la lepra se encuentra:

i) *Tratamiento inadecuado*: relacionado con la incorrecta clasificación de la enfermedad al momento del diagnóstico, y conocido como error de clasificación operacional, en la que los pacientes con lepra MB (alta carga bacilar) se clasifican erróneamente como PB (baja carga bacilar). Como consecuencia se presentan condiciones inadecuadas de tratamiento (dosis insuficientes) produciendo recurrencia de la lepra en un corto periodo (<5 años) después de la finalización del tratamiento [85].

ii) *Persistencia bacilar*: Se puede presentar por el crecimiento de bacilos sobrevivientes en fase latente dentro de las células hospederas, durante un periodo prolongado de tiempo (5 a 10 años) incluso cuando el diagnóstico, el tratamiento y el número de dosis ha sido adecuado. Esta situación puede darse como resultado de una activación del estado metabólico de la micobacteria que se encontraba metabólicamente inactivo o por la persistencia de *M. leprae* viable en los nervios, ganglios linfáticos o en la piel, que causan manifestaciones clínicas de la enfermedad en el paciente dentro de los 10 a 15 años después de la terminación del tratamiento [87].

iii) *Nueva infección o reinfección*: A pesar de la aplicación de un tratamiento adecuado y la remisión completa de la enfermedad, es probable que el paciente se vuelva a exponer a *M. leprae* a través de sus conexiones sociales (amigos, familiares, convivientes) en áreas altamente endémicas. Existen puntos calientes (Hotpots) de transmisión: escenarios que aumentan el riesgo de circulación de patógenos y en consecuencia, una nueva infección en pacientes susceptibles, que se manifiesta como recurrencia de la enfermedad en un largo periodo después de la terminación del tratamiento (>15 años) [87]. En regiones que son altamente endémicas para la lepra, hay un aumento de la exposición y transmisión de la enfermedad con un consecuente aumento del riesgo de reinfección [86].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las tasa de recaída post-PQT en países endémicos oscila entre el 3 y 4% de los casos; 3.361 recaídas fueron reportadas en el 2018 en todo el mundo (3.192 en 2017) [56,88], de las que Brasil reportó el mayor porcentaje de casos con un 6,4% (1.840), seguido de India con 0,5 (436) e Indonesia con el 1,5% (284) casos [56]. Para Colombia, los reportes del ministerio de salud y la protección social a la OMS han mostrado que el porcentaje de recaídas ha variado entre el 7 y 14% entre los años 2013 y 2019 [5,7,56,88-92], sin embargo no se han realizado estudios de cohortes que ratifiquen estos datos.

En un estudio realizado por el Centro de Enseñanza de la Lepra y el Instituto de Investigación, Chengalpattu, Tamil Nadu, India, de 3.248 pacientes PB que completaron el esquema PQT de la OMS durante el periodo 1987-2003 [93], las tasas generales de recaída oscilaban entre el 0,84 y el 1,9%,

la mayoría de éstas se presentaban en los 3 primeros años después de finalizado el tratamiento [93]. En un análisis retrospectivo en China donde se analizaron 2.374 pacientes PB, se encontró una tasa de recaída baja de 0,21 por cada 1.000 personas [94].

En países con un predominio de casos MB, el número de recaídas aumenta notablemente. En Brasil el reporte de recaídas varía entre 6 y 20% de los casos [95]. Entre 2004 y 2009, se reportaron 16.063 casos de recaídas a escala mundial, de los que Brasil reportó 1.483 casos en 2009, correspondiendo al 3,9% de las recaídas del reporte mundial [96].

En Colombia, un estudio realizado por Guerrero y colaboradores 2012 [86], mostró que 6,7 personas de cada 100 tuvieron una recaída en 1 a 7 años después de terminado el tratamiento, de las que el 97% de estas se dieron antes de los 5 años de seguimiento [86]. Como dato muy relevante, se trata de uno de los estudios con mayor tasa de recaída en 100 pacientes seguidos por año de seguimiento, número de recaídas reportadas a nivel mundial, siendo el único realizado con cohortes estrictamente seguidas [86]. Posteriormente, el Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta (HUCDFLLA), realizó un estudio observacional analítico de corte transversal en pacientes MB con sospecha de recaída, encontrando que las principales manifestaciones eran la aparición de nuevas lesiones (33,3%), algunas acompañadas del aumento del BI (*Bacillar index, sigla en ingles*) (11,1%), por lo que la detección de recaídas solo por el incremento del BI durante los controles rutinarios de la vigilancia es menos frecuente (16,7%). En el grupo de pacientes con sospecha de recaída, sólo se pudo confirmar este evento en el 50% de ellos por medio de la detección de bacilos viables en muestras clínicas [97].

Los eventos recurrentes de lepra clínicamente no pueden ser diferenciados entre recaída y reinfección, aunque los métodos de genotipificación basados en el uso de VNTRs y SNPs proporcionan información epidemiológica importante, tienen una resolución limitada, debido a la alta conservación del genoma de *M. leprae* y la baja diversidad entre las cepas de una misma área geográfica [26,98]. Durante el desarrollo de la presente investigación se publicó un estudio en el que se compararon las secuencias del genoma total de cepas de *M. leprae* de episodio inicial y los eventos de recaída. En ese y otros estudios, la WGS es una poderosa herramienta para determinar las diferencias entre cepas, evaluar el régimen de tratamiento y seguir los procesos de transmisión de la enfermedad [99].

Debido a que las características moleculares de *M. leprae* causantes de casos recurrentes de lepra es limitado, nosotros hipotetizamos que el análisis genómico y además transcriptómico de cepas colombianas de *M. leprae* asociadas o no con eventos recurrentes de la enfermedad, podría mostrar diferencias e información fundamental para explicar en parte el fenómeno de las recaídas post-PQT de la lepra en Colombia.

En este sentido, para evaluar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo General: “Determinar las características genómicas y transcriptómicas de cepas de *Mycobacterium leprae* asociadas con múltiples episodios de lepra post-poliquimioterapia en Colombia”.

Objetivos Específicos:

- i. Describir la secuencia total del genoma de las cepas colombianas de *M. leprae* asociadas o no, con múltiples episodios sintomáticos de lepra post-poliquimioterapia.
- ii. Determinar la capacidad de infección cepas de *M. leprae* asociadas y no asociadas con posibles recaídas en un modelo *in vitro* de células de Schwann.
- iii. Evaluar el perfil transcripcional de *M. leprae* asociado y no asociado con múltiples episodios sintomáticos de lepra post-PQT durante la infección de células de Schwann.

Para lograr los objetivos se se planteó una estrategia experimental basada en la identificación y comparación de puntos de mutaciones, inserciones y/o deleciones en el genoma, para identificar las diferencias entre los genomas del evento inicial versus el de la recaída y establecer si se trata de una verdadera recaída o una reinfección. Previamente se requirió la obtención de muestras de pacientes con eventos recurrentes de lepra, partiendo de las biopsias en los eventos de la enfermedad antes y después de la PQT, para extraer el ADN genómico de *M. leprae* y realizar WGS.

A través de un modelo *in vitro* de células de Schwann también se evaluó la capacidad de infección de cepas de *M. leprae* asociadas y no asociadas con casos recurrentes de la enfermedad, con el objetivo de observar posibles diferencias en la capacidad de infección entre *M. leprae* proveniente de un paciente nuevo y un paciente con sospecha de recaída.

A partir del ARN extraído durante el modelo de infección de células de Schwann se realizó el análisis de transcripción de genes en *M. leprae* que están activos durante esta y así poder establecer diferencias en el comportamiento transcripcional de las cepas causantes de eventos recurrentes Vs cepas nuevas.

# 1. Características genómicas de las cepas colombianas de *Mycobacterium leprae* implicadas y no implicadas en eventos recurrentes de lepra

## 1.1. Resumen

La aparición de casos recurrentes de la lepra y su diferenciación entre recaída y reinfección, a pesar de que actualmente es un desafío, también es una herramienta para evaluar la eficacia terapéutica de la PQT a largo plazo. La recaída y la reinfección no pueden ser diferenciadas clínicamente por lo que la secuenciación total de genomas es una poderosa herramienta para la caracterización de las cepas ya que permite analizar la variabilidad del genoma de cada cepa. En el presente trabajo, para dilucidar esta diferencia, se realizó la secuenciación total del genoma de cepas colombianas de *M. leprae* causantes de eventos recurrentes de la enfermedad.

El ADN se aisló a partir de muestras de biopsias de piel a partir de pacientes provenientes del diagnóstico inicial y durante la recurrencia de la enfermedad. Se realizó la secuenciación total del genoma de las cepas de *M. leprae* causante de cada evento y se analizaron *in silico* los conjuntos de secuencias resultantes.

Los análisis de las secuencias de los genomas permitieron establecer diferencias en el número de SNPs, genotipo y SNPs únicos en las cepas del primer, segundo e incluso el tercer evento en los pacientes analizados. Esto nos permitió confirmar 5 casos de recaída y 1 caso de reinfección. Los análisis filogenéticos de las cepas analizadas mostraron que las cepas colombianas están estrechamente relacionadas con cepas antiguas y modernas del genotipo 3I; además algunas cepas colombianas mostraron estrecha relación con cepas provenientes de armadillos de nueve bandas.

Este es el primer estudio en Colombia donde se describe la secuencia total de cepas colombianas de *M. leprae*. Se analizan 25 casos de sospecha de recurrencia de lepra en pacientes tratados y curados a través de la secuenciación total de genomas y su posterior análisis y que fueron identificados durante estudios previos y el seguimiento post-PQT.

**Palabras clave:** *Mycobacterium leprae*, recaída, reinfección, secuenciación total de genomas.

## 1.2. Introducción

La lepra es una enfermedad bacteriana antigua como resultado principalmente de la infección con *M. leprae* y en menor grado por *M. lepromatosis* [2], la lepra se caracteriza por presentar neuropatía periférica no traumática, que involucra principalmente la piel, los nervios periféricos y las mucosas [1]. Aunque el mecanismo de transmisión no se conoce con certeza, la mucosa nasal se considera la vía principal de entrada del bacilo [100] y su propagación en poblaciones particulares depende de la susceptibilidad genética natural de los individuos, así como de la frecuencia del contacto entre individuos sanos y enfermos [4,101,102]. Si bien, la mayoría de las personas expuestas a un caso de lepra no tratado, se infectan, menos del 5% de los infectados desarrollan la enfermedad y la consiguiente discapacidad [103].

El análisis de genómica comparativa, muestra que todas las cepas de *M. leprae* son descendientes de un ancestro común [38,104], se propone que el ancestro de *M. leprae* sufrió una evolución reductiva extrema que involucró la inactivación de la mitad de los genes en el cromosoma [17]. Los genomas de cepas de *M. leprae* han mostrado ser altamente conservadas, se han identificado menos de 300 variaciones de un solo nucleótido (SNVs, *sigla en ingles*) entre las cepas más distantes [26]; por otra parte, con solo 84 SNVs se han podido definir grupos filogenéticos [26,39]. Sin embargo, la publicación de más de 140 nuevos genomas ha producido la identificación de al menos 3124 SNPs, que han permitido mejorar y dar más complejidad a los análisis filogenéticos [38].

La lepra sigue siendo una causa importante de morbilidad crónica en poblaciones vulnerables, a pesar de la disponibilidad de un tratamiento efectivo aunque de aplicación prolongada [54]. La estrategia global para el control de la lepra, involucra la aplicación de una PQT que combina rifampicina, dapsona y clofazimina como medicamentos de primera línea; cuya combinación, como su tiempo de aplicación, depende del diagnóstico de la enfermedad [105]. Actualmente la OMS, recomienda una PQT de 1 año (12 dosis) para pacientes con lepra MB y 6 meses (6 dosis) para pacientes con lepra PB [106]. A pesar del uso de la PQT, la lepra, sigue siendo un importante problema de salud pública en varias partes del mundo, según la OMS en el 2018 se reportaron más de 200.000 casos nuevos de lepra a nivel mundial, una tasa de incidencia anual totalmente estable en la última década [5].

Si la lepra no se diagnostica o se trata en la fase temprana de la enfermedad, la pérdida de la sensibilidad asociada se complica en las extremidades, con la formación de úlceras neuropáticas, que pueden destruir otras estructuras subyacentes de la piel, incluidos los cartílagos y los huesos, causando una discapacidad física irreversible [64,107], situación que ha ido en aumento entre 2009-2018 [56].

Otro factor importante en la epidemiología de la lepra es el reporte de recaídas, que se considera un indicador indirecto de la eficacia de los esquemas de tratamiento de la PQT [108]. La recaída o recurrencia, se puede presentar por la multiplicación de bacilos sobrevivientes a la PQT. Esto puede ser consecuencia de la activación del estado metabólico latente de la micobacteria o por la

persistencia de *M. leprae* viable en los nervios, ganglios linfáticos o en la piel [66]. Las recaídas pueden suceder en pacientes considerados “curados” que tuvieron un correcto tratamiento, es decir, dosis completas y regulares, llegando a baciloscopia negativa y desaparición de los síntomas [86]. Entre los factores que influyen en la recaída se incluyen: el retraso en el diagnóstico inicial y altas cargas bacilares iniciales y la lepra en pacientes multibacilares [86]. Esta manifestación clínica se diferencia de procesos como la resistencia a medicamentos y la reinfección, esta última en pacientes que se han curado y años después inician nuevamente la enfermedad con una nueva cepa de *M. leprae* [93]. En regiones que son altamente endémicas existe un aumento de la exposición y transmisión de la enfermedad con un consecuente aumento del riesgo de reinfección [86].

El riesgo de recaída es significativamente mayor en pacientes con una “carga” BI (Bacillary index) elevado (BI = 4) antes de iniciar de tratamiento, lo que se produce entre 6 a 16 años después de la PQT [109]. La reducción del IB es un proceso lento, ya que solo se disminuye en una unidad logarítmica por cada año de ingesta de la PQT; por lo tanto, no existe un punto final estándar para la terminación del tratamiento, además que la determinación del IB no es un estándar practicado universalmente [107]. En consecuencia, el seguimiento post PQT es fundamental para el diagnóstico de las recaídas evitando la generación de complicaciones incluyendo el aumento en la transmisión de la infección.

En países con un predominio de casos MB, el número de recaídas aumenta notablemente. En Brasil el reporte de recaídas varía entre 6 y 20% de los casos [95]. Entre los años 2004 y 2009, se reportaron 16.063 casos de recaídas a escala mundial, entre los que Brasil reportó 1.483 casos para el año 2009, lo que corresponde al 3,9% de las recaídas del reporte mundial [96]. En Colombia, un estudio realizado por Guerrero y colaboradores en el 2012 [86], mostró que 6,7 de cada 100 personas seguidas por año, tuvieron una recaída entre 1 y 7 años después de la terminación del tratamiento, de las que el 97% de estas se dieron antes de los 5 años de seguimiento [86].

Las recaídas y las reinfecciones no pueden ser diferenciadas clínicamente. Por otra parte, los métodos de genotipificación molecular de un set específico de loci, tienen una resolución limitada debido a la alta conservación del genoma de *M. leprae* y a la baja diversidad de la secuencia entre cepas de la misma área geográfica [26,98]. Por lo tanto, la WGS es una herramienta útil para la tipificación bacteriana y la vigilancia epidemiológica. En un estudio realizado por Stefani y colaboradores (2017), se utilizó esta herramienta para comparar las secuencias de genomas completos de *M. leprae* en episodios iniciales y recurrentes de lepra encontrando que el uso de esta metodología permitió la identificación de una reinfección (cepas no relacionadas) y las presencia de verdaderas recaídas por diferencias menores en la cepa [99].

En el presente trabajo se analizaron 25 casos de lepra con sospecha de recaída, con el objetivo de determinar si la recurrencia de la enfermedad se debió a una recaída verdadera o a un evento de reinfección (una nueva cepa). Para lograr esto se realizó la secuenciación total del genoma de 56 cepas colombianas de *M. leprae* y se compararon los resultados de la secuenciación del genoma

completo de *M. leprae* tomado de las biopsias de piel en el diagnóstico inicial y durante la recurrencia de la enfermedad. para analizar los resultados de la secuencia y los datos de los hallazgos microbiológicos.

## 1.3. Materiales y Métodos

### 1.3.1. Muestra de estudio

Para el presente estudio se seleccionaron mediante muestreo selectivo, 56 muestras de biopsias de piel embebidas en parafina tomadas para el diagnóstico inicial y el evento de la recaída, provenientes de 25 pacientes del banco biológico del HUCDFLLA y pertenecientes al proyecto “Estudios de genotipificación y farmacorresistencia de *Mycobacterium leprae* colombiano” del CDFLLA (código 4000-16.2H), (Tabla 1.1.). En el estudio también se incluyeron 3 biopsias frescas de pacientes nuevos.

Las biopsias provenían de casos clasificados como multibacilares y paucibacilares, de acuerdo con los siguientes criterios: Fite-Faraco positivo en el estudio histopatológico, Zielh Neelsen (ZN) positivo en el examen de frotis de piel y examen clínico compatible con lepra. Las biopsias de piel conservadas en bloques de parafina se cortaron con un micrótomo Leica® y se obtuvieron seis cortes (4 µm de espesor), utilizando una cuchilla desechable para cada muestra. Los cortes se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL y se almacenaron hasta su procesamiento.

Las muestras incluidas en el estudio provinieron de 28 pacientes (25 Casos recurrentes y 3 casos nuevos). Durante el seguimiento los pacientes incluidos presentaron nuevos síntomas entre 1 y 10 años después de la finalización de la PQT.

En los pacientes seleccionados, la sintomatología original detectada en el momento del diagnóstico desapareció tras el tratamiento específico; durante el proceso de vigilancia post PQT y ante la sospecha de recaída/reinfección, se observaron lesiones cutáneas y signos clínicos activos de la enfermedad. El cronograma de los eventos clínicos presentados por los pacientes seleccionados se muestra en la tabla 1.1. y su origen geográfico en la Figura 1.1.

**Tabla 1.1. Información epidemiológica de los pacientes incluidos en el estudio**

Codificación de los pacientes en el estudio	Códigos de las cepas	Edad del Diagnostico (años)	Sexo	Poliquimio Terapia		Fecha de la recaída	Meses entre la finalización del tratamiento y la recurrencia de los síntomas
				Inicio	Terminación		
1	COL_545 COL_656 COL_672	30	M	05/1994	11/1994	05/1997	18
2	COL_587 COL_764	66	M	03/1992	04/1993	07/1996	30
3	COL_509 COL_780	27	M	07/1992	08/1994	21/1998	48
4	COL_457 COL_664	68	F	10/1994	01/1997	01/2000	36

Codificación de los pacientes en el estudio	Códigos de las cepas	Edad del Diagnóstico (años)	Sexo	Poliquimio Terapia		Fecha de la recaída	Meses entre la finalización del tratamiento y la recurrencia de los síntomas
				Inicio	Terminación		
5	COL_199 COL_767	70	M	04/1992	05/1993	02/2002	104
6	COL_232 COL_598	42	M	10/1996	11/1998	05/2002	44
7	COL_600 COL_662	34	F	03/1994	04/1996	12/1996	9
8	COL_317 COL_667	27	M	04/1994	06/1996	09/2001	57
9	COL_122 COL_187	63	M	09/2003	10/2004	10/2004	1
10	COL_661 COL_507	32	M	03/1994	04/1996	09/1998	29
11	COL_524 COL_193	44	M	01/1998	02/1999	01/2002	35
12	COL_163 COL_412 COL_874	33	M	08/1990	12/1992	04/2003	96
13	COL_153 COL_432	56	F	03/2000	04/2002	02/2003	10
14	COL_452 COL_613	64	F	02/1996	06/1998	08/1999	14
15	COL_233 COL_533	41	F	08/1997	09/2000	05/2002	28
16	COL_167 COL_406	67	F	10/2000	5/2001	05/2003	25
17	COL_188 COL_459	28	F	12/1999	01/2002	09/2003	19
18	COL_488 COL_640	47	F	11/1995	12/1997	06/1999	18
19	COL_626 COL_733	39	F	06/1993	07/1994	06/1995	11
20	COL_467 COL_960	12	F	01/1987	03/1989	12/1999	160
21	COL_377 COL_611	33	M	02/1996	03/1998	06/2000	26
22	COL_547 COL_774	18	M	06/1992	7/1994	01/1997	30
23	COL_478 COL_584	36	M	06/1996	09/1998	03/1999	6
24	COL_535 COL_787	43	M	10/1992	11/1994	9/1997	34
25	COL_274 COL_275	58	M				
26	COL_18-9217 COL_18-428	43	M				
27	COL_18-2948	49	M				
28	COL_18-3026	41	M				



**Figura 1.1. Origen geográfico de los pacientes incluidos en el estudio.** Los departamentos en verde representan el departamento de nacimiento de los pacientes y en los globos con las fechas se especifican el año y lugar de residencia al momento del diagnóstico del primer evento de la enfermedad.

### 1.3.2. Extracción de ADN

Las muestras fueron extraídas con dos procesos de extracción de ADN: Las biopsias de piel embebidas en bloques de parafina se cortaron con un micróscopo Leica® y se obtuvieron seis cortes (de 4 µm de grosor) utilizando una cuchilla desechable para cada muestra. Los cortes se colocaron en tubos de 1,5 ml y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Luego se añadieron 400 µL de buffer TET 1X (Buffer Triton X-100 y buffer TE 1X) a cada muestra, la que y se hirvió por 20 minutos, hasta que fuera soluble para la eliminación de la parafina. Posteriormente, se realizó un tratamiento con 10µL de proteinasa K (10mg/mL) y se incubó en baño serológico a 65°C por 1 hora. Posteriormente se agregaron 100 µL de NaCl 5M, 400 µL de Cloroformo y se centrifugó a 12.000 xg por 15 min. Luego de la centrifugación, se separó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 600 µL de isopropanol, se incubó a -20°C por 1 hora y se centrifugó a 12.000 xg por 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 700 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 12.000 xg por 30 min a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se dejó secar el tubo completamente y posteriormente la muestra se hidrató con 50 µL buffer TE 0.1X y mantuvo a -20°C hasta su utilización [110,111].

El segundo proceso de extracción de ADN se realizó utilizando el Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En resumen, los 6 cortes obtenidos anteriormente (4  $\mu\text{m}$  de espesor) obtenido de cada una de las muestras se pusieron individualmente en un tubo eppendorf y se eliminó la parafina mediante el tratamiento con Xilol. Se centrifugó a 13.000 xg por 5 min, se removió el sobrenadante y se agregó etanol (100%) al pellet y se mezcló por vortex. Las muestras se centrifugaron a 13.000 xg por 5 min, una vez desechado el sobrenadante, se incubaron a 50°C por 30 min (para evaporar etanol residual).

A cada pellet se le añadió buffer ALT y Proteinasa K [10 mg/mL] y se incubó a 56°C toda la noche y posteriormente a 90°C por 1 hora. Una vez finalizado los tiempos de incubación se agregó RNase [10 mg/mL] (Thermo Fisher Scientific), se incubó 2 min a temperatura ambiente, se agregó el buffer AL y se adicionó etanol al 100%, mezclando nuevamente por vortex. El lisado se transfirió a la columna (QIAamp MinElute colum) y se centrifugó a 8000 xg x 1 min. A continuación, a la columna se le agregó el buffer AW1, seguido del buffer AW2 (con pasos de centrifugación a 8000 xg x 1 min, respectivamente). La columna se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se le añadieron 50  $\mu\text{L}$  de buffer ATE se incubo por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugo a 13.000 xg por 1 min, el ADN se re-suspendió en 50  $\mu\text{L}$ .

La cuantificación del ADN se realizó después de cada paso crítico (la extracción del ADN y la preparación de la librería) (Anexo A). Por otra parte, la integridad del ADN se evaluó en el sistema Agilent TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Al contar con un tamaño de ADN promedio menor a 200 pb no se realizó la fragmentación del ADN. Por otra parte, para evitar pérdidas de ADN, tampoco se realizó la selección de las librerías por tamaño.

### 1.3.3. Preparación de las librerías y secuenciación

Para la preparación de las librerías de ADN utilizadas en la HTS (*High Throughput Shotgun Sequencing, sigla en ingles*) (Anexo B) las muestras se procesaron utilizando dos metodologías, obteniendo dos librerías diferentes, de acuerdo a protocolos previamente establecidos, incluyendo algunas modificaciones [112].

*Primera Librería:* las librerías tratadas con UDG (*Uracil DNA Glycosylase, sigla en ingles*) se prepararon en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  contenido: 20  $\mu\text{L}$  de ADN, 1X de NEBuffer™ 2 (New England Biolabs), dNTPs 300  $\mu\text{M}$  (cada uno), 0.005 mg/mL de BSA, 1 mM ATP, 20 U de T4 polinucleotido kinase (Thermo Fisher Scientific) y 3 U de enzima USER (Uracil-Specific Excision Reagent, New England Biolabs). La reacción fue incubada a 37°C por 3 horas. Posteriormente, se agregaron 6 U de T4 ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y la mezcla de reacción se incubó inicialmente a 25°C durante 30 min y posteriormente a 10°C durante 5 min.

*Segunda Librería:* las librerías no tratadas con UDG se prepararon en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  que contiene: 20  $\mu\text{L}$  de ADN, 1X NEBuffer™ 2 (New England Biolabs), dNTPs 300  $\mu\text{M}$  (cada uno), 0.005

mg/mL de BSA, 1 mM ATP, 20 U de T4 polinucleotido kinase (Thermo Fisher Scientific) y 1.2 U de T4 polimerasa (New England Biolabs) la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

Las dos preparaciones se continuaron separadamente mediante el siguiente procedimiento: Las genotecas se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen) usando un volumen de elución de 18  $\mu$ L. A continuación, se ligaron los adaptadores mediante reacciones enzimáticas a un volumen que de 40  $\mu$ L que contenía 18  $\mu$ L de ADN, 1X Quick Ligasa buffer (New England Biolabs), una mezcla de 2.5  $\mu$ M de adaptador (Solexa) y 0.5 U de Quick Ligasa (New England Biolabs). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Después de una nueva etapa de purificación con MinElute utilizando un volumen de elución de 20  $\mu$ L, se realizó una reacción de adapter fill-in (síntesis de cadenas complementarias) en un volumen de 40  $\mu$ L que contenía: 1X de buffer ThermoPol (Thermo Fisher Scientific), dNTP 125  $\mu$ M y 16U de BSM DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 20 min y luego a 80°C durante 20 min.

Para las librerías tratadas con UDG, las PCR de indexación se realizaron en un volumen de 50  $\mu$ L que contenía: 20  $\mu$ L de plantilla de ADN, 1X de buffer Pfu (Thermo Fisher Scientific), 1.25U Pfu Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 0.3  $\mu$ M de oligonucleótido P5 y 0.3  $\mu$ M de oligonucleótido P7 y dNTP 125  $\mu$ M. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 min, 10 ciclos de 95°C x 30 seg, 58°C x 30 seg y 72°C x 1 min y un paso final de 72°C por 10 min.

Ambas librerías de ADN indexadas se purificaron nuevamente con el kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las que se eluyeron en 50  $\mu$ L de buffer de elución.

Se realizó una segunda etapa de amplificación para las librerías indexadas en una reacción de PCU a un volumen final de 50  $\mu$ L que contenía: 5  $\mu$ L de plantilla de librería indexada, 1.25U de ADN polimerasa AccuPrime Pfx (Thermo Fisher Scientific), 1X de mezcla de reacción AccuPrime Pfx (Thermo Fisher Scientific) y 0.3  $\mu$ M de los oligonucleótidos IS5 (Cebadores 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3') e IS6 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3'), que se unen a los adaptadores de las librerías indexadas. Los productos amplificados se purificaron con el Kit de purificación de MinElute (Qiagen) (volumen de elución 53 $\mu$ L) y se cuantificaron usando el chip Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 1000. La secuenciación se llevó a cabo en las plataformas Illumina HiSeq 2500 (2  $\times$  125 bp) y HiSeq 4000 (2  $\times$  75 bp) en el Instituto de Biología Molecular Clínica de la Universidad de Kiel, utilizando la química HiSeq v4 y el protocolo del fabricante para secuencia múltiple.

#### **1.3.4. Procesamiento de las secuencias**

Se generaron múltiples conjuntos de datos HTS para las 56 secuencias de las muestras de biopsias de piel; estos datos se pre-procesaron de acuerdo con el protocolos publicados para ADN antiguo [113]. Las secuencias se alinearon con el genoma de referencia de *M. leprae* TN (AL450380.1) aplicando algoritmos establecidos. El post-procesamiento incluyó la identificación de la variación

genómica, la predicción del efecto de los SNPs y el ensamblaje de *novo* de los genomas de *M. leprae* obtenidos. A continuación, se muestra una descripción detallada de cada paso (Figura 1.2.).

*Pre-procesamiento de genomas:* Los datos producidos para todas las muestras contenían lecturas combinadas con un número variable de nucleótidos superpuestos, así como las secuencias de los adaptadores de las librerías. Se utilizó ClipAndMerge v1.7.3., un módulo de la programación de EAGER [113], para recortar las secuencias de los adaptadores, se fusionaron las lecturas correspondientes a los extremos emparejados en regiones superpuestas y se recortaron las lecturas resultantes. Estos pasos se explican en detalle a continuación:

La metodología ClipAndMerge utilizó una alineación superpuesta de los adaptadores y los corta, las lecturas que tenían menos de 25 nucleótidos después de la eliminación de los adaptadores o que solo contenían secuencias adaptadoras (atenuadores del adaptador) se eliminaron. Todas las lecturas restantes con una superposición mínima de 10 nucleótidos y con un máximo de 5% de desajustes en la región de superposición. El algoritmo selecciona la máxima superposición que cumple con estos criterios. La secuencia consenso se generó utilizando los nucleótidos superpuestos en las regiones de la lectura con la puntuación de calidad PHRED más alta, maximizando la calidad de la lectura obtenida. En un paso final, ClipAndMerge realizó un corte de calidad de cada lectura y todos los nucleótidos en el extremo 3' con puntuaciones PHRED menores de 20. Finalmente, se eliminaron todas las lecturas con menos de 25 nucleótidos después de la evaluación de calidad.

*Mapeo de las lecturas:* Las lecturas resultantes se usaron para realizar la alineación contra el genoma de referencia TN de *M. leprae* (AL450380.1) con BWA (Bowtie2 v2.4.2) [114]. En este paso, todas las lecturas se trataron como lecturas de extremo único y el mapeo se realizó utilizando el modo de alineación semi-global y los parámetros predeterminados. Todos los archivos BAM finales específicos de cada individuo se concatenaron usando el algoritmo MergeSamFiles de picard tools v1.139 (<http://broadinstitute.github.io/picard>) y se indexaron usando SAMtools. Se utilizó DeDup v0.9.9, parte del pipeline EAGER [113], para identificar y eliminar las lecturas duplicadas en archivos BAM específicos. Para autenticar el conjunto de datos, se evaluó la presencia de signos de daño en el ADN usando mapDamage v2.0.6 [115].

*Genotipificación:* Se identificó la variación genómica con Genome Analysis Toolkit (GATK) [116] v3.6. Inicialmente se realizó una realineación local de los archivos BAM específicos de cada cepa con los módulos RealignerTargetCreator y el IndelRealigner de GATK [116]. Posteriormente, se aplicó el módulo UnifiedGenotyper para llamar las bases de referencia y las variantes de la alineación. Para anotar el efecto estimado de la variación genómica identificada, se aplicó el software SnpEff v4.2. [117]



Figura 1.2. Diagrama de flujo del proceso utilizado para el procesamiento de las secuencias. La programación consiste en tres componentes principales para el proceso y análisis de los datos de la NGS: preprocesamiento, mapeo y genotipificación. Modificado y adaptado al español de Peltzer (2016) [113].

### 1.3.5. Análisis de las secuencias

Se generaron múltiples conjuntos de datos de HTS para las 56 muestras de pacientes con sospecha de recaída. Estos conjuntos de datos se procesaron como se describió previamente. Las lecturas se alinearon con el genoma de *M. leprae* cepa TN (AL450380.1) aplicando algoritmos establecidos. El post-procesamiento incluyó la identificación de la variación genómica entre las cepas, la predicción del efecto de los SNPs, el ensamblaje de novo de los genomas bacterianos y los análisis filogenéticos. A continuación se muestra una descripción detallada de cada paso.

*Identificación de variaciones:* A partir de los archivos BAM obtenidos previamente se generaron archivos mpileup usando SAMtools [118] y se procesó usando VarScan v2.3.9 [119]. Se obtuvo un archivo VCF que contenía todos los sitios (tanto variantes como no variantes) y se utilizaron los siguientes parámetros: número de lecturas que cubren la posición = 5, número mínimo de lecturas

que cubren el alelo variante = 3, frecuencia mínima de la variante = 0.2, calidad mínima por base = 30 y la frecuencia máxima en una hebra = 90%. Los archivos VCF para todas las cepas se combinaron utilizando la herramienta CombineVariants disponible en GATK [116]. Se utilizó VCFtools [120] para eliminar inserciones, deleciones y excluir posiciones que ocurrieron en regiones repetitivas y ARNr. La herramienta SelectVariants en GATK se utilizó para generar un archivo VCF que contiene solo los SNPs. Los SNPs identificados se revisaron manualmente para detectar posibles errores e inconsistencias.

Después de la alineación y eliminación de duplicados, también se identificó la variación genómica con GATK. Primero, se realizó una realineación local de los archivos BAM de las secuencias de cada evento de cada uno de los pacientes con los módulos RealignerTargetCreator e IndelRealigner de GATK. Posteriormente, se aplicó el módulo UnifiedGenotyper para llamar las bases de referencia y las variantes en el alineamiento [116].

*Efecto de las mutaciones:* Para anotar el efecto estimado de la variación genómica identificada, se aplicó el Software SnpEff [117]. Las anotaciones se completaron manualmente con información con información sobre el tipo de transcripción, la función disponibles en las bases de datos en NCBI y la categoría funcional en la clasificación EggNOG [121]. Debido a la imposibilidad de crecer *M. leprae*, la mayoría de las funciones génicas predichas se basan en comparaciones con *M. tuberculosis*, por lo que numerosos genes permanecen anotados como proteínas hipotéticas cuyas funciones se desconocen.

*Ensamblaje de novo:* Lecturas de mapeo de 3 conjuntos de datos con una cobertura del 98%, que cubrieron completamente el genoma de *M. leprae* TN (AL450380.1) al menos 10-fold, se ensamblaron *de novo* utilizando el programa SPAdes v3.14.1 [122].

### 1.3.6. Análisis de los datos

El alineamiento de SNPs se analizaron utilizando BEAST v1.10.4 [123]. Las fechas de radiocarbono se calibraron en años antes del presente (Siendo el presente considerado como 2018). Se utilizó un modelo de strict clock con una tasa uniforme en todas las ramas y un modelo de árbol de tamaño de población constante. Para tener en cuenta el sesgo de verificación que podría resultar de usar solo sitios variables en el alineamiento, se incluyeron en el análisis el número de sitios invariantes (número de As, Cs, Ts y Gs constantes). Se llevó a cabo un análisis de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) con 30.000.000 de interacciones, mostrando cada 10.000 pasos. Las primeras 3.000.000 de interacciones se descartaron. Se utilizó Tracer [124] para visualizar los resultados del análisis MCMC. TreeAnnotator [123] se utilizó para resumir la información de los árboles generados en un solo árbol calculado por BEAST. Se usó FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) para visualizar el árbol de máxima credibilidad de clados (MCC).

Para determinar los tiempos de divergencia de las cepas colombianas de *M. leprae* y su relación con cepas de otras partes del mundo, se generó un alineamiento de los SNPs encontrados. Lo que

resultó en un alineamiento que comprende 3339 sitios. Para evaluar si había una señal temporal suficiente en los datos para realizar un análisis de reloj molecular, se realizó una regresión de la distancia genética de la raíz del árbol de punta fechada (donde las secuencias se han recopilado en diferentes fechas) de las cepas de *M. leprae* con TempEst [125].

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando los métodos Neighbor-Joining (NJ) y Maximum Parsimony (MP) en MEGAX [126] y un enfoque bayesiano en BEAST v1.10.4 [123]. La alineación de los SNPs de todos los genomas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* comprendía 3339 sitios y se utilizaron como entrada para MEGAX. El árbol de NJ se generó utilizando el método de distancia P. Este método se utilizó porque el alineamiento no contenía sitios invariables y los genomas de *M. leprae* obtenidos no eran muy divergentes. El soporte Bootstrap se generó a partir de 500 réplicas. El árbol de MP se generó utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) y 500 replicas de bootstrap.

## 1.4. Resultados

### 1.4.1. Características clínicas, epidemiológicas y demográficas

Para el desarrollo de este estudio se partió de un grupo de biopsias obtenidas en un estudio previo desarrollado en el CDFLLA [86]. Las biopsias provenientes del banco biológico de la línea de Hansen fueron tomadas entre los años 1990 y 2018, durante el procedimiento de diagnóstico y seguimiento post-PQT de los pacientes con Lepra.

Los pacientes provinieron de 9 departamentos: Bolívar (1 municipio), Boyaca (4 municipios), Caqueta (1 municipio), Cundinamarca (6 municipios), Huila (1 municipio), Meta (1 municipio), Norte de Santander (1 municipio) y Santander (4 municipios) (Figura 1.1). Los pacientes incluidos en este estudio fueron tratados con esquemas que incluyeron entre 12 y 24 dosis de Monoterapia o PQT. La clasificación clínica de los pacientes incluidos en el estudio se dio por la clasificación de la OMS y la de Ridley-Jopling así: 21 casos Multibacilares (LL=14, BL=4 y BB=3) y 4 casos Paucibacilares (LT=1, BT=2 y LI=1).

### 1.4.2. Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas

En la tabla 1.2. se muestran la cobertura y calidad obtenida en las muestras secuenciadas para la tipificación genómica y análisis genómica comparativa. La identificación de los SNPs se realizó utilizando SNPcalling – SAMtools. Para evitar SNPs falsos positivos, se aplicaron los siguientes puntos de corte: cobertura total mínima de 5 lecturas no duplicadas, mínimo 3 lecturas no duplicadas que garantizan el SNP, puntuación de la calidad del mapeo > 8, puntuación de calidad de la base > 15 y una frecuencia del SNP por encima 5 (Figura 1.3.). En la tabla 1.2 se muestra los detalles de los SNPs analizados por muestra, donde se indica la profundidad obtenida durante el proceso de secuenciación y así se garantizó que se cumplen los criterios de calidad establecidos previamente. Para evitar señales SNP falso positivos, se aplicaron los siguientes puntos de corte: cobertura total mínima de cinco lecturas no duplicadas, mínimo de tres lecturas no duplicadas que

admiten el SNP, puntuación de calidad de mapeo > 8, puntuación de calidad de base > 15 y una frecuencia de SNP por encima del 80%.

**Tabla 1.2. Resultados de la secuenciación total del genoma de las cepas colombianas de *M. leprae***

Paciente	Codigo cepa	Lecturas mapeadas	Control de calidad	% de cubrimiento del genoma
1-1997	COL_545	827.424	0,96	95,6
1-1995	COL_656	972.620	0,96	99,5
1-1994	COL_672	738.276	0,97	97,9
2-1996	COL_587	594.361	0,95	96,9
2-1992	COL_764	717.479	0,97	97,0
3-1998	COL_509	654.987	0,95	94,3
3-1992	COL_780	658.434	0,97	99,4
4-1999	COL_457	547.825	0,95	39,6
4-1994	COL_664	508.862	0,95	29,3
5-2002	COL_199	1.833.225	0,91	97,6
5-1992	COL_767	3.704.489	0,91	96,7
6-2002	COL_232	2.688.744	0,95	24,5
6-1996	COL_598	5.522.755	0,97	33,2
7-1996	COL_600	1.620.060	0,97	93,7
7-1994	COL_662	1.650.930	0,97	97,6
8-2001	COL_317	6.048.227	0,99	28,5
8-1994	COL_667	197.062	0,61	11,5
9-2004	COL_122	5.470.772	0,91	4,4
9-2003	COL_187	4.086.899	0,99	23,1
10-1998	COL_507	669.303	0,96	24,8
10-1994	COL_661	694.502	0,95	3,1
11-2002	COL_193	7.134.456	0,91	15,6
11-1998	COL_524	6.189.579	0,89	29,0
12-2003	COL_163	232.51.682	0,97	100,0
12-2000	COL_412	9.446.539	0,94	97,8
12-1990	COL_874	6.578.347	0,95	97,0
13-2003	COL_153	6.060.112	0,96	25,5
13-2000	COL_432	458.632	0,95	16,6
14-1999	COL_452	5.544.751	0,96	56,2
14-1996	COL_613	626.4351	0,95	81,2
15-2002	COL_233	6.630.867	0,96	40,4
15-1997	COL_533	926.919	0,95	21,8
16-2003	COL_167	880.513	0,96	17,5
16-2000	COL_406	700.752	0,95	7,2
17-2003	COL_188	537.195	0,94	23,4
17-1999	COL_459	5.606.872	0,98	5,8

Paciente	Codigo cepa	Lecturas mapeadas	Control de calidad	% de cubrimiento del genoma
18-1999	COL_488	1.040.151	0,93	18,7
18-1995	COL_640	125.616	0,94	12,2
19-1995	COL_626	7.196.848	0,98	22,2
19-1993	COL_733	6.404.738	0,81	46,4
20-1999	COL_467	4.584.080	0,69	13,5
20-1987	COL_960	3.317.376	0,80	17,2
21-2000	COL_377	921.362	0,49	20,3
21-1996	COL_611	745.955	0,79	10,6
22-1997	COL_547	4.140.708	0,98	5,5
22-1992	COL_774	5.161.607	0,95	81,0
23-1999	COL_478	3.940.919	0,93	4,9
23-1996	COL_584	4.533.705	0,91	6,4
24-1997	COL_535	384.977	0,98	2,9
24-1992	COL_787	5.488.768	0,79	15,8
25-2002 <sup>a</sup>	COL_274	5.359.627	0,96	91,9
25-2002B	COL_275	4.926.009	0,97	98,4
18-2191	17082005	25.394.276	0,97	12,5
18-9217	14279217	921.613	0,41	23,5
18-428	14279217	1.469.557	0,79	12,4
18-2948	17221022	22.739.546	0,96	100,0
18-3026	79768135	24.272.033	0,96	96,7

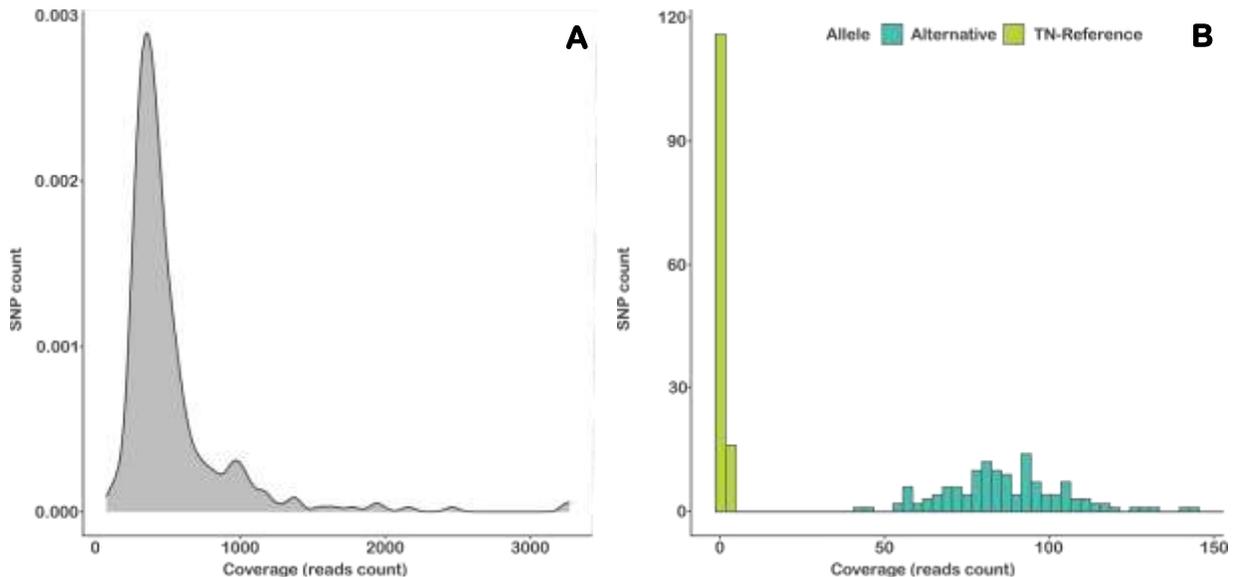


Figura 1.3. Cobertura de los SNPs identificados en las cepas de colombianas de *M. leprae* analizadas. A. Distribución de la cantidad de SNPs identificados Vs la cobertura de cada SNP y B. Histograma del numero de SNPs identificados en cada cepa comparado con la cepa de *M. leprae* TN (AL450380.1).

### 1.4.3. Clasificación de casos de recaída o reinfección

Una vez se realizaron los análisis de calidad de las secuencias obtenidas durante el proceso de secuenciación total y se obtuvo suficiente cobertura del genoma, se compararon los SNPs y las InDel entre los episodios inicial, secundario y/o terciario para cada caso recurrente. Se establecieron conjuntos únicos de SNPs para cada uno de los genomas y se compararon con la lista de SNPs de 42 genomas de *M. leprae* previamente publicados (Anexo E). Todas las variantes únicas y/o discriminatorias se visualizaron manualmente utilizando el navegador IGV para verificar posibles inconsistencias en el alineamiento [127].

Para establecer una recaída se deben cumplir los siguientes criterios: i) 0-4 SNPs de diferencia entre las cepas, ii) presencia de mutaciones en genes, pseudogenes que puedan ser rastreadas en cada una de las muestras y iii) en caso de mostrar SNPs que no han sido previamente reportados estos deben estar en cada una de las cepas [99,128,129].

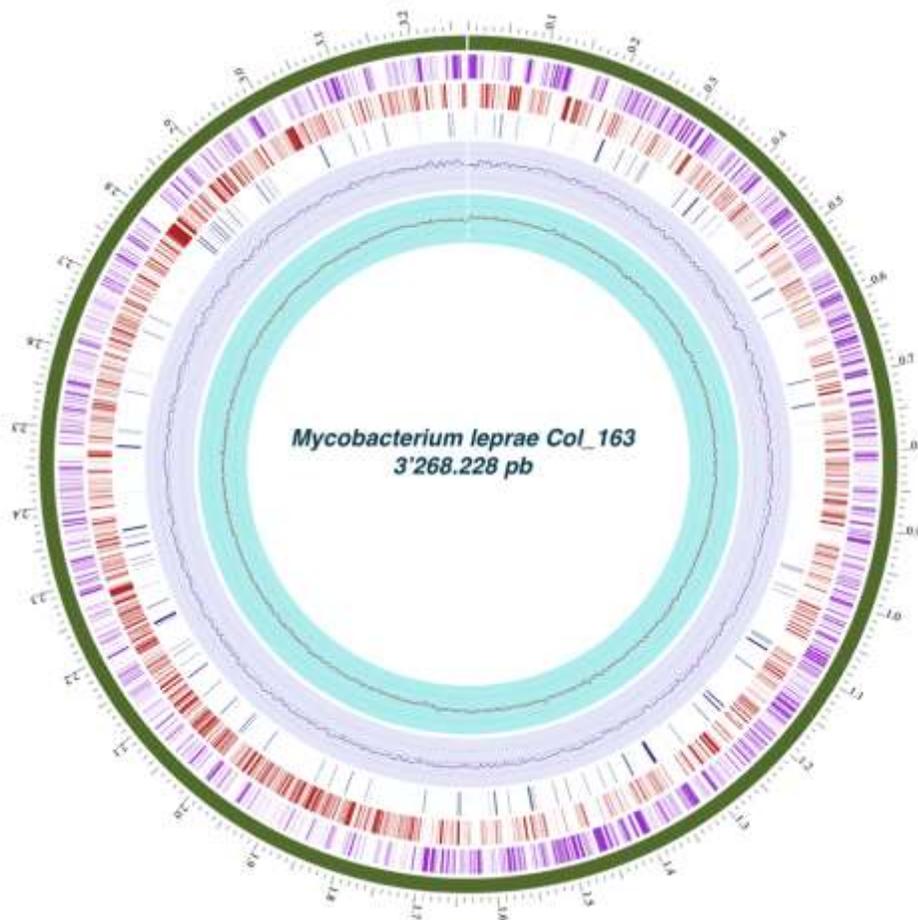
La definición de reinfección se basó en la identificación de: i)  $\geq 5$  SNPs diferentes, ii) cepas en diferentes genotipos y/o linajes y iii) identificación de SNPs únicos que no se encuentren en el evento anterior o posterior [99,128,129]. De acuerdo al análisis de calidad de las secuencias (Tabla 1.3.), se analizaron 6 casos de eventos recurrentes y un caso de un paciente con dos toma de muestra el mismo año.

**Tabla 1.3. Resumen del análisis de la secuenciación total del genoma entre las cepas de *M. leprae* analizadas en la primera, segunda e incluso tercera aparición de la enfermedad.**

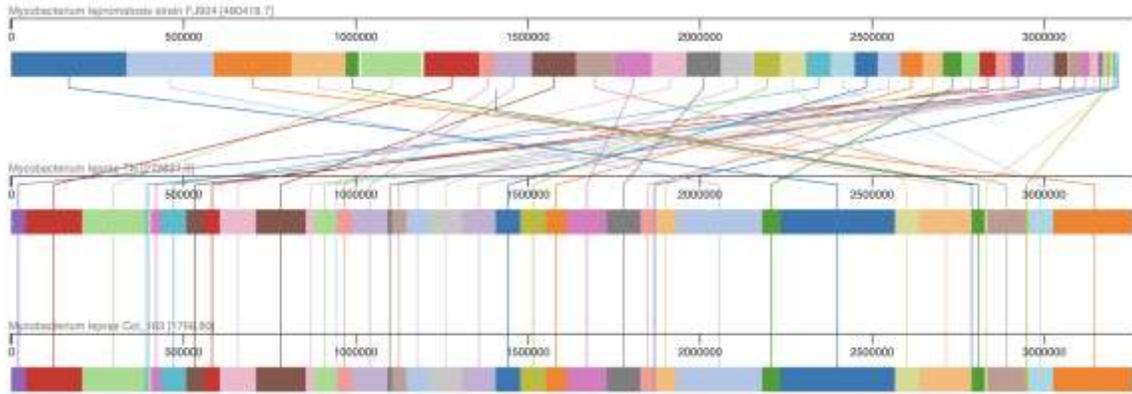
Paciente	Cod Cepa	Total SNPs	Genotipo	SNPs característicos y/o Únicos	Definición de caso
1	Col_672	79	3I	G1634769A (Pseudogen ML1801)	Recaída
	Col_656	82	3I		
	Col_545	78	3I		
2	Col_764	85	3I	G1358191T (Pseudogen ML1161c)	Recaída
	Col_587	89	3I		
3	Col_780	96	3I	G3165254A (Pseudogen ML2645c)	Recaída
	Col_509	96	3I		
5	Col_767	112	3I	T2449775C (ML2061)	Recaída
	Col_199	113	3I		
7	Col_662	106	3I		Recaída
	Col_600	105	3I		
12	Col_874	102	3I	A1552530G T1552533G	Reinfección
	Col_412	134	3I		
	Col_163	135	3I		
25	Col_274	118	3I		Nuevo
	Col_275	118	3I		

#### 1.4.4. Descripción del genoma de una cepa colombiana de *M. leprae* causante de reinfección

El análisis del ensamblaje del genoma de la cepa de *M. leprae* COL\_163 causante de un evento de reinfección de lepra y proveniente de un paciente nacido en Suaita (Santander), Colombia, obtenida de una muestra de biopsia de piel embebida en parafina en el 2003 y el tercer evento de la enfermedad. Este genoma presentó una cobertura del 99% de la secuencia, con una identidad nucleotídica mayor al >99% comparada con el genoma de *M. leprae* TN (AL450380.1), un tamaño de 3'268.228 pb y un 57.8% de GC (Figura 1.4.). En el Anexo E se muestra el alineamiento múltiple de las cepas de *M. leprae* COL\_163, TN y *M. lepromatosis* (Figura 1.5.) con el fin de observar las regiones conservadas en los genomas analizados. En el alineamiento de los genomas de las cepas COL\_163 y la cepa TN mostró que difieren en 135 sitios polimórficos (SNPs) y de estas 4 son únicas para esta cepa. En la tabla 1.4. se muestra un resumen del análisis del efecto de los SNPs en el genoma de Col\_163.



**Figura 1.4. Mapa circular del genoma de *Mycobacterium leprae* COL\_163.** Desde el exterior: Círculo 1 genoma circular y tamaño del mismo, círculos 2 y 3 (en sentido horario y antihorario) genes codificantes en las cadenas — y +, respectivamente; círculo 4 funciones no CDS; círculo 5 contenido GC y círculo 6 sesgo de G/C (G + C) / (G-C).



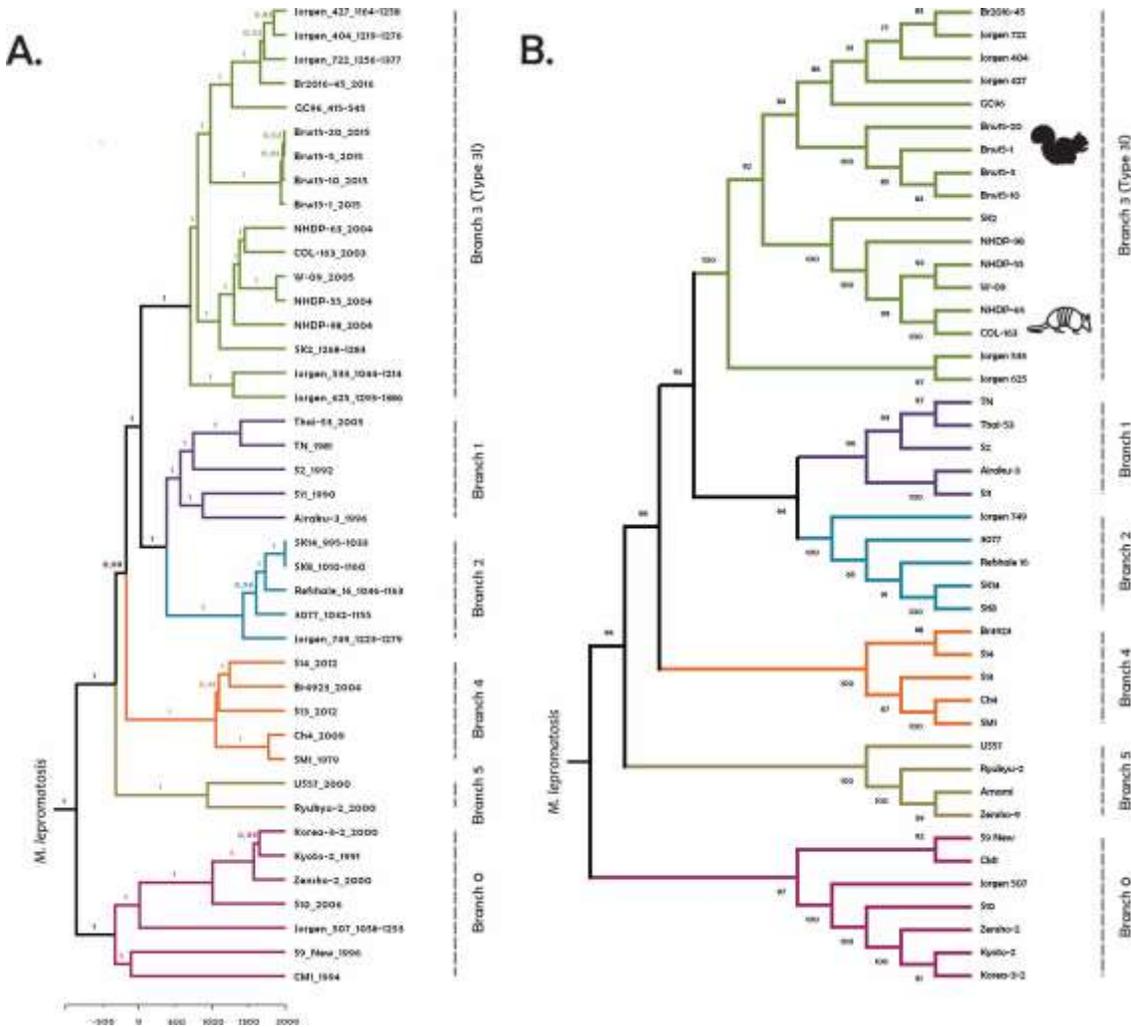
**Figura 1.5. Alineamiento múltiple de los genomas de las cepas de *Mycobacterium leprae* TN, COL\_163 y *M. lepromatosis*** Se realizó el alineamiento por el método de progressiveMauve [130] y se grafico a través del programa PATRIC website. Las líneas rectas en cada uno de los contigs confirma la identidad estructural y las líneas diagonales la variación estructural entre los genomas de *M. leprae* y *M. lepromatosis*.

**Tabla 1.4. Resumen del análisis del efecto de los SNPs en la cepa colombiana de *M. leprae* Col\_163**

Tipo de variante	Col_163	Únicas para esta cepa
Variaciones sin sentido en genes codificantes de proteínas	41	2
Variaciones sinónimas en genes codificantes de proteínas	30	0
Variante en pseudogenes	27	1
Variante en regiones intergénicas	37	1
<b>Total</b>	<b>135</b>	<b>4</b>

**1.4.4.1. Relación filogenética de la cepa colombiana de *Mycobacterium leprae* COL\_163 con otros genomas de *M. leprae***

A partir del análisis bayesiano y de máxima parsimonia (Figura 1.6.), se observó que la cepa de *M. leprae* Col\_163 tiene como parientes cercanos cepas de *M. leprae* cuyo origen es la Europa Medieval. Uno de estos (SK2) se aisló a partir de restos óseos de una victima de lepra en el periodo 818-1240 D.C. en Winchester (Reino Unido) [43]. La cepa colombiana además tiene una estrecha relación con cepas provenientes de Estados Unidos especialmente con la cepa NHDP-63, la cual se ha encontrado en armadillos de nueve bandas [45]. El genotipo 3I se ha descrito en muestras humanas de Inglaterra, Alemania, Dinamarca [43,47] y las Américas [26] y es capaz de infectar al menos tres hospederos diferentes: humanos, ardillas rojas y armadillos [10,38,45].



**Figura 1.6. Análisis filogenético de cepas antiguas y modernas de *M. leprae* y su relación con la cepa colombiana.** A) Árbol filogenético bayesiano basado en 3339 SNPs calculadas con BEASTdoc [123], se muestran los nodos principales. Las etiquetas de cada punta muestran el nombre de la muestra y la fecha de aislamiento, o las fechas de radiocarbono. Las ramas principales están codificadas por colores. B) Árbol de máxima parsimonia reconstruido a partir de 3339 SNPs informativos y fue obtenido usando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR). El árbol está dibujado a escala y se utilizó *M. lepromatosis* como cepa fuera de la especie. Las ramas principales están codificadas por colores y los símbolos de animales indican cepas aisladas en ardillas y armadillos. Los valores de Bootstrap (500 replicas) se muestra junto a cada nodo; estos análisis se realizaron en MEGAX [126].

Según el árbol MCC (Figura 1.6.A), la cepa Col\_163 divergió 1.200 YBP (*Years Before Present, sigla en inglés*) (con el presente considerado para este análisis 2015) con un rango de densidad posterior más alto (HDP) del 95% de 965-1.399 YBP. El sublinaje o subtipo que comprende esta cepa compartió por última vez un ancestro común con las cepas de *M. leprae* humano Jorgen 533 y Jorgen 625 de 1.834 YBP (HPD 95% 1.476-2.259 YBP). Por último, se estimó que el ancestro común más reciente (MRCA) de todas las cepas de *M. leprae* existía 3.500 YBP.

### 1.4.4.2. Sustituciones sinónimas y no sinónimas

Cuando se compararon los genomas de las cepas de TN y Col\_163, se encontró que de los 82 SNPs en regiones codificantes 44 (54%) fueron cambios no sinónimos y 38 (46%) cambios sinónimos (Anexo E). Las mutaciones no sinónimas identificadas se encuentran distribuidas en el perfil funcional EggNOG así: el 9,3% en Replicación, recombinación y reparación, 5,3% en la función de transcripción entre otros (Figura 1.7).

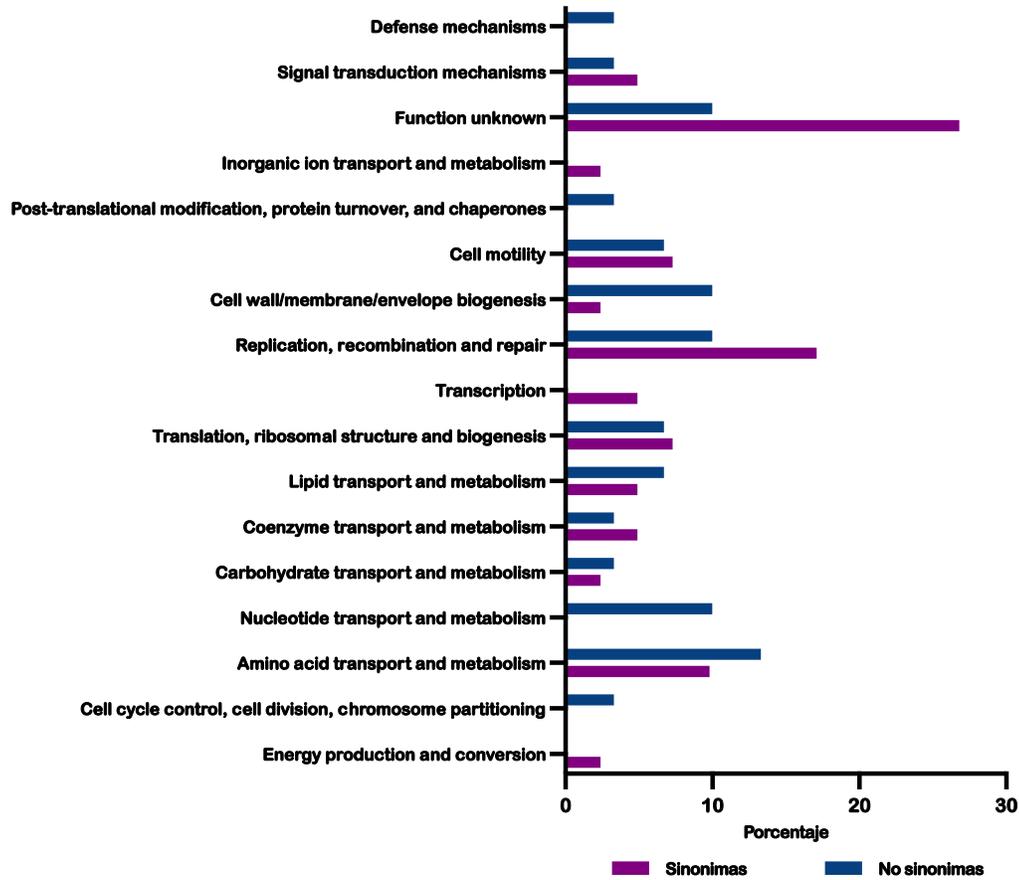


Figura 1.7. Distribución de las mutaciones en CDS en *Mycobacterium leprae* Col\_163 por las categorías funcionales de EggNOG

A continuación, se realizó la red de interacción (incluida la asociación predicha) entre los 39 genes que mostraron mutaciones sinónimas y no sinónimas en Col\_163, utilizando la base de datos en la plataforma de análisis STRING y se analizó mas profundamente la estructura de la topología de la red de interacción predicha utilizando el Software Cytoscape V.3.8.1. Se identificaron 16 genes en el centro de la interacción, la mayoría relacionados con las funciones moleculares de replicación, transcripción y transcripción del ADN; los genes en este grupo son: *dnaA* (proteína de inicio de la replicación), *gryA* (ADN girasa subunidad A), *recG* (ADN helicasa), *metG* (metionina ARN-t ligasa) *rho* (facturación de terminación de la transcripción), entre otros.

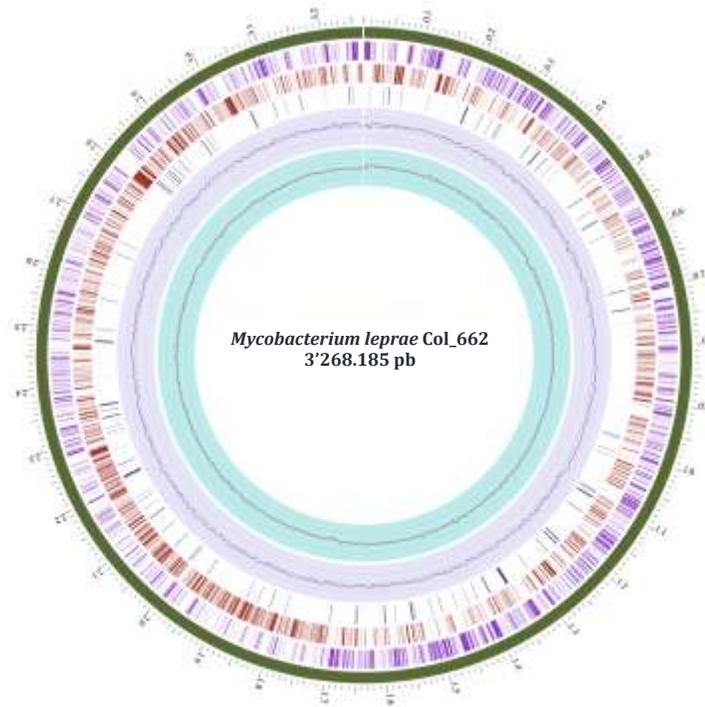
El genoma de *M. leprae* Col\_163 mostró mutaciones no sinónimas en un conjunto de sistemas de secreción denominados ESX [131], los cuales permiten el transporte de sustratos específicos a través de la compleja y gruesa envoltura celular de las micobacterias y se conocen más generalmente como sistemas de secreción tipo VII [132]. Estos sistemas se caracterizan por la presencia de genes que codifican pequeñas proteínas de 100 aminoácidos que tienen un motivo Trp-X-Gly (WXG) conservado y genes que codifican proteínas transmembranales tipo ATPasa (EccE), las cuales median la exportación dependiente de ATP de sustratos de ESX a través de la membrana externa [133]. A parte de estas características centrales, los sistemas ESX son bastante diversos, sugiriendo que han sido moldeados por procesos evolutivos que ha involucrado la duplicación y diversificación de genes [33]. En *M. tuberculosis* se ha demostrado que ESX-1 tiene un papel esencial para la resistencia y la evasión de la respuesta del huésped y ESX-3 se ha descrito como un sistema de secreción que participa en la adquisición de hierro mediada por micobactina [134].

#### 1.4.5. Descripción del genoma de una cepa colombiana de *M. leprae* causante de recaída

El análisis del ensamblaje de una cepa colombiana de *M. leprae* Col\_662, proveniente de un paciente, nacido en el municipio de Guadalupe (Santander), diagnosticado con lepra MB (LL) en 1996 y tratado con 24 dosis de PQT el cual presentó un evento recurrente de la enfermedad después de 9 meses de finalizado el tratamiento. El alineamiento de esta cepa con el genoma de referencia mostró que esta cepa difiere con la cepa de referencia en 106 SNPs (Figura 1.8). En la tabla 1.5. se muestra un resumen del análisis del efecto de los SNPs en este genoma; al comparar los SNPs presentes en esta cepa con otras previamente secuenciadas no presentó mutaciones únicas.

**Tabla 1.5. Resumen del análisis del efecto de los SNPs en la cepa colombiana de *M. leprae* Col\_622**

Tipo de variante	Col_662
Variaciones sin sentido en genes codificantes de proteínas	32
Variaciones sinónimas en genes codificantes de proteínas	25
Variante en pseudogenes	24
Variante en regiones intergénicas	25
<b>Total</b>	<b>106</b>



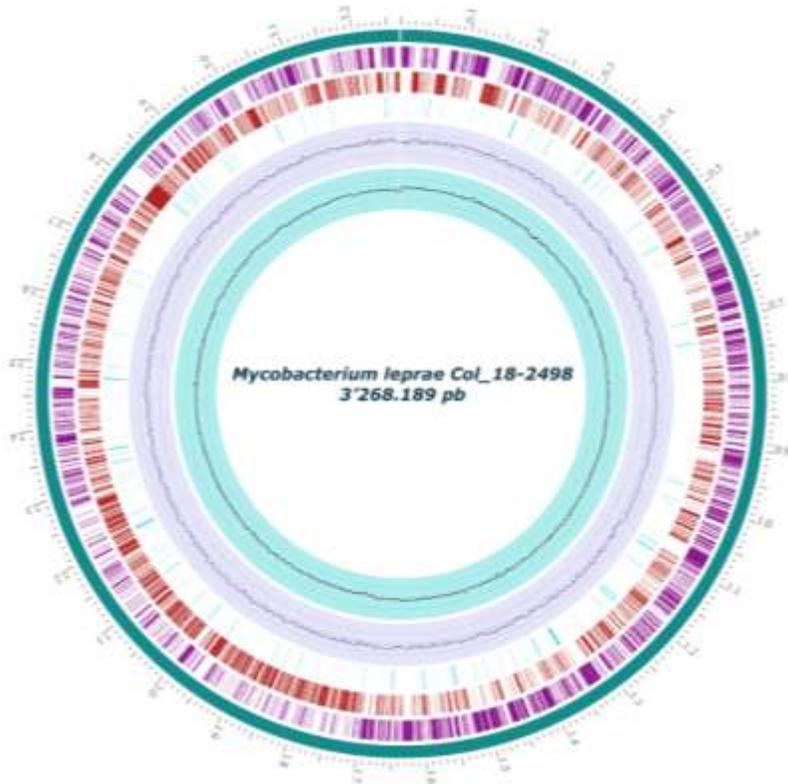
**Figura 1.8. Mapa circular del genoma de *Mycobacterium leprae* COL\_662.** Desde el exterior: Circulo 1 genoma circular y tamaño del mismo, círculos 2 y 3 (en sentido horario y antihorario) genes codificantes en las cadenas — y +, respectivamente; círculo 4 funciones no CDS; círculo 5 contenido GC y círculo 6 sesgo de G/C (G + C) / (G-C).

### 1.4.6. Descripción del genoma de cepas Colombianas de *M. leprae* no causantes de eventos recurrentes

Se realizó el análisis del ensamblaje de dos genomas de cepas de *M. leprae* Col\_18-2948 y Col\_18-3026, provenientes de pacientes nuevos, nacidos en Villavicencio (Meta) y Bogotá (Cundinamarca) Colombia. Estos genomas presentaron una cobertura del 99% de la secuencia, con una identidad nucleotídica mayor al >99% comparada con el genoma de *M. leprae* TN (AL450380.1), un tamaño de 3'268.189 pb y 3'268.209 pb respectivamente y un 57.79% de GC (Figura 1.9). El alineamiento de esta cepa con el genoma de referencia mostró que difieren en 141 y 74 sitios polimórficos (SNPs) respectivamente. En la tabla 1.6. se muestra un resumen del análisis del efecto de los SNPs en los genomas.

**Tabla 1.6. Resumen del análisis del efecto de los SNPs en las cepas colombianas de *M. leprae* COL\_18-2948 y COL\_18-3026**

Tipo de variante	Col_18-2948	Col_18-3026
Variaciones sin sentido en genes codificantes de proteínas	33	26
Variaciones sinónimas en genes codificantes de proteínas	25	21
Variante en pseudogenes	24	18
Variante en regiones intergénicas	30	24
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>89</b>



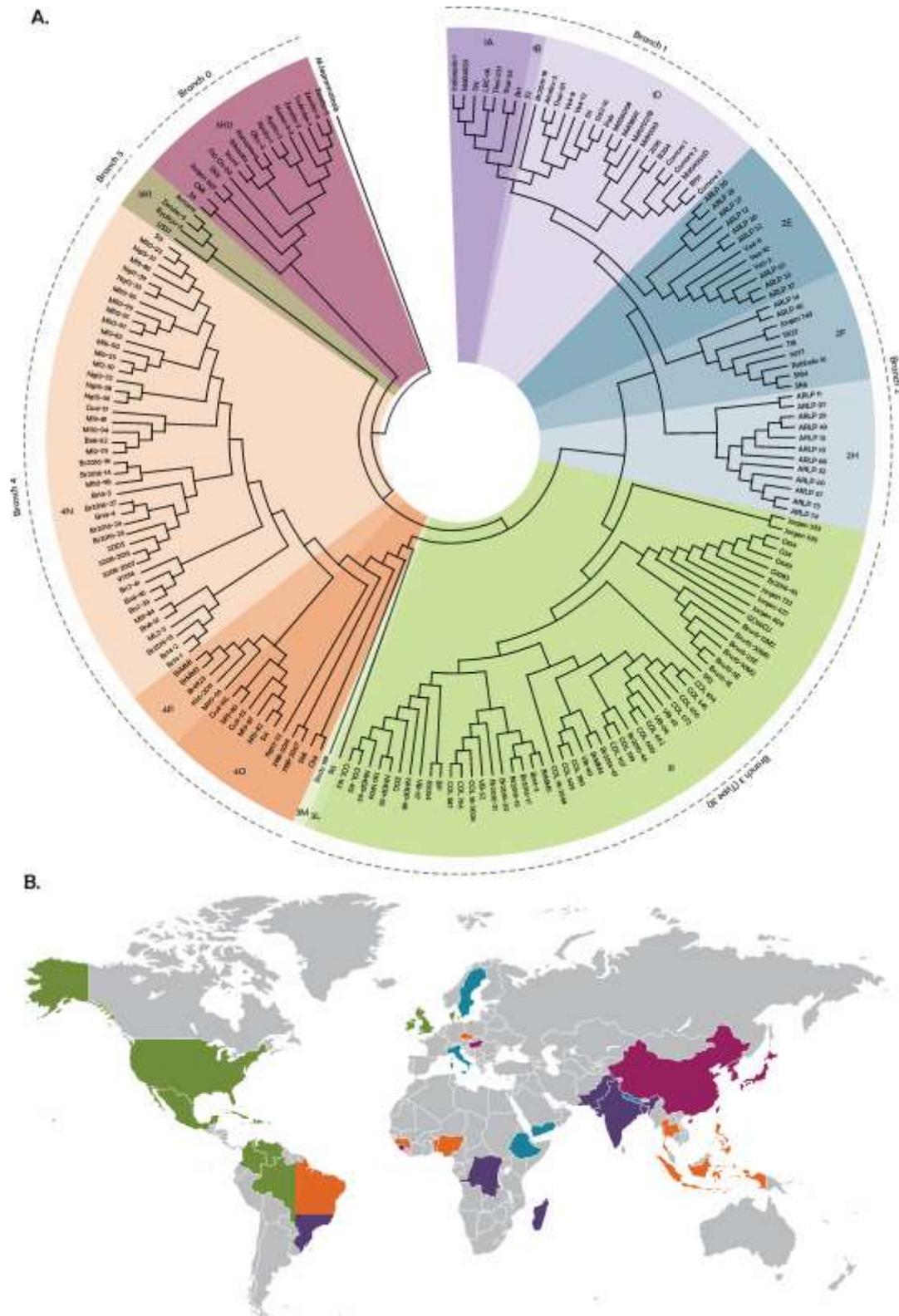
**Figura 1.9. Mapa circular del genoma de *Mycobacterium leprae* COL\_18-2498.** Desde el exterior: Circulo 1 genoma circular y tamaño del mismo, círculos 2 y 3 (en sentido horario y antihorario) genes codificantes en las cadenas — y +, respectivamente; círculo 4 funciones no CDS; círculo 5 contenido GC y círculo 6 sesgo de G/C (G + C) / (G-C).

#### 1.4.7. Análisis filogenético de aislamientos colombianos de *M. leprae*

Reconstruimos la filogenia de los genomas colombianos secuenciados con genomas previamente secuenciados (Anexo E). En la figura 8 se muestra el análisis filogeográfico de 188 cepas, su genotipo y la distribución geográfica de estos genotipos en el mundo.

El análisis de estos genomas mostró que las cepas colombianas pertenecen filogenéticamente al Branch 3 (Subtipo 3I) (Figura 1.10). Este subtipo está conformado por cepas antiguas provenientes del medioevo las cuales fueron traídas a las Américas durante la colonización. Este Branch está conformado además por cepas provenientes de Brasil, Estados Unidos, México, Reino Unido, Dinamarca, Venezuela, Isla Martinica y Colombia y se han descrito en tres hospederos diferentes: humanos, ardillas de cola roja y armadillo [10,38,45].

Las cepas colombianas de *M. leprae* tienen como pariente cercano la cepa de *M. leprae* SK originaria de la Europa Medieval y se aisló a partir de restos óseos de una víctima de lepra en el periodo 818-1240 en Winchester (Reino Unido) [43]. Estas cepas colombianas tienen una estrecha relación con cepas modernas provenientes de Venezuela y Brasil (Figura 1.11.) [26,38].



**Figura 1.10. Filogeografía de cepas de *M. leprae*.** (A) Árbol de máxima parsimonia de 188 genomas de *M. leprae* que representan 8 branch y 14 subtipos. Los valores de soporte se obtuvieron o bootstrap (1000 repeticiones). Las longitudes de las branch son proporcionales a las sustituciones de nucleótidos.

Estos análisis se realizaron en MEGAX [126]. El árbol de enraíza mediante *M. lepromatosis*. (B) la distribución global de los genotipos están coloreados como en la parte A

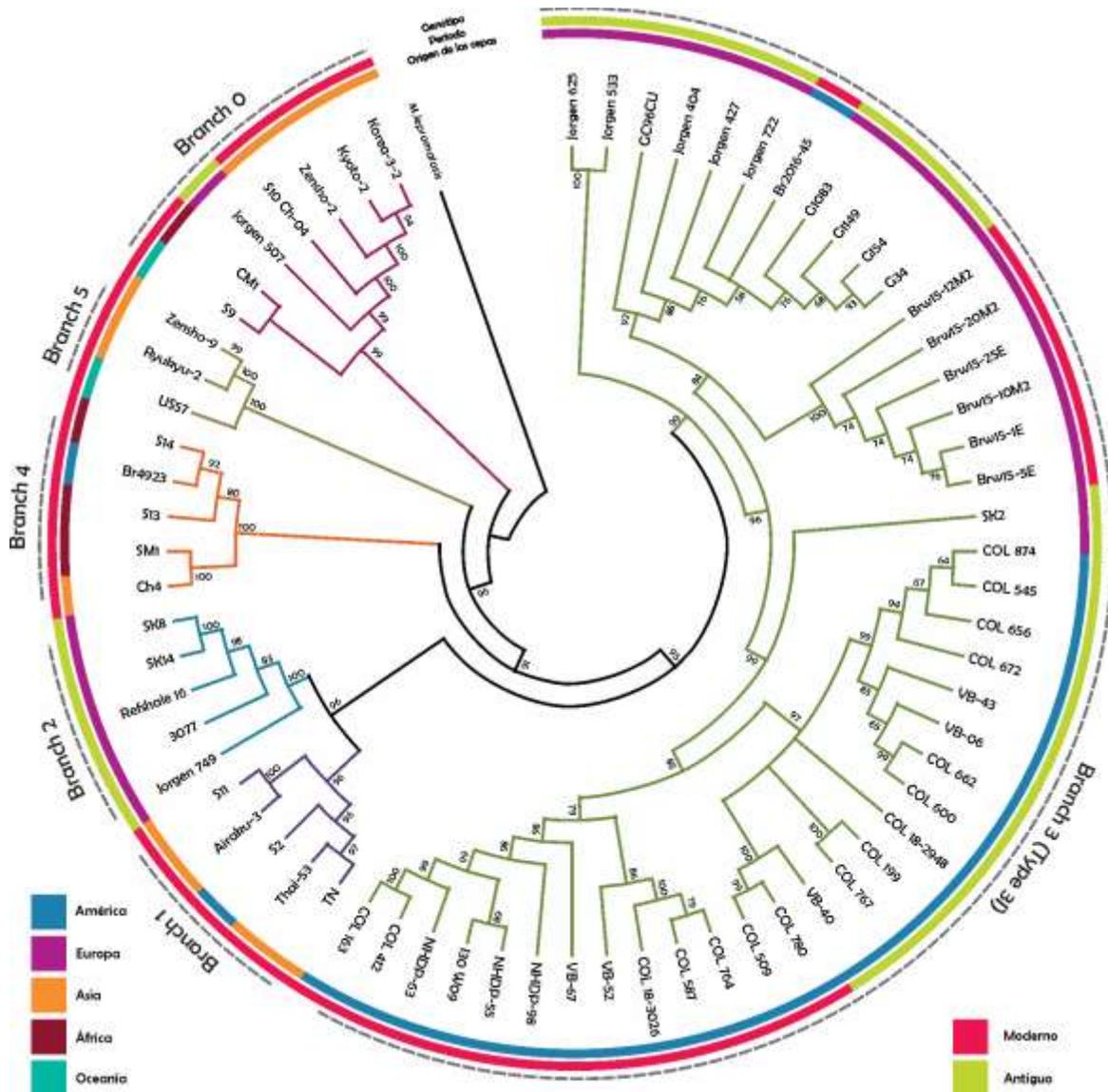


Figura 1.11. Análisis filogenético de cepas antiguas y modernas de *M. leprae* y su relación con las cepas colombiana de pacientes nuevos. Árbol de máxima parsimonia reconstruido a partir 4096 SNPs informativos, obtenido usando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR). El árbol está dibujado a escala y se utilizó *M. lepromatosis* como cepa fuera de la especie. Las ramas principales están codificadas por colores y los anillos exteriores representan el origen geografico de las cepas y el periodo de la cepa. Los valores de Bootstrap (1000 replicas) se muestra junto a cada nodo; estos análisis se realizaron en MEGAX [126]

## 1.5. Discusión

En los años 80s la OMS recomendó el uso de una PQT para disminuir la prevalencia de la lepra; sin embargo la tasa de detección se mantiene constante en algunos países, especialmente en zonas tropicales, razón por la cual la lepra se define como una enfermedad tropical desatendida [57,135]. En las últimas décadas se han realizado ajustes en la duración del tratamiento de la lepra pasando de una duración de 24 a 12 meses en pacientes con MB y de 12 a 6 meses en pacientes con lepra PB. El seguimiento y vigilancia de los pacientes una vez terminaron su tratamiento permite evaluar la eficacia de los programas de salud pública en los países en donde esta enfermedad sigue siendo prevalente [16,57].

En Colombia, se han notificado recientemente entre 400 y 500 casos nuevos de lepra cada año, siendo uno de los países latinoamericanos donde más casos se reportan cada año, a pesar de la falta de estrategias como la búsqueda activa de caso [6,92].

Los programas del control de la lepra se basan en el diagnóstico, tratamiento e identificación de casos recurrentes de la enfermedad; en este último caso la diferenciación entre recaída y reinfección es importante, dado que son eventos epidemiológicos diferentes. Mientras la tasa de recaídas es un indicador de la eficacia o fracaso del tratamiento; la reinfección es un indicador de transmisión activa en el país [86,87]. Aunque los casos de recurrencia de lepra se ha documentado en muchas partes del mundo, el análisis detallado de estos casos puede facilitar aún más la interrupción de la cadena de transmisión y, por lo tanto, controlar la enfermedad acuerdo con la estrategia recientemente lanzada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016-2020 [54].

Para confirmar una recaída, se requieren biopsias o el seguimiento a través de la baciloscopia en la que se demuestra la disminución de la carga bacteriana durante el tratamiento, seguido del aumento de la misma después de completar el tratamiento [136]. Además de los signos clínicos, un criterio de identificación de la recaída es la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en el tejido; por lo que sin evidencia clara de síntomas y/o cambios en la carga bacteriana, no existe una definición clara de recaída [137].

En el presente estudio, se analizaron biopsias de 25 pacientes del HUCDFLLA con sospecha de recaída y que fueron identificados en estudios previos realizados por Guerrero y colaboradores en 2012 [86,110], en los que se mostraron que las variables asociadas con la recaída fueron: el índice bacilar inicial  $\geq 2.0$ , tratamientos antireaccionales y una clasificación clínica de LL. Para cada una de estas, el riesgo de recaída fue de cuatro a cinco veces más probable de presentar recaída [86]. Además las recaídas pueden diagnosticarse incluso 15 años después de la finalización del tratamiento [86,138,139].

En este estudio, analizamos eventos recurrentes de lepra para su clasificación en recaída o reinfección mediante la secuenciación del ADN de *M. leprae* a partir de biopsias tomadas durante

el proceso de diagnóstico de estos eventos. Nuestros datos representan el primer informe de la secuencia total del genoma de cepas de *M. leprae* colombiano.

La metodología empleada nos permitió realizar una clara distinción entre recaída y reinfección con la aplicación de criterios como: i) diferencia en el número de SNPs ii) mutaciones únicas o representativas y iii) genotipo o linaje identificado. Estos criterios fueron apropiados para distinguir la recaída y la reinfección y se soportan por la distribución de los diferentes SNPs dentro del mismo episodio y por la cobertura del genoma lograda [99,128,140–142]. En este estudio se obtuvieron la secuencia total de 16 genomas de pacientes con sospecha de recaída, 5 casos en los que se confirmó la recaída y 1 caso en donde se estableció la reinfección 10 años después del primer evento de la enfermedad. También se logró la secuenciación total del genoma de 2 cepas correspondientes a casos de pacientes nuevos.

El continente americano alberga múltiples genotipos de *M. leprae* y este estudio aporta conocimiento para ampliar el panorama de la lepra en nuestro continente. En resumen, las cepas de la rama 1 se han encontrado en Brasil, Martinique, las Antillas y Venezuela; la Rama 3 en Brasil, México, Estados Unidos y Venezuela y la Rama 4 en Brasil y Venezuela [26,38,46,143]. El análisis de los genotipos circulantes en Colombia a través del análisis de VNTR en tres regiones colombianas mostró la circulación de los genotipos 3, 2 y 4 relacionados con los linajes Europeos y Africano respectivamente [144], pero a la fecha no se han reportado la secuenciación total de genoma de cepas de *M. leprae* circulantes en Colombia. En este estudio reportamos 18 genomas de cepas circulantes en departamentos como Boyacá, Bolívar, Santander, Norte de Santander, Tolima y Cundinamarca, de pacientes con eventos de recaída, reinfección y nuevos. En este estudio se analizaron, más de 3000 posiciones de SNP identificadas en el conjunto total de genomas reportados a nivel mundial, lo que permitió tener un mayor conjunto de datos y hacer una diferenciación más específica entre cepas de *M. leprae*.

La reconstrucción de la filogenia de los genomas colombianos y 188 genomas previamente secuenciados con más de 3000 SNPs, permitió identificar que las cepas colombianas analizadas pertenecen a la rama 3, en la que se encuentra la cepa de *M. leprae* más antigua secuenciada hasta la fecha Great Chesterford (GC96) [43], al igual que otras cepas medievales [47] y cepas provenientes de hospederos no humanos como el armadillo y la ardilla de cola roja [10,26]. Al realizar un análisis dentro de las cepas pertenecientes al genotipo 3I, se encontró que las cepas colombianas presentan estrecha relación con la cepa SK2 de Winchester (Siglo XI) y su diversidad probablemente se deriva de múltiples introducciones de Europa [39,47]. Esto indica que la colonización y migración desde el viejo mundo probablemente contribuyó a la introducción de la lepra en las Américas [39].

Por otro lado, también se encontró una estrecha relación con las cepas circulantes en el sur de Estados Unidos y asociadas a zoonosis del armadillo de nueve bandas, I-30, NHDP-55 y NHDP-63, que se originaron mucho más recientemente, de acuerdo con la rápida expansión y propagación de la población de armadillos desde su introducción en esta región [45,46]. Por lo tanto, la infección

exclusiva del genotipo 3I entre los armadillos en los Estados Unidos es probablemente el resultado de la expansión clonal de este genotipo entre los armadillos después de que se adquirió de un hospedero humano [145]. Esto muestra el impacto de la propagación zoonótica de la lepra en las Américas a través del armadillo de nueve bandas, no es imposible que el contacto con estos animales haya sido un factor que contribuyó a la diseminación de la enfermedad en el pasado [47].

La secuenciación total de genomas de *M. leprae* colombiano; además permitió la identificación de sus características genéticas como: un promedio de 114 SNPs en comparación con la cepa de referencia *M. leprae* TN, el análisis de estas mutaciones permitió identificar que hay variabilidad en las cepas circulantes de *M. leprae* colombiano, lo cual se demuestra por la presencia de subtipos que se han reportado previamente en el sur de EEUU, Venezuela y Brasil [26,38,45,47] y cuyos ancestros son cepas aisladas de esqueletos provenientes de la Europa Medieval, que además han sido identificados causando lesiones características de la lepra en ardillas del norte de Europa.

Anotamos funcionalmente el efecto de las mutaciones identificadas en las cepas colombianas utilizando la base de datos eggNOG. La mayoría de las mutaciones se asignaron a categorías funcionales caracterizadas deficientemente (Function Unknown) y no se les asignó una función definitiva o no se encontraron homólogos en la base de datos eggNOG. Las anotaciones restantes se asignaron principalmente a genes involucrados en el transporte y metabolismo de aminoácidos y replicación, recombinación y replicación. La familia de proteínas ESX reveló una gran diversidad en *M. tuberculosis* [146], y está involucrada en la interacción huésped-patógeno. Es relevante que ESAT-6 (ML0049) es un potente antígeno de células T [147,148], por lo que las mutaciones en el gen *esxA* podrían indicar el mecanismo de adaptación a la presión inmune, lo que podría explicar la ocurrencia de mutaciones en SNP61425 en diferentes genotipos.

Todo lo anterior comprueba que la secuenciación total del genoma de *M. leprae* es una herramienta aplicable a la diferenciación de recaídas de la enfermedad vs reinfecciones.

## 1.6. Conclusiones

- El seguimiento y vigilancia realizada por el HUCDFLLA a los pacientes una vez estos terminaron su tratamiento permitió la identificación de eventos recurrentes de la enfermedad (recaída/reinfección), que debido al lento crecimiento de *M. leprae* y un tiempo prolongado en la aparición de signos clínicos, hacen que tiempos cortos de seguimiento del paciente proporcionen evidencia clínica suficiente para sospechar de eventos recurrentes; este seguimiento es de vital importancia para un evento de salud pública como la lepra.
- Nuestros resultados resaltan la importancia del seguimiento prolongado de los pacientes una vez terminado su tratamiento, la importancia del uso de tecnologías como la secuenciación total de genomas en el seguimiento clínico de la lepra y su aplicación en el punto de diagnóstico de la enfermedad.

- La metodología utilizada para la extracción de ADN y secuenciación total de genoma a partir de biopsias embebidas en parafina fue eficiente identificar las características genómicas de cepas de *M. leprae* causantes de eventos recurrentes de lepra y los criterios genómicos para diferenciar las recaídas de las reinfecciones, los cuales se definieron basados en el número y la posición de los SNPs identificados, la presencia de SNPs únicos y el genotipo identificado.
- La aplicación de la secuenciación total de genomas, nos permitió caracterizar el mayor número de cepas de *M. leprae* hasta la fecha, permitiendo identificar los subtipos de las mismas y su relación filogenética con cepas de otras partes del mundo y así poder mostrar un panorama general de la lepra en Colombia.
- La reconstrucción de la filogenia nos permitió identificar que las cepas colombianas pertenecen a la rama 3, en la que se encuentran cepas provenientes de Europa Medieval y cepas provenientes de hospederos no humanos como los armadillos de nueve bandas y ardilla de cola roja. Además se encontraron cepas estrechamente relacionadas con la cepa de referencia NHDP-63 (USA) la cual ha sido relacionada con transmisión zoonótica desde armadillos en esta región.
- Dentro de las características genómicas más relevantes de las cepas de *M. leprae* colombianas se encontraron un promedio 114 SNPs con respecto a la cepa de referencia TN, las cuales además tienen mutaciones no sinónimas en sistemas como ESAT-6, el cual es un potente antígeno para las células T, por lo que la mutación de este en *M. leprae* puede ser un mecanismo de adaptación y evasión del sistema inmune.

## **2. Capacidad de infección de cepas colombianas de *Mycobacterium leprae* implicadas y no implicadas en eventos recurrentes de lepra**

### **2.1. Resumen**

El Sistema Nervioso Periférico (PNS) es la residencia predilecta para *M. leprae*, uno de los patógenos bacterianos más antiguos conocidos por la humanidad, *M. leprae*. Este patógeno tiene una capacidad notable para invadir las células gliales de soporte del PNS adulto, conocidas como células de Schwann. Debido a que los nervios periféricos son un sitio privilegiado y protegido, las células de Schwann proporcionan un nicho más seguro para la supervivencia, propagación y colonización inicial de *M. leprae*. Los eventos recurrentes de la enfermedad, se pueden dar por la activación metabólica de *M. leprae* sobrevivientes a la PQT y producen la aparición de nuevas manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Con el objetivo de conocer si existen diferencias en la capacidad de infección entre cepas de *M. leprae* asociadas y no asociadas con posibles recaídas, durante esta parte del trabajo se utilizó un modelo *in vitro* de células de Schwann infectadas con cepas de *M. leprae* obtenidas de pacientes nuevos y con sospecha de recaída. Específicamente se observó la cinética de multiplicación durante el tiempo de cultivo de 1-12 días.

Las condiciones utilizadas para la infección de las células de Schwann con *M. leprae* fueron una temperatura de 33°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. También se observó una variación en la capacidad de infección inicial de las células de Schwann i) en el tiempo inicial de infección, entre el 6.5% para pacientes de recaída y del 27% para pacientes nuevos y ii) una variación en el máximo de infección entre el 16.5% (pacientes recaída) y el 54% (paciente nuevo).

Los resultados obtenidos sugieren diferencias en la capacidad infecciosa de cada cepa, proporcionando evidencia de que la entrada de *M. leprae* no solo depende de la carga bacteriana inicial, sino también de las características fenotípicas de cada cepa. En este caso las cepas asociadas con posibles recaídas, mostrarían que un fenotipo puede ser modulado favoreciendo la multiplicación y persistencia intracelular a través del tiempo

**Palabras clave:** Células de Schwann, persistencia, infección, *M. leprae*

## 2.2. Introducción

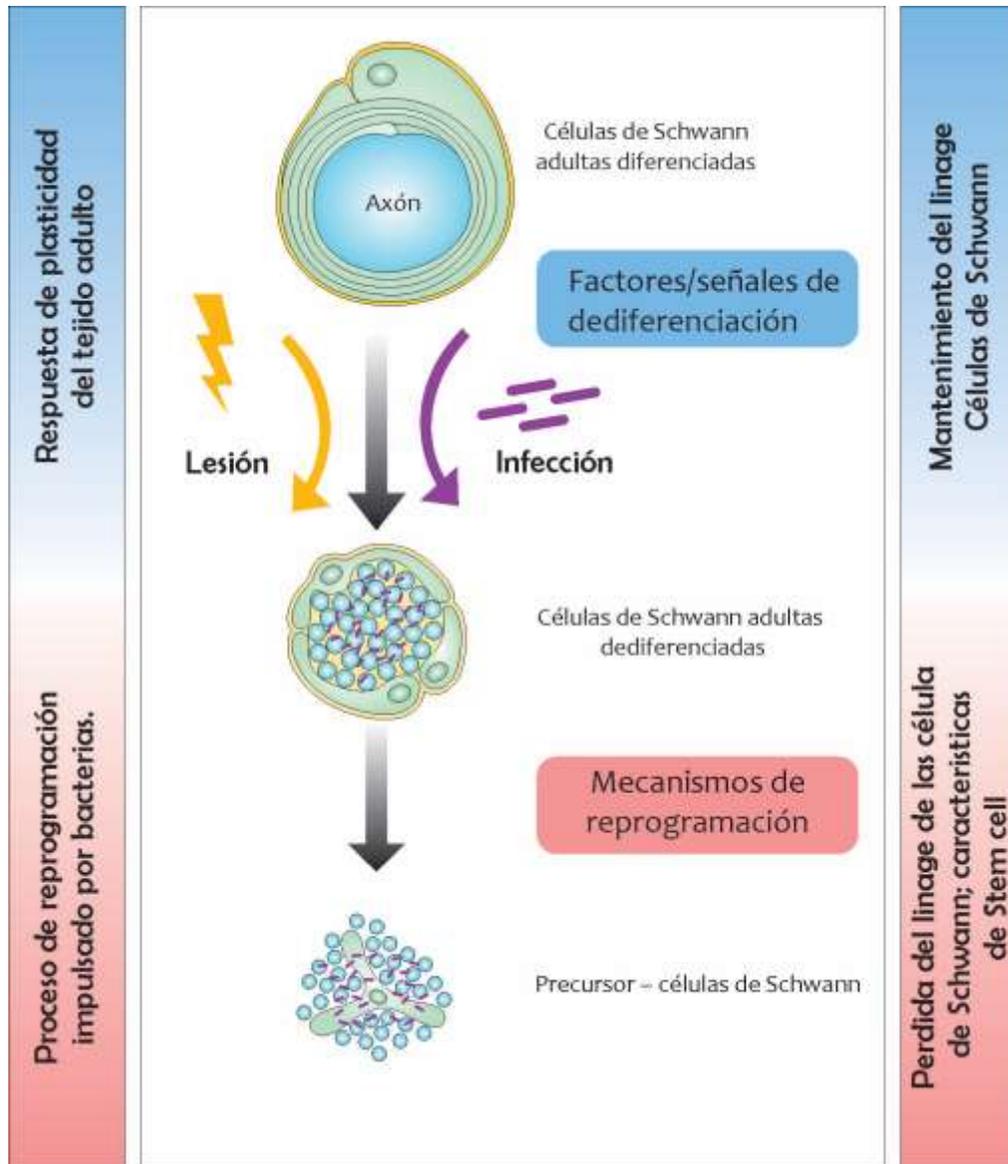
Las células de tejidos diferenciados son blancos naturales para muchos patógenos bacterianos intracelulares, que causan numerosas enfermedades humanas. Estos microorganismos a menudo establecen la infección en sus nichos preferidos manipulando o alterando funciones de la célula diferenciada [149], la cual posee una plasticidad genómica y nuclear sin precedentes, además de un potencial de reprogramación nuclear [150,151]. Los patógenos bacterianos intracelulares deben cumplir varios criterios para llevar a cabo este proceso; i) la evasión del sistema inmune, ii) el mantenimiento de la supervivencia bacteriana y iii) promover su diseminación [152].

Entre las células de tejido diferenciadas, las células de Schwann, las células gliales del PNS (*Peripheral Nervous System, por su sigla en ingles*) se derivan de los precursores de la cresta neural y muestran una notable plasticidad, como la capacidad de cambiar entre estados diferenciados y no diferenciados después de una lesión nerviosa [153]. Las células de Schwann además, comprenden dos fenotipos: mielinizadas y no mielinizadas, que cubren los axones en todo el PNS [154]. Las células de Schwann mielinizadas envuelven individualmente axones de gran calibre ( $> 1 \mu\text{m}$  de diámetro), propagan la conducción nerviosa rápida y facilitan la conducción axonal saltatoria. La mielina de las células de Schwann comprende varios lípidos y proteínas compactados en una estructura multicapa que proporciona aislamiento eléctrico. Las células de Schwann no mielinizadas no envuelven los axones, pero los axones sensoriales pequeños ( $< 1 \mu\text{m}$  de diámetro) están incrustados en los surcos de sus membranas y proporciona una conducción nerviosa lenta [154]. Las células de Schwann son muy sensibles a los cambios ambientales, que pueden afectar su comportamiento y sus funciones celulares. Estos cambios influyen en la decisión de la célula de permanecer inactiva, diferenciarse, sufrir una muerte celular programada o de proliferar y diferenciarse, además al carecer de maquinaria antimicrobiana, pueden tolerar la carga bacteriana [79,155].

A pesar de la diferenciación terminal de las células de Schwann en un fenotipo mielinizado, estas células maduras muestran una plasticidad sin precedentes. Pueden apagar su programa de mielina en respuesta a una lesión y así desarrollar un estado des-diferenciado que se asemeja a un fenotipo inmaduro, pero manteniendo las propiedades del linaje celular de Schwann [156,157].

*M. leprae* parece aprovechar la propiedad natural de las células de Schwann e induce la desmielinización como mecanismo adaptativo y así generar células de Schwann des-diferenciadas que facilitarían la colonización y manipulación bacteriana [158] (Figura 2.1.). Las células de Schwann del PNS no solo son un hospedero natural para *M. leprae* (debido a que son capaces de soportar el crecimiento bacteriano) [17], sino además un refugio para su multiplicación, ya que la barrera hematoencefálica del PNS lo protege de la acción del sistema inmune del hospedero [64]. Estas condiciones permiten la persistencia bacteriana durante un largo periodo de tiempo, debido a la manipulación por parte de *M. leprae* de las propiedades regenerativas del PNS [79,158]. Por lo tanto, el *M. leprae* residente en las células de Schwann sirve como fuente primaria de infección, que no solo causa daño a los nervios, sino que además es el responsable de la continua fuga de *M. leprae*

de las células de Schwann, lo que en última instancia, facilita la diseminación de la infección a otros tejidos [4].



**Figura 2.1. Preparación del escenario para la reprogramación de la célula hospedera: desde la diferenciación terminal hasta la dediferenciación y las Stem cell.** *M. leprae* capta la capacidad innata de plasticidad de las células de Schwann adultas, apaga el programa de mielina y adopta un programa de dediferenciado activando las vías de señalización mediadas por el receptor. A diferencia del proceso de lesión en el cual se vuelven a diferenciar las células dediferenciadas a un estado terminalmente diferenciado para completar el proceso de reparación del nervio; en la infección por *M. leprae* lleva a las células de Schwann dediferenciadas mas allá del linaje y hacia un estado inmaduro que genera células parecidas a las células madre y así una ventaja bacteriana. Figura modificada y adaptada al español a partir de la referencia [159].

Estudios recientes han demostrado que las células de Schwann mielinizadas y no mielinizadas muestran una respuesta funcional diferente a la infección con el bacilo de la lepra. Aunque por *M. leprae*. Aunque *M. leprae* se une a los axones de células de Schwann mielinizadas y no mielinizadas [160], las células de Schwann mielinizadas son una fuente primaria de infección que no solo causa daño a los nervios, sino además es responsable de la continua fuga de *M. leprae* y sus antígenos al tejido neural y la circulación, por lo tanto puede conducir a un estado de infección persistente o recaída. Sin embargo, estas células son extremadamente resistentes a la invasión de *M. leprae*, por lo que las no mielinizadas son más susceptibles a la invasión con *M. leprae* [79].

A medida que la infección avanza y las bacterias se multiplican sin restricciones, la disponibilidad de células de Schwann no mielinizadas se convierte en un factor limitante. Para evitar tal situación, *M. leprae* induce las células de Schwann no mielinizadas inactivas para volver a entrar en el ciclo de división celular y proliferar, generando así más células libres de mielina, generando así un nicho intracelular para su supervivencia a largo plazo [79]. Durante el proceso de infección, es probable que *M. leprae* resida y se replique dentro de las células de Schwann durante un periodo prolongado de tiempo antes de que el sistema inmune inicie la respuesta inflamatoria que eventualmente se manifiesta clínicamente con la pérdida sensorial o sensomotora [61]. Antes de esta etapa, desde la infección inicial hasta los primeros síntomas de afectación nerviosa no se conoce nada de lo que sucede en la infección temprana; esta fase inicial es una “caja negra”, pero es crítica para la propagación de *M. leprae* y el establecimiento de nichos bacterianos dentro del PNS y el daño nervioso posterior y la progresión de la enfermedad [64].

En pacientes con lepra no tratada, se ha establecido la regeneración de los nervios periféricos dañados a pesar de la presencia de *M. leprae*. Esto refleja el esfuerzo de *M. leprae* para asegurar y propagar las células de Schwann durante la infección humana. Por lo tanto, una vez invadido, *M. leprae* utiliza estrategias que promueven la resistencia o el rejuvenecimiento de las células de Schwann para mantener las células infectadas en la etapa activa de modo que puedan adquirirse factores esenciales del hospedero que son esenciales para la supervivencia bacteriana [64,161,162].

El uso particular de potentes fármacos combinados y el desarrollo de regímenes estándar para el tratamiento de la lepra, han marcado una gran diferencia en el éxito del tratamiento de la lepra [163] y su implementación ha reducido drásticamente el número de casos de aproximadamente 12 millones en 1985 a menos de 220.000 de casos nuevos en el 2018 [56]. A pesar de que la aplicación de la PQT es un proceso largo, ampliamente aceptado y no es costoso, el reporte de resistencia y de recaídas es cada día más frecuente [56,57]. La recaída se da por la reaparición de la enfermedad después de completar el tratamiento con la PQT recomendada por la WHO [107] y se da por el crecimiento de *M. leprae* sobrevivientes en el huésped y que permanecieron fase latente durante un periodo prolongado de tiempo (5 a 10 años). Como resultado de la activación del estado metabólico del bacilo, se producen nuevas manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Es por lo anterior que el presente trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad de infección de cepas de *M. leprae* asociadas y no asociadas con posibles recaídas en un modelo *in vitro* de células de Schwann.

## 2.3. Materiales y Métodos

### 2.3.1. Selección de los pacientes que ingresaron al estudio

En el CDFLLA se seleccionaron e incluyeron casos de pacientes que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- i) Sospecha clínica de recaída emitida por el dermatólogo responsable del programa de Hansen.
- ii) Paciente cuyo diagnóstico inicial haya sido realizado en el HUCDFLLA con el fin de garantizar la existencia de una biopsia previa almacenada en el biobanco del centro.
- iii) Paciente cuyo seguimiento de la PQT haya sido realizado en el HUCDFLLA asegurando la adherencia, al igual que la vigilancia post PQT.
- iv) Paciente cuyo diagnóstico de recaída incluyo la evaluación de resistencia a los medicamentos y viabilidad del *M leprae* realizado en el HUCDFLLA.
- v) Paciente cuyo diagnóstico de recaída incluya toma de biopsia de tejido ordenada por el dermatólogo tratante.
- vi) Paciente que apruebe participar en el estudio y que firme voluntariamente el consentimiento informado.

### 2.3.2. Cultivos de células de Schwann y obtención de las monocapas

La línea de células primarias de Schwann Humanas, obtenidas a partir del nervio espinal humano se adquirieron en ScienCell, Carlsbad, CA, EE.UU. (Cat. No. 1700). Las células se cultivaron en medio que contenía suero de crecimiento celular de Schwann, 5% de Suero Fetal Bovino y Penicilina/Streptomycin (SCM, Cat. No. 1701, ScienCell), en frascos de cultivo celular previamente revestidos con Poli-L-lisina 2 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> (Cat. No. 0413, ScienCell), para así promover la adhesión celular. Las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y el medio de cultivo fue renovado cada 3-4 días.

Se obtuvieron monocapas confluentes de células Primarias de Schwann, después de entre 3 y 4 semanas de incubación, y se realizó un seguimiento a las características del crecimiento configurado a través del tiempo. Durante las observaciones diarias, se observó que las características propias de las células de Schwann (forma de huso, birrefringentes, núcleos alargados) no cambiaran a través del tiempo, y cuando los cultivos tuvieron aproximadamente 20 días y un 90% de confluencia se realizó la multiplicación del mismo (Figura 2.3.). Este proceso se realizó en tres tiempos diferentes con el fin de establecer el tiempo máximo de viabilidad (características físicas y adherencia) de las células a dos temperaturas diferentes a 33°C

(temperatura de crecimiento óptima de *M. leprae*) y a 37°C, temperatura recomendada para el cultivo y mantenimiento de estas células.

Luego las células fueron lavadas con PBS 1X dos veces y se sometieron a un proceso de separación de la monocapa con una solución de Tripsina/EDTA al 0,0625% (ScienCell) por 1 min. Una vez comprobada la separación celular en el microscopio óptico, las células fueron colectadas en un tubo de 50 mL que contenía Suero Fetal Bovino (SFB), se adicionaron 5 mL de solución de neutralización (ScienCell) y luego se centrifugó a 3.000 r.p.m por 5 min. Una vez centrifugadas, se procedió a realizar el conteo y evaluación de viabilidad celular en cámara de Neubauer.

Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se mezclaron con 90 µL de azul de tripano (dilución 1:10). Seguido, se colocaron 10 µL de la dilución en una cámara de Neubauer y las células se observaron en un microscopio óptico y se contaron en las 4 cuadrículas para glóbulos blancos. El número de células / mL se calculó como el promedio en los 4 cuadrantes x Factor de dilución x 10 000. Luego se preparó la suspensión celular en medio SCM suplementado, de acuerdo con la cantidad de células requeridas para el ensayo de infección (20.000 cls por pozo). Las células se cultivaron en una placa de 24 pozos (sobre laminillas) (previamente tratadas con Poli-L-lisina).

### **2.3.3. Obtención de biopsia de piel**

En la clínica de lepra del HUCDFLLA, el médico tratante siempre solicita biopsia de piel a los pacientes con sospecha de caso nuevo o recaída de lepra. Se consideró que las lesiones incipientes más características de la lepra son aquellas que comprometen los filetes nerviosos localizados en la vecindad de la unión dermohipodérmica. El médico encargado de la toma de la biopsia siguió el protocolo PC-4000-167 establecido por el HUCDFLLA específico para pacientes de Hansen. El médico escogió la o las lesiones más representativas, de las que las biopsias se tomaron del borde más activo de la lesión hacia el centro de las mismas, sin incluir piel sana, incluyendo hipodermis. Se tomaron biopsias incisionales elípticas de las siguientes dimensiones 1 cm de longitud x 5 mm de ancho x 7 mm de profundidad. Una parte de la biopsia de tejido se colocó en un recipiente estéril que contenía solución salina balanceada de Hank's Sigma® (H9269) y se mantuvo a 4°C hasta su procesamiento. Previo a la toma de muestra el paciente firmó un consentimiento informado, en el que autoriza la toma y uso de su muestra para ingresar al estudio.

### **2.3.4. Biopsias de piel frescas incluidas en el estudio.**

Para el desarrollo de este estudio se incluyeron 5 muestras de pacientes (3 nuevos y 1 paciente de recaída) clasificados con Lepra Lepromatosa (LL) o Multibacilar (MB). Durante el diagnóstico o seguimiento del paciente con sospecha de recaída presentó nuevos síntomas 40 meses después de completar la PQT, el cual era un hombre de 45 años. En el caso de los pacientes nuevos clasificados con LL, fueron tres pacientes hombres de 41, 49 y 75 años, provenientes de Bogotá (Cundinamarca) y Villavicencio (Meta). Las principales características clínicas y de laboratorio de estos pacientes se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1. Principales características demográficas y clínicas de los pacientes nuevos y con sospecha de recaída**

Identificación de los pacientes (Código en el estudio)	18-3026 (Exp 4 y 5)	18-2948 (Exp 3)	18-9217 (Exp 1)	18-9217 (Exp 2)
Edad al momento del diagnóstico	41	49	75	45
Sexo	M	M	M	M
Procedencia	Bogotá	Villavicencio	Bogotá	Bogotá
Municipio de nacimiento	Bogotá	Villavicencio (Meta)	Bogotá	Rio Blanco (Tolima)
Antecedentes médicos	Ninguno	Leishmaniasis cutánea	Diabetes	Secuelas de lepra
Resultado de la biopsia	LBT	LL	LL	LL
<b>Clasificación de Ridley-Jopling</b>				
Primer diagnóstico	LL	LL	LL	LL
Recaída				LL
<b>Recurrencia</b>				
Fecha de la Recaída (mes/año)				9/2018
Meses entre la terminación de la PQT y la recurrencia de los síntomas				40
<b>Índice Bacilar</b>				
Primer diagnóstico	2.0	5.0	1.8	1.5
Recaída				3.0

### 2.3.5. Purificación y cuantificación de *M. leprae*

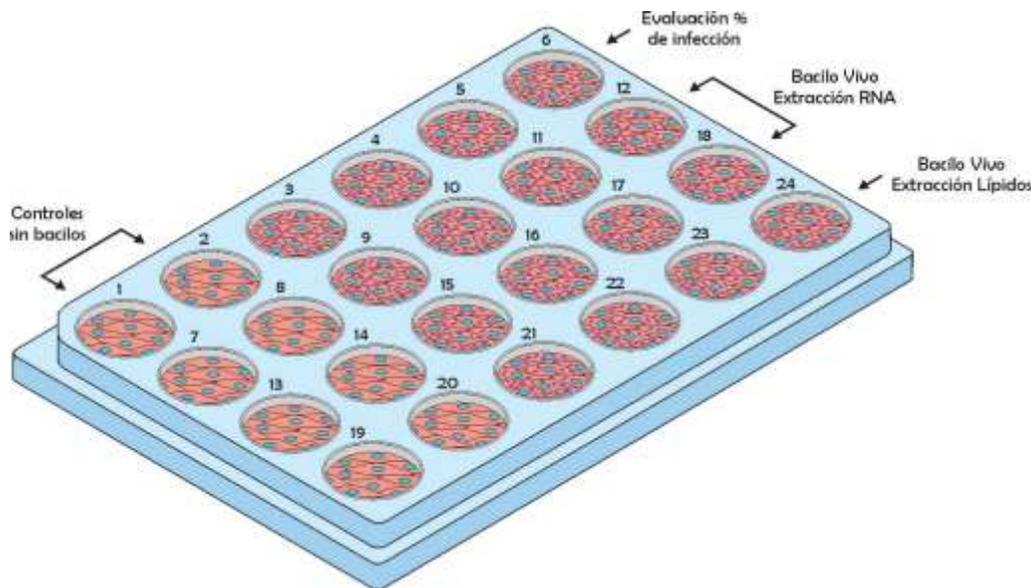
Las biopsias de los pacientes fueron transferidas a una caja de Petri estéril y con ayuda de un bisturí se seccionó el tejido, se transfirió el material a un homogeneizador de tejidos de vidrio estéril y se maceró el tejido (se mantuvo el homogeneizador en hielo). Una vez macerado el tejido se adicionó 1 mL de solución salina balanceada de Hank's (SSBH) fría y se homogeneizó en una suspensión, la que se filtró a través de un filtro celular BD (352340). Se tomaron los restos celulares que quedaron en el filtro y se ubicaron nuevamente en el homogeneizador, se adicionó 1 mL de SSBH fría se homogeneizó nuevamente el tejido y se filtró nuevamente la suspensión y una vez más hasta alcanzar un volumen de 2,5 mL (AnexoA).

A la suspensión se le adicionó 500 µL de tripsina al 0,5% ([0.05%] final) y se incubó en baño serológico a 37°C por una hora. Después se añadió 10 mL de SSBH a la suspensión y se centrifugó a 3500 g por 30 min a 4°C. Una vez descartado se el sobrenadante y se adicionó 1 mL de SSBH al precipitado y se homogeneizó la suspensión. La cuantificación bacilar se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por Shepard y McRae (Anexo A) [114] y la viabilidad bacilar se corroboró

mediante el kit de viabilidad BacLight LIVE/DEAD (Invitrogen, EE.UU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 2.3.6. Infección de células de Schwann con *M. leprae*

Una vez se tuvieron las células de Schwann en monocapa. A una densidad de 20.000 células por pozo, se añadieron las suspensiones bacilares previamente cuantificadas de cada paciente, en una proporción de 10 a 50 bacilos por células. Las muestras se dejaron interactuar a una temperatura de 33°C con 5% de CO<sub>2</sub> adicionando medio SCM-suplementado, cada 72 horas para evitar la deshidratación y la alcalinización. En la figura 2.2. Se presenta el esquema de una caja de cultivo celular de 24 pozos (1 caja para cada tiempo estipulado).



**Figura 2.2. Esquema de la placa de cultivo utilizado en la infección.** Durante los tiempos de < 2 hora (T<sub>0</sub> < 2 hora), 72 horas (T<sub>1</sub> = 3 días), 7 días (T<sub>2</sub> = 7 días), 10 días (T<sub>3</sub> = 10 días) y 12 días (T<sub>4</sub> = 12 días). Los pozos 1 al 6 (1 y 2 no contienen el bacilo) se utilizaron para evaluar el porcentaje de infección, del 7 al 18 (7, 8, 13 y 14 no contienen el bacilo) se utilizaron para extracción de ARN y los pozos del 19 al 24 (19 y 20 no contiene el bacilo) se utilizaron para la extracción de lípidos de *M. leprae*. La cepa de *M. leprae* Thai-53 purificada a partir de almohadillas de ratón atímicos BALB/c (*nu/nu*) fue donada por el Instituto Lauro de Sousa Lima, Bauru, São Pablo, Brasil y se utilizó como control negativo de infección (bacilos muertos).

### 2.3.7. Estudios de microscopia

Una vez se cumplió el tiempo de incubación de las células de Schwann infectadas con *M. leprae*: 2 horas (T<sub>0</sub> = 2 horas), 72 horas (T<sub>1</sub> = 3 días), 7 días (T<sub>2</sub> = 7 días), 10 días (T<sub>3</sub> = 10 días) y 12 días (T<sub>4</sub> = 12 días) en las placas de 24 pozos, se descartó el medio y las células se lavaron dos veces con PBS 1X. Para los pozos 1 al 6, se adicionó paraformaldehído al 4% y se incubó a 37°C por 10 minutos. Una vez descartado el paraformaldehído, las células se lavaron dos veces con PBS 1X

(entre cada lavado se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos), posteriormente se retiraron las laminillas del pozo y se tiñeron las láminas por la técnica de Zielh Neelsen.

Las laminillas previamente fijadas, que incluían un control positivo y negativo de coloración, se cubrieron cada una de las láminas con Fucsina Fenicada previamente filtrada dejando el colorante en contacto durante 30 minutos. Después se descartó la fucsina, se lavaron las láminas con agua, luego añadió alcohol acido al 3% durante 5 minutos y se lavó nuevamente con agua. Posteriormente se cubrieron las laminillas con azul de metileno de Loeffler (colorante de contraste) durante 20 minutos y se lavó nuevamente con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se realizó el montaje con una citoresina (con la muestra de estudio hacia abajo) para conservar las láminas. Se realizo la visualización de la morfología de las células infectadas en el microscopio optico.

### **2.3.8. Evaluación del porcentaje de células infectadas**

Una vez se cumplió el tiempo de incubación de las células de Schwann infectadas con *M. leprae*: 2 horas (T0 = 2 horas), 72 horas (T1 = 3 días), 7 días (T2 = 7 días), 10 días (T3 = 10 días) y 12 días (T4 = 12 días) en las placas de 24 pozos, se descartó el medio y las células se lavaron dos veces con PBS 1X. Para los pozos 1 al 6, se adicionó paraformaldehido al 4% y se incubo a 37°C por 10 minutos. Una vez descartado el paraformaldehido, las células se lavaron dos veces con PBS 1X (entre cada lavado se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos), posteriormente se retiraron las laminillas del pozo y se tiñeron las láminas por la técnica de Zielh Neelsen. Finalmente, se realizó el conteo de 200 celulas y cuantas de estas estaban infectadas, como control se utilizaron células sin infectar.

### **2.3.9. Evaluación del número de bacilos por célula en cada punto del tiempo**

Una vez se cumplió el tiempo de incubación de las células de Schwann infectadas con *M. leprae*: 2 horas (T0 = 2 horas), 72 horas (T1 = 3 días), 7 días (T2 = 7 días), 10 días (T3 = 10 días) y 12 días (T4 = 12 días) en las placas de 24 pozos, se descartó el medio y las células se lavaron con PBS 1X. Para los pozos 1 al 6, se adiciono paraformaldehido al 4% y se incubo a 37°C por 10 minutos. Una vez descartado el paraformaldehido, las células se lavaron dos veces con PBS 1X (entre cada lavado se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos), posteriormente se retiraron las laminillas del pozo y se tiñeron las láminas por la técnica de Zielh Neelsen. Luego se realizó el montaje con una citoresina (con la muestra de estudio hacia abajo) para conservar las láminas. Finalmente, se realizaron los conteos en microscopio óptico del número de bacilos en el citoplasma de 200 células de Schwann, como control se utilizaron células sin infectar.

### **2.3.10. Análisis estadístico**

Los análisis de los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron aplicando un análisis de

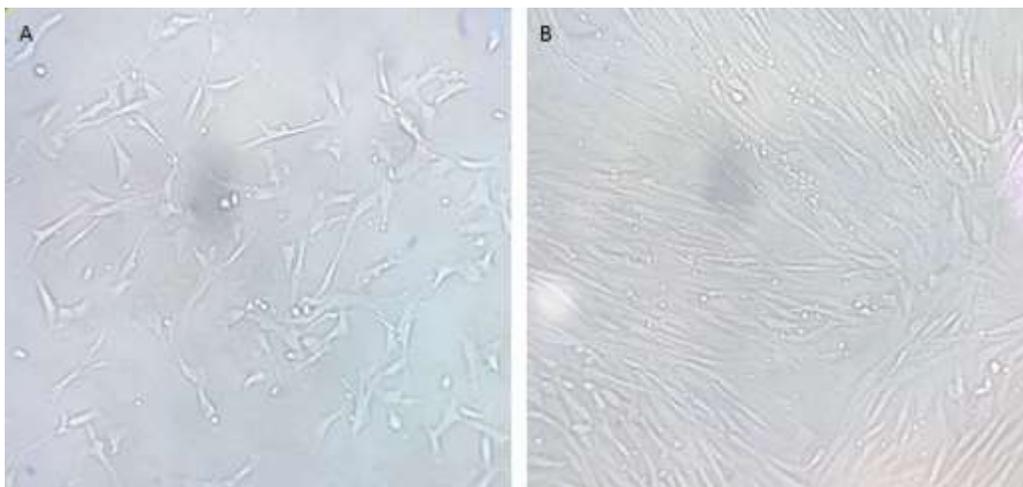
varianza de múltiples mediciones (ANOVA) de una o dos vías con la prueba de Tukey's, utilizando GraphPrims versión 9 para macOS Big sur, GraphPad Software, San Diego, California EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Los valores de  $P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $*P < 0,001$  y  $***P < 0,0001$ , se consideraron estadísticamente significativos.

## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Obtención de los cultivos de células de Schwann en monocapa.

Se obtuvieron monocapas confluentes de células Primarias de Schwann Humanas, a partir del nervio espinal humano, después de entre 3 y 4 semanas de incubación, y se realizó un seguimiento a las características del crecimiento configurado a través del tiempo. Durante las observaciones diarias, se encontró que las características propias de las células de Schwann (forma de huso, birrefringentes, núcleos alargados) no cambiaron a través del tiempo, cuando los cultivos tuvieron aproximadamente 20 días y un 90% de confluencia se realizó la multiplicación del mismo (Figura 2.3.). Este proceso se realizó en tres tiempos diferentes con el fin de establecer el tiempo máximo de viabilidad (características físicas y adherencia) de las células a dos temperaturas diferentes a 33°C (temperatura de crecimiento óptima de *M. leprae*) y a 37°C, temperatura recomendada para el cultivo y mantenimiento de estas células.

Una vez las células incubadas a 37°C alcanzaron una densidad aproximada de 20.000 células por pozo, se pudo observar una adecuada disposición de las células para ser contadas y una capa homogénea en el pozo; esto permitió tener una superficie adecuada para la interacción bacilo/célula y realizar el recuento del número de bacilos interactuando con cada célula.



**Figura 2.3. Cultivo de células de Schwann.** A. Células de Schwann en monocapa con un 50% de confluencia, B. Células de Schwann en monocapa con un 80% de confluencia observada en microscopio óptico a 40x.

## 2.4.2. Cuantificación de los bacilos obtenidos.

Durante el procesamiento de las biopsias frescas, se obtuvieron diferentes concentraciones de bacilo en 1 mL de suspensión bacilar, variaciones eran esperadas, debido a las características intrínsecas de cada uno de los pacientes relacionados con su repertorio genético, respuesta inmunológica y el estadio de la enfermedad (Inicio, recaída o reinfección) (Tabla 2.2.).

**Tabla 2.2. Aislamiento de *M. leprae* a partir de pacientes con LL (Nuevos y recaída)**

Código	Fecha de Biopsia	Tipo de Caso	IB Actual	Recuento de bacilos/mL
Exp 1	09/09/2018	Paciente Nuevo	1.8	1.709.403
Exp 2	09/09/2018	Paciente Recaída	3.0	≈ 1.600.000
Exp 3	10/09/2018	Paciente Nuevo	5.0	27.254.012
Exp 4	17/10/2018	Paciente Nuevo	2.0	106.660.872
Exp 5	17/10/2018	Paciente Nuevo	2.0	62.762.831
Exp 6	10/09/2018	Control	NA	134.451.081

## 2.4.3. Evaluación morfológica de las células Schwann infectadas con *M. leprae*

La captación o internalización de *M. leprae* por parte de las células de Schwann se observó a través de los experimentos de microscopía que permitieron observar que las células que interactuaron con el bacilo conservaron la monocapa y la morfología durante el tiempo, y las células infectadas contenían los bacilos en el citoplasma. Los bacilos no se observaron sobre la superficie de la laminilla, indicando que los lavados durante el cambio de medio fueron suficientes para eliminar los bacilos no internalizados.

Las células que interactuaron con los bacilos durante solo 2 horas mostraron una baja cantidad de bacilos a nivel distal en el citoplasma. A las 72 horas se observó un mayor número de bacilos asociados al citoplasma siguiendo la dirección y la superficie otorgada por este. Después de 7 días se observaron bacilos asociados al citoplasma; sin embargo, se apreció una alteración celular en la SC, caracterizada por la contracción del citoplasma y una disminución de las células presentes. Por último, luego de 12 días de interacción se observó una notable pérdida celular y la mayoría de las células muestran bacilos a nivel de su citoplasma y con una característica contracción citoplasmática (Figura 2.4.).

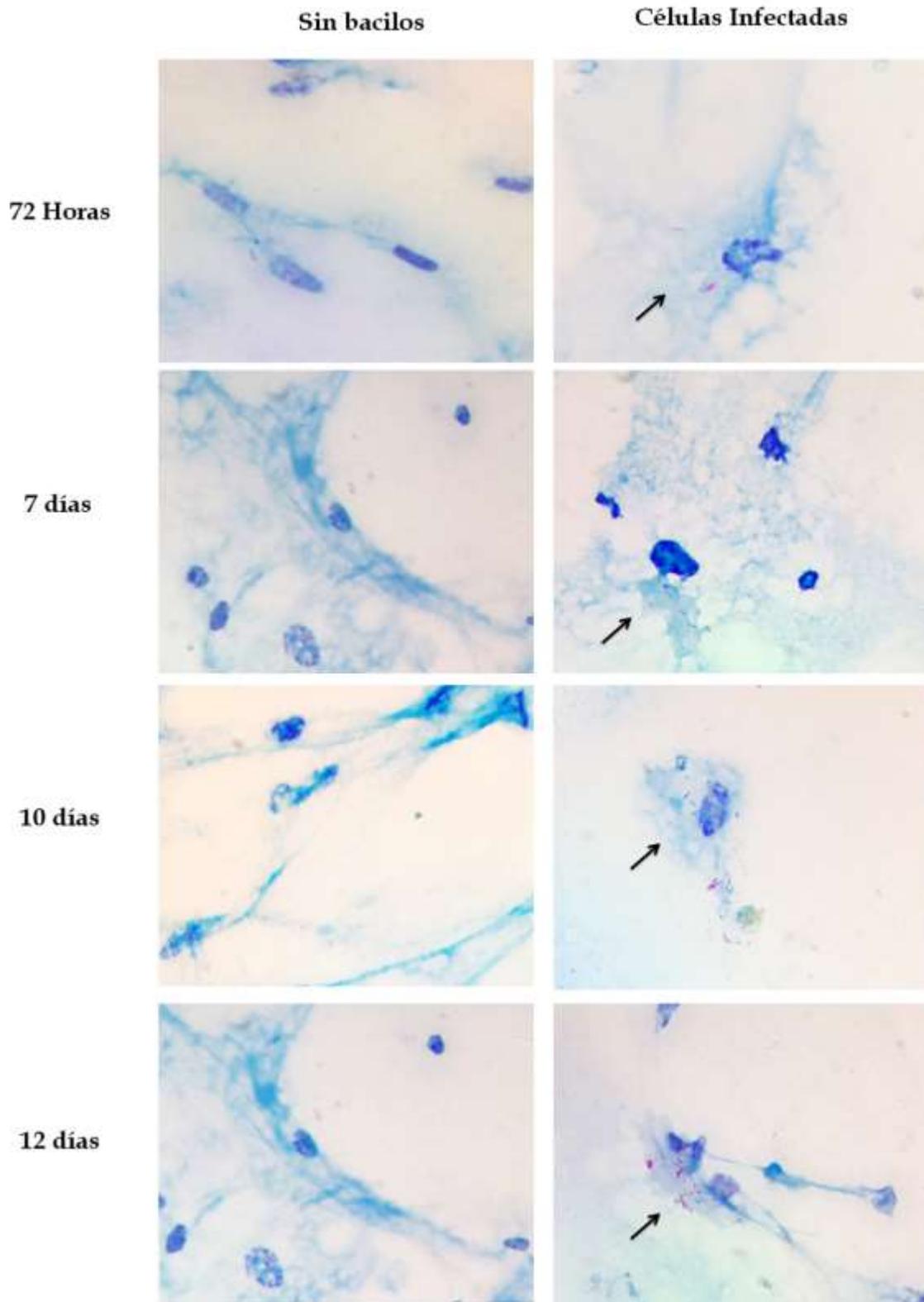


Figura 2.4 Cultivo de células de Schwann en monocapa coloreadas con ZN. Células de Schwann en monocapa sin bacilos e infectadas con *M. leprae*, coloreadas y observadas en microscopio óptico a 100x.

## 2.4.4. Evaluación de la capacidad de infección de las células de Schwann

### 2.4.4.1. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas en cada punto del tiempo

En la Figura 2.5A. se observa que a las 2 horas post-Infección (tiempo en el cual las células de Schwann permiten el ingreso de *M. leprae*), las cepas de estudio mostraron diferencias en la capacidad de infectar las células de Schwann. Esto evidencia que las características inherentes de las cepas (vivas o muertas, de pacientes de eventos recurrentes o nuevos) no tienen ningún efecto en la capacidad de entrada del bacilo en las células de Schwann.

Específicamente se observó un aumento en la proporción de células infectadas desde las 2 horas, siendo progresivamente mayor a los 3, 7, 10 y 12 días de incubación (Figura 2.5). En las tablas 2.3 a 2.7. se muestran los resultados del análisis de ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey en cada uno de los tiempos.

**Tabla 2.3. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 2 horas post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
Distribución Fisher-Snedecor (F)			447,1
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (p <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9947
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
Exp 1 vs. Exp 2	1,500	0,4121 - 3,412	0,1617
Exp 1 vs. Exp 3	19,50	17,59 - 21,41	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	12,83	10,92 - 14,75	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	15,00	13,09 - 16,91	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	12,67	10,75 - 14,58	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	21,00	19,09 - 22,91	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	14,33	12,42 - 16,25	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	16,50	14,59 - 18,41	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	14,17	12,25 - 16,08	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	6,667	4,755 - 8,579	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 5	4,500	2,588 - 6,412	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	6,833	4,921 - 8,745	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	2,167	0,2545 - 4,079	0,0235
Exp 4 vs. Exp 6	0,1667	-1,745 - 2,079	0,9996
Exp 5 vs. Exp 6	2,333	0,4212 - 4,245	0,0144

**Tabla 2.4. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 3 días post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
Distribución Fisher-Snedecor (F)			1417
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9983
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	<b>Diferencia de Medias</b>	<b>Intervalo de confianza 95%,</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Exp 1 vs. Exp 2	3,000	1,352 a 4,648	0,0006
Exp 1 vs. Exp 3	29,67	28,02 - 31,31	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	18,50	16,85 -20,15	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	23,67	22,02-25,35	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	10,50	8,852-12,15	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	32,67	31,02-34,31	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	21,50	19,85-23,15	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	26,67	25,02-28,31	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	13,50	11,85-15,15	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	11,17	9,519 a 12,81	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 5	6,000	4,352 a 7,648	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	19,17	17,52 a 20,81	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	5,167	3,519 -6,815	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 6	8,000	6,352 - 9,648	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	13,17	11,52 - 14,81	<0,0001

**Tabla 2.5. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 7 días post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
Distribución Fisher-Snedecor (F)			2827
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9992
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	<b>Diferencia de Medias</b>	<b>Intervalo de confianza 95%,</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Exp 1 vs. Exp 2	8,000	6,484 - 9,516	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 3	24,00	22,48 - 25,52	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	32,33	30,82 - 33,85	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	29,00	27,48 - 30,52	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	4,000	2,484 - 5,516	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	32,00	30,48 - 33,52	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	40,33	38,82 - 41,85	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	37,00	35,48 - 38,52	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	12,00	10,48 - 13,52 -	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	8,333	6,817 - 9,849	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 5	5,000	3,484 - 6,516	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	20,00	18,48 - 21,52	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	3,333	1,817 - 4,849	<0,0001

Exp 4 vs. Exp 6	28,33	26,82 - 29,85	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	25,00	23,48 - 26,52	<0,0001

**Tabla 2.6. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 10 días post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
Distribución Fisher-Snedecor (F)			3787
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9994
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	<b>Diferencia de Medias</b>	<b>Intervalo de confianza 95%,</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Exp 1 vs. Exp 2	-4,500	3,129 - 5,871	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 3	-36,00	34,63 - 37,37	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	-37,50	36,13 - 38,87	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	-36,00	34,63 - 37,37	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	-9,000	7,629 - 10,37	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	-31,50	30,13 - 32,87	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	-33,00	31,63 - 34,37	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	-31,50	30,13 - 32,87	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	-4,500	3,129 - 5,871	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	-1,500	0,1287 - 2,871	0,0294
Exp 3 vs. Exp 5	0,000	-1,371 - 1,371	>0,9999
Exp 3 vs. Exp 6	27,00	25,63 - 28,37	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	1,500	0,1287 - 2,871	0,0294
Exp 4 vs. Exp 6	28,50	27,13 - 29,87	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	27,00	25,63 - 28,37	<0,0001

**Tabla 2.7. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas en el tiempo 12 días post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
Distribución Fisher-Snedecor (F)			3873
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9994
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	<b>Diferencia de Medias</b>	<b>Intervalo de confianza 95%,</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Exp 1 vs. Exp 2	-4,500	7,629 - 10,37	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 3	-36,00	39,63 - 42,37	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	-37,50	38,13 - 40,87	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	-36,00	35,13 - 37,87	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	-9,000	11,13 - 13,87	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	-31,50	30,63 - 33,37	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	-33,00	29,13 - 31,87	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	-31,50	26,13 - 28,87	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	-4,500	2,129 - 4,871	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	-1,500	0,1287 - 2,871	0,0294

Exp 3 vs. Exp 5	0,000	3,129 a 5,871	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	27,00	27,13 a 29,87	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	1,500	1,629 a 4,371	0,0001
Exp 4 vs. Exp 6	28,50	25,63 a 28,37	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	27,00	22,63 a 25,37	<0,0001

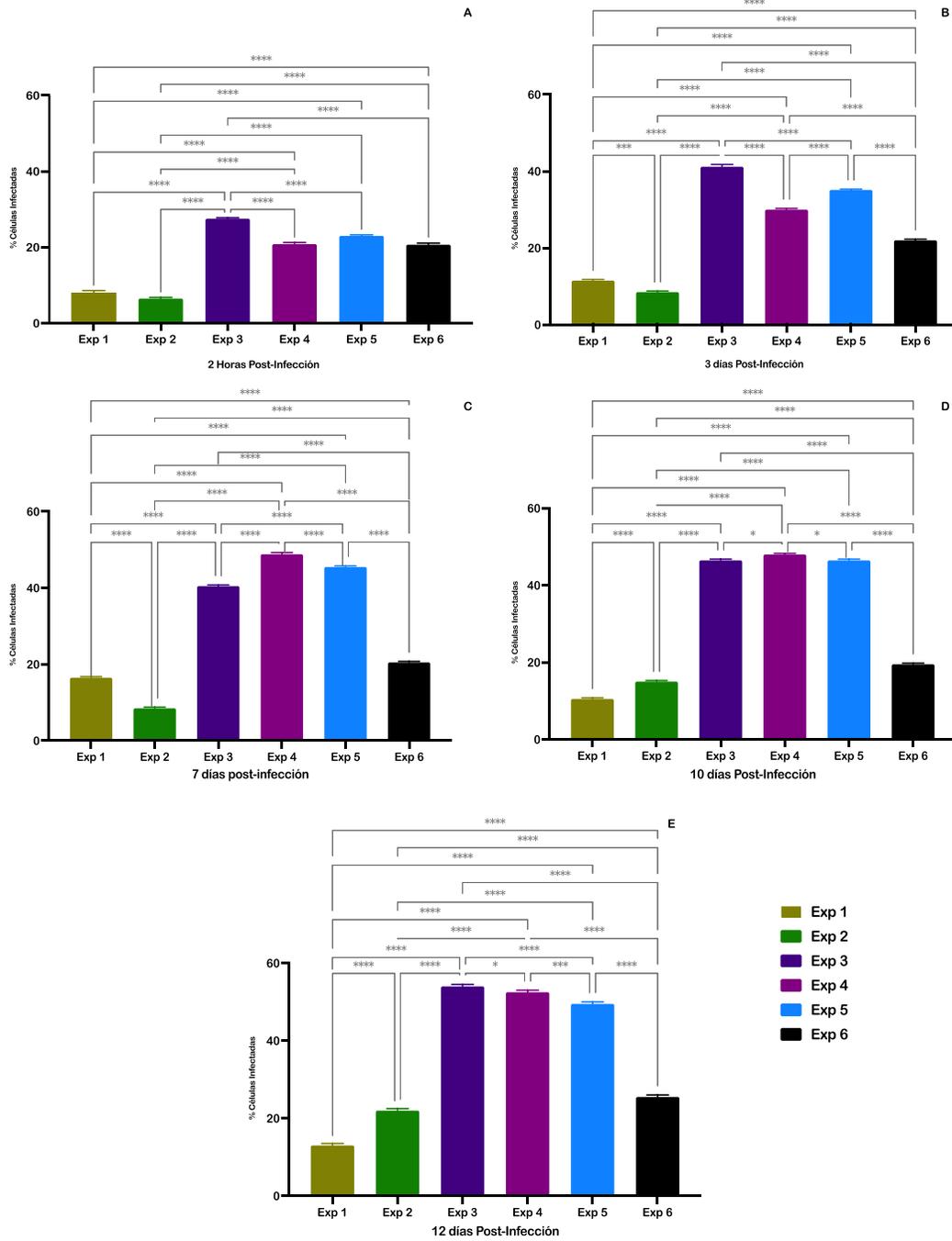


Figura 2.5. Porcentaje de infección de las células de Schwann infectadas con *M. leprae* de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída. A) 2 Horas, B) 3 días, C) 7 días, D) 10 días y E)

12 días Post-Infección. Transcurrido el tiempo post-infección las células fueron fijadas y teñidas con la coloración de ZN. Experimentos 1, 3, 4 y 5 corresponden a los resultados de pacientes nuevos, el experimento 2 corresponde a los resultados de paciente de recaída y el experimento 6, bacilos muertos cepa Tahi-53. Los valores graficados corresponden al porcentaje de células infectadas  $\pm$  SEM derivados de tres infecciones paralelas e independientes. Los asteriscos indican los análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba Tukey's para cada tiempo  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,001$  y \*\*\* $P < 0,0001$ .

### 2.4.4.2. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas por las cepas de *M. leprae* y su evolución en el tiempo

*Experimento 1:* Al transcurrir el proceso de infección especialmente en los días 3 y 7 post infección, se observó un aumento significativo en la capacidad infectiva de *M. leprae* (Figura 2.6 A). Cuando se comparó el porcentaje de células infectadas entre los días 3 y 10 y 3 y 12 no hubo un aumento significativo. Sin embargo, a transcurrir 7 días post-infección se observó una disminución en la capacidad de infección de *M. leprae*, la cual aumentó nuevamente en el día 12 (Tabla 2.8).

**Tabla 2.8. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Exp 1) a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
Tiempos	Media 1	Media 2	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%	Valor p ajustado
0 vs. 3	8,000	11,50	3,500	2,180 - 4,820	<0,0001
0 vs. 7	8,000	16,50	8,500	7,180 - 9,820	<0,0001
0 vs. 10	8,000	10,50	2,500	1,180 - 3,820	<0,0001
0 vs. 12	8,000	13,00	5,000	3,680 - 6,320	<0,0001
3 vs. 7	11,50	16,50	5,000	3,680 - 6,320	<0,0001
3 vs. 10	11,50	10,50	1,000	0,3203 - 2,320	0,2210
3 vs. 12	11,50	13,00	1,500	0,1797-2,820	0,0182
7 vs. 10	16,50	10,50	6,000	4,680 - 7,320	<0,0001
7 vs. 12	16,50	13,00	3,500	2,180 - 4,820	<0,0001
10 vs. 12	10,50	13,00	2,500	1,180 - 3,820	<0,0001

*Experimento 2:* La cepa de *M. leprae* de este experimento presentó la capacidad mas baja de infección a las dos horas post-infección, la cual aumentó en los días 3 y 7 post-infección (Figura 2.6 B). A partir del día 7 post-infección se observó un aumento constante en la capacidad infectiva de *M. leprae* de este experimento tanto en el día 10 como en el día 12 (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Exp 2) a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
Tiempo	Media 1	Media 2	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%	Valor p ajustado
0 vs. 3	6,500	8,500	2,000	0,6797 - 3,320	0,0007
0 vs. 7	6,500	8,500	2,000	0,6797 - 3,320	0,0007

0 vs. 10	6,500	15,00	8,500	7,180 - 9,820	<0,0001
0 vs. 12	6,500	22,00	15,50	14,18 - 16,82	<0,0001
3 vs. 7	8,500	8,500	0,000	-1,320 - 1,320	>0,9999
3 vs. 10	8,500	15,00	6,500	5,180 - 7,820	<0,0001
3 vs. 12	8,500	22,00	13,50	12,18 - 14,82	<0,0001
7 vs. 10	8,500	15,00	6,500	5,180 - 7,820	<0,0001
7 vs. 12	8,500	22,00	13,50	12,18 - 14,82	<0,0001
10 vs. 12	15,00	22,00	7,000	5,680 - 8,320	<0,0001

*Experimento 3:* La capacidad infectiva de esta cepa fue la más efectiva en el tiempo 0 post-infección, entre el tiempo 0 y los tres días se observó un aumento significativo de células infectadas, que se mantuvo estable entre los días 3 y 7 (Figura 2.6 C.). Después de 7 días post-infección y entre los días 10 y 12 se observó un aumento del 6,5% y 8.0% en el número de células infectadas en estos días (Tabla 2.10).

**Tabla 2.10. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Exp 3) a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
Tiempo	Media 1	Media 2	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	27,50	41,17	13,67	12,35 - 14,99	<0,0001
0 vs. 7	27,50	40,50	13,00	11,68 - 14,32	<0,0001
0 vs. 10	27,50	46,50	19,00	17,68 - 20,32	<0,0001
0 vs. 12	27,50	54,00	26,50	25,18 - 27,82	<0,0001
3 vs. 7	41,17	40,50	0,6667	-0,6536 - 1,987	0,6173
3 vs. 10	41,17	46,50	5,333	4,013 - 6,654	<0,0001
3 vs. 12	41,17	54,00	12,83	11,51 - 14,15	<0,0001
7 vs. 10	40,50	46,50	6,000	4,680 - 7,320	<0,0001
7 vs. 12	40,50	54,00	13,50	12,18 - 14,82	<0,0001
10 vs. 12	46,50	54,00	7,500	6,180 - 8,820	<0,0001

*Experimento 4:* En este caso se observó un aumento constante en el porcentaje de células infectadas desde el tiempo 0 hasta el día 7 post-infección, con porcentajes de infección del 21%, 30% y 49%, respectivamente. Entre el día 7 y 10 se observó una capacidad infectiva estable con un 48%, con un aumento del 4,5% entre el día 10 y 12 post-infección (y Tabla 2.11. y Figura 2.6.D).

**Tabla 2.11. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Exp 4) a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
Tiempo	Media 1	Media 2	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	20,83	30,00	9,167	7,846 - 10,49	<0,0001
0 vs. 7	20,83	48,83	28,00	26,68 - 29,32	<0,0001
0 vs. 10	20,83	48,00	27,17	25,85 - 28,49	<0,0001
0 vs. 12	20,83	52,50	31,67	30,35 - 32,99	<0,0001
3 vs. 7	30,00	48,83	18,83	17,51 - 20,15	<0,0001
3 vs. 10	30,00	48,00	18,00	16,68 - 19,32	<0,0001

3 vs. 12	30,00	52,50	22,50	21,18 - 23,82	<0,0001
7 vs. 10	48,83	48,00	0,8333	0,4869 - 2,154	0,3974
7 vs. 12	48,83	52,50	3,667	2,346 - 4,987	<0,0001
10 vs. 12	48,00	52,50	4,500	3,180 - 5,820	<0,0001

*Experimento 5:* Para este experimento se observó un aumento en el número de células desde el tiempo 0 hasta el día 7 post infección con porcentajes de infección del 23%, 35,5% y 45,5% respectivamente; entre los días 7, 10 y 12 se observó una estabilidad en el porcentaje de infección (Tabla 2.12. y Figura 2.6.E).

**Tabla 2.12. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Exp 5) a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
	Media 1	Media 2	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	23,00	35,17	12,17	10,85 - 13,49	<0,0001
0 vs. 7	23,00	45,50	22,50	21,18 - 23,82	<0,0001
0 vs. 10	23,00	46,50	23,50	22,18 - 24,82	<0,0001
0 vs. 12	23,00	49,50	26,50	25,18 - 27,82	<0,0001
3 vs. 7	35,17	45,50	10,33	9,013 - 11,65	<0,0001
3 vs. 10	35,17	46,50	11,33	10,01 - 12,65	<0,0001
3 vs. 12	35,17	49,50	14,33	13,01 - 15,65	<0,0001
7 vs. 10	45,50	46,50	1,000	0,3203 - 2,320	0,2210
7 vs. 12	45,50	49,50	4,000	2,680 - 5,320	<0,0001
10 vs. 12	46,50	49,50	3,000	1,680 - 4,320	<0,0001

*Experimento 6:* En este se utilizaron bacilos muertos, a lo largo del tiempo se observó una estabilidad en la capacidad de infección de *M. leprae*, lo que indica que una vez ingresado en la célula de Schwann, se requiere que el bacilo este vivo, para infectar más células a lo largo del tiempo (Tabla 2.13. Figura 2.6.F).

**Tabla 2.13. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del porcentaje de células de Schwann infectadas por *M. leprae* (Exp 6) a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
	Media 1	Media 2	Diferencia de Medias	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	20,67	22,00	1,333	0,01306 - 2,654	0,0466
0 vs. 7	20,67	20,50	0,1667	-1,154 - 1,487	0,9965
0 vs. 10	20,67	19,50	1,167	- 0,1536 - 2,487	0,1077
0 vs. 12	20,67	25,50	4,833	3,513 - 6,154	<0,0001
3 vs. 7	22,00	20,50	1,500	0,1797 - 2,820	0,0182
3 vs. 10	22,00	19,50	2,500	1,180 - 3,820	<0,0001
3 vs. 12	22,00	25,50	3,500	2,180 - 4,820	<0,0001
7 vs. 10	20,50	19,50	1,000	-0,3203 - 2,320	0,2210
7 vs. 12	20,50	25,50	5,000	3,680 - 6,320	<0,0001
10 vs. 12	19,50	25,50	6,000	4,680 - 7,320	<0,0001

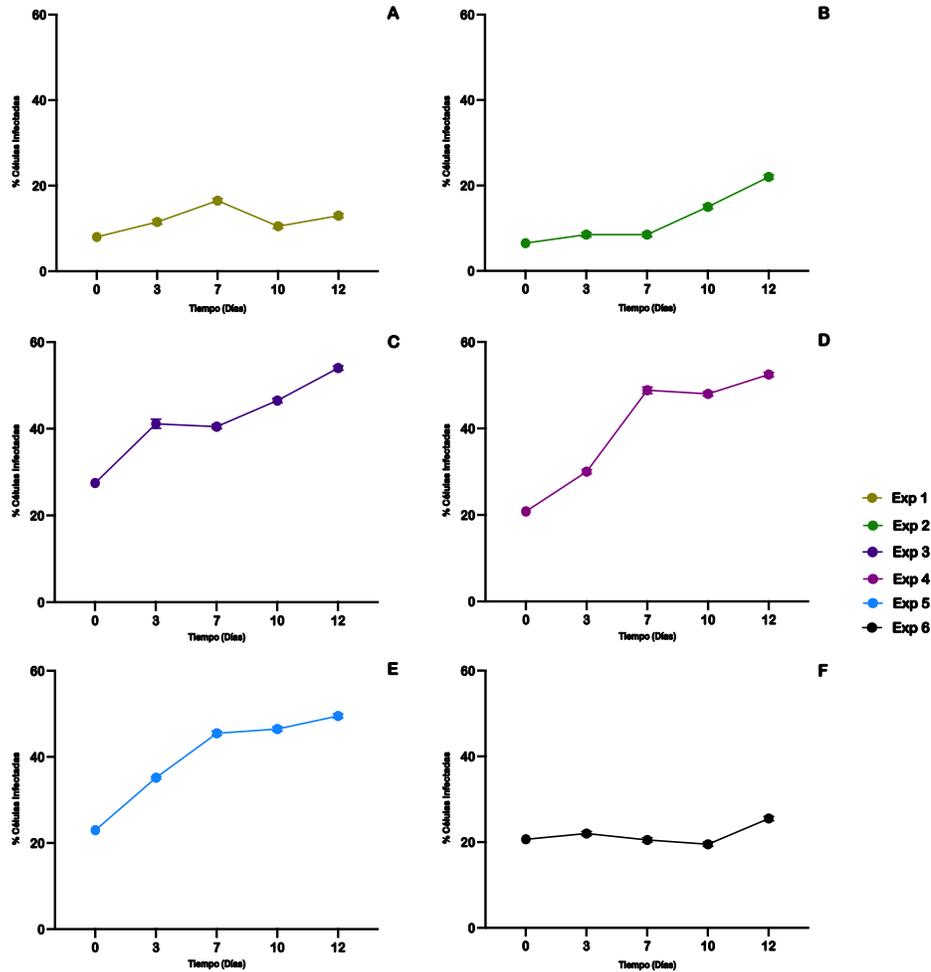


Figura 2.6. Tendencia del porcentaje de células de Schwann infectadas con *M. leprae* obtenido de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída. Experimentos 1, 3, 4 y 5 corresponde a los resultados de pacientes nuevos, el experimento 2 corresponde a los resultados de paciente de recaída y el experimento 6, bacilos muertos cepa Thai-53.

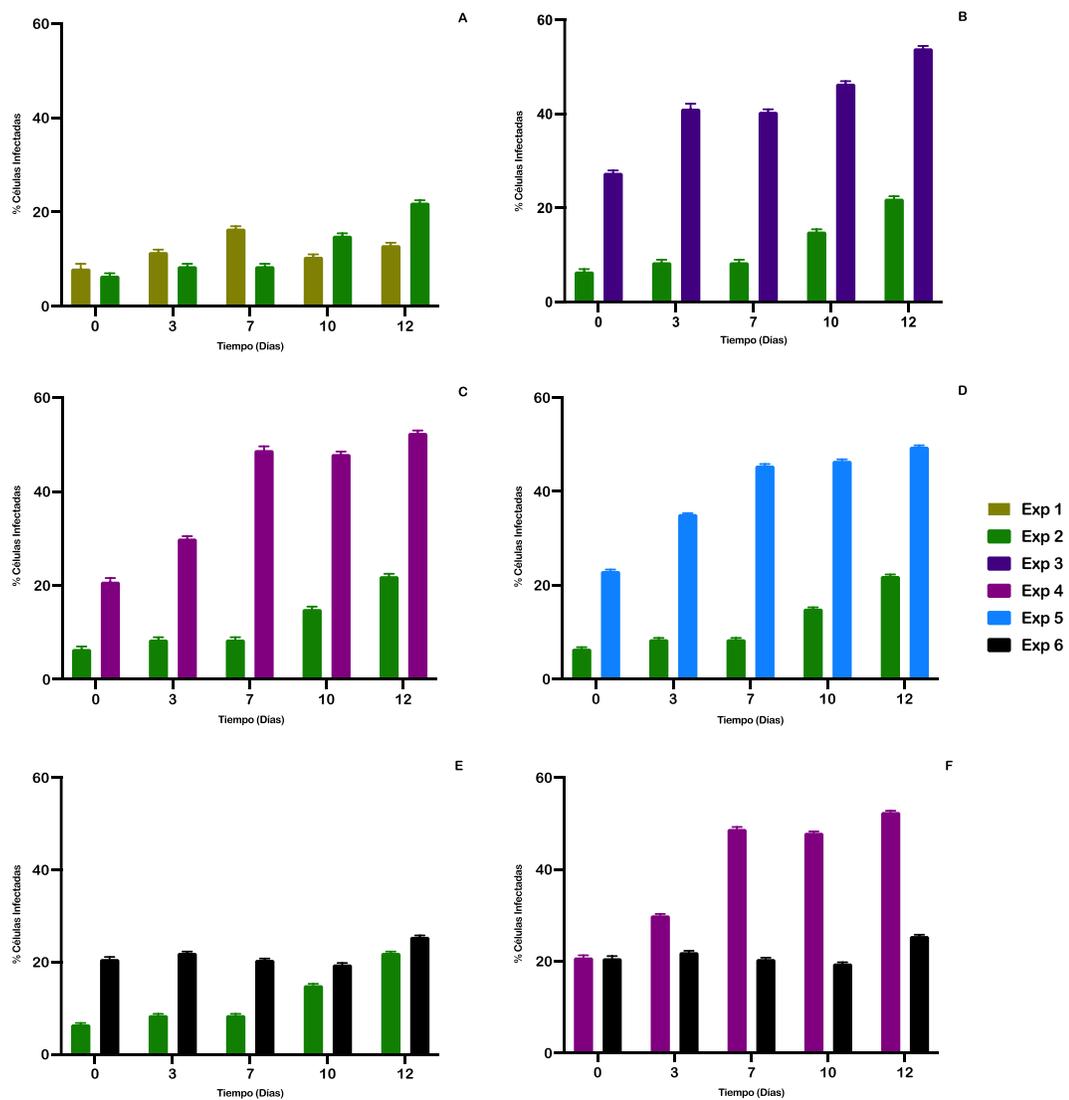
#### 2.4.4.3. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas entre cepas de *M. leprae* causantes de recaída con otras cepas analizadas

Se realizó la comparación del porcentaje de células Schwann infectadas con cepas de *M. leprae* del experimento 2 (cepa causante de recaída) con los experimentos 1, 3, 4, 5 (cepas de pacientes nuevos) y el experimento 6 (cepa de *M. leprae* Thai-53) (Figura 2.7). Cuando se comparan los experimentos 2 y 3, 2 y 4 y 2 y 5 (que corresponden a una cepa de *M. leprae* obtenido de un paciente recaída Vs *M. leprae* el obtenido de pacientes nuevos), se observa un aumento en el porcentaje de las células infectadas a través del tiempo (Figura 2.7).

Es importante notar que la capacidad de infección de las cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes nuevos siempre es mayor, excepto cuando se comparó el experimento 2 y el experimento 1, estas cepas infectaron entre el 6% y el 9% en el tiempo 0. En el caso de la cepa de *M. leprae* del

experimento 1, aumentó su capacidad infectiva en los días 3 y 7, pero disminuyó en los días 10 y 12, caso contrario a la cepa de *M. leprae* del experimento 2 que aumentó su capacidad infectiva en los días 10 y 12 (Figura 2.7 A).

En la figura 2.7F, podemos comparar el porcentaje de infección a lo largo del tiempo de *M. leprae* obtenido de un paciente nuevo con la cepa *M. leprae* Thai-53 control (bacilos muertos) (Exp 6), observando que las células de Schwann permiten el ingreso de bacilos muertos (Tabla 2.13.) mientras que el experimento con bacilos de pacientes nuevos se incrementa dramáticamente hasta el día 12. Esto implica la necesidad de viabilidad de *M. leprae* para aumentar el número de células infectadas a través del tiempo.



**Figura 2.7. Comparación del porcentaje de células de Schwann infectadas con *M. leprae* obtenido de un paciente con un evento de recaída Vs *M. leprae* obtenidos de pacientes nuevos. A) Exp 1 Vs Exp 2, B) Exp 2 Vs Exp 3, C) 7 Exp 2 Vs Exp 4, D) Exp 2 Vs Exp 5, E) Exp 2 Vs Exp 6 y F) Exp 4 Vs Exp 6. Experimentos 1, 3, 4 y 5 corresponden a los resultados de pacientes nuevos, el experimento 2**

corresponde a los resultados de paciente de recaída y el experimento 6, bacilos muertos cepa Tahí-53. Los valores graficados corresponden al porcentaje de células infectadas  $\pm$  SEM derivados de tres infecciones paralelas e independientes.

## 2.4.5. Evaluación de la multiplicación de *M. leprae* durante la infección de las células de Schwann

### 2.4.5.1. Comparación del número de bacilos por célula infectada en cada punto del tiempo

Las laminas porta objetos de cada pozo se tiñeron por la técnica de ZN; en cada caso se contó el número de bacilos en 200 células. Los resultados obtenidos indicaron que existe una variación en el número de bacilos infectantes en cada uno de los tiempos analizados. En la Figura 2.8. se observa el promedio del número de bacilos de cada experimento en cada uno de los tiempos analizados, las cepas de estudio mostraron diferencias en la capacidad de multiplicación a través del tiempo. Esto evidencia que la viabilidad de *M. leprae* es fundamental para la infección y multiplicación en las células de Schwann. En las tablas 2.14 a 2.18. se muestran los resultados del análisis de ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey en cada uno de los tiempos.

**Tabla 2.14. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* por célula de Schwann infectada a 2 horas post-infección**

Análisis de ANOVA			
F			12,64
Valor de p			0,0002
¿Diferencia significativa entre medias (p <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,8404
Prueba de comparaciones múltiples de Tukey			
	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
Exp 1 vs. Exp 2	0,03400	-0,5365 - 0,4685	0,9999
Exp 1 vs. Exp 3	0,8893	0,3869 - 1,392	0,0007
Exp 1 vs. Exp 4	0,2533	0,2491 - 0,7558	0,5599
Exp 1 vs. Exp 5	0,2077	0,2948 - 0,7101	0,7332
Exp 1 vs. Exp 6	0,7557	0,2532 - 1,258	0,0030
Exp 2 vs. Exp 3	0,8553	0,3529 - 1,358	0,0010
Exp 2 vs. Exp 4	0,2193	-0,7218 - 0,2831	0,6899
Exp 2 vs. Exp 5	0,1737	-0,6761 - 0,3288	0,8466
Exp 2 vs. Exp 6	0,7217	0,2192 - 1,224	0,0043
Exp 3 vs. Exp 4	0,6360	0,1335 - 1,138	0,0111
Exp 3 vs. Exp 5	0,6817	0,1792 - 1,184	0,0067
Exp 3 vs. Exp 6	0,1337	-0,3688 - 0,6361	0,9409
Exp 4 vs. Exp 5	0,04567	-0,4568 - 0,5481	0,9995
Exp 4 vs. Exp 6	0,5023	0,0001474 - 1,005	0,0501
Exp 5 vs. Exp 6	0,5480	0,04552 - 1,050	0,0300

**Tabla 2.15. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* por célula de Schwann infectada 3 días post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
F			183,4
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9871
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
Exp 1 vs. Exp 2	0,1197	-0,1952 - 0,4346	0,7919
Exp 1 vs. Exp 3	0,4783	0,1634 - 0,7932	0,0027
Exp 1 vs. Exp 4	2,079	1,764 - 2,394	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	1,698	1,383 - 2,013	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	0,8560	0,5411 - 1,171	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	0,5980	0,2831 - 0,9129	0,0004
Exp 2 vs. Exp 4	2,199	1,884 - 2,514	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	1,818	1,503 - 2,133	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	0,9757	0,6608 - 1,291	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	1,601	1,286 - 1,916	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 5	1,220	0,9048 - 1,535	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	0,3777	0,06276 - 0,6926	0,0162
Exp 4 vs. Exp 5	0,3813	0,06643 - 0,6962	0,0151
Exp 4 vs. Exp 6	1,223	0,9084 - 1,538	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	0,8420	0,5271 - 1,157	<0,0001

**Tabla 2.16. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* por célula de Schwann infectada 7 días post-infección**

<b>Análisis de ANOVA</b>			
F			183,4
Valor de P			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9871
<b>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey</b>			
	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor P ajustado
Exp 1 vs. Exp 2	0,02267	0,2775 - 0,3229	0,9998
Exp 1 vs. Exp 3	0,8840	0,5838 - 1,184	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	1,976	1,676 - 2,277	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	1,992	1,692 - 2,292	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	1,041	0,7405 - 1,341	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 3	0,8613	0,5611 - 1,162	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	1,954	1,653 - 2,254	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	1,969	1,669 - 2,270	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	1,018	0,7178 - 1,318	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 4	1,092	0,7921 - 1,393	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 5	1,108	0,8078 - 1,408	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	0,1567	-0,4569 - 0,1435	0,5262

Exp 4 vs. Exp 5	-0,01567	-0,3159 - 0,2845	>0,9999
Exp 4 vs. Exp 6	0,9357	0,6355 - 1,236	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	0,9513	0,6511 - 1,252	<0,0001

**Tabla 2.17. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* por célula de Schwann infectada 10 días post-infección**

Análisis de ANOVA			
F			73,03
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9682
Prueba de comparaciones múltiples de Tukey			
	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
Exp 1 vs. Exp 2	0,2273	0,1237 - 0,5783	0,3151
Exp 1 vs. Exp 3	1,460	1,109 - 1,811	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	0,7887	0,4377 - 1,140	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	0,9780	0,6270 - 1,329	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	0,4047	0,05367 - 0,7557	0,0210
Exp 2 vs. Exp 3	1,687	1,336 - 2,038	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	1,016	0,6650 - 1,367	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	1,205	0,8543 - 1,556	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 6	0,6320	0,2810 - 0,9830	0,0006
Exp 3 vs. Exp 4	0,6710	0,3200 - 1,022	0,0004
Exp 3 vs. Exp 5	0,4817	0,1307 - 0,8327	0,0061
Exp 3 vs. Exp 6	1,055	0,7040 - 1,406	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	0,1893	0,1617 - 0,5403	0,4936
Exp 4 vs. Exp 6	0,3840	0,03300 - 0,7350	0,0294
Exp 5 vs. Exp 6	0,5733	0,2223 - 0,9243	0,0015

**Tabla 2.18. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* por célula de Schwann infectada 12 días post-infección**

Análisis de ANOVA			
F			108,1
Valor de p			<0,0001
¿Diferencia significativa entre medias (P <0,05)?			Si
R-cuadrado			0,9783
Prueba de comparaciones múltiples de Tukey			
	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
Exp 1 vs. Exp 2	0,1323	0,1753 - 0,4399	0,7018
Exp 1 vs. Exp 3	1,564	1,256 - 1,872	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 4	1,400	1,092 - 1,707	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 5	0,7673	0,4597 - 1,075	<0,0001
Exp 1 vs. Exp 6	0,2347	0,07295 - 0,5423	0,1807
Exp 2 vs. Exp 3	1,432	1,124 - 1,739	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 4	1,267	0,9597 - 1,575	<0,0001
Exp 2 vs. Exp 5	0,6350	0,3274 - 0,9426	0,0002

Exp 2 vs. Exp 6	0,1023	a 0,2053 - 0,4099	0,8652
Exp 3 vs. Exp 4	0,1643	a 0,4719 - 0,1433	0,5032
Exp 3 vs. Exp 5	0,7967	0,4891 - 1,104	<0,0001
Exp 3 vs. Exp 6	1,329	1,022 - 1,637	<0,0001
Exp 4 vs. Exp 5	0,6323	0,3247 - 0,9399	0,0002
Exp 4 vs. Exp 6	1,165	0,8574 - 1,473	<0,0001
Exp 5 vs. Exp 6	0,5327	0,2251 - 0,8403	0,0009

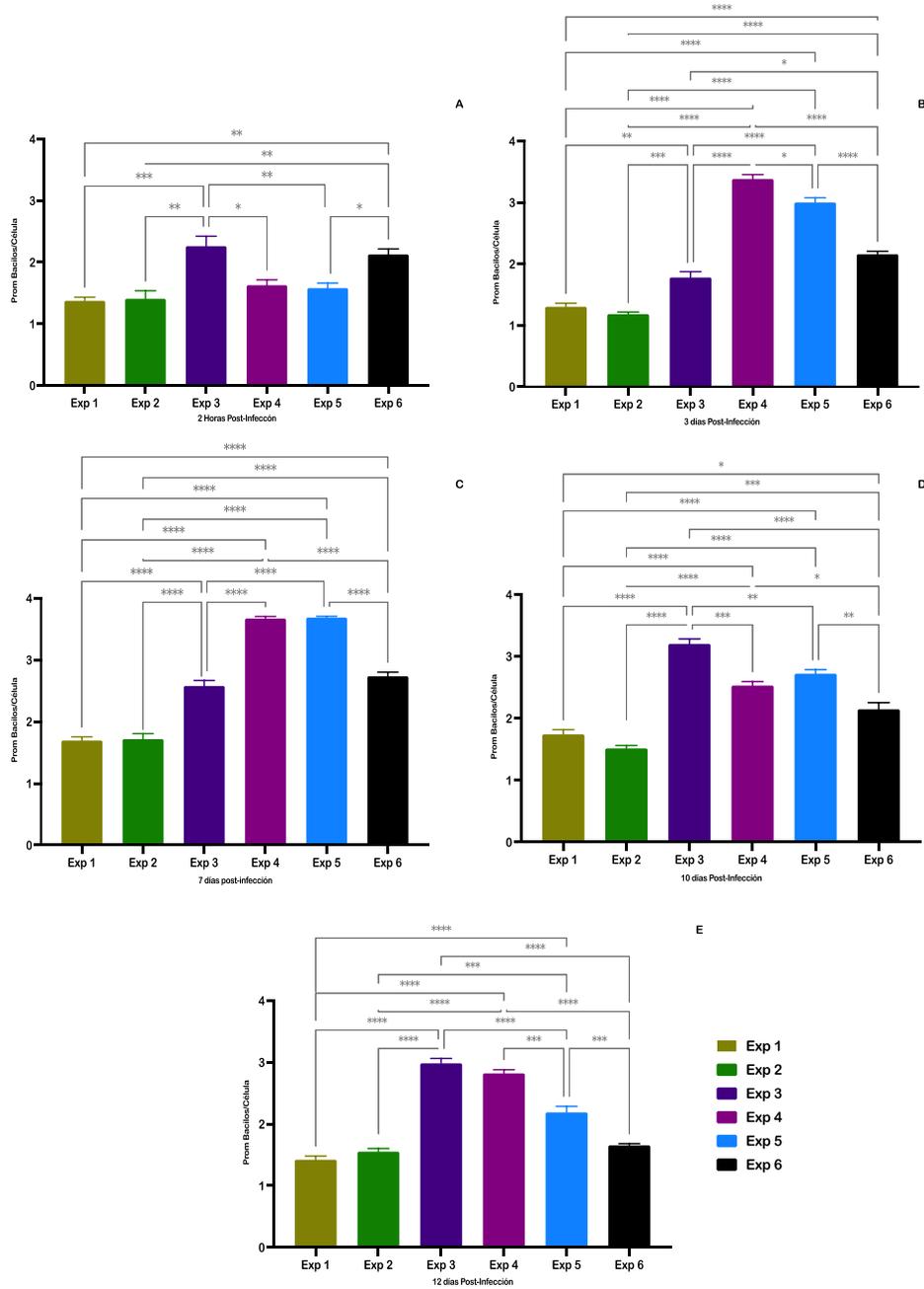


Figura 2.8. Comparación del número de bacilos por célula de Schwann infectada con *M. leprae* obtenido de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída en cada punto de tiempo analizado. A) 2 Horas, B) 3 días, C) 7 días, D) 10 días y E) 12 días Post-Infección. Transcurrido el tiempo

post-infección las células fueron fijadas y teñidas con la coloración de ZN. Experimentos 1, 3, 4 y 5 corresponden a los resultados de pacientes nuevos, el experimento 2 corresponde a los resultados de paciente de recaída y el experimento 6, bacilos muertos cepa Tahi-53. Los valores graficados corresponden al porcentaje de células infectadas  $\pm$  SEM derivados de tres infecciones paralelas e independientes. Los asteriscos indican los análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba Tukey's para cada tiempo  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,001$  y \*\*\* $P < 0,0001$ .

#### 2.4.5.2. Comparación del número de bacilos de *M. leprae* por célula de Schwann infectada y su multiplicación en el tiempo

En la Figura 2.9. se observa el promedio del número (multiplicación) de bacilos de cada experimento en cada uno de los tiempos analizados, En los tiempos 3 y 7 las cepas de los experimentos que utilizaron bacilos vivos mostraron un aumento progresivo en el número de bacilos por célula infectada indicando que a partir de este día *M. leprae* se multiplica en el modelo utilizado (Tablas 2.19 a 2.24). En el caso de la cepa proveniente del paciente de recaída el aumento en el número de bacilos por célula infectada se da en el día 7, esto se relaciona con los resultados obtenidos en el porcentaje de infección de las células de Schwann. El control de multiplicación el Experimento 6 corresponde a bacilos muertos de la cepa Thai-53, los que no muestran cambios en el número de bacilos por célula indicando que no hay multiplicación de estos.

**Tabla 2.19. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* (Exp 1) por célula a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
Tiempo	Media 1	Media 2	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor P ajustado
0 vs. 3	1,375	1,304	0,07100	0,2331 - 0,3751	0,9647
0 vs. 7	1,375	1,696	0,3210	0,01688 - 0,6251	0,0336
0 vs. 10	1,375	1,744	0,3690	0,06488 - 0,6731	0,0098
0 vs. 12	1,375	1,423	0,04800	-0,3521 a 0,2561	0,9918
3 vs. 7	1,304	1,696	0,3920	0,08788-0,6961	0,0052
3 vs. 10	1,304	1,744	0,4400	0,1359-0,7441	0,0013
3 vs. 12	1,304	1,423	0,1190	0,1851-0,4231	0,8056
7 vs. 10	1,696	1,744	0,04800	0,2561-0,3521	0,9918
7 vs. 12	1,696	1,423	0,2730	-0,03112 - 0,5771	0,0987
10 vs. 12	1,744	1,423	0,3210	0,01688 - 0,6251	0,0336

**Tabla 2.20. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* (Exp 2) por célula a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
	Media 1	Media 2	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor P ajustado
0 vs. 3	1,409	1,184	0,2247	0,07945 - 0,5288	0,2432
0 vs. 7	1,409	1,719	0,3097	0,005551 - 0,6138	0,0440
0 vs. 10	1,409	1,517	0,1077	0,1964 - 0,4118	0,8563
0 vs. 12	1,409	1,555	0,1463	0,1578 - 0,4504	0,6594
3 vs. 7	1,184	1,719	0,5343	0,2302 - 0,8384	<0,0001
3 vs. 10	1,184	1,517	0,3323	0,02822 - 0,6364	0,0255

3 vs. 12	1,184	1,555	0,3710	0,06688 - 0,6751	0,0093
7 vs. 10	1,719	1,517	0,2020	0,1021 - 0,5061	0,3455
7 vs. 12	1,719	1,555	0,1633	0,1408 - 0,4674	0,5598
10 vs. 12	1,517	1,555	0,03867	a 0,2654 - 0,3428	0,9964

**Tabla 2.21. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* (Exp 3) por célula a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
Tiempo	Media 1	Media 2	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	2,264	1,782	0,4820	0,1779 - 0,7861	0,0003
0 vs. 7	2,264	2,580	0,3157	0,01155 - 0,6198	0,0382
0 vs. 10	2,264	3,204	0,9393	0,6352 - 1,243	<0,0001
0 vs. 12	2,264	2,987	0,7227	0,4186 - 1,027	<0,0001
3 vs. 7	1,782	2,580	0,7977	0,4936 - 1,102	<0,0001
3 vs. 10	1,782	3,204	1,421	1,117 - 1,725	<0,0001
3 vs. 12	1,782	2,987	1,205	0,9006 - 1,509	<0,0001
7 vs. 10	2,580	3,204	0,6237	0,3196 - 0,9278	<0,0001
7 vs. 12	2,580	2,987	0,4070	0,1029 - 0,7111	0,0034
10 vs. 12	3,204	2,987	0,2167	0,08745 - 0,5208	0,2768

**Tabla 2.22. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* (Exp 4) por célula a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
	Media 1	Media 2	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor P ajustado
0 vs. 3	1,628	3,383	1,755	1,451 - 2,059	<0,0001
0 vs. 7	1,628	3,672	2,044	1,740 - 2,348	<0,0001
0 vs. 10	1,628	2,533	0,9043	0,6002 - 1,208	<0,0001
0 vs. 12	1,628	2,823	1,194	0,8902 - 1,498	<0,0001
3 vs. 7	3,383	3,672	0,2890	0,01512 - 0,5931	0,0702
3 vs. 10	3,383	2,533	0,8507	0,5466 - 1,155	<0,0001
3 vs. 12	3,383	2,823	0,5607	0,2566 - 0,8648	<0,0001
7 vs. 10	3,672	2,533	1,140	0,8356 - 1,444	<0,0001
7 vs. 12	3,672	2,823	0,8497	0,5456 - 1,154	<0,0001
10 vs. 12	2,533	2,823	0,2900	0,01412 - 0,5941	0,0687

**Tabla 2.23. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* (Exp 5) por célula a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
	Media 1	Media 2	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	1,583	3,002	-1,419	1,115 - 1,723	<0,0001
0 vs. 7	1,583	3,688	-2,105	1,801 - 2,409	<0,0001
0 vs. 10	1,583	2,722	-1,139	0,8352 - 1,443	<0,0001
0 vs. 12	1,583	2,190	-0,6077	0,3036 - 0,9118	<0,0001
3 vs. 7	3,002	3,688	-0,6860	0,3819 - 0,9901	<0,0001
3 vs. 10	3,002	2,722	0,2800	-0,02412 - 0,5841	0,0852
3 vs. 12	3,002	2,190	0,8117	0,5076 - 1,116	<0,0001

7 vs. 10	3,688	2,722	0,9660	0,6619 - 1,270	<0,0001
7 vs. 12	3,688	2,190	1,498	1,194 - 1,802	<0,0001
10 vs. 12	2,722	2,190	0,5317	0,2276 - 0,8358	<0,0001

**Tabla 2.24. Resultados del análisis ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de bacilos de *M. leprae* (Exp 6) por célula a través del tiempo**

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey					
	Media 1	Media 2	Diferencia Media	Intervalo de confianza 95%,	Valor p ajustado
0 vs. 3	2,131	2,160	0,02933	-0,3334 a 0,2748	0,9988
0 vs. 7	2,131	2,737	0,6060	0,3019 - 0,9101	<0,0001
0 vs. 10	2,131	2,149	0,01800	-0,3221 - 0,2861	0,9998
0 vs. 12	2,131	1,658	0,4730	0,1689 - 0,7771	0,0005
3 vs. 7	2,160	2,737	0,5767	0,2726 - 0,8808	<0,0001
3 vs. 10	2,160	2,149	0,01133	-0,2928 - 0,3154	>0,9999
3 vs. 12	2,160	1,658	0,5023	0,1982 - 0,8064	0,0002
7 vs. 10	2,737	2,149	0,5880	0,2839 - 0,8921	<0,0001
7 vs. 12	2,737	1,658	1,079	0,7749 - 1,383	<0,0001
10 vs. 12	2,149	1,658	0,4910	0,1869 - 0,7951	0,0003

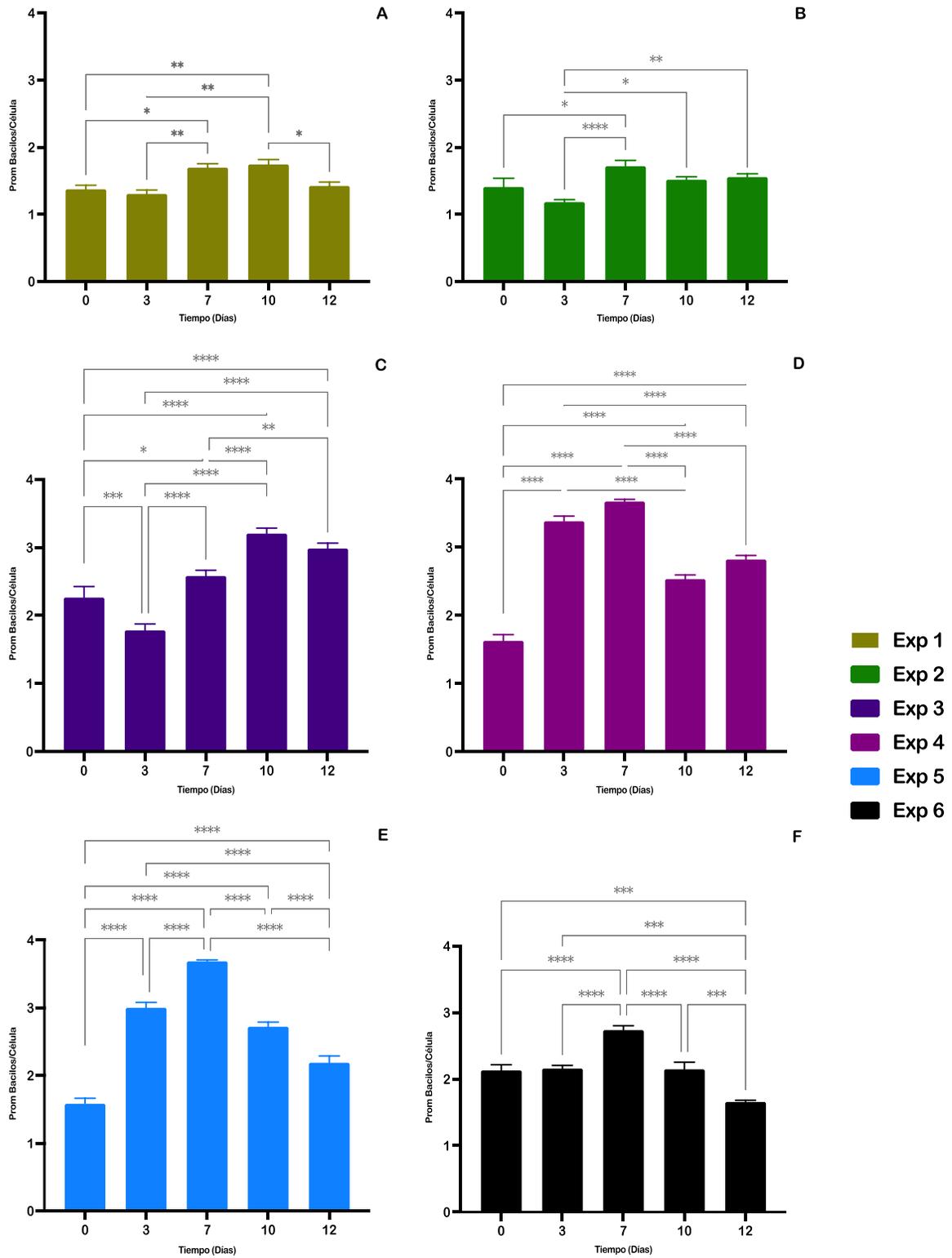


Figura 2.9. Número de bacilos por célula de Schwann infectada con *M. leprae* obtenido de pacientes colombianos de casos nuevos y de recaída. A) Exp 1, B) Exp 2, C) Exp 3, D) Exp 4 y E) Exp 5 y F) Exp 6. Transcurrido el tiempo post-infección las células fueron fijadas y teñidas con la coloración

de ZN. Experimentos 1, 3, 4 y 5 corresponden a los resultados de pacientes nuevos, el experimento 2 corresponde a los resultados de paciente de recaída y el experimento 6, bacilos muertos cepa Tahi-53. Los valores graficados corresponden al porcentaje de células infectadas  $\pm$  SEM derivados de tres infecciones paralelas e independientes. Los asteriscos indican los análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba Tukey's para cada tiempo  $P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $*P < 0,001$  y  $***P < 0,0001$ .

## 2.5. Discusión

La característica clínica más severa de la lepra es el desarrollo de neuropatías y es una consecuencia de la infección de las células de Schwann por *M. leprae*. En la lepra multibacilar, se observa una gran cantidad de bacilos intracelulares en las células de Schwann en los nervios periféricos [51], la degeneración axonal producida por esta no solo genera discapacidad, sino también pérdida ósea y atrofia muscular debido a la pérdida de sensibilidad y complicaciones asociadas que afectan los tejidos adyacentes a la piel [15]. Estas condiciones han determinado que la lepra sea una de las enfermedades más temidas y estigmatizadas por la humanidad [64].

La capacidad de invasión inicial y posterior multiplicación de *M. leprae* en las células de Schwann es un proceso crítico dentro de la lepra. Se conoce que estas células en pacientes con la enfermedad pueden albergar a *M. leprae* durante un extenso periodo de tiempo, toda vez que las células de Schwann protegen de la respuesta inmune y no son fagocitos profesionales [162]. La permanencia bacteriana en las células de Schwann favorece su supervivencia y multiplicación, la cual es extremadamente lenta, durante la infección temprana y permite a lo largo del tiempo la invasión del tejido nervioso circundante y más allá, lo que convierte a las células de Schwann en un blanco importante [64].

En el presente estudio, se evaluó *in vitro*, con células de Schwann humanas la interacción de diferentes cepas de *M. leprae* obtenidos de pacientes nuevos y pacientes con casos recurrentes de lepra.

Además del estilo de vida intracelular estrictamente obligado, el bacilo de la lepra requiere una temperatura corporal más baja para su supervivencia y multiplicación, por lo que en el humano se observa un crecimiento bacteriano en tejidos periféricos, la piel y los testículos donde la temperatura corporal periférica es relativamente más baja [4,51]. En el armadillo de nueve bandas, la temperatura corporal es de 33 a 35°C y *M. leprae* se propaga tanto en tejidos periféricos como en órganos internos, como el hígado [164,165].

Las condiciones experimentales utilizadas en este estudio y en estudios previos, han demostrado que una temperatura de 37°C es desfavorable para la viabilidad intracelular de *M. leprae*, por lo que se utilizó una incubación a una temperatura de 33°C que es óptima para realizar la infección de las células de Schwann con *M. leprae* [166]. Hagge y colaboradores [167] informaron que *M. leprae* mostro una viabilidad del 56% en las células de Schwann durante 3 semanas después de la

infección a 33°C, en comparación con la viabilidad del 3,6% a 37°C [167]. Además, se observó que las condiciones empleadas en este estudio permitieron mantener los cultivos infectados hasta por 12 días sin que la monocapa se desprendiera por resequedad o por acción de los productos de la infección con *M. leprae*.

Cuando se evaluó el porcentaje de infección de las células de Schwann en contacto con cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes con eventos recurrentes y nuevos se encontró un comportamiento diferencial, mostrando que *M. leprae* proveniente de un paciente de recaída aumenta su capacidad infectiva a los 7 días post-infección en comparación con el *M. leprae* proveniente de pacientes nuevos este aumenta de manera constante desde el día 3 post-infección. Para el día 12 se observó una infección celular que varió entre 13 y el 54%; esto se relaciona con los resultados presentados por Díaz Acosta y colaboradores, en donde se demuestra que las células de Schwann pueden alcanzar hasta un 80% de infección con el bacilo de la lepra [78].

Al utilizar una cepa de *M. leprae* muerto, este alcanzó un 26% de interacción con células de Schwann. Este resultado está de acuerdo con lo observado por Díaz y colaboradores en los cuales se estableció que el porcentaje de asociación de las células de Schwann con bacilos *M. leprae* muertos disminuye a menos del 50% [78]. Nuestros resultados demuestran que la viabilidad del bacilo es fundamental para aumentar el número de células infectadas a través del tiempo; esto también se soporta con los resultados de la capacidad de infección de *M. leprae* proveniente de pacientes con recaída Vs los provenientes de pacientes nuevos, los cuales tienen un comportamiento diferencial que se puede deber a debido a un proceso metabólico disminuido en el primer caso.

Aunque la respuesta inmune del hospedero frente a *M. leprae* juega un papel importante en el desarrollo clínico de la lepra, es la bacteria y su capacidad de propagación en el tejido periférico, como el PNS y la piel, lo que establece una infección productiva que favorece un escenario para un proceso infeccioso posterior [64]. Además, la respuesta de las células tisulares a una alta carga bacteriana, podrían dar lugar a condiciones patológicas características, especialmente en nichos específicos como las células de Schwann, donde el tráfico de las células inmunes es mínimo. Este es el caso de pacientes con lepra multibacilar, que albergan una alta carga bacilar en los tejidos [61,64,168].

En este estudio también se evaluó el número de bacilos por célula infectada. Nuestros resultados mostraron que el número de bacilos infectantes no dependen de la cantidad de bacilos presentes en cada suspensión inicial obtenida ( $r=0,295$ ), confirmando que no se requiere la viabilidad del bacilo para la interacción inicial de *M. leprae* con las células de Schwann, pero sí para el aumento de la infección a través del tiempo, también confirmando los resultados obtenidos por Díaz Acosta y col en el 2018 [71]. A su vez, la carga bacilar inicial (suspensión) sí se pudo explicar ( $r = 0,919$ ) por el IB determinado en el momento de la toma de estas biopsias a los pacientes donantes, lo que nos confirma que la viabilidad o actividad del bacilo sí son determinantes para su capacidad infectiva.

## 2.6. Conclusiones

1. Cuando se realizó el cultivo inicial de las células de Schwann humanas, se encontró que las células requirieron un mayor tiempo de incubación (alrededor de 20 días) después del proceso de descongelado y el crecimiento máximo alcanzado fue del 70%, por lo que se requirió realizar pases a las células y así estimular la multiplicación celular.
2. Las condiciones experimentales utilizadas en este estudio nos permitieron mantener los cultivos infectados hasta por 12 días sin que la monocapa se desprendiera por resequedad o por acción de los productos de la infección con *M leprae*.
3. La capacidad infectiva de cepas de *M. leprae* depende de la viabilidad del bacilo; cuando se infectan las células con *M. leprae* provenientes de pacientes nuevos, esta aumenta desde el día 0-3 post-infección y alcanza su pico máximo entre los días 7 y 10 días post-infección. En el caso de las cepas provenientes de pacientes con casos recurrentes de la enfermedad (previamente tratados), la capacidad infectiva aumenta desde el día 7 post-infección y se mantiene constante hasta el día 12; esta diferencia puede ser debida a un metabolismo disminuido.
4. La carga bacilar inicial si se pudo explicar ( $r = 0,919$ ) por el IB determinado en el momento de la toma de estas biopsias a los pacientes donantes, lo que nuevamente nos confirma que la viabilidad o actividad del bacilo son determinantes de su ingreso a las células de Schwann que no son fagocitos profesionales y por lo tanto necesitan de las interacciones facilitadas por el bacilo.

### **3. Perfil transcripcional en un modelo de infección de células de Schwann, de cepas de *Mycobacterium leprae* colombianas implicadas o no, en eventos de recurrencia de la lepra**

#### **3.1. Resumen**

*M. leprae* es un patógeno intracelular obligado no cultivable al parecer, entre otros, a la evolución reductiva de su genoma, por lo que acumula un gran número de pseudogenes. Debido a sus características genómicas y las limitaciones para el cultivo en medio artificiales, ha sido muy limitada la información sobre el comportamiento transcripcional de *M. leprae* en diferentes condiciones de infección.

El objetivo del presente estudio fue identificar el conjunto de genes que se transcriben en *M. leprae* proveniente de lesiones de pacientes durante su proceso de infección en un modelo de células de Schwann. Específicamente, el análisis de transcripción se realizó mediante la secuenciación de ARN (ARNseq) de *M. leprae* obtenido a partir de muestras de biopsias de piel provenientes del diagnóstico inicial y durante la recurrencia de la enfermedad, y puesto a infectar células de Schwann.

Nuestros resultados revelan que, durante el proceso de infección, un aumento en la actividad de genes involucrados en la virulencia y genes codificantes de proteínas de choque térmico que posiblemente favorecen la supervivencia de *M. leprae* en condiciones de estrés o durante el cultivo *in vitro*. Por otra parte, se realizaron ensayos de qPCR, para evaluar los niveles de expresión de siete genes implicados en la síntesis de PGL-1, durante la infección de células de Schwann en un periodo de 12 días. Los resultados mostraron que las cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes con recaída aumentan los niveles de los genes evaluados a los 7 días post-infección. Por el contrario, las cepas provenientes de pacientes nuevos la expresión de estos aumentó en el día 3 post-infección. Pudimos encontrar que las cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes de recaída tienen un metabolismo disminuido, cuando se compara con las cepas de pacientes nuevos.

**Palabras clave:** *M. leprae*, ARN-seq, Transcritoma, Glicolípido fenólico-1

## 3.2. Introducción

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *M. leprae* y afecta principalmente al sistema nervioso periférico, la piel y otros tejidos como el sistema retículo-endotelial, huesos, articulaciones, membranas mucosas, ojos, testículos, músculos y las glándulas suprarrenales [4]. La neuropatía se presenta en diferentes formas clínicas, por lo que los determinantes bacterianos y la respuesta inmune del hospedero probablemente juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad, aunque los mecanismos mediante los que cada uno contribuye a la lesión nerviosa son poco conocidos. Estudios *in vitro* sugieren que *M. leprae* causa directamente la desmielinización al infectar y de-diferenciar las células de Schwann que mielinizan los nervios periféricos [66].

*M. leprae* fue el primer patógeno humano identificado con el microscopio, se trata de un bacilo intracelular obligado que nunca se ha cultivado con éxito *in vitro*, con un tiempo de generación de 14 días, uno de los más largos conocidos para una bacteria y al parecer una de las principales razones de su prolongado periodo de incubación en los pacientes [4,115]. Como resultado del crecimiento restringido, se han desarrollado modelos animales como el cojinete plantar del ratón y el del armadillo de nueve bandas, sistemas que han proporcionado recursos básicos para estudios genéticos, metabólicos y antigénicos del bacilo [119]. En el armadillo de nueve bandas, *M. leprae* manifiesta una diseminación sistémica que produce cambios estructurales y patológicos similares a las observadas en los tejidos y nervios de los seres humanos con la enfermedad [120].

La secuenciación del genoma de *M. leprae* proporcionó gran cantidad de información sobre este bacilo, la que se ha utilizado para comprender su comportamiento genómico y fenotípico [9]. El genoma de *M. leprae* contiene 3.27 Mb, de los que solo 1.614 ORFs (*open reading frame, sigla en inglés*) (49,6%) corresponden a genes codificadores de proteínas. Una de las características notables del genoma de *M. leprae* es la existencia de 1.310 pseudogenes (41%) y que aparentemente el 9,4% restante de su genoma no codifica para genes. Estas últimas podrían corresponder a secuencias reguladoras o genes residuales, que no pueden reconocerse por su gran cantidad de mutaciones acumuladas [8,9,121]. La reducción masiva del genoma de *M. leprae* probablemente se produjo por una fuerte alteración en su estilo de vida [51], que condujo a que el 50% de los genes se convirtieran en pseudogenes [121]. Se ha demostrado que *M. leprae* evolucionó reteniendo un conjunto mínimo de genes que corresponde a familias esenciales y se eliminaron varias vías metabólicas que limitó sus condiciones de crecimiento [8,9,122].

El tropismo tisular de un patógeno bacteriano está determinado tanto por el huésped como por los componentes bacterianos. En las micobacterias patógenas, se ha propuesto que su pared bacteriana contienen la mayoría de los elementos asociados con la patogénesis de la enfermedad [169,170]. Estos componentes específicos además pueden dirigir al patógeno a sus nichos favoritos. La pared celular de *M. leprae* contiene una extensa capa externa (electro transparente), compuesta, entre otros por phthiocerol dimycocerosato (PDIM) y glicolípidos relacionados incluyendo principalmente el glicolípido fenólico - 1 (PGL-1), específico de *M. leprae*, que consiste

básicamente en un núcleo lipídico llamado Fenol- phthiocerol dimycocerosato (conservado en otras especies micobacterianas). El PGL-1 (glicolipido fenólico-1), es una de las moléculas que se sospecha son críticas en la patogenia de la lepra [76]. El PGL-1 contiene un trisacárido antigénicamente distinto que consiste en 3,6-di-o-metil- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-o-metil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1,2)-3-o-metil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil, antigénicamente único [69,70] y que no se ha encontrado en ninguna otra especie de las mycobacterias y bacterias en general [76,171].

Se ha observado que PGL-1 está involucrado en la afinidad única de *M. leprae* por los nervios periféricos. La posición de PGL-1 en la superficie más externa del bacilo de la lepra es ideal para interactuar con los componentes de la célula hospedera. Se ha propuesto la posición trisacárido de PGL-1 promueve la invasión de las células de Schwann y por lo tanto puede ser responsable de la capacidad única de *M. leprae* para invadir los nervios periféricos [24].

La vía de biosíntesis de PGL involucra más de 20 pasos enzimáticos, y los pasos necesarios para la formación del núcleo lipídico son comunes en todas las micobacterias que contienen PGL. Por el contrario, la porción sacárido de PGL es específico en cada micobacteria. En un estudio realizado por Tabouret en el 2010 [172], se reportaron los genes de *M. leprae* involucrados en la síntesis de PGL-1 (Tabla 3.1.).

**Tabla 3.1. Genes implicados en la formación del dominio sacárido de PGL-1 en *M. leprae***

Proteínas	Función homóloga más cercana	% Iden (% Simil)	Función propuesta	Ref
ML0126	MUL1999 (Metiltransferasa involucrada en la metilación de la posición 3 del residuo ramnosil de PGL en <i>M. ulcerans</i> )	69 (81)	Metilación de la posición 3 del primer residuo de ramnosa	[172]
ML0127	Rv2959c (Metiltransferasa involucrada en la metilación de la posición 2 del residuo ramnosil de PGL en <i>M. tuberculosis</i> )	76 (86)	Metilación de la posición 2 del segundo residuo ramnosil	[173–175]
ML0128	Rv2958c (Glicosiltransferasa involucrada en transferencia del segundo residuo ramnosil de PGL en <i>M. tuberculosis</i> )	75 (84)	Transferencia del segundo residuo ramnosil	[173–175]
ML2346c			Metilación del residuo glicosil	[172]
ML2347			Metilación del residuo glicosil	[172]
ML2348	Rv1524 (Glicosiltransferasa en <i>M. tuberculosis</i> )		Ramnosil transferasa	[33]

La tabla se adaptó al español a partir de Tabouret y colaboradores, 2010 [172].

El gen *ppsC* (involucrado en la síntesis de la fracción tiocerol) [176] y seis genes involucrados en la síntesis de la fracción glicosil-fenolica, en los procesos de metilación y transferencia de dos de los

residuos terminales y en la metilación del primer residuo ramnosil: proteínas que codifican ML0128 y ML2348 (glicosiltransferasas), ML0126, ML0127, ML2346 y ML2347 (metiltransferasas) [172,173,175]. Los genes seleccionados se agrupan en dos regiones del genoma de *M. leprae* y que tiene ortólogos en *M. tuberculosis* y cuyos genes están implicados en la formación de PGL-tb y el tiocerol dimicoserosato en esta bacteria (Figura 3.1).

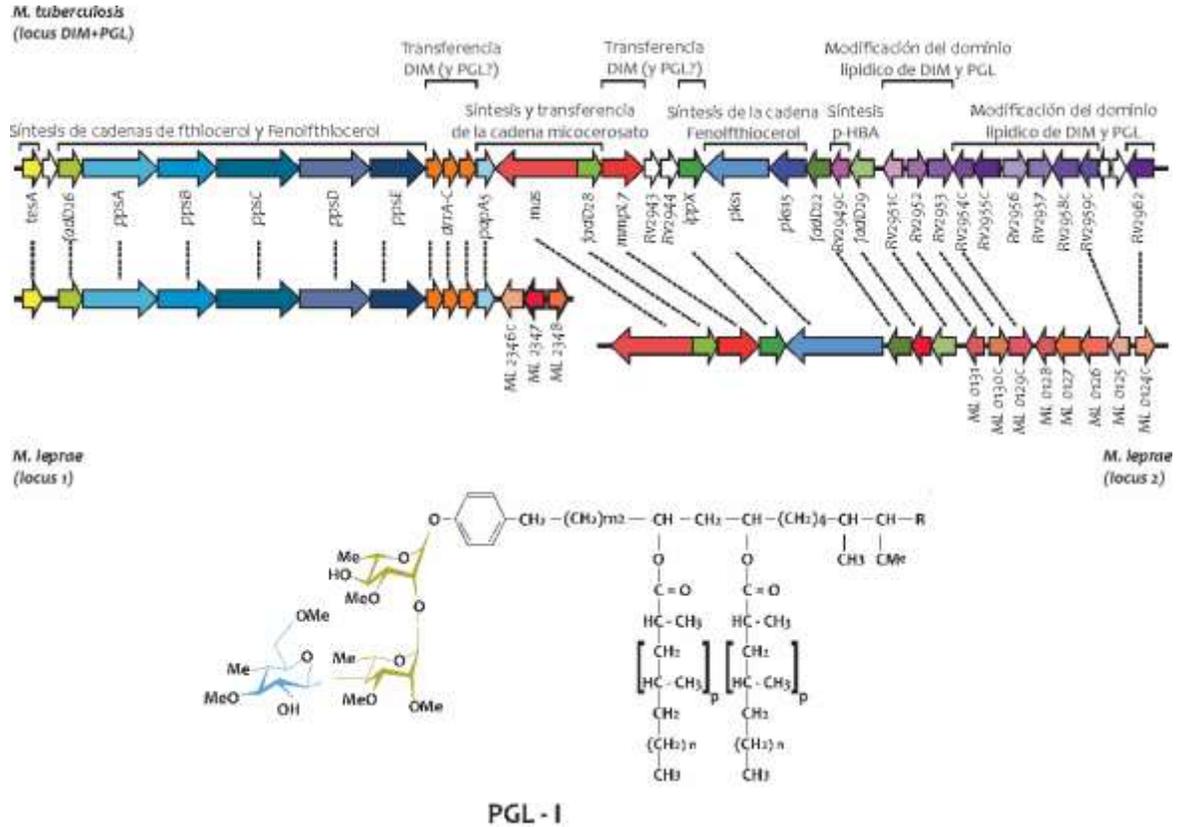


Figura 3.1. Genes involucrados en la síntesis de PGL-1 de *M. leprae* y sus ortólogos en *M. tuberculosis*. Tomado y modificado de Tabouret et al [172]

La patogenicidad de *M. leprae* está definida por el fenotipo del bacilo y determinada por la expresión génica durante su estancia intracelular. Un obstáculo importante que ha impedido el progreso en el análisis de la expresión génica de *M. leprae* es la incapacidad de cultivarlo en medio axénicos [37]. Si bien el análisis comparativo de genomas ha permitido identificar las deficiencias metabólicas y su composición celular, este es solo un punto de partida para realización de estudios funcionales. Recientemente se ha aplicado la secuenciación dual del ARN (ARN-seq) para secuenciar simultáneamente el transcriptoma de la célula hospedera y el patógeno, con el posterior aislamiento de cada transcriptoma *in silico* mediante la alineación de los genomas de los respectivos organismos [123,124]. Por lo que el objetivo de esta parte del estudio es identificar los conjuntos de genes que se transcriben en *M. leprae* aislado a partir de lesiones de pacientes durante la infección de células de Schwann.

### 3.3. Materiales y métodos

#### 3.3.1. Cultivos de células de Schwann y obtención de monocapas

La línea de células Primarias de Schwann Humanas, obtenidas a partir del nervio espinal humano se adquirieron en ScienCell, Carlsbad, CA, EE.UU. (Cat. No. 1700). Las células se cultivaron en medio que contenía suero de crecimiento celular de Schwann, 5% de Suero Fetal Bovino y Penicilina/Streptomycin (SCM, Cat. No. 1701, ScienCell), en frascos de cultivo celular previamente revestidos con Poli-L-lisina  $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Cat. No. 0413, ScienCell), para así promover la adhesión celular. Las células se cultivaron a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  hasta fueron confluentes, luego se colocaron en placas de 24 pozos (sobre laminillas) (previamente tratadas con Poli-L-lisina) a una densidad de 20.000 células por pozo y se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas antes de la infección.

#### 3.3.2. Purificación de *M. leprae*

Las biopsias de los pacientes fueron transferidas a una caja de Petri estéril y con ayuda de un bisturí se seccionó el tejido, transfirió el material a un homogeneizador de tejidos de vidrio estéril y se macero (se mantuvo el homogeneizador en hielo), una vez macerado el tejido se adiciono 1 mL de solución salina balanceada de Hank's (SSBH) fría y se homogeneizó en una suspensión, la que se filtró a través de un filtro celular BD (352340). Se tomaron los restos celulares que quedaron en el filtro y se ubicaron nuevamente en el homogeneizador, se añadió 1 mL de SSBH fría se homogeneizó nuevamente el tejido, se filtró nuevamente la suspensión y una vez más hasta alcanzar un volumen de 2,5 mL.

A la suspensión se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tripsina al 0,5% ([0.05%] final) y se incubó en baño serológico a  $37^\circ\text{C}$  por una hora. Después se añadió a la suspensión 10 mL de SSBH y se centrifugó a 3500 g por 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez descartado, el sobrenadante y se añadió 1 mL de SSBH al precipitado y se homogeneizó la suspensión. La cuantificación bacilar se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por Shepard y McRae [114] y la viabilidad bacilar se corroboró mediante el kit de viabilidad BacLight LIVE/DEAD (Invitrogen, EE.UU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### 3.3.3. Infección células de Schwann con *M. leprae*

Una vez se tuvieron las células de Schwann en monocapa a una densidad de 20.000 células por pozo, se colocaron en contacto en una proporción de 10 bacilos por célula con las suspensiones bacilares de cada paciente previamente cuantificadas. Células y bacilos se dejaron interactuar a una temperatura de  $33^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  adicionando medio SCM-suplementado, cada 72h para evitar la deshidratación y la alcalinización.

En la figura 2.2. Se presenta el esquema de una caja de cultivo celular de 24 pozos (1 caja para cada tiempo estipulado). Los pozos 1 al 6 (1 y 2 no contienen el bacilo) se utilizaron para evaluar el porcentaje de infección, del 7 al 18 (7, 8, 13 y 14 no contienen el bacilo) se utilizaron para extracción

de ARN y los pozos del 19 al 24 (19 y 20 no contiene el bacilo) se utilizaron para la extracción de lípidos de *M. leprae*.

### **3.3.4. Extracción de ARN**

Las células infectadas recolectadas en cada tiempo se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ARN (lisis mecánica). El día del experimento, la suspensión celular se centrifugó a 15.000 g por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de la lisis mecánica, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de buffer RLT que contenía [14,4 M] de 2-mercaptoetanol (Thermo Scientific) a cada 200  $\mu\text{L}$  de lisado celular, se mezcló con vortex y se centrifugó a 15.000 gr por 3 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se tomó el sobrenadante y se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de Etanol al 70% frío; se tomó todo el volumen, se ubicó en la columna y se centrifugó a 15.000 gr por 15 seg a  $4^{\circ}\text{C}$ , a la columna se le adicionó 80  $\mu\text{L}$  de solución de Dnasa I y se incubó a  $25^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Luego de incubada la columna se le adicionó el buffer RW1 se mezcló por inversión y se centrifugó a 15.000 gr por 15 seg a  $4^{\circ}\text{C}$ , seguido de dos pasos con buffer RPE con dos pasos de centrifugación a 15.000 gr por 15 seg a  $4^{\circ}\text{C}$  entre cada uno de ellos. Posteriormente en un tubo colector nuevo se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de Rnasas y se incubó 5 min a  $T^{\circ}$  ambiente y se centrifugó a 15.000 gr por 1 min. El RNA se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Una vez obtenido el ARN, una alícuota se utilizó para medir la concentración y la relación 260/280 por espectrofotometría en un equipo NanoDrop 1000TM (Thermo Scientific, EE. UU.). La calidad se midió con el Agilent RNA Nano Kit para cada una de las muestras; las muestras con un RIN (RNA Integrity Number) de 7.5 o superior, fueron seleccionadas para el proceso de ARNSeq.

### **3.3.5. Preparación y secuenciación de las librerías a partir de ARN total**

Las librerías se prepararon utilizando el Kit Illumina Stranded Total RNA (Cat. # RS-122-2301) de acuerdo con el protocolo del fabricante a partir de 100 ng de ARN total. La secuenciación se llevó a cabo en las plataformas Illumina HiSeq 2500 ( $2 \times 125$  bp) y HiSeq 4000 ( $2 \times 75$  bp) en el Instituto de Biología Molecular Clínica de la Universidad de Kiel, utilizando la química HiSeq v4 y el protocolo del fabricante para secuencia múltiple.

### **3.3.6. Procesamiento bioinformático de las secuencias**

Se eliminaron las lecturas de calidad inferior a 25 pb, los primeros diez nucleótidos de cada lectura y la contaminación por el adaptador. Los recuentos de las lecturas filtradas (que contienen genes con  $\geq 5$  lecturas en al menos una muestra) de los transcriptomas bacterianos se normalizaron mediante DESeq2 [177], utilizando parámetros predeterminados. Se generaron recuentos de genes normalizados con DESeq2 que fueron utilizados para el análisis posterior.

El análisis de las redes de correlación bacteriana se realizó mediante el análisis de correlación génica ponderada (WGCNA) [178]. La fracción de abundancia del ARNm para el transcriptoma de *M. leprae* se calculó dividiendo la abundancia de cada gen (recuentos normales de DESeq2)/longitud

del gen) por la suma de la cuantificación total de ARNm. El análisis de enriquecimiento de genes bacterianos se realizó mediante el análisis de superposición hipergeométrica de las categorías funcionales de Mycobrowser [179] para cada gen.

### 3.3.7. PCR en tiempo real de genes involucrados en la biosíntesis de PGL-1

A partir del ARN obtenido en cada uno de los tiempos post infección de las células de Schwann con *M. leprae* del paciente con un evento de recurrencia (Exp 2), el paciente nuevo (Exp 3) y control negativo (Exp 6), se realizó la síntesis de ADNc por medio de la transcriptasa reversa (M-MLV RT 200 U/ $\mu$ l) usando un oligo de hexámeros aleatorios; las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso (Anexo A).

La expresión de los genes involucrados en la síntesis de PGL-1 (Tabla 3.1) fue cuantificada por PCR en tiempo real (qPCR). Estos genes fueron seleccionados por su papel en la biosíntesis de PGL-1.

Para tal fin se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes seleccionados, usando las herramientas primer-Blast [180] y Primer3Plus [181]. Los parámetros escogidos para el diseño fueron los siguientes: tamaño del oligonucleótido (18-24 pb), temperatura de fusión de los oligonucleótidos ( $\sim$ 60°C) y tamaño del amplicón (90-200 pb), siguiendo las recomendaciones de Thornton y colaboradores [182] En las reacciones de amplificación se utilizó SYBR Green como generador de fluorescencia, en un equipo T100™ Thermal Cycler (BioRad).

**Tabla 3.2. Secuencias y características de los primers diseñados para la detección de genes implicados en la síntesis de PGL-1 en *M. leprae***

Primer	Secuencia	Tamaño	Long	Tm	% GC	Ref
ppsC-F	CGGAGCTAGCCGATCTCACT	127	20	64.5	60.0	Este estudio
ppsC-R	CGCACAGGATTACGCATGTT		20	60.4	50.0	Este estudio
ML0126-F	CTTTCGTGCGCATAATCACTG	210	21	60.6	47.6	Este estudio
ML0126-R	GCGACGAGATCCTCGTAATTG		21	62.6	52.4	Este estudio
ML0127-F	GATCTTCGCCATCTTGGACAG	178	21	62.6	52.4	Este estudio
ML0127-R	CTCGTATGCCTCAATGGCTTC		21	62.6	52.4	Este estudio
ML0128-F	CGATCCACGGTACAACAACCT	172	21	62.6	52.4	Este estudio
ML0128-R	TTCGATCTCGGACAGCAATTT		21	58.7	42.9	Este estudio
ML2346-F	ATGAAGCGTCCGAACCTGAT	104	20	60.4	50.0	Este estudio

ML2346-R	GGATTCGCCTCTAACGCAAC		20	62.4	55.0	Este estudio
ML2347-F	GATGGATCGCACTTTGGTGA	113	20	60.4	50.0	Este estudio
ML2347-R	CGTAGATAGCCGGCCATAA		20	62.4	55.0	Este estudio
ML2348-F	GGCCTATGACGAGCTCTGCT	165	20	64.5	60.0	Este estudio
ML2348-R	CCGAAGCCGAAGTAGATTGG		20	62.4	55.0	Este estudio
<i>Sod-F</i>	CACCGTTCGGAGAGAGGTTTC	192	20	64.5	60.0	Este estudio
<i>sod-R</i>	TCAACGAGATCCACCACACC		20	62.4	55.0	Este estudio

Para la estandarización de las condiciones de reacción fueron evaluadas diferentes condiciones de reacción y temperaturas de anillamiento para cada pareja de oligonucleótidos, en el equipo T100™ Thermal Cycler (BioRad) usando el siguiente perfil de análisis: 95°C de denaturación inicial por tres minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de denaturación a 95°C (por 30 seg), anillamiento a diferentes temperaturas (por 30 seg) y extensión a 72°C (por 30 seg); finalmente el proceso terminó con un paso de elongación a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1,8% p/v y visualizados con sifersafe (10 mg/mL).

Para la cuantificación relativa del ADNc por qPCR se utilizó el kit comercial kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix de BioRad®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron 10 ng de ADNc para la cuantificación, usando los oligonucleótidos de la tabla 3.2. a una concentración final de 0,25 µM (*sod*, ML0126, ML0127, ML2348), 0,375 µM (ML2346, ML2346) y 0,5 µM (ML0128 y *ppsC*) y los ciclos térmicos comprendieron una denaturación inicial a 95°C por 5 min, 40 ciclos de denaturalización a 95°C por 15 seg y una extensión a 62°C por 30 seg (Anexo A).

Inicialmente, se construyeron las curvas de eficiencia para cada juego de oligonucleótidos usando diluciones seriadas (0,01-100 ng/ µL) de ADN genómico de *M. leprae*, y se estandarizaron las condiciones de reacción para obtener una eficiencia cercana a 2 y un único producto de amplificación. Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado sobre dos replicas experimentales. Se utilizó el gen *sod* (superóxido-dismutasa), como control endógeno. Los valores de expresión negativa de los genes se obtuvieron convirtiendo los valores del ciclo umbral (Ct) de acuerdo con la siguiente formula: Valor de expresión =  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  [183].

### 3.3.8. Análisis estadístico

Los análisis de los resultados se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM) de experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron aplicando un análisis de varianza de múltiples mediciones (ANOVA) de una o dos vías con la prueba de Tukey's, utilizando

GraphPrims versión 9 para macOS Big sur, GraphPad Software, San Diego, California EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Los valores de  $P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $*P < 0,001$  y  $***P < 0,0001$ , se consideraron estadísticamente significativos.

## 3.4. Resultados

### 3.4.1. Control de calidad del ARN obtenido durante la infección de las células de Schwann con *M. leprae*

La cantidad y la calidad de ARN extraído como se mencionó anteriormente se verificó midiendo la concentración y calidad por la relación 260/280 en NanoDrop 1000TM (Thermo Scientific, EE. UU.) (Tabla 3.2). Los valores 260/280 en varias muestras mostraron una relación de o cercana a 2. A estas muestras posteriormente se le realizó la evaluación de la integridad del ARN a través de electroforesis capilar para la obtención del RIN. Los resultados de este análisis mostraron que la mayoría de las muestras analizadas presentaron un RIN entre 4 y 7; las muestras del día 7 las que presentaron un RIN mayor a 7. Después del análisis de calidad y los resultados de infección y multiplicación se seleccionó el día 7 post infección para la secuenciación del ARN.

**Tabla 3.3. Cuantificación del ARN post-infección de las células de Schwann con *M. leprae***

Exp infectante	Tiempo Post-Infección (días)	ng/ul	Total	A260	A280	260/280
Exp 1	0	3,08	92,4	0,077	0,042	1,82
Exp 1	3	9,08	272,4	0,227	0,132	1,72
Exp 1	7	20,76	622,8	0,519	0,26	2
Exp 1	10	8,1	243	0,203	0,119	1,7
Exp 1	12	6,2	186	0,155	0,076	2,03
Exp 2	0	11,16	334,8	0,279	0,152	1,84
Exp 2	3	17,46	523,8	0,437	0,236	1,85
Exp 2	7	51,44	1543,2	1,286	0,678	1,9
Exp 2	10	10,83	324,9	0,271	0,155	1,74
Exp 2	12	13,06	391,8	0,327	0,191	1,71
Exp 3	0	6,89	206,7	0,172	0,131	1,32
Exp 3	3	7,33	219,9	0,183	0,12	1,53
Exp 3	7	13,15	394,5	0,329	0,168	1,95
Exp 3	10	25,5	765	0,637	0,342	1,87
Exp 3	12	11,93	357,9	0,298	0,17	1,75
Exp 4	0	8,33	249,9	0,208	0,112	1,87
Exp 4	3	11,85	355,5	0,296	0,162	1,83
Exp 4	7	21,75	652,5	0,544	0,28	1,94
Exp 4	10	12,72	381,6	0,318	0,149	2,13
Exp 4	12	11,66	349,8	0,292	0,147	1,99
Exp 5	0	11,02	330,6	0,276	0,148	1,86
Exp 5	3	20,89	626,7	0,522	0,248	2,1

Exp infectante	Tiempo Post-Infección (días)	ng/ul	Total	A260	A280	260/280
Exp 5	7	15,49	464,7	0,387	0,196	1,97
Exp 5	10	8,83	264,9	0,221	0,108	2,03
Exp 5	12	11,06	331,8	0,277	0,17	1,63
Exp 6	0	5,05	151,5	0,126	0,085	1,48
Exp 6	3	13,45	403,5	0,336	0,191	1,76
Exp 6	7	11,03	330,9	0,276	0,14	1,97
Exp 6	10	24,48	734,4	0,612	0,298	2,06
Exp 6	12	4,83	144,9	0,121	0,057	2,11

### 3.4.2. Análisis de lecturas del proceso de secuenciación del ARN

Del proceso de secuenciación de transcriptomas completos de *M. leprae* a partir de la infección de un modelo *in vitro* de células de Schwann, se obtuvieron datos de secuenciación en formato fastq, los cuales arrojaron valores de calidad adecuados para el control de calidad al ser analizados en MultiQC [184] con valores >25, que mostraron pocos errores del proceso de secuenciación, los cuales fueron filtrados para obtener secuencias depuradas con la herramienta Trimmomatic con valores de calidad >25 (Tabla 3.4) [185].

**Tabla 3.4. Tabla del análisis de calidad de las secuencias obtenidas**

Muestra	Total de lecturas	Secuencias eliminadas por calidad	Longitud de las secuencias	%GC
Exp 2	8.225.483	0	35-91	48
Exp 3	7.672.921	0	35-91	50
Exp 4	8.182.693	0	35-91	49
Exp 6	6.796.098	0	35-91	51

### 3.4.3. Análisis de la expresión global de genes en *M. leprae* durante la infección de células de Schwann.

Al cumplir con los filtros de calidad de las lecturas, estas se utilizaron para ser mapeadas contra el genoma de referencia de *M. leprae* TN (código de acceso AL450380.1). Del proceso de secuenciación se obtuvieron en promedio 7.719.229+/-664.682 lecturas de las cuales en promedio 14.441 +/- 18.335, mapearon contra el genoma de *M. leprae*, lo que representa menos de 1x del transcriptoma (Tabla 3.5)

**Tabla 3.5. Resumen de la secuenciación del ARN de *M. leprae***

	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 6
Total de lecturas (datos crudos)	8.225.483	7.672.921	8.182.693	6.796.098
Lecturas <i>M. leprae</i> (datos crudos)	9.109	36.971	34.213	0

Cobertura de <i>M. leprae</i> ((Lecturax50 pb)/suma de la longitud de todos los exones)	4X	7X	6X	0X
Porcentaje de genes de <i>M. leprae</i> con ≥ 5 lecturas	60%	80%	78%	

### 3.4.4. Composición del transcriptoma de *M. leprae* asociado y no asociados con eventos recurrentes de lepra

A continuación, investigamos las propiedades más específicas del transcriptoma bacteriano durante la infección de células de Schwann. Al examinar las lecturas obtenidas para el exp 2 se detectaron lecturas de *M. leprae* para ARN estructurales no codificantes (ARNm de transferencia, la ribonucleasa P y el ARNr 23S). Por otra parte, se detectaron ARNm codificantes para el sistema de secreción ESX1 (*esxA* y *esxB*), *groEL1* (Chaperonina 2 60 kDa). También se encontró ARNm de pseudogenes (Tabla 3.6).

Una de las limitaciones de la aplicación de esta metodología en modelos de infección bacteriana se debe a una falta de enriquecimiento de las células invadidas, lo que resulta en una baja cobertura del transcriptoma bacteriano y/o una profundidad de secuenciación poco profunda, lo que dificulta un perfil en profundidad de la respuesta tanto del hospedero como del patógeno [186–188].

**Tabla 3.6. Tabla de genes expresados por *M. leprae* proveniente del paciente con recaída 7 días post- infección de las células de Schwann**

Gen en <i>M. leprae</i> TN	Gene	Tipo	Abundancia transcripcional	Descripción	Categoría funcional
ML0001	<i>dnaA</i>	CDS	1.3	Probable chromosomal replication initiator protein DnaA	information pathways
ML0003	<i>recF</i>	CDS	2.1	Probable DNA replication and repair protein RecF	information pathways
ML0006	<i>gyrA</i>	CDS	2.3	Probable DNA gyrase (subunit A) GyrA (DNA topoisomerase (ATP-hydrolysing)) (DNA topoisomerase II) (Type II DNA topoisomerase)	information pathways
ML0050	<i>esxB</i>	CDS	2.0	WXG100 family type VII secretion target	virulence, detoxification, adaptation
ML0080	ML0080c	CDS (pseudogen)	1.8	Conserved hypothetical protein (pseudogene)	pseudogenes
ML0381	<i>groL</i>	CDS	3.2	60 kDa chaperone family	virulence, detoxification, adaptation
ML0403	<i>iunH</i>	CDS (pseudogen)	2.0	Probable nucleoside hydrolase <i>iunH</i> (pseudogene)	pseudogenes
ML0687	ML0687	CDS	2.0	Probable conserved integral membrane protein	cell wall and cell processes
ML0790	ML0790c	CDS (pseudogen)	2.7	Probable beta-ketoacyl-CoA thiolase (pseudogene)	pseudogenes
ML0811	<i>rhIE</i>	CDS	2.0	Probable ATP-dependent RNA helicase <i>Rhle</i>	information pathways
ML0830	ML0830	CDS (pseudogen)	1.5	TPM domain-containing protein	pseudogenes

Gen en <i>M.leprae</i> TN	Gene	Tipo	Abundancia transcripcional	Descripción	Categoría funcional
ML1051	fadD36	CDS	1.8	acyl-CoA synthetase	lipid metabolism
ML1226	ML1226	CDS	1.9	L-aspartate oxidase	
ML2398	ML2398	CDS (pseudogen)	2.3	SGNH/GDSL hydrolase family protein	pseudogenes

Las propiedades del transcriptoma de *M. leprae* obtenidos de paciente nuevos (Exp 3 y Exp 4) mostraron lecturas para ARN estructurales no codificantes (ARNm de transferencia, la ribonucleasa P y el ARNr 23S). Los ARNm codificantes incluyeron el sistema de secreción ESX1 (*esxA* y *esxB*), las proteínas asociadas a ESX1 (*espA* y *espC*) y transcripciones de las proteínas de estrés como GroES y *cspA*; así como el regulador transcripcional *whiB1*, también se encontró ARNm de pseudogenes (Tabla 3.7).

Cuando se ha analizado el efecto del aumento de la transcripción del sistema de secreción ESX1 en otras micobacterias como *M. marinum*; se encontró que este sistema es parcialmente responsable de la evasión de la micobacteria del fagosoma durante las primeras horas de la infección [1]; en particular, las proteínas codificadas por el operón *espA* pueden desempeñar un papel importante en este proceso. En consecuencia, en micobacterias deficientes en ESX-1 (fenotipo avirulento), se les ha atribuido una incapacidad para secretar *espA* y/o *espC* al inicio de la infección [189]. En nuestros resultados se identificó que tanto las cepas causantes de eventos recurrentes y no recurrentes expresan genes pertenecientes a este sistema y por lo tanto es importante durante la infección de las células de Schwann con *M. leprae*.

**Tabla 3.7. Tabla de genes expresados por *M. leprae* causantes de eventos no recurrentes a los 7 días post- infección de las células de Schwann**

Gen en <i>M.leprae</i> TN	Gene	Tipo	Abundancia transcripcional	Descripción	Categoría funcional
ML0001	<i>dnaA</i>	CDS	6.5	Probable chromosomal replication initiator protein DnaA	information pathways
ML0006	<i>gyrA</i>	CDS	5.8	Probable DNA gyrase (subunit A) GyrA (DNA topoisomerase (ATP-hydrolysing)) (DNA topoisomerase II) (Type II DNA topoisomerase)	information pathways
ML0049	<i>esxA</i>	CDS	3.2	WXG100 family type VII secretion target	virulence, detoxification, adaptation
ML0050	<i>esxB</i>	CDS	3.1	WXG100 family type VII secretion target	virulence, detoxification, adaptation
ML0155	<i>sucC</i>	CDS	1.5	Probable succinyl-CoA synthase, (beta chain) SucC (SCS-beta)	intermediary metabolism and respiration
ML0198	<i>cspA</i>	CDS	2.0	cold shock protein CspA	
ML0205	ML0205	CDS	1.7	DUF475 domain-containing protein	Function unknown

ML0380	groES	CDS	3.6	co-chaperone GroES	virulence, detoxification, adaptation
ML0405	espA	CDS	3.8	hypothetical protein	
ML0406	espC	CDS	3.9	ESX-1 secretion-associated protein	
ML0709	ML0709	CDS (pseudogen)	2.5	amidohydrolase	pseudogenes
ML0804	whiB1	CDS	1.7	transcriptional regulator WhiB1	
ML0827	ML0827	CDS	2.2	IS3 family transposase	
ML0830	ML0830	CDS (pseudogen)	2.1	TPM domain-containing protein	pseudogenes
ML1226	ML1226	CDS	1.9	L-aspartate oxidase	
ML1335	ML1335	CDS (pseudogen)	3.2	flap endonuclease	pseudogenes
ML1571	nicT	CDS	2.1	hypothetical protein	Function unknown
ML2209	CpsY	CDS	2.5	exopolysaccharide phosphotransferase CpsY	cell wall and cell processes
ML2149	ML2149	CDS (pseudogen)	1.7	GTP 3',8-cyclase MoaA	pseudogenes
ML2398	ML2398	CDS (pseudogen)	1.6	SGNH/GDSL hydrolase family protein	pseudogenes

### 3.4.5. Cuantificación de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PGL-1 durante la infección de células de Schwann con cepas de *M. leprae*

Como se mencionó anteriormente, la posición triscarida de PGL-1 promueve la invasión de *M. leprae* a las células de Schwann y por lo tanto puede ser responsable de la capacidad única de *M. leprae* para invadir los nervios periféricos [24]. El gen *ppsC* (Poliketido sintasa tipo I), cataliza los pasos biosintéticos clave para la síntesis de DIM y PGL-1; Por lo tanto, se procedió a la evaluación transcripcional de este gen en cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes con recaída (exp 2) y nuevos (exp 3) durante la infección de las células de Schwann.

Para el exp 2, se observó una transcripción relativa de 0,76 a las 2 horas post-infección, la que aumentó entre 1.7 y 8.27 veces en los días 3 a 10, un pico máximo a los 7 días y una transcripción menor a 0 y los 12 días post-infección (Figura 3.2). Estos datos se relacionan con lo observado en el capítulo 2, en donde se describe el aumento en la multiplicación del bacilo (exp 2) a los 7 días post-infección. Para el exp 3, a las 2 horas post-infección se observó una expresión relativa de 9.08, la cual aumentó 29 veces su expresión en el día 3 día post-infección, con una posterior disminución en los días 7 y 12 post-infección ( $p > 0.0001$ ) (Figura 3.2).

Cuando se comparó el comportamiento transcripcional diferencial entre los experimentos analizados se determinó que el exp 3 tuvo una expresión  $>30$  veces en el día 3, mientras que en el día 7 el exp 2 mostró una expresión mayor del gen *ppsC*.

El comportamiento de los genes ML2346, ML2347 y ML2348, presentes en locus 1 de *M. leprae* (Figura 3.2), presentó un comportamiento similar a lo descrito para el gen *ppsC*. En la figura 3.2. se

observa que para el exp 2, los tres genes alcanzaron su máxima expresión relativa a los 7 días post-infección y para el exp 3 a los 3 días post infección. El perfil transcripcional de estos genes puede deberse a una transcripción operónica.

Cuando se analizó el comportamiento transcripcional de los genes ML0126, ML0127 y ML0128, ubicados en el segundo locus en *M. leprae* e involucrados en el proceso de metilación y traslocación de los residuos ramnosil de PGL-1, mostraron un comportamiento diferente al comportamiento transcripcional de los genes analizados en el locus 1. Los genes ML0126 y ML0127 tuvieron una expresión positiva en el exp 2; la cual tuvo variaciones en el gen ML0126 entre los días 0 y 7 post infección. En el caso del gen ML0128 se observó una expresión negativa en todos los días analizados (Figura 3.2).

Para el exp 3 los genes ML0126 y ML0127 tuvieron una expresión positiva en todos los días analizados alcanzando su pico máximo a los 3 días post-infección; la cual fue disminuyendo a través del tiempo. Para el gen ML0128 este inicio con una expresión negativa a las 2 horas-post-infección, se elevó a los 3 días, la cual decayó negativamente a los 7 días post-infección (Figura 3.2).

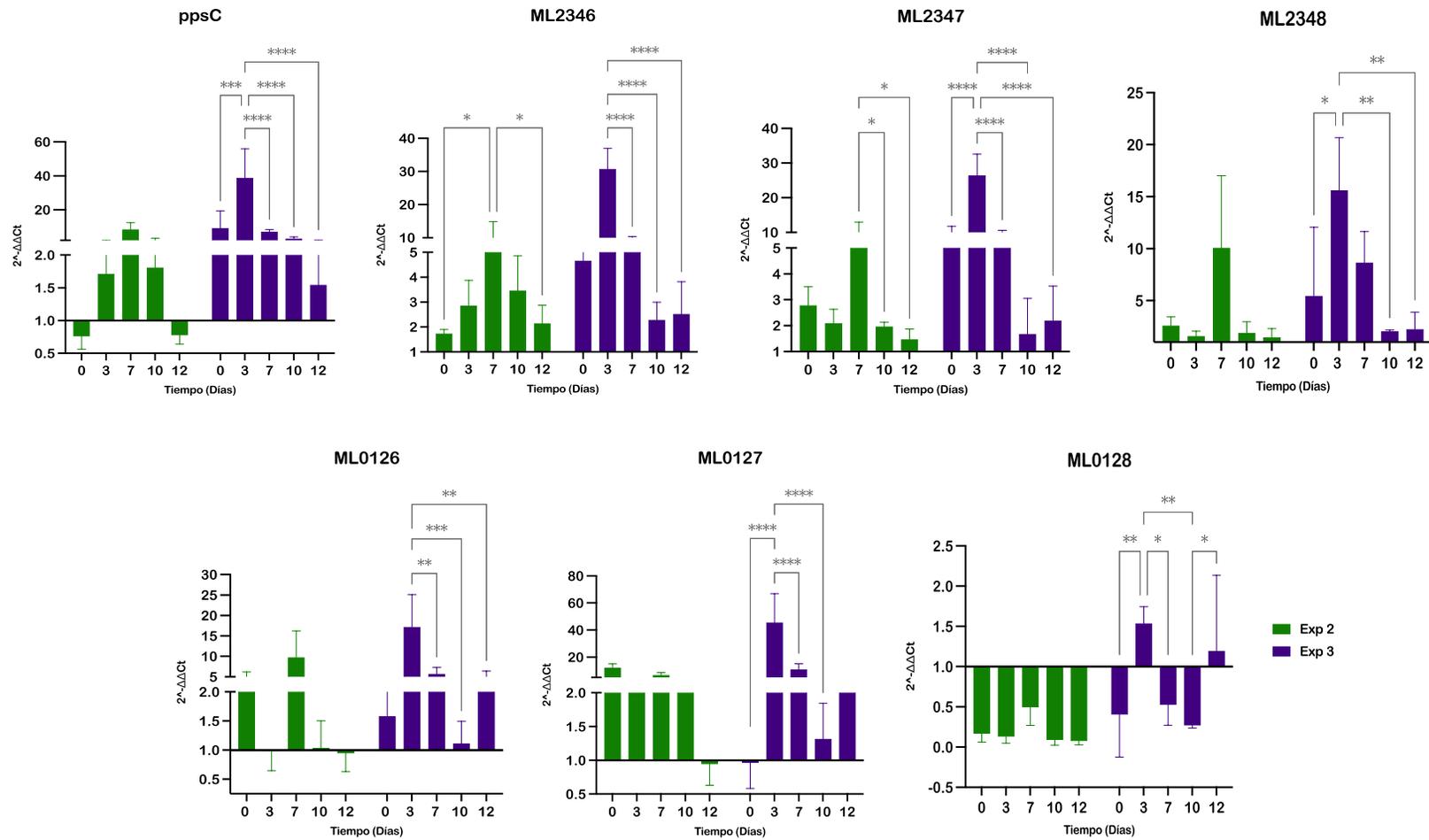


Figura 3.2. Perfil transcripcional de los genes involucrados en la síntesis de PGL-1 en *M. leprae*. Los niveles de transcripción se presentan como la relación de la expresión de las cepas de *M. leprae* durante la infección de las células de Schwann. La transcripción relativa de los genes analizados se normalizó en relación con el gen constitutivo *sod*. Los valores graficados corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar derivados de tres replicas técnicas. Los asteriscos indican los análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba Sidaks \*\*P < 0,01 y \*\*\*\*P < 0,0001

### 3.5. Discusión

Los signos clínicos más severos de la lepra se dan por la desmielinización progresiva de los nervios infectados. Por lo tanto, identificar los genes que se transcriben en *M. leprae* durante la infección de células de Schwann es un paso importante para la comprensión básica de los mecanismos en *M. leprae* que favorecen su multiplicación en la célula de Schwann.

En este estudio, evaluamos la transcripción de genes a través de la ARNseq de cepas de *M. leprae* causantes o no de eventos de recurrencias de la enfermedad, durante la infección de células de Schwann.

La infección es una de las interacciones más intrincadas entre dos organismos de diferentes especies, especialmente en un escenario donde el patógeno invade un hospedero. Estos procesos son capaces de revelar como patógenos intracelulares reprograman sus procesos moleculares (transcriptoma, proteoma y/o metaboloma, etc) desde el interior de la célula hospedera [190]. Sin embargo a medida que la percepción de la expresión génica cambia de una visión centrada en la proteínas a una más centrada en pro del ARN [191]. En este nivel, los análisis duales del ARN han demostrado ser más desafiantes, principalmente debido a las dramáticas diferencias con respecto al transcriptoma del hospedero y del patógeno [192]

A la fecha pocos han sido los trabajos que analizan el transcriptoma completo por ARNseq en *M. leprae*, debido a la imposibilidad de cultivo en medio artificiales y aunque la carga bacteriana aumente en el análisis con modelos *in vivo*, también aumenta el nivel de dificultad metodológica para el cubrimiento del transcriptoma bacteriano ya que a pesar de tener modelos de multiplicación como el cojinete plantar de ratones inmunosuprimidos, no muchos laboratorios en el mundo pueden acceder a estos modelos de infección [193]. Diferentes estudios han reportado la aplicación de ARNseq dual en modelos de infección [194–196], sin embargo, debido a diferencias fundamentales entre transcriptomas bacterianos y eucariotas, tales análisis se ha restringido a hospederos infectados con parásitos eucariotas y bacterias con una alta tasa de multiplicación intracelular [186–188].

En el presente trabajo, se obtuvo ARN total durante la infección de células de Schwann, se eligió el día 7 post-infección de acuerdo con los resultados de capacidad de infección y multiplicación, evaluados en el capítulo 2. Se encontró que en este tiempo post-infección hay un aumento en el número de células infectadas y en el número de bacilos por célula. La metodología empleada utilizó la eliminación de subunidades ribosomales, basada en el uso de perlas magnéticas. Esta metodología nos permitió evaluar cerca de 30.000 lecturas del transcriptoma bacteriano, aunque esto representa una cobertura menor a 1x esta es la primera aproximación experimental que analiza el transcriptoma de *M. leprae* en un modelo de infección de células de Schwann. En un estudio realizado por Montoya y colaboradores [197], realizaron ARNseq dual de tejido de pacientes con LL y evaluaron aspectos de la respuesta inmune del huésped y vinculo la activación

de proteínas de choque térmico de *M. leprae* a la respuesta inmune de paciente. En este trabajo se obtuvieron hasta 1 millón de lecturas para el ARN de *M. leprae* con cerca de 200 genes y pseudogenes [197].

Las cepas de *M. leprae* analizadas en este estudio, mostraron la transcripción de los genes *esxB-esxA*; locus que se encuentra dentro del locus *esx-1* en el genoma de *M. tuberculosis* y que codifica el sistema de secreción tipo VII [198]. Diferentes estudios han sugerido que estos genes desempeñan un papel importante en la virulencia, patogenicidad, supervivencia intracelular y evasión de la respuesta inmune de las micobacterias [199]. El análisis de transcriptoma de *M. leprae* provenientes de pacientes nuevos además reveló la expresión de los genes *EspA*, *EspC* o *EspB* otros factores de ESX-1; los cuales se ven afectados sin la presencia funcional de los genes *EsxA/B* [200].

En estudios previos [201], revelaron que *M. leprae* genera su propio ATP cuando se incubaba *in vitro*. Lee y colaboradores además confirmaron que *M. leprae* no puede observar ATP exógeno durante la incubación *in vitro*, lo que confirma que *M. leprae* tiene su propio mecanismo para generar ATP, que es fundamental para sus actividades bioquímicas [201]. Proteínas de choque térmico como GroEL, GroES dependen de ATP para su funcionamiento y su actividad puede ser la base para la supervivencia de *M. leprae* en diferentes condiciones de estrés [202]. Nuestros resultados identificaron la transcripción de genes codificantes de proteínas de choque térmico durante la infección de células de Schwann, lo que confirma que la mayoría de estas proteínas son críticas para la supervivencia de *M. leprae* en diferentes condiciones de crecimiento, ya que en el estudio realizado por Montoya y colaboradores [197], también encontraron la expresión de estos genes. En este aspecto las cepas de *M. leprae* provenientes de eventos recurrentes y no recurrentes no presentaron diferencias significativas, ya que las dos mostraron actividad en esos sistemas de secreción.

Nuestros resultados muestran, la expresión diferencial de los genes implicados en la síntesis de PGL-1 en las cepas analizadas. En el caso de *M. leprae* provenientes de pacientes nuevos aumenta en el día 3 post-infección y las cepas de *M. leprae* de casos recurrentes en el día 7 post-infección; estos datos se relacionan con los resultados mostrados en el capítulo 2; y soporta que PGL-1 influye en la capacidad infectiva de *M. leprae* y que la diferencia en el comportamiento transcripcional se puede deber a condiciones metabólicas disminuidas en el caso de *M. leprae* proveniente de caso recurrente.

### 3.6. Conclusiones

1. Esta es la primera aproximación experimental en la que se analiza el transcriptoma de *M. leprae* durante la infección de células de Schwann; aunque se obtuvo una cobertura menor a 1x, los resultados obtenidos nos permiten mejorar la aproximación experimental para lograr una

mayor cobertura de *M. leprae* y así conocer su comportamiento transcripcional durante la infección de células de Schwann.

2. Durante el análisis del ARN a través de ARNseq, se cobertura de genes implicados en la virulencia, patogenicidad, supervivencia intracelular y evasión de la respuesta inmune de las micobacterias como *EspA*, *EspC* o *EspB* y *esxA*.
3. El análisis de la transcripción de genes involucrados en la síntesis de PGL-1 de *M. leprae* durante la infección de las células de Schwann demostró un comportamiento diferencial entre las cepas de *M. leprae* provenientes de casos recurrentes en comparación con las cepas provenientes de pacientes nuevos, los cuales se relacionan con los resultados mostrados en el capítulo 2 y en donde se estableció que la capacidad infectiva de *M. leprae* provenientes de casos de recaída aumenta en el día 7 a diferencia de *M. leprae* de pacientes nuevos la cual aumenta en el día 3 y se puede deber a la actividad metabólica de cada cepa.
4. Los genes involucrados en la síntesis de PGL-1 y que se encuentran en el locus 1 de *M. leprae* mostraron un perfil transcripcional similar en las dos cepas analizadas; lo que indico una transcripción operonica. En el caso de los genes evaluados pertenecientes al locus 2, aunque tuvieron un aumento en la expresión en los días 3 y 7 post-infección; en el caso del gen ML0128 este en el tiempo 0 y 12 días post-infección mostraron una expresión menor a 1.

## 4. Discusión general

La capacidad de *M. leprae* de invadir las células gliales de los nervios periféricos (células de Schwann), hacen que la lepra sea una de las causas de neuropatías infecciosas más comunes. Los programas del control de la lepra se basan en el diagnóstico, tratamiento e identificación de casos recurrentes de la enfermedad; en este último caso la diferenciación entre recaída y reinfección es importante, dado que son eventos epidemiológicos diferentes [86,137]. Mientras la tasa de recaídas es un indicador de la eficacia o fracaso del tratamiento; la reinfección es un indicador de transmisión activa en el país [86,87]. En este sentido y como se detalló en el capítulo 1, la extremadamente limitada variabilidad genómica entre cepas de *M. leprae* de la misma área geográfica de origen plantea un desafío importante para distinguir eventos de recaída o reinfección con una cepa estrechamente relacionada [203]. En nuestro estudio se tomaron biopsias de piel de lesiones diferentes (diagnóstico inicial y recurrencia) de 25 pacientes, las cuales fueron analizadas a través de la secuenciación total de genomas y cuyos resultados nos permitieron confirmar 5 casos de recaída y una reinfección.

La lepra presenta un periodo de incubación que puede oscilar entre 2 y 15 años. Aunque es más relevante en adultos, la lepra también se ha reportado en niños <15 años e incluso en niños menores de 1 año que indican, al menos en niños, un periodo de incubación corto de la enfermedad [204]. La disponibilidad y el mayor uso de técnicas de secuenciación total del genoma de *M. leprae* en eventos recurrentes de lepra pueden aclarar la duración del periodo de incubación en cada caso especialmente en individuos genéticamente susceptibles que permanecen expuestos al bacilo en áreas endémicas.

Los resultados de este estudio permitieron clasificar eventos recurrentes de lepra en recaída y reinfección en un periodo de análisis de 10 años; lo que destaca que periodos de observación de los pacientes post-PQT proporciona evidencia clínica suficiente para la sospecha e identificación de casos recurrentes. Además, este estudio resalta la importancia de la aplicación de la secuenciación total de genomas sobre los métodos de genotipificación tradicionales los cuales utilizan un número limitados de loci o VNTRs para la tipificación.

Las cepas de *M. leprae* exhiben una fuerte relación entre los subtipos de SNPs y la ubicación geográfica, los cuales son el reflejo de las primeras migraciones humanas y las rutas comerciales utilizadas en la antigüedad como en el caso de la colonización europea en las Américas, la ruta de

la seda que unía Europa y China. es por esto que la tipificación de SNP proporciona pruebas del origen, diseminación y la filogenia de la enfermedad [1]. El análisis genómico de las cepas de *M. leprae* secuenciadas en este estudio están filogenéticamente relacionadas con cepas de origen Europeo (Medieval) [47] y cepas provenientes de hospederos no humanos como el armadillo y la ardilla de cola roja [10,26]. El análisis al interior del genotipo 3I mostró que las cepas colombianas presentan estrecha relación con la cepa SK2 de Winchester (Siglo XI) [39,47] y con las cepas circulantes en el sur de Estados Unidos y asociadas a zoonosis del armadillo de nueve bandas, I-30, NHDP-55 y NHDP-63, que se originaron mucho más recientemente, de acuerdo con la rápida expansión y propagación de la población de armadillos desde su introducción en esta región [45,46]. Esto muestra el impacto de la propagación zoonótica de la lepra en las Américas a través del armadillo de nueve bandas; Es posible que el contacto con estos animales haya sido un factor que contribuyó a la diseminación de la enfermedad en el pasado [47].

Un factor diferencial de la lepra es el desarrollo de neuropatías, consecuencia de la infección de las células de Schwann por *M. leprae* [51]; en donde la capacidad de invasión inicial y posterior multiplicación de *M. leprae* en las células de Schwann es un proceso crítico debido a que las células de Schwann protegen de la respuesta inmune, favoreciendo la multiplicación y supervivencia bacteriana [162].

Las condiciones experimentales utilizadas en este estudio permitieron realizar el cultivo, mantenimiento e infección de las células de Schwann con *M. leprae* y se alcanzó una viabilidad del 56% en las células de Schwann durante 3 semanas después de la infección a 33°C, en comparación con la viabilidad del 3,6% a 37°C [167]. Además, se observó que las condiciones empleadas en este estudio permitieron mantener los cultivos infectados hasta por 12 días sin que la monocapa se desprendiera por resequedad o por acción de los productos de la infección con *M. leprae*.

La evaluación del comportamiento de las cepas de *M. leprae* provenientes de eventos recurrentes y no recurrentes mostró un comportamiento diferencial; se observó que *M. leprae* de un paciente de recaída aumenta su capacidad infectiva a los 7 días post-infección en comparación con el *M. leprae* proveniente de pacientes nuevos donde se aumenta de manera constante la capacidad infectiva a partir del día 3 post-infección. Por su parte, para el día 12 se observó una infección celular que varió entre 13 y el 54%, lo que con resultados previos en donde se demuestra que las células de Schwann pueden alcanzar hasta un 80% de infección con *M. leprae* [78]. También Nuestros resultados demuestran que la viabilidad del bacilo es fundamental para aumentar el número de células infectadas a través del tiempo, como se puede observar en la capacidad de infección de *M. leprae* proveniente de pacientes con recaída Vs los provenientes de pacientes nuevos, los cuales tienen un comportamiento diferencial posiblemente producido por un proceso metabólico disminuido en el primer caso.

Los hallazgos del capítulo 2 se relacionan con los resultados mostrados en el capítulo 1 en donde se evidenció la importancia de un seguimiento prolongado de los pacientes post-PQT debido a que

los tiempos de incubación de *M. leprae* son prolongados y se puede tardar hasta más de 10 años en la aparición de nuevos signos clínicos.

A la fecha pocos han sido los trabajos que analizan el transcriptoma completo por ARNseq en *M. leprae*, debido a la imposibilidad de cultivo en medio artificiales y aunque la carga bacteriana aumente en el análisis con modelos *in vivo*, también aumenta el nivel de dificultad metodológica para el cubrimiento del transcriptoma bacteriano [193].

En el presente trabajo, se obtuvo ARN total durante la infección de células de Schwann, se eligió el día 7 post-infección de acuerdo con los resultados de capacidad de infección y multiplicación, evaluados en el capítulo 2. La metodología empleada utilizó la eliminación de subunidades ribosomales, basada en el uso de perlas magnéticas y nos permitió evaluar cerca de 30.000 lecturas del transcriptoma bacteriano, aunque esto representa una cobertura menor a 1x esta es la primera aproximación experimental que analiza el transcriptoma de *M. leprae* en un modelo de infección de células de Schwann.

Las cepas de *M. leprae* en analizadas en este estudio, mostraron la transcripción de los genes *esxB-esxA*. Estos genes se encuentran en el locus *esx-1* en el genoma de *M. tuberculosis* y que codifica el sistema de secreción tipo VII, un sistema que se ha sugerido que desempeñan un papel importante en la virulencia, patogenicidad, supervivencia intracelular y evasión de la respuesta inmune de las micobacterias [199]. El análisis de transcriptoma de *M. leprae* provenientes de pacientes nuevos además reveló la expresión de los genes *EspA*, *EspC* o *EspB* (otros factores de ESX-1), los cuales se ven afectados sin la presencia funcional de los genes *EsxA/B* [200]. También se observó la transcripción de genes codificantes de proteínas de choque térmico en *M. leprae* durante la infección de las células de Schwann, lo que confirma que la mayoría de estas proteínas son críticas para la supervivencia de *M. leprae* en diferentes condiciones de crecimiento [197], El análisis transcripcional de las cepas de *M. leprae* provenientes de eventos recurrentes y no recurrentes no presentaron diferencias significativas, ya que las dos mostraron la misma actividad en esos sistemas de secreción.

Nosotros evaluamos la transcripción de genes implicados en la vía biosintética de PGL-1, la que involucra más de 20 pasos enzimáticos [1]. Nuestros resultados muestran, la expresión diferencial de los genes implicados en la síntesis de PGL-1 en las cepas analizadas. En el caso de *M. leprae* provenientes de pacientes nuevos aumenta en el día 3 post-infección y las cepas de *M. leprae* de casos recurrentes en el día 7 post-infección; estos datos se relacionan con los resultados mostrados en el capítulo 2; y soporta que PGL-1 influye en la capacidad infectiva de *M. leprae* y que la diferencia en el comportamiento transcripcional se puede deber a condiciones metabólicas disminuidas en el caso de *M. leprae* proveniente de caso recurrente.

Las aproximaciones de biología molecular, bioinformática y microbiología utilizados en este estudio nos permitieron establecer características genómicas y transcriptómicas de cepas de *M. leprae* causantes o no de eventos recurrentes de lepra en Colombia. Sin embargo, muchos esfuerzos

deben hacerse con el objeto de elucidar las condiciones fisiológicas por las que *M. leprae* tiene la capacidad de infectar las células de Schwann y a su vez el sistema nervioso periférico.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

En coherencia con nuestro propósito global de describir las características genómicas y transcriptómicas de cepas colombianas de *M. leprae* causantes de eventos recurrentes de la enfermedad. Podemos decir que nuestro sistema ha resultado una herramienta valiosa para concluir que:

1. Aunque las cifras de lepra en Colombia y en el mundo se han mantenido estables en los últimos años, la lepra sigue siendo un problema de salud pública especialmente en países en donde no se hace un control rápido del progreso de esta enfermedad. Por lo tanto, concluimos de acuerdo con nuestros resultados que la vigilancia post-PQT es importante para la identificación rápida de casos recurrentes de lepra.
2. La utilización de metodologías como la secuenciación total de genomas, nos permiten clasificar casos recurrentes de lepra en recaídas y reinfección; además de poder realizar un seguimiento detallado de la transmisión de la enfermedad en regiones con un alto número de casos de lepra.
3. Las condiciones experimentales utilizadas en este estudio nos permitió establecer un modelo de infección de células de Schwann humanas con *M. leprae* obtenidos de pacientes.
4. La capacidad infectiva de cepas de *M. leprae*, depende de la viabilidad del bacilo; analizó el comportamiento de cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes recurrentes vs pacientes nuevos se observó diferencia en el aumento alcanzando su pico máximo entre los 7 y 3 días respectivamente, esta diferencia puede ser debida a un metabolismo disminuido.
5. Las condiciones experimentales utilizadas nos permitió determinar un comportamiento transcripcional diferencial de gene involucrados en la síntesis de PGL-1 entre las cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes con recaída los cuales aumentaron sus niveles de expresión a los 7 días post-infección; a diferencia de las cepas provenientes de pacientes nuevos la expresión de estos aumentó en el día 3 post-infección.
6. Las aproximaciones de biología molecular, bioinformática y microbiología utilizados en este estudio nos permitieron establecer características genómicas y transcriptómicas de cepas de *M. leprae* causantes o no de eventos recurrentes de lepra en Colombia. Sin embargo, muchos esfuerzos deben hacerse con el objeto de elucidar las condiciones fisiológicas por las que *M. leprae* tiene la capacidad de infectar las células de Schwann y a su vez el sistema nervioso periférico.

## 5.2. Recomendaciones

Con el desarrollo de este trabajo fue posible generar nuevas preguntas que serán abordadas en futuros proyectos de investigación de la línea de Hansen del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta y el grupo “Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias” de la Universidad Nacional de Colombia y que posiblemente contribuirán con información valiosa para la comunidad científica.

Desde el punto de vista de salud pública, sería importante ampliar el número de pacientes que han presentado eventos recurrentes de la enfermedad, con el fin de conocer el impacto a nivel de salud pública del seguimiento molecular de estos eventos en el país, ya que encontramos con la secuenciación total del genoma una poderosa herramienta para el seguimiento epidemiológico de la enfermedad en Colombia. Sin embargo, la limitante se encuentra en la obtención de los recursos (muestras y financiación) para este tipo de estudios. No obstante, a pesar de las dificultades en la obtención de las muestras y recursos es factible, por lo que esperamos en el futuro ampliar el número de casos analizados y que estos no solo sean de pacientes diagnosticados en el HUCFLLA sino provenientes de otras instituciones del país. Siendo este un objetivo de los sistemas de control y vigilancia en salud.

En este mismo sentido esperamos poder ampliar el análisis temporal de las mutaciones identificadas en las cepas colombianas de *M. leprae* y las implicaciones de las mismas en condiciones como por ejemplo durante la infección de células de Schwann; con el fin de establecer si un genotipo tiene mayor facilidad en su capacidad infectiva que otro.

En este estudio también encontramos diferencias en la capacidad infectiva y tasa de multiplicación de cepas de *M. leprae* provenientes de pacientes de recaídas y nuevos. Por lo tanto, es importante establecer un patrón transcriptómico *in situ* al inicio del evento y durante el tratamiento con el fin de establecer el comportamiento de *M. leprae* en el tejido y así conocer las diferencias en el comportamiento transcripcional de estos eventos.

Aunque en este estudio logramos identificar la transcripción de algunos genes de *M. leprae* durante la infección de células de Schwann a través de la metodología de RNAseq, la cobertura de este no fue suficiente para conocer el comportamiento transcripcional de todos los genes, debido a la alta presencia de ARNr y ARNm de la célula hospedera, por lo que se recomienda utilizar metodologías como el single cell RNAseq y así tener un mayor poder secuenciación.

## 6. Anexos

### Anexo A. Protocolos utilizados en el estudio

#### Protocolo 1. Extracción de ADN a partir de biopsias embebidas en parafina

##### 1. Consideraciones generales

Este protocolo operativo estándar se basó en los protocolos proporcionado por Qiagen®.

##### 2. Materiales

- Xilol
- Etanol Absoluto
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen®)
- Consumibles: Tubos Eppendorf de 1,5 mL (libres de ADNasa/ARNasa), puntas de pipetas de 200 y 1000 µL con filtro y libres de ADNasa/ARNasa.
- Equipos: Pipetas automáticas de 200 y 1000 µL, Thermomixer o bloque térmico que permita incubaciones a 56, 70 y 90°C, Microcentrífuga con rotor para tubos de 2 mL y vortex.

##### 3. Procedimiento

1. Tomar el bloque de muestra, cortar 8 secciones de 5-10 µm, asegurando que todo el material disponible se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 a 2.0 mL.  
**Nota:** Si la superficie de la muestra ha sido expuesta al aire, descartar las dos primeras secciones.
2. Añadir 1 mL de Xilol a la muestra, cerrar la tapa y agitar con vortex hasta que se disuelva la parafina (10 seg aprox). Asegurarse que el tubo está completamente cerrado para evitar que se vierta el xilol, la contaminación cruzada  
**Nota:** Dejar toda la noche para degradar completamente la parafina.
3. Centrifugar a 13.000 gr por 5 min a Tº ambiente, para recoger el sedimento del tejido. Si no se forma sedimento del tejido, repita este paso.  
**Nota:** Una temperatura de centrifugado baja puede llevar a que la extracción no sea óptima.
4. Eliminar y desechar el sobrenadante. Conservar el sedimento.

5. Agregar 1 mL de etanol (96-100%) al sedimento del tejido y mezclar por vortex. El etanol extrae el xilol residual de la muestra.
6. Centrifugar a 13.000 gr por 5 min a T<sup>o</sup> ambiente. Eliminar el sobrenadante evitando el contacto con el sedimento.
7. Abrir el tubo e incubar a 40°C hasta el etanol residual se evapore.  
**Nota:** una temperatura de incubación más baja reduce la velocidad de evaporación, mientras que una temperatura mayor puede secar en exceso el sedimento, dificultando su suspensión.
8. Resuspender el sedimento en 180 µL de buffer ALT y añadir 20 µL de proteinasa K y mezcle por vortex.  
**Nota:** El sedimento debe estar bien suspendido en el buffer ATL para garantizar el máximo rendimiento en la recuperación.
9. Incubar a 56°C durante 1 hora (o hasta que la muestra se haya lisado completamente).
10. Incubar a 90°C durante 1 hora. La incubación a 90°C en buffer ATL invierte parcialmente los ácidos nucleicos por el formaldehído.  
**Nota:** Si emplea un único bloque térmico dejar la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56°C hasta que el bloque térmico haya alcanzado los 90°C.
11. Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas en el interior del tubo.
12. Añadir a la muestra 200 µL de buffer AL y mezcle a fondo mediante agitación por vortex. A continuación. Añadir 200 µL etanol (96-100%) y mezclar con vortex.
13. Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas en el interior del tubo.
14. Transferir todo el lisado a la columna QIAamp MinElute, cerrar la tapa y centrifugar a 6000 gr por 1 minuto. Poner de la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado de 2 mL limpio y desechar el tubo de lavado anterior.  
**Nota:** Si el lisado no atravesó completamente la membrana tras el centrifugado, repetir el centrifugado a una velocidad mayor velocidad hasta que la columna QIAamp MinElute quede vacía.
15. Abrir la columna QIAamp MinElute y añadir 500 µL de buffer AW1 reconstituido. Cerrar la tapa y centrifugar a aproximadamente 6000 gr durante 1 minuto. Disponga la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado de 2 mL limpio y desechar el tubo de lavado anterior.
16. Abrir la columna QIAamp MinElute y añadir 500 µL de buffer AW2 reconstituido. Cerrar la tapa y centrifugar a aproximadamente 6000 gr durante 1 minuto. Disponga la columna QIAamp MinElute en un tubo de lavado de 2 mL limpio y desechar el tubo de lavado anterior.  
**Nota:** Tener cuidado en el momento de retirar la columna QIAamp MinElute de la centrifuga, se debe evitar contacto de esta con el líquido residual.
17. Centrifugar a 13.000 gr para secar la membrana.
18. Poner la columna QIAamp MinElute en un tubo de elución de 1,5 mL limpio y desechar el tubo de lavado que contiene el filtrado. Abra con cuidado la tapa de la columna QIAamp MinElute y aplicar 25 µL de buffer ATE en el centro de la membrana e incubar 5 min a T<sup>o</sup> ambiente.
19. Centrifugar a 13000 gr por 1 min.

## Protocolo 2. Tratamiento de las muestras de ADN con UDG

### 1. Materiales

- USER® Enzyme (BioLabs®)
- Uracil Glycosylase Inhibitor (UGI), (BioLabs®)
- T4 Polymerase (BioLabs®)
- T4 Polynucleotide Kinase (BioLabs®)
- Solexa adapter mix
- Taq DNA polymerase with ThermoPol® Buffer
- Bsm DNA Polymerase, large fragment (8 U/μL) Thermo Scientific™
- ATP
- BSA, Molecular Biology Grade, (BioLabs®)
- dNTPs
- Quick Ligation kit (BioLabs®)
- Solexa adapter mix (Illumina)
- Etanol
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- Consumibles: Tiras de tubos de PCR de 0,2 mL (libres de ADNasa/ARNasa), puntas de pipetas de 200 y 1000 μL con filtro y libres de ADNasa/ARNasa.
- Equipos: Pipetas automáticas de 20, 200 y 1000 μL, Thermomixer o bloque térmico que permita incubaciones a 12, 25, 37, 56 y 80°C, Microcentrifuga con rotor para tubos de 2 mL y vortex.

### 2. Procedimiento

#### a. Tratamiento con UDG

##### Mezcla de reacción

Reactivo	Concentración	1x (μL)	25x (μL)
H <sub>2</sub> O		14,1	352,5
Buffer Tango	10x	6	150
ATP	100mM	0,6	15
dNTPs	25mM	0,2	5
BSA	20mg/ml	0,5	12,5
USER Enzyme	1U/μl	3,6	90
<b>Mezcla Total</b>	<b>25</b>		
<b>ADN</b>	<b>25</b>		

- Agregar 25 μL de mezcla a cada tubo (usar tiras de tubos de PCR de 0,2 mL)
- Agregar 25 μL de muestra (ADN) a cada tubo (tiras de PCR de 0,2 mL) mezclar suavemente por pipeteo (usar siempre una punta nueva).

- Mezclar cuidadosamente moviendo el tubo con un dedo y realizar un spin.
- Incubar a 37°C durante 30 min, luego a 12°C durante 1 min.

#### b. Inhibición de UDG

- Agregar 3,6 µL de UGI (*Uracil Glycosylase Inhibitor, sigla en inglés*) (Conc. Stock: 2 U, Conc. Final: 0,1343 U) a cada librería.
- Mezclar cuidadosamente y Centrifugar brevemente
- Incubar a 37°C durante 30 min, luego a 12°C durante 1 min.

#### c. Reparación de extremos romos

Reactivo	1x (µL)	25x (µL)
T4 PNK*	3,00	75
T4 Polymerase	1,65	41,25
<b>Mezcla Total</b>	4,65	

\*T4 Polynucleotide Kinase

- Agregar 4,65 µL de mezcla a cada reacción (tubo de 0,2 mL)
- Mezclar cuidadosamente y realizar un spin.
- Incubar a 25°C durante 20 min, luego a 12°C durante 10 min.

#### d. Purificación MinElute

- Preparar una columna nueva de purificación y un tubo eppendorf de 1,5 mL para cada muestra.
- Agregar 700 µL de buffer PB a cada columna
- Agregar la muestra a la columna previamente preparada y mezclar por pipeteo.
- Centrifugar a máxima velocidad por 30 seg y descartar el sobrenadante.
- Agregar 700 µL de buffer PE a cada columna.
- Centrifugar a máxima velocidad por 30 seg y descartar el sobrenadante.
- Centrifugar el tubo en seco a máxima velocidad por 1 min.
- Colocar la columna en un tubo nuevo eppendorf de 1,5 mL (previamente rotulado).
- Eluir en 20 µL de buffer EB, incubar a temperatura ambiente por 1 min, luego centrifugar a máxima velocidad por 1 min.

#### e. Ligación del adaptador

Reactivo	1x (µL)	25x (µL)
Quick Ligase Buffer (2X)	20	500
Solexa adapter mix	1	25
<b>Mezcla Total</b>	21	
<b>Templado</b>	20	

- Agregar 21 µL de la mezcla y el volumen completo del eluido del último paso (~ 20 µl) a cada tubo (usar tiras de tubos de PCR de 0,2 mL)

- Después, agregar 1  $\mu\text{L}$  de Quick ligase (Conc. Stock: 5 U, Conc. Final: 0,125 U) a cada librería y mezclar por pipeteo.
- Incubar a 22°C durante 20 min.

#### f. Purificación MinElute

- Preparar una columna nueva de purificación y un tubo eppendorf de 1,5 mL para cada muestra.
- Agregar 700  $\mu\text{L}$  de buffer PB a cada columna
- Agregar la muestra a la columna previamente preparada y mezclar por pipeteo.
- Centrifugar a máxima velocidad por 30 seg y descartar el sobrenadante.
- Agregar 700  $\mu\text{L}$  de buffer PE a cada columna.
- Centrifugar a máxima velocidad por 30 seg y descartar el sobrenadante.
- Centrifugar el tubo en seco a máxima velocidad por 1 min.
- Colocar la columna en un tubo nuevo eppendorf de 1,5 mL (previamente rotulado).
- Eluir en 22  $\mu\text{L}$  de buffer EB, incubar a temperatura ambiente por 1 min, luego centrifugar a máxima velocidad por 1 min.

#### g. Fill-in

Reactivo	Concentración	1x ( $\mu\text{L}$ )	25x ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		13,8	345
Thermol pol buffer	(10X)	4	100
dNTPs	25mM	0,2	5
Bsm polymerase	8U/ $\mu\text{l}$	2	50
<b>Mezcla Total</b>	<b>20</b>		
<b>Templado</b>	<b>22</b>		

- Adicionar 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla y el volumen completo del eluido del último paso (~22  $\mu\text{l}$ ) a cada tubo (usar tiras de tubos de PCR de 0,2 mL).
- Incubar a 37°C durante 30 min y después a 80°C durante 10 min.
- Mantener a -20°C.

## Protocolo 3. PCR de indexación de las muestras de ADN tratadas con UDG

### 1. Materiales

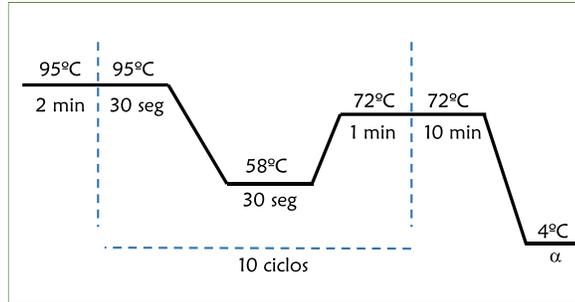
- Pfu Polymerasa
- Pfu buffer
- dNTPs
- Primers P5 y P7
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- Consumibles: Tiras de tubos de PCR de 0,2 mL (libres de ADNasa/ARNasa), puntas de pipetas de 200 y 1000 µL con filtro y libres de ADNasa/ARNasa.
- Equipos: Pipetas automáticas de 20, 200 y 1000 µL, Thermomixer o bloque térmico que permita incubaciones a 12, 25, 37, 56 y 80°C, Microcentrífuga con rotor para tubos de 2 mL y vortex.

### 2. Procedimiento

- Preparar un tubo eppendorf de 1,5 mL nuevo y una tira de tubos de PCR (4 pocillos) para cada muestra.
- Preparar la siguiente mezcla en un tubo de 15 mL o en varios tubos de 2 mL.

Reactivo	1x	4x (µL)	100x (µL)
H <sub>2</sub> O HPLC	35,6	142,4	3560
Pfu buffer (10x)	5	20	500
dNTPs (200 mM)	0,4	1,6	40
Pfu Polymerase	1	4	100
<b>Mezcla Total</b>	<b>42</b>	<b>168</b>	<b>4200</b>

- Dividir la mezcla así:  $42 \times 4 = 168$  µL (para cuatro reacciones) en un tubo de 1,5 mL nuevo.
- Agregar 6 µL del cebador P7 y 6 µL del cebador P5 a cada mezcla. (Utilizar la combinación específica, previamente establecida).
- Agregar las muestras de ADN tratado con UDG (~ 40 µl) a la mezcla apropiada.
- Mezclar cuidadosamente moviendo los tubos con el dedo, realizar un spin.
- Tomar 50 µL de la reacción y dispensar en los 4 tubos de la tira (previamente preparada).
- Programa de PCR



- Etiquetar tubos nuevos de 1.5 mL con la identificación de cada librería y la fecha de preparación.

### *Purificación MinElute*

- Preparar una columna nueva de purificación (Qiagen) y un tubo eppendorf de 1,5 mL para cada muestra.
- Agregar 500  $\mu$ L de buffer PB a cada columna
- Agregar 50  $\mu$ L de la muestra (dos veces para un volumen total de 100  $\mu$ L) a la columna previamente preparada con PB y mezclar por pipeteo.
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 min y descartar el sobrenadante.
- Agregar nuevamente 500  $\mu$ L de buffer PB a cada columna; y agregar el resto de la muestra (Total: 100  $\mu$ L nuevamente) a la columna y mezclar por pipeteo.
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 min y descartar el sobrenadante.
- Agregar 600  $\mu$ L de buffer PE a cada columna.
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 min y descartar el sobrenadante.
- Centrifugar el tubo en seco a máxima velocidad por 1 min.
- Colocar la columna en un tubo nuevo eppendorf de 1,5 mL (previamente rotulado).
- Eluir en 53  $\mu$ L de buffer EB, incubar a temperatura ambiente por 1 min, luego centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
- Almacenar las muestras a -20°C, hasta su procesamiento.

## Protocolo 4. Obtención y purificación de *M. leprae* a partir de biopsias frescas

### 1. Materiales

- Solución Suero-Fenol
- Solución salina balanceada de hank's frío (Sigma ref H9269)
- 1 tubo con medio de cultivo Lowenstein Jensen
- 1 tubo con medio de cultivo 7H9
- *Consumibles:* Papel absorbente, tubos Falcon de 50 mL, Filtro celular BD Falcon (Ref 352340), Caja de Petri (estéril), Jeringa de 5 a 10 mL, Aguja de insulina, Tubos de 5 mL estériles, Tubos eppendorf de 2 mL, Gradilla y soporte para tubos y microtubos, laminas porta objetos, Puntas de 1000, 100 y 10  $\mu$ L con filtro
- *Equipos:* Pipetas automáticas de 100, 200 y 1000  $\mu$ L, Thermomixer o bloque térmico, Centrifuga refrigerada y vortex,

### 2. Procedimiento

#### a. Obtención de los bacilos

##### Notas:

- El procedimiento debe realizarse usando bata desechable estéril, para evitar cualquier contaminación.
- Si es posible realizar el procedimiento en condiciones frías (Contenedor con hielo) y así evitar la pérdida de viabilidad de los bacilos.
- Si los bacilos purificados se utilizaran para la infección de células, deberán ser utilizados en un periodo no mayor a 8 horas.
- La cámara de flujo deberá ser preparada previamente y así poder ponerla en U.V. al menos 15 min antes de iniciar el proceso.

1. Transferir la biopsia del paciente a una caja de Petri estéril y con ayuda de unas tijeras de punta curva o bisturí, picar el tejido.
2. Con ayuda de las tijeras o el bisturí, transferir el material a un tubo de 5 mL estéril que contiene 1 mL de solución de hank's frío.
3. Homogeneizar los tejidos utilizando el homogeneizador en tres bloques de 15 segundos.

**Nota:** Evitar que la suspensión eleve demasiado la temperatura, realizar el homogeneizado con intervalos de 1 min. Se recomienda mantener en hielo para evitar la disminución de la viabilidad de los bacilos.

4. Pasar la suspensión por el filtro celular ubicado sobre un tubo falcón de 50 mL. (retirar el exceso de piel y tejido).
5. Adicionar al tubo de la suspensión 1 mL de solución de hank's fría y homogeneizar y filtrar.

6. Tomar los residuos que quedaron en el filtro y ponerlos en el tubo en donde se realiza el homogeneizado y adicionar 1 mL de solución de hank's fría. Homogeneizar y filtrar. Realizar este procedimiento hasta alcanzar un volumen de 9 mL.

**Nota:** Los procesos de lavado tienen como objetivo recuperar la mayor cantidad de bacilos posible.

7. Adicionar a la suspensión en el tubo falcón 1,5 mL de tripsina al 0,5% ([0.05%] final) e incubar en baño serológico a 37°C por una hora.

**Nota:** Sellar el tubo con papel parafilm y así evitar contaminación.

8. Adicionar a la suspensión en el tubo falcón 1,5 mL de tripsina al 0,5% ([0.05%] final) e incubar en baño serológico a 37°C por una hora.
9. Completar el volumen a 40 mL con solución de hank's fría (Dilución de la tripsina).
10. Centrifugar a 5000 rpm por 30 min a 4°C (Si la suspensión está en tubos eppendorf centrifugar a 6000 rpm por 14.20 min a 4°C).
11. Descartar el sobrenadante y adicionar de 1 a 3 mL de solución de hank's (Volumen a utilizar depende del pellet formado).
12. Dispersar los grumos con ayuda de una jeringa y aguja de insulina, mezclando suavemente 10 veces (Esto permite la homogeneización de la suspensión y el rompimiento de las globias).
13. Poner la suspensión en un tubo eppendorf de 2 mL y tomar dos gotas para control de esterilidad en medio BHI, LJ y 7H9.

#### **b. Solución fenol-suero Cuantificación los bacilos**

1. Marcar tres campos de 1 cm de diámetro en tres láminas portaobjetos nuevos y desengrasados.
2. Marcar cada una de las láminas portaobjetos así: N (Normal), 1/10 y 1/100 y la identificación del paciente.
3. Hacer dos diluciones 1/10 y 1/100 de la suspensión bacilar con solución salina de Hank's.
4. En los campos marcados en las láminas poner 10 µL de solución fenol suero.
5. Colocar 10 µL de cada la dilución en cada círculo, haciendo un extendido homogéneo. Dejar secar a temperatura ambiente y fijar por calor. Realizar esto con las láminas N (Suspensión) 1/10 y 1/100.
6. Colorear por la técnica de Zielh Neelsen (De Naranjo et al. 1988).
7. Contar en los tres extendidos el número de bacilos en 20 campos y sacar el promedio.
8. Calcular en N° de bacilos totales con la siguiente formula.

$$\text{BAAR/campo} = \frac{\text{Numero de bacilos contados}}{60 \text{ campos contado}}$$

$$\text{BAAR totales} = \frac{\text{BAAR}}{\text{campo}} * \text{Factor de corrección del micro} * \text{Factor de dilución}$$

Factor de dilución depende de la lámina en donde se haya realizado la lectura.

$$\text{Bacilos/mL} = \frac{\# \text{ bacilos}}{\# \text{ campos}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{10 \mu\text{L}} \times \frac{\text{DC}}{\text{DCM}}$$

Siendo DC el diámetro del círculo y DCM el diámetro del campo microscópico (OMS 1989).

## **Protocolo 5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc a partir de células de Schwann infectadas con *M. leprae***

### **1. Consideraciones generales**

Este protocolo operativo estándar se basó en los protocolos proporcionado por Qiagen®.

### **2. Materiales**

- Rneasy Mini Kit (250)
- Etanol al 70%
- 2-Mercaptoethanol
- Dnasa I
- Consumibles: Tiras de tubos de PCR de 0,2 mL (libres de ADNasa/ARNasa), puntas de pipetas de 200 y 1000 µL con filtro y libres de ADNasa/ARNasa.
- Equipos: Pipetas automáticas de 20, 200 y 1000 µL, Thermomixer o bloque térmico, Microcentrifuga con rotor para tubos de 2 mL y vortex.

### **3. Procedimiento**

1. Cosechar un máximo de  $1 \times 10^7$  células, como un sedimento celular. Agregar 350 – 600 µL de buffer RTL y mezclar con vortex. Centrifugar el lisado durante 3 minutos a máxima velocidad, retirar el sobrenadante con cuidado y úselo en el siguiente pasó.
2. Agregar 1 volumen de etanol al 70% al lisado y mezclar por pipeteo.
3. Transferir hasta 700 µL de la muestra, incluido cualquier precipitado, a una columna Rneasy Mini colocada de un tubo de recolección de 2 mL. Cierre la tapa y centrifugar durante 15 segundos a  $\geq 10000$  rpm, deseche el flujo continuo.

Nota: Si utiliza el kit de Dnasa por primera vez, prepare la solución de Dnasa 1 agregando 550 µL de agua libre de Rnasa en el vial de la Dnasa. Mezclar suavemente (No usar vortex). Para el almacenamiento a largo plazo de la solución, divida está en alícuotas de un solo uso y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta por 9 meses. Las alícuotas descongeladas se pueden almacenar a  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  hasta por 6 semanas. No vuelva a congelar alícuotas después de descongelar.

4. Agregar 350 µL de buffer RW1 a la columna Rnesy, cierre la tapa y centrifugue durante 15 seg a  $\geq 10000$  rpm, deseche el flujo continuo.
5. Agregar 10 µL de solución de DNasa I a 70 µL de buffer RDD. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar brevemente.
6. Agregar la mezcla de DNasa I (80 µL) directamente a la membrana de la columna Rnesy y colocar en la mesa de trabajo ( $20-30^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos).
7. Agregar 350 µL de buffer RW1 a la columna Rnesy, cierre la tapa y centrifugar a  $\geq 10000$  rpm, deseche el flujo continuo.

Nota: Agregar 4 volúmenes de etanol al 100% al buffer RPE.

8. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE a la columna Rnesy, cierre la tapa y centrifugar a  $\geq 10000$  rpm, por 15 seg, para lavar la membrana y deseche el flujo continuo.
9. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE a la columna Rnesy, cierre la tapa y centrifugar a  $\geq 10000$  rpm, por 2 min y deseche el flujo continuo.
10. Colocar la columna en un tubo colector de 2 mL nuevo, cierre la tapa y centrifugue a máxima velocidad durante 1 min.
11. Colocar la columna Rnesy en un nuevo tubo de recolección de 1.5 mL y agregar 30-50  $\mu\text{L}$  de agua libre de Rnasas directamente a la membrana de la columna. Cierre la tapa y centrifugar durante 1 min a  $\geq 10000$  rpm, por 1 min para eluir el ARN.
12. Si el rendimiento de ARN esperado es  $>30$   $\mu\text{g}$ , repetir el paso 11 usando otros 30-50  $\mu\text{L}$  de agua libre de Rnasa. Vuelva a usar el tubo de recolección del paso 11.

#### 4. Síntesis de ADNc

1. Tomar 10  $\mu\text{L}$  del ARN previamente extraído y adicionar 1  $\mu\text{L}$  de random primer [0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ].
2. Incubar a 65°C durante 5 min.
3. Una vez finalizado en tiempo de incubación, poner inmediatamente en hielo.
4. A la mezcla anterior adicionar 9  $\mu\text{L}$  de la siguiente mezcla:

Reactivo	1x ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O DEPC	2,0
Buffer 5x	4
dNTPs (10 mM)	2,0
Transcriptasa reversa (200 U/ $\mu\text{L}$ )	1
<b>Mezcla Total</b>	<b>9</b>

5. Mezclar con vortex.
6. En un termociclador realizar los siguientes pasos de incubación.
  - 30°C x 10 min.
  - 42°C x 5 horas.
  - 4°C x 20 min.
7. Guardar el ADNc a - 20°C, se recomienda realizar una verificación previa del ADNc amplificando por PCR convencional con el gen housekeeping *sod*

## **Protocolo 6. Protocolo PCR en tiempo real para el análisis de PGL-1 en *M. leprae***

### **1. Materiales**

- Tubos Eppendorf (libres de ARNasa / ADNasa)
- Master Mix: SsoAdvanced Universal SYBER Green Supermix
- Agua RF (agua libre de ARNasa)
- Tampón TE (TrisHCl 5 mM y EDTA 0,1 mM pH 8,0)
- Consumibles: Tiras de tubos de PCR de 0,2 mL (libres de ADNasa/ARNasa), puntas de pipetas de 200 y 1000  $\mu$ L con filtro y libres de ADNasa/ARNasa, tubos eppendorf
- Equipos: Pipetas automáticas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L, Thermomixer o bloque térmico, Microcentrífuga con rotor para tubos de 2 mL y vortex, centrífuga de placa, termociclador de PCR en tiempo real.

### **2. Procedimiento**

#### **a. Preparación**

1. Encender la cabina de flujo laminar, limpiar previamente con alcohol y dejar la luz ultravioleta durante 15 minutos.
2. En la cabina de flujo laminar, diluir el stock de los primers a una concentración de 10  $\mu$ M en tubos eppendorf libres de ARNasa/ADNasa.
3. Preparar la mezcla así:

Buffer (10X)	5 $\mu$ L
Primer F (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
Primer R (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
Agua	2,5 $\mu$ L

4. Agregar 8  $\mu$ L de la mezcla de reacción a cada pozo de la placa de PCR (placa de 96).
5. Fuera de la cabina de flujo laminar, agregar 2  $\mu$ L de ADNc (concentración del ADNc 5ng/ $\mu$ L) por reacción. De esta forma la reacción tendrá un volumen final de 10  $\mu$ L.
6. Llevar la placa al termociclador

#### **b. Curva estándar**

1. Tomar 2 $\mu$ L de ADNc de cada una de las muestras de interés y se deben mezclar en un tubo eppendorf (mezclar con vortex para lograr una muestra homogénea).
2. A partir de esta mezcla, preparar entre 5 y 6 diluciones en base 10. (La mezcla de ADNc restante se debe guardar a -20°C, para utilizarlo en futuros experimentos).

- Las muestras diluidas se deben conservar en hielo hasta que se prepare la placa de reacción. Las muestras deben ser diluidas en agua libre de DNAsas o buffer TE al 0,1%.

*Preparación mezcla de reacción curva estándar*

- Prepare la mezcla de reacción con los componentes y volúmenes así:

Buffer (10X)	5 $\mu$ L
Primer F (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
Primer R (10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
Agua	3,5 $\mu$ L

**Notas:** Para la realización de la curva estándar se debe tener en cuenta: Los primers para la amplificación de las muestras de diluidas para la realización de la curva estándar deben ser los del gen normalizador o gen *Housekeeping* y se debe montar cada dilución por duplicado.

- Coloque la mezcla de reacción en los tubos correspondientes y adicione 1  $\mu$ L de ADNc diluido (nota: recuerde que se debe hacer por duplicado), evite la formación de burbujas, para esto ponga las muestras por las paredes del tubo.
- Debe poner las reacciones en hielo hasta que monte la placa de reacción en el equipo.

*Puntos para tener en cuenta durante la preparación*

- Si el experimento incluye más de un ensayo diana, prepare la mezcla de cada ensayo de manera separada.
- Incluir un volumen de exceso en los cálculos para compensar la pérdida que se produce durante las transferencias de reactivos, se recomienda un volumen de exceso del 10%.
- Para una correcta preparación de los reactivos se debe tener en cuenta las recomendaciones del fabricante.
- Se deben mantener los ensayos protegidos de la acción de la luz directa, con bajas temperaturas.
- Previo a la realización de la mezcla, de vueltas al tubo que contiene la máster mix y luego centrifugue brevemente para retirar restos de la tapa.
- Para descongelar las muestras que se encuentran congeladas, colóquelas en hielo. Una vez descongeladas agite las muestras para resuspenderlas y a continuación centrifugue los tubos brevemente.
- No se deben marcar las tapas o el adhesivo de la placa de reacción, esto interfiere con la lectura realizada por el equipo.

## Anexo B. Cuantificación de ADN después de la extracción y después de la preparación de las librerías

Codificación de los pacientes en el estudio - año de toma de la muestra	Código de la muestra	Concentración ADN (ng/ $\mu$ L)	Concentración de la Librería (ng/ $\mu$ L)	Tamaño (pb)
1-1997	COL_545	1.39	10.4	195
1-1995	COL_656	1.66	6.12	184
1-1994	COL_672	1.21	11.1	189
2-1996	COL_587	2.68	37.2	183
2-1992	COL_764	2.36	15.2	160
3-1998	COL_509	1.78	23.2	195
3-1992	COL_780	2.26	11.7	187
4-1999	COL_457	2.00	10.3	188
4-1994	COL_664	2.23	32.0	182
5-2002	COL_199	1.54	2.71	197
5-1992	COL_767	1.31	33.3	199
6-2002	COL_232	1.71	0.910	192
6-1996	COL_598	2.48	4.99	192
7-1996	COL_600	1.15	17.9	189
7-1994	COL_662	12.2	26.0	188
8-2001	COL_317	2.32	2.39	202
8-1994	COL_667	0.078	0.968	189
9-2004	COL_122	1.73	8.91	221
9-2003	COL_187	3.94	3.92	210
10-1998	COL_507	1.87	12.1	194
10-1994	COL_661	2.03	20.1	190
11-2002	COL_193	1.39	4.22	196
11-1998	COL_524	1.37	15.6	186
12-2003	COL_163	1.66	5.87	587
12-2000	COL_412	0.56	1.48	181
12-1990	COL_874	3.48	16.8	193
13-2003	COL_153	1.50	5.1	216
13-2000	COL_432	<LOD	0.711	172
14-1999	COL_452	1.24	22.8	187
14-1996	COL_613	1.92	13.9	181
15-2002	COL_233	2.30	16.8	194

Codificación de los pacientes en el estudio - año de toma de la muestra	Código de la muestra	Concentración ADN (ng/μL)	Concentración de la Librería (ng/μL)	Tamaño (pb)
15-1997	COL_533	2.07	33.3	197
16-2003	COL_167	2.16	29.1	209
16-2000	COL_406	1.58	21.9	202
17-2003	COL_188	2.31	14.1	198
17-1999	COL_459	2.36	21.1	200
18-1999	COL_488	2.35	31.1	199
18-1995	COL_640	1.29	21.3	186
19-1995	COL_626	1.43	1.67	196
19-1993	COL_733	1.44	1.87	198
20-1999	COL_467	1.85	14.2	197
20-1987	COL_960	1.25	13.7	175
21-2000	COL_377	1.37	0.770	192
21-1996	COL_611	1.29	0.620	175
22-1997	COL_547	2.53	41.8	191
22-1992	COL_774	1.73	13.5	195
23-1999	COL_478	1.68	31.6	198
23-1996	COL_584	2.60	10.6	181
24-1997	COL_535	3.83	22.1	204
24-1992	COL_787	1.36	7.55	191
25-2002 <sup>a</sup>	COL_274	1.91	32.6	209
25-2002B	COL_275	1.71	37.5	229
18-2191	17082005	2.59	19.9	221
18-9217	14279217	2.56	38.2	208
18-428	14279217	1.88	0.560	207
18-2948	17221022	2.23	12.78	266
18-3026	79768135	1.76	20.3	247

Límite de detección: LOD

## Anexo C. Programas usados para los análisis bioinformáticos

Programa	Uso en el proyecto	Referencia
BEAST	Programa multiplataforma para el análisis bayesiano de secuencias moleculares utilizando MCMC. Está orientado para el análisis de filogenias enraizadas y análisis evolutivos utilizando modelos de reloj molecular estrictos o relajados.	[123]
Bowtie 2	Herramienta para alinear las lecturas obtenidas durante el proceso de secuenciación con secuencias de referencia. Este permite modos de alineamiento con espacios, local y emparejado.	[114]
ClipAndMerge	Parte de las herramientas EAGER; este método realiza un corte altamente eficiente de las lecturas de secuenciación.	[113]
DESeq2	Método de análisis diferencial de los datos de secuenciación, que utiliza una estimación para mejorar la estabilidad e interpretabilidad de las estimaciones. Este permite un análisis cuantitativo centrado en la fuerza más que en la mera expresión diferencial.	[177]
EAGER	Herramientas que abordan en pre-procesamiento, el mapeo, eliminación de duplicados por PCR y la genotipificación de secuencias o datos generados por secuenciación NGS (p. Ej., Illumina HiSeq, MiSeq o NextSeq)	[113]
Genome Analysis Toolkit (GATK)	Conjunto de herramientas para el análisis genómico que se centra en el descubrimiento de variantes. Este identifica SNP e InDels en datos en ADN y ARNseq obtenidos por secuenciación de alto rendimiento	[116]
Integrative Genomics Viewer (IGV)	Herramienta de visualización que permite la exploración intuitiva y en tiempo real de diversos conjuntos de datos genómicos a gran escala. Admite la integración flexible de una amplia gama de tipos de datos genómicos, incluidas lecturas de secuencias alineadas, mutaciones, número de copias, pantallas de interferencia de ARN, expresión génica, metilación y anotaciones genómicas.	[127]
MapDamage	Herramienta computacional que rastrea y cuantifica los patrones de daños entre las lecturas de secuenciación obtenidas por la secuenciación NGS de ADN antiguo.	[115]
MEGAX	Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), implementa métodos y herramientas analíticas para explorar, descubrir y analizar secuencias de ADN y proteínas desde una perspectiva evolutiva, generando análisis de filogenómica y filomedicina.	[126]

Programa	Uso en el proyecto	Referencia
Mycobrowser	Proporciona información tanto generada in silico como revisada manualmente dentro de bases de datos dedicadas a los genomas completos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> y <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	[179]
MultiQC	Analiza las estadísticas resumidas de los resultados y archivos de registro generados por otras herramientas bioinformáticas.	[184]
Primer-Blast	Esta herramienta combina BLAST con un algoritmo de alineación global para garantizar una alineación cebador-objetivo completa y es lo suficientemente sensible como para detectar objetivos que tienen un número significativo de desajustes con los cebadores.	[180]
Primer3plus	Primer3Plus, una interfaz para diseño de oligonucleótidos, esta admite una variedad de formatos de secuencia, como FASTA.	[181]
SnEff	Categoriza de forma rápida los efectos de las variantes en las secuencias del genoma, basados en su ubicación genómica y predice los efectos en la codificación.	[117]
SnEff	Anota variaciones genómicas como: SNPs, InDel, polimorfismos de múltiples nucleótidos en función de sus ubicaciones genómicas. También predice efectos de codificación como cambios sinónimos o no sinónimos, ganancia o pérdida de codones, codones de parada o cambios en el marco de lectura.	[117]
SPAdes	Genera ensamblajes unicelulares, proporcionando información sobre genomas de bacterias no cultivables que se obtienen mediante tradicionales de metagenómica.	[122]
SAMTools	Conjunto de programas usados para interactuar con datos de secuenciación de alto rendimiento.	[118]
TempEst	Herramienta para investigar la señal temporal de las filogenias moleculares. En este se pueden analizar árboles contemporáneos (donde todas las secuencias se han recopilado al mismo tiempo y arboles de punta fechada (donde las secuencias se han recopilado en diferentes fechas)	[125]
Tracer	Software para visualizar y analizar los archivos MCMC generados a través de la inferencia filogenética bayesiana. Este proporciona la reconstrucción de la trayectoria demográfica, visualización multivariado, entre otras.	[124]
TreeAnnotator	Programa para resumir la información de análisis producidos por BEAST en un solo árbol "Objetivo". La información resumida incluye las probabilidades de los nodos en el árbol objetivo, las estimaciones posteriores y los límites HDP.	[123]
Trimmomatic	Incluye una variedad de pasos de procesamiento para el recorte y filtrado de lecturas producto del proceso de secuenciación, identifica las secuencias de los adaptadores y filtrado de calidad.	[185]

Programa	Uso en el proyecto	Referencia
VarScan	Herramienta para detectar variantes en los datos obtenidos a partir de la secuenciación de alto rendimiento.	[119]
WGCNA	Se puede usar para encontrar grupos (módulos) de genes altamente correlacionados, para resumir dichos grupos usando el gen propio del módulo o un gen concentrador intramodular, para relacionar módulos entre sí y con rasgos de muestra externos (usando la red de genes propios metodología), y para calcular las medidas de pertenencia al módulo. adjunto.	[178]

### Anexo D. Resultados del análisis de SNPs por muestra

CHROM	REF	ALT	QUAL	TYPE	Profundidad	Frecuencia del Alelo	# de observaciones del alelo de referencia	# de observaciones del alelo alterno	Longitud del SNP
SNP_73	A	G	1145.29	snp	47	1	1	46	1
SNP_883	G	A	2217.65	snp	80	1	1	79	1
SNP_1011	G	A	2654.16	snp	92	1	1	91	1
SNP_7614	C	T	440.757	snp	58	1	0	57	1
SNP_8453	T	C	1276.19	snp	72	1	0	72	1
SNP_10505	C	T	2899.56	snp	97	1	1	96	1
SNP_21139	G	T	2160.45	snp	81	1	2	79	1
SNP_22488	G	A	2469.75	snp	80	1	0	80	1
SNP_38202	C	T	2109.06	snp	78	1	0	78	1
SNP_52851	T	C	2512.77	snp	83	1	0	83	1
SNP_61425	A	G	2398.08	snp	84	1	0	84	1
SNP_61530	C	T	2191.96	snp	78	1	0	78	1
SNP_77864	T	C	2779.69	snp	95	1	0	95	1
SNP_116225	C	T	1904.36	snp	76	1	1	75	1
SNP_156948	C	T	2221.12	snp	82	1	0	82	1
SNP_298572	A	G	2785.07	snp	113	1	2	110	1
SNP_305310	G	A	3345.98	snp	117	1	0	117	1
SNP_330125	G	A	2821.84	snp	108	1	1	107	1
SNP_481476	A	G	2959.69	snp	94	1	0	94	1
SNP_485138	T	C	3043.98	snp	97	1	1	96	1
SNP_494674	T	G	2900.29	snp	99	1	0	99	1
SNP_508481	T	C	454.011	snp	60	1	1	58	1
SNP_530685	C	T	2750.79	snp	93	1	0	92	1

CHROM	REF	ALT	QUAL	TYPE	Profundidad	Frecuencia del Alelo	# de observaciones del alelo de referencia	# de observaciones del alelo alterno	Longitud del SNP
SNP_574639	G	A	3057.8	snp	105	1	0	105	1
SNP_604325	T	C	3906.68	snp	132	1	0	132	1
SNP_623365	C	T	2430.56	snp	95	1	1	94	1
SNP_657736	G	C	2532.06	snp	81	1	0	81	1
SNP_694090	T	C	1885.55	snp	65	1	0	65	1
SNP_774704	G	A	3249.05	snp	117	1	1	115	1
SNP_832152	T	C	2992.66	snp	108	1	3	105	1
SNP_840584	A	G	2680.41	snp	91	1	0	91	1
SNP_890453	A	G	2621.66	snp	86	1	0	86	1
SNP_904824	G	C	2681.38	snp	93	1	0	93	1
SNP_954663	T	C	2509.86	snp	87	1	1	86	1
SNP_972005	T	G	3286.16	snp	110	1	0	110	1
SNP_1017407	G	A	2044.59	snp	72	1	1	70	1
SNP_1038669	C	T	2684.26	snp	96	1	0	96	1
SNP_1070051	C	T	2670.29	snp	95	1	2	93	1
SNP_1087397	T	C	2552.4	snp	86	1	0	86	1
SNP_1104232	C	G	1518.6	snp	54	1	0	54	1
SNP_1113923	A	G	2274.58	snp	78	1	0	78	1
SNP_1143423	T	C	2283.22	snp	80	1	0	80	1
SNP_1155582	T	G	1657.66	snp	61	1	2	59	1
SNP_1160426	C	G	1970.29	snp	74	1	1	73	1
SNP_1164291	C	T	2661.42	snp	94	1	0	94	1
SNP_1206341	C	T	3625.09	snp	130	1	0	130	1
SNP_1217336	G	A	2997.05	snp	106	1	1	104	1
SNP_1223294	C	T	2507.87	snp	86	1	0	86	1
SNP_1227631	C	A	3229.42	snp	120	1	0	119	1

CHROM	REF	ALT	QUAL	TYPE	Profundidad	Frecuencia del Alelo	# de observaciones del alelo de referencia	# de observaciones del alelo alterno	Longitud del SNP
SNP_1257185	T	C	2849.18	snp	100	1	1	99	1
SNP_1265267	T	G	2726.17	snp	98	1	1	96	1
SNP_1291018	G	A	2789.47	snp	95	1	1	94	1
SNP_1324009	C	G	3969.73	snp	140	1	0	140	1
SNP_1329459	C	T	2679.73	snp	94	1	0	94	1
SNP_1339813	T	C	3399.24	snp	119	1	1	118	1
SNP_1348426	T	C	1134.32	snp	72	1	0	72	1
SNP_1351149	C	G	2624.8	snp	94	1	0	94	1
SNP_1450888	G	A	2296.4	snp	80	1	0	80	1
SNP_1466041	C	A	2756.59	snp	97	1	1	96	1
SNP_1527053	G	C	154.068	snp	65	1	2	63	1
SNP_1529088	A	G	2178.46	snp	73	1	0	73	1
SNP_1579109	T	G	2262.36	snp	82	1	1	81	1
SNP_1585800	A	G	2838.42	snp	93	1	0	93	1
SNP_1588112	G	C	3150.39	snp	109	1	0	109	1
SNP_1600434	T	G	2069.8	snp	65	1	0	65	1
SNP_1605956	G	A	507.516	snp	43	1	0	43	1
SNP_1614069	T	C	2005.28	snp	68	1	0	68	1
SNP_1625045	T	G	232.111	snp	57	1	0	57	1
SNP_1642875	G	T	440.223	snp	57	1	0	57	1
SNP_1643162	T	C	2085.01	snp	71	1	1	70	1
SNP_1657373	G	T	2898.31	snp	103	1	0	102	1
SNP_1677493	G	C	2198.77	snp	80	1	0	80	1
SNP_1701590	G	C	292.739	snp	58	1	0	58	1
SNP_1734697	G	A	2650.57	snp	95	1	2	93	1
SNP_1759651	G	A	2599.06	snp	89	1	1	88	1

CHROM	REF	ALT	QUAL	TYPE	Profundidad	Frecuencia del Alelo	# de observaciones del alelo de referencia	# de observaciones del alelo alterno	Longitud del SNP
SNP_1787399	C	T	2533.4	snp	95	1	2	92	1
SNP_1797211	C	T	3143.22	snp	126	1	1	125	1
SNP_1843283	C	A	2003.54	snp	69	1	0	69	1
SNP_1897187	C	A	2311.1	snp	85	1	0	85	1
SNP_1900006	G	A	2658.99	snp	91	1	0	90	1
SNP_1926696	T	C	3159.84	snp	102	1	0	102	1
SNP_1928719	A	C	1974.51	snp	68	1	0	68	1
SNP_1962036	C	T	2929.5	snp	106	1	2	104	1
SNP_1983606	C	T	2079.89	snp	82	1	1	81	1
SNP_1996633	C	T	2607.64	snp	87	1	1	86	1
SNP_2011747	T	G	588.293	snp	75	1	0	75	1
SNP_2015320	G	C	2694.9	snp	101	1	2	98	1
SNP_2043287	A	G	2969.67	snp	107	1	0	107	1
SNP_2100523	C	G	3100.51	snp	106	1	0	106	1
SNP_2104127	T	C	3337.64	snp	115	1	0	115	1
SNP_2119392	A	G	498.652	snp	67	1	1	66	1
SNP_2155013	T	G	2562.3	snp	90	1	1	89	1
SNP_2174865	G	C	2662.92	snp	92	1	0	92	1
SNP_2184965	T	C	366.22	snp	74	1	0	74	1
SNP_2200732	C	T	2372.07	snp	87	1	0	87	1
SNP_2459766	A	G	661.534	snp	56	1	0	56	1
SNP_2542313	G	A	3043.43	snp	107	1	0	106	1
SNP_2553176	T	G	2975.09	snp	105	1	0	105	1
SNP_2706236	T	G	2314.32	snp	85	1	1	84	1
SNP_2714879	T	A	2505.21	snp	88	1	1	87	1
SNP_2751783	A	G	2925.66	snp	102	1	0	102	1

CHROM	REF	ALT	QUAL	TYPE	Profundidad	Frecuencia del Alelo	# de observaciones del alelo de referencia	# de observaciones del alelo alterno	Longitud del SNP
SNP_2784324	A	G	2054.62	snp	73	1	1	72	1
SNP_2818521	T	C	817.463	snp	83	1	0	83	1
SNP_2935685	A	C	2389.81	snp	83	1	2	81	1
SNP_2964999	T	C	3066.78	snp	100	1	0	100	1
SNP_2978374	C	A	2476.84	snp	89	1	1	88	1
SNP_2990150	T	C	2145.23	snp	77	1	0	77	1
SNP_2999976	C	T	2104.97	snp	81	1	2	79	1
SNP_3016175	T	C	4066.69	snp	143	1	0	143	1
SNP_3102778	A	C	2737.98	snp	96	1	1	95	1
SNP_3110858	T	C	1724.3	snp	63	1	0	63	1
SNP_3175296	A	C	384.434	snp	53	1	0	53	1
SNP_3243731	A	G	1991.92	snp	80	1	1	79	1

## Anexo E. Lista de 42 genomas de *M. leprae* usados para inferir SNPs en casos recurrentes

Nombre	Año	País	Genotipo	Branch	Descrito en
TN	2000	India	1A	1	[17]
Thai53	2005	Tailandia	1A	1	[26]
S2	1995	Antillas	1B	1	[43]
S11	2000	India	1D	1	[43]
Airaku-3	2000	Japón	1D	1	[44]
3077	1074	Suecia	2F	2F	[43]
Jorgen_749	1223	Dinamarca	2F	2F	[47]
Refshale_16	1103	Dinamarca	2F	2F	[43]
SK8	1200	Reino Unido	2F	2F	[43]
SK14	1200	Reino Unido	2F	2F	[205]
Jorgen_625	1368	Dinamarca	3I	3	[43]
Jorgen_533	1293	Dinamarca	3I	3	[47]
Jorgen_722	1256	Dinamarca	3I	3	[47]
Jorgen_404	1276	Dinamarca	3I	3	[47]
Jorgen_427	1258	Dinamarca	3I	3	[47]
GC96	415	Reino Unido	3I	3	[47]
SK2	1283	Reino Unido	3I	3	[43]
NHDP-98	2004	USA	3I	3	[45]
NHDP-55	2004	USA	3I	3	[45]
I30	2005	USA	3I	3	[45]
NHDP-63	2004	USA	3I	3	[26]
Brw15-1	2015	Reino Unido	3I	3	[10]
Brw15-20	2015	Reino Unido	3I	3	[10]
Brw15-5	2015	Reino Unido	3I	3	[10]
Brw15-10	2015	Reino Unido	3I	3	[10]
US57	2000	Islas Marshall	3K-1	5	[38]
Ryukyu-2	2000	Japón	3K-1	5	[38]
Amami	2000	Japón	3K-1	5	[38]
Zensho-9	2000	Japón	3K-1	5	[38]
S9	1996	Nueva Caledonia	3K-0	0	[43]
CM1	1994	Filipinas	3K-0	0	[11]
Jorgen_507	1068	Dinamarca	3K-0	0	[47]
Kyoto-2	2000	Japón	3K-0	0	[32]
Korea-3-2	2000	Corea	3K-0	0	[38]
Zensho-2	2000	Japón	3K-0	0	[38]
S10	2006	China	3K-0	0	[43]
S15	1992	Martiniqués	3L	4	[206]
S13	2013	Mali	4N	4	[43]
S14	2013	Mali	4O	4	[43]
Br4923	2004	Brasil	4P	4	[26,39]
Ch4	2009	Sierra Leona	4	4	[11]
SM1	1979	África	4	4	[11]
Mx1-22 ( <i>M. lepromatosis</i> )			Outgroup		[32]

## Anexo F. Tabla de polimorfismos en *M. leprae* Col\_163 que incluyen SNP sinónimos y no sinónimos

Pos	Mutation Effect	Gen	Protein name or transcript type	A.acid_change	TN	COL_163
73	missense_variant	dnaA	chromosomal replication initiator protein DnaA	Ser25Gly	A	G
883	missense_variant	dnaA	chromosomal replication initiator protein DnaA	Gly295Ser	G	A
1011	synonymous_variant	dnaA	chromosomal replication initiator protein DnaA	Glu337Glu	G	A
7614	synonymous_variant	gyrA	intein-containing DNA gyrase subunit A	Arg99Arg	C	T
8453	missense_variant	gyrA	intein-containing DNA gyrase subunit A	Leu379Pro	T	C
10505	missense_variant	gyrA	intein-containing DNA gyrase subunit A	Ser1063Phe	C	T
21139	missense_variant	ML0017	serine/threonine protein kinase	Leu352Met	G	T
22488	missense_variant	pbpA	D,D-transpeptidase PbpA	Pro394Ser	G	A
38202	missense_variant	ML0032	leucine—tRNA ligase	Arg628Trp	C	T
52851	missense_variant	eccE	type VII secretion protein EccE	Trp287Arg	T	C
61425	missense_variant	ML0049	WXG100 family type VII secretion target	Met90Thr	A	G
61530	missense_variant	ML0049	WXG100 family type VII secretion target	Arg55Gln	C	T
77864	synonymous_variant	gltB	glutamate synthase large subunit	Gly52Gly	T	C
116225	synonymous_variant	ML0093	GNAT family N-acetyltransferase	Gly285Gly	C	T
156948	missense_variant	ML0116	hypothetical protein	Val328Ile	C	T
223209	missense_variant	ML0159	hypothetical protein	Gly187Agr	G	A
298572	synonymous_variant	ML0227	DUF3180 domain-containing protein	Val19Val	A	G
313361	missense_variant	metG	methionine—tRNA ligase	Leu154Pro	A	G
330125	missense_variant	mfd	transcription-repair coupling factor	Ala687Thr	G	A
470179	missense_variant	ML0376	alpha/beta hydrolase	Lys298Gln	A	C
473882	non synonymous_variant	groL	chaperonin GroEL	Gly109Trp	G	T
481476	synonymous_variant	guaB	IMP dehydrogenase	Leu272Leu	A	G
485138	missense_variant	choD	GMC family oxidoreductase	Leu563Pro	T	C
494674	missense_variant	ML0397	diguanylate cyclase	Glu358Asp	T	G
508481	missense_variant	ML0410	PE family protein	Val52Ala	T	C
509023	missense_variant	ML0411	PPE family protein	Val90Ala	T	C
509325	missense_variant	ML0411	PPE family protein	His191Asp	C	G
509578	missense_variant	ML0411	PPE family protein	Ser275Asn	G	A
530685	missense_variant	ML0430	MFS transporter	Ala389Val	C	T
574639	synonymous_variant	ML0473	hypothetical protein	Pro34Pro	G	A

Pos	Mutation Effect	Gen	Protein name or transcript type	A.acid_change	TN	COL_163
623365	synonymous_variant	alaS	alanine—tRNA ligase	Leu403Leu	C	T
657736	synonymous_variant	gmk	guanylate kinase	Val155Val	G	C
687105	missense_variant	ML0568	hypothetical protein	Leu98Pro	T	C
694090	missense_variant	ML0569	L,D-transpeptidase	Thr113Ala	T	C
767345	synonymous_variant	ML0634	decaprenyl diphosphate synthase	Ala212Ala	A	C
774704	synonymous_variant	ML0642	zinc-dependent metalloprotease	Arg407Arg	G	A
832152	synonymous_variant	ML0694	hypothetical protein	His57Arg	T	C
890453	missense_variant	ctpC	manganese-exporting P-type ATPase CtpC	Val173Ala	A	G
904824	synonymous_variant	manB	phosphomannomutase/phosphoglucomutase	Val50Val	G	C
1017407	missense_variant	ML0855	insulinase family protein	Glu387Lys	G	A
1038669	missense_variant	asnB	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	Arg324Gln	C	T
1087397	synonymous_variant	ftsZ	cell 145ndexaci protein FtsZ	Gly34Gly	T	C
1155582	synonymous_variant	recX	recombination regulator RecX	Ala142Ala	T	G
1206341	missense_variant	ML1040	ribonuclease D	Ala66Thr	C	T
1217336	synonymous_variant	xclC	acyl-CoA synthetase	Val76Val	G	A
1223294	synonymous_variant	dapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	Val201Val	C	T
1270719	missense_variant	ML1099	lipoprotein	Val16Gly	A	C
1277394	synonymous_variant	ML1103	FAD-binding protein	Pro128Pro	G	A
1291018	synonymous_variant	ML1114	ABC transporter ATP-binding protein	Asn120Asn	G	A
1324009	missense_variant	rho	transcription termination factor Rho	Gln227Glu	C	G
1329459	synonymous_variant	ML1137	undecaprenyl/decaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase	Ile319Ile	C	T
1339813	synonymous_variant	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	Asp78Asp	T	C
1351149	Synonymous_variant	ML_RS05780	hypothetical protein	Arg20Arg	C	G
1439376	Synonymous_variant	ML1216	adenosylmethionine—8-amino-7-oxononanoate transaminase	Ala259Ala	T	C
1561458	synonymous_variant	ML1308	PPE domain-containing protein	Thr28Thr	A	G
1561478	Synonymous_variant	ML1308	PPE domain-containing protein	Phe35Phe	C	T
1561491	Synonymous_variant	ML1308	PPE domain-containing protein	Pro39Pro	C	T
1585800	missense_variant	ML1333	RNA helicase	Thr436Ala	A	G
1588112	missense_variant	ML1334	DUF4333 domain-containing protein	Gly264Ala	G	C
1625045	synonymous_variant	pyrG	CTP synthase	Pro298Pro	T	G
1677493	synonymous_variant	tsnR	RNA methyltransferase	Ala129Ala	G	C
1714490	synonymous_variant	ML1427	sugar ABC transporter substrate-binding protein	Arg426Arg	C	T
1734697	synonymous_variant	Int	apolipoprotein N-acyltransferase	Leu569Leu	G	A
1759651	missense_variant	nadE	NAD(+) synthase	Ala566Val	G	A

Pos	Mutation Effect	Gen	Protein name or transcript type	A.acid_change	TN	COL_163
1787399	missense_variant	ML1484	ribose-5-phosphate isomerase	Gly159Asp	C	T
1897187	non synonymous_variant	nicT	hypothetical protein	Ala127Gln	C	A
1914268	synonymous_variant	ML1589	phosphatidate cytidyltransferase	Met189Met	T	C
1996633	synonymous_variant	kasB	beta-ketoacyl-ACP synthase	His166His	C	T
2015320	missense_variant	recG	ATP-dependent DNA helicase RecG	Asp545Glu	G	C
2043287	synonymous_variant	ilvC	ketol-acid reductoisomerase	Pro145Pro	A	G
2184965	missense_variant	ML1804	hypothetical protein	Tyr41His	T	C
2301051	synonymous_variant	ML_RS09800	DUF1067 domain-containing protein	Thr17Thr	C	T
2459766	missense_variant	glcB	malate synthase G	Lys591Glu	A	G
2542313	missense_variant	ML2140	MarR family transcriptional regulator	Ser35Leu	G	A
2751783	synonymous_variant	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Ala299Ala	A	G
2768633	missense_variant	ML2336	aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme	Ser100Arg	G	C
2878161	missense_variant	ML2406	1,4-dihydroxy-2-naphthoate polyprenyltransferase	Val255Gln	T	A
2964999	synonymous_variant	clpB	ATP-dependent chaperone ClpB	Glu256Glu	T	C
2999976	missense_variant	ML2518	hypothetical protein	Gly78Asp	C	T
3016175	synonymous_variant	ML2534	PE family protein	Val79Val	T	C
3102778	missense_variant	ML2597	hypothetical protein	Tyr151Ser	A	C
3248058	synonymous_variant	ML_RS13780	DUF1067 domain-containing protein	Thr99Thr	T	C





## Bibliografía

1. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet*. 2004;363: 1209–1219. doi:10.1016/S0140- 6736(04)15952-7
2. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A New *Mycobacterium* Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008;130: 856–864. doi:10.1309/ajcpp72fjzrrvmm
3. Penna ML, Buhner-Sekula S, Pontes MA, Cruz R, Goncalves Hde S, Penna GO. Primary results of clinical trial for uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): reactions frequency in multibacillary patients. *Leprosy review*. 2012;83: 308–19.
4. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19: 338. doi:10.1128/cmr.19.2.338- 381.2006
5. WHO. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. *Weekly epidemiological record*. 2018;93: 444–456.
6. Instituto Nacional de Salud. LEPRO, Periodo epidemiológico XIII. Colombia, 2019. 2019; Bogotá DC, Colombia. Available: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEPRO%20PE%20XIII%202019.pdf>
7. WHO. Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. *Weekly epidemiological record*. 2017;35: 501–520.
8. van Brakel WH, Post E, Saunderson PR, Gopal PK. Leprosy. In: Quah SR, editor. *International Encyclopedia of Public Health* (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2017. pp. 391–401. doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00251-4
9. Lahiri R, Adams LB. Cultivation and Viability Determination of *Mycobacterium leprae*. Scollard DM, Gillis TP (ed). *International textbook of leprosy*. Scollard DM, Gillis TP (ed). 2016. Available: [www.internationaltextbookofleprosy.org](http://www.internationaltextbookofleprosy.org).
10. Avanzi C, del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016;354: 744. doi:10.1126/science.aah3783
11. Honap TP, Pfister L-A, Housman G, Mills S, Tarara RP, Suzuki K, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018;12: e0006190. doi:10.1371/journal.pntd.0006190
12. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*. 1971;39: 693–702.
13. Noordeen SK. Elimination of leprosy as a public health problem. *Indian journal of leprosy*. 1994;66: 1–10.
14. Ramos-e-Silva M, Rebello PF. Leprosy. Recognition and treatment. *American journal of clinical dermatology*. 2001;2: 203–11.
15. Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis*. 2011;11: 464–470. doi:10.1016/s1473-3099(11)70006-8
16. Fine PE. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiologic reviews*. 1982;4: 161– 88.
17. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409: 1007–1011. doi:10.1038/35059006
18. Eiglmeier K, Parkhill J, Honore N, Garnier T, Tekai F, Telenti A, et al. The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. *Leprosy review*. 2001;72: 387–98.
19. Gómez-Valero L, Rocha EPC, Latorre A, Silva FJ. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: The dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Research*. 2007;17: 1178–1185.
20. Harrison PM, Gerstein M. Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. *Journal of molecular biology*. 2002;318: 1155–74.

21. Liu Y, Harrison PM, Kunin V, Gerstein M. Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome biology*. 2004;5: R64. doi:10.1186/gb-2004-5-9-r64
22. Mira A, Pushker R. The silencing of pseudogenes. *Molecular biology and evolution*. 2005;22: 2135–8. doi:10.1093/molbev/msi209
23. Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, et al. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC genomics*. 2009;10: 397. doi:10.1186/1471-2164-10-397
24. Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae*'s evolution and environmental adaptation. *Acta Tropica*. 2019;197: 105041. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105041
25. Mitchell A, Graur D. Inferring the Pattern of Spontaneous Mutation from the Pattern of Substitution in Unitary Pseudogenes of *Mycobacterium leprae* and a Comparison of Mutation Patterns Among Distantly Related Organisms. *Journal of Molecular Evolution*. 2005;61: 795–803. doi:10.1007/s00239-004-0235-0
26. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics*. 2009;41: 1282. doi:10.1038/ng.477
27. Singh P, Cole S. The Genomics of Leprosy. In: Nelson KE, Jones-Nelson B, editors. *Genomics Applications for the Developing World*. Springer New York; 2012. pp. 39–49. doi:10.1007/978-1-4614-2182-5\_4
28. Han XY, Sizer KC, Velarde-Félix JS, Frias-Castro LO, Vargas-Ocampo F. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. *International journal of dermatology*. 2012;51: 952–959. doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05414.x
29. Han XY, Sizer KC, Tan HH. Identification of the leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2012;11: 168–72.
30. Jessamine PG, Desjardins M, Gillis T, Scollard D, Jamieson F, Broukhanski G, et al. Leprosy-like illness in a patient with *Mycobacterium lepromatosis* from Ontario, Canada. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2012;11: 229–33.
31. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes WG, Gomez-Flores M, Ocampo-Candiani J, Busso P, Singh P, et al. Case of diffuse lepromatous leprosy associated with “*Mycobacterium lepromatosis*.” *Journal of clinical microbiology*. 2011;49: 4366–4368. doi:10.1128/jcm.05634-11
32. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112: 4459–4464. doi:10.1073/pnas.1421504112
33. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393: 537–44. doi:10.1038/31159
34. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PD, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome research*. 2008;18: 729–41. doi:10.1101/gr.075069.107
35. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reyssset G, Garnier T, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome research*. 2007;17: 192–200. doi:10.1101/gr.5942807
36. Singh P, Tufariello J, Wattam AR, Gillis TP, Jacobs Jr WR. Genomics Insights into the Biology and Evolution of Leprosy Bacilli. Scollard DM, Gillis TP (ed). *International textbook of leprosy*. Scollard DM, Gillis TP (ed). 2018. Available: [www.internationaltextbookofleprosy.org](http://www.internationaltextbookofleprosy.org)
37. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLOS ONE*. 2009;4: e7815. doi:10.1371/journal.pone.0007815
38. Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Communications*. 2018;9: 352. doi:10.1038/s41467-017-02576-z
39. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the Origin of Leprosy. *Science*. 2005;308: 1040. doi:10.1126/science/1109759
40. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiology*. 2011;6: 57–71. doi:10.2217/fmb.10.153
41. Gillis T, Vissa V, Matsuoka M, Young S, Richardus JH, Truman R, et al. Characterisation of short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 2009;80: 250–260.
42. Salipante SJ, Hall BG. Towards the molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Strategies, successes, and shortcomings. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;11: 1505–1513. doi:10.1016/j.meegid.2011.06.003
43. Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern *Mycobacterium leprae*. *Science*. 2013;341: 179. doi:10.1126/science.1238286
44. Singh P, Benjak A, Carat S, Kai M, Busso P, Avanzi C, et al. Genome-wide re-sequencing of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* Airaku-3. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20: O619–O622. doi:10.1111/1469-0691.12609

45. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *The New England journal of medicine*. 2011;364: 1626– 1633. doi:10.1056/NEJMoa1010536
46. Sharma R, Singh P, Loughry WJ, Lockhart JM, Inman WB, Duthie MS, et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerging infectious diseases*. 2015;21: 2127–2134. doi:10.3201/eid2112.150501
47. Schuenemann VJ, Avanzi C, Krause-Kyora B, Seitz A, Herbig A, Inskip S, et al. Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe. *PLOS Pathogens*. 2018;14: e1006997. doi:10.1371/journal.ppat.1006997
48. Cardona-Castro N, Beltran-Alzate JC, Romero-Montoya IM, Melendez E, Torres F, Sakamuri RM, et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. *Leprosy review*. 2009;80: 316–21.
49. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Romero-Montoya IM, Li W, Brennan PJ, Vissa V. *Mycobacterium leprae* in Colombia described by SNP7614 in *gyrA*, two minisatellites and geography. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;14: 375–382. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.015
50. Torres-Ávila JF, Colorado CL, Gamboa LA, Araujo MJ, León-Franco CI, Guerrero-Guerrero MI. Genotipificación de *Mycobacterium leprae* Colombiano para la Determinación de Patrones de Transmisión de la Enfermedad. *Revista de Salud Pública*. 2009;11: 3–13.
51. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol*. 2015;33: 46–54. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.07.008
52. Muvdi-Arenas S, Ordóñez-Rubiano M. Aspectos clínicos. La lepra: una enfermedad vigente En: Guerrero MI, Hernández CA y Rodríguez G Editores Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta Bogotá DC, Colombia Panamericana Formas e Impresos. 2019. pp. 89-114.
53. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*. 1966;34: 255–73.
54. Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy. *Clinics in Dermatology*. 2007;25: 165–172. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.05.012
55. Nordeen SK. *The epidemiology of leprosy*. Edinburgh, United Kingdom: Churchill-Livingstone; 1985.
56. WHO. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. *Weekly epidemiological record*. 2019;94: 389–412.
57. WHO - Global Leprosy Programme. *Global Leprosy Strategy 2016-2020: Accelerating towards a leprosy-free world*. 2016; 20.
58. IQUEN. Situación epidemiológica de lepra, Colombia, 2012 a 2014. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. 2015;20.
59. Guerrero MI, Muvdi S, León CI. Retraso en el diagnóstico de lepra como factor pronóstico de discapacidad en una cohorte de pacientes en Colombia, 2000 - 2010. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2013;33: 137–143.
60. Virmond M, Grzybowski A, Virmond L. Leprosy: A glossary. *Clin Dermatol*. 2015;33: 8–18. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.07.006
61. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the Human Genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*. 2010;74: 589–620. doi:10.1128/mubr.00025-10
62. Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol*. 2015;33: 90–98. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.07.005
63. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun*. 1983;41: 1077–1083.
64. Hess S, Rambukkana A. Cell Biology of Intracellular Adaptation of *Mycobacterium leprae* in the Peripheral Nervous System. *Microbiology Spectrum*. 2019;7. doi:10.1128/microbiolspec.BAI-0020-2019
65. Gaschignard J, Grant AV, Thuc NV, Orlova M, Cobat A, Huong NT, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10: e0004345. doi:10.1371/journal.pntd.0004345
66. Nunzi E, Massone C, Noto S. Clinical Features. In: Nunzi E, Massone C, editors. *Leprosy*. Springer Milan; 2012. pp. 75–110. doi:10.1007/978-88-470-2376-5\_10
67. Daffé M, Draper P. The Envelope Layers of *Mycobacteria* with Reference to their Pathogenicity. In: Poole RK, editor. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press; 1997. pp. 131–203. doi:10.1016/S0065-2911(08)60016-8
68. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2: REVIEWS1023–REVIEWS1023. doi:10.1186/gb-2001-2-8-reviews1023

69. Chavarro-Portillo B, Colorado CL, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae*. En: Guerrero MI, Hernández CA y Rodríguez G Editores La lepra: una enfermedad vigente Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta Bogotá DC, Colombia Panamericana Formas e Impresos. Bogotá DC, Colombia; 2019. pp. 63–87.
70. Liu J, Barry C, Besra G, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271: 29545–29551. doi:10.1074/jbc.271.47.29545
71. Brennan PJ, Nikaido H. THE ENVELOPE OF MYCOBACTERIA. *Annu Rev Biochem*. 1995;64: 29– 63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333
72. Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, et al. Role of alpha- dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science*. 1998;282: 2076–9.
73. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103: 511–524. doi:10.1016/S0092-8674(00)00142-2
74. Chang K-J, Redmond SA, Chan JR. Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nature Neuroscience*. 2016;19: 190. doi:10.1038/nn.4200
75. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Leprosy review*. 2011;82: 344–57.
76. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *Journal of bacteriology*. 1981;147: 728–35.
77. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257: 15072–8.
78. Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TLSA, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR $\gamma$  cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLoS pathogens*. 2018;14: e1007151–e1007151. doi:10.1371/journal.ppat.1007151
79. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. *Science*. 2002;296: 927. doi:10.1126/science.1067631
80. Rambukkana A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends in Microbiology*. 2000;8: 23–28. doi:10.1016/S0966-842X(99)01647-9
81. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Current Opinion in Microbiology*. 2001;4: 21–27. doi:10.1016/S1369-5274(00)00159-4
82. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96: 9857–62.
83. Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Leprosy review*. 2014;85: 2–17.
84. WHO. Drug resistance in leprosy: reports from selected endemic countries. *Weekly epidemiological record*. 2009;84: 264–7.
85. Gonçalves FG, Belone A de FF, Rosa PS, Laporta GZ. Underlying mechanisms of leprosy recurrence in the Western Amazon: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2019;19: 460–460. doi:10.1186/s12879-019-4100-6
86. Guerrero-Guerrero MI, Muvdi-Arenas S, Leon-Franco CI. Relapses in multibacillary leprosy patients: a retrospective cohort of 11 years in Colombia. *Leprosy review*. 2012;83: 247–60.
87. da Silva Rocha A, Cunha Dos Santos AA, Pignataro P, Nery JA, de Miranda AB, Soares DF, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggests the occurrence of reinfection or of bacterial population shift during disease relapse. *J Med Microbiol*. 2011;60: 1441–1446. doi:10.1099/jmm.0.029389-0
88. WHO. Global leprosy: update on the 2012 situation. *Weekly epidemiological record*. 2013;88: 365–79.
89. WHO. Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. *Weekly epidemiological record*. 2014;89: 389–400.
90. WHO. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. *Weekly epidemiological record*. 2015;36 (99): 461–476.
91. WHO. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *Weekly epidemiological record*. 2016;35: 405–420.
92. WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Weekly Epidemiological Record*. 4 Sep 2020;95: 417–440.
93. Ali MK, Thorat DM, Subramanian M, Parthasarathy G, Selvaraj U, Prabhakar V. A study on trend of relapse in leprosy and factors influencing relapse. *Indian journal of leprosy*. 2005;77: 105–15.
94. Shen J, Liu M, Zhang J, Su W, Ding G. Relapse in MB leprosy patients treated with 24 months of MDT in south west China: a short report. *Leprosy review*. 2006;77: 219–24.
95. Ferreira SMB, Ignotti E, Senigalia LM, Silva DRX, Gamba MA. Recidivas de casos de hanseníase no estado de Mato Grosso. *Revista de Saúde Pública*. 2010;44: 650–657

96. WHO. Global leprosy situation, 2010. *Weekly epidemiological record*. 2010;85(35): 337–48.
97. Guerrero MI Colorado, C, Muvdi, S, Leon-Franco, CI. Informe final estudio de recaídas en pacientes con lepra multibacilar, experiencia del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta-E.S.E Bogotá, Colombia. Fase 2. 2010.
98. Monot M, Honoré N, Balière C, Ji B, Sow S, Brennan PJ, et al. Are Variable-Number Tandem Repeats Appropriate for Genotyping *Mycobacterium leprae*? *Journal of clinical microbiology*. 2008;46: 2291. doi:10.1128/jcm.00239-08
99. Stefani MMA, Avanzi C, Bühner-Sékula S, Benjak A, Loiseau C, Singh P, et al. Whole genome sequencing distinguishes between relapse and reinfection in recurrent leprosy cases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11: e0005598. doi:10.1371/journal.pntd.0005598
100. Smith CS, Noordeen SK, Richardus JH, Sansarricq H, Cole ST, Soares RC, et al. A strategy to halt leprosy transmission. *The Lancet infectious diseases*. 2014;14: 96–8. doi:10.1016/S1473-3099(13)70365-7
101. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193: 346–53. doi:10.1086/499278
102. Fischer E, De Vlas S, Meima A, Habbema D, Richardus J. Different mechanisms for heterogeneity in leprosy susceptibility can explain disease clustering within households. *PloS one*. 2010;5: e14061. doi:10.1371/journal.pone.0014061
103. Al Awaidy ST. Progress towards a leprosy-free country: The experience of Oman. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11: e0006028. doi:10.1371/journal.pntd.0006028
104. Maiden MCJ. Putting leprosy on the map. *Nature Genetics*. 2009;41: 1264. doi:10.1038/ng1209-1264
105. WHO. Model Prescribing Information: Drugs Used in Leprosy. 1998. Available: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js23543en/>
106. WHO. Multidrug therapy (MDT). In: WHO [Internet]. [cited 9 Feb 2020]. Available: <http://www.who.int/lep/mdt/en/>
107. WHO. WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organization technical report series. 2012;968: 1–61.
108. Girdhar BK, Girdhar A, A. K. Relapses in multibacillary leprosy patients: effect of length of therapy. *Lepr Rev*. 2000;71: 144–53.
109. Girdhar BK, Girdhar A, Kumar A. Relapses in multibacillary leprosy patients: effect of length of therapy. *Leprosy review*. 2000;71: 144–53.
110. Guerrero MI, Colorado CL, Torres JF, León CI. Is drug-resistant *Mycobacterium leprae* a real cause for concern?: First approach to molecular monitoring of multibacillary Colombian patients with and without previous leprosy treatment. *Biomédica*. 2014;34: 137–147.
111. National JALMA Institute of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases. Informal consultation on rifampicin resistance in leprosy. *Lepr Rev*. 2007;3: 295–305. doi:10.47276/lr.78.3.295
112. Meyer M, Kircher M. Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010;2010: pdb.prot5448. doi:10.1101/pdb.prot5448
113. Peltzer A, Jäger G, Herbig A, Seitz A, Knip C, Krause J, et al. EAGER: efficient ancient genome reconstruction. *Genome Biol*. 2016;17: 60–60. doi:10.1186/s13059-016-0918-z
114. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012;9: 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923
115. Jónsson H, Ginolhac A, Schubert M, Johnson PLF, Orlando L. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*. 2013;29: 1682–1684. doi:10.1093/bioinformatics/btt193
116. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20: 1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110
117. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6: 80–92. doi:10.4161/fly.19695
118. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009;25: 2078–2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
119. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012/02/02 ed. 2012;22: 568–576. doi:10.1101/gr.129684.111
120. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011/06/07 ed. 2011;27: 2156–2158. doi:10.1093/bioinformatics/btr330
121. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*. 2019;47: D309–D314. doi:10.1093/nar/gky1085

122. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19: 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
123. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*. 2018;4. doi:10.1093/ve/vey016
124. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 2018;67: 901–904. doi:10.1093/sysbio/syy032
125. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol*. 2016;2: vew007–vew007. doi:10.1093/ve/vew007
126. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35: 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
127. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29: 24–26. doi:10.1038/nbt.1754
128. Bryant JM, Harris SR, Parkhill J, Dawson R, Diacon AH, van Helden P, et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *Lancet Respir Med*. 2013/11/21 ed. 2013;1: 786–792. doi:10.1016/S2213-2600(13)70231-5
129. Witney AA, Bateson ALE, Jindani A, Phillips PPJ, Coleman D, Stoker NG, et al. Use of whole-genome sequencing to distinguish relapse from reinfection in a completed tuberculosis clinical trial. *BMC Med*. 2017;15: 71–71. doi:10.1186/s12916-017-0834-4
130. Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS one*. 2010;5: e11147. doi:10.1371/journal.pone.0011147
131. Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14: 677–691. doi:10.1038/nrmicro.2016.131
132. Daffe M, Crick DC, Jackson M. Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiology spectrum*. 2014;2: MGM2-0021–2013. doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0021-2013
133. Pallen MJ. The ESAT-6/WXG100 superfamily – and a new Gram-positive secretion system? *Trends in Microbiology*. 2002;10: 209–212. doi:10.1016/S0966-842X(02)02345-4
134. Tufariello JM, Chapman JR, Kerantzas CA, Wong K-W, Vilchèze C, Jones CM, et al. Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113: E348. doi:10.1073/pnas.1523321113
135. Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull World Health Organ*. 2005/03/16 ed. 2005;83: 230–235.
136. WHO Technical Advisory Group on Elimination of Leprosy. Meeting (3rd: 2002: Brasilia B, World Health Organization. Strategy Development and Monitoring for Eradication and Elimination Team, Leprosy Elimination Advisory Group. Meeting. Report on third meeting of the WHO Technical Advisory Group on Elimination of Leprosy, Brasilia, 1 and 2 February 2002. Rapport de la troisième réunion du groupe consultatif technique de l'OMS sur l'élimination de la lèpre, Brasilia, 1 et 2 février 2002. 2002. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67302>
137. Scollard DM. Leprosy treatment: Can we replace opinions with research? *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14: e0008636. doi:10.1371/journal.pntd.0008636
138. Balagon MF, Cellona RV, Cruz E dela, Burgos JA, Abalos RM, Walsh GP, et al. Long-Term Relapse Risk of Multibacillary Leprosy after Completion of 2 Years of Multiple Drug Therapy (WHO-MDT) in Cebu, Philippines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Am J Trop Med Hyg*. 2009;81: 895–899. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0189
139. Norman G, Joseph G, Richard J. Relapses in multibacillary patients treated with multi-drug therapy until smear negativity: findings after twenty years. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 2004;72: 1–7. doi:10.1489/1544-581X(2004)072<0001:RIMPTW>2.0.CO;2
140. Walker TM, Ip CLC, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13: 137–146. doi:10.1016/s1473-3099(12)70277-3
141. Bryant JM, Schürch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, et al. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis*. 2013;13: 110–110. doi:10.1186/1471-2334-13-110
142. Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herranz M, Bouza E, et al. Whole Genome Sequencing Analysis of Inpatient Microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: Potential Impact on the Inference of Tuberculosis Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209: 98–108. doi:10.1093/infdis/jit439
143. Avanzi C, Lécorché E, Rakotomalala FA, Benjak A, Rapelanoro Rabenja F, Ramarozatovo LS, et al. Population Genomics of *Mycobacterium leprae* Reveals a New Genotype in Madagascar and the Comoros. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11: 711. doi:10.3389/fmicb.2020.00711

144. Cardona-Castro N, Cortés E, Beltrán C, Romero M, Badel-Mogollón JE, Bedoya G. Human Genetic Ancestral Composition Correlates with the Origin of *Mycobacterium leprae* Strains in a Leprosy Endemic Population. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0004045. doi:10.1371/journal.pntd.0004045
145. Sharma R, Singh P, Pena M, Subramanian R, Chouljenko V, Kim J, et al. Differential growth of *Mycobacterium leprae* strains (SNP genotypes) in armadillos. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018;62: 20–26. doi:10.1016/j.meegid.2018.04.017
146. Uplekar S, Heym B, Friocourt V, Rougemont J, Cole ST. Comparative genomics of Esx genes from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* provides evidence for gene conversion and epitope variation. *Infect Immun*. 2011/08/01 ed. 2011;79: 4042–4049. doi:10.1128/IAI.05344-11
147. Geluk A, Van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Wieles B, Arend SM, Faber WR, et al. Immunological Crossreactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its Homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004;59: 66–70. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01358.x
148. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Subronto YW, Wieles B, Arend SM, et al. Identification and Characterization of the ESAT-6 Homologue of *Mycobacterium leprae* and T-Cell Cross- Reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2002;70: 2544. doi:10.1128/IAI.70.5.2544-2548.2002
149. Mostowy S, Cossart P. From Pathogenesis to Cell Biology and Back. *Cell Host & Microbe*. 2009;5: 510–513. doi:10.1016/j.chom.2009.06.002
150. Gurdon JB, Melton DA. Nuclear Reprogramming in Cells. *Science*. 2008;322: 1811. doi:10.1126/science.1160810
151. Theise ND, Wilmut I. Cell plasticity: Flexible arrangement. *Nature*. 2003;425: 21–21. doi:10.1038/425021a
152. Falkow S. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell*. 1991;65: 1099–1102. doi:10.1016/0092-8674(91)90003-h
153. Kim HA, Mindos T, Parkinson DB. Plastic fantastic: Schwann cells and repair of the peripheral nervous system. *Stem cells translational medicine*. 2013;2: 553–557. doi:10.5966/sctm.2013-0011
154. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neurosciences*. 2005;6: 671–682. doi:10.1038/nrn1746
155. Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16: 511–518. doi:10.1016/j.coi.2004.05.021
156. Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: Relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. 2008;56: 1552–1565. doi:10.1002/glia.20761
157. Chen Z-L, Yu W-M, Strickland S. Peripheral Regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30: 209–233. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094337
158. Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Progress in Neurobiology*. 2010;91: 102–107. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.12.002
159. Hess S, Rambukkana A. Bacterial-induced cell reprogramming to stem cell-like cells: new premise in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 2015;23: 179–188. doi:10.1016/j.mib.2014.11.021
160. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural Targeting of *Mycobacterium leprae* Mediated by the G Domain of the Laminin- $\alpha$ 2 Chain. *Cell*. 1997;88: 811–821. doi:10.1016/S0092-8674(00)81927-3
161. Toshihiro M, Aidan M, Justyna C-W, Jinrong Q, R. TS, Anura R. Innate Immune Response Precedes *Mycobacterium leprae*-Induced Reprogramming of Adult Schwann Cells. *Cellular Reprogramming*. 2014;16: 9–17. doi:10.1089/cell.2013.0064
162. Masaki T, McGlinchey A, Tomlinson SR, Qu J, Rambukkana A. Reprogramming diminishes retention of *Mycobacterium leprae* in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. *F1000Res*. 2013;2: 198–198. doi:10.12688/f1000research.2-198.v3
163. Smith CS, Aerts A, Saunderson P, Kawuma J, Kita E, Virmond M. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. *Lancet Infect Dis*. 2017;17: e293–e297. doi:10.1016/S1473-3099(17)30418-8
164. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. 2012/12/05 ed. 2013;6: 19–24. doi:10.1242/dmm.010215
165. Truman RW, Ebenezer GJ, Pena MT, Sharma R, Balamayooran G, Gillingwater TH, et al. The Armadillo as a Model for Peripheral Neuropathy in Leprosy. *ILAR Journal*. 2014;54: 304–314. doi:10.1093/ilar/ilt050
166. Muñetón-Gómez VC. Use of Schwann cell cultures in the study of *Mycobacterium leprae* in vitro infection. Pontificia Universidad Javeriana. 1996.
167. Hagge DA, Oby Robinson S, Scollard D, McCormick G, Williams DL. A New Model for Studying the Effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann Cell and Neuron Interactions. *J Infect Dis*. 2002;186: 1283–1296. doi:10.1086/344313
168. Miko TL, Le Maitre C, Kinfu Y. Damage and regeneration of peripheral nerves in advanced treated leprosy. *The Lancet*. 1993;342: 521–525. doi:10.1016/0140-6736(93)91647-5

169. Arbues A, Lugo-Villarino G, Neyrolles O, Guillhot C, Astarie-Dequeker C. Playing hide-and-seek with host macrophages through the use of mycobacterial cell envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4: 173–173. doi:10.3389/fcimb.2014.00173
170. Guenin-Macé L, Siméone R, Demangel C. Lipids of Pathogenic Mycobacteria: Contributions to Virulence and Host Immune Suppression. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2009;56: 255–268. doi:10.1111/j.1865-1682.2009.01072.x
171. Daffé M, Laneelle MA. Distribution of Phthiocerol Diester, Phenolic Mycosides and Related Compounds in Mycobacteria. *Microbiology. Microbiology Society;* 1988. pp. 2049–2055. doi:https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-2049
172. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, et al. *Mycobacterium leprae* Phenoglycolipid-1 Expressed by Engineered *M. bovis* BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes. *PLoS Pathogens.* 2010;6: e1001159. doi:10.1371/journal.ppat.1001159
173. Pérez E, Constant P, Lemassu A, Laval F, Daffé M, Guillhot C. Characterization of Three Glycosyltransferases Involved in the Biosynthesis of the Phenolic Glycolipid Antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279: 42574–42583. doi:10.1074/jbc.M406246200
174. Pérez E, Constant P, Laval F, Lemassu A, Lanéelle M-A, Daffé M, et al. Molecular Dissection of the Role of Two Methyltransferases in the Biosynthesis of Phenoglycolipids and Phthiocerol Dimycocerosate in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex \*. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279: 42584–42592. doi:10.1074/jbc.M406134200
175. Onwueme KC, Vos CJ, Zurita J, Ferreras JA, Quadri LEN. The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Progress in Lipid Research.* 2005;44: 259–302. doi:10.1016/j.plipres.2005.07.001
176. Azad AK, Sirakova TD, Fernandes ND, Kolattukudy PE. Gene Knockout Reveals a Novel Gene Cluster for the Synthesis of a Class of Cell Wall Lipids Unique to Pathogenic Mycobacteria \*. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272: 16741–16745. doi:10.1074/jbc.272.27.16741
177. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15: 550–550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
178. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 2008;9: 559–559. doi:10.1186/1471-2105-9-559
179. Kapopoulou A, Lew JM, Cole ST. The MycoBrowser portal: A comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes. *Tuberculosis.* 2011;91: 8–13. doi:10.1016/j.tube.2010.09.006
180. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13: 134–134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
181. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007/05/07 ed. 2007;35: W71–W74. doi:10.1093/nar/gkm306
182. Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education.* 2011;39: 145–154. doi:10.1002/bmb.20461
183. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001;25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
184. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32: 3047–3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354
185. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30: 2114–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
186. Humphrys MS, Creasy T, Sun Y, Shetty AC, Chibucos MC, Drabek EF, et al. Simultaneous Transcriptional Profiling of Bacteria and Their Host Cells. *PLoS ONE.* 2013;8: e80597. doi:10.1371/journal.pone.0080597
187. Asai S, Rallapalli G, Piquerez SJM, Caillaud M-C, Furzer OJ, Ishaque N, et al. Expression Profiling during Arabidopsis/Downy Mildew Interaction Reveals a Highly-Expressed Effector That Attenuates Responses to Salicylic Acid. *PLoS Pathogens.* 2014;10: e1004443. doi:10.1371/journal.ppat.1004443
188. Socquet-Juglard D, Kamber T, Pothier JF, Christen D, Gessler C, Duffy B, et al. Comparative RNA-Seq Analysis of Early-Infected Peach Leaves by the Invasive *Phytopathogen Xanthomonas arboricola* pv. pruni. *PLoS ONE.* 2013;8: e54196. doi:10.1371/journal.pone.0054196
189. Abdallah AM, Weerdenburg EM, Guan Q, Ummels R, Borggreve S, Adroub SA, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of pathogenic mycobacteria and their *esx-1* mutants reveal secretion-dependent regulation of ESX-1 substrates and WhiB6 as a transcriptional regulator. *PLoS One.* 2019;14: e0211003–e0211003. doi:10.1371/journal.pone.0211003
190. Rechavi O, Kalman M, Fang Y, Vernitsky H, Jacob-Hirsch J, Foster LJ, et al. Trans-SILAC: sorting out the non-cell-autonomous proteome. *Nature Methods.* 2010;7: 923–927. doi:10.1038/nmeth.1513
191. Papenfort K, Vogel J. Regulatory RNA in Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe.* 2010;8: 116–127. doi:10.1016/j.chom.2010.06.008

192. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10: 618–630. doi:10.1038/nrmicro2852
193. Williams DL, Torrero M, Wheeler PR, Truman RW, Yoder M, Morrison N, et al. Biological Implications of *Mycobacterium leprae* Gene Expression during Infection. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2004;8: 58–72. doi:10.1159/000082081
194. Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, Minami E. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLOS ONE*. 2012;7: e49423. doi:10.1371/journal.pone.0049423
195. Yazawa T, Kawahigashi H, Matsumoto T, Mizuno H. Simultaneous Transcriptome Analysis of Sorghum and *Bipolaris sorghicola* by Using RNA-seq in Combination with De Novo Transcriptome Assembly. *PLOS ONE*. 2013;8: e62460. doi:10.1371/journal.pone.0062460
196. Petre B, Morin E, Tisserant E, Hacquard S, Da Silva C, Poulain J, et al. RNA-Seq of Early-Infected Poplar Leaves by the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Uncovers PtSultr3;5, a Fungal-Induced Host Sulfate Transporter. *PLOS ONE*. 2012;7: e44408. doi:10.1371/journal.pone.0044408
197. Montoya DJ, Andrade P, Silva BJA, Teles RMB, Ma F, Bryson B, et al. Dual RNA-Seq of Human Leprosy Lesions Identifies Bacterial Determinants Linked to Host Immune Response. *Cell Reports*. 2019;26: 3574–3585.e3. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.109
198. Bitter W, Houben ENG, Bottai D, Brodin P, Brown EJ, Cox JS, et al. Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathog*. 2009/10/30 ed. 2009;5: e1000507– e1000507. doi:10.1371/journal.ppat.1000507
199. MacGurn JA, Cox JS. A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun*. 2007/03/12 ed. 2007;75: 2668–2678. doi:10.1128/IAI.01872-06
200. Champion MM, Williams EA, Pinapati RS, Champion PAD. Correlation of phenotypic profiles using targeted proteomics identifies mycobacterial esx-1 substrates. *J Proteome Res*. 2014/08/25 ed. 2014;13: 5151–5164. doi:10.1021/pr500484w
201. Lee Y, Colston MJ. Measurement of ATP generation and decay in *Mycobacterium leprae* in vitro 1985. *J Gen Microbiol*. 1985;12: 3331–7. doi:10.1099/00221287-131-12-3331. PMID: 3913745.
202. Nandi SK, Chakraborty A, Panda AK, Ray SS, Kar RK, Bhunia A, et al. Interaction of ATP with a small heat shock protein from *Mycobacterium leprae*: effect on its structure and function. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9: e0003661. doi:10.1371/journal.pntd.0003661
203. Avanzi C, Busso P, Benjak A, Loiseau C, Fomba A, Doumbia G, et al. Transmission of Drug- Resistant Leprosy in Guinea-Conakry Detected Using Molecular Epidemiological Approaches. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63: 1482–1484. doi:10.1093/cid/ciw572
204. Oliveira MBB de, Diniz LM. Leprosy among children under 15 years of age: literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91: 196–203. doi:10.1590/abd1806-4841.20163661
205. Mendum TA, Schuenemann VJ, Roffey S, Taylor GM, Wu H, Singh P, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from a British medieval leprosy hospital: towards understanding an ancient epidemic. *BMC Genomics*. 2014;15: 270. doi:10.1186/1471-2164-15-270
206. Honoré N, Perrani E, Telenti A, Grosset J, Cole S. A simple and rapid technique for the detection of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*. 1993;61: 600–604.

