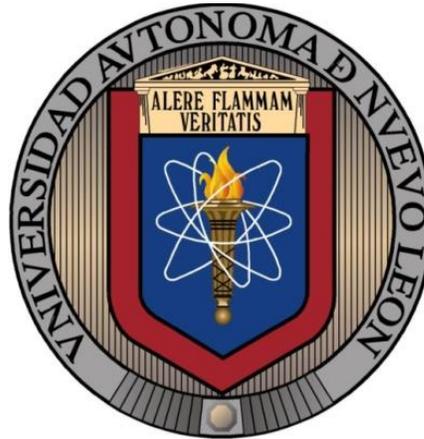


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4⁺ Y
CD8⁺ EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR
*Nocardia brasiliensis***

POR

JUAN RICARDO TÉLLEZ DORADO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

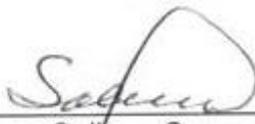
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN

EN INMUNOLOGÍA MÉDICA

AGOSTO, 2019

CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4⁺ Y CD8⁺ EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.

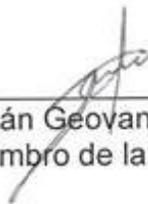
Aprobación de la Tesis.



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director



Dr. C. Ernesto Torres López
Co-director



Dr. C. Adrián Geoyanni Rosas Taraco
Miembro de la Comisión



Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

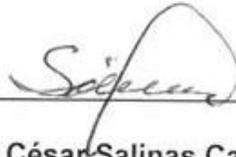
CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4⁺ Y CD8⁺ EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.

Presentado por: Juan Ricardo Téllez Dorado

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

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: **IN18-00006**

Director de Tesis

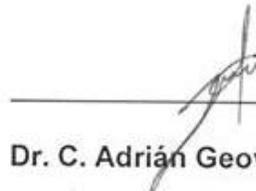


Dr. C. Mario César Salinas Carmona



Dr. C. Ernesto Torres López

Co-director de Tesis



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Miembro de la comisión

Dedicatoria

A mi madre Virginia Dorado Arce

Mi esposa Brenda Cisneros Hattem

Mi Hija Fernanda Téllez Cisneros

A mi hermano Luis Felipe Legazpe Dorado

Mi padre Felipe Legazpe González

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Medicina y al Departamento de Inmunología por la oportunidad que me brindaron para continuar aprendiendo. Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su compromiso, paciencia con mi trabajo y además de sus consejos, orientación y gran disposición.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a su programa de apoyo financiero que permitieron realizar mis estudios de posgrado. Teniendo el número de registro de becario: 635338

Al Dr. C. Ernesto Torres López por ser un gran guía en mi preparación académica y personal. Gracias por todos sus consejos y su tiempo, en las fases más oscuras de mi vida.

Al Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco por siempre tener una gran disposición y su gran ayuda en el desarrollo de esta tesis.

A todos los profesores del departamento de Inmunología. A mis compañeros de posgrado Jorge, Armando, Diana y Antonio por los momentos agradables que pasamos juntos y aparte gracias por sus enseñanzas.

A mis Padres por su cariño y gran paciencia que me tuvieron durante todo este tiempo, por motivarme a seguir, aunque yo no tuviera ni siquiera una pizca de motivación. A mi madre Virginia Dorado Arce a la cual le prometí terminar mis estudios de posgrado.

A mi esposa Brenda Cisneros Hattem por su paciencia y ayuda con la traducción de artículos y mis tareas. A mi Hija Fernanda Téllez Cisneros perdóname por el tiempo que te quité de juegos y convivencia, hice lo posible por siempre brindártelo, pero creó que no fue suficiente.

Un agradecimiento a todo el personal del Departamento: Pamela, Mayela, Tomas, Lucero, Azalia, Lupita, Brenda, Sr. Francisco, Sr. Reynaldo y todas aquellas personas que no alcance a mencionar, pero participaron a lo largo de este proyecto.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
CAPÍTULO 1 Introducción	1
1.1 El micetoma y sus agentes causales.	1
1.2 Actinomicetos como agentes patógenos.	3
1.3 Distribución geográfica del micetoma en el mundo y en México.	3
1.4 Descripción microbiológica del género <i>Nocardia</i> .	5
1.4.1 Características de <i>N. b.</i>	6
1.5 Evolución clínica del actinomicetoma por <i>N. b.</i>	8
1.6 Diagnóstico inmunológico del actinomicetoma por <i>N.b.</i>	9
1.7 Histopatología del actinomicetoma por <i>N. b.</i>	9
1.8 Respuesta inmune innata en la infección por <i>N. b.</i>	10
1.8.1 Macrófagos	11
1.8.2 Neutrófilos	12
1.9 Respuesta inmune adquirida en la infección por <i>N. b.</i>	13
1.9.1 Respuesta inmune humoral en la infección por <i>N. b.</i>	14
1.10 Respuesta inmune celular en la infección por <i>N. b.</i>	15
1.10.1 Linfocitos T CD4 ⁺ (Th o cooperadores).	16
1.10.2 Linfocitos T CD8 ⁺ (citotóxicos).	16
1.10.3 Linfocitos T en el actinomicetoma por <i>N. b.</i>	16
1.10.4 Agotamiento de Linfocitos T.	18
1.11 Interleucinas (IL) en el actinomicetoma por <i>N. b.</i>	20
1.12 Tratamiento de actinomicetoma por <i>N. b.</i>	22

CAPÍTULO 2 Definición del problema.	23
CAPÍTULO 3 Justificación.	24
CAPÍTULO 4 Hipótesis.	25
CAPÍTULO 5 Objetivos.	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 6 Estrategia general.	27
CAPÍTULO 7 Material y métodos.	28
7.1 Material biológico.	28
7.1.1 Animales.	28
7.1.2 Cepa bacteriana.	28
7.1.3 Obtención de la suspensión unicelular bacteriana.	28
7:1.3.1 Método de microdilución de Miles y Misra para Ajustalo a el marco del texodeterminar la concentración del inóculo	29
7.1.4 Infección experimental.	29
7.1.5 Monitoreo de los ratones.	29
7.1.5.1 Eutanasia.	30
7.2. Evolución clínica.	30
7.3. Obtención de células de bazo y ganglio poplíteo de Ajustalo al marco del textor ratones infectados.	30
7.4. Digestión y obtención de células del cojinete plantar.	31
7.5. Determinación de carga bacteriana.Unidades formadoras de colonias (UFC).	31
7.6. Análisis por citometría de flujo.	32
7.6.1 Inmunofenotipificación de los linfocitos T de bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar en los ratones infectados.	32
8.1 Análisis estadístico	34

CAPÍTULO 8 Resultados.	35
CAPÍTULO 9 Discusión.	57
CAPÍTULO 10 Conclusión.	71
CAPÍTULO 11 Perspectiva.	72
Referencias bibliográficas	73
Anexos	86

Lista de tablas

Contenido	Página
Tabla 1 Composición de la pared celular de diferentes géneros de bacterias.	5
Tabla 2 Clasificación taxonómica de <i>N. b.</i>	6
Tabla 3 Utilización de fuentes de carbono de <i>N. b.</i>	7
Tabla 4 Perfil enzimático de <i>N. b.</i>	7
Tabla 5 Criterios de evaluación clínica del desarrollo del actinomicetoma por <i>N. b.</i>	8
Tabla 6 Comparación de las características de los LT funcionales y los LT agotados.	19
Tabla 7 Anticuerpos monoclonales empleados.	33
Tabla 8 Resultados de la detección de UFCs en bazo durante la fase aguda.	36
Tabla 9 Resultados de la detección de UFCs en ganglio poplíteo durante la fase aguda.	36
Tabla 10 Resultados de la detección de UFCs en cojinete plantar durante la fase aguda.	36
Tabla 11 Resultados de la detección de UFCs en bazo durante los diferentes días post-infección de la fase crónica	46
Tabla 12 Resultados de la detección de UFCs en ganglio poplíteo durante los diferentes días post-infección de la fase crónica	46
Tabla 13 Resultados de la detección de UFCs en cojinete plantar durante los diferentes días post-infección de la fase crónica.	47

Lista de figuras

Contenido	Página
Fig.1 Partes del cuerpo comúnmente afectadas por micetoma.	2
Fig.2 Distribución geográfica del micetoma.	4
Fig.3 Distribución de actinomicetoma en México.	4
Fig.4 Fases de la infección por <i>N. b.</i>	8
Fig.5 Esquema de la estrategia general del experimento.	27
Fig.6 Espectro de absorción y emisión de los anticuerpos.	33
Fig. 7 Determinación de las UFC/mL en bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar.	37
Fig.8 Aumento del volumen de los bazos en la fase aguda.	38
Fig.9 Aumento del volumen de los ganglios poplíteos en la fase aguda.	38
Fig.10 Aumento del volumen de los cojinetes plantares en la fase aguda de la infección.	38
Fig. 11 Determinación del volumen del bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	39
Fig. 12 Determinación del peso del bazo y ganglio poplíteo la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i> .	39
Fig.13 Imágenes representativas de la citometría de flujo de la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	40
Fig. 14 Cuantificación del porcentaje de LT CD4 ⁺ en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	41
Fig. 15 Determinación de los números absolutos de LT CD4 ⁺ en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	42
Fig. 16 Determinación de los números absolutos de LT CD4 ⁺	43

del cojinete plantar en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	
Fig. 17 Cuantificación del porcentaje de LT CD8 ⁺ en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	44
Fig. 18 Determinación de los números absolutos de LT CD 8 ⁺ en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	45
Fig. 19 Determinación de los números absolutos de LT CD8 ⁺ del cojinete plantar en la fase aguda de la infección por <i>N. b.</i>	45
Fig. 20 Determinación de las UFC en bazo, ganglio y cojinete plantar durante la fase crónica de <i>N. b.</i>	47
Fig. 21 Aumento del volumen de los bazo en la fase crónica de la infección.	48
Fig. 22 Aumento del volumen de los ganglios poplíteos en la fase crónica de la infección.	48
Fig. 23 Aumento del volumen de los cojines plantares en la fase crónica de la infección.	48
Fig. 24 Determinación del volumen del bazo, ganglio y cojinete plantar en la fase aguda y fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	49

Fig 25	Determinación del peso del bazo y ganglio poplíteo en la infección por <i>N. b.</i>	50
Fig 26	Imágenes representativas de la citometría de flujo de la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	51
Fig 27	Cuantificación del porcentaje de LT CD4 ⁺ en la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	52
Fig 28	Determinación de los números absolutos de LT CD4 ⁺ en la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	53
Fig 29	Determinación de los números absolutos de LT CD4 ⁺ del cojinete plantar en la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	53
Fig 30	Cuantificación del porcentaje de LT CD8 ⁺ en la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	54
Fig 31	Determinación de los números absolutos de LT CD 8 ⁺ en la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	55
Fig 32	Determinación de los números absolutos de LT CD8 ⁺ del cojinete plantar en la fase crónica de la infección por <i>N. b.</i>	55
Fig 33	Comparación de la respuesta inmune local y sistémica en un modelo de actinomicetoma por <i>N. b.</i>	56

Abreviaturas

Ag	Antígeno
APC-Cy7	Alofocianina-cianina 7
BCR	Receptor de células B
BHI	Infusión Cerebro-Corazón
BSL2	Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2
CON-A	Concanavalina A
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA 4	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
DC	Célula dendrítica
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H	Horas
IFN- γ	Interferón gamma
IL-	Interleucina
IL-10R	Receptor de IL-10
kD	Kilodaltones
KOH	Hidróxido de potasio
LAG 3	Proteína del gen de activación de linfocitos3
LCMV	Virus de la de la corimeningitis linfocítica
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LT	Linfocito T
LTc	Linfocitos T citotóxicos
LTh	Linfocitos cooperadores
Mab	Anticuerpo monoclonal
Meso-DAP	Ácido meso-diaminopimélico
MHC	Molécula de histocompatibilidad

μl	Microlitros
mL	Mililitros
NK	Natural Killer
NH ₄ CL	Cloruro de amonio.
<i>N.b.</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
PALS	Vainas linfoides periarteriales
PAMS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB	Pulpa blanca
PD-1	Proteína de muerte celular programada
PMN	Polimorfonucleares
PR	Pulpa roja
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
S.S.E.	Solución salina estéril
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
T <i>reg</i>	Linfocitos T reguladores
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ZM	Zona marginal

RESUMEN

Biólogo Juan Ricardo Téllez Dorado Fecha de titulación: Agosto 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del trabajo: "Cuantificación de las subpoblaciones de Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en un modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*."

Número de páginas: 85

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica.

Área de Estudio: Inmunología Médica.

Resumen: Se cuantificó el número de LT en un modelo experimental de actinomicetoma por *N. b.* **Objetivo:** Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en bazo, ganglio poplíteo y el sitio de la lesión durante el desarrollo de la infección de *N. brasiliensis* en ratones BALB/c. **Material y Métodos:** Se infectaron ratones BALB/c con *N. b.* Se registró las medidas de inflamación, las UFC de los órganos y se analizaron las suspensiones celulares por citometría de flujo. **Resultados:** En el bazo no existió presencia de UFCs. En ganglio poplíteo se determinaron al día 3, en cojinete aumentaron al 60 y 90. El volumen del cojinete aumento al 60 y 90. El peso y volumen de ganglio y bazo aumentaron. En la cuantificación absoluta y porcentual de LT CD3⁺/CD4⁺ y CD3⁺/CD8⁺, se observó aumento y disminución en los órganos estudiados dependiendo de las etapas aguda y crónica de la infección. **Conclusión:** En un modelo experimental de actinomicetoma por *N. b.*, la cantidad de LT aumentan en los órganos linfoides secundarios y en el sitio de la infección durante las etapas aguda y crónica.



Director de tesis
Dr. en C. Mario César Salinas Carmona

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 EL MICETOMA Y SUS AGENTES CAUSALES

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica subcutánea, de carácter inflamatorio, indoloro, deformante y destructivo ⁽¹⁾. No es contagioso y se caracteriza por un aumento de volumen en el sitio donde ocurrió la lesión, involucrando al tejido cutáneo y subcutáneo, teniendo una progresión lenta hacia zonas musculares, viscerales y óseas. Los pacientes infectados o los ratones experimentales desarrollan múltiples nódulos granulomatosos con tractos fistulosos por los cuales drenan secreciones sanguíneo-purulentas con presencia de gránulos, que consisten en cúmulos de colonias del agente causal. El micetoma es prevenible y tratable, especialmente en sus primeras etapas, esta enfermedad conlleva una alta morbilidad y una inestabilidad socioeconómica ⁽²⁾.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en malabar, India, por Engelbert Kaempfer en 1694. Posteriormente en 1842 John McGill la observó en la región de Madura, India. En 1846 J. Godfrey documentó los primeros casos, denominándola como: "enfermedad tuberculoide del pie" (*morbus tuberculosis pedis*). En 1860, Henry Vandyke Carter lo nombró "*micetoma*", cuando constató que esta enfermedad era secundaria a infección por hongos. Tiempo después E. Pinoy en 1913 subdividió en dos grupos al micetoma según la etiología causal: *actinomicetomas* y *eumicetomas*, si eran causados por bacterias o por hongos verdaderos, respectivamente. Se ha descrito que independientemente del agente causal de la enfermedad, estas son clínica y patológicamente similares ^(1,3).

La infección generalmente se produce mediante inoculación traumática en la piel de las extremidades inferiores con material contaminado, siendo el pie (68.7%) el sitio más comúnmente afectado.

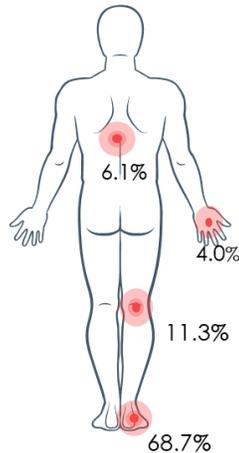


Figura 1. Partes del cuerpo comunmente afectadas por micetoma. Las partes del cuerpo más afectadas son: espalda (6.1%), manos (4%), pies 11.3% y el pie (68.7%) ⁽³⁾.

Se considera que aproximadamente 33 especies de hongos verdaderos y doce actinomicetos, son responsables de la infección. El eumicetoma es causado por hongos filamentosos (macroscópicos), tabicados, pigmentados o negros y hialinos o blancos. Dentro de los que destacan: *Madurella*, *Pyrenochaeta*, *Exophiala*, *Leptosphaeria*, *Curvularia*, *Pseudallescheria*, *Acremonium* y *Fusarium*; siendo *Madurella mycetomatis*, *M. grisea* y *Pseudallescheria boydii* las especies que comúnmente se aíslan en casos de eumicetoma ⁽⁴⁾. En cambio, los agentes causales más frecuentes de actinomicetomas son: *Nocardia brasiliensis* (*N.b*), *N. asteroides*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletrieri* y *Streptomyces somaliensis*. Los registros en México señalan que los dos principales agentes etiológicos de actinomicetoma son *N.b* (85%) y *A. madurae* (8-10%) ^(3, 5, 6).

El diagnóstico de lesiones sospechosas se realiza con la ayuda del examen de granos, microscopía, imágenes (radiografía, ultrasonografía, resonancia magnética), cultivo, prueba de ELISA ⁽⁷⁾ y más recientemente mediante métodos moleculares como PCR y secuenciación molecular ⁽⁸⁾.

1.2 ACTINOMICETOS COMO AGENTES PATÓGENOS

El género *Nocardia* pertenece al orden actinomycetales y a la familia Nocardiaceae; a la fecha se reconocen 12 especies como patógenas humanas entre las cuales tenemos a: *Nocardia asteroides sensu stricto* (tipo I y VI), *N. farcinica*, *N. nova*, *N. b*, *N. otitidiscavarium*, complejo *N. transvalensis* (*N. asteroides* tipo IV, sensu stricto, nuevo taxón I y II), *N. pseudobrasiliensis*, *N. brevicatena*, *N. paucivorans*, *N. abscesus*, *N. veterana* y *N. wallacei*; siendo las seis primeras especies, las que con mayor frecuencia causan infección en el humano. Este grupo de bacterias se clasificó como un hongo debido a la presencia de hifas, sin embargo, también poseen peptidoglicanos, pared celular lipídica y la ausencia de quitina ayudaron a definir su naturaleza bacteriana ⁽¹⁾.

1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL MICETOMA EN EL MUNDO Y EN MÉXICO

Recientemente la Organización Mundial de la Salud clasificó al micetoma como una enfermedad tropical descuidada o desatendida ⁽²⁾. La razón principal de la negligencia es que afecta principalmente a las poblaciones pobres en áreas remotas con una falta de personal capacitado, instalaciones de salud, herramientas de diagnóstico y tratamiento ⁽⁸⁾.

Los casos de eumicetoma predominan en África y Asia, mientras que el actinomicetoma es más común en América; estos se presentan frecuentemente en regiones tropicales y subtropicales entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio, comprendido entre las latitudes 15° sur y 30° norte, esta zona se conoce como “El cinturón del micetoma”. Los países más afectados son: Sudan, Somalia, Senegal, India, Yemen, México y Venezuela ⁽⁹⁾

A nivel mundial, México tiene el mayor número de casos de actinomicetomas por *N. b.* reportados después de Sudán (1,3,6,10,11 y 12).

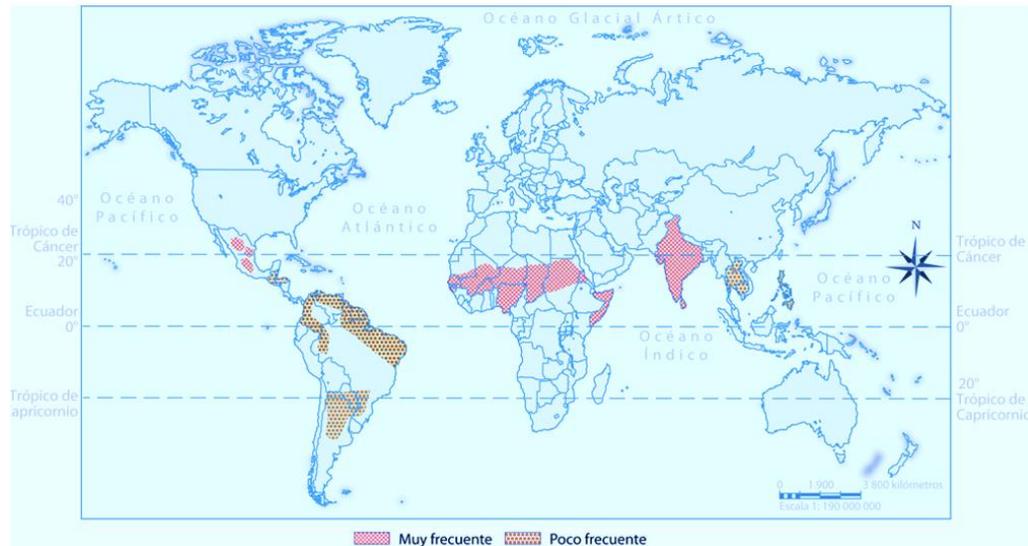


Figura 2. Distribución geográfica del micetoma. El cinturón del micetoma se encuentra localizado entre el Trópico de Cáncer y el de Capricornio afectando a países tropicales de América del Norte y del Sur, Países de África y Asia (9).

En México el 98% de los casos de micetoma, son clasificados como actinomicetoma, dentro de los cuales predominan los causados por *N. brasiliensis* con un 87% (13). Los Estados más afectados son Morelos, Jalisco, el sur de Nuevo León, Guerrero, norte de Veracruz, San Luis Potosí, Guanajuato, Michoacán y sur de Sinaloa.

Estados con mayor incidencia de Actinomicetoma

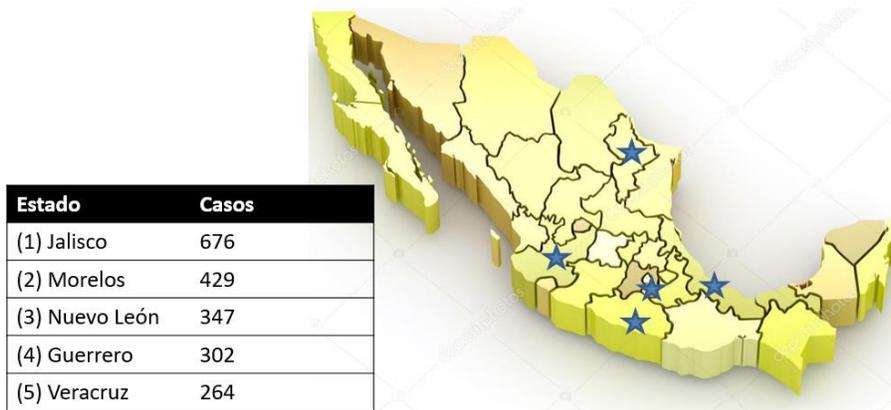


Figura 3. Distribución de actinomicetoma en México. Los estados con mayor incidencia de casos de actinomicetoma son: Jalisco (676), Morelos (429), Nuevo León (347), Guerrero (302), Veracruz (264) (9)

1.4 DESCRIPCIÓN MICROBIOLÓGICA DEL GÉNERO *Nocardia*

Estos microorganismos se han caracterizado por ser bacilos ramificados de 0.5 a 1 μm de diámetro, presentan subramificaciones, pudiendo fragmentarse en formas coco bacilares. No presentan capsulas ni son espatuladas, tienen resistencia a la lisozima, son catalasa positiva, producen superóxido dismutasa, poseen un alto contenido de nucleótidos G y C (60-70%) y ácidos grasos (nocardomicolatos) con tres dobles enlaces y una mayor proporción de cadenas insaturadas ⁽¹⁾.

Además, presentan una pared celular de Tipo IV con ácidos grasos de unos 50 átomos de carbono, ácido 2,6 meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. El aspecto de las colonias depende de la especie, que al subcultivar, las cepas van perdiendo la afinidad tintorial y morfología inicial, formando comúnmente colonias blancas, secas, arraigadas al agar, pueden ser pastosas picudas y expresar un color marrón salmón, desprendiendo un olor característico de tierra mojada ^(1,14).

Quimiotipo de la pared celular	Composición	Géneros
I	<i>l</i> -DAP y sin azúcares diagnósticos	<i>Streptomyces</i>
II	<i>Meso</i> -DAP y sin azúcares diagnósticos	<i>Thermoactinomyces</i> , <i>Nocardiosis</i>
III	<i>Meso</i> -DAP y madurosa	<i>Dermatophilus</i> <i>Actinomadura</i>
IV	<i>Meso</i> -DAP, arabinosa y galactosa	<i>Faenia</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Gordonia</i> <i>Tsakmurella</i> <i>Dietzia</i> <i>Saccaromonospora</i> <i>Saccaropolyspora</i> <i>Mycobacterium</i>

Tabla 1. Composición de la pared celular de diferentes generos de bacterias. El género nocardia presenta una composición de ácidos meso-diaminopimelicos (*Meso*-DAP), arabinosa y galactosa; clasificandose con un quimiotipo de la pared celular tipo IV ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

1.4.1 CARACTERÍSTICAS DE *N. b.*

Es una bacteria Gram positiva, parcialmente ácido alcohol resistente, intracelular facultativa, filamentosa, inmóvil, saprófita, aerobia, su crecimiento es lento en medio Sabouraud, mycosel, Müeller, Hinton y BHI a una temperatura de 25-35°C, forma colonias de aspecto seco y rocoso, presentan una coloración amarilla. Contiene ácidos grasos con una longitud de 46 a 60 carbonos en su pared celular, azúcares como arabinosa y galactosa, además de ácido diaminopimélico, ácido murámico, ácidos micólicos, ácidos turbeculo-esteáricos y melaquinonas ^(6,17).

Dominio	Eubacteria
Reino	Bacterias
Filo	Bacterias
Clase	Actinobacteriae
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomicetales
Suborden	Corinebacterineae
Familia	Nocardiaceae
Género	<i>Nocardia</i>
Especie	<i>brasiliensis</i>

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *N. b.*, la cual pertenece a la clase Actinobacteriae, al orden Actinomicetales, suborden Corinebacterineae y familia Nocardiaceae ⁽⁶⁾.

En las infecciones de *N. asteroides*, esta bacteria al igual que *N. b.* posee un alto contenido lipídico y sufre modificaciones en diferentes etapas de crecimiento; volviéndose altamente poli-insaturado durante la fase logarítmica (fase virulenta), lo que no pasa en la fase estacionaria (fase menos virulenta) sugiriendo una existencia entre la asociación de componentes lipídicos y la patogenicidad ⁽¹⁸⁾

El sistema bioquímico para la identificación de *N. b.* consiste en la utilización de carbono como fuente de energía y presencia o ausencia de ciertas enzimas (Tabla 3 y 4 respectivamente) ⁽¹⁹⁾.

Glu	Ara	Suc	Xylo	Ino	Man	Fru	Rha	Cel
+	-	-	-	+	-	+	-	-

Tabla 3. Utilización de fuentes de carbono. *N. b.* es positivo para glucosa, inositol y fuctuosa.

Glu: glucosa, Ara: arabinosa, Suc: sacarosa, Xyl: xilosa, Ino: inositol, Man: manosa, Fru: fructosa, Raf: rafinosa, Cel: celobiosa.

Caseína	Xantina	Hipoxantina	Tirosina	Fusión de gel	Ureasa	Almidón	Esculina	Nitrato reductasa	Citrato	L-ramnosa	D-sorbitol
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabla 4. Perfil enzimático de *N. b.* la cual es positiva para caseína, hipoxantina, tirosina, Fusión de gel, Ureasa, Almidón, Esculina, Nitrato reductasa, Citrato.

Además, entre las pruebas para identificar los actinomicetos se encuentra el examen directo de los gránulos a partir de una muestra del tejido infectado, al que se añade KOH al 10%, para observar hifas o septación de filamentos.

La pared celular de esta bacteria, protege al organismo del medio ambiente, inicia las reacciones inflamatorias del hospedero, contribuye a la persistencia de una infección y a la resistencia a muchos antibióticos y contribuye a que alargue su vida.

1.5 EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

En 1999 Salinas Carmona y colaboradores desarrollaron un modelo de actinomicetoma por *N. b.* en ratones BALB/c infectados en el cojinete plantar. Típicamente en este modelo experimental, se produce inflamación aguda en los primeros 15 días de la infección, alcanzando su máximo alrededor de 1 semana después de la inoculación, presentando una disminución entre los días 7 y 15. Nuevamente la inflamación aumenta notablemente al día 30, considerando a la infección como establecida (infección crónica), el tamaño de la lesión sigue incrementándose conforme pasa el tiempo y causa una deformación tisular. Los ratones BALB/c infectados reproducen de manera muy similar la enfermedad que se desarrolla en humanos. El tamaño, y la gravedad de la lesión es clasificada tomando en cuenta el tamaño de la lesión, la presencia de úlceras y abscesos, así como la presencia de fístulas y el drenaje de micro colonias o gránulos del agente causal. En la tabla 5 se resumen los datos de esta clasificación ⁽²⁰⁾.

Tipo I	(+)	Edema ligero.
Tipo II	(++)	Edema de 7mm, abscesos y úlceras.
Tipo III	(+++)	Edema, abscesos y descarga de gránulos.
Tipo IV	(++++)	Micetoma completo, con forma elipsoide, edema, abscesos, úlceras, descarga de gránulos y fibrosis.

Tabla 5. Criterios de evaluación clínica del desarrollo del actinomicetoma por *N. b.* en ratones.

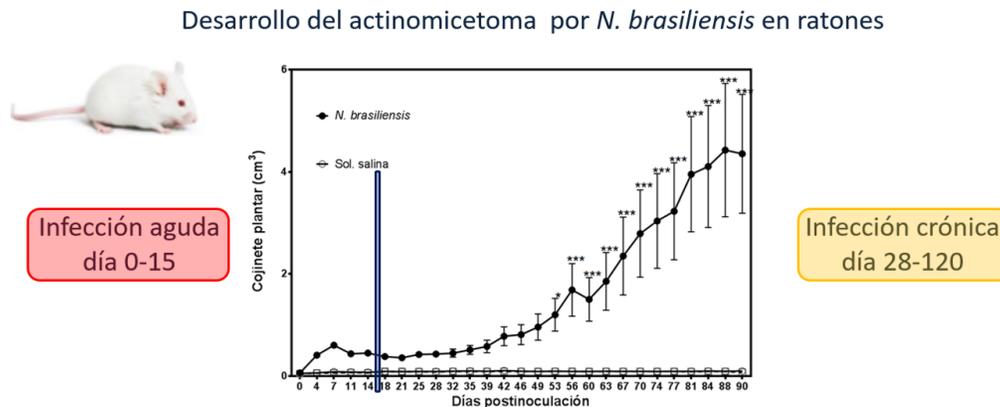


Figura 4. Fases de la infección por *N. b.* La infección aguda se presenta del día 0 al 15 post-infección, después del día 28 en adelante se considera la infección como establecida.

1.6 DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DEL ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

Salinas Carmona *et al*, en 1993 determinaron varios antígenos inmunodominantes mediante la técnica de electrotransferencia (western blot) identificando tres proteínas P61, P26 y P24, aislando y purificando P61 y P24, estas proteínas fueron utilizadas para desarrollar una técnica de ELISA que sirve para el diagnóstico serológico de *N. b.* Utilizando esta prueba, los pacientes con diagnóstico de actinomicetoma por *N. b.* fueron evaluados según su respuesta al tratamiento médico, comprobando que el título de anticuerpos contra- *N. b.*, se correlaciona clínicamente con la evolución de la enfermedad ⁽⁷⁾.

1.7 HISTOPATOLOGÍA DEL ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

Durante la infección por *N. b.* en humanos, en el sitio de la lesión se observa la presencia de una reacción inflamatoria granulomatosa con abscesos en el cual contiene gránulos del microorganismo infeccioso, estos consisten en masas de filamentos embebidos en cemento intracelular, rodeado de abundantes células polimorfonucleares (PMN), células mononucleares (linfocitos, monocitos, macrófagos células dendríticas, células espumosas), rodeado por una zona periférica de fibroblastos y colágena delimitando así los múltiples granulomas ^(1,6,21).

En el modelo murino de actinomicetoma por *N. b.*, se observa en las lesiones agudas un gran infiltrado de neutrófilos e inflamación, formación de microabscesos alrededor de gránulos de la bacteria y destrucción tisular ^(1,20,22). En la cronicidad el infiltrado inflamatorio agudo sigue presente y empiezan a aparecer granulomas fibrosos; compuestos por macrófagos, células gigantes multinucleadas, células espumosas, linfocitos y células plasmáticas, rodeados por una cápsula de tejido fibroso de colágena ⁽²⁰⁾. Con estos resultados se observó que los ratones BALB/c infectados, reproducen histológicamente una manera muy similar la enfermedad que se desarrolla en humanos.

Mifuji Lira *et al.*, (2016). desarrollaron y estudiaron un modelo de infección “pulmonar” por *N. b.* en ratones BALB/c y observaron el cambio en las poblaciones celulares dentro de los granulomas, reportando que al séptimo día post-infección la lesión granulomatosa no se encontraba bien estructurada y los linfocitos T (LT) y macrófagos, se encontraron distribuidos en toda la lesión sin observar un patrón característico. En el día 21, las distintas poblaciones celulares empezaron a adoptar una localización específica dentro del granuloma, donde los LT se encontraron en la periferia, envolviendo las lesiones, y los macrófagos se encontraron por dentro del anillo de LT. Al día 65, la estructura de los granulomas cambió encontrándose que el anillo de LT presentaba irregularidades, muchos granulomas presentaban un gran número de macrófagos espumosos.

1.8 RESPUESTA INMUNE INNATA EN LA INFECCIÓN POR *N. b.*

El sistema inmune innato comprende de barreras epiteliales, células y mecanismos inespecíficos que defienden de manera inmediata del establecimiento de la infección por otros organismos. Sus funciones principales incluyen: fagocitosis por macrófagos y PMN, citotoxicidad por Linfocitos Natural Killer (NK), reclutar células inmunes hacia los sitios de infección y de inflamación mediante la producción de citocinas, activar la cascada del sistema del complemento, activar el sistema inmunitario adaptativo mediante la presentación de antígenos.

Sin embargo, muchos patógenos han desarrollado mecanismos que les permiten evadir el sistema inmunitario innato.⁽²⁴⁾ Una de las estrategias de evasión que engañan a la inmunidad innata incluyen la inhibición de la formación del fagolisosoma, como ocurre en infecciones por *N. b.*

1.8.1 MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células fagocíticas que reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMs) y activan a los LT, mediante la presentación de antígenos y el tipo de respuesta dependerá del microambiente de citocinas y mediadores inmunológicos ⁽²⁵⁾.

Estas células son blancas en infecciones intracelulares y son activadas para aumentar su actividad microbicida ⁽²⁶⁾, por medio de Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN) y Oxígeno (ERO). Otros mecanismos independientes de los mencionados incluyen: acidificación de la vacuola fagolisosomal, acción de las enzimas hidrolíticas, ausencia de nutrientes o proteínas antimicrobianas ⁽²⁷⁾. La activación de los macrófagos es una condición necesaria para la protección contra *N. asteroides* y *N. b.*

N. b. es una bacteria intracelular facultativa, es decir puede multiplicarse tanto intracelularmente dentro de los macrófagos como extracelularmente. Un ejemplo de virulencia por bacterias del género *Nocardia spp.* es la presencia de α -trehalosa 66 dimicolato en su pared celular y se sugiere que inhibe la fusión de fagosoma con el lisosoma ⁽²⁸⁾.

Los macrófagos se observan durante el desarrollo de la lesión, pero no predominan en número, se encuentran asociados con el área de la fibrosis del granuloma y se llenan de lípidos y aumentando 2 o 3 veces su tamaño, especialmente durante la infección crónica, denominándolas como macrófagos espumosos ⁽²⁹⁾.

Por otra parte, en modelos experimentales con *Mycobacterium tuberculosis*, se publicó que las células gigantes espumosas son utilizadas como reservorios por el microbio y proporcionan un entorno rico en nutrientes que favorece la supervivencia intracelular de la bacteria ⁽³⁰⁾. En las Infecciones con *N. b.* también se ha detectado una presencia de dichas células (períodos tempranos y tardíos), localizándose debajo de la capa fibrótica que delimita un

microabsceso, ⁽¹⁾ pero su participación en el alojamiento y suministro de nutrientes a la bacteria no se ha estudiado ⁽¹³⁾.

En un modelo de conejo se logró disminuir el número de *N. asteroides* vivas incrementando el daño en su pared celular, cuando los macrófagos alveolares son activados al ser cultivados con linfocitos específicos obtenidos de los ganglios linfáticos, en presencia de suero inmune y surfactante ⁽³¹⁾.

1.8.2 NEUTRÓFILOS (Polimorfonucleares PMN)

Los neutrófilos eliminan la mayor parte de los microorganismos a través de las vías dependientes e independientes de oxígeno. A diferencia de lo que sucede en el caso del macrófago, *Nocardia* no es un microorganismo intracelular facultativo de los PMN. La función de estas últimas células es fagocitar y retardar el crecimiento bacteriano, ayudando a inducir una respuesta inmune adecuada ^(32,33).

Filice *et al.* (1985) determinaron en neutrófilos humanos infectados con *N. asteroides* que el porcentaje de la bacteria viable dentro de los PMN era del 10% y no eran muy efectivos al momento de eliminar estas bacterias y en caso de otras bacterias como *Listeria monocytogenes (Lm)* y *Staphylococcus aureus* casi tenían una eliminación total al cabo de 4 horas de incubación. Los PMN son capaces de inhibir su crecimiento; probablemente debido a que las células se activan y secretan varios tipos de citocinas (P. ej. IFN- γ) las cuales activan a su vez a los macrófagos y a los LT .

Se sugiere que la resistencia de *Nocardia* a los mecanismos bactericidas de macrófagos como de PMN, se debe a un incremento en los niveles de producción de catalasa y súper oxido dismutasa en las bacterias, bloqueos en la acidificación del fagosoma o cambios estructurales o bioquímicos de la pared celular bacteria, en donde se encuentra el dimicolato de trehalosa que inhibe la fusión de las membranas dependientes de calcio ⁽³⁴⁾

1.9 RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA EN LA INFECCIÓN POR *N. b.*

La función principal de las células presentadoras de antígeno (CPA) es el procesamiento de antígeno (Ag) para poder presentarlo en moléculas de histocompatibilidad (MHC) clase I o MHC clase II a LT CD4⁺ o T CD8⁺, respectivamente ⁽³⁵⁾. Las CPA que presentan antígenos a LT son los macrófagos, las células dendríticas (DC) y linfocitos B ⁽³⁶⁾.

La inmunidad adaptativa se define por la presencia de linfocitos, ya sean T o B. La proliferación y diferenciación de linfocitos representan funciones básicas del sistema inmune, ya que son necesarios para la expansión clonal de poblaciones específicas de linfocitos, para la adquisición de memoria inmunológica, y para la producción de anticuerpos ⁽³⁷⁾.

Existen dos tipos de respuesta inmune adquirida: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

La inmunidad humoral es mediada por linfocitos B y es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmunitario que atacan a los Ag son anticuerpos o proteínas del sistema del complemento. El mecanismo por el cual se activan los linfocitos B, se resume a continuación: Reconocen antígenos extraños a través de su receptor de membrana (BCR), estos linfocitos son estimulados por LT cooperadores (LTh) CD4⁺, estimulándolo a una expansión clonal y una diferenciación a célula plasmática, dejando de secretar anticuerpos IgM y secretando IgA, IgG ó IgE, dependiendo del estímulo.

En cuanto a la inmunidad celular es mediada por LT. Actúa como mecanismo de defensa en contra de los virus, células neoplásicas y microorganismos intracelulares, como algunas bacterias capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos como es el caso de *N. b.* En defensa frente a estas infecciones, los LT activados, inducen la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas.

Existen tres clases de linfocitos T:

Los LT cooperadores (CD4⁺) secretan interleucinas, moléculas que estimulan la proliferación de LT, la activación de linfocitos B y también la activación de los macrófagos, incrementando su capacidad fagocítica.

Los LT citotóxicos (CD8⁺) identifican antígenos virales o de infecciones intracelulares que se encuentran en la superficie de células infectadas. Luego de este reconocimiento proliferan, atacan y destruyen a estas células.

Los LT de memoria identifican el Ag en exposiciones sucesivas, iniciando una respuesta mucho más rápida que la que se produjo por primera vez ⁽³⁸⁾.

En infecciones virales crónicas en ratones y humanos se ha publicado que existe destrucción de la arquitectura tisular, además de fibrosis de los órganos linfoides secundarios. Los cambios en la arquitectura del tejido linfoide se han asociado a respuestas pobres de LT ⁽³⁹⁾.

1.9.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA INFECCIÓN POR *N. b.*

Se ha demostrado que en las infecciones crónicas por bacterias intracelulares como *M. tuberculosis* o *N. b.*, inducen una alta producción de anticuerpos, con una hipergamaglobulinemia policlonal en la electroforesis sérica ⁽⁴⁰⁾. La presencia de anticuerpos de memoria es un indicador de que la enfermedad está activa ⁽⁷⁾.

Los ratones BALB / c infectados experimentalmente con la cepa virulenta de *N. b.* ATCC 700358, responden con una alta respuesta de anticuerpos a los antígenos inmunodominantes y un aumento de la respuesta proliferativa de linfocitos en el bazo debido a la estimulación con antígenos ⁽¹⁾.

En pacientes y en ratones infectados experimentalmente con *N. b.* se han demostrado anticuerpos contra *N. b.* de diferentes isotipos: IgG, IgM e IgA ^(1,7,40,41).

Utilizando técnicas de inmunohistoquímica, se han localizado anticuerpos en los gránulos y células plasmática en ratones infectados experimentalmente con *N. b.* a las dos semanas y en sueros a los 30-45 días post infección ⁽⁴²⁾.

A pesar de la presencia de anticuerpos contra *Nocardia*, la inmunización pasiva por inyección de sueros hiperinmunes con anticuerpos del isotipo IgG a ratones no inmunizados, no ha conferido protección contra *N. b.* en el establecimiento del micetoma ⁽⁴¹⁾.

En experimentos de inmunización activa y pasiva se comprobó que los anticuerpos en el suero de ratones hiperinmunizados con antígenos de *N. b.*, a los días 7 posteriores a la primo infección con aumento de anticuerpos del isotipo IgM al igual que los anticuerpos monoclonales IgM pero no los IgG, administrados intraperitonealmente, eran capaces de conferir protección TOTAL en el micetoma experimental ^(40, 43).

Se produce una fuerte respuesta sistémica de anticuerpos en estos pacientes, pero no son útiles para resolver la infección. La respuesta proliferativa de linfocitos a la estimulación in vitro con antígenos purificados de *N. b.* también se incrementa como se ha demostrado en animales experimentales ^(40, 43).

1.10 RESPUESTA INMUNE CELULAR EN LA INFECCION POR *N. b.*

En diversos modelos animales al infectarlos con microorganismos intracelulares como *N. b.*, se ha propuesto que la inmunidad mediada por células, es el mecanismo que resiste estos tipos de infección, pero algunas veces no las resuelve. Aunque no se conoce información tan específica para el caso del micetoma producido por *N. b.*, en ratones y ratas deficientes en LT se ha demostrado la importancia de esta población celular para proteger contra la infección aguda o crónica. Esta respuesta se hace evidente por la reacción de hipersensibilidad tardía y la formación de granulomas.

Las evidencias y opiniones sobre la respuesta inmune mediada por células tienden a concordar en que la deficiencia en la inmunidad celular se acompaña de susceptibilidad mayor al desarrollo de nocardiosis y micetomas progresivos ⁽⁴⁴⁾

1.10.1 LINFOCITOS T CD4⁺ (cooperadores)

Esta subpoblación de linfocitos regula procesos mediante la producción de citocinas; mejorando la función y diferenciación de los macrófagos, manteniendo la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTc), estimulan a los linfocitos B en la producción de anticuerpos y son mediadores de la memoria inmunológica ⁽⁵⁰⁾.

Existen diferentes subpoblaciones de linfocitos T cooperadores de acuerdo a las citocinas que producen. Los linfocitos Th1 producen INF- γ , TNF- α e IL-12, estas últimas 2 citocinas favorecen la respuesta inmune celular ⁽⁵¹⁾. Los linfocitos Th2 son productores de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que colaboran en la producción de una respuesta inmune humoral ⁽⁵²⁾.

1.10.2 LINFOCITOS T CD8⁺ (citotóxicos)

Los linfocitos T citotóxicos (LTc) son los principales efectores de la respuesta inmune celular contra tumores, infecciones virales e intracelulares. Producen perforinas y granzimas las cuales son moléculas citolíticas y favorecen a la apoptosis celular ⁽⁵³⁾.

1.10.3 LT EN EL ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

Los LT constituyen la mayor parte de la población de linfocitos de sangre periférica, estos expresan en común el antígeno CD3, y a su vez se dividen en LTh CD4⁺ los cuales son activados en el contexto de MHC II ⁽⁵⁴⁾ en donde la respuesta inmune producirá citocinas y LTc CD8⁺ activado por MHC I y su función principal es eliminar células con alteraciones, infectadas por virus o microorganismos intracelulares ⁽³⁵⁾.

Durante infecciones agudas o en caso de la aplicación de vacunas, los LT vírgenes se activan y se diferencian en LT efectores en el transcurso de 1 a 2 semanas. Después del pico de expansión efectora, la resolución de la inflamación y la eliminación del Ag, la mayoría de los LT efectores mueren, pero persiste una subpoblación de LT de memoria ^(55,56). El papel de los LT durante la infección por *Nocardia* es principalmente la activación de macrófagos y la estimulación de la respuesta inmune celular ⁽⁵⁷⁾.

Existe considerable diversidad y complejidad de subconjuntos de LT de memoria después de infecciones agudas o vacunas ⁽⁵⁶⁾.

Mahgoub (1978) reportó respuestas defectuosas de LT en pacientes con micetoma, lo que sugirió que estas células eran necesarias para generar una adecuada resistencia del huésped contra *Nocardia* ⁽⁵⁸⁾.

En ratones atímicos infectados con bacterias vivas de *N. asteroides*, desarrollaron la infección diseminada y persistente, mientras que en los ratones normales ocurre infección localizada de menor duración ⁽⁵⁹⁾. En otros experimentos; se transfirieron LT de animales infectados con *N. asteroides* a ratones deficientes en este tipo de células y se observó un aumento en la capacidad del hospedero para eliminar la bacteria ⁽⁶⁰⁾. Con estos estudios se sugiere que la presencia de Timo y de la respuesta inmune celular es fundamental en la resistencia a estos microorganismos.

Folb *et al.*, (1977) infectaron ratones atímicos, (*nu/nu*) con *N. asteroides* y *N. b.* y encontraron que ambas especies producían una infección diseminada y con alta mortalidad en comparación con los controles. Estos ratones perdieron la habilidad de inducir granulomas en respuestas a *N. b.*, lo que sugirió el papel crucial que tienen los LT en la formación del mismo ⁽⁶¹⁾. Estos hallazgos fueron confirmados más tarde por Beaman y Scates ⁽⁶²⁾ con ensayos de *N. caviae*, en donde infectaron ratones normales, atímicos y asplénicos, encontrando que estos últimos fueron más susceptibles a los agentes infecciosos que los controles sin importar la vía de inoculación y que los

ratones deficientes en LT fueron incapaces de desarrollar micetomas típicos ^(14, 63).

La respuesta inmune celular contra *N. b.* se ha hecho evidente *in vivo* por la reacción de hipersensibilidad tardía ⁽⁶⁴⁾.

Demm *et al.* en 1983 observaron una población de LT específicos que eliminaron a *N. asteroides* por medio de una asociación de la pared celular del microorganismo y la membrana celular del LT, en ausencia de otras células como PMN o macrófagos. Esta habilidad de los LT puede ser considerada como un mecanismo de defensa del hospedero ⁽⁵⁹⁾.

Guimares *et al.*, (2003) caracterizaron la respuesta *in situ* del huésped humano al actinomicetoma y encontraron la presencia de LT CD4⁺ y CD8⁺ rodeando agregados de neutrófilos y macrófagos ⁽⁶⁵⁾.

1.10.4 AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T

Se ha sugerido que, en infecciones crónicas y cáncer, los LT están expuestos a un estímulo de antígeno y / o inflamatorio crónico y ese escenario a menudo se asocia con el deterioro de la función del LT: un estado llamado "agotamiento". Los LT agotados pierden funciones efectoras, expresan múltiples receptores inhibidores y están definidas por un programa de transcripción alterado. El agotamiento de LT a menudo se asocia con un control ineficiente de infecciones y tumores, pero la revitalización de estas células puede reactivar la inmunidad ⁽⁶⁶⁾.

Aunque el agotamiento de los LT previene el control óptimo de las infecciones y los tumores, modulan también vías sobre expresadas por agotamiento, por ejemplo, bloqueando proteína 1 de la muerte celular programada (PD1) y el antígeno linfocítico T citotóxico 4 (CTLA4) puede revertir este estado disfuncional y revitalizar respuestas inmunes ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Características	Linfocito T funcional	Linfocito T agotados
Potencial proliferativo	+++	+/-
Producción de citocinas	+++	+/-
Marcadores de memoria	+++	+/-
Receptores inhibidores	-	+++
Autorregulación por IL-7 y / o IL-15	++	-
Dependencia de antígeno	-	+

Tabla 6. Comparación de las características de los LT funcionales y los LT agotados. Los LT agotados disminuyen el potencial proliferativo, la producción de citocinas, los marcadores de memoria, la autorregulación por IL-7 o IL-15, sobreexpresan receptores inhibidores y son dependientes de antígeno.

También se ha reconocido que el deterioro de varias funciones inmunes es una característica notable observada con el aumento de la edad, tanto en humanos como en animales de experimentación ⁽⁷⁰⁾. Es llamativo que no todas las funciones inmunes parecen verse afectadas en la misma medida, algunas incluso parecen permanecer esencialmente intactas hasta una edad muy avanzada. La edad afecta en particular a varias funciones de los LT y altera el proceso de autoreconocimiento.

La disminución de la proliferación de LT después de la estimulación con lectina, en particular Con A, ha sido reconocida durante mucho tiempo como una característica destacada del envejecimiento inmunológico ^(71,72).

Estudios en ratones han revelado otros cambios asociados con la edad, como modificaciones en la composición de subpoblaciones celulares en diversos órganos linfoides y diferencias en la compartimentación de linfocitos (73).

Los estudios sobre el envejecimiento de los linfocitos han demostrado claramente que la capacidad proliferativa disminuida se basa no solo en la disminución de la producción de IL-2 (74-76), sino también en la disminución de la receptividad de IL-2. Consecuencia de una disminución en la densidad de los receptores IL-2 disponibles en la superficie celular.

Los primeros intentos de administrar la IL-2 sistémicamente en el hombre han demostrado algunos efectos secundarios transitorios, como dolor de cabeza y fiebre, y tiene una vida media corta de 5 a 7 minutos. El tratamiento con IL-2 durante la infección crónica por LCMV dio como resultado un aumento en el número de LT CD8⁺ específicos de antígeno y un aumento en el control viral, consistente con la reversión del agotamiento de los LT (77).

1.11 INTERLEUCINAS (IL) EN EL ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

En 2013 Mester y colaboradores determinaron en la infección crónica en ratones BALB/c infectados experimentalmente un aumento de la citocina interferón gamma (IFN- γ) (29).

La presencia local de interleucina IL-12 e IFN- γ en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. b.* (22, 78) indica la activación de una respuesta inmune celular Th1.

Los mecanismos patogénicos de *N. b.* incluye la generación de un microambiente inmunosupresor local para evadir la respuesta inmune protectora, favoreciendo su supervivencia y enfermedad crónica (13). La IL-10 es una citocina inmunoreguladora producida por varias células, incluidos macrófagos, células dendríticas, linfocitos T reguladores (*Treg*) y LT CD4⁺ (79,80).

La producción de IL-10 podría ser modificada por patógenos; este mecanismo se ha relacionado con la supervivencia de algunos patógenos, por ejemplo, la susceptibilidad a la infección por patógenos intracelulares se ha asociado con los niveles de IL-10 ⁽⁸¹⁾. Se ha encontrado respuestas similares a LT cooperadores 2 (Th2) en lesiones primarias y en ganglios linfáticos en infección por *S. somaliensis* y en infecciones después de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica por antígenos de *M. mycetomatis* ⁽⁵⁾.

Además, las moléculas solubles son una clase de señales que regulan el agotamiento de los LT, incluyendo citocinas inmunosupresoras como IL-10 y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) ⁽⁸²⁾.

La vía del receptor de IL-10 (IL-10R) ha recibido considerable atención por su papel en el agotamiento de los LT. EL bloqueo de IL-10 restaura la función de LT y mejora el control viral durante las infecciones virales crónicas, lo que sugiere que la IL-10 promueve el agotamiento de los LT ^(66, 83).

Los LT_{reg} en infecciones en fases agudas o crónicas también pueden suprimir la respuesta de los LT efectores y son una fuente de IL-10, TGF- β y quizás otras interleucinas supresoras como IL-35 ⁽⁸⁴⁾.

1.12 TRATAMIENTO DE ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

El actinomicetoma por *N. b.* es más sensible al uso de antibióticos y otros agentes químicos comparado con el tratamiento de los eumicetomas, esto hace que el tratamiento médico sea más efectivo en el caso de los actinomicetos. El tratamiento más empleado es trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), en combinación con amikacina durante varios meses o hasta 1 o 2 años. Aunque algunos pacientes no muestran respuesta a la terapéutica convencional en las fases más tardías, por lo que en estos casos suele recurrir a la cirugía ⁽⁶⁾. La afectación ósea, los casos diseminados y las ubicaciones especiales requieren un tratamiento combinado con amikacina y SXT.

El micetoma se puede prevenir con medidas sencillas, como usar ropa y zapatos de protección adecuada, especialmente en áreas rurales y durante actividades al aire libre ⁽⁸⁾.

CAPÍTULO 2

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El micetoma es uno de los problemas de salud más descuidados en todo el mundo. Se ve comúnmente en regiones tropicales y subtropicales y puede ser causado por hongos (llamándolo Eumicetoma) o bacterias (Actinomicetoma). Es una enfermedad infecciosa crónica, destructiva que eventualmente invade las estructuras profundas y los huesos y produce una deformidad y discapacidad masivas. Esta infección tiene una alta morbilidad y puede ser fatal. Sin embargo, su incidencia, prevalencia, inmunopatología, vía de infección, así como su susceptibilidad y resistencia no se conocen por completo. Esta brecha de conocimiento ha afectado gravemente el manejo del paciente y a la planificación adecuada para las medidas preventivas de micetoma. En la actualidad no se cuenta con una vacuna la cual proteja de esta enfermedad y los tratamientos convencionales son costosos, tóxicos y la terapia es de larga duración.

Los eventos inmunológicos que se producen durante este proceso infeccioso todavía no han sido bien esclarecidos. Además, poco se sabe sobre el inmuno-fenotipo de los elementos celulares de la reacción tisular del micetoma.

La presente investigación se dirigió al estudio de la respuesta inmune celular, mediante la cuantificación de las subpoblaciones de LT CD4⁺ Y CD8⁺ sistémica y localmente, durante las fases aguda y crónica de un modelo experimental de actinomicetoma por *N. b*. Debido a que actualmente existen pocos informes que han abordado el papel de la inmunidad celular en la patogénesis del micetoma en humanos y en modelos experimentales, esta información será útil para comprender los mecanismos de la inmunopatogenia en los LT en las diferentes fases de la enfermedad.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

En infecciones bacterianas crónicas como el actinomicetoma por *N. b.*, el número de LT puede ser uno de los mecanismos que contribuya a una falta de control de la infección.

Por lo anterior, es importante cuantificar por citometría de flujo a los LT CD4⁺ y CD8⁺ en el sitio de la lesión, en los órganos linfoides como el ganglio poplíteo y el bazo durante las fases aguda y crónica de la infección para comprender más claramente su inmunofisiopatología.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

En un modelo experimental de actinomicetoma por *N. b.*, la cantidad de LT aumentan en los órganos linfoides secundarios y en el sitio de la infección durante las etapas aguda y crónica.

CAPÍTULO 5

5.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar las subpoblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ en bazo, ganglio poplíteo y el sitio de la lesión durante el desarrollo de la infección de *N. b.* en ratones BALB/c.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar LT CD4⁺ y CD8⁺ en bazo, ganglio poplíteo y el sitio de la lesión durante la FASE AGUDA de la infección de *N. b.* en ratones BALB/c.
2. Determinar el número de LT CD4⁺ y CD8⁺ en bazo, ganglio poplíteo y el sitio de la lesión durante la FASE CRÓNICA de la infección de *N. b.* en ratones BALB/c.
3. Comparar la respuesta inmune local y sistémica en un modelo de actinomicetoma por *N. b.*

CAPÍTULO 6

ESTRATEGIA GENERAL

Se inoculó un caldo de BHI con una alícuota del cultivo de *N. b.* ATCC700358 a 37 °C por 72 h, una vez obtenido el cultivo se disgregó mecánicamente para obtener una suspensión bacteriana unicelular en la cual se determinó las U.F.C. de *N. b.* por la técnica de micro dilución en placa. Se infectaron ratones BALB/c con 100 µL de la suspensión la cual estuvo a una concentración de 1×10^6 UFC. A los días 0,3, 5, 7, 14, 60, 90, se registró la evolución clínica obteniendo medidas de inflamación en el tejido infectado, en esos mismos días los animales fueron sacrificados y se extrajeron el ganglio poplíteo y el bazo obteniendo también medidas de inflamación, se determinó la carga bacteriana y simultáneamente se analizó las suspensiones celulares de los 3 órganos mediante citometría de flujo.

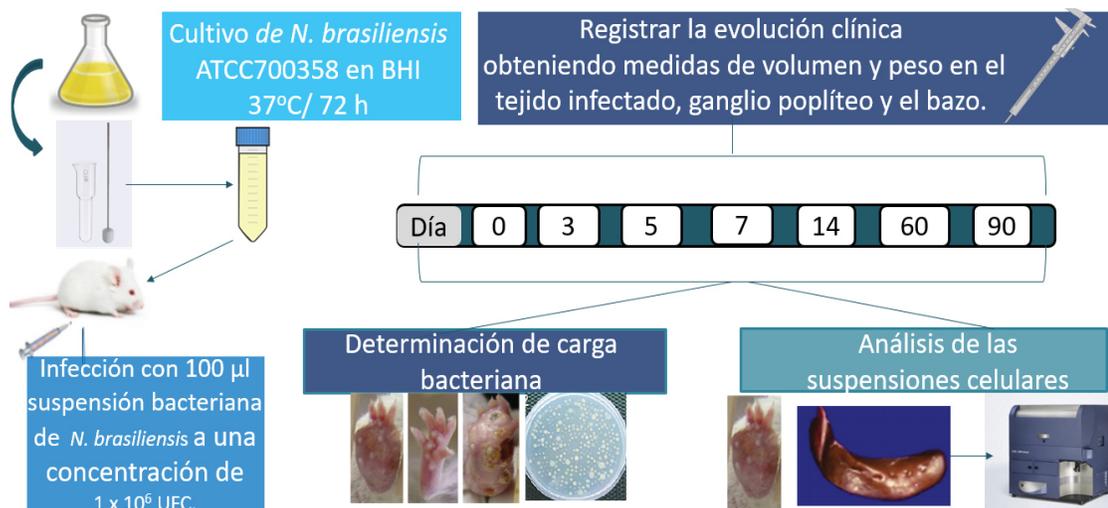


Figura 5. Esquema de la estrategia general del experimento. Se obtendrá una suspensión bacteriana para infectar a los ratones y determinar las medidas de inflamación, carga bacteria y análisis de las suspensiones bacterianas de los órganos antes mencionados.

CAPÍTULO 7

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1.1 ANIMALES

En esta investigación se trabajó con ratones BALB/c hembras de 10 a 14 semanas de edad, libres de patógenos, mantenidos bajo condiciones BSL2 en el laboratorio de experimentación de animal del servicio de Inmunología. Se les proporciono alimento comercial LabDiet, la cual contiene una composición bromatológica ideal para alimento de roedores de laboratorio y agua estéril *ad libitum*. Los animales se observaron diariamente y la iluminación será 12/12 controlada automáticamente, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999. Este proyecto fue aprobado por el Comité de ética y el Comité Interno para el cuidado y uso de los animales del laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio Gonzalez” de la U.A.N.L. bajo el siguiente número de registro: IN18-00006.

7.1.2 CEPA BACTERIANA

En este proyecto se utilizó la cepa de referencia *N. b.* ATCC700358. La cual se cultivó en caldo BHI y se incubó por 72h a 37 °C.

7.1.3 OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN UNICELULAR BACTERIANA.

De la cepa *N. b.* ATCC700358, se inoculó una alícuota en matraces Erlenmeyer de 125 ml, los cuales contenían 30 ml de caldo BHI estéril (121 °C por 15 minutos a 15 libras de presión). Una vez sembrado se incubó a 37 °C durante 72 hrs. Después, la masa bacteriana se recuperó de los matraces y se colocaron en tubos cónicos y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y la masa bacteriana depositada en el sedimento se lavó con solución salina estéril (S.S.E.), repitiendo el proceso de centrifugación y lavado 2 veces más. Después de realizar los lavados, las bacterias se disgregaron y homogenizaron con un Potter-Evelham para obtener una suspensión

unicelular, se usó una alícuota de la suspensión antes mencionada, para determinar las UFC mediante el método de microdilución de Miles y Misra y conocer la concentración de UFC de la suspensión.

7.1.3.1 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN DE MILES Y MISRA PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO.

Con alícuotas de una suspensión unicelular de *N. b.* se prepararon soluciones seriadas 1:10 en S.S.E., desde $1:10^1$ hasta $1:10^8$. En placas de agar BHI, se depositaron por triplicado 20 μ L de cada una de las diluciones de la suspensión bacteriana. Después de una incubación de 5 días a 37°C (Incubadora Microbiologica J.M Ortiz, México), se registró el número de UFC presentes en cada alícuota y se estimó la cantidad de UFC/ml (con ayuda de un cuenta colonias Quebec Darkfield, Reichert-Jung) por multiplicación del número promedio de colonias desarrolladas en las 3 alícuotas de la misma dilución por el factor del volumen de muestra (50) y por el factor de dilución. Se ajustó el número de UFC obtenidas, para tener en 100 μ l de la suspensión bacteriana una concentración de 1×10^6 UFC ⁽⁸⁵⁾.

7.1.4 INFECCIÓN EXPERIMENTAL.

La infección se indujo en ratones BALB/c hembras de 10 a 14 semanas, los cuales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con 200 μ l de una combinación de ketamina 100mg/ml y xilazina 20mg/ml (2 y 0.4 mg respectivamente). Se les inoculó 100 μ L de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC de *N. b.* en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera ⁽²⁰⁾. Los tejidos del cojinete plantar, el bazo y el ganglio poplíteo de cada animal se extirparon quirúrgicamente a los 0, 3, 5, 7, 14, 60 y 90 días después de la infección. El grupo control (día 0) fue inoculado con 100 μ L de PBS en el cojinete plantar.

7.1.5 MONITOREO DE LOS RATONES.

Los ratones infectados fueron observados diariamente hasta el día de su sacrificio.

7.1.5.1 EUTANASIA

Los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal, con la metodología antes señalada, una vez sedados, se sacrificaron vía dislocación cervical en los tiempos designados en este trabajo.

7.2.- EVALUACIÓN CLÍNICA

La inflamación observada en el cojinete plantar de cada ratón, fue medida con un vernier en los días señalados del estudio. Se empleó la ecuación de la elipse (ancho x alto x largo) multiplicando el producto por el factor 0.5235999. De esta manera se obtuvo el volumen de los cojinetes plantares en cm³. Además, se midió y pesó el bazo y el ganglio poplíteo.

7.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO Y GANGLIO POPLÍTEO DE RATONES INFECTADOS.

En condiciones de esterilidad y en frío se extrajo el bazo y ganglio poplíteo izquierdo, realizando una perfusión con medio RPMI 1640 con 10% de FBS, 1% de Glutamina, Penicilina y Estreptomicina (10,000 U/mL y 10 mg/mL respectivamente) y se obtuvo una suspensión celular mediante una disgregación de los órganos, respectivamente.

Las células obtenidas se recuperaron en tubos cónicos de 50ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 1800 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1ml de RPMI al 10% y se le añadió 10 ml de solución de lisis al 1X (NH₄Cl) para eliminar eritrocitos, se agitó el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se repitió el paso de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó 2 veces con 10ml de RPMI 1640, las células se resuspendieron en 5ml de S.S.E y se contaron en una cámara de Neubauer para ajustar la suspensión a 1×10^5 células.

7.4 DIGESTIÓN Y OBTENCIÓN DE CÉLULAS DEL COJINETE PLANTAR

El cojinete plantar infectado se obtuvo de los diferentes grupos de ratones sacrificados, estos fueron desinfectados limpiándolos con iodopovidona mediante movimientos circulares por 10 minutos y se colocaron en medio RPMI completado (cRPMI) con glutamina, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U de penicilina / ml, 100 g de estreptomycin / ml y 10% de Suero Fetal Bovino. Se le agregó colagenasa X a cRPMI en una dilución 1:10 y la muestra se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se realizó unos cortes al cojinete plantar con unas tijeras estériles y el tejido digerido se maceró empujando suavemente con un embolo a través de un tamiz celular estéril con un poro de 40 µm (marca Corning 431750) durante el tiempo de incubación. Una vez obtenidas las células se centrifugó a 3,000 x 3 min. a 4 °C. Los glóbulos rojos de la muestra fueron eliminados con la solución de lisis al 1X (NH₄CL), se agitó el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se repitió el paso de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó 2 veces con 10ml de RPMI 1640, las células se resuspendieron en 5ml y se contaron en una cámara de Neubauer para ajustar la suspensión a 1×10^5 células⁽⁷⁸⁾.

7.5 DETERMINACIÓN DE CARGA BACTERIANA. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Una vez obtenidas las suspensiones celulares del cojinete plantar, el bazo y el ganglio poplíteo, se utilizó una alícuota de 100 µl y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en S.S.E. En la superficie de una placa de agar granulada (BBL) 2% p/v en BHI se depositaron 3 alícuotas de 20 µl de cada una de las diluciones de la bacteria, en cada placa 2 muestras (diluciones) distintas. Después de 5 días de incubación a 37°C (Incubadora Microbiológica J.M.Ortiz, México), se registró el número de UFC presentes en cada alícuota (con ayuda de un cuenta colonias Quebec Darkfield, Reichert-Jung)

y se estimó la cantidad de UFC/ml por multiplicación del número promedio de colonias desarrolladas en las 3 alícuotas de una misma dilución por 50 (factor de volumen de muestra) y por el factor de dilución ⁽⁸⁵⁾.

7.6 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las suspensiones celulares del cojinete plantar, el ganglio poplíteo y el bazo fueron ajustadas a 10^5 células/mL, se centrifugaron como se mencionó en el punto 7.3, se añadió 1 ml de buffer bloqueador por 30 minutos, incubándose en hielo. Posteriormente se realizó un lavado con PBS, se centrifugó, resuspendiendo con 125 μ L de buffer FACS e incubando con anticuerpos monoclonales (MAb) que reconocen moléculas de superficie de membrana de los linfocitos T. Los MAb de rata anti.-raton utilizados fueron: Anti-CD8, Anti-CD4 y Anti-CD3, conjugados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Pacific blue y alofococianina (APC-Cy7) respectivamente.

Estos Mabs fueron adquiridos de la casa comercial Becton Dickinson (BD). La incubación se llevó a cabo a 4 °C durante 30 min. en la oscuridad. Finalmente se realizó un lavado con PBS y su respectiva centrifugación para después resuspender el paquete celular en 300 μ L de PBS y se las células se fijaron con 30 μ L de paraformaldehído al 2%. La adquisición de las células se realizó en el citómetro LSR Fortessa o FACS Canto II. Los resultados fueron analizados utilizando el Flowing Software 2.

7.6.1 INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS T DE BAZO, GANGLIO POPLÍTEO y COJINETE PLANTAR EN LOS RATONES INFECTADOS.

Se realizó la titulación de los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos que se utilizan en citometría de flujo, dando por resultado las siguientes diluciones óptimas: Mab anti-CD8 1:200, anti-CD4 1:400 y anti-CD3 1:200.

Se utilizó un tubo con una muestra sin marcar con Mabs para determinar la autofluorescencia y nos sirvió como control negativo. También se utilizó un control de isótipo como un segundo control negativo.

Se utilizó 3 µl de los Mabs mencionados para marcar las células. Debido a que la señal de fluorescencia no se traslapaba entre los 3 fluorocromos, se agregaron los 3 mabs en un tubo con la muestra de ganglio, bazo o cojinete plantar, respectivamente.

Finalmente, los tubos se guardaron a 4°C y se cubrieron con papel aluminio. Las células se adquirieron en el citómetro de flujo ajustándose a 10,000 eventos. Los resultados se analizaron para cuantificar las subpoblaciones de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a nivel sistémico (bazo) y local (cojinete plantar y ganglio poplíteo) en el modelo de actinomicetoma experimental por *N. b.*

Anticuerpo	Dilución	Clona	Fluorocromo	Compañía	N _o de Catálogo
Anticuerpo (de superficie) de rata anti-ratón					
Anti-CD3	2 µg	17A2	APC-CY7	BD Biosciencias	560590
Anti-CD4	2 µg	RM4-5	Pacific Blue	BD Biosciencias	558107
Anti-CD8	2 µg	53-6.7	V 500	BD Biosciencias	560776

Tabla 7. Anticuerpos monoclonales empleados en la citometría de flujo de este trabajo.

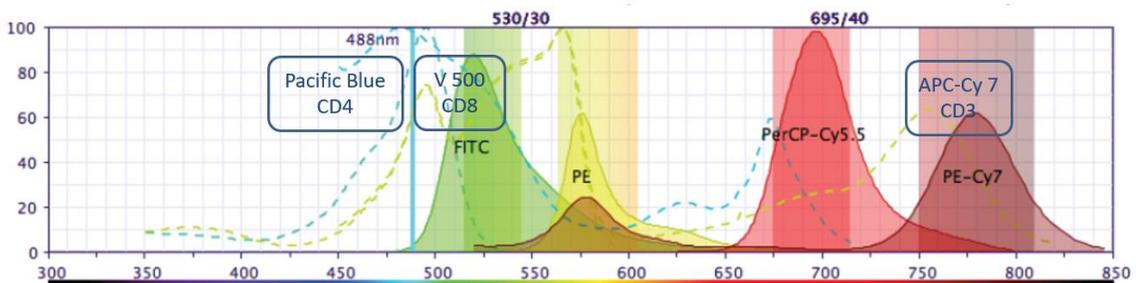


Figura 6. Espectro de absorción y emisión de los anticuerpos utilizados en este trabajo. (CD4 Pacific Blue, CD8 FITC, CD3 APC-Cy7).

8.1. Análisis estadístico

Los datos de la determinación de UFCs, la determinación del peso y volumen y la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar durante las fases aguda y crónica de la infección por *N. b.* fueron tratados con ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunnet. Para la comparación de linfocitos TCD4⁺ y CD8⁺ a nivel local y sistémico, se utilizó pruebas de T de student, con una significancia de $P < 0.05$. Estos datos fueron graficados como promedio \pm SD, con ayuda del programa estadístico GraphPad Prim V. 8.0.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS

8.1.1 DETERMINACIÓN DE LAS UFC/mL EN LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN POR *N. b.*

De las suspensiones celulares obtenidas de bazo, cojinete plantar y el ganglio poplíteo, se adquirió una alícuota de estos para determinar el número de UFC/mL mediante el método de microdilución de Miles y Misra ⁽⁸⁵⁾. Realizando estas determinaciones por triplicado en cada uno de los órganos de estudio. Se consideraron los días 3, 5, 7 y 14 como la fase aguda de la Infección por *N. b.*

Se observó que en el bazo, en ningún día de estudio existió presencia de UFCs.

En ganglio poplíteo se determinó 6.15×10^3 UFCs al día 3 post-infección, pero esta cantidad fue disminuyendo conforme pasaban los días hasta que en el día 14 ya no se detectó UFCs en este órgano.

En el cojinete plantar se observó al día 3 de la post-infección fue de 1.65×10^5 UFCs disminuyendo conforme avanzaba la infección hasta el día 14 en donde se determinaron solo 6×10^2 UFCs.

Los resultados se presentan a continuación en las siguientes tablas (8-10) y en la figura 7.

A) Bazo	
Día 0	0
Día 3	0
Día 5	0
Día 7	0
Día 14	0

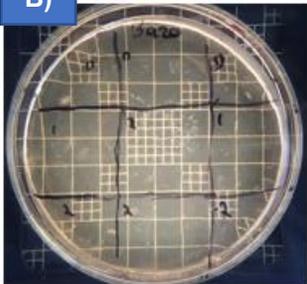


Tabla 8. A) Tabla de resultados de la detección de UFCs en bazo durante los diferentes días post-infección de la fase aguda. B) Imagen representativa del método de microdilución de Miles y Misra en donde no se observan UFC en el bazo.

A) Ganglio	
Día 0	0
Día 3	6.15×10^3
Día 5	2.43×10^2
Día 7	1.6×10^1
Día 14	0

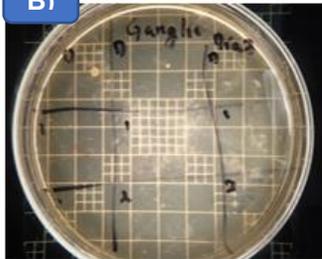


Tabla 9. A) Tabla de resultados de la detección de UFCs en ganglio poplíteo durante los diferentes días post-infección de la fase aguda. B) Imagen representativa del método de microdilución de Miles y Misra en donde se observan UFC en el ganglio poplíteo.

A) Cojinete plantar	
Día 0	0
Día 3	1.65×10^5
Día 5	1.5×10^5
Día 7	1.66×10^4
Día 14	6×10^2



Tabla 10. A) Tabla de resultados de la detección de UFCs en cojinete plantar durante los diferentes días post-infección de la fase aguda. B) Imagen representativa del método de microdilución de Miles y Misra en donde se observan UFC en el cojinete plantar.

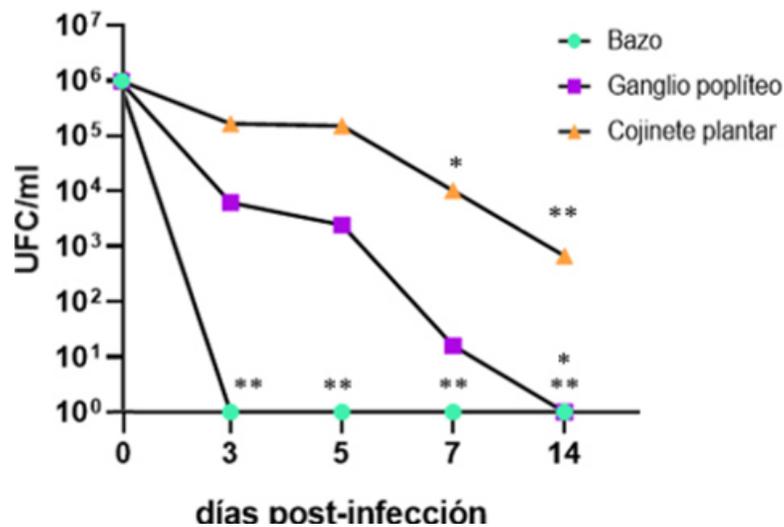


Figura 7. Determinación de las UFC/mL en bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar. Los ratones (n=3) se infectaron con 1×10^6 UFC de *N. brasiliensis*. En bazo no hubo presencia de UFC en ningún tiempo analizado, en ganglio poplíteo se observó presencia de UFC al día 3 y fue disminuyendo significativamente conforme transcurren los días, en el cojinete se observó UFC's desde el día 3 y disminuyó significativamente durante el día 7 y 14. ANOVA de una vía < 0.05 , Comparación múltiple de Dunnett's: * < 0.5 , ** < 0.01 .

8.1.2- DETERMINACIÓN DE PESO Y VOLUMEN DE LOS ÓRGANOS EN LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN POR *N. b.*

El bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar se midieron mediante un vernier y se pesaron durante los días post-infección de la fase aguda. Se observó un gran aumento de volumen en el cojinete plantar al día 3, pero fue disminuyendo hasta el día 14 post-infección. El ganglio poplíteo y el bazo fueron aumentando de volumen conforme transcurría el tiempo.

En cuanto al peso se puede observar que conforme transcurre el tiempo el ganglio poplíteo y el bazo aumentaron.

Estos resultados antes mencionados se pueden observar en las figuras 8 a 11.



Figura 8. Aumento del volumen de los bazo en la fase aguda de la infección.



Figura 9. Aumento del volumen de los ganglios poplíteos en la fase aguda de la infección.



Figura 10. Aumento del volumen de los cojientes plantares en la fase aguda de la infección.

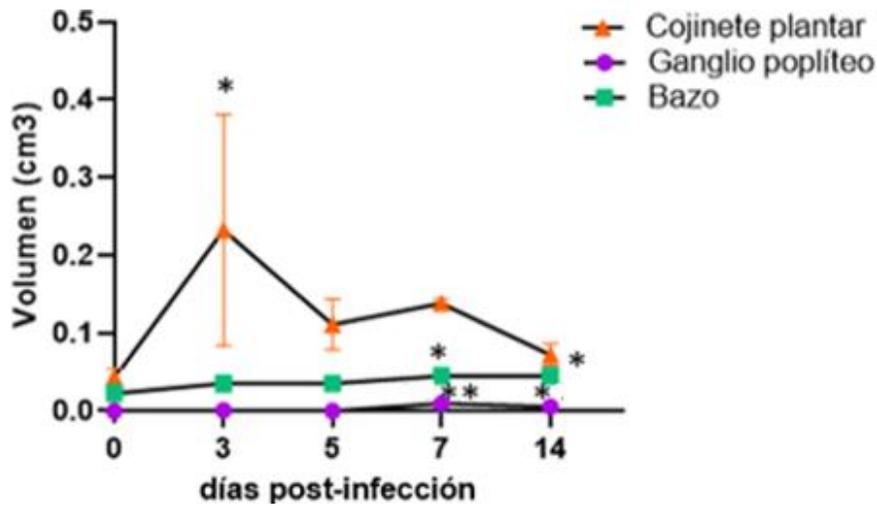


Figura 11 Determinación del volumen del bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar en la fase aguda de la infección por *N. b.* Los órganos de los ratones (n=3) se midieron; se utilizó la fórmula elipsoide para calcular los datos del volumen. El volumen del cojinete plantar se incrementó significativamente a partir del día 3 y posteriormente empezó a disminuir hasta el día 14 en donde no hay una diferencia significativa. En el Bazo y ganglio poplíteo existe un aumento estadísticamente significativo en los días 7 y 14. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: * < 0.5, ** < 0.01.

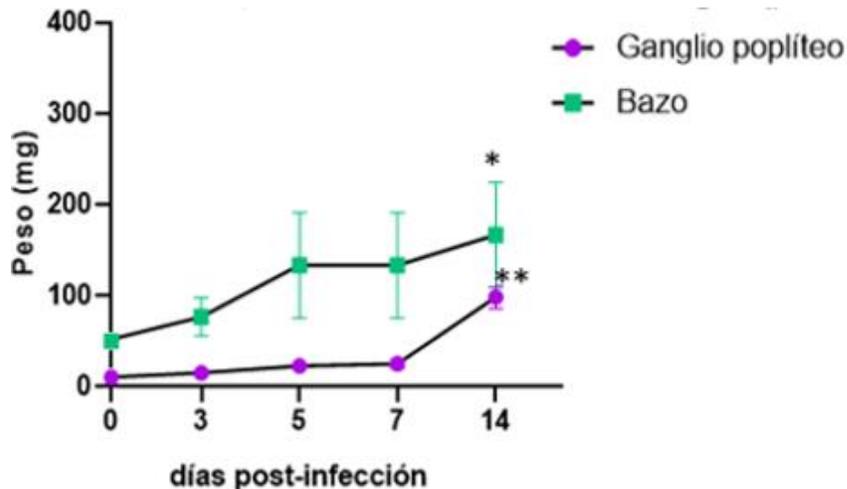


Figura 12 Determinación del peso del bazo y ganglio poplíteo la fase aguda de la infección por *N. b.* Los órganos de los ratones (n=3) se pesaron. El peso de los órganos aumenta conforme avanza la infección teniendo diferencia significativa para el día 14 en ganglio y bazo respectivamente. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: * < 0.5, ** < 0.01.

8.1.3- CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LT CD4⁺ Y CD8⁺ EN LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN POR *N. b.*

Las suspensiones celulares obtenidas de los bazo, ganglios poplíteos y cojinetes plantares fueron marcadas con anticuerpos monoclonales Anti-CD3, Anti-CD4 y Anti-CD8. La adquisición de las células se realizó en el citómetro LSR Fortesa o FACS Canto II. Los resultados fueron analizados utilizando el Flowing Software 2.

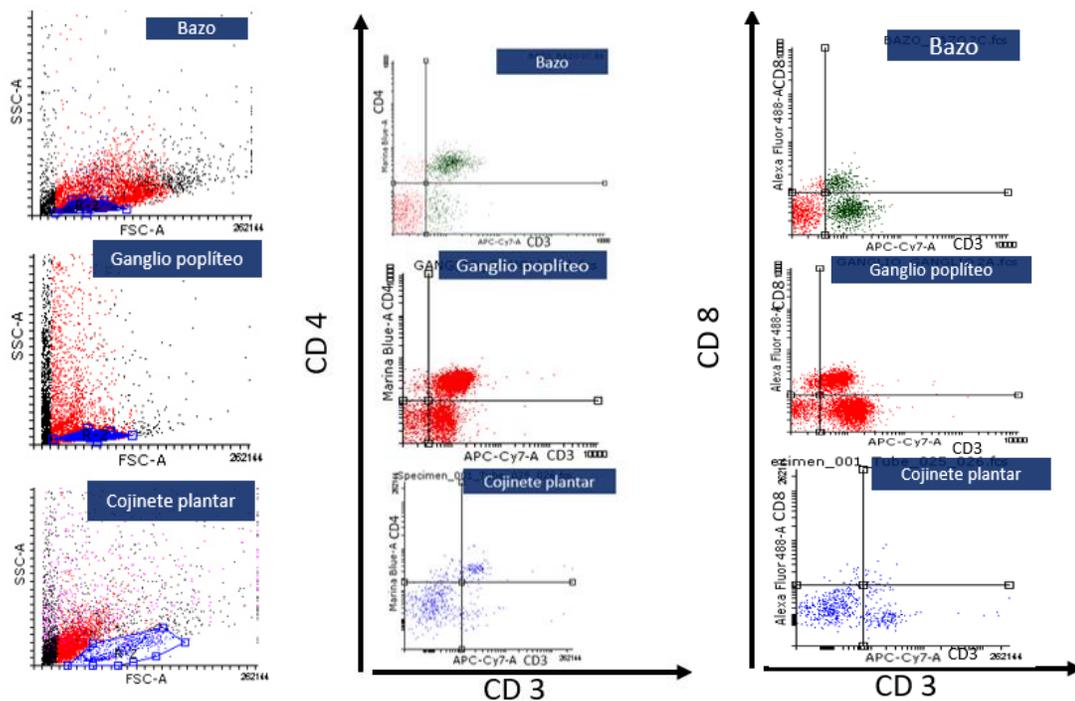


Figura 13. Imágenes representativas de la citometría de flujo de la fase aguda de la infección por *N. b.* A) La figura azul delimita la región de linfocitos en los diferentes órganos. B) Marcaje doble para los linfocitos CD3⁺/CD4⁺. C) Marcaje doble para los linfocitos CD3⁺/CD8⁺.

En el bazo se observó un incremento significativo en el porcentaje de LT CD3⁺/CD4⁺ a los días 5 y 7. En el ganglio poplíteo se pudo observar una disminución al día 5 pero no fue estadísticamente significativa. En cojinete plantar se observó un aumento significativo de linfocitos al día 14. Todos los resultados fueron comparados con el día 0 que fue el control.

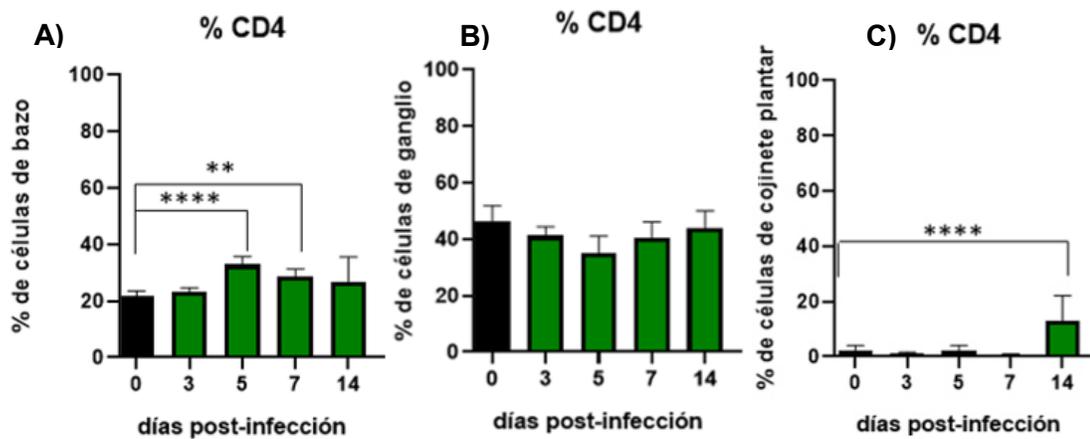


Figura 14. Cuantificación del porcentaje de LT CD4⁺ en la fase aguda de la infección por *N. b.* Se realizaron suspensiones celulares de los ratones infectados (n=3) a los días señalados, marcando a los linfocitos con anticuerpos monoclonales Anti-CD3 y Anti-CD4 para analizarlos por citometria. A) En el bazo se observa un aumento significativo del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ al día 5 y 7. B) En el ganglio existe una disminución del porcentaje al día 5 y 7 pero sin diferencia significativa. C) En el cojinete se determinó una gran diferencia significativa al día 14. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: ** < 0.01, **** < 0.0001.

Los números absolutos de linfocitos T CD3⁺/CD4⁺ en la fase aguda de la infección de los órganos antes mencionados, se muestran a continuación:

En el bazo no se encontró una diferencia significativa del número absolutos de linfocitos T CD4⁺ durante la fase aguda comparados con el valor control presentado al día 0. El ganglio poplíteo presentó una disminución significativa al día 7 post-infección el cual se recuperó al día 14. En el cojinete plantar se determinó un aumento en la presencia de LT CD4⁺ con diferencia significativa al día 14.

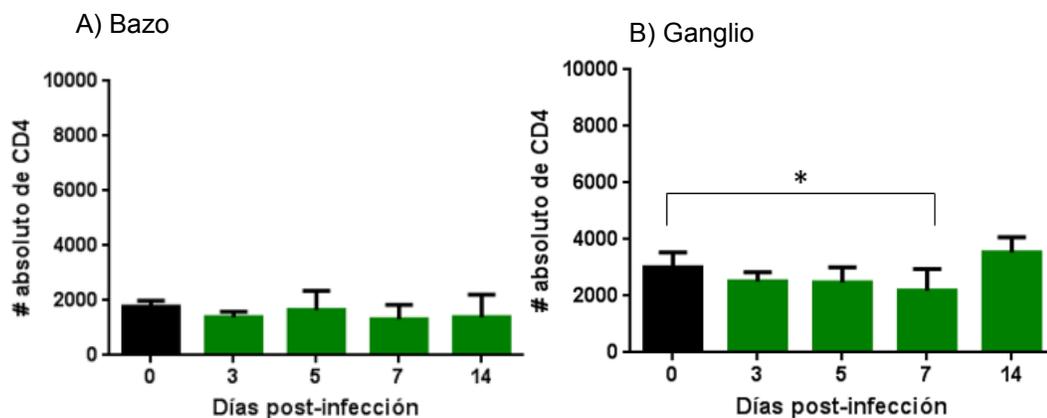


Figura 15. Determinación de los números absolutos de LT CD4⁺ en la fase aguda de la infección por *N. b.* A) En el bazo no se observa un aumento significativo en el número absoluto de linfocitos T CD4⁺. B) En el ganglio existe una disminución significativa en el número absoluto de linfocitos T CD4⁺ al día 7 post-infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: **< 0.01, ****< 0.0001.

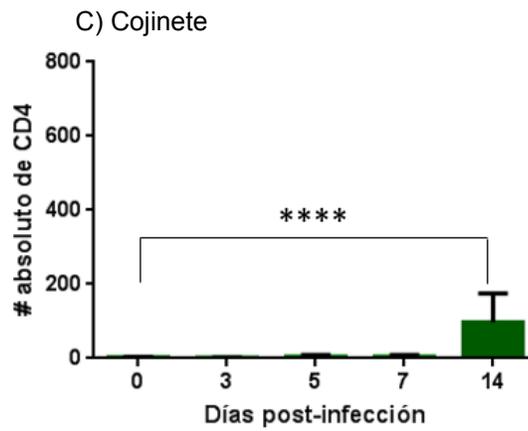


Figura 16. Determinación de los números absolutos de LT CD4⁺ del cojinete plantar en la fase aguda de la infección por *N. b.* A) Se observa un aumento significativo en los números absolutos de linfocitos T CD4⁺ al día 14 post-infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: **< 0.01 , ****< 0.0001.

En cuanto al porcentaje de los linfocitos T CD3⁺/CD8⁺, no se encontró una diferencia significativa en el bazo conforme avanzaba los días de la infección, en el ganglio poplíteo se determinó un aumento significativo al día 3, después disminuyeron al día 5, aumentando nuevamente en el día 14 post-infección. Por otro lado, en el cojinete plantar solo se detectó una presencia significativa al día 14. Todos los resultados fueron comparados con el día 0 que fue el control.

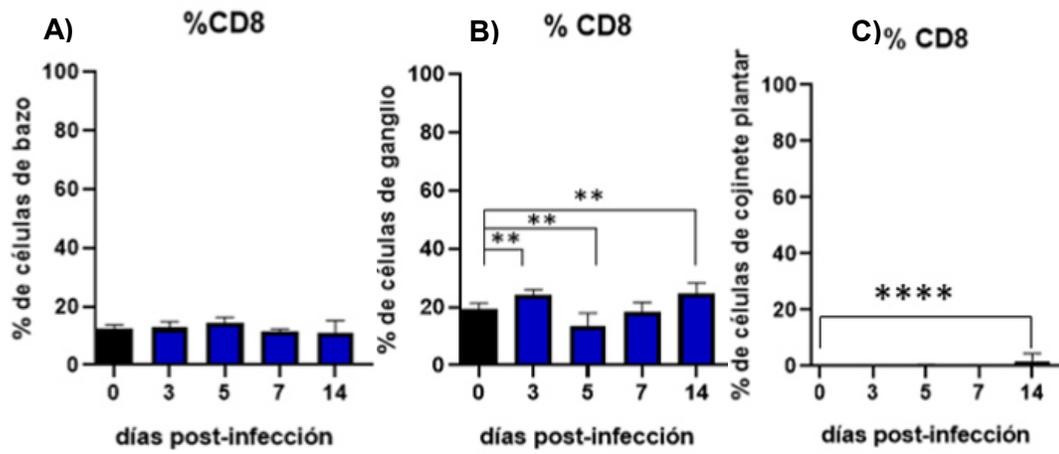


Figura 17. Cuantificación del porcentaje de LT CD8⁺ en la fase aguda de la infección por *N. b.* Se realizaron suspensiones celulares de los ratones infectados (n=3) a los días señalados, marcando a los linfocitos con anticuerpos monoclonales Anti-CD3 y Anti-CD8 para analizarlos por citometria. A) En el bazo no se observa diferencia significativa en los porcentajes de linfocitos T en los días de estudio. B) En el ganglio existe un aumento significativo del porcentaje al día 3, 14 y una disminución significativa al día 5. C) En el cojinete hubo una gran diferencia significativa al día 14. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: **< 0.01, ****< 0.0001.

Los números absolutos de linfocitos T CD3⁺/CD8⁺ en la fase aguda de la infección de los órganos antes mencionados, se muestran a continuación:

En el bazo se determinó una disminución significativa del número absolutos de linfocitos T CD8⁺ a los días 5, 7 y 14 post-infección, comparados con el valor control presentado al día 0. El ganglio poplíteo presentó un aumento significativo al día 14 post-infección. En el cojinete plantar se determinó un aumento en la presencia de linfocitos T CD8⁺ con diferencia significativa al día 14.

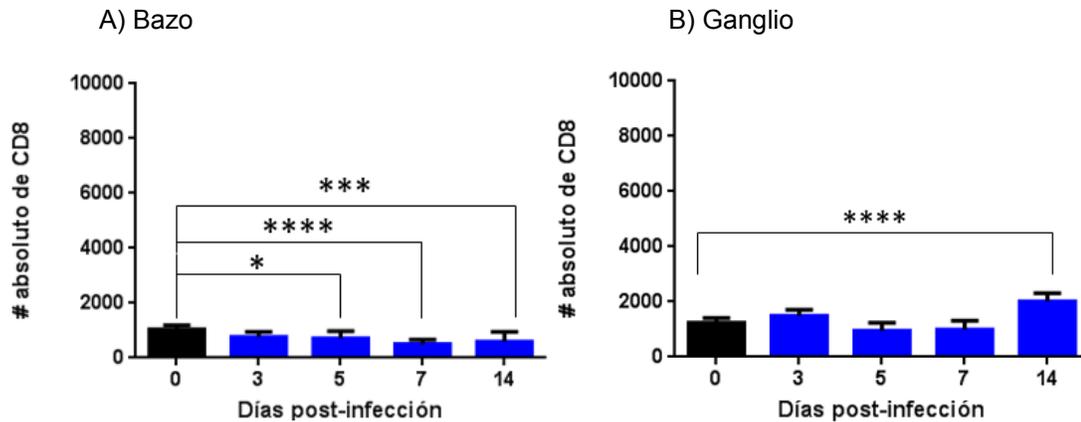


Figura 18. Determinación de los números absolutos de LT CD 8⁺ en la fase aguda de la infección por *N. b.* A) En el bazo se observa una disminución significativa en el número absoluto de linfocitos T CD8⁺ al día 5,7,14 y 60. B) En el ganglio existe un aumento significativo en el número absoluto de LT CD8⁺ al día 14 y disminuye al 60 post infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnet's: **< 0.01 ,**** < 0.0001.

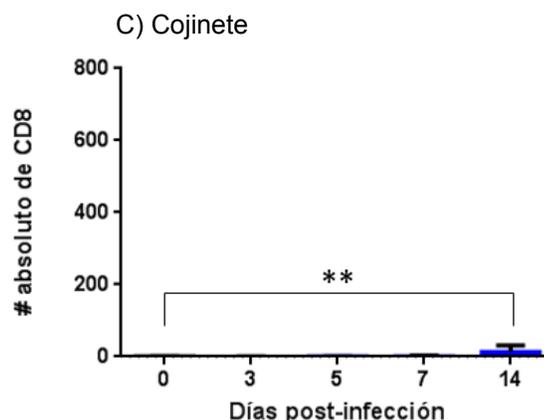


Figura 19. Determinación de los números absolutos de linfocitos T CD8⁺ del cojinete plantar en la fase aguda de la infección por *N. b.* Se observa un aumento significativo en los números absolutos de LT CD8⁺ al día 14 post-infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnet's: **< 0.01 ,**** < 0.0001.

8.2.1- DETERMINACIÓN DE LAS UFC/mL EN LA FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN POR *N. b.*

Se determinaron las UFC en bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar como se mencionó en el punto 8.1.1. y se consideraron los días 60 y 90 como la fase crónica de la Infección por *N. b.*

Tanto en el bazo como en el ganglio poplíteo no se encontró la presencia de UFCs en la fase crónica de la infección, por que ya habían desaparecido en la fase aguda.

En cambio, en el cojinete plantar se observó al día 60 de la post-infección 8.3×10^3 UFCs y un incremento al día 90 con 1×10^4 .

Los resultados se presentan a continuación en las siguientes tablas (11-13) y en la figura 20, en donde se diferencia la fase aguda con color rojo y la fase crónica con color amarillo.

A) Bazo	
Día 0	0
Día 60	0
Día 90	0

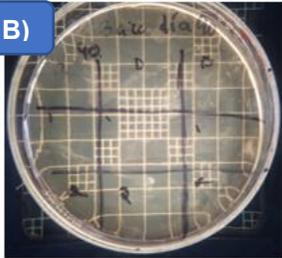


Imagen B) muestra un plato de microdilución de Miles y Misra para el bazo. El plato contiene una cuadrícula de 10x10 pozos. Se observan líneas de dilución que indican la ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC) en el bazo.

Tabla 11. A) Resultados de la detección de UFCs en bazo durante los diferentes días post-infección de la fase crónica. B) Imagen representativa del método de microdilución de Miles y Misra en donde no se observan UFC en el bazo.

A) Ganglio	
Día 0	0
Día 60	0
Día 90	0

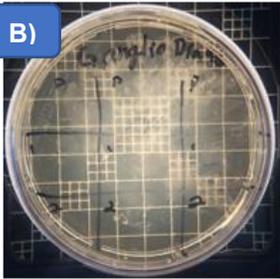


Imagen B) muestra un plato de microdilución de Miles y Misra para el ganglio. El plato contiene una cuadrícula de 10x10 pozos. Se observan líneas de dilución que indican la ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC) en el ganglio.

Tabla 12. A) Resultados de la detección de UFCs en ganglio poplíteo durante los diferentes días post-infección de la fase crónica. B) Imagen representativa del método de microdilución de Miles y Misra en donde no se observan UFC en el ganglio poplíteo.

A) Cojinete	
Día 0	0
Día 60	8.3×10^3
Día 90	1×10^4

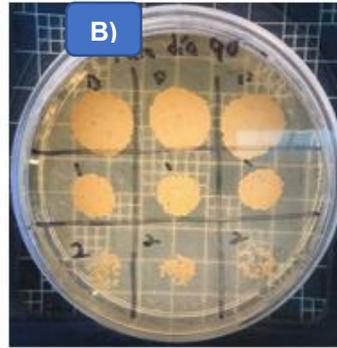


Tabla 13. A) Tabla de resultados de la detección de UFCs en cojinete plantar durante los diferentes días post-infección de la fase crónica. B) Imagen representativa del método de microdilución de Miles y Misra en donde se observan UFC en el cojinete plantar.

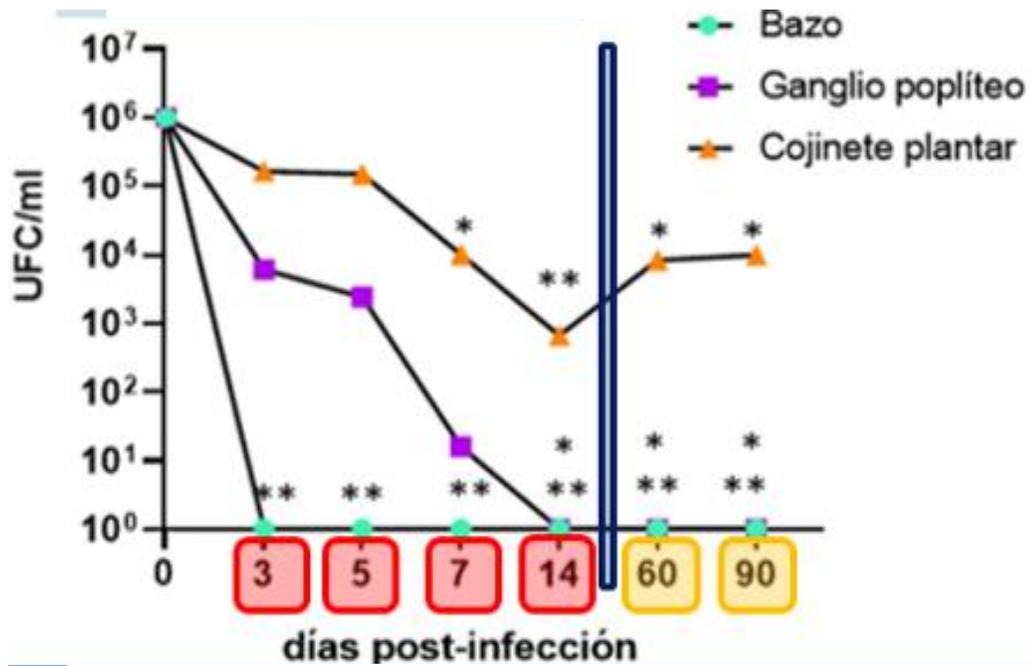


Figura 20. Determinación de las UFC en bazo ganglio y cojinete plantar durante la fase crónica de *N. b*. Los ratones (n=3) se infectaron con 1×10^6 UFC de *N. b*. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) En el bazo y el ganglio poplíteo no se determinó la presencia de UFC en la fase crónica. B) En el cojinete se observa un aumento en las UFC al día 60 y 90 de la fase crónica. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnet's: * < 0.5 , ** < 0.01.

8.2.2- DETERMINACIÓN DE PESO Y VOLUMEN DE LOS ORGANOS EN LA FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN POR *N. b.*

El bazo, cojinete plantar y ganglio poplíteo se midieron mediante un vernier y se pesaron durante los días post-infección de la fase crónica. Se observó un gran aumento de volumen en el cojinete plantar, ganglio poplíteo y el bazo al día 60 y 90 post-infección.

En cuanto al peso se puede observar que conforme transcurre el tiempo de la infección, el ganglio poplíteo y el bazo aumentaron significativamente.



Figura 21. Aumento del volumen de los bazos en la fase crónica de la infección.



Figura 22. Aumento del volumen de los ganglios poplíteos en la fase crónica de la infección.



Figura 23. Aumento del volumen de los cojines plantares en la fase crónica de la infección.

Estos resultados antes mencionados se pueden observar en las figuras 24 y 25.

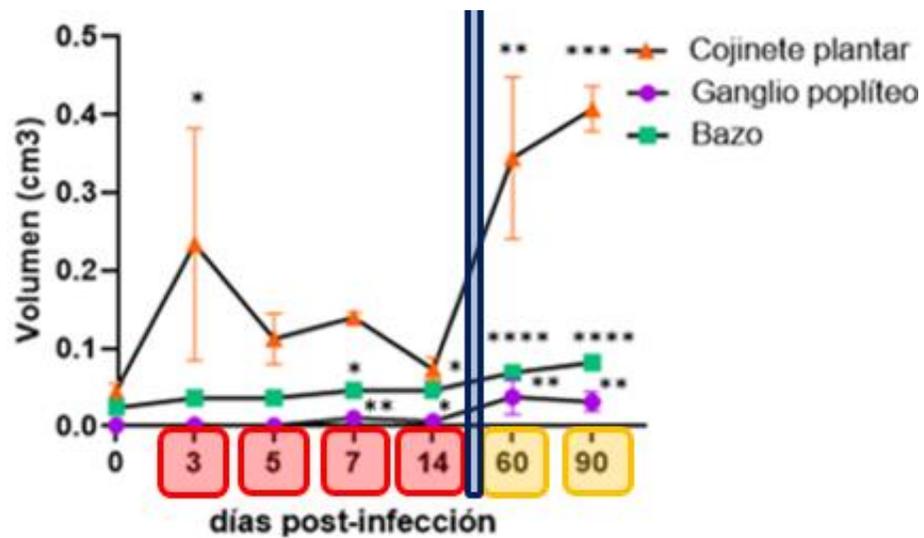


Figura 24. Determinación del volumen del bazo, ganglio y cojinete plantar en la fase aguda y fase crónica de la infección por *N. b*. Los órganos de los ratones (n=3) se midieron; se utilizó la fórmula elipsoide para calcular los datos del volumen. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) El volumen del cojinete plantar, ganglio poplíteo y el bazo se incrementó significativamente al día 60 y 90 en la fase crónica. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: * < 0.5, **< 0.01, ***< 0.001, **** < 0.0001.

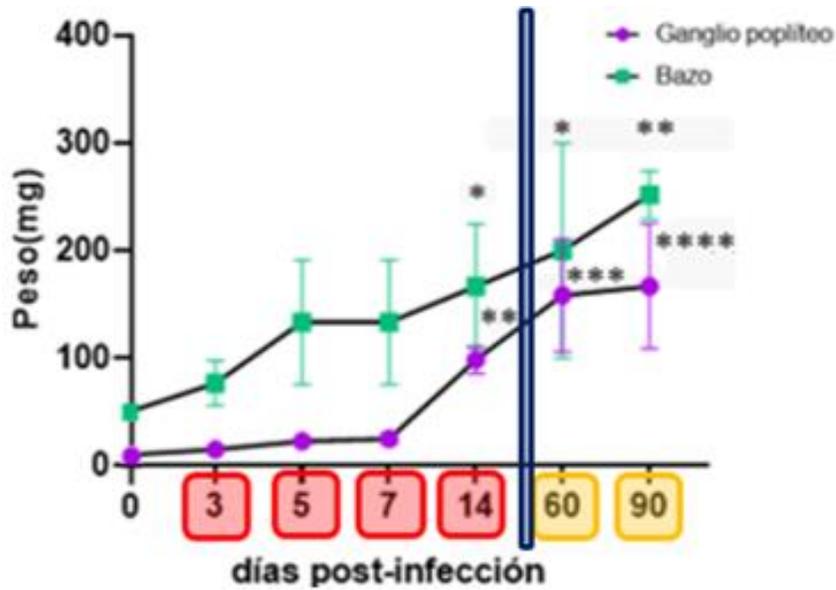


Figura 25. Determinación del peso del bazo y ganglio poplíteo en la infección por *N. b* . Los órganos de los ratones (n=3) se pesaron y midieron; se utilizó la fórmula elipsoide para calcular los datos del volumen. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) El peso de los órganos aumenta en la fase crónica de la infección, teniendo diferencia significativa en el día 60 y 90 en ganglio y bazo respectivamente. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: * < 0.5 , **< 0.01, ***< 0.001, **** < 0.0001.

8.2.3- CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4⁺ Y CD8⁺ EN LA FASE CRÓNICA DE LA INFECCIÓN POR *N. b.*

Las suspensiones celulares de bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar fueron tratadas como se mencionó en el punto 8.1.3 obteniendo los siguientes resultados a los días 60 y 90 post-infección.

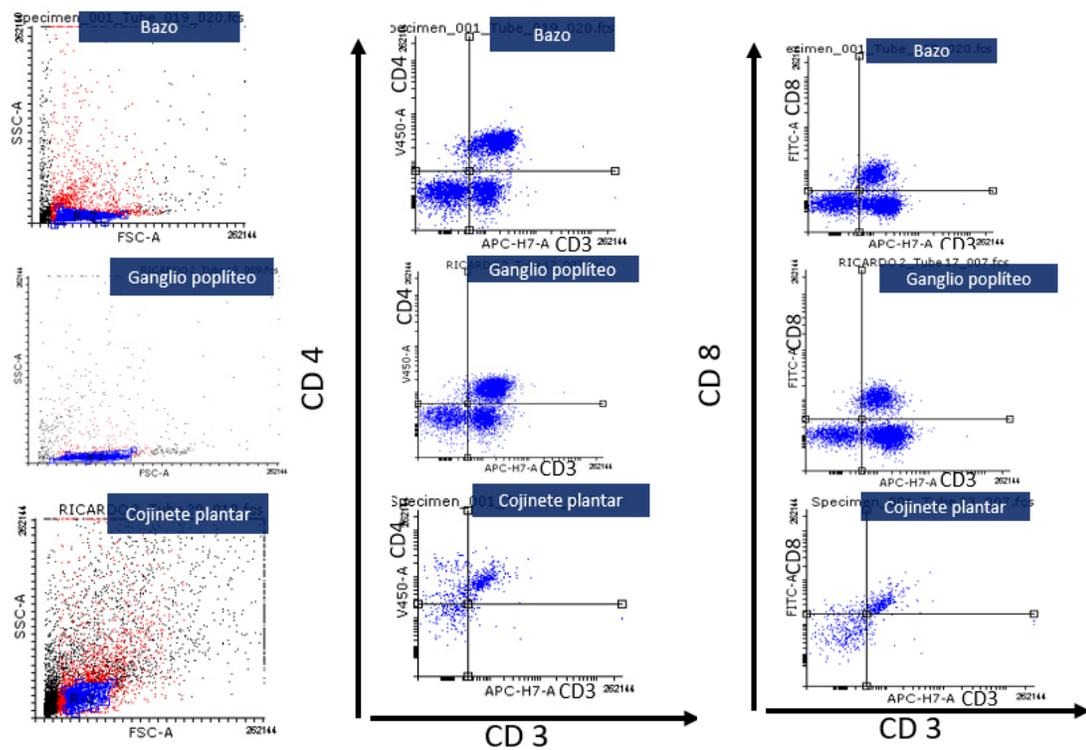


Figura 26. Imágenes representativas de la citometría de flujo de la fase crónica de la infección por *N. b.* A) La figura azul delimita la región de linfocitos en los diferentes órganos. B) Marcaje doble para los linfocitos CD3⁺/CD4⁺. C) Marcaje doble para los linfocitos CD3⁺/CD8⁺.

En el bazo se observó un incremento significativo en el porcentaje de LT CD3⁺/CD4⁺ a los días 60 y 90. En el ganglio poplíteo no se observan diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de linfocitos a los días antes mencionados. En cojinete plantar se observa un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos al día 90. Todos los resultados fueron comparados con el día 0 que fue el control.

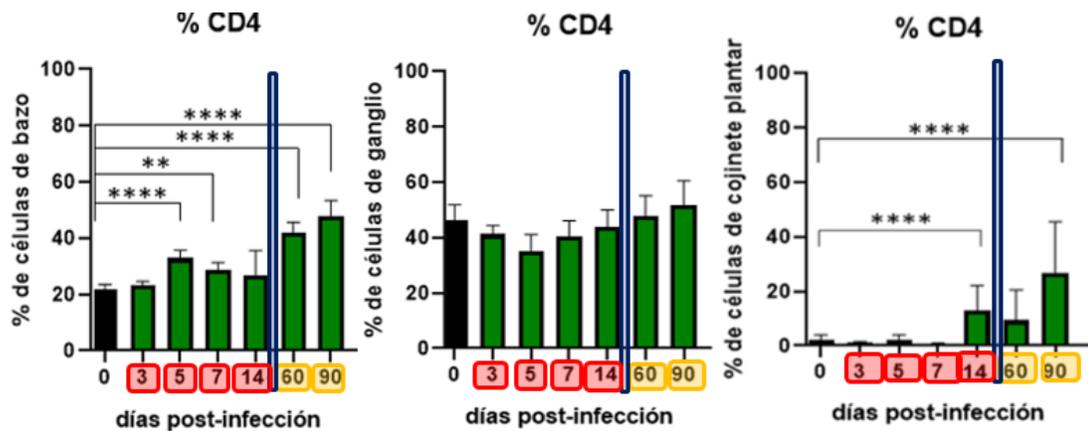


Figura 27. Cuantificación del porcentaje de LT CD4⁺ en la fase crónica de la infección por *N. b.* Se realizaron suspensiones celulares de los ratones infectados (n=3) a los días señalados, marcando a los linfocitos con anticuerpos monoclonales Anti-CD4 para analizarlos por citometría de flujo. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) En el bazo se observa un aumento significativo de l porcentaje de linfocitos T CD4⁺ al día 60 y 90. B) En el ganglio existe aumento del porcentaje al día 60 y 90 sin diferencia significativa comparados con el día 0. C) En el cojinete hubo una gran diferencia significativa al día 90. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación multiple de Dunnet's: **< 0.01, ****< 0.0001

También se calculó los números absolutos de LT CD3⁺/CD4⁺ en la fase crónica de los órganos antes mencionados, obteniendo los siguientes resultados:

En el bazo se encontró un aumento significativo de LT CD4⁺ al día 90 post-infección comparados con el valor control presentado al día 0. El ganglio poplíteo presentó una disminución significativa al día 7 post-infección el cual se recuperó al día 14, disminuyendo nuevamente al día 60 y alcanzando al día 90 el aumento más significativo. En el cojinete plantar se determinó un aumento significativo al día 14 y 90.

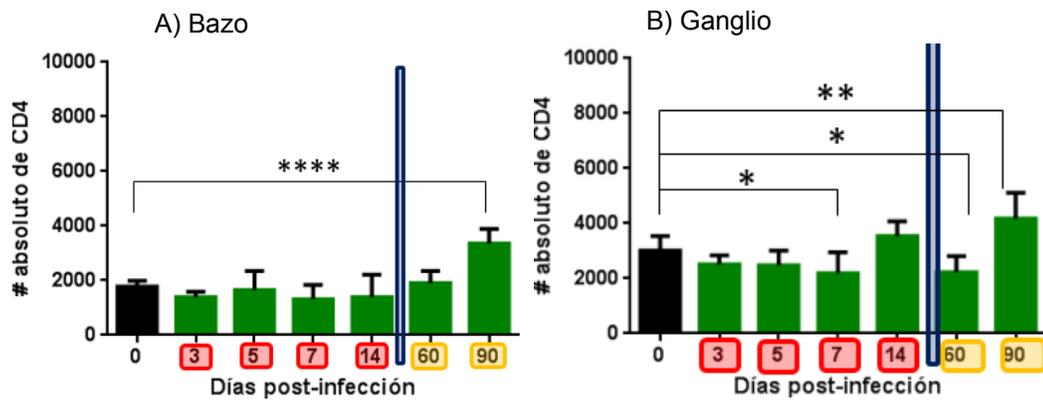


Figura 28. Determinación de los números absolutos de LT CD4⁺ en la fase crónica de la infección por *N. b*. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) En el bazo se observa un aumento significativo en el número absoluto de LT CD4⁺ al día 90. B) En el ganglio existe una disminución significativa en el número absoluto de LT CD4⁺ al día 14 y 60 y un aumento significativo al día 90 post-infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: **< 0.01, **** < 0.0001. C) Cojinete plantar

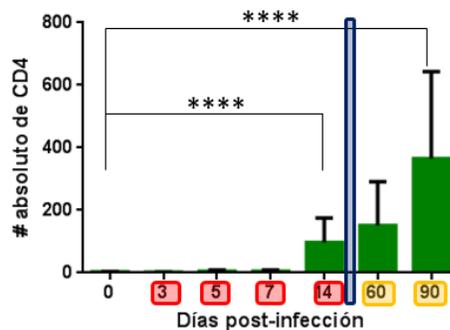


Figura 29. Determinación de los números absolutos de LT CD4⁺ del cojinete plantar en la fase crónica de la infección por *N. b*. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) Se observa un aumento significativo en los

números absolutos de LT CD4⁺ al día 14 y 90 post-infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: **< 0.01, ****< 0.0001.

En cuanto al porcentaje de los LT CD3⁺/CD8⁺, se determinó una diferencia significativa en el bazo al día 90 de la infección, en el ganglio poplíteo no se observó una diferencia significativa al día 60 y 90 post-infección. Por otro lado, en el cojinete plantar solo se detectó un aumento estadísticamente significativo al día 90. Todos los resultados fueron comparados con el día 0 que fue el control.

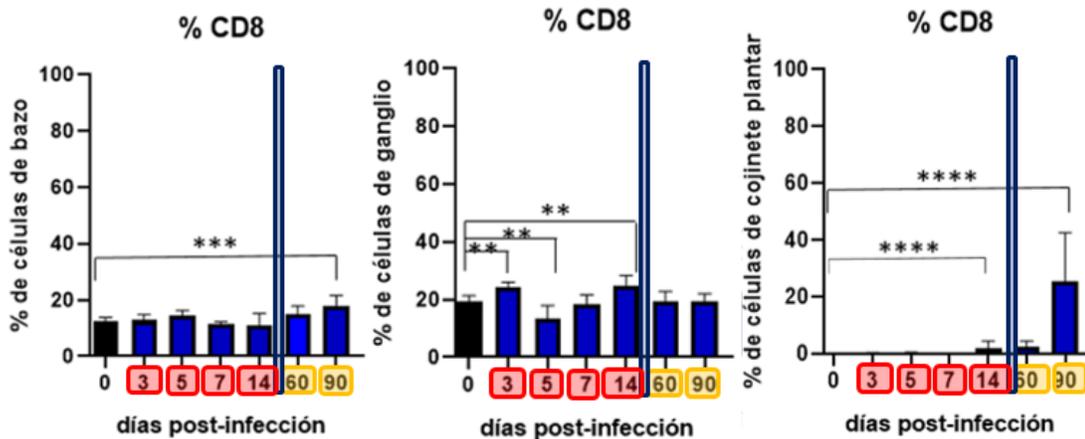


Figura 30. Cuantificación del porcentaje de LT CD8⁺ en la fase crónica de la infección por *N. b.* Se realizaron suspensiones celulares de los ratones infectados (n=3) a los días señalados, marcando a los linfocitos con anticuerpos monoclonales Anti-CD8 para analizarlos por citometría de flujo. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) En el bazo se observó diferencia significativa en el porcentaje de linfocitos al día 90 del estudio. B) En el ganglio no existió diferencia significativa del porcentaje entre los días 60 y 90 comparadas con el día 0. C) En el cojinete hubo una gran diferencia significativa al día 90. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnett's: **< 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001.

Los números absolutos de LT CD3⁺/CD8⁺ en la fase crónica de los órganos antes mencionados, se muestran a continuación:

En el bazo se encontró una disminución significativa de LT CD8⁺ al día 60 post-infección. El ganglio poplíteo presentó una disminución significativa al día 60. En el cojinete plantar se determinó un aumento significativo al día 14 y 90. Todos los resultados fueron comparados con el día 0 que fue el control.

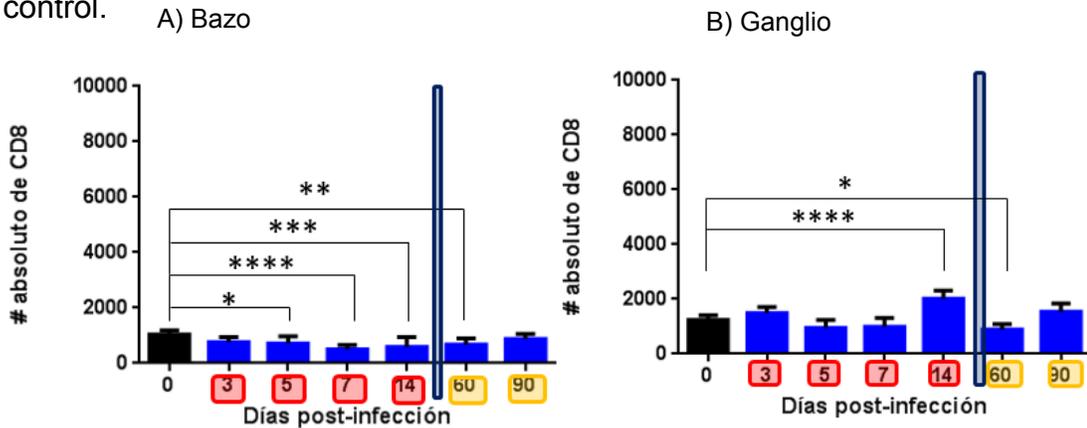


Figura 31. Determinación de los números absolutos de LT CD8⁺ en la fase crónica de la infección por *N. b*. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) En el bazo se observa una disminución significativa al día 5, 7, 14 y 60. B) En el ganglio existe un aumento significativo al día 14 y disminuye al 60 post infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnet's: **< 0.01 , **** < 0.0001.

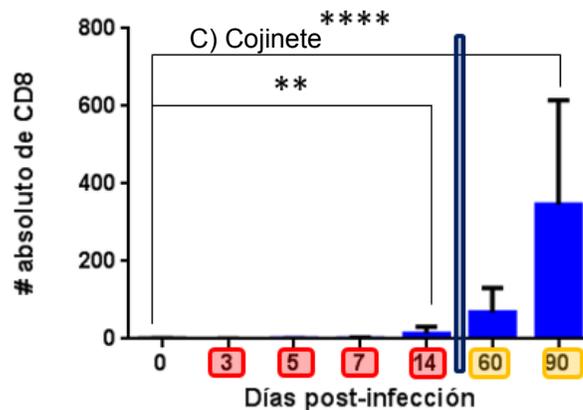


Figura.32. Determinación de los números absolutos de LT CD8⁺ del cojinete plantar en la fase crónica de la infección por *N. b*. La fase aguda y crónica se diferencian mediante los colores rojo y amarillo, respectivamente. A) Se observa un aumento al día 7 y 90 post-infección. ANOVA de una vía < 0.05, Comparación múltiple de Dunnet's: **< 0.01 , **** < 0.0001

8.3 COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y SISTÉMICA DE LT CD4⁺ Y CD8⁺ EN UN MODELO DE ACTINOMICETOMA POR *N. b.*

Se comparó el porcentaje de linfocitos presentes en los bazos (sistémico) con los de los cojinetes plantares (local) infectados a través del tiempo (n=3).

El porcentaje de linfocitos CD3⁺/CD4⁺ del bazo presenta una gran diferencia significativa comparada con el cojinete plantar pero esa diferencia disminuye al día 14 y 90 de la infección.

En el bazo el porcentaje de linfocitos CD3⁺/CD8⁺ presenta una gran diferencia significativa comparada con el cojinete plantar, hasta el día 90 en donde ya no existe.

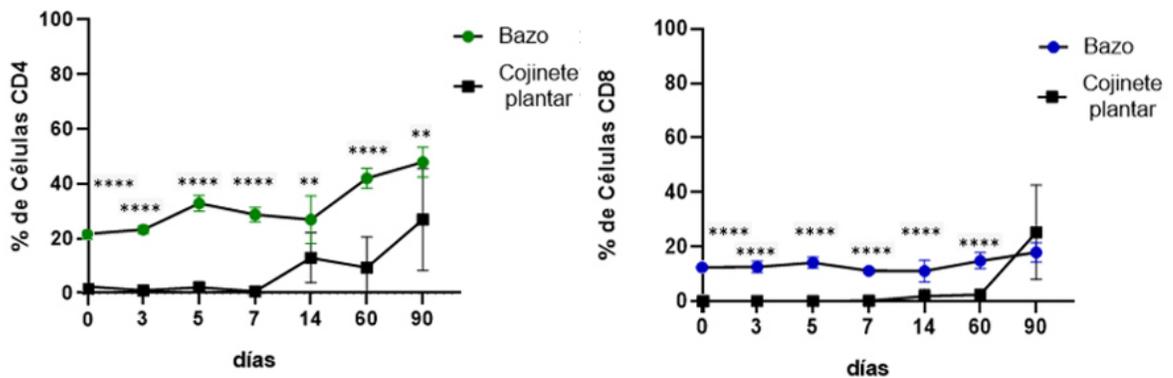


Figura 33. Comparación de la respuesta inmune local y sistémica en un modelo de actinomicetoma por *N. b.* Se comparó el porcentaje de linfocitos presentes en los bazos (sistémico) con los de los cojinetes plantares (local) infectados a través del tiempo (n=3). A) La diferencia estadísticamente significativa del porcentaje de LT CD4⁺ del bazo comparado con el cojinete plantar disminuye al día 14 y 90 de la infección. B) No existe diferencia estadísticamente significativa del porcentaje de LT CD8⁺ del bazo comparado con el cojinete plantar al día 90 de la infección. Prueba de T no pareada. **< 0.01, *** < .001, **** < 0.0001.

CAPÍTULO 9

DISCUSIÓN

En las enfermedades infecciosas, aparte de la virulencia del patógeno, tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa del huésped juegan un papel importante en el resultado de la infección ⁽⁸⁶⁾. En el caso de los patógenos intracelulares como *N. b*, una de las principales características es evadir al sistema inmune, residiendo en el interior de los macrófagos y escapando de sus mecanismos microbicidas por medio de sus factores de virulencia ^(87, 88). Dependiendo de esta capacidad, el patógeno puede causar una enfermedad aguda, una infección crónica o su eliminación si sus mecanismos evasivos no son adecuados ⁽²⁴⁾.

En esta tesis se enfocó en cuantificar las subpoblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ sistémica y localmente, durante la fase aguda y crónica de un modelo experimental de actinomicetoma por *N. b*. Se clasificó la fase aguda a los primeros 15 días y la fase crónica después del día 30 post-infección ⁽²⁰⁾, siguiendo el modelo desarrollado por Salinas Carmona *et al.*(1999).

Los eventos inmunológicos que se producen durante este proceso infeccioso por *N. b* todavía no han sido bien esclarecidos y actualmente existen pocos informes que han abordado el papel de la inmunidad celular y su inmuno-fenotipo en la patogénesis del actinomicetoma en humanos y en modelos experimentales.

Primeramente, en este trabajo se determinó las UFC de las suspensiones celulares del bazo, ganglio poplíteo y el cojinete plantar con el objetivo de comprobar que la infección evolucionaba a etapa crónica y comparar las UFC a nivel sistémico (bazo) y local (ganglio poplíteo y cojinete plantar).

En el bazo no se detectó presencia de UFC en ningún día del estudio, se sugiere que es debido a que *N. b.* es una bacteria inmóvil y generalmente produce una infección crónica local llamada actinomicetoma ⁽¹⁾. Estos resultados concuerdan con los reportados por Rosas-Taraco *et al.* en el 2012 en el mismo modelo experimental ⁽⁷⁸⁾.

En cuestión del ganglio poplíteo, se determinaron UFC, las cuales iban disminuyendo a los días 3, 5 y 7 post infección. A partir del día 14 no se observó UFC en este órgano. Debido a la posición anatómica del ganglio poplíteo, este órgano se encuentra muy cerca del cojinete plantar el cual fue el sitio de la infección y es posible que ese factor sea el responsable de la aparición de las UFC en el ganglio. Además, es conveniente recordar que una de las funciones de este órgano es filtrar antígenos que están presentes en la linfa, evitando su diseminación. Algunos de los posibles mecanismos que pudo haber sucedido para el aclaramiento de las UFC en este órgano fue que los macrófagos fagocitaron a las bacterias que ingresaron al ganglio, aparte que la respuesta inmune adaptativa ya se había desarrollado a partir del día 10 de la infección ⁽⁸⁹⁾.

Con respecto a la determinación de UFC de *N. b.* en el cojinete plantar, se observó una gran disminución a partir del día 3 hasta el día 14, pero no existió una resolución completa, aumentando las UFC al día 60 y 90, declarando la enfermedad crónica como establecida ⁽²⁰⁾. En un estudio realizado *in vitro*, se observó que *N. asteroides* era fagocitada fácilmente por macrófagos peritoneales de ratón, disminuyendo drásticamente el número de bacterias ingeridas durante los primeros doce días. Sin embargo, fue seguido por un aumento en el número de las mismas a los 16 días aproximadamente ⁽³¹⁾, siendo estos resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo.

Por otra parte, estos resultados se pueden correlacionar con el aumento de inflamación los primeros días de la infección en donde en el modelo murino de actinomicetoma por *N. b.*, se observa en las lesiones agudas un gran infiltrado de neutrófilos ^(1, 20, 22). Si bien, las nocardias son fagocitadas con relativa facilidad, no siempre son destruidas ^(27, 90, 91) y, pueden llegar a desarrollarse especialmente dentro del macrófago.

A diferencia de lo que sucede en el caso del macrófago, *Nocardia* no es un microorganismo intracelular facultativo de los neutrófilos. Estas células fagocitan, pero no son muy efectivas al momento de eliminar las nocardias, pero son capaces de retardar su crecimiento para permitir que los macrófagos se activen y aumenten su capacidad microbicida ^(33,41). Estos mecanismos pueden explicar la disminución de las UFC de *N. b.*, debido al aumento de neutrófilos que estén fagocitando nocardias en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección, para tratar de retardar su crecimiento.

Además, aunque los neutrófilos pueden tener más moléculas antimicrobianas que los macrófagos, su corta vida limita su papel en el control de ciertos patógenos que terminan infectando a los macrófagos. Se ha demostrado fagocitosis in vitro por macrófagos humanos del protozoario parásito *Leishmania major* o la bacteria *Chlamydia pneumoniae* que habían sido fagocitados anteriormente por neutrófilos en proceso apoptótico. Los autores demostraron que los parásitos de la *Leishmania* que ingresaron al macrófago dentro de los neutrófilos apoptóticos, proliferan ampliamente, sugiriendo que los neutrófilos sirven como caballos de Troya ^(92,93). Este mecanismo puede estar sucediendo también en la infección por *N. b.*, estableciendo así la fase crónica de la infección.

Por otra parte, Rosas-Taraco *et al*, en el 2012, reportaron los niveles de expresión de IFN- γ en un modelo experimental por *N. b.* determinando una expresión mayor de esta citocina en la fase aguda de la infección comparadas con el grupo de control. Este aumento, se correlacionó con una reducción de la carga bacteriana. En la infección crónica, la carga bacteriana en las muestras de los cojinetes plantares aumentó nuevamente, mientras que la expresión de IFN- γ disminuyó. Además, detectaron niveles altos de IL-10, favoreciendo la infección crónica ⁽⁷⁸⁾. Siendo este fenómeno otra alternativa para justificar los resultados de este trabajo

Posteriormente, en este trabajo, se determinó el volumen y peso del bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar durante las fases aguda y crónica de la infección por *N. b.*

Al determinar el volumen de los órganos estudiados, observamos que efectivamente en el sitio de la lesión (cojinete plantar) presentó una gran inflamación los primeros días post-infección y disminuyó entre el día 7 y 15, incrementando más al día 60 y 90 lo que concuerda con el modelo experimental establecido por Salinas Carmona *et al.* 1999.

En cuestión al bazo, se observó un aumento de peso y tamaño (esplenomegalia) conforme transcurría el tiempo de infección ⁽⁷⁸⁾. Este fenómeno también se ha registrado en otros microorganismos intracelulares ^(94, 95, 96).

Esto puede deberse a que ratones BALB/c infectados experimentalmente con la cepa con la que trabajamos (*N. b.* ATCC 700358), responden con una alta respuesta de anticuerpos a los antígenos inmunodominantes y un aumento de la respuesta proliferativa de linfocitos en el bazo debido a la estimulación con antígenos ^(1, 13).

Igualmente se observó en el ganglio poplíteo un proceso muy similar al del bazo, en donde se evidenció un aumento de peso y volumen a través del tiempo post-infección. Este fenómeno sucedió, debido al aumento de celularidad que se llevó a cabo en el proceso de migración en la presentación de Ag y mayormente por expansión clonal de los LT activados en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa ^(64,89, 97).

Además, se ha descrito que infecciones agudas, los LT vírgenes se activan y se diferencian en LT efectores en el transcurso de 1 a 2 semanas. Produciendo un pico de expansión efectora, para la eliminación del Ag y la resolución de la inflamación ^(55, 56, 66). Este mecanismo ampliamente estudiado puede justificar el aumento del volumen y peso de los ganglios poplíteos en este estudio, debido a que el papel de los LT durante la infección por *Nocardia* es principalmente la activación de macrófagos y la estimulación de la respuesta inmune celular ⁽⁵⁷⁾.

Es por lo anterior que se ha sugerido que la inmunidad mediada por células es un mecanismo esencial para la defensa contra la infección de microorganismos intracelulares ^(27, 47, 48, 59).

Los análisis cuantitativos de poblaciones de LT específicos de Ag en las infecciones, han proporcionado información importante sobre el curso natural de las respuestas inmunitarias ⁽⁹⁴⁾.

Algunos investigadores han determinado en humanos y en modelos experimentales, la presencia de LT CD4⁺ y CD8⁺ en el sitio de la lesión del actinomicetoma por *N. b.*, por medio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia ^(22, 65, 98,99, 100). Pero los resultados de la cantidad porcentual y absoluta estas células, no han sido muy específicos.

Solis-Soto y colaboradores detectaron linfocitos y citocinas durante el curso de la infección por *N. b.*, determinando la presencia de linfocitos inmunoreactivos a IL-4, IL-10, IFN- γ y TGF- β en el sitio de la infección y, en etapas posteriores, en células en la periferia de los microabscesos ⁽²²⁾. Rosas taraco *et al.* 2012 Obtuvieron resultados similares en la determinación de TGF- β e IL-10 en el mismo modelo ⁽⁷⁸⁾.

Se sabe que la IL-4 es un potente activador de la respuesta Th2, donde se produce la IL-10 para disminuir la respuesta Th1. La IL-10 es una importante citoquina supresora, presente en las respuestas inmunes antiinflamatorias enfocadas a minimizar la inmunopatología ⁽¹⁰¹⁾. Además, se ha sugerido que la producción de IL-10 podría ser modificada por patógenos; relacionando este mecanismo con la supervivencia de algunos patógenos intracelulares ⁽⁸¹⁾.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de LT en lesiones de actinomicetomas por *S. somaliensis* en pacientes humanos. También determinaron que el perfil de citoquinas en las lesiones y los ganglios linfáticos regionales tenía un patrón Th2 dominante al producir IL-4 e IL-10, comportándose muy similar a *N. b.* ^(102,103).

Debido a los antecedentes mencionados, en este trabajo se cuantificó las subpoblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ del bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar en la fase aguda y crónica de la infección por *N. b.*

Es necesario mencionar que cada órgano investigado tiene una composición diferente de subpoblación de LT CD4⁺ y CD8⁺, lo cual debe tenerse en cuenta al comparar la proliferación de estas células dentro de un órgano determinado o entre diferentes órganos ⁽¹⁰⁴⁾.

La cuantificación de LT CD4⁺ en el bazo presentó un incremento significativo en el porcentaje a los días 5 y 7 durante la fase aguda. Por otra parte en la etapa crónica se observó un aumento significativo porcentualmente y también del número absoluto al día 90 post-infección.

En cuanto al porcentaje de los LT CD8⁺, en el bazo se determinó una disminución significativa del número absoluto a los días 5, 7 y 14 post-infección. Además, se determinó una diferencia significativa porcentualmente y en el número absoluto de LT CD8⁺ en el bazo al día 90 post-infección.

Una posible explicación de estos hallazgos de proliferación de los LT CD4⁺ y CD8⁺ es que los antígenos solubles producidos por *N. b.* pueden alcanzar el flujo sanguíneo y activar los LT en este órgano ⁽⁷⁸⁾.

Para poder profundizar un poco más en dar una posible explicación de los resultados obtenidos en este trabajo, me permitiré dar una pequeña reseña del bazo y su función inmunológica.

El bazo es un órgano linfoide altamente estructurado que consta de tres compartimentos principales: la pulpa roja (PR) donde se capturan y reciclan los glóbulos rojos, la zona marginal (ZM) y pulpa blanca (PB) donde residen la mayoría de los LT y los linfocitos B ^(105,106). Los LT se encuentran localizados en las vainas linfoides periarteriales (PALS) y son adyacentes a la túnica media de la arteria central ^(105,107).

La zona marginal o zona de transición, es un área de paso en la que las células migran a la pulpa esplénica roja o a la blanca ⁽¹⁰⁸⁾ y al estar interpuesta en el paso de los linfocitos circulantes, tiene especial importancia en el desarrollo de la respuesta inmune ⁽¹⁰⁹⁾. El plasma y las sustancias solubles sólo alcanzan la pulpa esplénica blanca cuando han pasado la zona marginal, en la que son liberados de sustancias antigénicas ^(107, 108). Diversas poblaciones esplénicas, no solo atrapan y eliminan los antígenos transmitidos por la sangre, sino que también inician respuestas inmunes innatas y adaptativas contra los patógenos ⁽¹¹⁰⁾.

En un modelo murino se evaluó la respuesta inmune celular a través de la estimulación in vitro de linfocitos sensibilizados con Ag de *N. b.* y determinaron que la que la infección con el antígeno particulado induce mayor proliferación linfocitaria que la estimulada por la inmunización de los Ags solubles de este microorganismo ⁽⁶⁴⁾. En este trabajo se utilizó el Ag particulado como estimulador de la proliferación.

En infecciones de microorganismos intracelulares como *L. monocytogenes (L.m.)* y *N. b.* se ha determinado la respuesta proliferativa de los linfocitos y se ha determinado que comienza tan pronto como 3 días después de la infección y es mayor 5 días post- infección; siendo similares esos resultados con los del presente trabajo ^(13,95).

Muchos estudios concluyen que el bazo desempeña un papel importante en las respuestas de protección del huésped a *L. m.* Apenas 9 horas después de la infección, Taiki *et al*, identificaron células dendríticas infectadas con la bacteria en las regiones periféricas de la PALS. Sugiriendo que las células dendríticas esplénicas suministran rápidamente bacterias intracelulares a las áreas de LT de la pulpa blanca para iniciar las respuestas de los LT CD8⁺. De manera análoga a su función de transportar antígenos de los tejidos periféricos al drenaje de los ganglios linfáticos ⁽¹⁰⁵⁾.

Por otra parte, es completamente posible que diferentes regiones del bazo y distintas CPA puedan participar en la activación de los LT CD4⁺ ⁽¹¹¹⁾. Aunque en nuestro trabajo no se detectó que células específicas eran responsables en la activación de los LT CD4⁺, si se pudo determinar que existe activación de estas células.

Otros autores han determinado que las sustancias solubles (menores de 75 kD) pueden fluir directamente desde la MZ a la pulpa blanca a través de una red de conductos, sin necesidad de una CPA ⁽¹⁰⁶⁾.

Además, se ha descrito que los epítomos inmunodominantes provocan grandes respuestas de LT y los epítomos subdominantes provocan respuestas más pequeñas (112, 113).

Salinas Carmona *et al*, en 1993 determinaron varios antígenos inmunodominantes de *N. b.* mediante la técnica de electrotransferencia (western blot) identificando tres proteínas P24, P26 y P61. Estas proteínas pesan 24, 26 y 61 kD respectivamente. Con los resultados del presente trabajo, se puede inferir que, aunque el sitio de infección fue localizado, los Ag inmunodominantes de *N. b.* pueden alcanzar el flujo sanguíneo, llegar al bazo y al cumplir el requisito de pesar menos de 75 kD, pueden trasladarse directamente a la pulpa blanca, sin necesidad de una CPA y estimular a los LT para su proliferación. Esta posible explicación también justificaría los resultados de la mayor proliferación por el antígeno particulado ⁽⁶⁴⁾.

El bazo, al movilizar sus componentes celulares, puede establecer conexiones con otras ubicaciones del cuerpo. Un ejemplo prototípico sería la redistribución de LT CD4⁺ y CD8⁺ a los tejidos no linfoides después del reconocimiento de Ag afines en la pulpa blanca esplénica ⁽¹¹⁰⁾. Este fenómeno se observa en nuestros resultados y se puede inferir una migración mayor de estas dos subpoblaciones de linfocitos del bazo al cojinete plantar al día 14 y 90 post-infección.

Palmer *et al.*, han estudiado la dinámica de LT durante la infección por *Lm* en un modelo murino y determinaron que el número de LT esplénicos CD4⁺ y CD8⁺ aumenta durante la infección primaria manteniéndose en un porcentaje del 23% y entre el 11-12%, respectivamente. Además, el aumento en el número total de LT CD4⁺ en el bazo es más marcado durante la infección primaria ⁽⁹⁵⁾. Estos resultados son similares a los del presente trabajo.

En un modelo murino (C57BL/ 6JBom x DBA/2JBom) infectados con *M. tuberculosis* Phyu *et al.*, determinaron que en los bazos de ratones infectados el subtipo de LT CD4⁺ era aproximadamente 3 veces más que la subpoblación de LT CD8⁺ al inicio de la infección, seguido de un aumento significativo en los LT CD8⁺ a los 20-30 días después de la infección, mientras que los pulmones que fue el sitio de infección, tuvieron un aumento del triple de ambos subconjuntos ⁽⁹⁶⁾. Se obtuvieron resultados similares en este trabajo en cuanto a los LT CD4⁺ y CD8⁺ en el bazo y en el sitio de la lesión que en este caso no fueron los pulmones, fue el cojinete plantar.

En cuestión del ganglio linfático, para que exista una respuesta inmune celular, el primer evento involucra la entrega de Ag desde un sitio de tejido expuesto al ganglio linfático de drenaje, en este trabajo fue el ganglio poplíteo. Esto inicia la activación de LT vírgenes que recirculan constantemente de la sangre al ganglio linfático y luego regresan a la sangre a través del drenaje linfático. El evento final que ocurre es la diferenciación y expansión de los LT efectores y de memoria. Estos LT recirculan de nuevo a sitios de tejido no linfoides en donde se encuentra la infección, el cual fue el cojinete plantar ⁽¹¹⁴⁾. En el presente trabajo, se determinó una disminución del número absoluto de LT CD4⁺ al día 7, el cual se recuperó al día 14 post-infección. En la fase crónica para esta subpoblación se observó nuevamente una disminución al día 60 y alcanzó al día 90 el aumento más significativo. Con respecto a los LT CD8⁺, se determinó un aumento significativo del porcentaje y en el número absoluto de LT CD8⁺ en el día 14 post-infección. No se observó una gran proliferación en todos los días de estudio, posiblemente a que como estas células proliferan y se vuelven efectoras, migran al sitio de la lesión, el cual anatómicamente está muy cercano al ganglio, registrándose así un aumento de células en el sitio de la infección y una disminución de estas en el ganglio.

En 1999 Ramos Cano determinó la respuesta inmune celular, medida en función de la magnitud de la respuesta proliferativa de linfocitos obtenidos de los ratones BALB/c inmunizados con una sola dosis de los Ag de *N. b.*, particulado y soluble. Durante los primeros 14 días post-inmunización con el Ag particulado, en ganglio poplíteo se determinó un aumento de LT CD8⁺ en un 300%, en tanto que con el antígeno soluble no fue posible detectarlas. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro trabajo, pero el incremento de estas células no fue tan dramático, esto se pudo deber a que Ramos Cano determinó que la proliferación de linfocitos es dependiente de la concentración del Ag y ella utilizó una dosis más elevada de Ag particulado (1x10⁹ UFC de *N. b.*).

Los LT activados en los ganglios linfáticos son estimulados por el Ag para dividirse, producen citocinas efectoras y migran a los tejidos periféricos. En un modelo de ratones 5C.7C transgénicos Harris *et al*, determinaron que los LT activados que migran a tejidos no linfoides, en el pulmón y la vía aérea, produjeron citoquinas efectoras sustanciales tras la exposición al Ag, pero fueron completamente incapaces de dividirse o migrar de nuevo a los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los LT activados pueden experimentar expansión clonal en el ganglio linfático, pero se reclutan y retienen como células no divisorias en tejidos no linfoides ⁽⁹⁷⁾. Debido a este antecedente, podemos sugerir que los linfocitos que se presentan en el cojinete plantar migraron de algún órgano linfoide secundario, ya sea bazo o ganglio poplíteo, no hubo una proliferación *in situ*.

Por último en la cuantificación de linfocitos en el cojinete plantar se observó un aumento significativo del porcentaje y números absolutos de LT CD4⁺ y CD8⁺ al día 14 y 90 post-infección. Aunque los números de linfocitos aumentaron, los LT CD4⁺ fueron mayores que los LT CD8⁺. Estos resultados concuerdan con los revelados mediante estudios de inmunohistoquímica en el sitio de la lesión en infecciones por *N. b.* ^(65, 98, 103).

Por otra parte, se ha determinado que *N. b.* modula las respuestas de los LT y sus perfiles de citoquinas en un modelo experimental murino, con el objetivo de inducir un microambiente inmunosupresor. Detectaron que en la infección temprana, los linfocitos Th17 / Tc17 aumentaron el día 3 en el cojinete plantar y el bazo y las subpoblaciones de Treg alcanzaron su punto máximo en los días 7 y 15 en el cojinete plantar ⁽⁷⁸⁾, estos resultados dan un indicio de que existían estas subpoblaciones que pertenecen a los LT CD4⁺, pero los números no corresponden a los nuestros porque en ese estudio se evaluaron subpoblaciones muy específicas y en nuestro trabajo se determinó la subpoblación T CD4⁺ total.

Al comparar la inmunidad adaptativa sistémica contra la local, se determinó que inicialmente el porcentaje de LT CD4⁺ y CD8⁺ era mayor en el bazo, evidentemente. Se obtuvo una diferencia menor entre el bazo y el cojinete plantar en el porcentaje de LT CD4⁺ al día 14 y 90, y no hubo diferencia significativa al día 90 post-infección en LT CD8⁺. Estos resultados concuerdan con estudios donde se ha demostrado en humanos y en ratones experimentales infectados por *N. b.* existe una respuesta inmune sistémica aumentada la cual coexiste con un microambiente inmunosupresor local siendo un mecanismo de algunos actinomicetos para evadir la respuesta inmunitaria protectora ⁽¹³⁾. Observando una correlación entre la IL-10 y la carga bacteriana en la infección crónica ⁽⁷⁸⁾.

También se ha reportado en animales experimentales, infectados con *N. b.* que se produce una fuerte respuesta sistémica de anticuerpos y un incremento en la respuesta proliferativa de linfocitos a la estimulación *in vitro* con Ag purificados, pero no son útiles para resolver la infección ^(40, 43).

El presente estudio demostró que las subpoblaciones de linfocitos en la reacción tisular del actinomicetoma por *N. b.* está compuesta por LT CD4⁺ y CD8⁺ y la distribución de estos, fue diferente en los órganos estudiados, modificándose después de la infección. Recordemos que el cojinete plantar es un tejido no linfoide y podemos sugerir que estas células han migrado de otros órganos linfoides.

Se produjo una respuesta inmune tanto local como sistémica, en donde se detectaron LT CD4⁺ y CD8⁺. Aun así, no se eliminó la infección.

Varios patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* y *N. b.*, inducen un microambiente inmunosupresor a través de aumentos en Linfocitos Treg CD4⁺ Foxp3⁺ en fases agudas o crónicas de la infección, regulando a la vez otras subpoblaciones de LT por medio de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β . También pueden inhibir la actividad antimicrobiana en las células fagocíticas y de esta manera favorecer su supervivencia ^(78, 81, 84).

En estudios más recientes, se ha sugerido que, en infecciones crónicas y cáncer, los LT están expuestos crónicamente a un estímulo de Ag y / o inflamación. Este fenómeno a menudo se asocia con el deterioro de la función del LT y es llamado "agotamiento". Los LT agotados pierden funciones efectoras, expresan múltiples receptores inhibidores y están definidas por un programa de transcripción alterado. Estas células retienen funciones subóptimas pero cruciales que limitan la replicación del patógeno ⁽⁶⁶⁾.

El agotamiento de LT también se acompaña de un aumento progresivo en la cantidad y diversidad de receptores inhibidores que se expresan, incluida la proteína de muerte celular programada 1 (PD1), la proteína del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), TIM 3, 2B4, CD160 entre otras. Algunas citocinas supresoras, IL-10 y TGF- β , además de los LT CD4⁺ y Treg también se han implicado en este fenómeno ⁽⁶⁶⁾.

Por si fuera poco, se ha descrito que *N. b.* secreta sustancias como la brasilcardina A y la brasilinolida A, siendo potentes factores inmunosupresores para los linfocitos, incluso más fuertes que la ciclosporina A (Shigemori et al., 1998). Lo que puede contribuir a otro mecanismo de inmunosupresión local.

CAPÍTULO 10

CONCLUSIONES

En un modelo experimental de actinomicetoma por *N. b*, la cantidad de LT aumentan en los órganos linfoides secundarios y en el sitio de la infección durante las etapas aguda y crónica.

Durante toda la etapa de la infección, se determinó la disposición de estos LT, pero su presencia no ayudo a eliminar por completo al agente infeccioso.

CAPÍTULO 11

PERSPECTIVA

Determinar y cuantificar linfocitos que expresen marcadores de agotamiento en el sitio de la lesión durante la fase crónica de la infección por *N. b.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salinas-Carmona M.C. (2000). *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect* 2: 1373–1381.
2. Salinas-Carmona M.C. (2017). Actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*: A neglected disease and a surprising laboratory for experimental medicine. *Medicina Universitaria*; 19(76):143-144
3. Arenas, R.. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. México: Mc Graw Hill Education. 5ª Edición.
4. Van de Sande WWJ. 2013. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Plos Neglected Tropical Diseases*.7.
5. Zijlstra, E.E., Van de Sande, W.W.J., Welsh O., Mahgoub, E.S., Goodfellow, M. & Fahal, A.H. (2016). Mycetoma: a unique neglected tropical disease. *The Lancet Infectious diseases*, 16(1). 100-112.
6. Welsh, O., Vera, C. L. & Salinas, M. C. (2007). Mycetoma. *Clinics in Dermatology*, 25, 195 – 202.
7. Salinas-Carmona. (1993). Enzyme linked immunoadsorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infection. *J. clin Microbiol*. 31: 2901-06.
8. Verma, P. & Jha, A. (2018). Mycetoma: reviewing a neglected disease. *Clinical and Experimental Dermatology*. 1-7.
9. López-Martínez, R., Méndez-Tovar, L., Bonifaz, A., Arenas, R., Mayorga, J., Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Padilla-Desgarenes, M., Contreras Pérez, C. (2013). Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos *Gaceta Médica de México*. 149.
10. Fahal, A.H., Rahman, I.A., El-Hassan, A.M., El-Rahman, M.E. & Zijlstra E.E., (2011). The safety and efficacy of itraconazole for the

treatment of patients with eumycetoma due to *Madurella mycetomatis*, Trans R Soc Trop Med Hyg; 105(3):127-32.

11. Cruz, O., Vega, D., Ramirez, L. & Arenas R. (2018). Mycetoma. A Report of 174 Cases Studied in 30 Years in a General Hospital in Mexico City (1987-2017) Dermatología CMQ, 16(4):263-267.
12. Van de Sande, W., Maghoub, E.S., Fahal, A.H., Goodfellow, M., Welsh, O., Zijlstra, E. (2014) The Mycetoma Knowledge Gap: Identification of Research Priorities. PLoS Negl Trop Dis 8(3).
13. Salinas-Carmona, M.C., Rosas-Taraco, A.G. & Welsh, O. (2012). Systemic increased immune response to *Nocardia brasiliensis* co-exists with local immunosuppressive microenvironment. Antonie Van Leeuwenhoek 102: 473–480.
14. Beaman B.I., Beaman, L. (1994). *Nocardia* species: Host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev 7:213-264.
15. Sandoval-Trujillo, H. (1993). Actinomicetos. Microorganismos de la luz. UAM, Xochimilco, México.
16. Vera, I., Salinas, M.C., Welsh, O., Rodríguez, M. A. (1992). Isolation and purification of two immunodominant Antigens from *N. brasiliensis*. J. Clin Microbiol. 30(5): 1183-1188.
17. Butler, W.R., Kilburn, J.O., Kubica, G.P. (1987). High performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species, J. Clin. Microbiol. 25: 2126–2131.
18. Biaggini, R.E., Sarmiento, V.H., Querio, R.S. (1996). Mycetomas. Problemas de salud pública en el noreste argentino. Arch Arg Dermatol; 46 (2): 67-72.
19. Sandoval-Trujillo, H., Sánchez-Saucedo, N.L., Serrano, J.A., Goodfellow, M. (2007). Aspectos taxonómicos, bacteriológicos, citoquímicos, y de diagnóstico microbiológico, de actinomicetos aerobios productores de actinomicetoma, Ed. Plaza Y Valdez Editores, México pp.37-76.

20. Salinas-Carmona, M.C., Torres-Lopez, E., Ramos, A.I., Licon-Trillo, A. & Gonzalez-Spencer, D. (1999) Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun* 67: 2428–2432.
21. Gómez, F. A. (2004). Evaluación de antimicrobianos *In vitro* e *In vivo* para el tratamiento del micetoma por *Nocardia brasiliensis*. (Tesis de Grado). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, México. 72p.
22. Solis-Soto, J.M., Quintanilla-Rodriguez, L.E., Meester, I., Segoviano-Ramirez, J.C., Vazquez–Juarez, J.L., Salinas-Carmona, M.C. (2008) .In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histology and Histopathology* 23:573-581.
23. Mifuji Lira, R.M., Limón Flores, A. Y., Salinas Carmona, M.C., Ortiz Stern, A. (2016) Experimental Granulomatous Pulmonary Nocardiosis in BALB/C Mice. *PLoS ONE*11(6):e0157475
24. Finlay, B., McFadden, G. (2006). Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124 (4): 767-82.
25. Rouse, B.T., Sehrawat, S. (2010). Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group (7):514
26. Devki, Nandan., Kieth, L. (2000). Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial patogénesis. *J. Leukocyt biology* 67: 464-470.
27. Kaufmann, S.H.E. (1993) Immunity to Intracellular Bacteria. *Annual Review of Immunology*, 11(1), 129-163.
28. Beaman, B.L., Beaman, L.V., Black, C.M. (1985). Role of superoxide dismutase and catalase as determinant of pathogenicity of *N. asteroides*: Importance in Resistance to Microbial activities of

Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and Immunity*. 47 (1): 135- 141.

29. Meester, I., Rosas-Taraco, A. & Salinas-Carmona, M.C. (2013). Retnla down-regulation and IL-13-rich environment correlate with inflammation severity in experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Pathogens and Disease* 67, 214–220.
30. Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F. Altare, F. (2008). Foamy macrophages from tuberculous patient's granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *Plos Pathogens*, 4(11).
31. Davis, S.C. & Beaman, B.L. (1980). Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: immunological enhanced of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion and microbicidal activity. *Infect. Immun.* 30:578-587.
32. Filice, F.A. (1985) Inhibition of *Nocardia asteroides* by neutrophils. *J. infect Dis* 151: 47-56.
33. Filice, G. A., Beaman, B.L. & Krick, J.A. (1980) Effect of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*: failures of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *Infect . Immun.* 13: 1490-1496
34. Spargo, B.J., Crowe, L.M., Ioneda, T., Beaman, B.L. & Crowe, J.H. (1991). Cord factor (A α -threosyl 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 737-740.
35. Cohn, L., Delamarre, L. (2014). Dendritic Cell - Targeted Vaccines. *Frontiers in Immunology*. 5: 1-11.
36. Kohlmeier, J.E., Cookenham, T., Miller, S.C., Roberts, A.D., Christensen, J.P., Thomsen, A.R., & Woodland, D.L. (2009). CXCR3 Directs antigen-specific effector CD4⁺ T cell migration to the lung during parainfluenza virus infection. *The Journal of Immunology*, 183 (7), 4378-4384.

37. Stadler, B.M., Kristensen, F., De Weck, A.L. (1980) Thymocyte activation by cytokines: direct assessment of G0-G1 transition by flow cytometry. *Cell Immunol* 55: 436.
38. Fearon, D.T. & Locksley, R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272 (5258),50-54.
39. Zeng, M.(2011). Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J. Clin. Invest.* 121, 998–1008.
40. Salinas-Carmona, M.C., Pérez Rivera, I. (2004), Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infection and Immunity.* 72: 5596-5604.
41. Torres E. (1995). Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.
42. Salinas-Carmona, M.C., Perez Rivera, I., Welsh, O., Rodríguez, M., Rinaldi, M.G. (1992). Identification of intracelular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J MYcil. Med* 2: 1-5.
43. González-Suarez, M.L., Salinas-Carmona, M.C. & Perez-Rivera, I. (2009).IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 57(1), 17.24.
44. Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M.F., Bojalil, M.F. (1972) Cytoplasmic antigens from *Nocardia* eliciting a specific delayed hipersensitivity. *Infect Immunity* 5(6):879-882.
45. Beaman, B.L., Boiron, P., Beaman, L., Brownell, G.H., Schaal, K., Gombert, M.E. (1992). *Nocardia* and nocardiosis. *Jmed Vet Mycol;* 30 1:317-31.

46. Rico, G., Ochoa, R., Oliva, A., González, M., Walker S., Ortiz, L. (1982). Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B-cells. *J Immunol* 1982; 129 (4): 1688-93.
47. Deem, R.L., Beaman, B.L., Gershwin, M.E. (1982). Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in Nude Mice. *Infection and Immunity* 38: 914-920.
48. Mc Neil, M.M., Brown, J.M. (1994) The medical important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Rev.* 3:357-417.
49. Ehlers, S., Mielke, M., Hahn, H. (1994). Progress in TB research: Robert Koch's dilemma revisited. *Immunol Today* 15(1):1-4.
- Zhu, J., Yamane. H., Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology.* 28: 445.
50. Lee, M.K., Xu, S., Fitzpatrick, E.H., Sharma, A., Graves, H.I., Czerniecki, B.J. (2013). Inhibition of CD4⁺ Cd25⁺ Regulatory T cell function and conversion into Th1- like effectors by a Toll-like receptor – activated dendritic cell vaccine. *PloS one.* 8(11).
51. Matsuse, H., Behera, A.K., Kumar, M., Rabb, H., Lockey, R.F., Mohapatra, S.S. (2000). Recurrent respiratory syncytial virus infections in allergen-sensitized mice lead to persistent airway inflammation and hyperresponsiveness. *Journal of Immunology.* (12): 6583- 92.
52. Hamada, H., Garcia-Hernandez, M.D., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., Mckinstry, K.K. (2009). Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *Journal of Immunology.* 182 (6): 3469-81.
53. Chen, K., Kolls, J.K. (2013). T cell – mediated host immune defenses in the lung. *Annual review of immunology.* 31, 605-33

54. Kaech, S. M. & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 749–761.
55. Masopust, D. & Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 309–320.
56. Beaman, L., Beaman, B. (1990). Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect Immun* 58: 3122-3128
57. Maghoub, E.S. (1978). Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, nu/nu strain with mycetoma agents. *Sabouraudia* 16:225-228.
58. Deem, R.L., Doughty, F. A. & Beaman, B. L. (1983). Immunologically specific direct T Lymphocyte-mediate killing of *Nocardia asteroides*. *J. Immunol.* 130: 2401-2406.
59. Beaman, B.L. (1993). Ultrastructural analysis of growth of *Nocardia asteroides* during invasion of the murine brain. *Infect. Immun.* 61, 274–283.
60. Folb, P.I., Timme, A., Horowitz, A. (1977). *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect Immun* 18: 459-466.
61. Beaman, B.L., Scates, S.M. (1981). Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun* 33: 893-907.
62. Serrano, J.A., Sandoval, H.A., Beaman, B.L. (2007). *Actinomycetoma*. Plaza y Valdez Editores. México.
63. Rodriguez-Tovar, L.E. (1997). Estudio comparativo de la respuesta proliferativa de linfocitos de ratones BALB/c infectados o inmunizados con antígenos de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.

64. Guimares, C.C., Castro, L.G., Sotto, M.N. (2003) Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta trop* 87:377-384.
65. Wherry, J. & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 15: 486-499.
66. Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 131, 492–499.
67. Schietinger, A. & Greenberg, P. D. (2014). Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 35, 51–60.
68. Nguyen, L. T. & Ohashi, P. S. (2014). Clinical blockade of PD1 and LAG3 - potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 45–56.
69. Weksler, M.E. (1981). The senescence of the immune system. *Hosp Pract*: 53.
70. Makinodan, T., Kay, M.B. (1980) Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 29:287.
71. Adler, W.H., Jones, K.H., Brock, M.A. (1978) Aging and immune function. In: Behnke JA, Finch CE, Moment GB (eds) *The biology of aging*. Plenum, New York, p 2213.
72. Joncourt, F., Bettens, F., Kristensen, F., de Weck, A.L. (1981). Age-related changes of mitogen responsiveness in different lymphoid organs from outbred NMRI mice. *Immunobiology* 158:39.
73. Chang, M.P., Makinodan, T., Peterson, W. J., Strehler, B.L. (1982) Role of T cells and adherent cells in age- related decline in murine interleukin 2 production. *J Immunol* 129:2426.
74. Gillis, S., Kozak, R., Durante, M., Weksler, M.E. (1981) Immunologic studies of aging. Decreased production of and response to T-cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J Clin Invest* 67:937

75. Thoman, M.L., Weigle, W.O. (1982). Cell-mediated immunity in aged mice: an underlying lesion in IL 2 synthesis. *J Immunol* 128:2358.
76. Blattman, J. N. (2003). Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat. Med.* 9, 540–547.
77. Rosas-Taraco, A.G., Perez-Liñan, A.R., Bocanegra-Ibarias, P., Perez-Rivera, L.I. & Salinas-Carmona, M.C. (2012). *Nocardia brasiliensis* induces an immunosuppressive microenvironment that favors chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 80: 493–499.
78. Ng, C. T. & Oldstone, M. B. (2012). Infected CD8 α - dendritic cells are the predominant source of IL-10 during establishment of persistent viral infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 14116–14121.
79. Richter, G., Behrendt, R., Schwendener, R.A., Sexl, V., Dunn R., Masahito, K., Flavell R., Roers A. & Oxenius A. (2013). Macrophage and T cell produced IL-10 promotes viral chronicity. *PLoS Pathogens*, 9 (11).
80. Cyktor, J.C., Turner, J. (2011) Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun* 79(8):2964–2973
81. Brooks, D. G. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.* 12, 1301–1309.
82. Ejrnaes, M. (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J. Exp. Med.* 203, 2461–2472.
83. Veiga-Parga, T., Sehrawat, S. & Rouse, B. T. (2013) Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol. Rev.* 255, 182–196.
84. Miles, A.A & Misra, S.S. (1938).The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg. (London)*, 38, 732.
85. D’Elios, M.M., Benagiano, M., Bella, C., Amedei, A. (2011). T-cell response to bacterial agents. *J Infect Dev Ctries*; 5(9):640-645.

86. Vera, C. L., Salinas-Carmona, M. C., Waksman, N., Messeguer, P. J., Candiani, J.O. & Welsh O. (2012). Host defenses in subcutaneous mycoses. *Clinics in Dermatology*, 30, 382 – 388.
87. Welsh, O. & López, R. (1985). Micetoma con diseminación pulmonar. *Med. Cut. Iber. Lat.* 13: 517 – 523.
88. Ohtani, O., & Ohtani, Y. (2008). Structure and function of rat lymph nodes. *Archives of Histology and Cytology*, 71(2), 69–76.
89. Gordon, M.A., Mahgoub E.S. (1980). Immune response to aerobic pathogenic actinomycetaceae. *Manual of Clinical Immunology*. American Society for Microbiology.
90. Small, P., Ramakrishnan, L., Falkow, S. (1994). Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science* 263:637-639.
91. Laskay, T., van Zandbergen, G. & Solbach, W. (2003) Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? .*Trends Microbiol.* 11, 210–214.
92. van Zandbergen, G., Gieffers, J., Rupp J., Bollinger, A., Aga, E., Klinger, M., Brade, H., Dalhoff, K., Maass, M., Solbach, W., Laskay T. (2004) *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J. Immunol.* 172, 1768–1776.
93. Altman, J., Paul, A., Moss, H., Goulder, R., Barouch, D., McHeyzer-Williams, M., John 1. Bell, Andrew J. McMichael M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274: 94-96.
94. Busch, D., Pamer, E. (1999). T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology Letters.* 65:93–98
95. Phyu, S., Sornes, S., Mustafa, T., Tadesse A., Jonsson R. & Bjune G. (1999). Changes in T-Lymphocyte Subsets in lungs and spleens of mice with slowly progressive primary *Mycobacterium tuberculosis* infection: involvement of unconventional T-Cell subsets. *Scand. J. Immunol.* 50, 137–144.

96. Harris, N., Watt, V., Ronchese, F. & Le Gros G. (2002). Differential T Cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 195,(3): 317–326.
97. Palma, A., Castrillón, L., Pizaña, A., Vega, M., López, A., Arenas, R., Padilla, M. (2007). Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. *Dermatología Rev Mex*; 51(6):212-8.
98. Espinosa, V. (2012). Estimulación de linfocitos TCD4 Th1 en actinomicetomas inducidos por *Nocardia brasiliensis* en ratones balb/c y estimulados con un péptido de *Candida albicans*. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico Nacional.
99. Almaguer-Chávez, J., Welsh, O., Lozano-Garza H., Said-Fernández S., Romero-Díaz V., Ocampo-Candiani J. & Vera-Cabrera L. (2011). Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. *BMC Infectious Diseases* 11:290.
100. Redford, P.S., Murray, P.J., O'Garra, A. (2011). The role of IL-10 in immune regulation during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol.* 4:261–270.
101. El Hassan, A.M., Fahal, A.H., Ahmed, A.O., Ismail, A., Veress, B. (2001). The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 89.
102. Heuze, I., Castrillon, L., Garibay, A., Sandoval, H., Padilla, C., Palma, A. & Santos, L. (2011). Immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells and intracellular detection of IL-2, INF-g and IL-4 by flow cytometry in patients with actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* and *Actinomadura madurae*. Findings in six patients. *Health* 13 (3) 172-178.

103. Westermann, J., Ronneberg, S., Fritz, F. & Pabst, R. (1989). Proliferation of lymphocyte subsets in the adult rat: a comparison of different lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 19: 1087-1093.
104. Taiki, A., Zinselmeyer, B., Konjufca, V., Lynch, J., Zhang, X., Koide, Y. & Miller M. (2008). Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8⁺ T Cells. *Immunity* 29, 476–486.
105. Mebius, R.E. & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616.
106. Bautista, M.J., Carrasco, L.; Pérez, J.; Chacón M. de Lara, F., Hervas, J. & Sierra, M.A. (1994). Estudio comparativo del bazo en los diferentes mamíferos domésticos. *An. Vet.* 9-10: 83-97.
107. Blue, J., Weiss, L. (1981). Species variation in the structure and function of the marginal zone: an electron microscope study of cat spleen. *Am. J. Anat.* 161:169-187.
108. Mitchell, J., Abbot, A. (1971). Antigens in immunity. XVI. A light and electron microscope study of antigen localization in the rat spleen. *Immunology* 21:207-224.
109. Bronte, V. & Pittet, M. (2013). The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity* 39.
110. Odoardi, F., Kawakami, N., Li, Z., Cordiglieri, C., Streyl, K., Nosov, M., Klinkert, W.E., Ellwart, J.W., Bauer, J., Lassmann, H. (2007). Instant effect of soluble antigen on effector T cells in peripheral immune organs during immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 920–925
111. Busch, D., Pilip, I., Sujata, S. & Pamer, E. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial Infection. *Immunity*, Vol. 8, 353–362.
112. Sercarz, E.E., Lehmann, P.V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A. & Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 7229–7266.

113. Mackay, C.R., Marston, W. & Dudler, L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171:801–817.
114. Ramos, A. (1999). Efecto de la concentración y del estado físico de antígenos de *Nocardia brasiliensis* en las respuestas humoral y celular contra una fracción inmunodominante en ratones balb/c. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. U.A.N.L.
115. Shigemori, H., Komaki, H., Yazawa, K., Mikami, Y., Nemoto, A., Tanaka, Y., Sasaki, T., In, Y., Ishida, T. & Kobayashi, J. (1998) Brasilicardin A. A novel tricyclic Metabolite with potent immunosuppressive activity from actinomycete *Nocardia brasiliensis*.

116. ANEXOS

I.-PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

MEDIO DE CULTIVO BHI.

1. Pesar 3.7 g de medio BHI.
2. Disolver en 100 ml de agua destilada.
3. Dividir en 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml.
4. Esterilizar.

PREPARACIÓN DE PBS con BSA al 0.5%

1. Pesar 0.5g de albumina sérica bovina (BSA)
2. Agregar los 0.5 g de BSA a 100ml de PBS con pH 7.4
3. Alicuotar y mantener a -20°C.

PBS, (pH 7.2, 7.4).

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

SOLUCIÓN DE ANESTESIA PARA RATÓN.

- 1.- En 8 ml de PBS.
- 2.- Agregar 1 ml de Ketamina (100mg/1ml).
- 3.- Agregar 1 ml de Xilazina (20mg/1ml).

PREPARACIÓN DE MEDIO RPMI X 10% DE FBS

- 1.- En 500 ml de Medio de crecimiento RPMI 1640.
- 2.- Se agrega 50 ml de FBS inactivado por calor.
- 3.- Agregar 5 ml de Penicilina Estreptomicina al medio (10, 000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina).
- 4.- Guardar a 4°C.

Nota: usar el medio durante las primeras tres semanas de haberlo preparado.

BUFFER DE LISIS DE GLÓBULOS ROJOS 10X

- 1.- Pesar 8.26 g de NH_4Cl .
- 2.- Agregar 1.19 g de NaHCO_3 .
- 3.- Agregar 200 μL de EDTA [0.5 M, pH8].
- 4.- Agregar agua destilada hasta 100 mL.
- 5.- Ajustar pH a 7.3.
- 6.- Esterilizar por filtrado.

FORMALINA AL 10%

- 1.- 10 mL de formaldehído al 37%.
- 2.- 90 mL de PBS.

PARAFORMALDEHIDO AL 2% (PARA FIJAR CÉLULAS).

- 1.- 10 mL. de formaldehído al 10%.
- 2.- 5 mL. de PBS al 10x.
- 3.- 35 mL. de agua mili Q.

DILUCIÓN DE LA COLAGENASA.

1.-Diluir la colagenasa 1:10 con cRPMI..

DILUCIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES MARCADOS CON FLUOROCROMOS.

1.- Agregar 1 μ L de anticuerpo monoclonal y diluirlo a la concentración deseada con PBS con BSA al 0.5 %.

PREPARACIÓN DE BUFFER FACS

- 1.- Pesar 0.5g de BSA
- 2.- Pesar 0.005g de NaN_3
- 3.- Disolver en 10 ml de PBS

NOTA: este buffer se debe realizar al momento de utilizar.

PREPARACIÓN DE BUFFER BLOQUEADOR

- 1.- Pesar 0.5g de BSA
- 2.- agregar 200 μ l de suero fetal bovino.
- 3.- Disolverlo en 10 ml de PBS.

NOTA: este buffer se debe realizar al momento de utilizar.

RESUMEN AUTOBIBIOGRÁFICO

Juan Ricardo Téllez Dorado

**Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación
en Inmunología Médica**

**Tesis: CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS
T CD4⁺ Y CD8⁺ EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 15 de Julio de 1991,
hijo de Felipe Legazpe González y Virginia Dorado Arce.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 2013.