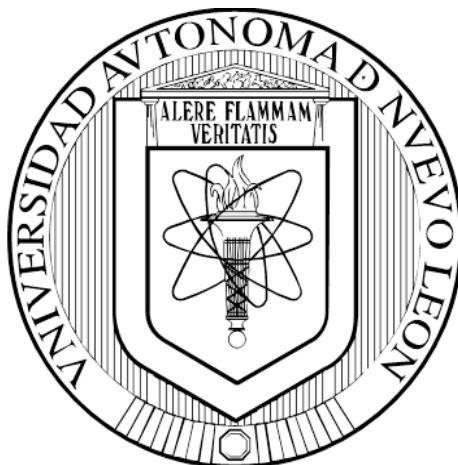


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y ESTUDIO DE UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR
POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c**

POR

M.C.P. ROQUE MASAHARU MIFUJI LIRA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

JUNIO, 2016

**“DESARROLLO Y ESTUDIO DE UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR
POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c”**

Aprobación de la Tesis

Dr. C. Alejandro Ortiz Stern

Director de Tesis

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Co-director de Tesis

Dr. C. Alberto Yairh Limón Flores

Miembro de la Comisión

Dr. med. Raquel Garza Guajardo

Subdirectora de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y ESTUDIO DE UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR
POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c**

Presentado por

M.C.P. ROQUE MASAHARU MIFUJI LIRA

Este trabajo se realizó en el Departamento y Servicio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Alejandro Ortiz Stern y la co-dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona.

Dr. C. Alejandro Ortiz Stern

AGRADECIMIENTOS

Alejandro Ortiz Stern y Alberto Y. Limón Flores, por todo el apoyo y consejos que me brindaron estos dos años y todo lo que me enseñaron en la maestría.

A mis compañeros de maestría: Erick, Héctor, Daniel, Claudia. Por escucharme, aconsejarme, y compartir estos dos años de maestría conmigo.

Especial agradecimiento al Q.C.B. Daniel Salas, por todos tus consejos y asistencia técnica para la valoración histopatológica en mi proyecto y a la L.B.G Claudia Aguayo, por todo el apoyo brindado este último año que ha sido particularmente complicado, por escucharme, aconsejarme y ayudarme incondicionalmente.

ÍNDICE

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidad de Nocardia spp.....	1
1.2. Nocardiosis pulmonar	2
1.2.1. Definición.....	2
1.2.2. Agente etiológico.....	2
1.2.3. Epidemiología.....	2
1.2.4. Factores de Riesgo.....	3
1.2.5. Manifestaciones clínicas.....	3
1.2.6. Estudios de laboratorio e imagen.....	4
1.2.7. Tratamiento.....	4
1.2.8. Pronóstico.....	5
1.3. Estudios in vivo.....	5
1.3.1. Modelo experimental en ratones.....	5
1.3.2. Susceptibilidad a infección en ratones atímicos.....	6
1.3.3. Susceptibilidad a infección en ratones heterocigotos.....	7
1.3.4. Susceptibilidad a infección en ratones Swiss Webster.....	8
1.3.5. Susceptibilidad a infección en ratones NIH:S convencionales.....	9
1.3.6. Susceptibilidad a infección en ratones NIH:s spf.....	9
1.3.7. Susceptibilidad a infección en ratones NIH:S spf tratados LPS	10
1.3.8. Susceptibilidad a infección en ratones CDB:F1.....	10
1.4. Nocardia brasiliensis.....	10
1.4.1. Patogenicidad y factores de virulencia.....	10

2.2.11. Obtención de imágenes en fotodocumentador.....	22
2.2.12. Inclusión de pulmones en parafina.....	22
2.2.13. Tratamiento de laminillas con carga positiva.....	22
2.2.14. Cortes de tejido en microtomo y montado en laminillas.....	23
2.2.15. Desparafinización.....	23
2.2.15.1. DWS 1.7%.....	23
2.2.15.2. Xileno.....	24
2.2.16. Tinciones.....	24
2.2.16.1. Hematoxilina y Eosina.....	24
2.2.16.2. Kinyoun.....	25
2.2.17. Desenmascaramiento de antígeno.....	26
2.2.18. Protocolo para inmunohistoquímica.....	26
2.2.18.1. Incubación con anticuerpo primario.....	26
2.2.18.2. Incubación con anticuerpo secundario.....	27
2.2.18.3. Revelado con cromógeno.....	27
2.2.18.4. Contratinción con hematoxilina.....	27
2.2.19. Microscopía confocal.....	28
2.2.20. Obtención de imágenes histológicas.....	28
2.2.21. Análisis y procesamiento de imágenes.....	29
2.2.21.1. GIMP2.....	29
2.2.22. ELISA para IL-1 β	29
2.2.23. ELISA para IgG contra extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i>	30
2.2.24. Análisis estadístico de experimentos.....	32
3. RESULTADOS.....	33
3.1. Determinación de dosis infecciosa de <i>N. brasiliensis</i> /desarrollo del modelo.....	33
3.2. Ensayos de protección frente a exposición secundaria.....	36

3.3. Identificación del blanco infeccioso.....	41
3.4. Identificación de microcolonias a tiempos tempranos.....	42
3.5. Bacterias unicelulares vs microcolonias.....	44
3.6. Crecimiento de microcolonias.....	48
3.7. Infección en ratones C57BL/6.....	48
3.8. Estudio de la respuesta inmune local contra <i>N. brasiliensis</i>	52
3.9. Estudio de la respuesta inmune humoral contra <i>N. brasiliensis</i>	61
4. DISCUSIÓN.....	62
4.1. Modelos de nocardiosis pulmonar.....	62
4.2. Dosis infecciosa y evolución de la enfermedad.....	64
4.3. Protección frente a infección secundaria.....	65
4.4. Microcolonias como unidad mínima infecciosa.....	67
4.5. Crecimiento de microcolonias.....	68
4.6. Evolución del granuloma y pérdida de control de la enfermedad.....	70
5. CONCLUSIONES.....	73
PERSPECTIVAS.....	74
REFERENCIAS.....	75
ANEXOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA.....	PÁGINA
Figura 1. Infección 10^8 vs 10^9 UFC. Gráfica de peso.....	34
Figura 2. Infección 10^8 vs 10^9 UFC. Imágenes de fotodocumentador.....	35
Figura 3. Histopatología de lesiones pulmonares.....	36
Figura 4. Ensayo de protección BALB/c.....	37
Figura 5. Imágenes de fotodocumentador BALB/c.....	38
Figura 6. Promedio de lesiones por ratón.....	38
Figura 7. Ensayo de protección BALB/c spf.....	39
Figura 8. Imágenes de fotodocumentador BALB/c spf.....	40
Figura 9. Promedio de lesiones por ratón.....	40
Figura 10. Co-cultivo de NbGFP con macrófagos alveolares.....	41
Figura 11. Citometría de flujo de BALF.....	42
Figura 12. Tinción de Kinyoun.....	43
Figura 13. Curva de crecimiento de NbGFP.....	43
Figura 14. Microcolonia de NbGFP.....	44
Figura 15. Suspensión unicelular de NbGFP.....	45

Figura 16. 10^9 UFC vs 10^9 unicelulares. Gráfica de pesos.....	45
Figura 17. 10^9 UFC vs 10^9 unicelulares. Imágenes de fotodocumentador.....	46
Figura 18. 10^9 UFC vs Microcolonias recuperadas de filtro.....	46
Figura 19. 10^9 UFC vs microcolonias NbGFP. Imágenes de fotodocumentador.....	47
Figura 20. Histopatología de lesión pulmonar. HyE.....	47
Figura 21. Microcolonias crecidas desde unicelulares.....	48
Figura 22. Microcolonias desde unicelulares, 48 horas vs 60 horas.....	49
Figura 23. Microcolonias desde unicelulares, 48 horas vs 60 horas Imágenes de fotodocumentador.....	50
Figura 24. Microcolonias NbGFP en ratones BALB/c vs C57BL/6.....	51
Figura 25. Microcolonias NbGFP en ratones BALB/c vs C57BL/6 Imágenes de fotodocumentador.....	51
Figura 26. 10^9 vs 10^9 UFC HK. Ratones BALB/c spf.....	52
Figura 27. 10^9 vs 10^9 UFC HK. Imágenes de fotodocumentador.....	53
Figura 28. 10^8 vs 10^9 UFC. Ratones BALB/c spf.....	54
Figura 29. 10^8 vs 10^9 UFC. Determinación de IL-1 β en BALF.....	54
Figura 30. 10^8 vs 10^9 UFC. Determinación de proteínas en BALF.....	55
Figura 31. 10^8 vs 10^9 UFC. Citometría de flujo de BALF.....	55

Figura 32. Microcolonias NbGFP.....	56
Figura 33. Inmunohistoquímica de evolución de granulomas pulmonares a los días7, 21 y 42 post-infección.....	57
Figura 34. Inmunohistoquímica de evolución de granulomas pulmonares al día 65 post-infección.....	58
Figura 35. Inmunohistoquímica de evolución de granulomas pulmonares al día 108 post-infección.....	59
Figura 36. Mapa de colores falsos de Inmunohistoquímica.....	60
Figura 37. Titulación de anticuerpos IgG vs extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i>	61

LISTADO DE ABREVIATURAS

NbGFP	N. brasiliensis que expresa proteína verde fluorescente
mg	miligramos
ml	mililitros
nm	nanometros
µm	micrómetros
µg	microgramos
µl	microlitros
Psi	presión
mmh ₂ O	milímetros de agua
C	centígrados
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
HyE	Hematoxilina y Eosina
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea
MA	Macrófagos Alveolares
p.i.	post-infección
BAL	Lavado Bronquioalveolar
BALF	Fluido de Lavado Bronquioalveolar
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAB	Diaminobenzidina
UV	Ultravioleta
RPM	Revoluciones por minuto

PMN	Polimorfonucleares
BHI	Brain Heart Infusion Broth
S.E.M.	Error estándar de la media
KO	Knock-out
HK	Heat-Killed
Spf	Specific pathogen free
Inos	Inducible Nitric oxide synthase
Arg-1	Arginasa-1
Ab	Antibody
Mab	Monoclonal Antibody
IHQ	Inmunohistoquímica
DWS	Dish Washing Solution
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
spp.	especies
LPS	Lipopolisacárido
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
PBS	Phosphate Buffered Solution
TBS	Tris Buffered Solution

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Generalidades de *Nocardia spp.*

Nocardia es un género de bacterias que pertenece al orden de los *Actinomycetales*. Son bacterias gram positivas, parcialmente ácido-alcohol resistentes, aerobias estrictas, de crecimiento lento y que habitan de forma natural en el suelo, principalmente rico en materia orgánica [1]. Fueron descritas por primera vez por un veterinario francés, Edmond Isidore Etienne Nocard en 1888, en un caso de linfadenitis bovina [2]. Un año después fue nombrada *N. farcinica* por Trevisan [3]. En 1891 la primera cepa de *N. asteroides* fue aislada de un absceso cerebral [4]. En un principio, a todas las cepas aisladas de *Nocardia* que no hidrolizaban sustratos como caseína, tirosina y xantinas se les denominaba *N. asteroides*. Fue hasta 1990 cuando se comenzaron a utilizar análisis de secuenciación de rRNA 16S que se comenzó a distinguir y clasificar adecuadamente a las distintas cepas aisladas [5]. Actualmente se han descrito 43 especies de *Nocardia* que se consideran de relevancia para los seres humanos, y las que se han aislado con mayor frecuencia son *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* y *N. nova* [5].

Existen diversos mecanismos que le confieren patogenicidad a *Nocardia spp.* entre ellos su pared celular rica en peptidoglicanos y ácido micólico organizadas en múltiples capas [6,7], la presencia de superóxido dismutasas que le confieren resistencia a la

muerte por estrés oxidativo por parte de células fagocíticas [8,9], inhibición de la fusión de fagosoma-lisosoma [10] y bloqueo de acidificación del fagosoma [11]. Muchos de estos mecanismos de patogenicidad son compartidos con otros patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*.

1.2 Nocardiosis pulmonar

1.2.1 Definición

La nocardiosis pulmonar es una infección poco frecuente y grave que se presenta de forma subaguda o crónica. [12]

1.2.2 Agente etiológico

El agente causal de esta enfermedad son bacterias del género *Nocardia spp.*, y las principales cepas aisladas en pacientes de acuerdo a un estudio en el 2009 fueron: *N. cyriacigeorgica* en un 32.4%, *N. farcinica* en un 24.3%, *N. otitidiscaviarum* en un 10.8%, *N. veterana* en un 8.1%, *N. asiatica* en un 5.4% y *N. brasiliensis* en un 2.7% [13].

1.2.3 Epidemiología

Debido a que el cuadro clínico es inespecífico y el crecimiento de la bacteria es lento y su aislamiento complicado usualmente existe un retraso en el diagnóstico de la enfermedad [12,14,15]. En un estudio reciente en España, se estimó que la incidencia de nocardiosis pulmonar era 0.45 casos/100,000 habitantes, de acuerdo a los pacientes

atendidos en un periodo de 3 años y la incidencia en pacientes inmunosuprimidos del 0.4% al 3.6% [13]. Beaman et al. reportaron una incidencia de 500-1000 casos al año en Estados Unidos, en un periodo de 1972-1974 [16]. En México no existen estudios epidemiológicos de la enfermedad y actualmente su incidencia se desconoce.

El principal modo de infección propuesto es por inhalación del patógeno que habita de forma natural en el suelo, aunque el mecanismo de infección exacto se desconoce [14].

1.2.4 Factores de riesgo

Los factores de riesgo que principalmente se asocian a nocardiosis pulmonar son un estado de inmunosupresión por uso de corticoesteroides de larga evolución como en pacientes con EPOC o pacientes post-transplantados [12,13,17] o en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida [14,18], aunque se ha reportado que entre el 30-50% de los pacientes con nocardiosis pulmonar son inmunocompetentes [16,19-21]

1.2.5 Manifestaciones clínicas

La nocardiosis pulmonar tiene una presentación clínica inespecífica siendo los síntomas más comunes: Fiebre, tos, dolor pleurítico, disnea, astenia, anorexia y pérdida de peso que pueden presentarse de forma subaguda a crónica e insidiosa [12,13,22,23]. En pacientes con afección sistémica concomitante se puede observar alteración en el estado de conciencia, cefalea y convulsiones [17]. Clínicamente es difícil diagnosticar esta enfermedad ya que muchos de sus síntomas son compartidos por otras enfermedades pulmonares como tuberculosis, y es por esa razón que son necesarios

estudios de laboratorio, aislamiento del patógeno por medios invasivos y no invasivos y estudios de imagen.

1.2.6 Estudios de laboratorio e imagen

Dentro de las alteraciones en los resultados de laboratorio se encuentran leucocitosis con neutrofilia, elevación de proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular [22,23], y alteraciones en gasometría arterial [12]. El aislamiento del patógeno se puede realizar por muestras de expectoración en casi la mitad de los casos y en el resto se requieren de métodos invasivos como lavado bronquioalveolar e incluso biopsia por aspiración con aguja fina guiada por tomografía computada [22].

Los hallazgos radiográficos y de tomografía computada pueden ser variables desde lesiones aisladas o multifocales con infiltrados nodulares o consolidaciones. La manifestación principal son nódulos pulmonares en más de la mitad de los casos, que pueden ser únicos o múltiples [12,22,23]. Se pueden observar lesiones cavitarias y derrame pleural hasta en un tercio de los pacientes [12,17]. También se pueden detectar cavitaciones dentro de los nódulos dentro de las primeras 2 semanas después del diagnóstico en la mayoría de los pacientes [23]. Otros hallazgos en las tomografías fueron linfadenopatías, bronquiectasias, y derrames pericárdicos. [23]

1.2.7 Tratamiento

Debido a la baja incidencia de estas infecciones y a la gran variabilidad en la susceptibilidad a antibióticos en las diversas especies de bacterias del género *Nocardia*,

no existen guías para el tratamiento de nocardiosis pulmonar y los regímenes de tratamiento deben ser individualizados de acuerdo a las pruebas de susceptibilidad en vitro del patógeno aislado [17]. En la actualidad el tratamiento se basa en una combinación de 2 o más fármacos y son terapias de larga duración. El esquema de antibióticos utilizado dependerá de la sensibilidad de la cepa aislada en los pacientes, pero los medicamentos utilizados de forma inicial y empírica son trimetoprim con sulfametoxazol, en combinación con imipenem o amikacina [13,23]. La duración del tratamiento tiene un promedio de 4 meses de acuerdo a algunos estudios, pero en pacientes inmunosuprimidos se han requerido terapias de más de un año [13-17].

1.2.8 Pronóstico

El pronóstico es variable dependiendo de las comorbilidades de los pacientes y si la infección es localizada en pulmón o si hay invasión a otros órganos y tejidos. En un estudio se reportó una mortalidad del 50% cuando existe involucro de SNC [23]. Se estima que la mortalidad en la población en general es de 21.6% a 39% y en la mortalidad reportada en pacientes inmunosuprimidos asciende hasta un 77% [12,13].

1.3 Estudios in vivo

1.3.1 Modelo experimental en ratones [24-26]

En la actualidad solo existe un modelo experimental de nocardiosis pulmonar que fue descrito por Blake L. Beaman en 1977. En el modelo se obtuvieron aislados de

N. asteroides GUH-2 (ahora *N. cyriaciageorgica*) y se cultivaban en medio BHI. Después se obtuvieron 5 ml del cultivo y se sembraron en 500 ml de medio BHI en agitación constante a 150 rpm. De esta forma obtuvieron una suspensión homogénea que se centrifugó para después resuspender la pastilla bacteriana en solución salina estéril y ajustar las UFCs a 10^{11} /ml para la infección por aerosol y 10^8 /ml para la instilación intranasal. Se infectaron distintas cepas de ratones y se obtuvieron los siguientes resultados.

1.3.2 Susceptibilidad a infección en ratones atímicos (Nu/Nu) [24].

Ninguno de los ratones que recibieron el inóculo vía aerosol murieron. Se encontró un mayor número de bacterias en su forma filamentosa dentro de los macrófagos en comparación con los ratones heterocigotos y Swiss Webster. A las 24 horas se observó infiltración de PMN y agregados de fagocitos mononucleares y lesiones extensas con grandes números de bacterias en su forma filamentosa. A las 72 horas la mayor parte de la inflamación desapareció.

Tras la instilación intranasal, el 5% de los ratones murieron en menos de 7 días post-infección. Los ratones fueron incapaces de eliminar a la bacteria y para la semana 4 post-infección muchos de ellos habían desarrollado enfermedad sistémica con afección renal. El 90% de los ratones murieron dentro de 6 semanas. En comparación con los ratones heterocigotos y los Swiss Webster, no hubo disminución en las UFC al día 7 en los ratones atímicos. Las lesiones fueron aumentando en extensión incluso después del día 7 en comparación con las otras dos cepas de ratones en quienes para este tiempo la

respuesta inflamatoria había desaparecido. Las lesiones se volvieron progresivamente más graves en las siguientes 48 horas y en este periodo murieron algunos animales. En este periodo se observó invasión del epitelio bronquial, algo no observado en los ratones que recibieron el inóculo en aerosol. Los cambios inflamatorios extensos desaparecieron para el día 7. Las lesiones remanentes constaban de células mononucleares y algunas células gigantes, las cuales desaparecieron por completo 1 mes después de la infección. La infección persistió un mes post-infección con afección renal en 3 de 7 ratones que sobrevivieron y nunca llegaron a una resolución completa.

1.3.3 Susceptibilidad a infección en ratones heterocigotos (Nu/+) [24].

Ningún ratón que recibió el inóculo en forma de aerosol murió. Al igual que los ratones atímicos, hubo un mayor número de UFC en pulmones 72 horas post-infección en comparación con los ratones Swiss Webster. Al análisis histológico se observó un gran número de bacterias en su forma cocoide y filamentosa de manera intracelular en los macrófagos para las 6 horas post-infección. Para las 72 horas, la inflamación ya había disminuido y las formas filamentosas de *Nocardia* ya no estaban presentes en los pulmones.

En comparación con el grupo de ratones que recibió la bacteria en forma de aerosol, el 50% de los ratones heterocigotos murieron en 7 días tras la instilación intranasal. Los ratones que sobrevivieron se recuperaron de la infección y no se observaron muertes después de este periodo. Para el día 7 había una disminución importante del número de UFC en pulmones. La extensión de las lesiones e inflamación

a nivel pulmonar fue importante en las primeras 72 horas y fue disminuyendo hasta desaparecer para el día 7, quedando únicamente lesiones aisladas conformadas por células mononucleares y algunas células gigantes y algunas bacterias de distintos tamaños. Para el mes post-infección hubo una completa resolución de la enfermedad.

1.3.4 Susceptibilidad a infección en ratones Swiss Webster [24].

Ninguno de los ratones que recibieron el inóculo vía aerosol murieron. A las 24 horas post-infección se observó una gran infiltración de PMN y fagocitos mononucleares, un aumento en el número de bacterias principalmente dentro de los macrófagos con presencia de formas filamentosas de la bacteria. A las 72 horas solo se observaron formas cocoides de la bacteria y una disminución significativa en el número de UFC.

25% de los ratones que recibieron el inóculo vía instilación intranasal murieron una semana después de la infección. Los ratones que sobrevivieron lograron eliminar por completo a la bacteria y no hubo muertes a tiempos tardíos. Al tercer día post-infección se recuperaron 10^6 UFC de los pulmones y esta cantidad fue disminuyendo significativamente hasta el día 7. A las 24 horas post-infección se observaba una infiltración pulmonar grave. Las lesiones se volvieron progresivamente más graves en las siguientes 48 horas y en este periodo murieron algunos animales. En este periodo se observó invasión del epitelio bronquial, algo no observado en los ratones que recibieron el inóculo en aerosol. Los cambios inflamatorio extensos desaparecieron para el día 7.

Las lesiones remanentes constaban de células mononucleares y algunas células gigantes, las cuales desaparecieron por completo 1 mes después de la infección.

1.3.5 Susceptibilidad a infección en ratones NIH:S convencionales [25].

Tras la instilación intranasal hubo una disminución en el número de UFC a partir de las 24 horas hasta las 72. Al análisis histológico se observó un crecimiento de las bacterias con presencia de formas filamentosas cuando únicamente se habían instilado bacterias en su forma cocoide. Los hallazgos histopatológicos fueron similares a aquellos observados en los ratones Swiss Webster. Las lesiones pulmonares estaban compuestas principalmente de macrófagos y linfocitos. Una semana después de la infección el número de UFC aisladas de los pulmones era considerablemente menor comparado con los ratones libres de patógenos.

1.3.6 Susceptibilidad a infección en ratones NIH:S spf [25].

Tras la instilación intranasal el número de UFC aumentó en las primeras 24 horas sin observar una disminución a las 72 horas, comparado con los ratones convencionales y los spf tratados con LPS. A la valoración histopatológica de los pulmones se observaron cambios importantes. Las bacterias cambiaron a su forma filamentosas con una respuesta inmune mínima e invasión del epitelio bronquial y crecimiento en el espacio alveolar. A las 72 horas los pulmones de los ratones estaban gravemente afectados por bacterias filamentosas alargadas, y los espacios alveolares se encontraban ocupados por macrófagos y neutrófilos. Los ratones se encontraban gravemente

enfermos y muchos murieron en este periodo. A los 7 días las UFC habían disminuido, pero en menor grado comparado con los ratones convencionales.

1.3.7 Susceptibilidad a infección en ratones NIH:S spf tratados - LPS [25].

Tras la instilación intranasal el número de UFC aumentó en las primeras 24 horas seguido de una disminución significativa para las 72 horas. La evolución y hallazgos histopatológicos fueron similares a la de los ratones convencionales, sin embargo, había un mayor número de UFC a los 7 días post-infección.

1.3.8 Susceptibilidad a infección en ratones CBD/F₁ [26].

Los ratones machos CBD/F1 son deficientes de células B, mientras que las hembras pueden montar una respuesta humoral adecuada. Al infectar a ambos grupos de ratones se demostró que no existe una diferencia en la susceptibilidad a la infección en ausencia de una respuesta humoral. Tras haber sido inmunizados con bacterias muertas, ambos grupos demostraron una mejor capacidad para resistir una dosis letal ya sea por vía intranasal o intravenosa.

1.4 *Nocardia brasiliensis*

1.4.1 Patogenicidad y factores de virulencia

Los determinantes de patogenicidad de *N. brasiliensis* no han sido ampliamente estudiados. La superóxido dismutasa es una enzima que cataliza el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y de esta forma subvierte la capacidad fagocítica por parte de células de la respuesta inmune innata [9]. Salinas Carmona et al, estudiaron el rol de la superóxido dismutasa (SOD) dentro de macrófagos infectados in vitro [27]. En este estudio, describieron la expresión de SOD en bacterias que se encontraban de forma intracelular en macrófagos y concluyeron que la expresión de esta proteína disminuye una hora después de la infección [27]. Por otra parte, se secuenció el genoma completo de una cepa de *N. brasiliensis* en la cual se detectaron genes para catalasa, superóxido dismutasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas, proteasas y fosfatasa alcalina, sin embargo, no se estudió el rol que juegan directamente estas enzimas en la infección por *N. brasiliensis* [28].

1.4.2 *N. brasiliensis* que expresa una proteína verde fluorescente (NbGFP) [29]

Salinas-Carmona et al construyeron una *N. brasiliensis* con un plásmido que expresa una proteína verde fluorescente (GFP) y un gen de resistencia a la gentamicina. Esta bacteria transformada conservaba su capacidad infecciosa la cual fue demostrada al momento de inocular la bacteria en patas de ratones y generarles actinomicetoma. La expresión de GFP facilita la identificación de viabilidad bacteriana sin la necesidad de utilizar anticuerpos marcados ni fluoróforos.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general:

Desarrollar un modelo de nocardiosis pulmonar granulomatosa por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c

1.5.2 Objetivos específicos:

1. Desarrollar un modelo de nocardiosis pulmonar por *N. brasiliensis*, estableciendo sus condiciones óptimas de reproducibilidad.
2. Evaluar la capacidad protectora de una infección previa en la resistencia a infecciones subsecuentes.
3. Definir el blanco infeccioso de *N. brasiliensis* en el pulmón de ratón.
4. Estudiar la respuesta inmune local pulmonar contra *N. brasiliensis*.
5. Estudiar la respuesta inmune humoral producida por la infección pulmonar por *N. brasiliensis*.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el modelo animal actual de nocardiosis pulmonar no reproduce adecuadamente la enfermedad como se presenta en humanos, es necesaria la búsqueda de un nuevo modelo. Éste permitirá estudiar la fisiopatología de la enfermedad y evaluar de manera preclínica múltiples opciones terapéuticas.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Equipos

Citómetro de flujo. BD Biosciences, LSR Fortessa.

Invertoscopio Thermo Fisher, FLoid Cell Imaging Station.

Campana de extracción ESCO Class II BSC

Balanza analítica AND GR-120

Centrífuga Thermo Scientific SL-40R

Potenciómetro Conductronic PC18

Placa de agitación Corning PC-620D

Baño caliente

Microtomo

Incubadoras 37°C Thermolyne Type I42300 Incubator

Fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System, de Bio-Rad.

Microscopio Carl Zeiss Axio Scope A1 equipado con AxioCam ERc 5s

Microscopio confocal multifoton Carl Zeiss LSM 710-NLO

2.1.2 Instrumentos

Pipetas automáticas Thermo Scientific Finnpiquette F2.

- 0.5-2 μ l
- 2-20 μ l
- 10-100 μ l
- 20-200 μ l
- 100-1000 μ l

Puntillas 10, 200 y 1000 μ l

Tubos cónicos Corning de 15 y 50 ml

Tubos Eppendorf de 1.5 ml.

2.1.3 Reactivos, kits y soluciones

Ver anexo I

2.2 Métodos

2.2.1 Propagación de *Nocardia brasiliensis*

Se preparó el medio de cultivo BHI complementado con gentamicina (Ver anexo I).

Se descongeló un vial de NbGFP (ver metodología de congelación más adelante).

Se tomó 1 ml del vial y sembró en 50 ml de medio BHI complementado con gentamicina.

Se incubó a 37°C hasta la formación de biopelícula (aproximadamente 72 horas).

2.2.2 Disrupción de biopelícula de NbGFP

Se decantó el sobrenadante.

Se resuspendieron biopelículas en 50 ml de solución salina estéril.

Se recuperó la suspensión en un tubo cónico de 50 ml.

Se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a 24° C.

Se decantó el sobrenadante.

Se resuspendió la pastilla en 50 ml de solución salina estéril.

Se agitó la suspensión.

Se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a 24°C.

Se decantó el sobrenadante.

Se resuspendió pastilla de bacterias en 15 ml de solución salina estéril.

Se agitó la suspensión.

Se transfirió la suspensión a homogenizador Potter.

Se disgregó mecánicamente la biopelícula.

Se recuperó en un tubo cónico de 15 ml.

2.2.3 Congelación de *Nocardia brasiliensis*

Se tomaron 500 µl de glicerol y se agregaron a un criovial estéril.

Se tomaron 500 µl de la suspensión de biopelícula homogenizada y se agregaron al criovial.

Se cerró el vial.

Se agitó en vortex.

Se guardó a -80°C.

2.2.4 Preparación de inóculo de biopelícula homogenizada

Después de homogenizar la biopelícula, se dejó reposar el homogenizado por 15 minutos en un tubo cónico de 15 ml.

Se recuperaron los 8 ml superiores en otro tubo cónico de 15 ml.

Se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a 24° C.

Se desecharon los 4 ml superiores.

Se prepararon dos diluciones, 1:10 y 1:100 en solución salina estéril que corresponden a 10^9 y 10^8 UFC/50 μ l respectivamente.

2.2.5 Cuantificación de UFC de distintos inóculos

Se prepararon 400 ml de medio BHI con Agar (Ver anexo I).

Se prepararon diluciones seriadas 1:10 desde 10^{-1} hasta 10^{-12} de cada uno de los inóculos.

Se sembraron 500 μ l de cada dilución en 20 ml de medio BHI con agar en placas de Petri en condiciones de esterilidad.

Se agitaron suavemente las placas, se esperó a que solidificaran y se sellaron las placas con Parafilm.

Se incubaron las placas a 37°C por 72 horas y se realizó conteo de colonias.

2.2.6 Preparación de inóculos de bacterias muertas por calor

Después de homogenizar la biopelícula, se dejó reposar el homogenizado por 15 minutos en un tubo cónico de 15 ml.

Se recuperaron los 8 ml superiores en otro tubo cónico de 15 ml.

Se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a 24° C.

Se desecharon los 4 ml superiores.

Se preparó un inóculo con dilución 1:10 del homogenizado.

Se metió a autoclave para matar por calor a las bacterias, 25 minutos a 121°C y 15 psi.

2.2.7 Preparación de inóculos de bacterias unicelulares

Después de la disrupción de la biopelícula (2.2.2), se pasan los 15 ml del homogenizado por un filtro de 4 µm de tamaño de poro, previamente esterilizado.

Al terminar la filtración, se recuperó la fracción filtrada en un tubo cónico de 50 ml.

Se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a 24°C.

Se decantó el sobrenadante.

Se resuspendió la pastilla en volumen residual.

Se agregó 1 ml de medio BHI complementado con gentamicina.

Se hizo dilución 1:100 en solución salina estéril.

Se tomaron 10 µl de la dilución para hacer conteo de bacterias en una cámara de Neubauer.

Se ajustó el inóculo a 10⁹ UFCs en 50 ml.

2.2.8 Obtención de agregados bacterianos (microcolonias)

Después de la disrupción de la biopelícula (2.2.2), se pasan los 15 ml del homogenizado por un filtro de 4 µm de tamaño de poro, previamente esterilizado.

Se recuperaron los agregados raspando el filtro con una puntilla estéril de 1000 µl.

Se resuspendieron en 1 ml de solución salina estéril.

Se realizó conteo de colonias en 10 µl del inóculo en cámara de Neubauer.

2.2.9 Crecimiento de microcolonias desde unicelulares

Después de la disrupción de la biopelícula (2.2.2), se pasan los 15 ml del homogenizado por un filtro de 4 μm de tamaño de poro, previamente esterilizado.

Al terminar la filtración, se recuperó la fracción filtrada en un tubo cónico de 50 ml.

Se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a 24°C.

Se decantó el sobrenadante.

Se resuspendió la pastilla en volumen residual.

Se agregó 1 ml de medio BHI complementado con gentamicina.

Se hizo dilución 1:100 en solución salina estéril.

Se tomaron 10 μl de la dilución para hacer conteo de bacterias en una cámara de Neubauer.

Se sembraron bacterias a razón de 50,000-150,000 NbGFP unicelulares en 10 ml de medio BHI

Se incubaron a 37°C por 6 días.

Se confirmó visualmente el diámetro de las colonias por microscopía.

Se recuperaron las colonias y se ajustó su concentración a 100 en 50 μl .

2.2.10 Manejo de animales para experimentación

2.2.10.1 Infección.

Se utilizaron ratones BALB/c y C57BL/6 entre 8 y 12 semanas de edad de ambos géneros.

Los ratones se mantuvieron en el bioterio del departamento de inmunología de la facultad de medicina, UANL.

El día de la infección, los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con 200 µl de una combinación de ketamina 100 mg/ml y xilazina 20 mg/ml, que corresponden a 2 mg y 0.4 mg por ratón, respectivamente.

Una vez sedados, se pesaron y marcaron para identificación.

Se procedió a instilar vía intranasal 50 µl de uno de los distintos inóculos.

Se esperó a que los ratones despertaran y la jaula se volvió a colocar en su área dentro del bioterio.

2.2.10.2 Monitoreo.

Diariamente los ratones fueron pesados dentro del bioterio tras la infección hasta el día de su sacrificio.

2.2.10.3 Eutanasia

Los ratones fueron sacrificados vía dislocación cervical en los tiempos designados por el protocolo o en caso de una pérdida de más del 20% de su peso, acorde a las normas de manejo adecuado de animales en experimentación.

2.2.10.4 Extracción y fijación de pulmones y obtención de sangre.

Después del sacrificio, los ratones fueron posicionados en decúbito supino para autopsia.

Se humedeció el área de incisión con etanol al 70%.

Se realizó un corte transversal en piel a nivel de abdomen superior.

Se introdujeron tijeras de disección y se procedió a separar piel del resto de tejidos.

Se hizo un corte vertical en la piel por la línea media.

Se realizó un corte en peritoneo para entrar a cavidad abdominal.

Se introdujeron tijera de disección y se descubrió el área diafragmática.

Cuidadosamente se puncionó el diafragma con las tijeras sin dañar órganos torácicos.

Se obtuvo muestra de sangre por punción cardiaca.

Se introdujeron tijeras manteniéndose pegadas a la pared anterior de la caja torácica teniendo cuidado de no dañar órganos.

Se abrieron las tijeras una vez que alcanzaron la parte superior para fracturar costillas.

Se realizó corte vertical en caja torácica a un lado de la línea media.

Se expusieron corazón y pulmones.

Se disecó la tráquea del ratón y se realizó corte transversal.

Se realizó una tracción constante y leve a la tráquea mientras se separaban los pulmones de las paredes de caja torácica y de otros órganos.

Una vez extraídos los pulmones se colocaron en una superficie plana (caja de Petri).

Se introdujo una aguja calibre 20 a la tráquea, y conectada a un sistema de fluidos que contenía formaldehído al 4% en PBS (Ver anexo I).

Se inflaron los pulmones con formaldehído al 4% a una presión de 20 mmH₂O.

Se realizó un nudo en la tráquea para mantener inflados los pulmones.

Se sumergieron en formaldehído al 4% dentro de un tubo cónico de 50 ml y se dejaron fijando hasta por 48 horas.

2.2.11 Obtención de imágenes en fotodocumentador

Ajustamos la longitud de onda del fotodocumentador a λ 488 nm con tiempo de exposición de 0.5 segundos para la detección de la proteína verde fluorescente que expresa NbGFP.

Se introdujo el tubo cónico con el pulmón sumergido en formaldehído al fotodocumentador.

Se tomó la imagen con los parámetros establecidos.

Se documentaron las imágenes para su uso.

2.2.12 Inclusión de pulmones en parafina

Se separaron los lóbulos de los pulmones previamente fijados y se colocaron en un cassette para cortes histológicos.

El cassette se sumergió 2 veces en etanol al 70% por una hora cada uno.

Luego se sumergió en etanol al 80% una hora.

Luego se sumergió en etanol 95% una hora.

Luego se sumergió 3 veces etanol al 100% por una hora cada uno.

Luego se sumergió 3 veces en xilol por hora y media cada uno.

Finalmente se sumergió 2 veces en parafina líquida (56°C) por 2 horas cada uno.

Los pulmones se sacaron de los cassettes y se incluyeron en parafina en un nuevo cassette.

2.2.13 Tratamiento de laminillas con carga positiva

Se colocaron las laminillas en gradillas.

Se sumergieron en agua con detergente líquido.

Se enjuagaron con agua corriente.

Se sumergieron en agua bidestilada por 2 minutos.

Se sumergieron en solución para tratar laminillas (Ver anexo I) 5 veces, 10 segundos cada una.

Se eliminó el exceso y se guardaron en un área sin corriente de aire y cubiertas con papel.

Se dejaron secar por 48 horas y se volvieron a guardar en las cajas.

2.2.14 Cortes de tejido en micrótopo y montado en laminillas

Se ajustaron los parámetros del microtomo a cortes de 5 μm de espesor.

Se realizaron 4 cortes secuenciales.

Se transfirieron a una cubeta con agua a temperatura ambiente.

Se transfirieron uno por uno a un baño caliente a 45°.

Se recuperaron tejidos en laminillas tratadas.

Se dejaron secar las laminillas por 24 horas.

2.2.15 Desparafinización

2.2.15.1 Solución de lavado (DWS) al 1.7% (Ver anexo I).

Se calentaron las laminillas de forma horizontal por 15 minutos en un horno de 56°C.

Se prepararon dos vasos de precipitado de 250 ml de DWS 1.7% y 2 vasos de agua destilada.

Se calentaron los 4 vasos en placa a 95°C.

Se sumergieron laminillas en un vaso de DWS 1.7% por 2 minutos.

Se sumergieron las laminillas en el segundo vaso de DWS 1.7% por 2 minutos.

Se sumergieron laminillas en un vaso con agua por 30 segundos.

Se sumergieron las laminillas en el segundo vaso con agua por 30 segundos.

Se transfirieron las laminillas a agua destilada a temperatura ambiente.

2.2.15.2 Xileno.

Se calentaron las laminillas de forma horizontal por 15 minutos en un horno de 56°C.

Se sumergieron laminillas en xileno por 10 minutos, 3 veces.

Se sumergieron laminillas en etanol al 100% por 5 minutos, 3 veces.

Se sumergieron laminillas en etanol al 95% por 1 minuto.

Se sumergieron laminillas en etanol al 80% por 1 minuto.

Se sumergieron laminillas en etanol al 70%.

Se transfirieron laminillas a contenedor con agua destilada a temperatura ambiente.

2.2.16 Tinciones

2.2.16.1 Hematoxilina y Eosina.

Se desparafinizaron cortes histológicos de acuerdo a protocolo para desparafinización de laminillas con DWS 1.7%.

Se pipetearon 150 µl de hematoxilina de Mayer sobre el tejido por 50 segundos.

Se lavó con agua corriente hasta el cambio de coloración.

Se pipetearon 150 µl de Eosina amarilla sobre el tejido por 10 segundos.

Se decantó el colorante.

Se sumergieron las laminillas 15 veces en etanol al 70%.

Se sumergieron las laminillas 15 veces en etanol al 95%.

Se sumergieron las laminillas en etanol al 100% por 3 minutos.

Se sumergieron las laminillas en etanol 100%/xileno por 5 minutos.

Se sumergieron las laminillas en xileno por 5 minutos.

Se aplicaron dos gotas de medio de montaje vectamount sobre el tejido.

Se colocó cubreobjetos sobre el tejido y se dejó a secar por 1 hora.

2.2.16.2 Kinyoun.

Se desparafinizaron cortes histológicos de acuerdo a protocolo para desparafinización de laminillas con DWS 1.7%.

Se pipetearon 150 µl de fuscina sobre el tejido y se dejó por 10 minutos.

Se decantó fuscina.

Se pipetearon 150 µl de alcohol ácido 1% sobre el tejido y se dejó por 1 minuto.

Se lavaron laminillas con agua corriente por 5 minutos.

Se pipetearon 150 µl de azul de metileno sobre el tejido por 5 minutos.

Se lavaron laminillas con agua corriente.

Se transfirieron laminillas a contenedor con agua destilada.

Se sumergieron laminillas a etanol 70%, 15 veces.

Se sumergieron laminillas a etanol 95%, 15 veces.

Se sumergieron laminillas a etanol 100% por 3 minutos.

Se sumergieron laminillas a etanol 100%/xileno por 5 minutos.

Se sumergieron laminillas a xileno por 5 minutos.

Se aplicaron dos gotas de medio de montaje Vectamout sobre el tejido.

Se colocó cubreobjetos sobre el tejido y se dejó secar por una hora.

2.2.17 Desenmascaramiento de antígeno

Se desparafinizaron cortes histológicos de acuerdo a protocolo para desparafinización de laminillas con DWS 1.7%.

Se calentó solución de desenmascaramiento (Buffer de Citratos pH 6.0 o Buffer EDTA pH 8.0. Ver anexo I) en vaporera hasta alcanzar 95°C.

Se sumergieron laminillas en buffer por 30 minutos.

Se retiraron de la fuente de calor y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos, dentro de la solución de desenmascaramiento.

Se lavaron las laminillas con agua destilada.

Se lavaron las laminillas con PBS pH 7.2-7.4.

2.2.18 Protocolo para Inmunohistoquímica

Se desenmascararon antígenos de acuerdo a protocolo.

2.2.18.1 Incubación con anticuerpo primario

Se incubaron los tejidos con 150 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (en agua) por 5-15 (10) minutos.

Se enjuagaron gentilmente con solución de lavado (Ver anexo I) y decantaron.

Se lavaron con solución de lavado por 5 minutos y decantaron.

Se bloquearon los tejidos con 150 μ l de solución de bloqueo (Ver anexo I) por 30 minutos.

Se decantó la solución de bloqueo sin enjuagar después.

Se incubaron los cortes histológicos con anticuerpo primario en buffer de incubación (Ver anexo I). Se dejaron toda la noche a 4 grados centígrados en una cámara húmeda.

Se decantó el buffer con el anticuerpo primario.

Se realizaron 3 lavados con solución de lavado de 5 minutos cada uno y decantaron las laminillas.

2.2.18.2 Incubación con anticuerpo secundario.

Se incubaron los tejidos con 150 μ l de anticuerpo secundario biotinilado por 30 minutos.

Se enjuagaron y realizaron lavados con solución de lavado, 3 veces, 5 minutos cada una.

Se decantó solución de lavado.

Se incubaron tejidos con 150 μ l de conjugado de estreptavidina-HRP por 30 minutos.

Se enjuagaron y lavaron 3 veces los tejidos con solución de lavado, de 2 minutos cada uno.

2.2.18.3 Revelado con cromógeno

Se añadieron 150 μ l de solución cromógeno DAB al tejido y dejar incubar por 3-20 minutos. Se detuvo la reacción (agregando un ml de PBS) al alcanzar una adecuada intensidad de señal.

Se enjuagaron las laminillas con solución de lavado 3 veces, 10 minutos cada una.

Se enjuagaron laminillas con agua bidestilada y decantó exceso de agua.

2.2.18.4 Contratación con hematoxilina

Se añadieron 150 µl de hematoxilina de Mayer y se detuvo la reacción a los 30 segundos.

Se aplicaron 2 gotas de medio de montar (Vectamount) y se cubrió con cubreobjetos esperando una hora a que se secaran.

Se observaron laminillas en microscopio de luz.

2.2.19 Microscopía Confocal

Se desparafinizaron cortes histológicos de acuerdo a protocolo para desparafinización de laminillas con Xileno.

Las laminillas fueron transportadas en agua destilada al microscopio confocal.

Se aplicaron 2 gotas de medio de montaje con DAPI sobre el tejido.

Se colocó un cubreobjetos sobre el tejido.

Se observaron las laminillas en el microscopio confocal.

2.2.20 Obtención de imágenes histológicas

Se adquirieron imágenes de los cortes histológicos utilizando el software Zen de Carl Zeiss.

Se eligieron 5 áreas al azar por corte histológico y se tomaron fotografías.

Las imágenes se convirtieron a formato .tiff y se exportaron para su análisis.

2.2.21 Análisis y procesamiento de imágenes

2.2.21.1 GIMP2

Se cargaron las imágenes de los cortes secuenciales con distintos marcadores a un mismo archivo en diferentes capas.

Se alinearon las imágenes.

Se seleccionó la señal positiva del cromógeno y se le asignó un color falso (rojo para iNOS, verde para Arginasa-1, y azul para CD3).

Se agregaron las 3 capas con colores falsos a una sola capa.

Se formó y exportó el mapa de colores falsos para el estudio de los granulomas.

2.2.22 ELISA para IL-1 β

Se llevaron todos los reactivos a temperatura ambiente.

Se reconstituyó el kit de control con 1 ml de agua destilada.

Se llevó el buffer de lavado (incluido en kit) a temperatura ambiente y se agregaron 20 ml de buffer a 480 ml de agua destilada.

Se reconstituyó el estándar de IL-1 β con 5 ml de calibrador diluyente RD516 (incluido en kit) y se dejó reposar por 5 minutos.

Se pipetearon 200 μ l de diluyente de calibrador en 6 tubos.

Se tomaron 200 μ l de estándar y se realizaron diluciones seriadas 1:2.

Se agregó 50 µl de diluyente de ensayo RD1N (incluido en kit) a cada uno de los pozos de la placa.

Se añadieron 50 µl de la muestra, estándar o control a cada uno de los pozos de la placa.

Se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente, cubriéndola con el plástico incluido en el kit.

Se decantó el líquido de las placas y se realizaron 5 lavados con solución de lavado.

Se decantó la placa después del último lavado.

Se agregaron 100 µl de conjugado de IL-1β a cada uno de los pozos

Se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente, cubriéndola con el plástico incluido en el kit.

Se decantó la placa y se realizaron 5 lavados con solución de lavado.

Se preparó la solución de sustrato (incluida en kit) a una relación 1:1 antes de su uso.

Se agregaron 100 µl de solución sustrato a cada pozo.

Se incubó placa por media hora a temperatura ambiente.

Se agregaron 100 µl de solución de Stop (incluida en kit) en el momento en que se dejó de distinguir una diferencia en la intensidad de señal en las dos concentraciones más altas del control y que todavía se alcanzara a diferenciar la tercera concentración superior.

Se realizó lectura con lector de placas con filtro a λ 450 nm en menos de media hora.

2.2.23 ELISA para IgG contra extracto crudo de *N. brasiliensis*

Se pipetearon 100 µl de extracto crudo de *N. brasiliensis* a cada pozo de una placa de 96 pozos.

Se cubrió la placa con plástico.

Se dejó incubando durante la noche a 4°C.

Se prepararon diluciones 1:8 de las muestras en PBS.

Se decantó el extracto crudo de *N. brasiliensis*.

Se hicieron 3 lavados con solución de lavado (Ver anexo I).

Se decantó la solución de lavado

Se pipetearon 300 µl de solución de bloqueo (Ver anexo I) a cada uno de los pozos.

Se cubrió la placa con plástico.

Se dejó incubando a 37°C por una hora.

Se decantó la solución de bloqueo.

Se aplicaron 100 µl de cada una de las muestras en las columnas 1, 5 y 9.

Se hicieron diluciones seriadas 1:2 en el resto de las columnas hasta tener diluciones 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64, en un volumen final de 100 µl/pozo.

Se cubrió la placa con plástico.

Se dejó incubando el anticuerpo a 37°C por una hora.

Se hicieron 3 lavados con solución de lavado.

Se decantó la solución de lavado.

Se prepararon 10 ml de una solución con anticuerpo conjugado con HRP contra IgG de ratón en una dilución 1:500.

Se aplicaron 100 µl de la solución con anticuerpo conjugado a cada pozo.

Se cubrió la placa con plástico.

Se dejó incubando el anticuerpo a 37°C por una hora.

Se hicieron 3 lavados con solución de lavado.

Se decantó la solución de lavado.

Se agregaron 160 μl de solución sustrato/cromógeno ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{OPD}$) y se incubó hasta que las dos concentraciones mayores alcanzaran la misma intensidad de señal y la tercera concentración más alta fuera claramente distinguible todavía.

Se detuvo la reacción agregando 40 μl ácido sulfúrico 1N a cada pozo.

Se realizó la lectura de la placa a λ 492 nm.

2.2.24 Análisis estadístico de experimentos

Se utilizó Excel de Microsoft Office para el análisis estadístico. Se realizaron pruebas de T de Student no pareadas y pareadas para analizar las diferencias de peso intra-grupo e inter-grupo respectivamente.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Determinación de dosis infecciosa de *N. brasiliensis*/desarrollo del modelo

Inoculamos grupos de 2 ratones con concentraciones de NbGFP de 10^6 hasta 10^{10} UFC y observamos que los ratones que recibieron 10^6 UFC, una concentración utilizada por otros investigadores, no presentaban pérdida de peso. Los ratones que recibieron 10^{10} UFC murieron en las primeras 24 horas. Los ratones que recibieron 10^8 y 10^9 tuvieron una pérdida de peso moderada razón por la cual decidimos trabajar con ambas concentraciones.

Grupos de 10 ratones fueron inoculados con 10^8 y 10^9 UFC y fueron monitoreados durante 21 días. La mayoría de los ratones que recibieron la dosis de 10^9 UFC perdieron más del 20% de su peso 48 horas post-infección sin recuperación para el cuarto día, razón por la cual tuvieron que ser sacrificados de acuerdo a las normas de manejo adecuado de animales en experimentación [**Figura 1**]. Los ratones que recibieron 10^8 UFC tuvieron una pérdida de peso inicial del $\approx 12\%$ con una recuperación casi completa para el cuarto día post-infección y mantuvieron un peso adecuado hasta el día 21 [**Figura 1**].

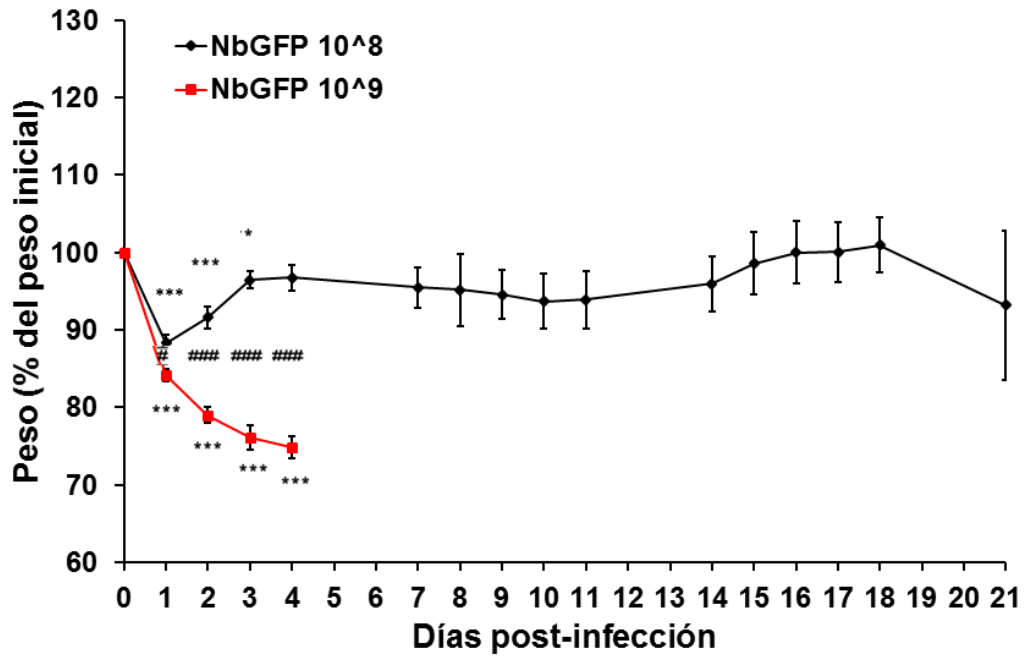


Figura 1. Infección 10⁸ vs 10⁹ UFC. Gráfica de peso. Ratones BALB/c. N=10 por grupo. Experimento único. Barras de error – S.E.M. p<0.05 *, p<0.01 **, p<0.001 *** (Intra-grupo)/p<0.05[#], p<0.001^{###} (Inter-grupo)

Los pulmones de los ratones fueron extraídos, inflados con una solución fijadora de formaldehído al 4% en PBS, sumergidos en esta misma por 48 horas y se tomaron imágenes en el fotodocumentador. Los pulmones de los ratones que recibieron la dosis más alta tenían un gran número de lesiones, visualizados como puntos blancos [Figura 2A y B], mientras que los ratones que recibieron la dosis baja tenían un menor número de lesiones (flechas blancas) [Figura 2 C y D].

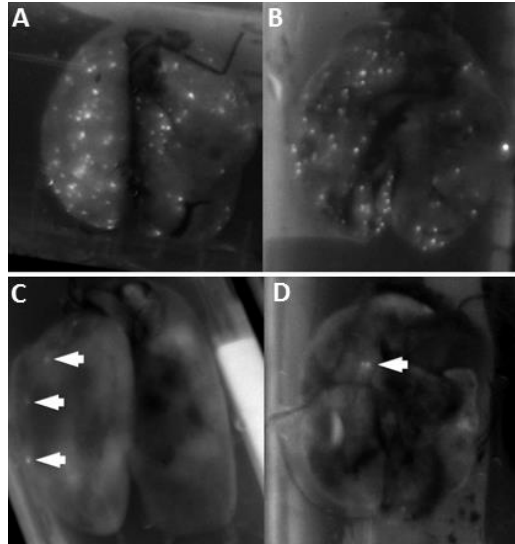


Figura 2. Infección 10^8 vs 10^9 UFC. Imágenes de fotodocumentador

Al realizar el análisis histopatológico de los pulmones al día 4, identificamos un gran número de lesiones que consistían de un gránulo central de NbGFP teñido de rosa por la fuscina, rodeado de un infiltrado inflamatorio teñido en azul [Figura 3 A y B]. Al analizar los pulmones de los ratones al día 21 se observó la misma estructura con una mejor organización, pudiéndose distinguir el gránulo interno de NbGFP, rodeada de PMN, macrófagos epitelioides y linfocitos [Figura 3 C y D].

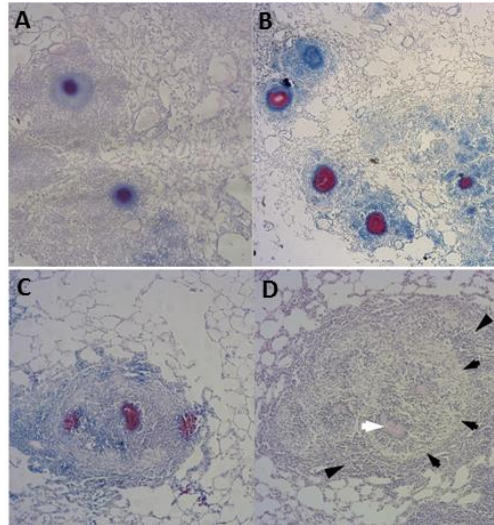


Figura 3. Histopatología de lesiones pulmonares. Gránulo de Nocardia (flecha blanca), macrófagos (flechas negras), linfocitos (cabezas de flechas)

3.2 Ensayos de protección frente a exposición secundaria

Una vez determinada la dosis infecciosa para inducir una enfermedad pulmonar granulomatosa decidimos explorar la protección de una primera exposición contra una segunda frente al mismo patógeno. Para esto tuvimos 2 grupos de ratones, un grupo que en la primera exposición instilamos la dosis baja (10^8 UFC) de NbGFP y un grupo control que recibió solución salina estéril; ambos grupos fueron monitoreados durante 21 días y fueron retados por segunda ocasión con la dosis alta (10^9) de NbGFP y monitoreados por 7 días. Al término del protocolo fueron sacrificados y se obtuvieron los pulmones para fijarlos, tomar imágenes con el fotodocumentador y valoración histopatológica.

Los ratones que recibieron la solución salina no perdieron peso, mientras que el grupo que recibió la dosis baja perdieron un 5% de peso el cual fue recuperado rápidamente para el tercer día post-infección, un comportamiento distinto al observado en el experimento previo. El peso de ambos grupos fue normalizado a 100% al día 21 y

después del segundo reto ambos grupos perdieron cerca del 18% al segundo día con una recuperación casi completa para el séptimo día post-infección. No hubo ninguna diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto a la pérdida de peso después del segundo reto [Figura 4].

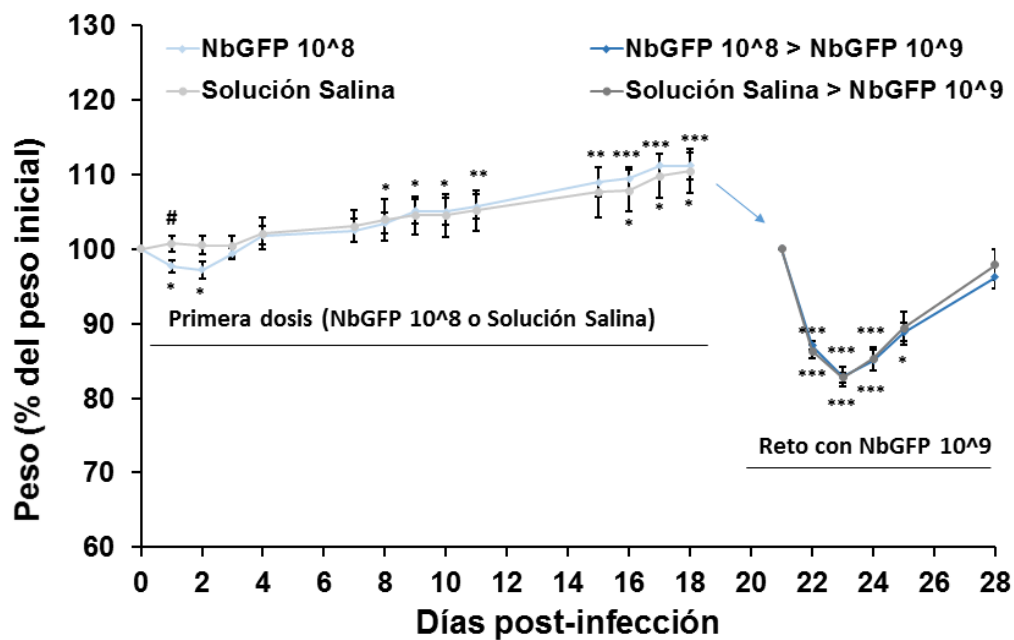
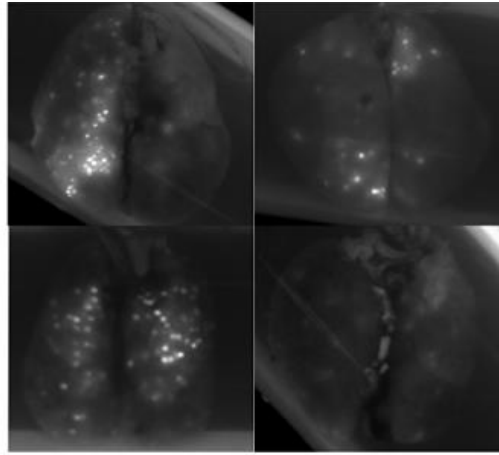


Figura 4. Ensayo de protección. Ratones BALB/c. N=5 por grupo. Barras de error – S.E.M. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** (Intra-grupo)/ $p < 0.05$ # (Inter-grupo)

Observamos las mismas lesiones del experimento previo en los cortes histológicos [Figura 5]. Al analizar las imágenes, observamos que los ratones que habían sido previamente expuestos a la bacteria, tenían un menor número de lesiones en comparación con los de primera exposición, 30 y 60 lesiones por ratón, respectivamente [Figura 6].



Solución Salina > NbGFP 10⁹ NbGFP 10⁸ > NbGFP 10⁹

Figura 5. Imágenes de fotodocumentador de ensayo de protección. Ratones BALB/c

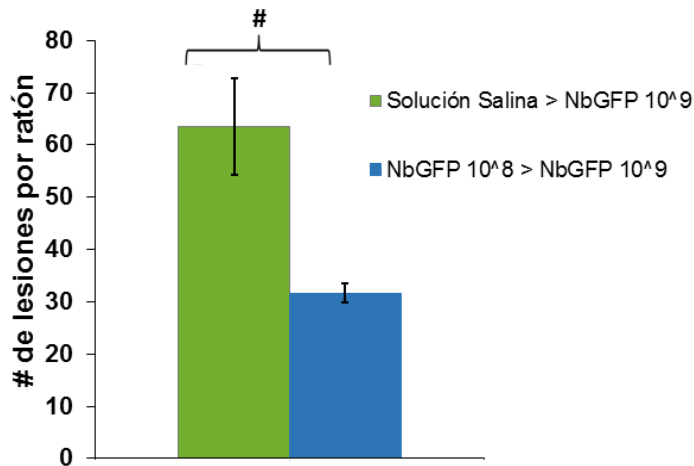


Figura 6. Promedio de lesiones por ratón.

La distinta respuesta frente a la dosis baja de NbGFP nos hizo cuestionarnos si otras variables pudieran estar influyendo en la respuesta. Beaman previamente demostró que la respuesta a la infección era distinta entre cepas de ratones crecidos en condiciones normales y aquellos libres de patógenos específicos. Dado que la pérdida de peso dentro de los distintos grupos fue muy heterogénea decidimos realizar un segundo ensayo de protección utilizando ratones libres de patógenos para tener un mejor control de las

condiciones experimentales y del estado de higiene de los ratones. Los ratones que recibieron la dosis baja tuvieron el comportamiento observado en el primer experimento, una pérdida de peso del $\approx 10\%$ en las primeras 24 horas con recuperación casi completa para el día 3 post-infección, mientras que el grupo control no perdió peso en esta primera fase. Después de la segunda exposición ambos grupos tuvieron una pérdida de peso de más del 20% al tercer día post-exposición sin observar diferencias en pérdida de peso en ambos grupos y sin datos de recuperación para el cuarto día, razón por la cual sacrificamos a los animales a tiempos tempranos [Figura 7].

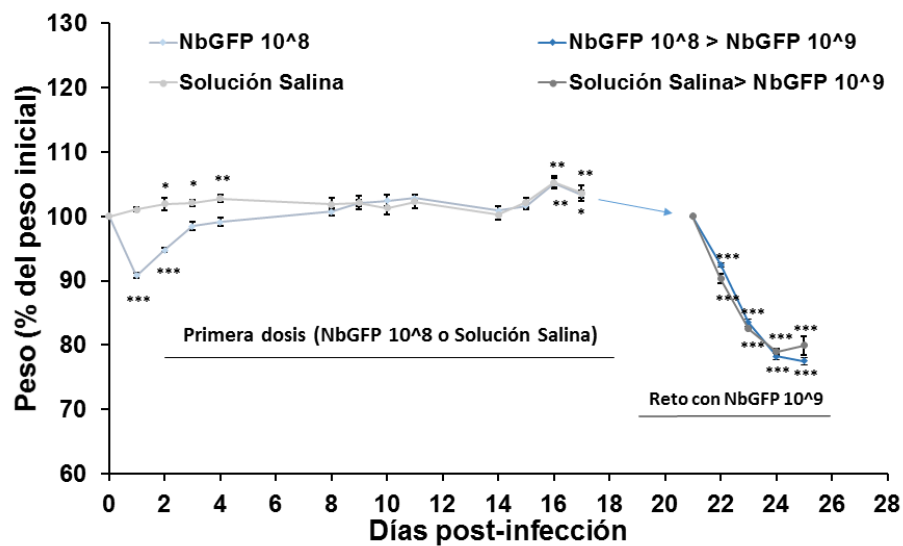


Figura 7. Ensayo de protección. Ratones BALB/c spf. N=5 por grupo. Barras de error – S.E.M. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** (Intra-grupo)/ $p < 0.05$ [#] (Inter-grupo)

Observamos el mismo hallazgo del experimento previo en el fotodocumentador; los ratones previamente expuestos tenían un menor número de lesiones que aquellos que

se enfrentaron por primera vez a la bacteria, 35 vs 60 lesiones por ratón y esta diferencia fue estadísticamente significativa [Figura 8 y 9].

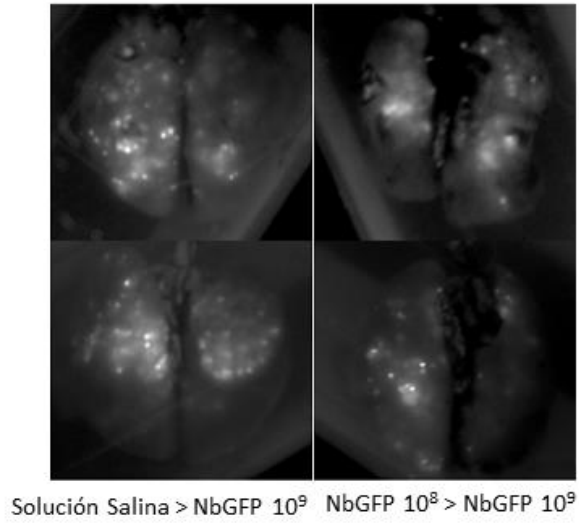


Figura 8. Imágenes de fotodocumentador de ensayo de protección. Ratones BALB/c spf.

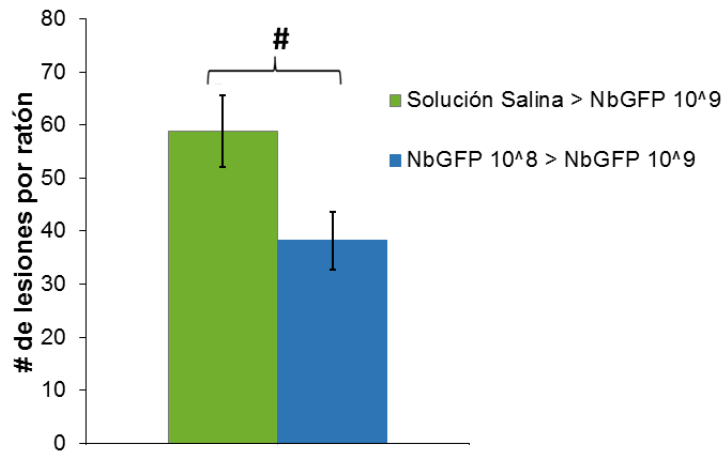


Figura 9. Promedio de lesiones por ratón. Ratones BALB/c spf

3.3 Identificación del blanco infeccioso

Debido a que se ha descrito previamente que los macrófagos alveolares son el blanco en nocardiosis pulmonar, decidimos estudiar la capacidad infectiva de la bacteria en distintas poblaciones celulares. Para esto, hicimos un co-cultivo de macrófagos alveolares o de macrófagos derivados de médula ósea con NbGFP a MOI de 1:1 y 1:50 e instilamos intranasalmente 10^9 UFC de NbGFP a un grupo de ratones para obtener fluido de lavado bronquioalveolar. Los macrófagos derivados de médula ósea fagocitaban a la bacteria en las primeras 2 horas y para las 48 horas observamos crecimiento intracelular de la bacteria [Figura 10]. Los macrófagos alveolares no fagocitaron a la bacteria, y por lo tanto tampoco se observó ningún crecimiento a tiempos tardíos. Al valorar el fluido de BAL tampoco se observó la presencia de NbGFP dentro de los macrófagos alveolares y únicamente se observó un reclutamiento importante de PMN [Figura 10].

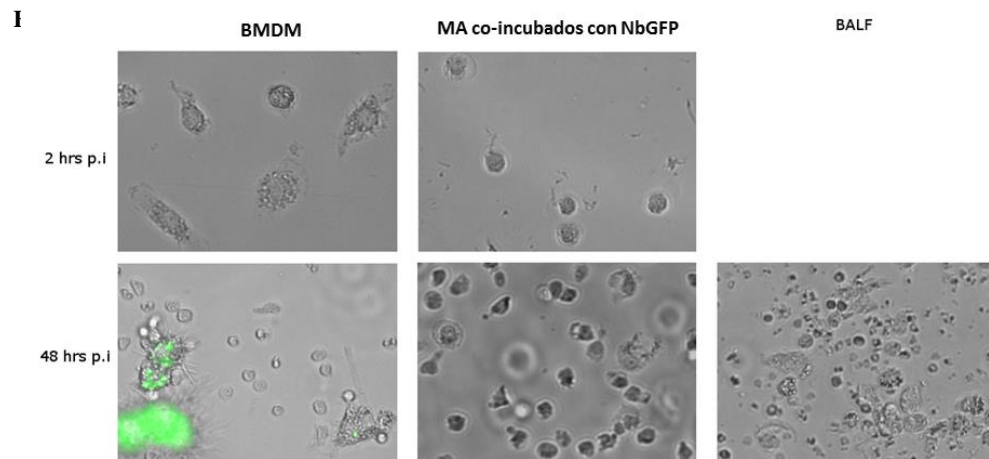


Figura 10. Co-cultivo de NbGFP con macrófagos alveolares o macrófagos derivados de médula ósea.

Decidimos estudiar otras poblaciones celulares para detectar si estaban siendo infectados, entre ellas neutrófilos, eosinófilos y valorar nuevamente los macrófagos alveolares, pero en esta ocasión por citometría de flujo. Nuevamente no se detectó señal de GFP en los macrófagos alveolares, y al analizar la población de eosinófilos tampoco se observó positividad para CCR3 y GFP [Figura 11]. Al analizar a los neutrófilos observamos que a las 24 horas un gran número de eran positivos para GFP y que esta positividad disminuía a las 48 horas, hablándonos de un adecuado proceso de eliminación por fagocitosis [Figura 11].

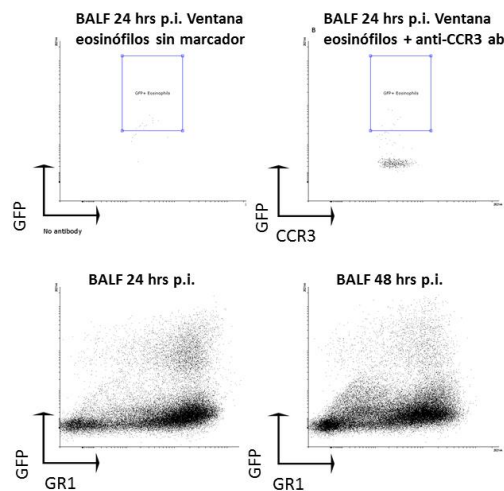


Figura 11. Citometría de flujo de BALF.

3.4 Identificación de microcolonias a tiempos tempranos

Después de haber descartado un blanco infeccioso, decidimos valorar nuevamente los cortes histológicos de los experimentos previos. Al momento de analizar laminillas de pulmones de ratones que fueron sacrificados a tiempos tempranos, encontramos la presencia de microcolonias de NbGFP a las 24 horas [Figura 12].

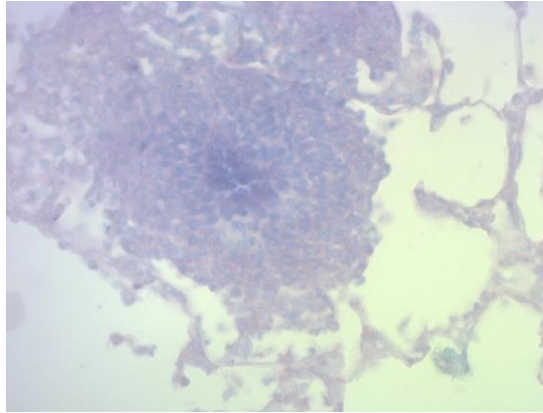


Figura 12. Tinción de Kinyoun. Microcolonia de NbGFP a las 24 hora s post-infección

Esto fue un hallazgo inesperado ya que al momento de preparar el inóculo no observamos agregados bacterianos, y el tamaño de las colonias era incompatible con el tiempo de duplicación de NbGFP, el cual es de aproximadamente 8 horas [Figura 13].

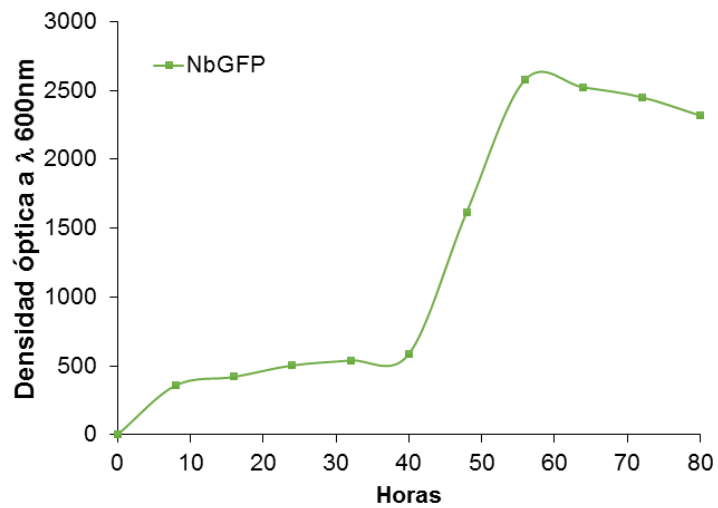


Figura 13. Curva de crecimiento de NbGFP.

Para confirmar que estos agregados se encontraban de forma inicial en el inóculo decidimos infectar un grupo de ratones y obtener los pulmones a las 6 horas tras la

infección. Se realizaron cortes histológicos y en esta ocasión fueron contrateñidos con DAPI para ser valorados en un microscopio confocal, en el cual pudimos detectar la presencia de estas microcolonias a tiempos muy tempranos [**Figura 14**].

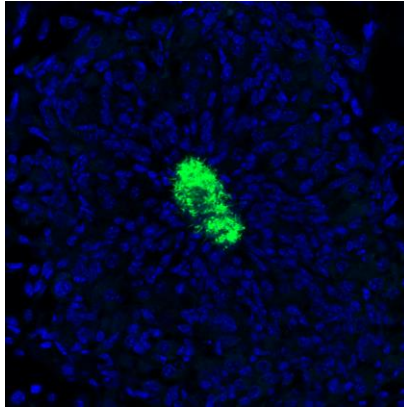


Figura 14. Microcolonia de NbGFP. Azul, DAPI (Núcleos), verde (NbGFP).

3.5 Bacterias unicelulares contra microcolonias

Una vez que observamos estos agregados en el inóculo, nos preguntamos si estos serían los responsables de causar las lesiones a nivel pulmonar. Lo primero que decidimos hacer fue agregar un paso más a la preparación del inóculo, pasando el homogenizado a través de un filtro de 4 μm de tamaño de poro y separando dos fracciones, los agregados bacterianos que se quedaron en las paredes del filtro y el filtrado, el cual consistía de únicamente bacterias unicelulares [**Figura 15**].

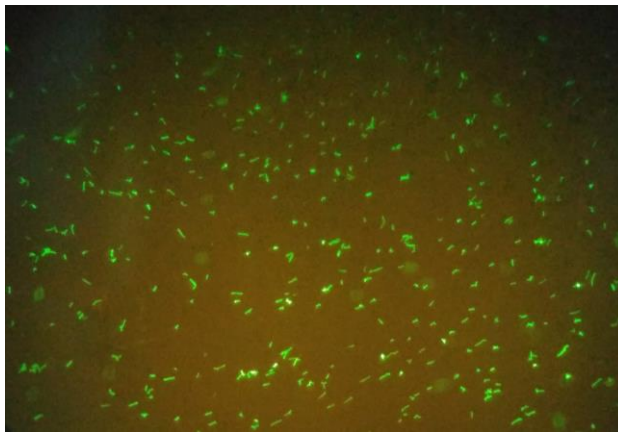


Figura 15. Suspensión unicelular de NbGFP. Microscopio UV, 40x.

Los ratones que recibieron las bacterias unicelulares perdieron peso de una forma similar a su grupo control que recibió la dosis alta del homogenizado, sin embargo, tuvieron una recuperación de peso más rápida que este último [Figura 16]. Observamos que los ratones que recibieron las bacterias unicelulares no desarrollaron lesiones pulmonares, en comparación con los ratones que recibieron al inóculo no filtrado [Figura 17].

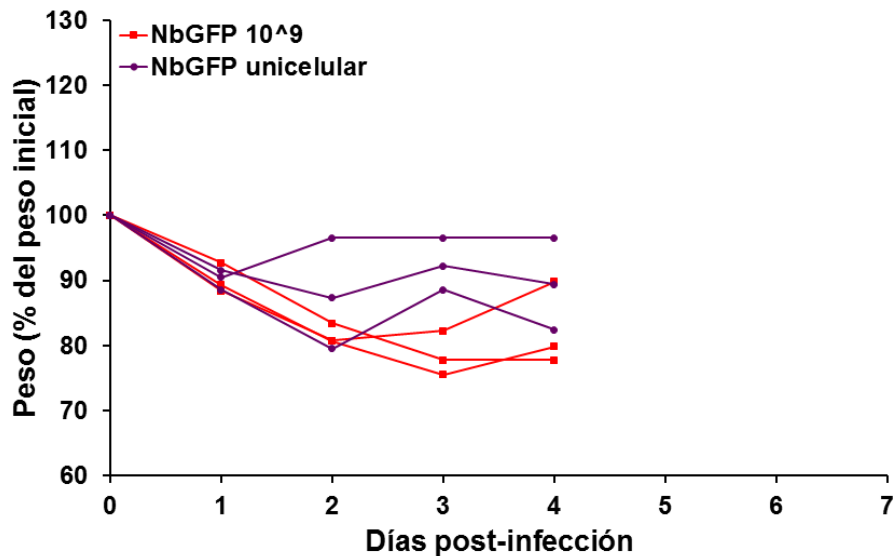


Figura 16. 10⁹ UFC vs 10⁹ unicelulares. Gráfica de pesos. N=3 por grupo. Experimento único.

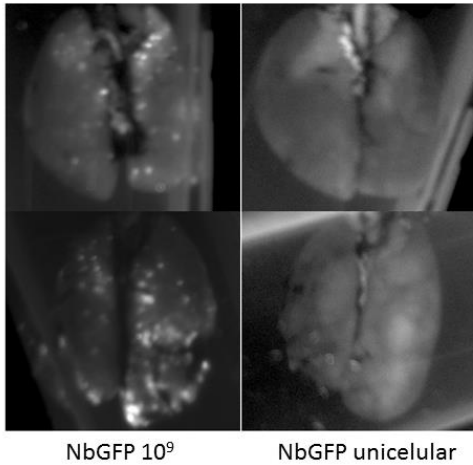


Figura 17. 10^9 UFC vs 10^9 unicelulares. Imágenes de fotodocumentador. Imágenes representativas de experimento único.

Los ratones que recibieron el inóculo de microcolonias recuperadas del filtro tuvieron una pérdida de peso mínima en comparación con el grupo que recibió la dosis alta del homogenizado [Figura 18]. Observamos lesiones a nivel pulmonar en menor cantidad que en los ratones que recibieron la dosis alta del homogenizado [Figura 19].

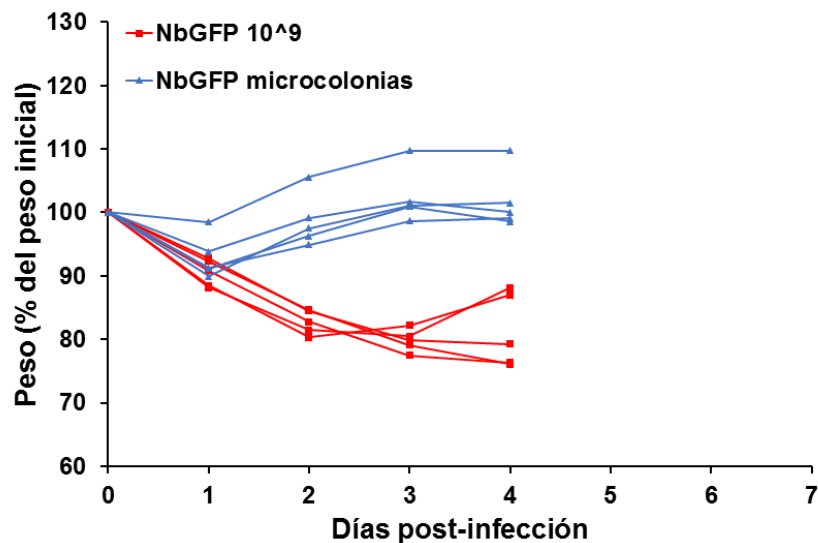


Figura 18. 10^9 UFC vs Microcolonias recuperadas de filtro. N=5 ratones por grupo. Experimento único.

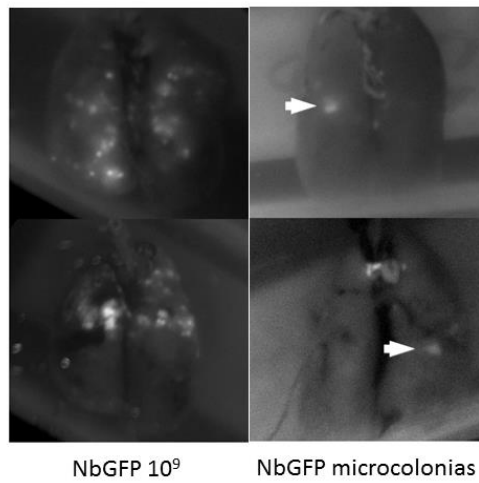


Figura 19. 10^9 UFC vs microcolonias NbGFP. Imágenes de fotodocumentador. Imágenes representativas de experimento único.

Observamos las mismas lesiones granulomatosas que consisten de un gránulo de nocardia central, rodeado de un infiltrado inflamatorio de consta de PMN, macrófagos epitelioides y un halo de linfocitos rodeando la estructura [**Figura 20**].

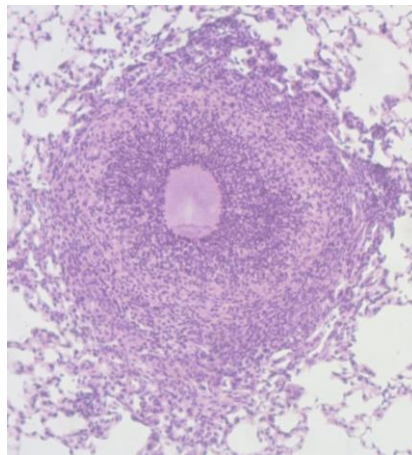


Figura 20. Histopatología de lesión pulmonar. HyE. Imagen representativa de experimento único.

3.6 Crecimiento de microcolonias

Una vez que confirmamos que las microcolonias son las responsables de producir la enfermedad pulmonar granulomatosa por sí solas, procedimos a refinar el método para obtención de éstas. Las microcolonias recuperadas del filtro eran de diversos tamaños y formas por lo cual no eran adecuadas para realizar un análisis histopatológico. Primero intentamos separar las microcolonias de acuerdo a su tamaño por medio de centrifugación por gradiente, sin embargo, no pudieron ser separadas por este método. Después intentamos crecer las colonias desde bacterias unicelulares resembradas en medio BHI e incubándolas varios días hasta observar la formación de colonias. Recuperamos microcolonias a las 48 y 60 horas las cuáles tenían un diámetro de $\approx 30 \mu\text{m}$ y $\approx 50 \mu\text{m}$ de diámetro respectivamente [Figura 21].

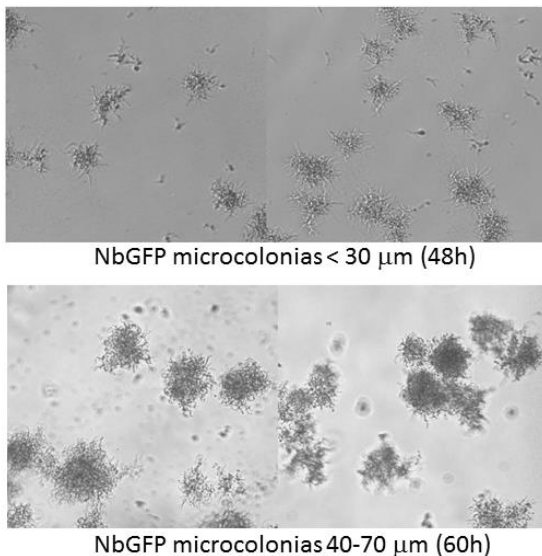


Figura 21. Microcolonias crecidas desde unicelulares.

Dos grupos de ratones recibieron uno de los dos tamaños de microcolonias vía intranasal y fueron monitoreados durante 7 días. Ambos grupos tuvieron una pérdida de peso menor al 10% en las primeras 24 horas con recuperación casi completa al finalizar el estudio [Figura 22]. Al analizar los pulmones en el fotodocumentador no se detectaron lesiones en los ratones que recibieron las microcolonias de $\approx 30 \mu\text{m}$ en comparación con el grupo que recibió las colonias de $\approx 50 \mu\text{m}$ que si desarrollaron lesiones pulmonares [Figura 23].

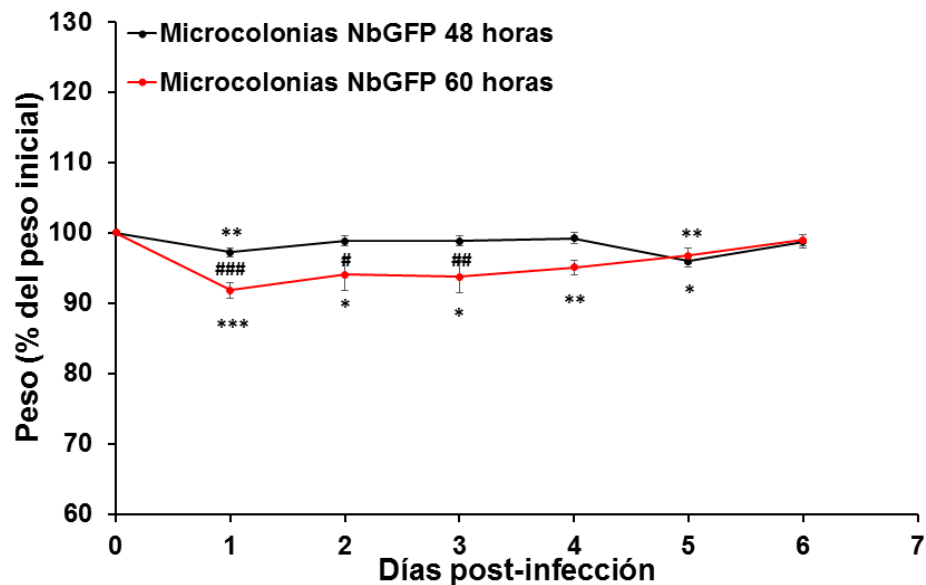


Figura 22. Microcolonias desde unicelulares, 48 horas vs 60 horas. Gráfica de pesos. Ratones BALB/c spf. N=10 por grupo. Único experimento. Barras de error – SEM. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** (Intra-grupo)/ $p < 0.05$ #, $p < 0.01$ ##, $p < 0.001$ ### (Inter-grupo)

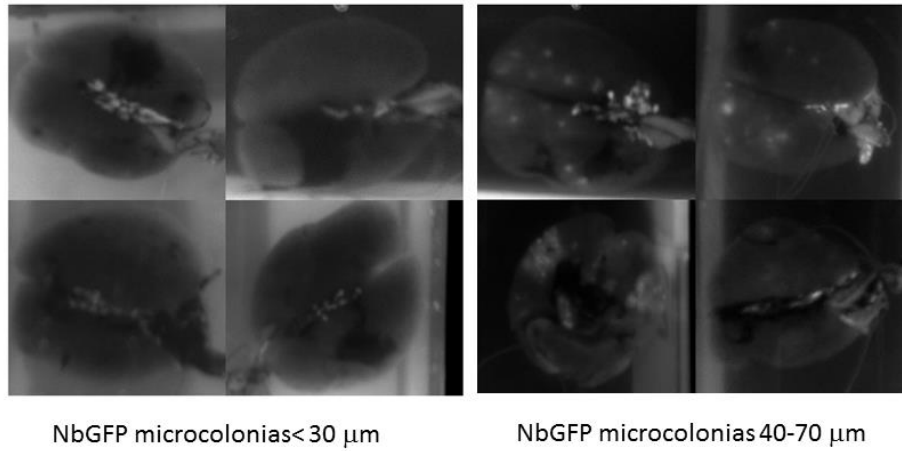


Figura 23. Microcolonias desde unicelulares, 48 horas vs 60 horas. Imágenes de fotodocumentador. Imágenes representativas de experimento único.

3.7 Infección en ratones C57BL/6

Después de refinar el método para obtener las microcolonias decidimos valorar si se observa esta misma respuesta frente a las microcolonias en otra cepa de ratones. Debido a que muchos de los ratones KO para distintos genes se desarrollan en ratones C57BL/6, decidimos utilizar esta cepa para probar el modelo experimental de nocardiosis pulmonar. Crecimos colonias desde unicelulares hasta alcanzar un tamaño de $\approx 50 \mu\text{m}$ de diámetro e infectamos a un grupo de ratones C57BL/6 y un grupo de ratones BALB/c como control con 100 microcolonias.

La pérdida de peso fue mínima en ambos grupos y mantuvieron su peso inicial durante el transcurso del ensayo [Figura 24]. Al analizar los pulmones de ambos grupos en el fotodocumentador se observaron aproximadamente 10 lesiones por ratón sin diferencia en número de lesiones entre ambos grupos [Figura 25].

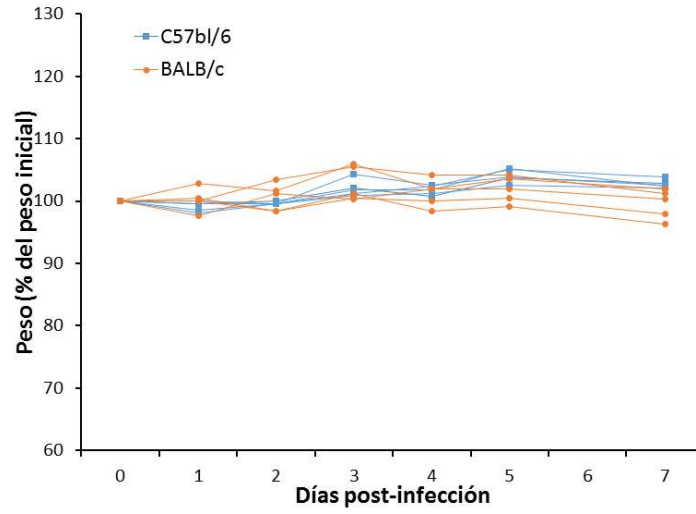


Figura 24. Microcolonias NbGFP en ratones BALB/c vs C57BL/6. N=5 ratones. Experimento único.

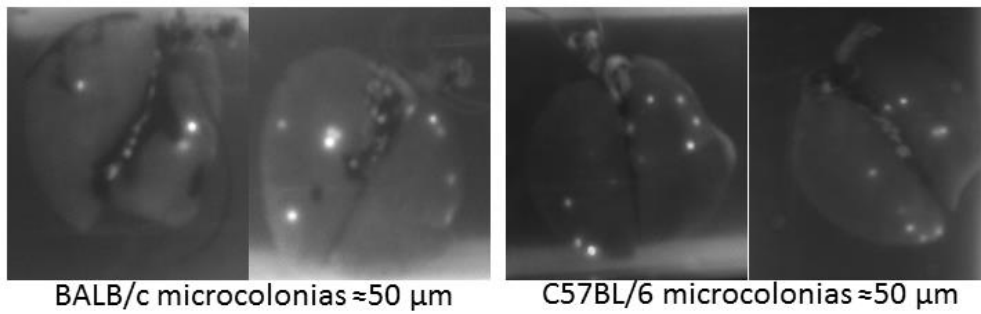


Figura 25. Microcolonias NbGFP en ratones BALB/c vs C57BL/6. Imágenes de fotodocumentador. Imágenes representativas de experimento único.

3.8 Estudio de la respuesta inmune local contra *N. brasiliensis*

Para el estudio de la respuesta inmune local primero decidimos confirmar si la pérdida de peso inicial se debía a una respuesta inflamatoria inicial y no a la infección *per se*. Para esto, preparamos el inóculo homogenizado de 10^9 UFC en dos viales y uno de ellos matamos a la bacteria por calor en autoclave. Ambos grupos tuvieron una pérdida de peso similar en las primeras 24 horas, pero el grupo que recibió la bacteria muerta por calor presentó una recuperación más rápida comparada con la del grupo que recibió el inóculo con bacterias vivas [Figura 26].

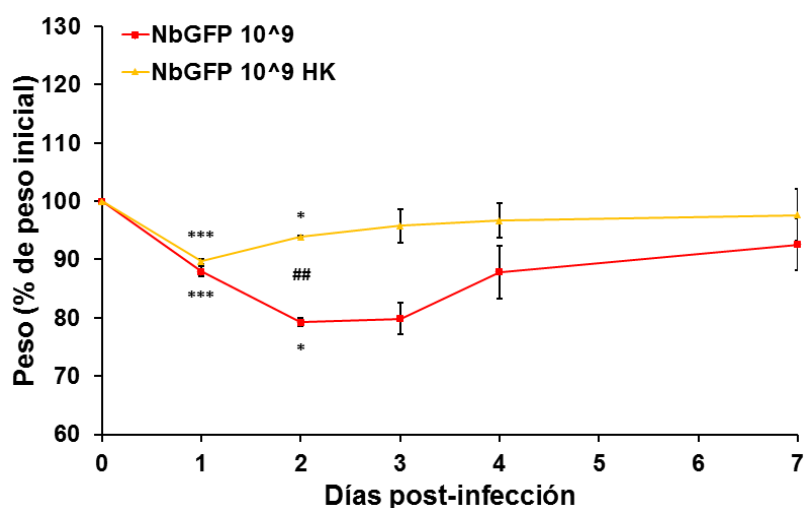


Figura 26. 10^9 vs 10^9 UFC HK. Ratones BALB/c spf. N=6 por grupo. Barras de error – S.E.M. $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ *** (Intra-grupo)/ $p < 0.01$ ##, (Inter-grupo)

Al analizar los pulmones de los ratones que recibieron a la bacteria muerta por calor no se detectaron lesiones a las 6, 24 horas ni 7 días después de la infección [Figura 27].

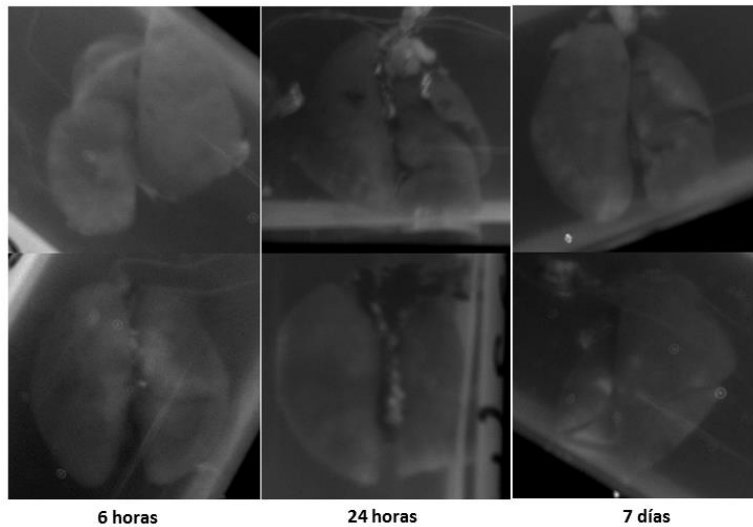


Figura 27. 10^9 vs 10^8 UFC HK. Imágenes de fotodocumentador. Imágenes representativas de experimento único.

Después de confirmar que la pérdida de peso inicial se debía a los componentes bacterianos y no a la infección, decidimos confirmar que la diferencia en la pérdida de peso entre los ratones que recibieron 10^8 y 10^9 UFC era debida a la magnitud de la respuesta inflamatoria. Para esto, infectamos a dos grupos de ratones BALB/c con concentración distinta cada uno. Los ratones fueron sacrificados a las 24 y 48 horas para obtener fluido de BAL para el estudio de poblaciones celulares, concentración de IL-1 β y proteínas como parámetro de respuesta inflamatoria, al igual que determinación de IL-1 β en suero de los ratones.

La pérdida de peso de los ratones en las primeras 48 horas fue la esperada de acuerdo a la observada en el primer experimento [**Figura 28**]. Los niveles de IL-1 β en los ratones que recibieron la dosis alta eran 7 veces mayores que los que recibieron la dosis baja a las 24 horas, y a las 48 horas los niveles eran indetectables en los ratones que recibieron la dosis baja y se encontraban aún elevados en el grupo que recibió la

dosis alta [Figura 29]. Las concentraciones de proteína en BAL eran casi el doble en los ratones que recibieron la dosis alta en comparación con el grupo de dosis baja a las 24 y 48 horas [Figura 30]. Los niveles de IL-1 β en suero fueron indetectables en ambos grupos.

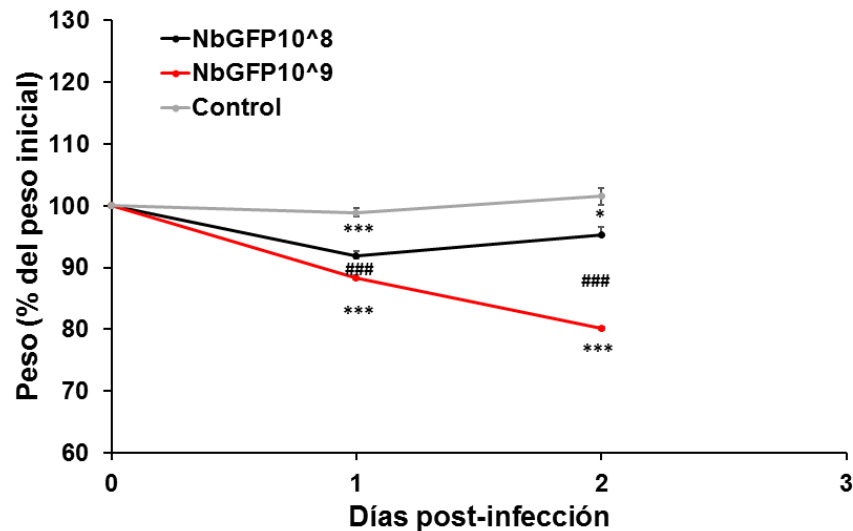


Figura 28. 10⁸ vs 10⁹ UFC. Ratones BALB/c spf. N=10 por grupo, N=4 control. Barras de error – S.E.M. p<0.05 *, p<0.01 **, p<0.001 *** (Intra-grupo)/p<0.05[#], p<0.01^{##}, p<0.001^{###} (Inter-grupo)

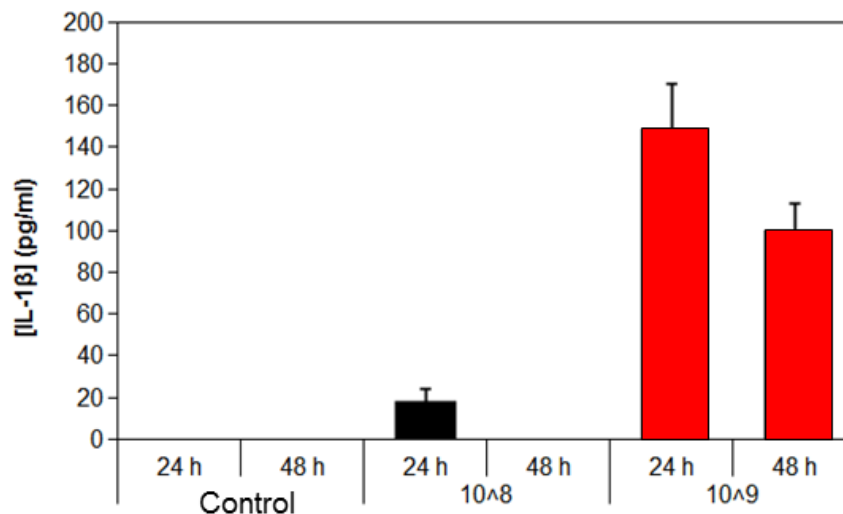


Figura 29. 10⁸ vs 10⁹ UFC. Determinación de IL-1 β en BALF. Ratones BALB/c spf. N=10 por grupo, N=4 control. Barras de error – S.E.M. p<0.05 *, p<0.01 **, p<0.001 *** (Intra-grupo)/p<0.05[#], p<0.01^{##}, p<0.001^{###} (Inter-grupo)

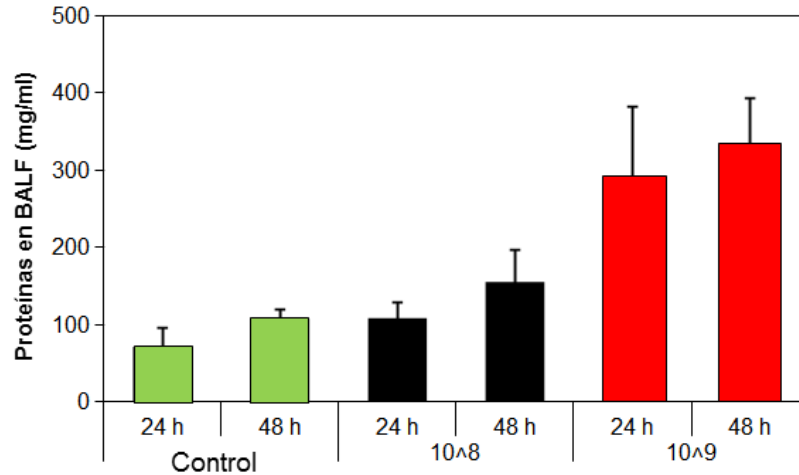


Figura 30. 10^8 vs 10^9 UFC. Determinación de proteínas en BALF. Ratones BALB/c spf. N=10 por grupo, N=4 control. Barras de error – S.E.M. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** (Intra-grupo)/ $p < 0.05$ [#], $p < 0.01$ ^{##}, $p < 0.001$ ^{###}(Inter-grupo)

Al analizar las muestras de BALF se observó un mayor número total de células a las 24 y 48 horas en los ratones que recibieron 10^9 UFC comparado con los que recibieron 10^8 UFC y el grupo control de solución salina [Figura 31A]. El tipo celular que fue reclutado en mayor número fueron neutrófilos y en menor proporción macrófagos en ambos grupos [Figura 31B].

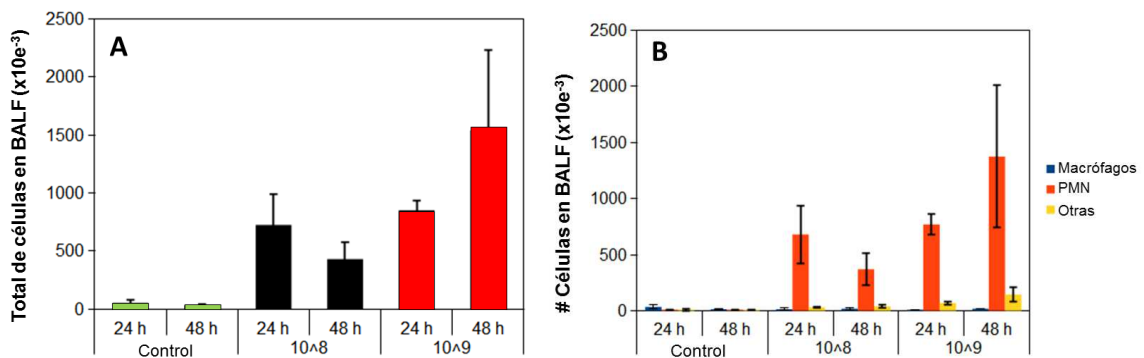


Figura 31. 10^8 vs 10^9 UFC. Citometría de flujo de BALF. Ratones BALB/c spf. N=10 por grupo, N=4 control. Barras de error – S.E.M. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** (Intra-grupo)/ $p < 0.05$ [#], $p < 0.01$ ^{##}, $p < 0.001$ ^{###}(Inter-grupo)

En cuanto al análisis histopatológico, decidimos realizar 4 cortes secuenciales de 5 μm de espesor de cada uno de los ratones que fueron sacrificados a los días 7, 21, 42 y se dejó un grupo de 5 ratones por tiempo indefinido para evaluar la evolución de la enfermedad. De este último grupo, dos ratones tuvieron que ser sacrificados a los 65 días, 1 a los 108 días y uno más a los 156 días post-infección, debido a una pérdida de peso importante sin datos de recuperación [Figura 32].

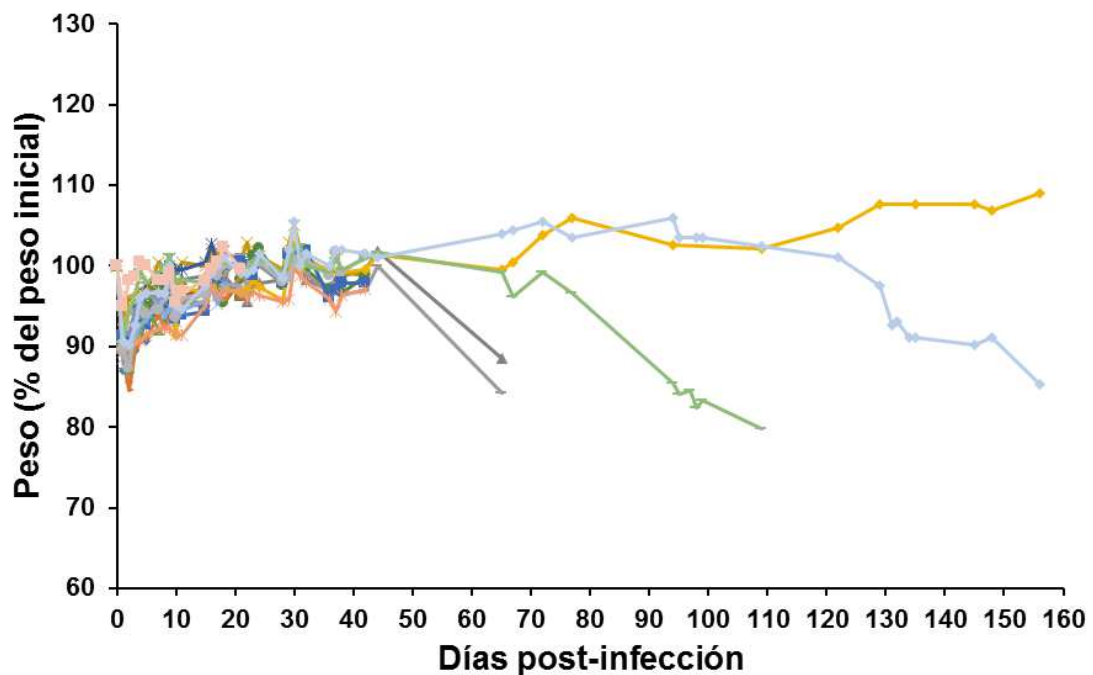


Figura 32. Microcolonias NbGFP. N = 5 ratones por grupo. Evolución de granuloma a día 7, 21, 42, y tiempo indefinido.

Para estudiar la evolución del granuloma realizamos marcajes por medio de inmunohistoquímica para iNOS, CD3 y arginasa-1 como marcadores de macrófagos M1, linfocitos T y macrófagos M2 respectivamente. Al día 7 post-infección se observaron las 3 señales de una manera desorganizada. Había un número importante de macrófagos M2, M1 y linfocitos dispersos por la lesión [Figura 33]. Al día 21 post-infección se

observó una mejor organización en la estructura del granuloma. Hubo un aumento en el número de macrófagos M1, una mayor dispersión en los macrófagos M2 en el centro del granuloma con presencia de un gran número de macrófagos espumosos, y una organización muy definida de los linfocitos T en la periferia de la lesión, y algunos dispersos en el área central [Figura 33]. Al día 42 post-infección comenzamos a detectar algunos cambios en la organización del granuloma. Hubo un mayor número de macrófagos espumosos al igual que una desorganización en la manga de linfocitos T rodeando el granuloma, con algunos segmentos muy engrosados y áreas muy delgadas de esta cápsula y los gránulos de *nocardia* de menor tamaño comparado con los dos primeros tiempos [Figura 33].

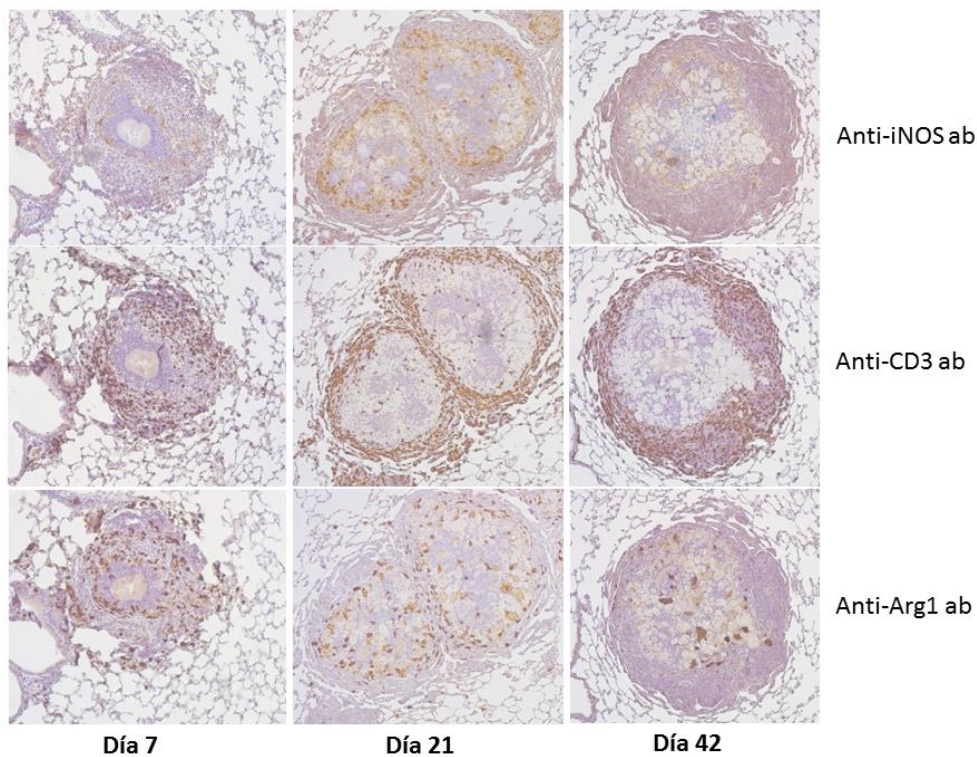


Figura 33. Inmunohistoquímica de evolución de granulomas pulmonares a los días 7, 21 y 42 post-infección. Marcaje para iNOS, CD3 y Arg-1. Imágenes representativas de experimento único.

Después procedimos a analizar la histopatología de los pulmones de ratones que fueron sacrificados por pérdida de control de la infección y pérdida de peso pronunciada. Al día 65 post-infección se observó una gran variedad de granulomas, algunos con aumento en la cantidad de macrófagos M2 en comparación con los macrófagos M1. Los linfocitos T seguían con una organización similar a los granulomas del día 42, áreas de engrosamiento del halo de linfocitos y áreas muy delgadas. Comenzamos a observar áreas con detritos cariorrécticos centrales con una capa de macrófagos espumosos rodeando el centro del granuloma [Figura 34 A-C]. Otro tipo de granulomas observados en este tiempo tenían un gran número de macrófagos M2 y espumosos con áreas de engrosadas y delgadas del halo de linfocitos T [Figura 34 D-F].

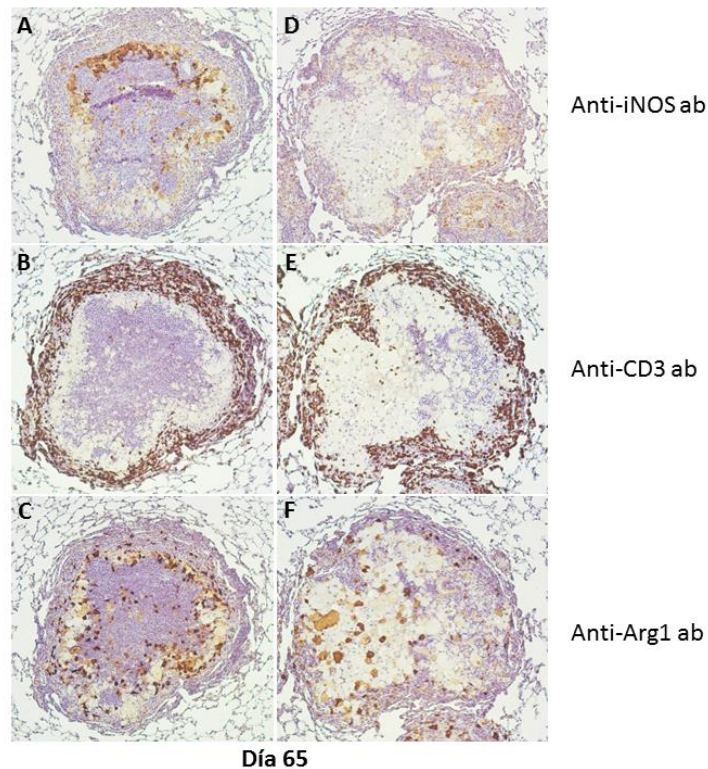


Figura 34. Inmunohistoquímica de evolución de granulomas pulmonares al día 65 post-infección. Marcaje para iNOS, CD3 y Arg-1. Imágenes representativas de experimento único.

Al día 108 post-infección hubo cambios importantes en la organización del granuloma. Una disminución importante de macrófagos M1 con un aumento de macrófagos M2, los gránulos de nocardia centrales se encontraban aumentados de tamaño en comparación con todos los días previos, y la cantidad de linfocitos T disminuyó considerablemente, hasta el punto de haber áreas en el halo sin linfocitos y el resto de los granulomas con una capa delgada de linfocitos T [Figura 35 A-C]. Al día 156 post-infección se observaron cambios similares en los granulomas con una gran variabilidad entre ellos aún dentro del mismo ratón. El tamaño del gránulo de *Nocardia* aumentó considerablemente, un tamaño similar al observado en el día 108, con una distribución poco organizada de linfocitos T en la periferia y predominancia de macrófagos M2 [Figura 35 D-F].

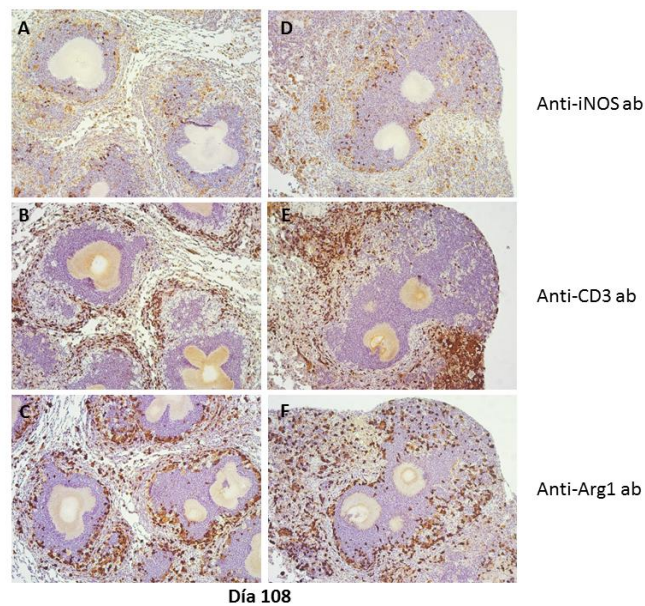


Figura 35. Inmunohistoquímica de evolución de granulomas pulmonares al día 108 post-infección. Marcaje para iNOS, CD3 y Arg-1. Imágenes representativas de experimento único.

Como parte del análisis de los granulomas decidimos seleccionar la señal positiva de cada corte y asignarle un color falso a cada una de las señales: color rojo a iNOS, verde a arginasa-1 y azul a CD3. Con este nuevo código de colores formamos un mapa de colores para valorar de una mejor forma la estructura de los granulomas a distintos tiempos [Figura 36].

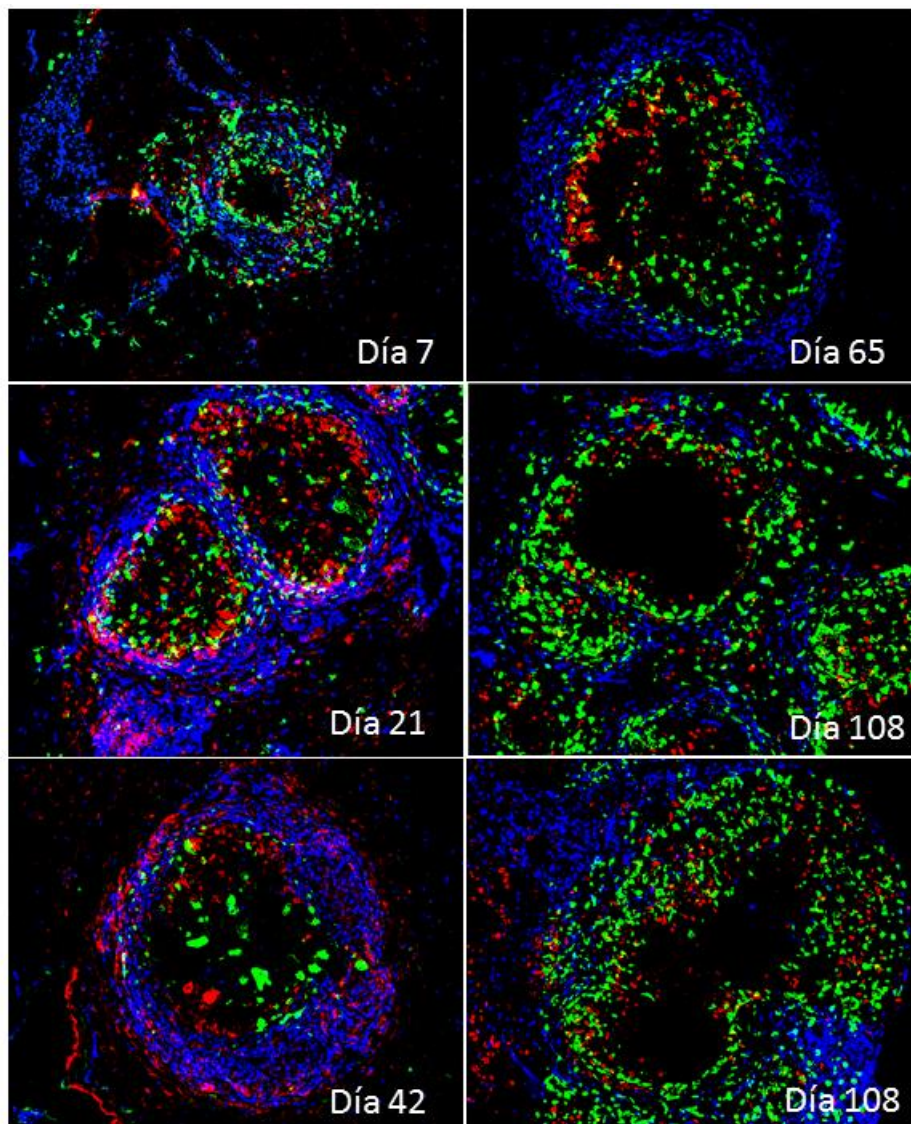


Figura 36. Mapa de colores falsos de Inmunohistoquímica. rojo (iNOS), azul (CD3) y verde (arg-1)

3.9 Estudio de la respuesta inmune humoral contra *N. brasiliensis*

Después de estudiar la respuesta inmune local contra la bacteria decidimos estudiar la respuesta inmune humoral contra el patógeno. Se había descrito previamente una respuesta inmune humoral adecuada contra *N. asteroides* sin embargo esta producción de anticuerpos no confería ninguna protección contra la enfermedad [26]. Utilizando el suero de los ratones que estudiamos a los 7, 21, 42, 65, 108 y 156 días post-infección, realizamos una determinación de anticuerpos IgG vs extracto crudo de *N. brasiliensis* por un ELISA indirecto. La producción de anticuerpos fue detectable desde el día 7 post-infección con aumento en los títulos de anticuerpos hasta el día 65. Los niveles de IgG fueron detectables hasta el día 156 post-infección [Figura 37].

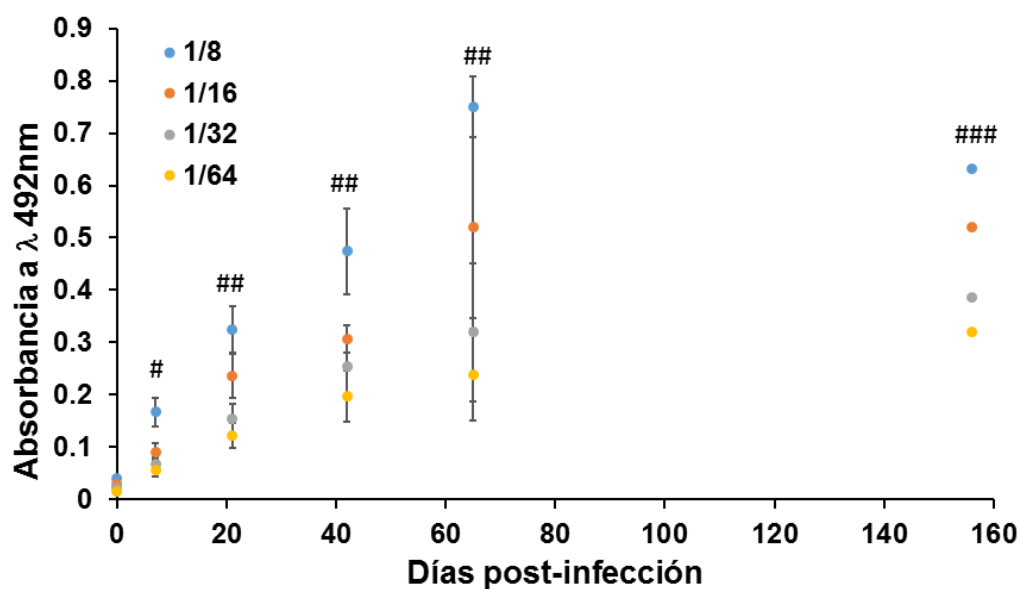


Figura 37. Titulación de anticuerpos IgG vs extracto crudo de *N. brasiliensis*

CAPITULO IV

DISCUSION

4.1 Modelos de nocardiosis pulmonar

Este es el primer modelo animal de nocardiosis pulmonar crónica granulomatosa descrito en la literatura. Modelos experimentales previos desarrollados por Beaman generaban una enfermedad aguda con mortalidad importante en los primeros 7 días [24-26]. De acuerdo a nuestro experimento sobre la respuesta inmune local, creemos que esta enfermedad aguda con alta mortalidad se podría deber a una respuesta inflamatoria inicial importante hacia los componentes bacterianos y no a una infección per se, como fue comprobado por nosotros en el experimento de bacterias muertas por calor.

Para nuestro modelo decidimos partir de la metodología utilizada por Beaman para la infección de los ratones. La decisión de instilar 10^8 y 10^9 UFC vía intranasal se tomó al momento de comprobar que la cantidad de UFC utilizada por otros investigadores no era suficiente para generar una respuesta en nuestros ratones. Esto podría deberse a la distinta cepa de *Nocardia* que utilizamos ya que Beaman utilizó en la mayoría de sus experimentos *N. cyriacigeorgica* [24-26]. Si bien *N. brasiliensis* no es la cepa que se aísla con mayor frecuencia de pacientes con nocardiosis pulmonar, si hay reportes de casos documentados de esta enfermedad por *N. brasiliensis* [31,32]. Otra diferencia importante fue la preparación del inóculo inicial. Beaman crecía sus cultivos

en agitación constante en medio BHI para evitar la formación de agregados mientras que nosotros esperábamos a que se formara una biopelícula para después disgregarla en un homogenizador de manera mecánica. Esta forma de crecer a la bacteria para preparar el inóculo había sido previamente descrita para obtener una suspensión unicelular de *N. brasiliensis* [30]. A nuestra sorpresa, nos dimos cuenta que el homogenizado no da una suspensión unicelular, sino una mezcla de unicelulares con agregados bacterianos o microcolonias. Si bien Beaman describía la formación de estos agregados al momento de recuperar las bacterias de los pulmones de los ratones y hacer conteo de UFC, nunca describió que la infección fuera ocasionada por los agregados únicamente y no por las bacterias en su forma unicelular [24]. Nosotros demostramos que la *N. brasiliensis* en su forma unicelular es incapaz de infectar células a nivel pulmonar y es incapaz de generar una infección pulmonar granulomatosa, sin embargo, si es capaz de inducir la misma pérdida de peso inicial que aquellos ratones que recibieron el inóculo homogenizado completo.

En los ensayos realizados por Beaman et al, *N. cyriacigeorgica* tenía la capacidad de ser fagocitada por macrófagos alveolares y crecer dentro de ellos. En nuestro modelo comprobamos que los macrófagos alveolares de ratones BALB/c eran incapaces de fagocitar a NbGFP y que los neutrófilos eran las células reclutadas a tiempos tempranos encargadas de fagocitar a las bacterias unicelulares. Hasta la fecha no se ha descrito que los macrófagos alveolares fueran incapaces de fagocitar a *N. brasiliensis* y este fue un hallazgo que nos hizo cuestionarnos si la infección se da por bacterias unicelulares o por la presencia de microcolonias dentro del homogenizado. Esta hipótesis fue corroborada al confirmar que ninguna otra célula era infectada por

NbGFP, que el inóculo de únicamente unicelulares no inducía la formación de granulomas y que las microcolonias por si solas generaban granulomas pulmonares.

4.2 Dosis infecciosa y evolución de enfermedad

En nuestro primer modelo (instilación intranasal de 10^8 y 10^9 UFC) observamos dos evoluciones distintas, los ratones que recibían la dosis alta tenían una pérdida de peso pronunciada en las primeras 48 horas y tenían que ser sacrificados a tiempos tempranos y los que recibían la dosis baja tenían una pérdida de peso inicial menor y al término del estudio recuperaban el peso casi a su totalidad. Esto en un principio nos hizo pensar si esta diferencia se pudiera deber a la cantidad de lesiones que se producían dependiendo de la concentración de bacteria instilada. Más adelante en los ensayos de protección comprobamos que el número de lesiones y la pérdida de peso eran independientes uno del otro. Fue a partir de este punto que quedó claro para nosotros, que la pérdida de peso era una variable independiente del número de lesiones a nivel pulmonar. Después nos preguntamos si la pérdida de peso de los ratones era una consecuencia de la infección o solo era un resultado de la respuesta inflamatoria aguda a los componentes bacterianos. El experimento del inóculo de bacterias muertas por calor confirmó que la pérdida de peso era debido a la respuesta frente a componentes bacterianos. Eso nos llevó más tarde a cuestionarnos si entonces la diferencia en el peso perdido se debía a la magnitud de la respuesta inflamatoria a las distintas concentraciones de componentes bacterianos instilados. Esto fue confirmado al observar que los ratones que recibían la dosis alta tenían concentraciones IL-1 β 7 veces más

elevadas que los ratones que recibieron la dosis baja, a las 24 y 48 horas post-infección. Al momento de analizar las poblaciones celulares en BALF por citometría de flujo observamos la magnitud de la respuesta inflamatoria en ambos grupos de ratones, en donde se observaba un reclutamiento de células hasta 3 veces mayor en los ratones que recibieron la dosis alta a las 24 horas post-infección, y este reclutamiento aumentó a las 48 horas únicamente en el grupo que recibió la dosis alta, mientras el grupo contrario presentó una disminución en el total de células en BALF. Esta serie de experimentos utilizando este modelo nos ayudó a ver la enfermedad pulmonar y la pérdida de peso inicial como eventos independientes.

4.3 Protección frente a infección secundaria

Una vez determinadas las condiciones experimentales para inducir la formación de granulomas de una forma reproducible, decidimos explorar la protección frente a una exposición secundaria al mismo patógeno. Salinas Carmona et al describieron que en su modelo de actinomicetoma se generaba una respuesta humoral protectora IgM específica, y que esta protección era transferible a otros ratones por medio de transferencia de suero de ratones inmunizados a otros sanos [33]. Después de haber determinado que una dosis de 10^9 UFC era letal para los ratones, decidimos inmunizar a un grupo de ratones con una dosis no letal de 10^8 UFC y comprobar si esta le confería protección frente a la letalidad de la dosis alta. Para nuestra sorpresa, la pérdida de peso en ambos grupos de ratones fue idéntica, en ambos experimentos, lo cual nos hizo pensar que no existía una protección real frente a una segunda exposición. Sin embargo, al momento de analizar las imágenes del fotodocumentador nos dimos cuenta que los

ratones inmunizados presentaban un menor número de lesiones. Este hallazgo se observó tanto en el ensayo con ratones BALB/c como en los BALB/c spf. En un principio utilizábamos el criterio de peso como un indicador de enfermedad y después de estos ensayos de protección empezamos a separar ambos eventos como independientes. Si tomamos en cuenta únicamente la aparición o no de lesiones a nivel pulmonar como indicador de enfermedad, podríamos decir que los ratones previamente expuestos adquieren cierta capacidad protectora, en forma de presencia de un menor número de lesiones. Aunque no exploramos más a que se debía esta protección, después de haber determinado que la unidad mínima infecciosa eran las microcolonias de un determinado diámetro, especulamos que la protección se podría basar en que los animales previamente expuestos son capaces de una forma más rápida a las bacterias antes de que se dupliquen y formen colonias de un tamaño imposible de eliminar, o que la exposición previa le haya conferido a los fagocitos de responder frente a colonias de un mayor diámetro y solo las colonias de diámetro superior a este límite generaban lesiones pulmonares. Se requieren de una serie de ensayos para comprobar esta hipótesis, como inmunizar a varios grupos de ratones con bacterias unicelulares para evitar la formación de granulomas desde la primera exposición, seguido de un reto al día 21 con microcolonias de distintos tamaños, desde 30 hasta 70 μm de diámetro, a distintos grupos de ratones al igual que sus controles no inmunizados, y observar si existe una diferencia en el número de lesiones en los distintos grupos con distintos tamaños de microcolonias. Técnicamente es complicado tener un control absoluto sobre el tamaño de las microcolonias ya que la formación de ellas depende en parte de la interacción entre unicelulares en cultivo y de la densidad inicial de bacterias en el medio. Por lo

tanto, este experimento es difícil de realizar en este momento y se requiere de un método más preciso de aislamiento de microcolonias de tamaños específico para llevarlo a cabo.

4.4 Microcolonias como unidad mínima infecciosa

En la actualidad no existen reportes de las microcolonias bacterianas como unidad mínima infecciosa. Beaman originalmente describió el crecimiento intracelular de *N. cyriacigeorgica* como múltiples formas filamentosas, algo parecido a las microcolonias observadas en nuestros experimentos, sin embargo, éstas eran observadas 48 horas después de la infección con suspensiones unicelulares [24]. Queda claro que la respuesta inmune contra *N. brasiliensis* es distinta a la respuesta contra *N. cyriacigeorgica*, partiendo desde el punto que NbGFP no es fagocitada por ninguna célula y que instilar bacterias unicelulares no induce la formación de granulomas pulmonares.

En un principio fue un hallazgo inesperado el observar microcolonias a las 24 horas post-infección. Al momento de preparar distintas diluciones del inóculo, nunca observamos estas colonias al microscopio. Este hallazgo nos permitió generar otra hipótesis respecto a la infección por la bacteria. Tradicionalmente se han atribuido determinantes patogénicas a las bacterias e incluso se han clasificado de acuerdo a ellas como la velocidad de duplicación, motilidad, su capacidad de subvertir la respuesta inmune mediante la producción de superóxido dismutasas, catalasas y otras enzimas que repercuten directamente sobre fagocitos [34]. Debido a que la NbGFP en su forma unicelular es incapaz de generar enfermedad nos sugirió que podría existir un nuevo

mecanismo o determinante de patogenicidad no antes descrito, la capacidad de las bacterias de infectar en forma de microcolonias. El crecimiento de la bacteria en forma de microcolonias fue confirmado en el experimento de crecimiento de colonias desde unicelulares y las repeticiones que se hicieron subsecuentemente. Al momento de observar la biopelícula de NbGFP bajo microscopía UV observamos que la estructura de la biopelícula se organizaba en forma de grandes colonias GFP+ unidas entre sí por una matriz con fluorescencia de menor intensidad. Esto nos habla de que, en condiciones naturales, *N. brasiliensis* crece en forma de colonias, lo cual nos hizo pensar que esta podría ser la forma infectiva de otros tipos de nocardiosis ocasionada por esta cepa, como lo es el actinomicetoma. Otros experimentos se requirieron para poder comprobar esta hipótesis, como inyectar *N. brasiliensis* unicelular en las patas de un grupo de ratones y microcolonias a otro y valorar la respuesta en ambos grupos.

4.5 Crecimiento de microcolonias

En un principio las microcolonias eran recuperadas directamente raspando el filtro con una puntilla estéril después de filtrar el homogenizado. Esto nos permitía obtener un número adecuado de microcolonias para realizar la infección, sin embargo, las colonias obtenidas de esta forma tenían tamaños y formas muy heterogéneas. Debido a que uno de los parámetros para valorar la evolución de los granulomas es el tamaño del gránulo de Nocardia, teníamos que refinar el método para homogenizar las colonias instiladas a los ratones. De forma inicial intentamos centrifugar y separar por gradientes de sacarosa las microcolonias recuperadas del filtro, pero estas se quedaban pegadas a la pared del tubo y no se separaban adecuadamente. Después de observar el crecimiento

normal de la bacteria, y como tiende a formar microcolonias de forma natural al momento de generar la biopelícula, nos preguntamos si podríamos usar su habilidad natural de formar microcolonias controlando la cantidad de bacterias unicelulares sembradas en determinado volumen de medio y monitoreando su crecimiento durante los siguientes días.

Es importante discutir sobre algunos aspectos de la metodología del crecimiento de colonias. De manera inicial quisimos crecer las microcolonias en placas de cultivo de células y tejidos o en cajas de Petri de plástico y observamos que el crecimiento no era adecuado. En las placas de cultivo las bacterias crecían y duplicaban adheridas al piso de cada pozo formando una biopelícula en el fondo de las placas. Por otra parte, las bacterias que fueron sembradas en cajas de Petri de plástico crecieron de una forma muy lenta y no llegaron a formar colonias. Después de estos experimentos decidimos crecer las colonias en superficies de vidrio (cajas de Petri de vidrio). En los primeros experimentos determinamos la cantidad de NbGFP unicelulares que se requerían para crecer colonias de un diámetro aproximado. Una cantidad muy alta de bacterias hacía que rápidamente formaran una biopelícula en la superficie del medio y una cantidad muy baja hacía el proceso muy lento. Encontramos que el sembrar 50,000-150,000 NbGFP unicelulares en 10 ml de medio BHI eran las condiciones óptimas para un crecimiento adecuado y para obtener microcolonias de $\approx 50 \mu\text{m}$ de diámetro y de forma homogénea.

Como nota importante queda mencionar el adecuado manejo del vidrio y la limpieza de este. En varios ensayos de crecimiento de colonia, las bacterias no crecían como se esperaba incluso cuando se sembraban en concentraciones muy altas. Esto nos hizo preguntarnos si existían otras variables que influyeran en la duplicación de la

bacteria. Al analizar todas las variables nos dimos cuenta que el utilizar detergentes para limpiar el vidrio sin una limpieza exhaustiva con agua corriente hacía que las colonias dejaran de formarse. Esto se observó tanto utilizando Extran o Virusolve para limpiar las superficies de vidrio. Después de limpiar las superficies con agua corriente por varias horas las colonias comenzaron a crecer de una forma adecuada. Para futuros experimentos recomendaría suspender el uso de detergentes para limpiar las superficies de vidrio y solo utilizar agua corriente para limpiar todos los materiales con los cuales va a entrar en contacto la bacteria.

4.6 Evolución del granuloma y pérdida de control de la enfermedad

Una vez refinado el método para crecer microcolonias decidimos estudiar la evolución de los granulomas a distintos tiempos. Se ha reportado en la literatura que el microambiente dentro de un granuloma es importante para el control de la infección e incluso lograr erradicar al agente infeccioso (Mtb) en ese granuloma individual [35]. De la misma forma se ha descrito una gran variabilidad entre granulomas aún dentro de un mismo ratón [35,36]. Existen otros modelos animales de enfermedad pulmonar granulomatosa como el de Mtb desarrollado por Hernández Pando et al, en el cual inoculaban a ratones BALB/c con bacterias en aerosol induciéndoles la formación de granulomas no caseosos [37]. Más tarde otro equipo de trabajo implementó el modelo en ratones C3Heb/FeJ para generar granulomas hipóxicos [38,39]. Otro equipo de trabajo identificó tres distintos tipos de granuloma en este mismo modelo, y los clasificó de acuerdo a su histopatología [36]. El tercer tipo de granuloma es muy parecido a los granulomas observados en humanos los cuales presentan necrosis central [36]. Creemos

que de clasificar a los granulomas inducidos por *N. brasiliensis*, estos entrarían bajo el tercer tipo.

En cuanto a la evolución de la enfermedad en nuestro modelo, observamos que los ratones que dejábamos monitoreando por tiempo indeterminado comenzaban a perder peso a tiempos tardíos y tenían que ser sacrificados por pérdida de peso importante. Este fenómeno se observó en varias ocasiones, y en el último experimento comenzó a observarse desde finales del segundo mes post-infección. Algo importante que remarcar es el cambio en las poblaciones celulares dentro de los granulomas en los ratones que perdieron el control de la infección a tiempos tardíos comparado con los ratones que fueron sacrificados a tiempos tempranos. Al séptimo día post-infección la lesión granulomatosa no se encontraba bien estructurada, y las tres poblaciones celulares estudiadas: linfocitos T, macrófagos M1 y M2, se encontraban distribuidos en toda la lesión sin observar un patrón característico. Esta desorganización cambió notablemente al día 21, en donde las distintas poblaciones celulares empezaron a adoptar una localización específica dentro del granuloma. Los linfocitos T se encontraron a partir de este punto principalmente en la periferia envolviendo las lesiones mientras que la distribución de los macrófagos M1 y M2 no mostraba un patrón característico más que encontrarse por dentro del anillo de linfocitos T. Al día 42 post-infección empezamos a observar los primeros datos de alteración en el anillo de linfocitos T, en donde observamos áreas de engrosamiento y adelgazamiento, y un mayor número de macrófagos espumosos. Hasta este punto se observaban gránulos de *Nocardia* pequeños en el centro de las lesiones y todavía no se identificaba un aumento o disminución en la relación macrófagos M1/M2. Al día 65 post-infección, en los ratones que comenzaron a perder control de la infección y presentaron una pérdida de

peso constante y lenta, la estructura de los granulomas había cambiado. El anillo de linfocitos T presentaba más irregularidades que en el día 42, muchos granulomas presentaban un gran número de macrófagos espumosos y otras lesiones eran extensas con detritos cariorréticos en su interior, hallazgo sugestivo de que los granulomas estaban evolucionando a abscesos. Al día 108 post-infección se observaron cambios drásticos en la estructura del granuloma. Los gránulos de *Nocardia* se encontraban aumentados de tamaño a comparación con aquellos que inicialmente instilamos intranasalmente, la densidad de linfocitos T rodeando la estructura disminuyó notablemente y el microambiente del granuloma era en su mayoría anti-inflamatorio, con un número de macrófagos M2. Esto nos hizo preguntarnos si la pérdida del control de la infección se debía a una desregulación del microambiente intra-granuloma, ya sea debido a un fenómeno de agotamiento por parte de los linfocitos T, o por modificación o alteración de la respuesta inmune por determinantes de patogenicidad de la bacteria.

Finalmente, de acuerdo a lo observado en todos los ratones que se monitorearon por tiempo indeterminado, la evolución de la enfermedad es crónica y de larga duración, en donde los ratones comienzan a perder peso de forma progresiva hasta que finalmente tienen que ser sacrificados. Algunos de los ratones que pierden el control desarrollan grandes abscesos a nivel pulmonar con presencia de granulomas con un microambiente altamente anti-inflamatorio mientras que otros ratones presentan áreas de fibrosis importantes con un gran número de lesiones granulomatosas a nivel pulmonar. Esto nos hace pensar que se trata de una enfermedad pulmonar crónica y progresiva como la que se observa en humanos con nocardiosis pulmonar.

CONCLUSIONES

1. Los ratones BALB/c (y C57BL/6) desarrollan Nocardiosis Pulmonar granulomatosa crónica tras la instilación intranasal de microcolonias de *N. brasiliensis*.
2. Una exposición previa al patógeno parece conferir cierto grado de protección. Los ratones previamente expuestos tienen un menor número de granulomas durante una reinfección.
3. No existe un blanco infeccioso. La unidad mínima infecciosa son las microcolonias.
4. Existe una respuesta inmune humoral frente al patógeno, con títulos de IgGs detectables hasta el día 158 p.i.
5. Los granulomas no se resuelven y los ratones pierden el control de la infección a tiempos tardíos.

PERSPECTIVAS

1. Transformación de NbGFP⁺OVA⁺.
2. Rol de PD-1 y PD-1L en el control del granuloma.
3. Estudiar el efecto protector de una primera exposición.
4. Análisis de Inmunohistoquímica.
5. Estudiar la actividad de neutrófilos en el control del granuloma.
6. Estudiar los cambios de expresión génica en NbGFP⁺OVA⁺ dentro del granuloma a distintos tiempos.
7. Estudiar los cambios de expresión génica celular a nivel granuloma.
8. Iniciar pruebas de alternativas farmacológicas para el tratamiento de nocardiosis pulmonar en el modelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Goodfellow M. The family *Nocardiaceae*. The prokaryotes vol. II, 2nd ed. 1992
2. Nocard E. Note sur la maladie des boeufs de la Gouadeloupe connue sous le nom de farcin. Ann. Inst. Pasteur 1888. 2:293-302
3. Trevisan V. I generi le specie delle Batteriacee. Zanaboni and Gabussi, Milan. 1889
4. Eppinger H. Über eine neue, pathogene Cladothrix und eine durch sie hervorgerufene pseudotuberculosis. Wien. Klin. Wochenschr 1890. 3:321-323
5. Brown-Elliot Barbara, Conville P, Wallace R. Current Status of Nocardia taxonomy and recommended identification methods. Clinical microbiology 2015. 37.
6. Beaman BL, Moring SE. Relationship among Cell Wall Composition, Stage of Growth, and Virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. Infections and immunity 1988. 56:557-563
7. Beaman BL, Maslan S. Virulence of *Nocardia asteroides* During its Growth Cycle. Infection and Immunity 1978. 20:290-295
8. Beaman BL, Scates SM, Moring SE et al. Purification and Properties of a Unique Superoxide Dismutase from *Nocardia asteroides*. The Journal of Biological Chemistry 1983. 258:91-96
9. Beaman BL, Black CM, Doughty F et al. Role of Superoxide Dismutase and Catalase as Determinants of Pathogenicity of *Nocardia asteroides*: Importance in Resistance to Microbicidal Activities of Human Polymorphonuclear Neutrophils. Infection and Immunity 1985. 47:135-141
10. Davis-Scibienski C, Beaman BL. Interaction of Alveolar Macrophages with *Nocardia asteroides*: Immunological Enhancement of Phagocytosis, Phagosome-Lysosome Fusion, and Microbicidal Activity. Infection and Immunity 1980. 30:578-587
11. Black CM, Paliescheskey M, Beaman BL et al. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by *Nocardia asteroides*. J Infect Dis 1986. 154:952-958

12. Martínez R, Menéndez R, Reyes A, et al: Pulmonary nocardiosis: risk factors and outcomes. *Respirology* 2007, 12:394-400
13. Valerio M, Marín M, Cercenado E et al. Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine* 2009. 88:250-261
14. Baracco G, Dickinson G. Pulmonary Nocardiosis. *Current Infectious Disease Reports* 2001. 3:286-292
15. Amin A, Faisal S, Anis M et al. Pulmonary Nocardiosis: a comparative analysis of *Nocardia asteroides* and non-asteroides species. *Tropical Doctor* 2012. 42:94-96
16. Beaman BL, Burnside J, Edwards B et al. Nocardial infections in the United States, 1972-1974. *J Infect Dis* 1976. 134:286-289
17. Wilson J. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clin Proc* 2012: 87:403-407
18. Uttamchandani RB, Daikos GL, Reyes RR, et al: Nocardiosis in 30 patients with advanced human immunodeficiency virus infection: clinical features and outcome. *Clin Infect Dis* 1994, 18:348:353
19. Curry WA: Human Nocardiosis A clinical review with selected case reports. *Arch Intern Med* 1980, 140:818-826
20. Domínguez DC, Antony SJ: Actinomyces and Nocardia infections in immunocompromised patients. *J Natl Med Assoc* 1999, 91:35-39
21. Menendez R, Cordero PJ, Santos M, et al: Pulmonary infection with Nocardia species: a report of 10 cases and review. *Eur Respir J* 1997, 10:1542-1546
22. C.H. Hui, V.W.K. Au, K. Rowland, et al. Pulmonary nocardiosis re-visited: experience of 35 patients at diagnosis. *Respiratory medicine* 2003. 97:709-71
23. Junjun Chen, Hua Zhou, Panfeng Xu, et al. Clinical and radiographic characteristics of pulmonary nocardiosis: clues to earlier diagnosis. *Plos one*. 2014
24. Beaman BL, Goldstein E, Gershwin ME et al. Lung Response of Congenitally Athymic (Nude), Heterozygous, and Swiss Webster Mice to Aero-genic and Intranasal Infection by *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity* 1978. 22:867-877

25. Beaman BL, Gershwin ME, Scates SS et al. Immunobiology of Germfree Mice Infected with *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity* 1980. 29:733-743
26. Beaman BL, Gershwin ME, Ahmed A et al. Response of CBA/N x DBA2/F₁ Mice to *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity* 1982. 35:111-116
27. Revol A, Espinoza-Ruiz M, Medina-Villanueva I et al. Expression of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Can J. Microbiol* 2006. 52:1255-1260
28. Vera-Cabrera L, Ortíz-López R, Elizondo-Gonzalez R et al. Complete Genome Sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *Journal of Bacteriology* 2012. 194:2761-2762
29. Salinas-Carmona MC, Rocha-Pizaña MR. Construction of a *Nocardia brasiliensis* fluorescent plasmid to study Actinomycetoma pathogenicity. *Plasmid* 2011. 65:25-31
30. Salinas-Carmona MC, Torres-Lopez E, I-Ramos Y et al. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infection and Immunity* 1999. 67:2428-2432
31. Amatya R, Koirala R, Khanal B et al. *Nocardia brasiliensis* primary pulmonary nocardiosis with subcutaneous involvement in an immunocompetent patient. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2011. 29:68-70
32. Wadhwa V, Rai S, Kharbanda P et al. Fatal pulmonary infection by *Nocardia brasiliensis*. *Indian Journal of Medical Microbiolofy* 2006. 24:63-64
33. Salinas-Carmona MC, Perez-Rivera I. Humoral immunity through Immunoglobulin M Protects Mice from an Experimental Actinomycetoma Infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infection and Immunity* 2004. 72:5597-5604
34. Gama JA, Abby SS, Vieira-Silva S et al. Immune subversión and quorum-sensing shape the variation in infectious dose among bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 2012. 8:e1002503
35. Gideon HP, Phuah J, Flynn JL et al. Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exist, But a Balance of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines is Associated With Sterilization. *PLoS Pathogens* 2015. 11; e1004603

36. Irwin SM, Driver E, Lyon E et al. Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3Heb/FeJ mice following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Dis Model Mech* 2015. 8;591-602
37. Hernández-Pando R, Orozco H, Honour J et al. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995. 12,53.
38. Kramnik I, Dietrich W, Demant P et al. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 2000. 97;8560-8565
39. Harper J, Skerry C, Davis SL et al. Mouse Model of Necrotic Tuberculosis Granulomas Develops Hypoxic Lesions. *JID* 2012. 205;595-602.

ANEXOS

Anexo I

Preparación de soluciones

Medio de cultivo BHI complementado con gentamicina

1. Pesar 3.7 gramos de medio BHI
2. Disolver en 100 ml de agua destilada
3. Dividir en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad
4. Esterilizar en autoclave por 25 minutos
5. Una vez que alcanza temperatura ambiente, agregar 26 μ g de gentamicina en cada matraz con 50 ml de medio BHI
6. Almacenar en incubadora a 37°C hasta su uso

Medio de cultivo BHI con Agar

1. Pesar 14.8 gramos de medio BHI
2. Pesar 6 gramos de agar
3. Disolver en 400 ml de agua destilada
4. Dividir en dos matraces Erlenmeyer de 400 ml de capacidad
5. Esterilizar en autoclave por 25 minutos

Buffers de desenmascaramiento de antígeno

***Nota:** Al momento de preparar estos buffers decidimos agregar Tween 20 después de aforar el buffer a 1000 ml ya que de otra forma se generaba una cantidad de espuma

importante. Agregar los 500 µl de Tween 20 después de aforar a 1 litro genera una variación mínima en la molaridad de la solución, la cual no es significativa, pasando a ser de 10 mM a 9.9999mM.

Buffer de citratos 10mM + Tween 20 al 0.05%, pH 6.0.

1. Pesar 2.14g de ácido cítrico monohidratado
2. Diluir en 800 ml de agua destilada
3. Ajustar pH a 6.0 con NaOH 1N
4. Aforar a 1,000 ml con agua destilada
5. Agregar 0.5 ml Tween 20
6. Almacenar a 4 grados centígrados hasta por 3 meses.

Buffer de EDTA + Tween 20 al 0.05%, pH 8.0.

1. Pesar 0.37 gramos de EDTA
2. Diluir en 800 ml de agua destilada
3. Ajustar pH a 8.0 con NaOH 1N
4. Aforar a 1,000 ml con agua destilada
5. Agregar 0.5 ml de Tween 20
6. Almacenar a 4 grados centígrados hasta por 3 meses

TBS, pH 7.2-7.4

1. Pesar 2.4 gramos de Tris HCl
2. Pesar 0.56 gramos de Tris Base
3. Pesar 8.8 gramos de NaCl
4. Diluir en 900 ml de agua destilada
5. Ajustar pH entre 7.2 y 7.4 con NaOH o HCl 1N

6. Aforar a 1,000 ml con agua destilada
7. Almacenar buffer a 4 grados centígrados

PBS, pH 7.2-7.4

1. Pesar 8 gramos de NaCl
2. Pesar 0.2 gramos de KCl
3. Pesar 1.44 gramos de Na₂HPO₄
4. Pesar 0.24 gramos de KH₂PO₄
5. Agregar 800 ml de agua destilada.
6. Ajustar pH a 7.2-7.4
7. Llevar a un litro con agua destilada

Solución de lavado IHQ (200 ml)

1. Se miden 199 ml de TBS pH 7.2-7.4
2. Se agrega 1 ml de Tween 20
3. Almacenar a 4 grados centígrados

Solución de peróxido de hidrógeno al 3% (10 ml)

1. Se miden 9 ml TBS
2. Se agrega 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%
3. Almacenar a 4 grados centígrados
4. Preparar nueva solución en cada experimento

Solución stock de gelatina de pescado

1. Pesar 0.5 gramos de gelatina de pescado
2. Diluír en 5 ml de agua destilada

3. Filtrar por membrana de 22 mm de poro
4. Almacenar a 4 grados centígrados

Solución de Bloqueo (TBS + 1% suero (De donde proviene el segundo anticuerpo) + 1% ASB + 0.1% gelatina de pescado)

1. Se miden 94.5 ml de TBS
2. Se agrega .9 ml de suero fetal bovino y .1 ml de suero del animal de donde proviene anticuerpo secundario
3. Se agregan 4.5 ml de ASB al 22%
4. Se agrega 100 µl de solución stock de gelatina de pescado

Solución de fijación, formaldehido al 4%

1. Tomar 4 ml de formaldehido
2. Llevar a volumen de 100 ml con PBS pH 7.2-7.4
3. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 3 meses

Solución de gelatina para tratamiento de laminillas

1. Pesar 5 gramos de gelatina
2. Disolver gelatina en un litro de agua desionizada caliente (no debe exceder de 45°C)
3. Agregar 0.5 gramos de dodecahidrato de sulfato de potasio cromio a la solución
4. Filtrar la solución
5. Almacenar a 4°C hasta su uso por tres meses

Solución DWS 1.7%

1. Medir 17 ml de detergente para platos

2. Disolver en 1 litro de agua destilada
3. Almacenar a temperatura ambiente

Solución de lavado (ELISA)

1. Medir 999 ml de PBS pH 7.2
2. Agregar 1 ml de Tween 20

Solución de Bloqueo (ELISA) (Skim Milk 3%)

1. Pesar 0.6 gramos de leche descremada (Skim Milk)
2. Disolver en 20 ml de agua bidestilada

Solución de Anestesia para ratón

1. Medir 8 ml de PBS
2. Agregar 1 ml de ketamina (100 mg/ 1 ml)
3. Agregar 1 ml de Xilazina (20 mg/ 1 ml)

Reactivos

Reactivo y kits	Laboratorio	# Catálogo
Cloruro de sodio	Sigma	S5886
Dodecahidrato sulfato de potasio cromio	Sigma	243361
Trizma clorhidrato	Sigma	T3253
Brain Heart Infusion Broth	Fluka	53286
Cloruro de potasio	Sigma	P5405
Trizma base	Sigma	T1503
Fosfato de Sodio dibásico	Sigma	S5136
Fosfato de potasio monobásico	Sigma	P5655
Ácido cítrico		522
Alcohol etílico	CTR	1160
Tween 20	Sigma	P-1379
Hematoxilina de Harris	Hycel	738
Carbol fuscín	Sigma	C4165
Azul de metileno	Sigma	
Tissue embedding Medium (Paraplast)	Sigma	A6330
Solución salina estéril 0.9%	PiSA	
Diaminobenzidina ImmPACT DAB	Vector	SK-4105
ELISA kit Mouse IL-1 β	R&D Systems	
Rabbit IgG Elite kit	Vector	PK-6101
Mab anti-CD3 de ratón	Origene	
Mab anti-iNOS de ratón	Abcam	
Mab anti-arg-1 de ratón	Origene	
VECTASHIELD with DAPI	Vector	
Mab A647 anti-CCR3	Biolegend	
Mab PE anti-Gr1	Biolegend	
Gentamicina (Garamicina)	Schering-Plough	
Ketamina (Anesket)	PiSA	
Xilazina (Procin)	PiSA	
Skim Milk Powder	Sigma	70166
Glicerol	Jalmek	G0925-13
Xileno	Jalmek	X1925-15
Detergente Axion Lima limón	Colgate-Palm.	
Formaldehido	P. Quím. de Mty	6402