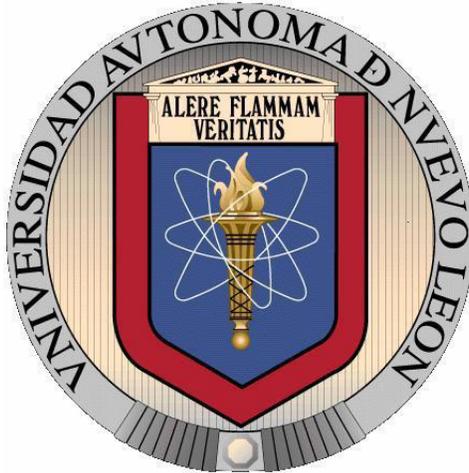


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ATENUACIÓN DE *NOCARDIA BRASILIENSIS* MEDIANTE 200 CULTIVOS
SERIADOS IN VITRO”**

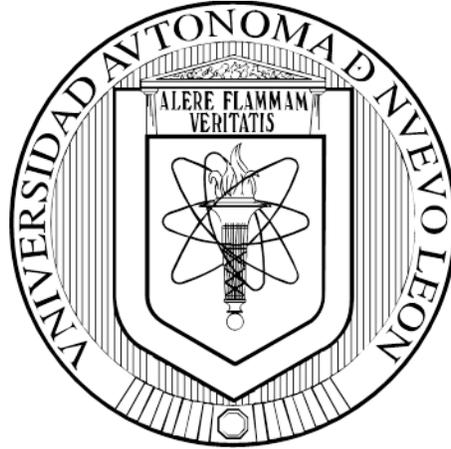
POR

DRA. CAROLINA GONZÁLEZ CARRILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

ENERO, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ATENUACIÓN DE *NOCARDIA BRASILIENSIS* MEDIANTE 200 CULTIVOS
SERIADOS IN VITRO”**

POR

CAROLINA GONZÁLEZ CARRILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

ENERO, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ATENUACIÓN DE *NOCARDIA BRASILIENSIS* MEDIANTE 200 CULTIVOS
SERIADOS IN VITRO”**

POR

CAROLINA GONZÁLEZ CARRILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

ENERO, 2017

Aprobación de la tesis:

Dr. C. LUCIO VERA CABRERA
Director de la tesis

Dr. med. OLIVERIO WELSH LOZANO

Dra. C. Carmen Molina Torres.

Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo.

Dr. med. Osvaldo Tomás Vázquez Martínez

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, quien me ha dado la fortaleza para seguir adelante, mis más infinitas gracias.

A mi familia, que me ha brindado un hogar cálido y lleno de buenos recuerdos, gracias a mis padres, Salvador y Socorro, por enseñarme con su ejemplo y amor a ser perseverante, gracias por sus sabios consejos.

Gracias a mis hermanos y sobrinos por sus palabras y compañía.

A mis suegros, Silvia y Pepe, por su apoyo incondicional y su amor en cada momento.

A mi esposo Eduardo y a mis hijos Gabriel y Valeria, que son fuente de motivación, alegrías e inspiración. Gracias por su paciencia y comprensión en estos años de estudio, gracias por enseñarme a ser mejor cada día.

Un agradecimiento especial al Dr. Lucio Vera Cabrera, que, como director de tesis, me ha orientado, apoyado, y corregido en mi labor científica, con una entrega excepcional de un gran maestro.

A mis asesores de tesis: el Dr. Oliverio Welsh y Dr. Jorge Ocampo, quienes me incentivaron a seguir adelante, gracias por compartir sus conocimientos y su valioso tiempo, sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A todo el personal del Laboratorio Interdisciplinario de Dermatología, especialmente a Paola, Carmen, Wendy, Anabel, Edith, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Jorge Castro, Dr. Héctor G. Lozano y al Dr. Viktor Romero, por su amable y desinteresada ayuda en la realización de una gran parte de este trabajo.

A todos los maestros y compañeros del Departamento de Dermatología, quienes me han inculcado el respeto, amor y disciplina a esta especialidad.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN.	1
Capítulo II	
2.1 INTRODUCCIÓN	5
2.2 HISTORIA.	6
2.3 EPIDEMIOLOGIA.	6
2.4 ETIOLOGIA.	8
2.5 GENERO NOCARDIA.	9
2.6 PATOGÉNESIS y VIRULENCIA NOCARDIA.	10
2.7 MANIFESTACIÓN CLÍNICA.	12
2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.	13
2.9 TRATAMIENTO.	14
2.10 ANTECEDENTES DIRECTOS	15
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS	17

Capítulo IV

4. OBJETIVOS	18
--------------------	----

Capítulo V

5. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1 Preparación de 200 cultivos seriados in vitro de <i>Nocardia brasiliensis</i>	19
5.2 Preparación del inóculo de <i>Nocardia brasiliensis</i> cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces.	20
5.3 Ensayo en ratones BALB/c	21
5.4 Preparación de la suspensión de <i>Nocardia brasiliensis</i> cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces.	22
5.5 Preparación de PMN humanos y ensayos bactericidas	24
5.6 Filtrado de <i>Nocardia brasiliensis</i> en RPMI-1640 cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces (proteínas extracelulares)	27
5.7 Extracto total de <i>Nocardia brasiliensis</i> cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces (proteínas intracelulares)	29
5.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%	30

Capítulo VI

6. RESULTADOS	
6.1 Cambios fenotípicos del subcultivo No. 200 de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	33
6.2 Resultados del modelo de infección experimental con ratones BALB/c	35
6.3 Resultados de la inducción de resistencia	36
6.4 Resultados histopatológicos de la lesión.	37
6.5 Resultados de la infección con PMN's	38
6.6 Resultados del análisis de proteínas	40

Capítulo VII

7. DISCUSIÓN	43
------------------------	----

Capítulo VIII

8. CONCLUSIÓN	45
-------------------------	----

Capítulo IX

9. ANEXOS	46
9.1 Geles de electroforesis	46
9.2 Carta de Consentimiento	48

Capítulo X

10.BIBLIOGRAFÍA	53
-----------------------	----

Capítulo XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	58
----------------------------------	----

CAPITULO I

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. México es uno de los países a nivel mundial con más casos reportados de actinomicetomas por *Nocardia brasiliensis*; éstos son bacilos gram positivos parcialmente ácido alcohol-resistentes los cuales están filogenéticamente muy relacionados con el género *Mycobacterium*.

Calmette y Guérin utilizaron una técnica de cultivos seriados durante 13 años para atenuar una cepa de *Mycobacterium bovis*, hasta llegar al subcultivo No. 230 que fue denominada BCG (Bacilo de Calmette y Guerin). En un estudio previo de cultivos seriados de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 se demostró que el subcultivo No. 130 produce atenuación de infección por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

OBJETIVO. Estudiar los cambios en la virulencia de *Nocardia brasiliensis* después de 200 cultivos seriados in vitro e identificar los cambios en el patrón de proteínas.

MATERIALES y MÉTODOS. Se prepararon 200 cultivos seriados in vitro a partir de una cepa de *Nocardia brasiliensis* identificada como HUJEG-1 que fue previamente subcultivada 130 veces. Los cultivos seriados fueron realizados en medios BHI cada 3 días, durante 2 años hasta alcanzar el pase No. 200 (1° septiembre 2008- noviembre 2010).

Con la finalidad de evaluar la virulencia de cada cepa in vivo se preparó un inóculo de la cepa silvestre HUJEG-1 (**cepa A**) y otro de la cepa subcultivada 200 veces (**cepa B**) a una concentración de 20 mg/50 µl el cual fue utilizado

para la producción experimental de micetoma en 2 grupos de ratones BALB/c, (**grupo 1**: infectado con la cepa A, n=20; **grupo 2**: infectado con la cepa B, n=20). El seguimiento se realizó semanalmente con la medición del cojinete plantar durante 6 meses con un calibrador Vernier y una escala de cruces.

Para visualizar la dinámica de la infección intracelular se utilizaron polimorfonucleares (PMN's) humanos. La suspensión de neutrófilos se agregó a 24 pozos de una placa estéril a una concentración de 1×10^6 PMN's por 0.1ml. Se infectaron 12 pozos con la cepa A y 12 pozos con la cepa B a una relación de 3:1 con respecto a los PMN's. En tiempos específicos a los 0, 60, 90, 180 y 360 min se recolectó la muestra en crioviales, se les agregó 800 μ l de agua destilada fría y se colocaron 100 μ l en placas de agar BHI por triplicado. Usando este procedimiento se determinó la recuperación cuantitativa de cada cepa.

Se realizó la purificación de proteínas intracelular y extracelular de *Nocardia brasiliensis* de la cepa HUJEG-1 y la subcultivada 200 veces a través de la obtención de un extracto total, produciendo la lisis celular y mediante la separación por filtrado de *Nocardia brasiliensis* inoculada en 500 ml de RPMI-1640, respectivamente.

Para analizar el patrón de proteínas se realizó electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), en geles de poliacrilamida al 12%, el gel actúa como un filtro

molecular donde las proteínas migran en función de su relación carga/masa. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis de geles en doble dimensión.

RESULTADOS. Durante el crecimiento de cada cepa en medios BHI líquidos se encontró que la cepa B a diferencia de la cepa A crecía en forma difusa, observándose el medio más turbio. Bajo microscopía de luz con la tinción de Ziehl-Neelsen y de Kinyoun se evidenciaron cambios fenotípicos en la cepa B ya que perdió su ácido alcohol resistencia. Además, se observó una disminución en la densidad celular de la cepa subcultivada 200 veces después de la extracción de los lípidos.

Tanto en el grupo 1 como en el grupo 2 de ratones BALB/c se desarrolló una reacción inflamatoria similar en la tercera semana. Posteriormente se pudo observar el desarrollo del actinomicetoma en el grupo 1 con una marcada diferencia en el tamaño de los cojinetes plantares, así como en el número de ratones infectados.

La infección de los neutrófilos humanos con ambas cepas demostró que la cepa B fue digerida por los PMN's más fácilmente que la cepa silvestre HUJEG-1.

Los cambios observados en los SDS-page's tanto del extracto total de *Nocardia brasiliensis* y del filtrado de RPMI-1640 fueron muy significativos comparando con la cepa HUJEG-1 y la subcultivada 200 veces, mostrando en esta última ausencia o pérdida de algunas bandas de proteínas.

CONCLUSIONES. Este estudio concluye que después de 200 cultivos seriados in vitro, la virulencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 disminuyó importantemente, así como su capacidad para desarrollar actinomicetomas en ratones. Además,

existen cambios significativos en la expresión de proteínas de la cepa subcultivada 200 veces.

CAPITULO II

2.1 INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica, por lo general indolora que se disemina a tejidos blandos y hueso. Se caracteriza por presentar aumento de volumen en la región afectada, fístulas, secreción y cicatrización del tejido adyacente ocasionando deformidad y disfunción a largo plazo (1,2).

Los agentes causales del micetoma se introducen en la piel a través de algún traumatismo con espinas o astillas de leña, ocasionando inflamación localizada en el sitio afectado. La localización más frecuente del micetoma es en las extremidades inferiores, aunque se han reportado casos en prácticamente cualquier sitio anatómico. Se denomina eumicetoma a la infección causada por hongos verdaderos y actinomicetoma cuando el agente causal es una bacteria (3).

A nivel mundial alrededor el 60% de los micetomas son causados por actinomicetos aerobios, siendo México uno de los países con mayor incidencia de éstos. El agente etiológico que se aísla con mayor frecuencia en México es *Nocardia brasiliensis*, aproximadamente en 65.58% de los micetomas, seguido por *Actinomadura madurae* con 10.2%, y en menor frecuencia *A. pelletierii* y *Streptomyces somaliensis* entre otros. Sólo un 3% de los casos son ocasionados por hongos (3).

Los estados que reportan un mayor número de micetomas son: Jalisco, Morelos, Nuevo León, San Luis Potosí, México, Veracruz, Hidalgo y Guerrero. (4).

2.2 HISTORIA

Las primeras descripciones de posibles micetomas han sido encontradas en el texto hindú Atharva Veda (2000-1000 a.C.), llamadas en ese tiempo “slipatham” o pie de elefante, al cual se referían como un aumento de volumen y deformidad de la región afectada. Existe evidencia de un probable micetoma en un esqueleto adulto durante el periodo Bizantino (300-600 DC) (5).

A principios del siglo 18, misioneros franceses en Pondicherry, India registraron los primeros casos de micetoma, llamándolos “fourmilere desvers”. Godfrey en 1846, denomina a esta condición como “pedis morbus tuberculosis”, Colebrook lo “llama pie de Madura” (5,6,7).

En 1860 Carter, acuñó el término micetoma (del griego *mycos*: hongo) que hasta la actualidad se emplea. En 1874 hace una descripción de los “granos negros” y los “granos claros” (5,6).

En México, Cicero reporta los primeros cinco casos de micetoma, en 1911 (5).

En 1913, Pinoy establece la clasificación del micetoma según su agente etiológico. denominando micetoma a las infecciones causadas por hongos y "actinomicosis" para los micetomas causados por bacterias (5).

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

Se han reportado casos de micetoma a nivel mundial, sin embargo, las regiones endémicas se encuentran entre los 15° S y 30° N de latitud, áreas tropicales y subtropicales; de los países con mayor número de casos reportados están: Sudán, México y la India (11).

Las regiones en el cinturón del micetoma se caracterizan por estaciones de 4-6 meses con humedad relativa de 60-80%, seguidas de estaciones secas de 6-8 meses con humedad relativa de 12-18%. En las zonas más secas se observa con mayor frecuencia el desarrollo de actinomicetomas, a diferencia de las zonas con mayor precipitación donde son más común los eumicetomas (12).

Debido a que los estudios epidemiológicos sobre el micetoma han sido realizados en base a reportes de casos o estudios retrospectivos, no se conoce la verdadera incidencia, prevalencia y distribución geográfica mundial de esta entidad. Sólo se ha realizado un estudio que evalúa la carga colectiva global del micetoma; en éste se incluyeron 8763 reportes de micetoma en 23 países desde 1944 (11). El número de casos por año a nivel mundial según este estudio es de 127 casos/año. 2607 casos fueron reportados en México, 2555 de Sudán, 1392 de la India. Otros países con número limitado de casos están: Uganda, Rumania, Nigeria, Bulgaria y Tailandia (11).

La mayoría de los casos se encuentra en varones, con una relación de 3:1 a 5:1. Túnez y Tailandia son las excepciones, donde el número de casos reportados es igual o mayor en mujeres que en los hombres. En este estudio, sólo 5240 casos tienen el reporte de edad, de los cuales el 70% (3664 casos) fueron personas entre 11 a 40 años (11). Las extremidades inferiores, en particular los pies son la región del cuerpo más afectadas (68.7%) (11,12).

En Sudán se encuentra el Centro de Investigación de Micetoma, en Khartoum, donde actualmente alrededor de 7000 pacientes están en tratamiento; en el 70% de ellos se encontró el agente causal *Madurella mycetomatis* (12).

En un estudio retrospectivo realizado en México, se reportaron 3933 casos en un periodo de 54 años (1954-2012), encontrándose que un 97% de éstos son actinomicetomas, (65% *Nocardia brasiliensis*, 8% *Actinomadura madurae*) y sólo un 3-5% eran eumicetomas. Nuevo León ocupa el tercer lugar en mayor número de casos reportados de micetomas (4).

El sector afectado más común son los campesinos o individuos de precarias condiciones. Debido a las secuelas que tiene este padecimiento, como la incapacidad del miembro afectado en caso de no recibir tratamiento oportuno, esta enfermedad genera un impacto socioeconómico alto en las familias. Los tratamientos son largos y costosos, motivo por el cual es abandonado y se presentan recidivas o complicaciones por invasión de tejidos profundos (4,11,12).

El micetoma no es una enfermedad de notificación obligatoria a nivel mundial y no está incluido en ningún sistema nacional de vigilancia. Por consiguiente, para poder evaluar su importancia como problema de salud pública es esencial disponer de datos más exactos de vigilancia y sobre la carga de morbilidad.

2.4 ETIOLOGÍA

El micetoma puede ser ocasionado por hongos verdaderos o eumicetos (micetoma eumicético) o por bacterias aerobias llamadas actinomicetos (micetoma actinomicético). Entre ellos se han encontrado más de 56 microorganismos diferentes (bacterias y hongos) que son agentes causantes de micetoma (12).

Entre los agentes que pueden causar micetoma por eumicetos tenemos: *Madurella mycetomatis*, *Trematosphaeria grisea*, *Leptosphaeria senegalensis*,

Pyrenochaeta romeroi, *Exophiala jeanselmei*, *Aspergillus nidulans*
Pseudoallescheria boydii, *Zophia rosatti*, *Fusarium sp.*, *Acremonium sp* (2,3,4).

Entre los agentes que pueden causar el micetoma por actinomicetos tenemos:
Nocardia brasiliensis, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidis caviarum*,
Actinomadura madurae, *Actinomadurae pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*
(2,3,4,6)

La mayoría de éstos organismos se encuentran en el suelo, y pueden entrar al hospedero a través de heridas con espinas o astillas de madera. A la fecha no se conoce un reservorio o vector animal. La infección no se transmite directamente de persona a persona (12).

2.5 GÉNERO NOCARDIA

Nocardia se encuentra distribuida mundialmente en el agua, suelo, viento, vegetación. Es un microorganismo saprófito, que juega un rol importante en los procesos de descomposición de la materia vegetal desdoblando productos orgánicos complejos como la celulosa, proteínas, polisacáridos, lípidos, parafina y otras fuentes de carbono y energía (6,13).

Las nocardias son bacilos aerobios, gram positivos, parcialmente ácido-alcohol resistentes, de 0,5 a 1 μm de diámetro y hasta 20 μm de longitud. Tienden a formar cadenas o filamentos de células y pueden semejar al micelio fúngico. Su crecimiento es de forma facultativa multiplicándose dentro de los macrófagos del huésped. No son nutricionalmente exigentes, toleran un pH entre 6,5 y 9, crecen a temperaturas entre 10 y 50°C; aunque las condiciones óptimas de crecimiento son: 35-37°C, ligera alcalinidad y atmósfera con 5-10% de CO_2 (14, 20).

Nocardia pertenece al suborden *Corynebacterineae*, al igual que otros microorganismos de relevancia clínica como: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomadura*, y *Gordonia*. La característica más distintiva que clasifican a estos microorganismos dentro del suborden *Corynebacterineae* es que poseen una pared celular de tipo IV, abundante en lípidos con estructuras químicas inusuales que pueden llegar hasta un 40% del peso en seco del microorganismo. Estos se encuentran distribuidos en 3 de los principales componentes de la pared celular: la membrana celular, el complejo peptidoglicano-ácido micólico-arabino-galactano y la membrana celular externa (14,15,16,17).

2.7 PATOGÉNESIS y VIRULENCIA DE NOCARDIA

Los factores involucrados en el desarrollo del micetoma no han sido dilucidados por completo. Se han realizado pruebas serológicas en áreas endémicas en donde la mayoría de los individuos presentan anticuerpos contra los microorganismos causantes, pero sólo pocos desarrollan la enfermedad. Una teoría es que estos pacientes presentan una deficiencia en el sistema inmune mediado por células (12).

En 1956 se iniciaron los estudios experimentales con *N. brasiliensis* en ratones y cobayos. González-Ochoa en 1973, por Folb y cols. en 1976 y por Ortiz-Ortiz y cols. en 1982, realizaron estudios en ratones sobre la patogenia del micetoma por *N. brasiliensis*. Observaron que existe una respuesta inflamatoria inicial constituida predominantemente por infiltrado de leucocitos polimorfonucleares. Una semana posterior se presenta una reacción inflamatoria granulomatosa en el sitio de inoculación (cojinete plantar). En el estudio histopatológico se observaron

histiocitos y granulocitos que circunscriben al microabsceso y en una tercera zona excéntrica se encontraron macrófagos con abundante citoplasma granular, linfocitos y células epiteliales y plasmáticas (8,9,22).

Las cepas virulentas de *Nocardia* presentan mecanismos evasivos de protección que permiten adaptarse a las células del huésped y multiplicarse. Se han implicado múltiples proteasas, catalasas y superóxido dismutasas que juega un papel importante en la infección de macrófagos. Esto provoca la apoptosis de células del sistema inmune del huésped y por lo tanto el retraso en la resolución de la infección (23, 24, 25, 26).

Un componente importante en la patogenicidad y virulencia de los microorganismos es su pared celular (21, 29). La infección de *N. brasiliensis* provoca la producción de citocinas proinflamatorias, particularmente IL-1 β e IL-6. En un estudio donde se realizó la deslipidación de la pared celular de *Nocardia*, se obtuvo una disminución en la producción de estas citocinas al inocular la bacteria modificada en modelos murinos, y no se desarrolló de forma completa el micetoma (21).

La respuesta inmunitaria innata del hospedero contribuye de forma importante a la eliminación de la bacteria. En los actinomicetomas causados por *N. brasiliensis* los neutrófilos y macrófagos que rodean a la *Nocardia*, presentan un incremento en la expresión de los receptores tipo Toll-2 (TLR-2) a diferencia de los receptores tipo Toll-4 (TLR-4) en las etapas tardías (12).

La respuesta inmune celular de los pacientes con actinomicetoma es principalmente de tipo Th2, con una pobre respuesta de tipo Th1 (12, 30).

2.8 MANIFESTACIÓN CLÍNICA

La presentación clínica del micetoma es casi la misma, independientemente del agente causal; sin embargo, el progreso del actinomicetoma es más rápido que el del eumicetoma, este se debe entre varias cosas por la rapidez de reproducción de los actinomicetos (bacterias) (12).

La triada clásica consiste en (16,31,32):

1. Masa tumoral subcutánea indolora,
2. Lesiones nodulares, fistulizadas,
3. Exudado filante o seropurulento donde se encuentran los microorganismos o “granos”.

Se localiza principalmente en el tejido celular subcutáneo, pero puede diseminarse y pasar la aponeurosis para afectar estructuras profundas como músculo, hueso o vísceras. En las etapas iniciales de la infección por eumicetoma o actinomicetoma el dolor está ausente, motivo por el cual las consultas se realizan en etapas avanzadas. El tiempo entre la infección inicial y la consulta al médico varía ampliamente de 3 meses hasta 50 años (4,11,12).

Cuando se encuentran afectando estructuras óseas pueden aparecer síntomas de dolor o cuando exista alguna sobreinfección bacteriana.

En fases avanzadas de la infección se pueden observar lesiones de tipo cavitario (geodos), las cuales pueden estar vacías o llenas de granos, este fenómeno desencadena la osteolisis. La capacidad de osteolisis de los agentes del micetoma, cobra importancia en localizaciones como la espalda ya que puede avanzar hacia las vértebras (cervicales) provocando la destrucción y compresión medular, generando complejos parapléjicos (5, 33).

Una variante clínica son los minimicetomas, los cuales como su nombre lo indica, son de tamaño pequeño y con una o dos fístulas, sin aumento de volumen, casi nunca afectan hueso. Otros casos atípicos se presentan de manera intraósea o sin formación de fístulas (34).

Los pies y las manos constituyen las regiones con mayor número de infecciones por micetoma (84%). La espalda es un sitio de afección poco común, sin embargo, en México ocupa el 2do. lugar debido a la costumbre de cargar objetos en el torso (11,12).

2.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Los agentes etiológicos pueden detectarse examinando las secreciones de las heridas y en biopsias quirúrgicas. El examen clínico y el estudio micológico directo son útiles para orientar el diagnóstico, al detectar los gránulos característicos. Posteriormente éstos pueden cultivarse o someterse a exámenes histopatológicos a fin de determinar la etiología del microorganismo. Existen otras técnicas útiles en el diagnóstico del micetoma, como el serodiagnóstico y la secuenciación del DNA del microorganismo aislado. Las pruebas de imagen: ultrasonido, radiografías, tomografía helicoidal y resonancia magnética ayudan a determinar la extensión de las lesiones y afección a tejidos y órganos subyacentes (6,12).

En áreas endémicas debido a la poca disponibilidad de algunos estudios, el diagnóstico en la mayoría de los casos se confirma mediante ultrasonido, identificación del agente etiológico y aspiración con aguja fina (12).

Es necesario hacer el diagnóstico diferencial con: botriomicosis, tuberculosis, como esporotricosis, tuberculosis osteoarticular, osteomielitis (dan fístulas, pero no granos), coccidioidomicosis y neoplasias (3,12,34)

2.10 TRATAMIENTO

El tratamiento depende de la etiología del micetoma. Generalmente son terapias combinadas y de larga duración. En el caso de los eumicetomas el pronóstico es incierto debido a la escasa respuesta a los medicamentos, y frecuentemente requiere de escisión quirúrgica (11,12).

En México, el 95% de los micetomas son actinomicéticos. La cirugía está contraindicada debido a la posibilidad de diseminación linfática y/o hematógena. La primera línea de tratamiento es la combinación de: trimetoprim-sulfametoxazol (T-S) vía oral con amikacina intramuscular. La dosis de T-S es de 48 mg/kg/día durante 5 semanas y la de amikacina es de 15 mg/kg/día dividido en 2 dosis, administrado durante 3 semanas. El intervalo de 2 semanas sin amikacina se utiliza para realizar estudios de monitoreo de la función renal y auditiva. Se denomina 1 ciclo de tratamiento a la combinación de T-S y amikacina durante 5 semanas. Se ha observado que la administración sin interrupciones de 3 a 4 ciclos, resulta en una alta tasa de curación en los pacientes con actinomicetomas. De 56 pacientes tratados con este régimen, 55 tuvieron curación completa. Alternativas en caso de resistencia o alergias, se recomienda el uso de amoxicilina más ácido clavulánico, imipenem, carbapenem, entre otros (6,7,10,12).

2.11 ANTECEDENTES DIRECTOS

La atenuación de microorganismos por diversos métodos permite que éstos pierdan su virulencia. El mecanismo de acción de la atenuación puede ser a través de la exposición de los agentes patógenos bajo nuevas condiciones como son: los rayos UV, exposición a calor, cambios genéticos, pases seriados o subcultivos entre otros. A pesar de que estos métodos se han realizado desde hace más de un siglo, es poco conocido el proceso mediante el cual se generan las mutaciones de los microorganismos. Por otro lado, el resultado es muy variable e impredecible en cada microorganismo (35, 36).

El pasaje in vitro de microorganismos o también denominado subcultivo seriado es un método muy sencillo y accesible el cual puede producir cambios importantes en las características fenotípicas de los microorganismos, así como la eliminación de factores virulentos. Algunos ejemplos de microorganismos atenuados de esta manera: virus de la rabia, poliovirus, sarampión, *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis* entre otros (37).

Albert Calmette y Jean Marie Camille Guérin estudiaron durante 13 años la atenuación de *Mycobacterium bovis*. Realizaron subcultivos seriados de *M. bovis* en medio de cultivo que contenía bilis de buey en 230 pasajes y obtuvieron un microorganismo atenuado al que llamaron bacilo de Calmette-Guérin(BCG). Al realizar experimentos en animales con el pasaje No. 39 observaron que la cepa era incapaz de matar animales y mostró desde entonces no tener reversión a su estado virulento (38,39,40,41).

Del bacilo BCG se han derivado varias cepas en distintos laboratorios del mundo, entre ellas están la BCG Pasteur la cual ha sufrido 1173P pasajes. Se realizó la

secuenciación genómica de esta cepa y se encontró un factor involucrado en la atenuación de BCG Pasteur que se denomina región de diferencia 1 (RD1); ésta constituye una deleción de 9.8 kb que produce la pérdida del sistema de secreción de proteínas ESX-1. Otra mutación que reduce su virulencia es en la RD-2.

Sin embargo, la reintroducción de este sistema RD1 a la cepa BCG Pasteur o Rusia no mostró el desarrollo de su virulencia completa. Por lo tanto, existen otros mecanismos aún no descritos en el proceso de atenuación de la BCG (42).

En el caso de *Nocardia brasiliensis* en un estudio publicado en el 2011 se procedió a subcultivar *N. brasiliensis* HUJEG-1 cada 3 días, 130 veces respectivamente en caldo infusión cerebro corazón y se procedió a probar la virulencia en ratones BALB/C. Se observó que el subcultivo No. 130 disminuyó significativamente la virulencia de este microorganismo. Se comprobó en varios ensayos con ratones BALB/c en los cuales se inoculó la cepa original y la cepa No. 130, observando que en esta última se desarrolló de forma parcial el micetoma (43). A la fecha, no se conocen los mecanismos de resistencia ni los factores de virulencia involucrados en la atenuación de *N. brasiliensis* a través de subcultivos.

La determinación de los factores involucrados en la atenuación de *N. brasiliensis* es de utilidad para poder conocer los mecanismos de protección de un huésped frente a este patógeno.

CAPITULO III

3. HIPÓTESIS

A) Hipótesis de trabajo:

Los cultivos seriados 200 veces in vitro producen disminución en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*.

B) Hipótesis nula:

Los cultivos seriados 200 veces in vitro no producen disminución en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*

CAPITULO IV

4. OBJETIVOS

1. Subcultivar la cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 en medio líquido por 200 pases.
2. Comparar la evolución clínica e histopatológica del micetoma inducido con la cepa no subcultivada vs la cepa subcultivada (No. 200).
3. Determinar la inducción de resistencia mediante la inoculación de la cepa subcultivada 200 veces.
4. Evaluar la sobrevivencia intracelular de la cepa subcultivada 200 veces en macrófagos humanos ThP-1.
5. Identificar y comparar el proteoma intracelular y extracelular de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 vs la cepa subcultivada 200 veces.

CAPITULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Preparación de 200 cultivos seriados in vitro de *Nocardia brasiliensis*

Se realizaron cultivos seriados de una cepa de *N. brasiliensis* identificada como Hospital Universitario José Eleuterio González, HUJEG-1 y registrada como ATCC # 700358 subcultivada 130 veces previamente con el siguiente método:

1. De un criotubo a -70°C que contenía el subcultivo No. 130 suspendido en agar skim-milk tomar 2 asadas e inocularlo en placas de agar Sabouraud. Incubar durante 72 horas a temperatura de 30°C.
2. Se tomó 1 – 2 colonias de la placa previamente inoculada y se colocaron en un tubo de ensayo más 3 gotas de solución salina.
3. Se maceró con una varilla estéril durante 30 segundos hasta formar una pasta.
4. Se agregó solución salina hasta obtener el grado de turbidez de 1 McFarland.
5. De ésta suspensión se tomaron 1 – 2 ml y se colocaron en 2 matraces de 125cc y con 33cc de medio de infusión cerebro corazón(BHI) líquido. Se dejó en agitación mecánica por 72 horas a 110rpm a una temperatura de 37°C.
6. Posteriormente al observar crecimiento de *Nocardia brasiliensis*, se centrifugó durante 2 minutos a 2500rpm.
7. Se maceró el botón celular con solución salina durante 1 minuto hasta obtener el grado 1 McFarland y de esta suspensión se tomaron 1 – 1.5

gotas con una pipeta Pasteur para inocular 2 matraces de 125cc con 33cc de BHI.

8. Se colocó en condiciones de subcultivo (agitación durante 72hrs a 110rpm a 37°C) para obtener el subcultivo No. 131.
9. Se repitieron los pasos 6 al 8 sucesivamente hasta llegar al subcultivo No. 200.

5.2 Preparación del inóculo de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces.

Para la preparación del inóculo de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 y del subcultivo No. 200 se realizó el siguiente método para cada uno:

1. A partir de las placas agar sangre inoculadas con la cepa HUJEG-1 y con la cepa No. 200 se tomaron 3 asadas y se maceraron con 2 gotas de solución salina durante 30 segundos en un tubo de ensayo con una varilla estéril.
2. Se agregaron 3ml de solución salina estéril y después de 5 minutos de sedimentación se tomaron del sobrenadante 0.5ml e se inocularon por separado cada cepa en 3 matraces diferentes con BHI (50ml) los cuales se incubaron en el shaker por 72 horas a 110rpm a 37°C.
3. Posteriormente se pasó el contenido de cada uno de los matraces a tubos plástico de 50 ml los cuales se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 25°C.
4. Se decantó el sobrenadante y se agregó solución salina para macerar el botón celular por 10 segundos.

5. Posteriormente se agregó solución salina hasta 20 ml y se agitó. Se dejó reposar 5–15 minutos y se inoculó con 1 ml de esa suspensión de cada cepa en cada uno de los 4 matraces de 2 litros con 500 ml con BHI estéril.
6. Se pasó a condiciones de subcultivo en agitación a 37°C, 110 rpm por 72 hrs.
7. Posterior a ésto se decantó el BHI de cada matraz dejando sólo el botón celular, el cual se lavó en 3 ocasiones con solución salina estéril y se centrifugó a 100xg por 20 minutos a 25°C.
8. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 20 ml de solución salina. Se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos.
9. Se ajustó el peso a 20 mg/50 µl.

5.3 Ensayo en ratones BALB/c

Se realizó un modelo experimental al que se infectó con *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 y su cepa atenuada 200 veces. Para la producción experimental del micetoma en los ratones BALB/c se siguió un método similar al utilizado por González-Ochoa y cols.

1. Se infectaron 2 grupos de ratones BALB/c hembras, entre 8 y 12 semanas de edad, con una **n**= 20 cada grupo, proporcionados por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, utilizando el inóculo de

Nocardia brasiliensis cepa HUJEG-1 y cepa 200 previamente preparados, en el cojinete de la pata trasera derecha.

2. Posteriormente se realizaron mediciones y evaluaciones de los cojinetes plantares inoculados con la cepa HUJEG-1 y la cepa subcultivada 200 veces, de manera semanal, para observar el progreso de cada grupo y hacer la comparación clínica hasta completar 12 semanas.

3. La escala que se utilizó es (46):

0: sin datos de infección

+: leve eritema

++: eritema e induración

+++ : eritema, induración y aumento de volumen, localizado sólo en la pata de la extremidad inoculada.

++++: eritema, induración, aumento de volumen localizado en la pata y muslo de la extremidad inoculada.

4. Se sacrificaron 3 ratones de cada grupo y se enviaron biopsias del cojinete plantar infectado en la semana 0, 3, 5 y 8.

5.4 Preparación de la suspensión de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces.

Dentro de la campana de seguridad, previamente limpiada y esterilizada con luz ultravioleta por 15 minutos

1. Se maceraron la cepa HUJEG-1 con varilla de cristal en tubos de ensayo con tapón de rosca estériles colocando 2-3 gotas de solución salina estéril.
2. Se agregaron 2 mL de solución salina y se centrifugaron a 100xg por 10 minutos. Se repitió el mismo proceso con la cepa subcultivada 200 veces.
3. De la suspensión de cada cepa se tomó 0.1 ml con una pipeta de 5 mL y se colocaron en dos matraces Erlenmeyer conteniendo 50 mL de caldo BHI.
4. Se taparon los matraces y se incubaron a 37°C por 72 horas a 110 rpm.
5. Después de 72 horas de incubación, se pasó el cultivo a un tubo cónico de 50 mL (1 tubo por matraz de cultivo).
6. Se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Se lavó tres veces con solución salina estéril.
7. Después de cada lavado se decantó el sobrenadante.
8. Posteriormente se maceró en un tubo Potter pequeño el sedimento de bacterias resultante durante 30 segundos y se agregaron 10 mL de solución salina estéril.
9. Se centrifugó a 100xg durante 10 minutos.
10. Se pasó el sobrenadante a un tubo cónico y se centrifugó a 100xg durante 10 minutos.
11. Se pasó el sobrenadante a otro tubo cónico y se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos.

12. Se decantó el sobrenadante de cada cepa y se resuspendió el sedimento con 2 mL de glicerol al 20% en agua destilada estéril.
13. Se prepararon alícuotas de cada cepa en crioviales para congelar a -70°C.

5.5 Preparación de PMN humanos y ensayos bactericidas

1. Previo consentimiento informado se obtuvieron 25 ml de sangre de un voluntario sano.
2. Se colocaron 5 ml de medio para separar los PMN (Polymorphprep® Sigma Aldrich) en un tubo falcon de 15 ml.
3. Se añadieron de forma lenta 5 ml de sangre a los tubos con polymorphprep® Sigma Aldrich con una pipeta Pasteur, evitando tener contacto con éste.
4. Se centrifugó la muestra a 500 RCF, durante 35 min a temperatura de 20-25°C.
5. Se obtuvo la separación de la sangre en 6 bandas (Fig. 5).
6. Se recolectaron y eliminaron las primeras tres bandas.
7. Se recolectaron los PMN y la capa debajo de éstos (4ª y 5ª capa) y se colocaron en un tubo estéril de 15 ml.
8. Se diluyó la muestra a 10 ml con la solución de Hank sin calcio/Mg.
9. Se centrifugó a 350 RCF durante 10 min a temperatura de (20 a 25°C)
10. Se obtuvo un botón celular el cual contenía PMN y eritrocitos.
11. Después de haber retirado el sobrenadante, se añadió 2 cc de Buffer para lisar eritrocitos.

12. Se colocaron en el vórtex a velocidad de 3-4 (evitar mayor velocidad debido a que se activan los PMN)
13. Se centrifugó a 250 RCF durante 5 min y se repitió la lisis.
14. Se retiró el sobrenadante y se suspendió el botón celular en 500 ml de solución de Hank sin calcio/Mg.
15. Se colocó en el vórtex y se añadió solución de Hank hasta 10 ml.
16. Se centrifugó a 250 RCF durante 5 min.
17. Se retiró el sobrenadante.
18. Se suspendió el botón en 250 ml del medio RPMI más albúmina humana.

5.51 Conteo de PMN en la cámara Neubauer

1. Se tomaron 5 μ l de los PMN aislados previamente y se colocaron en un criotubo.
- 2 Se agregaron 45 μ l de ácido acético al 2% para tener una dilución 1:10.
- 3 Posteriormente se realizó una dilución 1:50 con 10 μ l de la dilución 1:10 más 40 μ l de ácido acético.
- 4 De esta dilución se tomaron 10 μ l y se colocaron en el hemocitómetro.
- 5 Se contaron los PMN en los 4 cuadrantes externos utilizando la siguiente fórmula para el conteo de éstos:
 - a. Núm. PMN's = (suma de células/# cuadros) (factor de dilución)(10000).
6. La viabilidad de los PMN se determinó por exclusión con azul tripán.
7. Se añadieron 45 μ l de azul tripán y se colocó 1 gota en el portaobjetos.

8. Se observó a un aumento de 40x y se determinó el número de células muertas (azules) en 100 células contadas.

9. Se realizó este paso en un tiempo menor a 5 minutos debido a que se inactivan los PMN.

10. La viabilidad se consideró adecuada si existen menos del 5% de PMN muertos.

5.52 Infección de PMN con *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 y pase 200.

1. Se ajustó la cantidad de PMN a 1×10^6 por cada 100 μl .
2. Se colocaron 100 μl en cada uno de los 24 pozos de una microplaca.
3. Se ajustó la suspensión de la cepa HUJEG-1 y del pase 200 a 3×10^6 por cada 100 μl .
4. Se colocaron 100 μl de la cepa HUJEG-1 en cada uno de los 12 pozos previamente con PMN y 100 μl del pase 200 en cada uno de los otros 12 pozos con PMN.
5. Se dejó incubar la placa con los 24 pozos a 37°C en una incubadora de CO_2 sobre una plataforma con agitación gentil para facilitar el contacto entre bacterias y PMN.
6. En tiempos específicos a las 0, 60, 90 y 180 min se les añadió (cada muestra por triplicado):
 - a. Agua estéril destilada (0.8 ml)

- b. La preparación de los PMN rotos por el agua destilada se diluyeron a 1:10 y se colocaron por triplicado en placas de agar BHI.
- c. Usando este procedimiento se determinó la recuperación cuantitativa de las bacterias.

5.6 Filtrado de *Nocardia brasiliensis* en RPMI-1640 cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces (proteínas extracelulares)

5.61 Preparación de RPMI-1640

1. Se prepararon 2 matraces estériles de 2 litros con 500 mL de RPMI-1640 cada uno.
2. Se mezclaron 10.39 gramos de RPMI-1640 en 1 L de agua bidestilada, con calor hasta que el medio se encontró homogéneo.
3. Se ajustó el pH de 7.2 a 7.4 con un potenciómetro.
4. Se esterilizó mediante filtración por vacío con el sistema Stericup.
5. Se colocaron 500 mL en cada matraz y se refrigeraron.

5.62 Inoculación de RPMI-1640

1. Del inóculo de la cepa HUJEG-1 y la cepa subcultivada 200 veces se vertió cada uno en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm durante 3 minutos.
2. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no desprender botón.
3. Se agregaron aproximadamente 3 mL de solución salina para desprender botón y se vació el contenido en un tubo Potter.

4. Se maceró por no más de 12 segundos.
5. Se tomaron 1.6 mL del macerado de cada cepa y se inoculó cada matraz con RPMI-1640 con la cepa correspondiente.
6. Se colocaron en agitación mecánica a 110 rpm (37°C) durante 15 días.

5.63 Filtrado de *Nocardia brasiliensis* en RPMI-1640

1. Después de los 15 días de haber inoculado el medio de RPMI-1640 con la cepa HJJEG-1 y la subcultivada 200 veces se filtró con gasas cada matraz.
2. Posteriormente se filtró con conos de papel filtro en dos ocasiones.
3. Se vertió cada filtrado en un stericup con capacidad de 500 mL y mediante vacío se filtraron.
4. Se etiquetó cada frasco con la cepa correspondiente y se guardó en refrigerador a 4°C.

5.64 Liofilizado de filtrado de *Nocardia brasiliensis* en RPMI-1640

1. Se vaciaron los filtrados de la cepa HJJEG-1 y la subcultivada 200 veces en tubos para liofilizar, se cubrió con parafilm y papel aluminio.
2. Se colocó hielo seco más acetona en un contenedor para congelar los filtrados, se giraron para que el hielo se adhiriera a las paredes.
3. Una vez congelados se colocaron en la liofilizadora y se dejó durante 24 horas aproximadamente, hasta que no se observaran restos de hielo; una vez liofilizado realizamos la purificación de proteínas mediante diálisis.

5.65 Diálisis de liofilizado de filtrado de *Nocardia brasiliensis* en RPMI-1640

1. Se resuspendió cada liofilizado en 10 mL de solución salina estéril y se colocaron en la membrana de diálisis.
2. Se sujetó cada extremo de la membrana con los clips y se colocaron en el matraz de 2 L con agua bidestilada fría; se refrigeraron a 4°C.
3. Se realizaron 4 cambios de agua bidestilada, el primer cambio se realizó a la hora.
4. Se vació el contenido de cada membrana en los tubos Falcon y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos.
5. Se colocó el sobrenadante de cada Falcon en los viales y se congeló a una temperatura de -70°C.
6. Posteriormente se liofilizó durante 1 hora cada diálisis de la cepa HUJEG-1 y la subcultivada 200 veces, hasta que no se observara restos de hielo.
7. Se almacenó a -20°C.

5.7 Extracto total de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces (proteínas intracelulares)

1. Se lavó con agua bidestilada a 50°C durante 3 ciclos la cepa HUJEG-1 y la subcultivada 200 veces. Se centrifugó entre cada ciclo a 2500 rpm durante 5 minutos.
2. Se lavó con éter etílico cada cepa (4 a 5 veces).
3. Del concentrado bacteriano obtenido diluimos con PBS adicionado con 0.5% de Tritón X-100 para obtener una concentración de ~800 mg/mL.

4. Se transfirió 1 mL de cada suspensión a tubos que contienen perlas de sílice.
5. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos.
6. Decantamos el sobrenadante.
7. Se agregó 1 mL de TBS 100 mM pH 7.4 0.5% de TRITÓN X-100 adicionado con el cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA de Boehringer Mannheim (Roche).
8. Se procesaron 5 ciclos cada cultivo en el FAST-PREP en ciclos de 45 segundos a velocidad de 6.0 con intervalos de 2 minutos en hielo (para evitar desnaturalización de proteínas intracelulares).
9. Se realizó la tinción de Kinyoun en cada ciclo, para comprobar la viabilidad y lisis celular.
10. Se distribuyó en alícuotas el volumen deseado y congelamos a -70°C .

5.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%

1. Se colocaron los vidrios en el sostenedor sobre una base limpia y bien nivelada.
2. Se tomó 1 mL de agarosa al 1% y se colocó en la superficie, inmediatamente se colocaron los vidrios, y se esperó a que solidificara.
3. Se prepararon 5 mL del gel separador y se vertió entre los cristales, se esperó una hora a que solidifique.
4. Una vez solidificado se retiró el excedente de agua bidestilada.
5. Posteriormente se prepararon 3 mL del gel concentrador y se colocó entre los cristales e inmediatamente se colocó el cepillo (Fig. 6); se esperó 30 minutos a que solidifique.

a) Colocación de la muestra:

- Muestras:

- Filtrado de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces de RPMI-1640.
- Extracto total de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 y cepa subcultivada 200 veces.

- Marcadores:

- SDS reducing sample buffer: B-mercaptoetanol 12.5 uL + Stock sample buffer 237.5 uL.
- Se realizó dilución 1:20 19 uL SDS reducing sample buffer + 1 uL marcador estándar.

1. Se colocaron 15 uL de cada una de las muestras en tubos Eppendorf y se agregaron 5 uL de sample buffer 5X.
2. Se hirvió en agua durante 2 minutos y se colocaron las muestras y el marcador.
3. En la cámara de electroforesis se colocaron los cristales con el gel previamente elaborado.
4. Se colocó el buffer de corrimiento al 1X en la cámara interna y externa.
5. Se realizó una dilución 1:5
6. Se tomaron 20 uL de cada muestra y 10 uL del marcador y lo colocamos en los carriles del gel ya montado en la cámara de electroforesis.
7. Se conectó el modulador de voltaje a la cámara de electroforesis y se dejó correr el gel con un voltaje de 80 mV durante una hora aproximadamente.

8. Se retiró el gel del cristal y se aplicó la tinción con coomasie brilliant blue durante una hora aproximadamente.
9. Se destiñó con metanol-ácido acético
10. Se capturó la imagen del gel con el scanner, Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer.

CAPITULO VI

RESULTADOS

6.1 Cambios fenotípicos del subcultivo No. 200 de *N. brasiliensis* HUJEG-1

Se observaron cambios fenotípicos significativos en la cepa de *N. brasiliensis* subcultivada 200 veces (cepa B), entre ellos, la pérdida de la capacidad de formar microcolonias en el medio líquido de BHI (Fig. 7), presentando un crecimiento turbio del subcultivo. Al realizarle la tinción con Ziehl-Neelsen y Kinyoun modificado su ácido alcohol-resistencia estaba ausente a diferencia de la cepa silvestre (cepa A).



a) Ceba A



b) Ceba B

Fig. 7 Cambios biológicos de *Nocardia brasiliensis* en medios de cultivo BHI, a) Cepa T0 se observa la formación de pequeñas microcolonias, b) Después de 200 pasajes las nocardias crecieron en una suspensión homogénea.

En el crecimiento en placas de agar BHI de la cepa subcultivada se formaron colonias blanquecinas en forma de anillo irregular.

Se realizaron pruebas bioquímicas resultando en hidrólisis similar en ambas cepas (Tabla I).

	Cepa A	Cepa B
Ureasa	+	+
Xantina	-	-
Hipoxantina	+	+
Caseína	+	+
Tirosinasa	+	+

Tabla I. Comparación de las pruebas bioquímicas de la cepa T0 y cepa T200

Durante la preparación de la extracción intracelular de proteínas, al lavar las cepas con cloroformo:metanol se observó un cambio en la densidad de la masa

celular de la cepa B, la cual fue 0.04941 veces menor que la cepa A (Fig. 8).

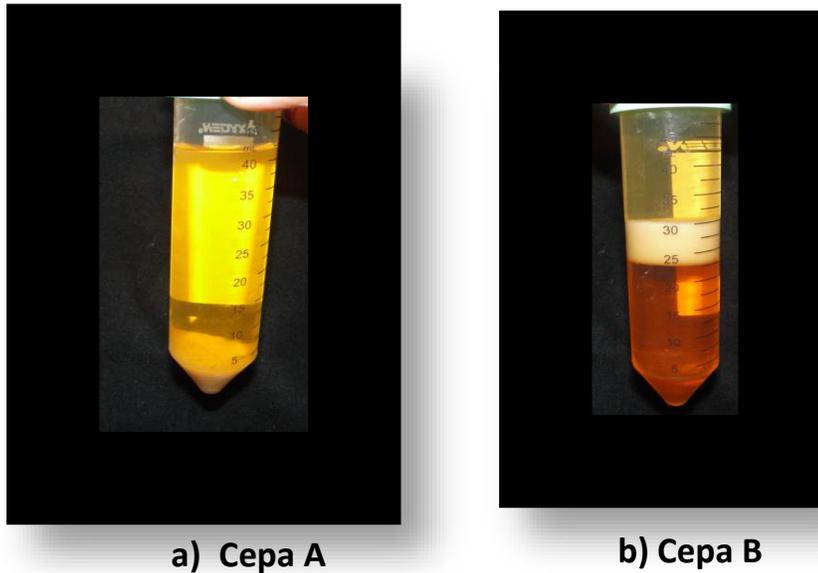


Fig. 8 Cambios en la composición de la pared celular de *N. brasiliensis* P-200. A) Suspensión del P-0 en cloroformo-metanol. La masa celular permaneció en la parte inferior del tubo. B) Suspensión del P-200 en el mismo solvente. La masa celular bacteriana se localizó entre ambos solventes.

6.2 Resultados del modelo de infección experimental con ratones BALB/c

La comparación de 40 modelos experimentales de micetoma en ratones BALB/c con la cepa silvestre HUJEG-1 (n= 20 grupo control) y con la cepa subcultivada 200 veces (n= 20 grupo experimental) denota que existe una reacción inflamatoria similar en la primer semana post-inyección del inóculo y que tiende a seguir el mismo patrón hasta la semana No. 5 aproximadamente (Anexos A Y B). A la semana No. 12 se puede observar el desarrollo del actinomicetoma con una marcada diferencia en el tamaño de los cojinetes plantares, teniendo en el grupo control (inoculados con la cepa HUJEG-1) una media de 4.9 x 5.5 mm vs 2.3 x 3.5mm en el grupo experimental (inoculados con la cepa 200 veces subcultivada) (Fig. 9).

Los ratones infectados con la cepa silvestre desarrollaron actinomicetoma de 3 a 4 cruces en un 95% (19/20 ratones) a diferencia del grupo experimental donde se desarrolló la infección con 3 cruces en un 5% (1/20 ratones) (Fig. 10).

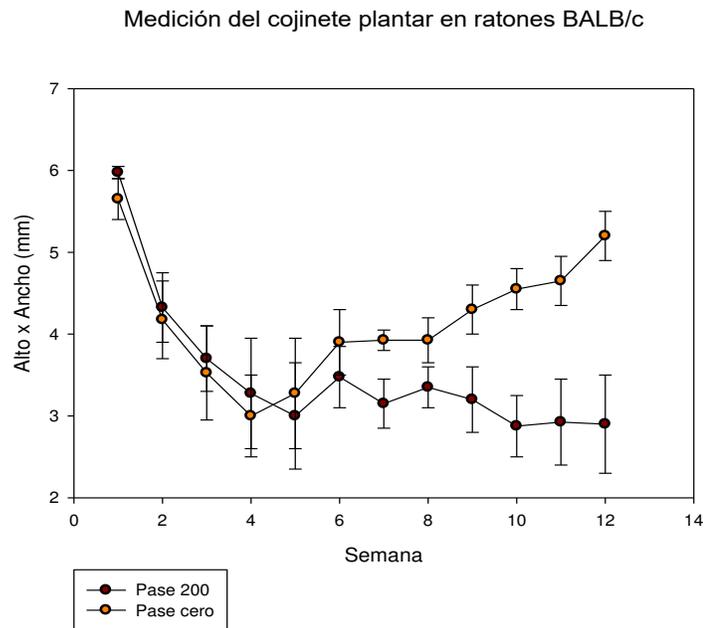


Fig. 9 Medición semanal del cojinete plantar (alto x ancho)

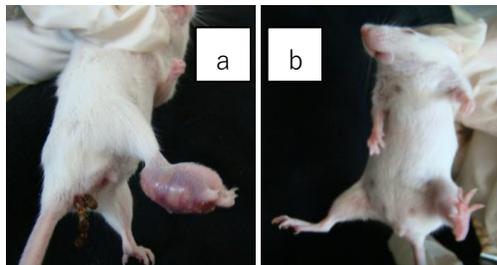


Fig. 10 Semana 12 post-infección con a) cepa T0 y b) cepa T200

6.3 Resultados de la inducción de resistencia

Los resultados del grupo experimental previamente inoculado con la cepa subcultivada 200 veces e inmunizado con 5×10^5 bacterias de *N. brasiliensis* en

el dorso, fueron los siguientes: a la semana 1 tuvieron una reacción inflamatoria similar que la del grupo control (media de 5.1 x 5.3 mm vs 5.2 x 5.6 mm respectivamente) la cual fue disminuyendo hasta la semana No. 5. A partir de esa semana, los ratones del grupo control desarrollaron micetoma de tres a cuatro cruces en un 90% (19/20 ratones) a diferencia del grupo experimental donde el desarrollo de la infección de tres cruces se observó sólo en el 5% de los ratones (1/20 ratones).

6.4 Resultados histopatológicos de la lesión.

Las biopsias del cojinete plantar afectado mostraron que a la semana uno, tanto en el grupo control como en el experimental presentaban un abundante infiltrado inflamatorio de células mixtas, con predominio de neutrófilos en el centro y células monocíticas en la periferia. Este infiltrado de tipo granulomatoso persistía en la semana tres en ambos grupos, sin embargo, en la 5ª semana se observó en el grupo experimental mayor cantidad de tejido fibroso y el infiltrado inflamatorio era más homogéneo y monocítico mientras que en el grupo control continuó la formación de microabscesos con un infiltrado inflamatorio mixto. Estas condiciones persistieron en las siguientes semanas (Fig.11).

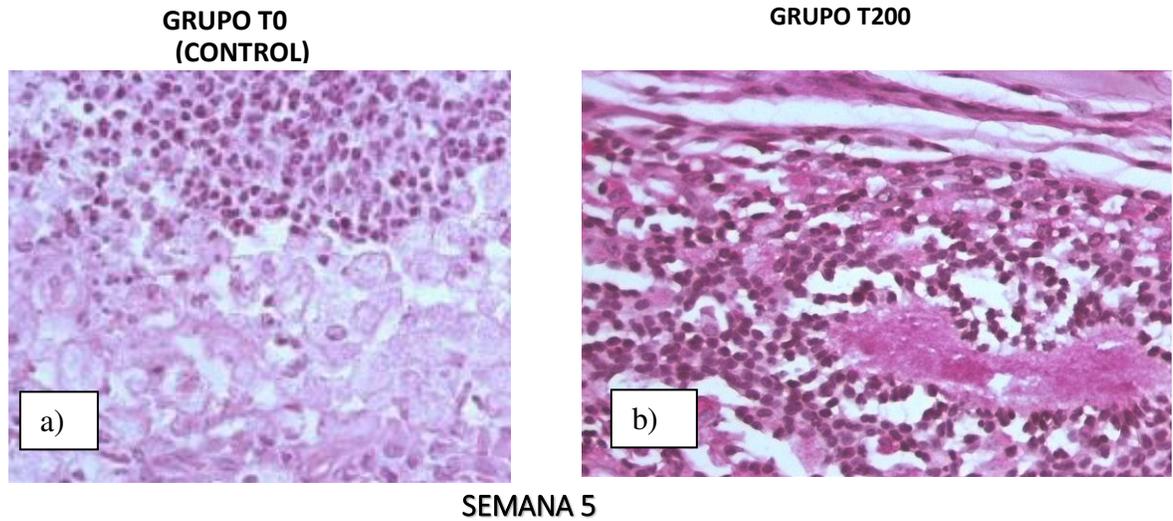


Fig. 11 Biopsias del cojinete plantar, en ratones BALB/c hembras, 5^a semana post-inoculación con *N. brasiliensis* a) cepa no subcultivada: se observaron microabscesos con infiltrado inflamatorio mixto, b) cepa subcultivada 200 veces: se observó mayor cantidad de tejido fibroso y un infiltrado mononuclear.

6.5 Resultados de la infección con PMN's

La infección de los neutrófilos humanos con ambas cepas demostró que la cepa 200 veces subcultivada (cepa T200) fue digerida por los PMN más fácilmente que la cepa A.

A las 0 horas las unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa T200 eran de ca. 4×10^6 UFC; esta cantidad disminuyó a las 3 horas a 2×10^6 UFC y a las 6 horas a 1×10^6 UFC. La cantidad de UFC de la cepa A aumentó a las 3 horas a ca. 2.5×10^6 UFC y a las 6 horas presentó un crecimiento de 3.6×10^6 UFC.

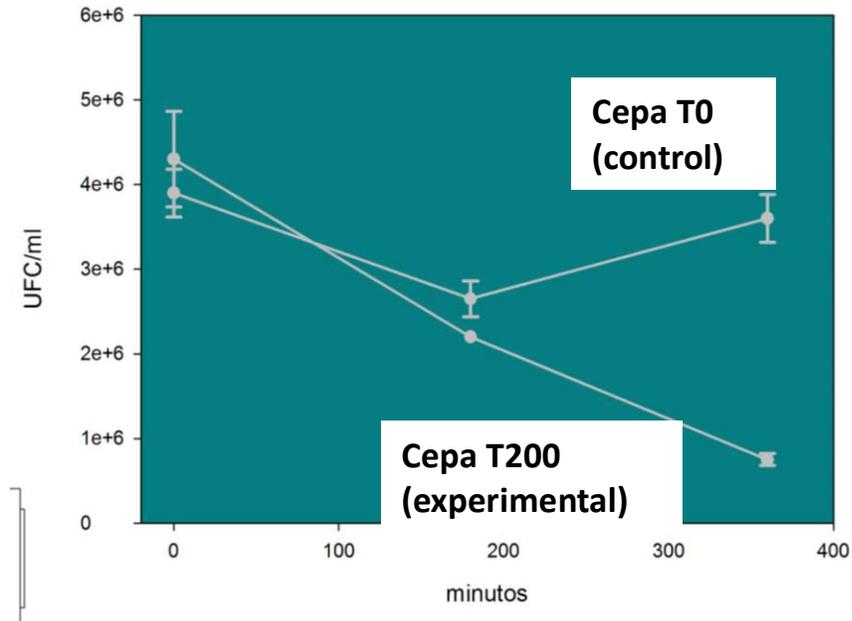
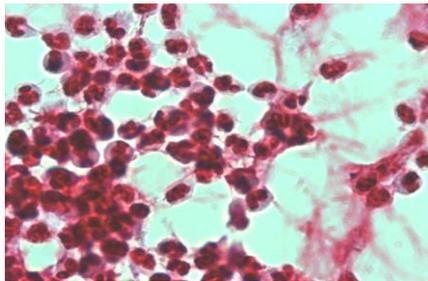
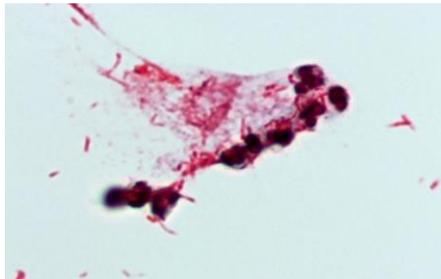


Fig. 12. Curva de fagocitosis por PMN's de la cepa T0 y cepa T200

A nivel de microscopía óptica los filamentos de *N. brasiliensis* de la cepa B se observaban más fragmentados a diferencia de la cepa A, los cuales se encontraban formando grupos de filamentos más largos.



Cepa A(control)



Cepa B (experimental)

Fig. 13. Infección a las 3 horas de PMN con *N. brasiliensis* cepa T0 y cepa T200.

6.6 Resultados del análisis de proteínas

Los cambios que se observaron en los marcadores SDS-PAGE's Broad-Range de Biorad al 12%, teñidos con azul de Coomasie R-250 fueron la ausencia de bandas proteicas en el extracto total intracelular, así como en el filtrado de proteínas extracelular de la cepa subcultivada 200 veces.

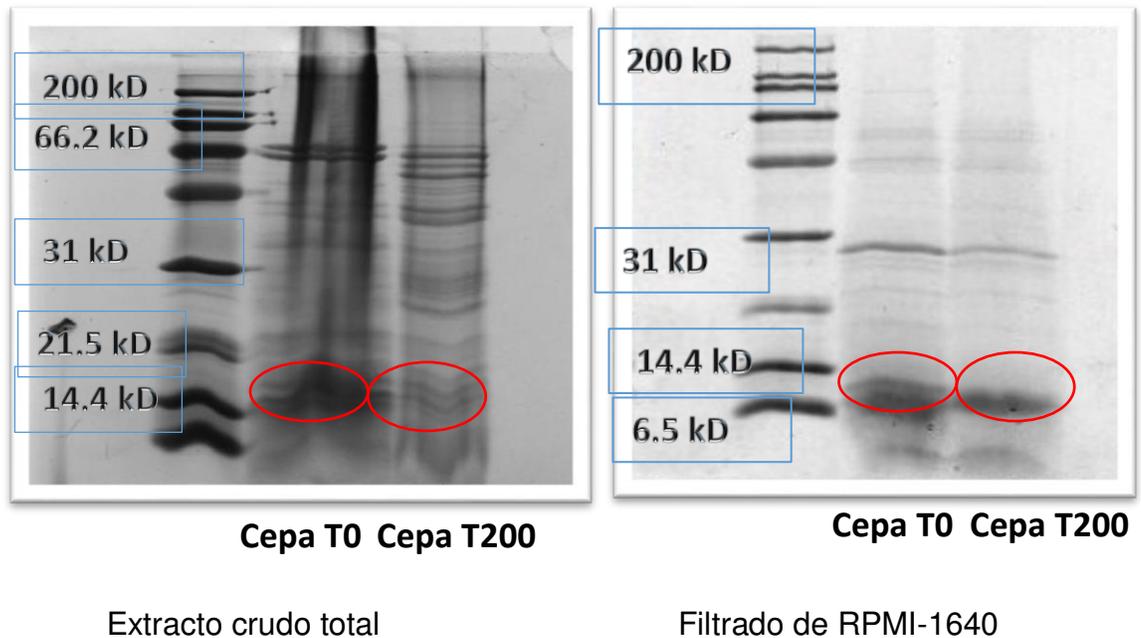


Fig. 13. SDS-PAGE's al 12%. Extracto celular crudo y filtrado de proteínas en RPMI-1640 Ceba T0 y cepa T200

El resultado de un análisis bidimensional de proteínas para una identificación más clara de estas proteínas demostró la ausencia de ciertas proteínas en el extracto celular crudo del pase 200, las cuales se pueden observar en la siguiente figura.

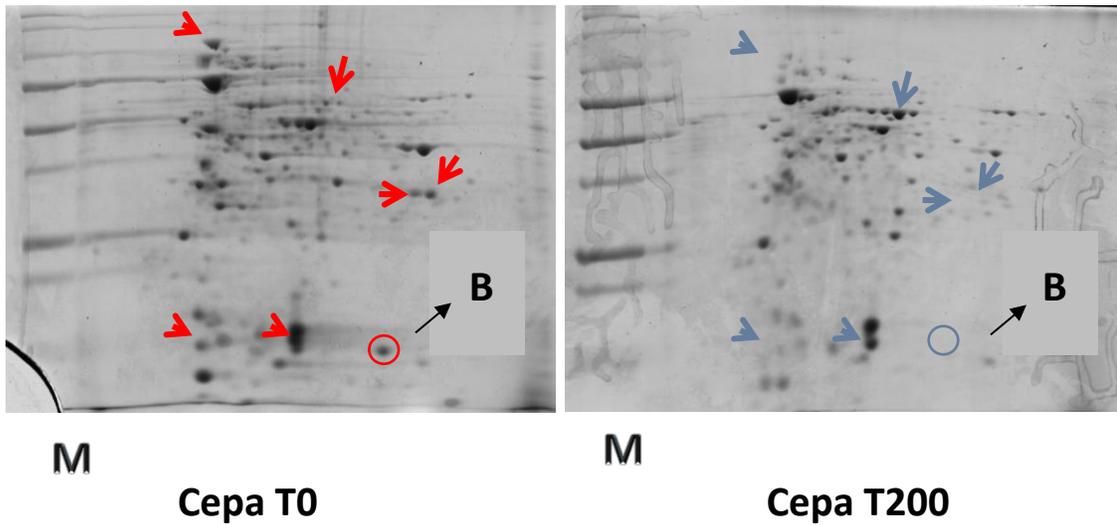


Fig. 14. Análisis bidimensional de proteínas

Se redujo el pH del gel bidimensional a 4 - 7 para tener un mayor aumento y mejor visualización de estas proteínas, observando los siguientes resultados:

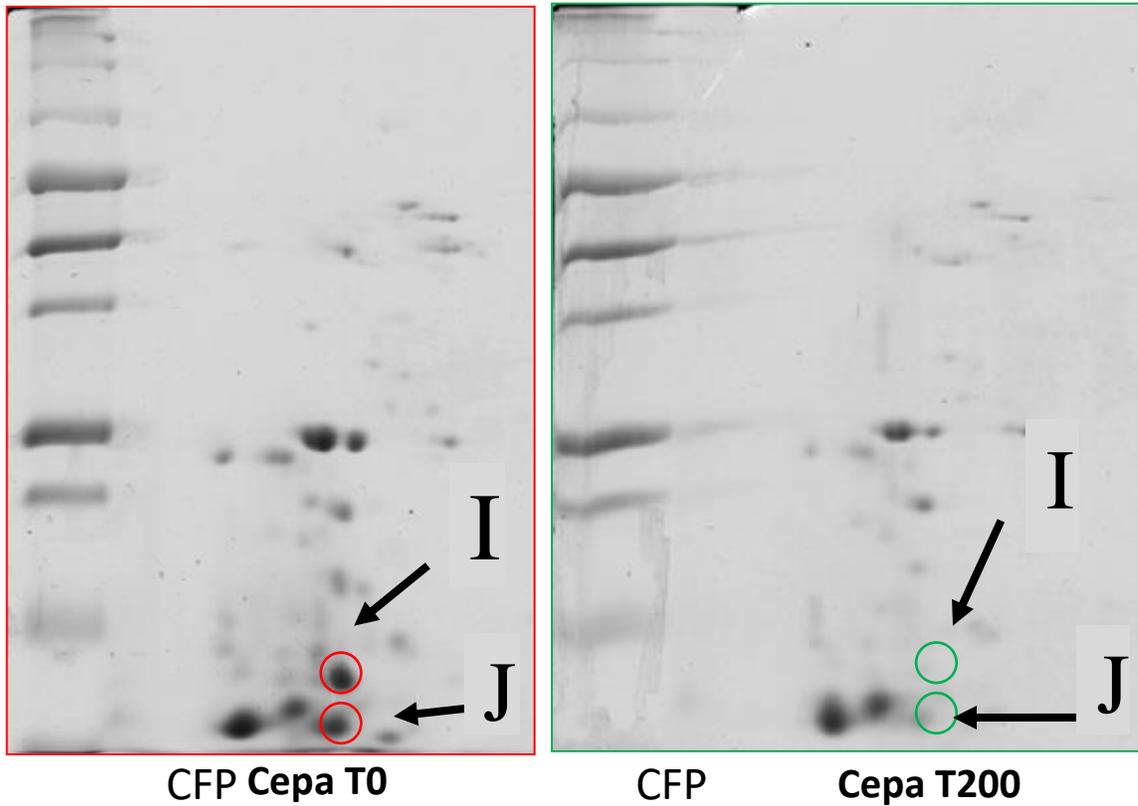


Fig. 15. Análisis bidimensional de proteínas pH 4 a 7

Las proteínas obtenidas del extracto total se encontraban entre los estándares de 66.2kda-45kda así como entre 21.5kda-14.4kda; y las proteínas de interés del filtrado de rpmi-1640 estaban en un rango de 31kda y entre 14.4-6.5kda.

DISCUSION

Nocardia brasiliensis es un actinomiceto saprófito responsable de originar micetoma en el humano. La infección es crónica, avanza lentamente y cuando permanece sin tratamiento puede resultar en una eventual discapacidad funcional (6,11,12).

Se han utilizado diversos métodos que provocan cambios en la virulencia de los microorganismos, entre ellos están los pasajes seriados también conocidos como subcultivos, la exposición del microorganismo a radiación UV, al calor o frío.

Entre las bacterias atenuadas por medio de subcultivos se encuentra la cepa de *Mycobacterium bovis*, también conocida como bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Ésta fue atenuada mediante 231 pasajes seriados en cultivos de patatas impregnadas con bilis de buey, durante un período de 13 años, obteniendo empíricamente una vacuna ampliamente utilizada en la actualidad. Otras vacunas virales atenuadas con la técnica de los subcultivos son la de polio, sarampión, paperas, rubéola y varicela.

La virulencia de *Nocardia brasiliensis* no ha sido completamente dilucidada.

En esta tesis se evaluaron los efectos de *N. brasiliensis* subcultivada 200 veces in vivo e in vitro con ratones BALB/c y neutrófilos humanos respectivamente, para tener una mayor información sobre los mecanismos de virulencia de esta bacteria para entender mejor su patogenia.

Los cambios biológicos que se observaron en la *Nocardia* subcultivada fueron un crecimiento más rápido y homogéneo de ésta en los cultivos BHI. Además,

la densidad celular disminuyó por probables cambios bioquímicos en la pared celular; ésto puede ser la causa de su comportamiento biológico al no inducir la formación de lesiones subcutáneas en los ratones.

El uso de la electroforesis en gel de dos dimensiones nos ayuda a identificar, interpretar y comprender los mecanismos de virulencia asociados a las proteínas del microorganismo. La cepa subcultivada 200 veces se analizó por este método, encontrando la ausencia de algunos puntos proteicos en los filtrados extracelulares, y en los extractos celulares crudos. Se realizó un análisis de secuenciación de aminoácidos por BLAST, identificando uno de estos puntos proteicos como la co-Chaperonina GROES de 10kDa.

La co-chaperonina GroES o Cpn10 ha sido estudiada en diferentes organismos como *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Bartonella bacilliformis*, *Agrobacterium tumefaciens*; así como en *Mycobacterium tuberculosis* donde ha mostrado ser una de las más abundantes proteínas encontradas en los filtrados de cultivo. La Cpn10 es importante en el plegamiento adecuado de proteínas.

A pesar de la ausencia de esta proteína en el subcultivo 200 de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, se necesitan corroborar estos hallazgos con más estudios, como las secuencias de los genes de interés y hacer un análisis retrospectivo de la posible pérdida de los genes y su expresión in vitro.

CONCLUSIONES

- a) El subcultivo No. 200 tuvo cambios fenotípicos importantes entre ellos:
- La pérdida parcial de su ácido-resistencia
 - La incapacidad de formar microcolonias en cultivo de agar BHI
 - La disminución en la densidad celular
 - La disociación en sus filamentos
- b) Después de 200 cultivos seriados in vitro se, disminuyó importantemente la capacidad de *N. brasiliensis* HUJEG-1 para desarrollar actinomicetomas en ratones.
- c) Los PMN's fagocitaron con mayor facilidad al subcultivo No. 200 de *N. brasiliensis*, por lo que tuvo una menor sobrevivencia frente a los PMN's en comparación con la cepa sin subcultivar.
- d) En el análisis proteico en dos dimensiones se encontró la desaparición de puntos proteícos, en la cepa subcultivada 200 veces.

ANEXOS

Geles de poliacrilamida al 12%

1. Reactivos

a) SDS-PAGE (SEPARADOR)

5mL

Agua bidestilada	1.7mL
TRIS-HCl 1.5M, pH 8.8	1.25mL
SDS 10%	0.025mL
Acrilamida-bisacrilamida	2mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.25mL
TEMED	0.0025mL

b) SDS-PAGE (CONCENTRADOR)

3mL

Agua bidestilada	1.845mL
TRIS-HCl 0.5M, pH 6.8	0.75mL
SDS 20%	0.015mL
Acrilamida-bisacrilamida	0.402mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.015mL
TEMED	0.003mL

pH

Buffer de
corrimiento 5X,
8.3

TRIS-BASE **15 gramos**

Glicina **72 gramos**

SDS **5 gramos**

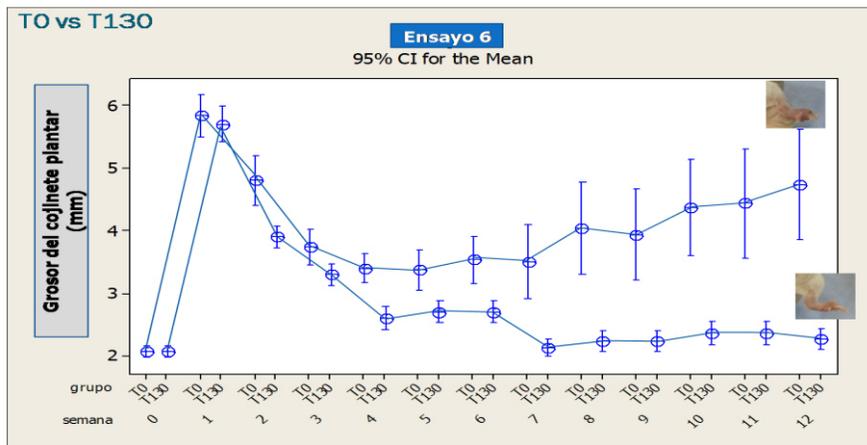


Fig. 1 Evolución natural de ratones BALB/C inoculados con *N. brasiliensis* HUJEG-1 sin subcultivar y subcultivo 130.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE UN ADULTO
para la OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LA SEPARACIÓN DE NEUTRÓFILOS
HUMANOS

Esta forma de consentimiento pudiera contener palabras que usted no comprenda. Por favor pida al doctor del estudio o a uno de los integrantes del personal del estudio que le expliquen cualquier palabra que usted no conozca, o cualquier información que no sea clara o que sea confusa.

INVESTIGADOR (DOCTOR DEL ESTUDIO): Dra. Carolina González Carrillo

DIRECCIÓN DEL(OS) CENTRO(S) DE ESTUDIO: Hospital Universitario “Dr. José E. González” Av. Madero y Gonzalitos S/N esq. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, CP 64460, Monterrey, Nuevo León, México.

NÚMERO(S) DE TELÉFONO EN HORAS DE OFICINA Y DESPUÉS DE HORAS HÁBILES: 83 48 14 65 ext.313

PROPÓSITO DEL PROYECTO

Se le está solicitando su participación en un estudio de investigación sobre separación de neutrófilos (células de la sangre que están involucrados en el sistema inmunológico). En este estudio deseamos examinar muestras biológicas (sangre) en personas sanas.

OBJETIVO

El objetivo de esta forma de consentimiento es darle información a fin de que usted pueda decidir si quiere proporcionar muestras biológicas (sangre) para la separación de neutrófilos humanos. El doctor del estudio coleccionará la muestra y la información, con la finalidad de generar un Banco de Muestras y Datos, mantenidos bajo estricta confidencialidad conjuntamente en el Departamento de Dermatología y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL.

ANTECEDENTES

El estudio tiene como objetivo recaudar neutrófilos humanos de voluntarios sanos con el fin de utilizarlos en un modelo experimental in vitro para valorar la respuesta inmunológica cuando éstos sean infectados con *Nocardia brasiliensis*.

Nosotros pretendemos describir y estudiar la virulencia de la *Nocardia brasiliensis* en polimorfonucleares.

Para lograr ésto, nosotros estudiaremos in vitro los neutrófilos humanos para observar la respuesta inmunológica secundaria a la infección por *Nocardia brasiliensis*.

PROCEDIMIENTO

Si usted acepta participar en este proyecto de investigación, no se afectará de manera absoluta el tratamiento médico que se le recomiende o su elección de médico para

realizar el tratamiento. Nosotros obtendremos de usted la siguiente información y las siguientes muestras biológicas:

Información Demográfica: Se le solicitará la siguiente información: fecha de nacimiento, antecedentes médico, se le preguntará si ha estado sometido a situaciones estresantes o si ha sufrido algún trastorno psicológico.

Muestras Biológicas: El personal del estudio extraerá una muestra de sangre de una vena del brazo que será recolectada en 5 tubos (aproximadamente 25 ml en total). Esta muestra es adicional a cualquiera de las muestras de sangre que se le extraigan para los fines de su atención médica o para el ensayo clínico principal.

RIESGO/BENEFICIO

Usted puede sentir algunas inconveniencias razonables y algunos otros riesgos si decide participar en estos estudios. La introducción de una aguja en la vena para la obtención de sangre puede producir molestias. Puede haber una lesión pequeña y existe una remota posibilidad de infección en el sitio de la punción. Usted puede sentir mareo o desvanecimiento durante la toma de la muestra de sangre.

Ninguno de los exámenes generará un beneficio directo e inmediato para usted, pero estos pueden ayudarnos a conseguir otras nuevas formas para identificar, prevenir y tratar la infección por *Nocardia brasiliensis* en otros pacientes con la misma enfermedad que lo afecta. Es posible que su participación pudiera contribuir al conocimiento de las causas de las condiciones médicas o pudiera ayudar al desarrollo de nuevos medicamentos o métodos para detectar o tratar la enfermedad.

Existe el riesgo remoto de que la información de su registro de investigación pueda afectar aplicaciones para seguro de vida, y para trabajo, tanto personales como de otros miembros de su familia. Por estas razones, cualquier información personal que nos suministre será mantenida con la máxima privacidad.

OPCIONES

Usted puede decidir no participar en este estudio.
Su participación en esta investigación es voluntaria.

CONFIDENCIALIDAD

Cualquier cosa que sepamos sobre usted en este estudio se mantendrá de manera estrictamente confidencial. Si publicamos los resultados del estudio en un artículo de una revista médica o en un libro, nosotros no lo identificaremos a usted de ninguna manera. Tomaremos las medidas necesarias para mantener toda su información en privado.

No se le notificará el momento en que se realice investigaciones adicionales, y no se obtendrá consentimiento informado adicional de usted. La investigación adicional estará

limitada por la información original de salud que sea colectada en la forma de reporte de caso durante el ensayo clínico principal y que haya sido discutida en este consentimiento informado.

Costos:

No se le cobrará por ninguno de los análisis requeridos ni por los procedimientos realizados durante su participación en esta enmienda. La visita a la clínica y la extracción de muestras biológicas asociadas con la conducción de esta enmienda se proporcionan sin costo si usted participa.

Nuevos hallazgos:

Se le proporcionarán todos los nuevos hallazgos, descubiertos durante el curso de este estudio de investigación, que pudieran cambiar su decisión de participar en esta enmienda cuando estén disponibles.

Retiro del consentimiento y destrucción de las muestras:

Usted podría retirar este consentimiento y terminar su participación en la investigación de ATENUACIÓN DE *NOCARDIA BRASILIENSIS* MEDIANTE 200 CULTIVOS SERIADOS IN VITRO arriba descrita sin afectar su participación en el ensayo clínico principal.

Para retirar su consentimiento, usted debe contactar al doctor del estudio al número telefónico indicado en la primera página del formato, ya que sólo él/ella tiene acceso a toda su información que le identifica. El doctor del estudio conservará los registros que vinculan la información que le identifica (por ejemplo, su nombre y la información de contacto) con su muestra codificada de sangre y la información de salud, durante el período de tiempo requerido por la ley aplicable. Si usted retirara su consentimiento para la investigación, usted podría solicitar que su muestra de sangre, sean destruidos y que ya no se usen en y otras investigaciones relacionadas. El grupo de investigación tendrá el derecho de conservar y usar cualquiera de los resultados de la investigación que obtengamos antes del retiro de su consentimiento.

Preguntas/ Información: Si tuviera alguna pregunta respecto a esta colección de muestra o a la investigación de farmacogenética o si sufriera alguna lesión causada por el procedimiento de colección de la muestra, usted deberá contactar al médico responsable del proyecto en el número telefónico indicado en la primera página.

Si tuviera alguna pregunta acerca de sus derechos como sujeto del estudio, deberá contactar a **REPRESENTANTE DEL COMITE:**

CENTRO / HOSPITAL DEL ESTUDIO: Subdirección de Investigación- Planta Baja de la Biblioteca de la Facultad de Medicina del Hospital Universitario “Dr. José E. González”

NÚMERO(S) DE TELÉFONO: 83-29-40-50 Extensión 2870 a la 74.

El consejo institucional de revisión o el comité de ética son grupos de médicos y de individuos no médicos que han revisado la información del estudio teniendo en mente la protección del sujeto.

Consentimiento: He leído la información anterior que describe la colección de las muestras biológicas y todas mis preguntas referentes a la colección de mi muestra y a la información

médica/de salud para la investigación relacionada han sido respondidas a mi satisfacción. Acepto proporcionar muestras biológicas y permitir que mi información de salud se use y se divulgue para la investigación de ATENUACIÓN DE *NOCARDIA BRASILIENSIS* MEDIANTE 200 CULTIVOS SERIADOS IN VITRO como se describe arriba. Entiendo que recibiré una copia firmada de esta forma de consentimiento.

ENTIENDO QUE ESTOY EN MI DERECHO DE SOLICITAR CUALQUIER ACLARACIÓN Y OBTENER INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN QUE SOLICITE EN CUALQUIER MOMENTO DEL DESARROLLO DE LA MISMA. ADEMÁS, ENTIENDO QUE ESTOY EN LA LIBERTAD DE RETIRARME EN EL MOMENTO QUE DESEE Y SI TOMO ESTA DECISIÓN NO ME AFECTARÁ EN FUTUROS TRATAMIENTOS QUE REQUIERA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO.

ENTIENDO QUE LA INFORMACIÓN OBTENIDA DE LA INVESTIGACIÓN SERÁ MANEJADA EN FORMA CONFIDENCIAL Y QUE EN NINGUN MOMENTO SE VIOLARÁ MI PRIVACIDAD.

ADEMÁS, EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA U.A.N.L., ESTARÁ EN LA DISPOSICIÓN DE BRINDARME TRATAMIENTO MÉDICO O QUIRÚRGICO SIN COSTO, EN CASO DE QUE RESULTARA DAÑADO DIRECTAMENTE POR CUALQUIERA DE LOS PROCEDIMIENTOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, Y EN CASO DE DAÑO PERMANENTE, TENDRÉ DERECHO A SER INDEMNIZADO DE ACUERDO AL DAÑO SUFRIDO.

SU FIRMA INDICA QUE USTED HA DECIDIDO TOMAR PARTE EN ESTE PROYECTO Y QUE HA LEIDO Y ENTENDIDO LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA Y EXPLICADA PERSONALMENTE.

NOMBRE DEL SUJETO

FECHA

FIRMA DEL SUJETO

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE DEL INVESTIGADOR

FECHA

FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE Y FIRMA DE LOS TESTIGOS

NOMBRE DEL PRIMER TESTIGO

FECHA

FIRMA DEL TESTIGO

Dirección del primer testigo

Relación con el paciente

NOMBRE DEL SEGUNDO TESTIGO

FECHA

FIRMA DEL TESTIGO

Dirección del segundo testigo

Relación con el paciente

BIBLIOGRAFÍA

1. Wright, JH. A case of Mycetoma (Madura Foot). *J Exp Med*, 1898. 1;3(4-5) 421:433
2. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saúl A, Macotella Ruíz E. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac Med Mex*. 1992 Jul-Aug; 128(4):477-81.
3. Arenas R, Fernandez FR, Arce M, Micosis subcutáneas: Esporotricosis, cromomicosis y micetoma. En *micosis cutáneas*. Cap. 10, la Ed. España: Médica panamericana. 2006 pp. 131-147.
4. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, Vera-Cabrera L, Padilla-Desgarenes MC, Contreras Pérez C, Chávez G, Estrada R, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac Med Mex*. 2013 149: 586-92
5. McGinnis MR. Mycetoma. *Dermatol Clin* 1996; 14(1):97- 104.
6. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Mycetoma. *Clinics in Dermatology*, 2007. 25, 195 – 202.
7. Arenas R, Estrada R. *Tropical Dermatology* Georgetown, Texas. 1ª edición 2001 p.51-60
8. Gonzalez-Ochoa A, Shibayama H, Felix D, Anaya M. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Proc XII Inter Cong Dermatol Washington DC, USA* 1962;542-551. 18.
9. Ortíz-Ortíz L, Bojalil LF. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. *Clin Exp Immunol* 1972; 12:225-229. 19.
10. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas M. Avances en la fisiopatogenia y tratamiento de los actinomicetomas. *Dermatol Rev Mex* 1999; 4843: S18-S21

11. Van de Sande WWJ. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013 7(11): e2550. doi:10.1371/journal.pntd.0002550
12. Zijlstra EE, van de Sande WWJ, Welsh O, Mahgoub ES, Goodfellow M, Fahal AH. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 100–12
13. Euzéby, JP 14 Sep 2008, fecha de acceso. List of bacterial names with standing in nomenclature. [Online] <http://www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html>.
14. Brown-Elliott B, Brown J, Conville P, Wallace R. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2006 p. 259–282
15. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: Updated Clinical Review and Experience at a Tertiary Center. *Infection*. 2010. 38 (2): p. 89-97.
16. Bonifaz A. Micetoma. *Micología Médica Básica*. 2da. Ed. México: Mendez Editores. 2000; pp. 135-165.
17. Lopez M, Mendez L, Hernandez F, Catanon R. Micetoma. *Micología Médica: procedimientos para el diagnóstico del laboratorio*. 2da. Ed. México: Trillas 2004; pp. 59-67.
18. Novales J. Contribution de la Dermatopatología al conocimiento de los micetomas. *Med Cut Ibero Lat Am* 1995; 23:248-252.
19. Vega MM. Histopatología del micetoma. *Monogr Dermatol Esp* 2006; 19:17-23.
20. Kwapinski JBG, Seeliger HPR. Investigations on the antigenic structure of actinomycetales. IX Serological classification of the nocardiae with the polysaccharide fractions of their cell walls. 1965 *Mycopathol.*, 25:173-182
21. Trevino-Villarreal JH, Vera-Cabrera L, Valero-Guillén PL, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* Cell Wall Lipids Modulate Macrophage and Dendritic Responses That Favor Development of Experimental Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infection and Immunity* 2012 80:(10) 3587–3601

22. Palma-Ramos A, Castrillón-Estela R, Pizaña-Cureño A, et al. Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. *Dermatología Rev Mex* 2007. 51, (6) 212-8
23. Barry DP, Beaman, BL. Modulation of eukaryotic cell apoptosis by members of the bacterial order Actinomycetales. *Apoptosis* 2006. 11:1695-1707
24. Beaman, B. L. Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with in vitro maintained macrophages obtained from the lungs of normal and Immunized rabbits. *Infect. Immun.* 1979. 26:355-361.
25. Beaman, B. L., and S. Maslan. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infect. Immun.* 1978. 20:290-295.
26. Beaman, L., and B. L. Beaman. The timing of exposure of mononuclear phagocytes to recombinant interferon γ and recombinant tumor necrosis factor α alters interactions with *Nocardia asteroides*. *J. Leukocyte Biol.* 1992. 51:276-281.
27. Beaman, B. L., C. M. Black, F. Doughty, and L. Beaman. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 1985.47:135-141.
28. Davis-Scibienski, C., and B. L. Beaman. Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: association of virulence, viability, ultrastructural damage, and phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 1980. 28:610-619.
29. Petit JF, Lederer E. Structure and immunostimulant properties of mycobacterial cell walls. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1978. 28:177-199
30. Salinas-Carmona MC, Castro-Corona MA, Licón-Trillo A. Mecanismos de patogenicidad de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. *Medicina Universitaria.* 2002. 4 (15): p. 97-101.
31. Hay RJ, Mahgoub ES, Leon G, Al-Sogair S, Welsh O. Micetoma. *J Med Vet Mycol* 1992;30:41-9

32. Saul A. Micosis profundas. Lecciones de Dermatología. 14 ed. México, D.F. Editorial Mendez-Cervantes. 2001. pp: 202-210.
33. Magana MM, Mycetoma Inter J Dermatol 1984; 23(4): 221-236
34. Padilla DC. Micetoma. Aspectos clínicos y diagnóstico diferencial. Actualidades en Micología médica. Ed. Fac. Med., UNAM, México D. F. 2004 pp. 215-223.
35. Badgett-Marty; R; Auer, A; Evolutionary Dynamics of Viral Attenuation. Journal of Virology, Oct. 2002 p. 10524-10529
36. Basombrío MA, Segura MA, Gómez L, Padilla M. Studies on the virulence and attenuation of Trypanosoma cruzi using immunodeficient animals. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000. 95 (1): p. 175-178.
37. Molina-Torres CA, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole ST, Vera-Cabrera L. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of Mycobacterium tuberculosis. J Med Microbiol. 2010. 59(4): p. 384-91.
38. Calmette A, Guerin C. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine, cultivé sur la bile de boeuf glycérimée. C. R. Acad. Sci. 1909. 149: p. 716-718.
39. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci. 2007. 104: p. 5596-601
40. Clemens JD, Jackie JH, Chuong JH, Feinstein AR. The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. JAMA. 1983. 249: p. 2362.
41. Calmette, A; Preventive Vaccination against Tuberculosis with BCG. Proc R Soc Med. 1931 Sep;24(11):1481-1490.
42. Kozak RA, Alexander CD, Liao R, Sherman DR, Behr MA. Region of difference 2 contributes to virulence of Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 2010. 79: p. 59-66.

43. Almaguer-Chávez J, Welsh O, Lozano-Garza HG, Said-Fernández S, Romero-Díaz VJ, Ocampo-Candiani O, Vera-Cabrera L. Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. BMC Infectious Diseases 2011, 11:290
44. Hansen EJ, Wilson RM, Baseman JB. Two-Dimensional Gel Electrophoretic Comparison of Proteins from Virulent and Avirulent Strains of *Mycoplasma pneumoniae*. Infection and Immunity. 1979. 24 (2): p. 468-475.
45. Aravindhavan V, Christy AJ, Roy S, Ajitkumar P, Narayanan PR, Narayanan S. Mycobacterium tuberculosis groES promoter controls the expression of the bicistronic groESL1 operon and shows differential regulation under stress conditions. FEMS Microbiol Lett. 2009. 292: p. 42-49.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Mi nombre es Carolina González Carrillo, originaria de Monterrey, N.L. México.

Nací el 26 de noviembre de 1983. Soy la segunda hija, de tres, del matrimonio entre mis padres: José Salvador González Gajón y Socorro Carrillo Martínez.

Acudí a la escuela primaria y secundaria (1989 – 1998) en el Colegio Excelsior A.C. Posteriormente realicé mis estudios de preparatoria de 2 años (1998–2000) en la Preparatoria No. 7.

Fui aceptada como alumna de la Facultad de Medicina en la UANL en el 2000.

Durante mi formación profesional como médico cirujano y partero realicé actividades extracurriculares como ser becaria del servicio de Histología y Fisiología y fui integrante y coordinadora del Servicio Universitario Orientado a la Prevención del Abuso de Drogas.

En mi último año de la carrera obtuve una beca completa para realizar estudios de Oftalmología, Ginecología y Obstetricia, Otorrinolaringología y Neurocirugía en la Universidad Ruprecht-Karls-Universität en Heidelberg, Alemania.

En el periodo 2007 – 2008 realicé mi servicio social en la clínica de Esquipulas en San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

Terminé la formación como especialista en Dermatología, la cual fue en el periodo marzo 2008 – febrero 2012.