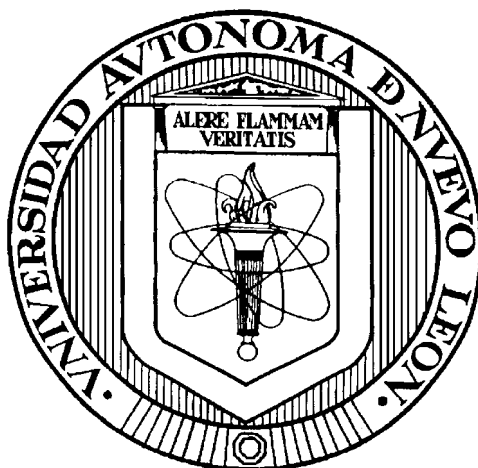


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-1beta, IL-6, IL-12, IFN-gama y TNF-alfa EN LA INFECCIÓN CON *Nocardia brasiliensis*.

Por

M.V.Z JOSE LUIS VAZQUEZ JUAREZ

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Julio 2007

PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-1beta, IL-6, IL-12, IFN-gama y TNF-alfa EN LA INFECCION CON *Nocardia brasiliensis*.

Aprobación de la Tesis:

Dr. Rafael Ramírez Romero
Asesor Interno

Dr. Juan Manuel Solís Soto
Asesor Externo

Dra. Josefina García Herrera
Co-asesor

Dr. Luís Edgar Rodríguez T.
Co-asesor

Dr. Gustavo Hernández Vidal
Subdirector de Estudios de Posgrado

PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-1beta, IL-6, IL-12, IFN-gama y TNF-alfa EN LA INFECCIÓN CON *Nocardia brasiliensis*.

Por

M.V.Z. José Luis Vásquez Juárez

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Juan Manuel Solís Soto.

Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Solís Soto

DEDICATORIA

Con admiración y cariño a la memoria de mi padre Sr. Pablo Vázquez Rojas (Q.E.P.D.) que con su ejemplo de entereza y valores me guió para ser una persona de bien.

A mi madre la Sra. María de los Angeles Juárez Vda. De Vázquez. Por darme la vida, su apoyo incondicional en todo momento y por el amor que siempre me ha brindado.

A mi esposa Juanita Hernández Moreno de Vázquez, por su amor, cariño, comprensión e impulsar siempre mis proyectos

A mis hijos Luis Ernesto, Edgar Alan y Evelyn Dennis por ser como son y por empeñarse a ser mejores todos los días

A mis hermanos, María del Carmen, Juan Pablo (QEPD), Francisca, Georgina, Ángel Javier, Ana Cristina y Raúl Ricardo, por permitirme ser su familia.

A mis compañeros de la facultad de Medicina de la UANL y colegas de profesión, Ruth Álvarez Cantu y Gilberto Arévalo Martínez, por apoyarme en todo momento, por su crítica constructiva para con mi trabajo y por brindarme su confianza.

AGRADECIMIENTOS

Con admiración y respeto al Dr. Mario César Salinas-Carmona, jefe del departamento de Inmunología del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la UANL, por permitirme laborar en su laboratorio para el desarrollo de esta tesis.

A mi Director de tesis y asesor externo Dr. Juan Manuel Solís Soto, por su apoyo y comprensión para la elaboración de este trabajo de investigación.

A mis asesores de Tesis, Dr. Rafael Ramírez Romero, Dra. Josefina García Herrera, Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar, por su gran apoyo en todo momento, y brindarme su apoyo solidario.

A mis profesores de la Maestría de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León que compartieron sus conocimientos conmigo y por su apoyo para ayudarme a cumplir mi meta.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez, por su afecto, comprensión y mostrarse como un excelente profesional en las distintas etapas donde tuve el privilegio de contar con él.

Al Dr. Demetrio Arcos Camargo, por su apoyo incondicional, su paciencia y sus sabios consejos.

A mis compañeros de Maestría, Rocio, Armando, Jorge y Rubén, por permitirme interactuar con ustedes en los momentos de crisis en la realización de este proyecto.

A la Dra. Nancy Fernández Garza por las facilidades que me otorgo para concluir este posgrado.

A todos mis compañeros del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

A Dios por regalarme esta familia, bendecir mi vida y permitirme realizar mis sueños.

***“APRENDE COMO SI FUERAS A VIVIR PARA SIEMPRE
VIVE COMO SI FUERAS A MORIR MAÑANA”***

-Mahatma Gandhi-

Hay 2 cosas que definen la grandeza de un hombre.

La primera es tener la capacidad de saberse limitado

Y reconocer que necesita de Dios y de los demás.

***La segunda es soñarse ilimitado con la posibilidad
de mejorar el tiempo y espacio que le tocó habitar.***

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Micetoma	1
1.2 Mecanismos Inmunes	2
1.3 Citocinas Proinflamatorias	3
2 ANTECEDENTES	5
2.1 Historia	5
2.2 Etiología	5
2.3 Epidemiología	6
2.4 Patogenia	7
2.5 Inmunidad	9
2.5.1 Respuesta Inmunitaria Innata	10
2.5.2 Respuesta Inmunitaria Adaptativa	11
2.5.3 Citocinas	12
2.5.3.1 Interleucina 1 beta	12
2.5.3.2 Interleucina 6	13
2.5.3.3 Interleucina 12	13
2.5.3.4 Interferón gama	13
2.5.3.5 Factor de Necrosis Tumoral alfa	13

Capítulo	Página
3 HIPÓTESIS	14
4 OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo General	15
4.2 Objetivo Particular	15
5 MATERIALES Y METODOS	16
5.1 Animales de Experimentación	16
5.2 Infección Experimental	16
5.3 Estudio Histopatológico	17
5.4 Inmunocitoquímica	18
6 RESULTADOS	20
7 DISCUSIÓN.	30
8 CONCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	35
APENDICE A	43
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.	46

LISTA DE TABLA Y FIGURAS

Tabla	Página
1. Resultados de la distribución de células productoras de citocinas	23

Figuras	Página
1. Modelo de Infección de ratón con <i>N. brasiliensis</i>	24
2. Fotomicrografías de células expresando IL-1 beta en la región plantar del ratón infectado con <i>N. brasiliensis</i>	25
3. Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón infectado con <i>N. brasiliensis</i> , se muestran células inmunoreactivas a IL- 6.	26
4. Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón tratado con <i>N. brasiliensis</i> , se muestran células inmunoreactivas a IL-12.	27
5. Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar de ratón infectado con <i>N. brasiliensis</i> se muestran células inmunoreactivas a IFN gama.	28
6 Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón infectado con <i>N. brasiliensis</i> , se muestran células inmunoreactivas a TNF – alfa	29

ABREVIATURAS

ATCC700358.	Registro de cepa de bacteria
BALB/c.	Cepa de ratones
C	Centígrados
c/u	cada uno
cm ³	Centímetro cúbico
CSF	Factor Estimulante de Colonias
d	día
<i>et al</i>	y otros
Fig.	Figura
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	gramo
h	hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HUJEG-1	Hospital Universitario José Eleuterio González
IL-1 beta	Interleucina 1 beta
IL-6,	Interleucina 6
IL-12,	Interleucina 12
IFN-gama	Interferón gama
<i>in situ</i>	en el sitio
<i>M</i>	<i>Micobacteria</i>
M	Concentración molar
μ	micras
mg	miligramo
ml	mililitro
μl	microlitros
<i>N</i>	<i>Nocardia</i>
nu/nu	desnudo (nude)

NK	Natural Killer.
NOM	Norma Oficial Mexicana
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de iones hidrógeno
SAC	Sacrificio
<i>Spp</i>	Especie
T	Tipo de linfocito
TGF	Factor Transformador del Crecimiento
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

José Luis Vázquez Juárez

Fecha de titulación Julio 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Título del Estudio: Presencia y distribución de células productoras de IL-beta, IL-6, IL-12, IFN –gama, y TNF-alfa en la infección con *Nocardia brasiliensis*

Numero de páginas: 60 **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias Veterinarias con especialidad en Salud Animal**

Área de Estudio: Inmunología

Resumen El actinomicetoma es una infección que se presenta en algunas especies de animales y en el hombre. El principal agente causante es *N. brasiliensis*. Esta bacteria dentro del hospedero interacciona de una manera compleja con el sistema inmunitario donde las citocinas juegan un papel preponderante. En esta investigación se inocularon bacterias *N. brasiliensis* en el cojinete plantar de ratones BALB/c. posterior a la inoculación se sacrificaron a los ratones por dislocación cervical 1, 2, 3, 4, 7, 30 y 90 días.

Estudios inmunocitoquímicos mostraron que las citocinas participan en la respuesta inmune temprana contra *Nocardia brasiliensis*. Desde del primer día se detectaron células inmunoreactivas a todas las citocinas proinflamatorias. Las células dendríticas de la epidermis mostraron producción de IL-1 beta en los primeros días y disminuyeron al día 7 y 30. Los linfocitos de la epidermis y dermis fueron inmunoreactivos a IL-6, en el inicio de la enfermedad. A los 30 días se encontraron en gran cantidad en la periferia del absceso. La IL-12 fue producida por células dendríticas de la dermis y la epidermis durante todo el curso de la enfermedad. El IFN-gama fue sintetizado en gran cantidad durante los primeros días de la infección en los sitios de la inflamación. El TNF-alfa se detectó en células de la dermis durante todo el curso de la infección.

De acuerdo a su localización, las citocinas proinflamatorias participan activamente en el proceso de defensa en contra de *Nocardia brasiliensis*.

Firma del Asesor _____

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

1.1 Micetoma

Es una enfermedad infecciosa crónica, progresiva y granulomatosa de la piel, se define como una infección de tejidos subcutáneos y músculo, se puede extender a huesos y órganos adyacentes, pero no se disemina por el sistema circulatorio. Se caracteriza por la formación de edema tisular y trayectos fistulosos que contiene gránulos (Welsh et al., 2007).

Puede ser producida por hongos, en cuyo caso se denomina eumicetoma, si el micetoma es de origen bacteriano recibe el nombre de actinomicetoma (Lichon y Khachemoune 2006).

El actinomicetoma se adquiere por inoculación traumática en la piel de la bacteria *Nocardia brasiliensis* que vive como saprofita en el suelo en las condiciones de temperatura y humedad de las áreas tropicales y subtropicales (Vera-Cabrera et al., 1992).

En un estudio histopatológico de las lesiones en humanos se observó que los hallazgos son similares a las observadas en un modelo de actinomicetoma experimental en ratones de la cepa BALB/c (Salinas-Carmona, 2000).

Las infecciones con bacterias intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* (Cardona et al., 2000) y *N. brasiliensis* (Salinas-Carmona et al., 2000) muestran una destrucción progresiva del tejido asociada a una intensa respuesta inflamatoria, caracterizada por neutrófilos y macrófagos, subsecuentemente, los linfocitos se acumulan progresivamente.

Algunas de las células participantes en contra de la infección ya han sido caracterizadas (Hassan et al., 2001; Guimaraes et al., 2003).

1.2 Mecanismos Inmunes

Todas las células del sistema inmune necesitan estar conectadas entre sí para elaborar en forma conjunta y ordenada una respuesta inmune que termine con la eliminación del patógeno. Para esto las células utilizan 2 medios de comunicación: uno es el contacto directo mediante las distintas moléculas de membrana y la otra forma es la síntesis de citocinas, que son producidas en los primeros instantes de la activación celular (Rakoff-Nahoum y Medzhitov 2006).

Los mecanismos inmunes de defensa del hospedero y las estrategias bacterianas para sobrevivir son complejas. Las bacterias deben modular las vías apoptóticas para mantener vivo a su hospedero con el fin de completar su ciclo de replicación. En este punto en particular, la citocinas juega un papel preponderante. Las citocinas participan en la diferenciación de las células T CD4 nativas, ya que de acuerdo a las citocinas a que son expuestas se diferencian hasta células T cooperadoras - 1 (Th 1 helper en inglés)., Célula T cooperadora 2 (Th 2 helper en ingles)., Célula T cooperadora reguladora (Th reg.). o Células T cooperadoras 17 (Th 17 helper en ingles). (Stockinger y Veldhocrn, 2007; Reiner, 2007).

1.3 Citocinas Proinflamatorias.

La respuesta inmunitaria desencadena la producción de moléculas denominadas citocinas proinflamatorias; Interleucina – 1 (IL-1), Interleucina - 6 (IL- 6), Interleucina – 8 (IL- 8), Interleucina -12 (IL-12), Interleucina 18 (IL -18), Interferón gama (IFN – gama), y factor de necrosis tumoral - alfa (TNF – alfa). y sus efectos son a nivel local y sistémicos (Gogos, et al., 2000).

Las citocinas proinflamatorias son producidas por gran variedad de células como son macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células epiteliales entre otras (Hessle et al., 2005; Mariathasan y Monack, 2007). Pueden promover y favorecer el crecimiento bacteriano (Porat et al., 1991; Meduri et al., 1999; Kanangat et al., 1999). Las citocinas proinflamatorias juegan un papel relevante en el inicio y amplificación de la respuesta inmune local, y participan en la inmunidad protectora, pero también pueden incrementar la patología de la infección (Langhome et al., 2004).

La IL-1 beta es una citocina altamente inflamatoria, puede estimular las defensas del hospedero y funcionar como inmunoadyuvante (Dinarello, 2000).

La IL- 6 es una citocina pleiotrópica que afecta al sistema inmune y actúa en otros sistemas fisiológicos de varios órganos, incluso puede generar señales distintas y algunas veces opuestas (Kamimura et al., 2003; Kishimoto, 2005).

La IL- 8 es secretada por células endoteliales, fibroblastos, monocitos y macrófagos, es un factor quimiotáctico para neutrófilos y regula la producción de proteínas de adhesión (Hessle et al., 2005).

La IL-12 es producida principalmente por células fagocíticas en respuesta a bacterias, productos bacterianos y parásitos intracelulares (Trinchieri, 1995). Esta citocina es especialmente importante porque su expresión durante la infección regula la respuesta inmune innata y determina el tipo y duración de la respuesta inmune adquirida, induce la producción de IFN - gama por células dendríticas, linfocitos T, células NK y macrófagos (Watford et al., 2003).

La IL-18 Es producida por macrófagos y por células de Th1, induce la producción de IFN y aumenta la actividad de células NK (Marinic et al., 2006).

El IFN - gama es una citocina importante en la defensa del hospedero en contra de la infección por patógenos virales y microbianos, induce una variedad de respuestas fisiológicamente significantes que contribuyen a la inmunidad (Shtrichman y Samuel, 2001).

El TNF - alfa es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda, estimula el reclutamiento de los neutrófilos y monocitos en los focos de infección (Bekker et al., 2000; Marinic et al., 2006).

Un estudio previo demostró que las citocinas circulantes aumentaron durante los primeros días después de haber infectado ratones BALB/c con *N. brasiliensis* (Salinas-Carmona et al., 1999). En el presente estudio se pretende determinar la población celular inmunológicamente activa que produce citocinas proinflamatorias en estadios agudos y crónicos en la piel de la región plantar del ratón, como modelo experimental de actinomicetoma.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Historia

La enfermedad de micetoma se presenta de manera natural, en bovinos, cerdos, ovinos, caprinos, equinos, perros, gatos, primates, armadillos, venados, mamíferos marinos, aves, peces y en el ser humano (Beaman y Beaman, 1994). La infección se presenta por inoculación traumática de una bacteria u hongo en la piel o tejido subcutáneo, si el microorganismo es un hongo la enfermedad se denomina eumicetoma y si es una bacteria se le conoce como actinomicetoma (Welsh et al., 1995). En el hombre la infección se presenta con múltiples abscesos en piel, tejido subcutáneo, pulmón y en el sistema nervioso central (Zlotnik y Buckley, 1980; Georghiou y Blacklock 1992).

2.2 Etiología

El actinomicetoma es causado por la bacteria del género *Nocardia* que fue descrita por el médico veterinario Francés Nocard en 1888, aislada de un bovino que presentaba una lesión de mastitis (Pillet, 2003).

El microorganismo del género *Nocardia* es un bacilo gram positivo, parcialmente ácido-alcohol resistente, inmóvil, no esporulado, filamentoso, catalasa-positiva y aerobio estricto, se caracteriza por la presencia de ácido mesodiaminopimelico (DAP) y los azúcares arabinosa y galactosa en su peptidoglucano de la pared celular (Beaman y Beaman, 1994).

Las colonias de las diferentes especies de *Nocardia* crecen en agar sabourand en un período de 4 a 5 días a una temperatura de entre 27° y 37° C, las cuales se observan con pliegues regulares, lisos, húmedos, rugosos y blanco amarillentas y forman filamentos ramificados que se extienden en la superficie del agar (Vera-Cabrera et al., 1992).

Actualmente se han descrito 30 especies del género *Nocardia* de importancia clínica (Brown-Elliott et al., 2006). De las que se conocen 11 patógenas en el ser humano; *N. abscessus*, *N. brasiliensis*, *N. brevicatena*, *N. cyiacigeorgica*, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. paucovorans*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. transvalensis*, *N. veterana* (Beaman y Beaman, 1994; Conville et al., 2002).

Los actinomicetos son abundantes en el medio ambiente y es fácil la posibilidad de adquirirlos, pero se reportan pocos casos, ya que muchos factores impiden el desarrollo de la enfermedad (Méndez-Tovar et al., 2004). Se conoce muy poco la respuesta inmune contra la *Nocardia* por lo que se estudia en varios animales de laboratorio como modelos experimentales para investigar varios aspectos de esta enfermedad (Conde et al., 1983).

2.3 Epidemiología

El género *Nocardia* está ampliamente distribuido en el suelo descomponiendo sustancias orgánicas complejas como celulosa, proteínas, polisacáridos, lípidos, parafinas y otras fuentes de carbono y energía (Sachs, 1992).

La enfermedad se presenta en todo el mundo, y se puede adquirir por inoculación traumática o por inhalación. En el hombre, 98 % de los micetomas son causados por actinomicetos, de los cuales el 86% corresponden a los casos causados por *Nocardia brasiliensis* (González-Ochoa et al., 1962; Welsh et al., 1995; Castro y Espinoza 2007).

Su incidencia mundial más alta se localiza entre el trópico de Cáncer, y el área de las latitudes 15° S y 30° N. Los países más afectados son India, Sudan, Senegal, Somalia, Venezuela y México (Welsh et al., 1995). En México, los estados más

afectados son los del centro de la república entre los que se encuentran Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (Serrano y Sandoval, 1992; Welsh, 1995).

2.4 Patogenia

Nocardia produce un actinomicetoma, infección crónica y granulomatosa, que afecta a la piel, tejido subcutáneo y músculo. La lesión ocurre en miembros inferiores y ocasionalmente en manos y tronco (Welsh et al., 1995).

Al inicio de la enfermedad el microorganismo penetra al tejido, iniciando con celulitis pustular y edema subcutáneo, las pústulas al romperse forman fístulas en tejidos profundos, llegando a ser necróticos con pus, la infección se caracteriza por granos que son las microcolonias de la bacteria (Wortman, 1995). Microscópicamente se observan como un proceso inflamatorio y fibroplásico con exudado rico en neutrófilos (Hironaga et al., 1990; Welsh et al., 1995).

Los macrófagos eliminan las bacterias del tejido afectado mediante la fagocitosis no selectiva y actúan bajo el control de citocinas y quimiocinas (Adams y Hamilton, 1984).

Durante la respuesta inmunitaria se producen diferentes grupos de citocinas (Mossmann, 1992). Que transmiten señales a diversas células; entre los cuales se encuentran:

Los Interferones (IFN) son importante para evitar la diseminación de ciertas infecciones víricas, algunos son producidos por la propia célula infectada o por determinadas células T activadas, se producen en las fases iniciales de la infección y constituyen la primera línea de defensa frente a muchos virus (Fujiwara y Kobayashi, 2005).

Las Interleucinas (IL) es un grupo extenso de citocinas que son producidas fundamentalmente por las células T, fagocitos mononucleares y algunas células tisulares, inducen la diferenciación y multiplicación de otras células (Mariathasan y Monack, 2007).

Los Factores Estimulantes de las Colonias (CSF) estos intervienen en la diferenciación y multiplicación de las células madre de la médula ósea y de los precursores de los leucocitos sanguíneos (Griffin et al., 1990).

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF): Son especialmente importantes en las reacciones inflamatorias y citotóxicas (Balkwill y Burke ,1989; Fujiwara y Kobayashi, 2005; Akira et al., 1993).

Las interacciones inespecíficas en los neutrófilos pueden contribuir a la incapacidad de la *Nocardia brasiliensis* en el contexto de una inmunodepresión celular. Los pacientes con defectos específicos en el mecanismo oxidativo de los fagocitos, como por ejemplo en la enfermedad granulomatosa crónica, son más vulnerables a esta infección (Mariathasan y Monack 2007).

El micetoma afecta a individuos inmunocompetentes, sin embargo en la mayoría de los casos es una infección oportunista que se presenta comúnmente en pacientes en tratamiento con corticoesteroides, con inmunosupresión, trasplante de órganos, SIDA, tuberculosis o alcoholismo (Schwartz et al., 1988; Kofteridis et al., 2005).

En primera instancia los polimorfonucleares, neutrófilos y los macrófagos tisulares son los mecanismos de defensa esenciales frente a *Nocardia* (Silva y Faccioli, 1992)

Las especies de *Nocardia* en su pared celular no contienen lipopolisacárido, polisacárido capsular, ni fimbrias en su superficie (Conville et al., 2002). El contenido en polímeros de ácido mícólico de la pared celular exhibe cierta concordancia con la virulencia de las cepas. De modo genérico las cepas

virulentas de *Nocardia* son relativamente resistentes a la muerte inducida por los neutrofilos, por ejemplo son capaces de inhibir la oxidación y de prevenir la fusión del complejo fagosoma-lisosoma (Revol et al., 2006).

La inoculación accidental en la piel de una de las especies patogénicas de *Nocardia* es un hecho mucho más frecuente de lo habitualmente reconocido. La lesión es generalmente autolimitada y no suele diagnosticarse por la tinción de gram. Los cultivos prolongados necesarios para el aislamiento de *Nocardia* no son rutinariamente realizados en las lesiones cutáneas superficiales (Georghiou y Blacklock, 1992).

El actinomicetoma, también denominado pie de Madura o maduromicosis es una infección crónica, profunda, progresiva y destructiva de piel, tejido subcutáneo, músculo y hueso, que generalmente afecta a las extremidades inferiores en el humano (Welsh et al., 2007). El traumatismo introduce al actinomiceto aerobio produciendo una área de edema localizado que contiene granulomas supurativos y diversos trayectos fistulosos con múltiples gránulos. (Bhalodia et al., 1998; Welsh et al. 1995).

Al menos el 50% de los casos de micetoma citados en la literatura médica son causados por especies de *Nocardia*. *Nocardia brasiliensis* es la causa más frecuente de actinomicetomas producidos por *Nocardia*, pero *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* y *N. transvalensis* pueden también producirlo.

La enfermedad de Nocardiosis puede presentarse en 8 formas diferentes: Pulmonar, Sistémica, en Sistema Nervioso Central, Extrapulmonar, Cutánea, Subcutánea, Linfocutanea, Actinomicetoma (Beaman y Beaman 1994; Castro y Espinosa 2007).

2.5 Inmunidad

La primera fase de cualquier respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento del patógeno o del material extraño, para poder iniciar después

una reacción destinada a eliminarlo. La respuesta inmunitaria se puede dividir en 2 categorías como son: La Innata y La Adaptativa (Marodi, 2006).

2.5.1 Respuesta inmunitaria innata

Está constituida por células cuya función primordial es la fagocitosis de los microorganismos patógenos o sus toxinas y están presentes antes de que se desarrolle la infección teniendo una rápida respuesta reaccionando básicamente igual en diferentes exposiciones repetidas. Mientras que la respuesta adaptativa tiene una alta especificidad a un determinado antígeno (Fujiwara y Kobayashi, 2005).

La diferencia mas importante que existe entre ambas, es que la respuesta innata no se modifica tras la exposición repetida a un determinado agente infeccioso, mientras que la adaptativa aumenta tras la exposición repetida del mismo antígeno, y recuerda al agente infeccioso, las células que participan principalmente son los linfocitos (Woods et al., 2006).

Respuesta Inmunitaria Innata está constituida principalmente por un grupo de leucocitos llamadas células fagocíticas, entre las que se encuentran los monocitos, macrófagos y polimorfonucleares. Estas células se unen a los microorganismos, los ingieren y destruyen, su sistema de reconocimiento es primitivo, carecen de especificidad y se unen a una amplia variedad de productos microbianos (Aderem y Underhill 1999; Bechan et al., 2006).

La activación de los macrófagos tiene una participación importante en la protección contra las infecciones por *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis* (Silva y Faccioli 1992).

La función de los linfocitos T es importante para el control de la infección como se determinó en estudios con ratas de las cepas nu/nu atímicas y Lewis infectadas con *Nocardia brasiliensis* en donde los animales normales presentaron una infección localizada mientras que las ratas atímicas desarrollaron una infección diseminada y mas grave (Welsh et al., 1995).

La inmunidad humoral no se considera como importante en esta infección y en cambio sí favorece su patogenia (Deem et al., 1982; González-Ochoa et al., 1962; Rico et al., 1982). Aunque se han detectado inmunoglobulinas en una infección experimental en ratones (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera 2004). El suero hiperinmune de ratones inoculados con *N brasiliensis* muerta por calor, inyectado a otro grupo de ratones no manifestó efecto protector en micetoma experimental (Salinas-Carmona et al., 2006). En ratones el actinomicetoma tiene una respuesta inflamatoria inicial compuesta de un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares, a los 7 días una reacción de tipo granulomatosa y a los 14 días un granuloma con abscesos (Rico et al., 1982). La respuesta inmune en actinomicetoma causada por *Nocardia spp* mostró reacciones cruzadas con antígenos de otros actinomicetos (González-Ochoa et al., 1962; Sugar et al., 1985; Land et al., 1991). Investigaciones realizadas sugieren que la inmunidad celular es la realmente efectiva contra la infección (Deem et al., 1982; Rico et al., 1982; Welsh et al., 1995).

2.5.2 Respuesta inmunitaria adaptativa

Es un mecanismo de defensa altamente evolucionado el cual es estimulado por agentes infecciosos que se caracterizan por su especificidad y memoria. La participación de los linfocitos, es esencial en todas las respuestas inmunitarias adaptativas ya que reconocen de forma específica patógenos individuales, independientemente de que éstos se localicen en el interior o exterior de la célula del huésped, líquidos tisulares y sangre (Marinic et al., 2006).

Existen diversos tipos de linfocitos; linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK y linfocitos NKT (Sladkova y Kostolansky, 2006).

En la inmunidad celular, las células T tienen acción variada; algunas controlan el desarrollo de los linfocitos B y su producción de anticuerpos, otros establecen interacciones con células fagocíticas y les ayudan a destruir a los agentes patógenos que han ingerido (Mossman, 1992).

Atendiendo a la función de los linfocitos T estos se diferencian en células CD4 (Th linfocitos auxiliares) y células CD8 (Tc linfocitos citotóxicos).

Mientras que en la inmunidad humoral las Células B combaten a los patógenos extracelulares, mediante la producción de anticuerpos que son moléculas que reconocen y se unen específicamente a un determinado antígeno (Toellner et al., 1997).

Las células NK es el tercer grupo de linfocitos y son capaces de detectar células tumorales e infectadas por virus (Nossal, 1993).

2.5.3 Citocinas

Se denomina citocina a un gran número de moléculas diferentes, cuya función es transmitir señales entre células en el curso de una respuesta inmunitaria, son proteínas o péptidos, que regulan la función de las células que las producen (autocrina) u otro tipo de células (paracrina), su producción es breve y autolimitado a menudo son pleitrópicas y redundantes (Scott y Kaufmann, 1991). Son los agentes responsables de la comunicación intercelular e inducen la activación de receptores específicos de la membrana, desencadenando una intensa respuesta inmunitaria ya sea induciendo, ampliando o inhibiendo una serie de funciones las cuales pueden ser compartidas por las diferentes citocinas, son producidas principalmente por los linfocitos, macrófagos activados, leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, epiteliales (Fujiwara y Kobayashi 2005; Craddock y Thomas, 2006).

2.5.3.1 IL – 1 beta

Es producida por células NK y Células B. Sus principales funciones son mediar la respuesta inflamatoria del huésped, aumenta la actividad citocida de las células NK y macrófagos, activa metabólicamente a los polimorfonucleares, a nivel endotelial aumenta la permeabilidad vascular y estimula la proliferación de células T, células B y macrófagos (Vivier, 2006).

2.5.3.2 IL-6

Es secretada por los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, células T y células B. Actúan sobre células B aumentando su diferenciación e induciendo la síntesis de proteínas de la fase aguda (Paul-Pletzer, 2006). En la inmunidad innata, estimula la síntesis de proteína de fase aguda por los hepatocitos, contribuyendo a los efectos sistémicos de la inflamación. En la inmunidad adaptativa estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos, e induce a hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (Akira et al., 1993).

2.5.3.3 IL-12

Es producida por los fagocitos mononucleares y células dendríticas es un mediador principal de la respuesta inmunitaria, estimula la producción de IFN gama y es activador de células NK (Alber et al., 2006). Es esencial para el inicio de una secuencia de respuesta en las que intervienen macrófagos, células NK y linfocitos T y para la erradicación de microorganismos intracelulares, a su vez estimula la producción de IFN - gama por las células NK y participa en la inducción de linfocitos T (Trinchieri, 1993).

2.5.3.4 IFN - gama

Es producida por las células T, B, macrófagos y NK. Su acción es estimular a los macrófagos y aumentar la actividad de las células NK y células citotóxicas. Además regula la respuesta de las células T, promueve la diferenciación e inhibición de las células B y tiene propiedades inmunoregulatoras, antivíricas y antiproliferativas (Vivier, 2006).

2.5.3.5 TNF - alfa

Se produce en macrófagos, linfocitos y mastocitos su función consiste en estimular macrófagos, células endoteliales y citotóxicas, a nivel local activa el endotelio vascular y estimula a los linfocitos T y B (Vasalli, 1992).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

Cuando *Nocardia brasiliensis* infecta al ratón cepa BALB/c induce la producción de citocinas proinflamatorias por diferentes células y estas células presentan una distribución y expresión de citocinas diferentes durante el desarrollo progresivo de la infección.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Comparar la presencia y distribución de la población de células productoras de citocinas proinflamatorias durante la infección aguda y crónica de *Nocardia brasiliensis* en el ratón de la cepa BALB/c.

4.2 Objetivos Particulares

1. Analizar la histopatología de la región plantar del ratón BALB/c infectado con la bacteria *Nocardia brasiliensis*.
2. Analizar la presencia y la distribución de células productoras de IL-1 beta, IL-6, IL-12, IFN-gama y TNF-alfa, de la región plantar del ratón infectado con *N. brasiliensis* después de los días 1, 2, 3, 4, 7, 30 y 90.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 9 a 12 semanas de edad, las cuales provenían de una colonia donada por Carl Hansen del Small Animal Section, Veterinary Resources Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándares de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) en el bioterio del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL, Los ratones fueron distribuidos en 7 grupos problema (n=5) y 1 grupo control (n= 7).

5.2 Infección Experimental

La infección fue inducida de acuerdo al protocolo de Salinas-Carmona en 1999. La bacteria *Nocardia brasiliensis* (cepa HUJEG -1) fue cultivada en un medio de infusión cerebro-corazón (Difco, Detroit, MI), posteriormente se preparo una suspensión de solución salina estéril conteniendo 10^7 CFU por ml en la fase logarítmica de crecimiento. Los ratones de los grupos problema fueron inoculados con 100µl de esta suspensión en la región plantar y fueron sacrificados después de los días 1, 2, 3, 4, 7, 30 y 90 por dislocación cervical. El grupo control se le inoculó 100µl de solución salina en la región plantar y se sacrificó a un ratón en cada tiempo, por dislocación cervical.

5.3 Estudio histopatológico

Una vez sacrificados los ratones se obtuvo una pieza de tejido (0.5 cm^3) de la región plantar infectada de cada uno. Las piezas fueron colocadas en formaldehído al 4% diluido en una solución de PBS al 0.2 M pH 7.4 por 12 horas y posteriormente se pasaron por las siguientes soluciones:

- 1.- Alcohol al 50% 1 h.
- 2.- Alcohol al 70 % 1h
- 3.- Alcohol al 90% 1 h.
- 4.- Alcohol al 100% 1 h.
- 5.- Alcohol al 100% 1 h
- 6.- Xilol 1 h
- 7.- Xilol 1 h
- 8.- Xilol parafina 1 h
- 9.- Parafina líquida 30 minutos
- 10.- Parafina líquida 30 minutos
- 11 Molde de plástico y parafina

La muestra de tejido se colocó en un micrótopo y se obtuvieron cortes de tejido de $7 \mu\text{m}$ de espesor, los cuales se montaron en un portaobjetos (Bancroft y Cook, 1994; Kiernan, 1990).

5.4 Inmunocitoquímica

Técnica de Inmunocitoquímica

- 1.- Colocar en estufa a 70⁰ C por 5 minutos.
- 2.- Desparafinar con xilol 2 veces por 5 minutos.
- 3.- Alcohol 100 % y xilol, 1:1, por 5 minutos.
- 4.-Hidratar con alcohol de mayor a menor concentración.
 - a).- Alcohol 100 % por 5 minutos.
 - b).- Alcohol 90% por 5 minutos.
 - c).- Alcohol 70% por 5 minutos.
 - d).- Alcohol 50% por 5 minutos.
- 5.- Lavar con solución buffer PBS 2 veces por 5 minutos.
- 6.- Metanol con H₂O₂ (0.3%) por 20 minutos.
- 7.- Lavar con solución buffer PBS 2 veces por 5 minutos.
- 8.- Solución de cóctel de suero de rata y conejo 2 horas a temperatura ambiente.
- 9.- Lavar con solución buffer PBS por 5 minutos.
- 10.- Incubación del primer anticuerpo por 12 horas a temperatura ambiente.
- 11.- Lavar con solución buffer PBS 5 por minutos.
- 12.- Incubación del segundo anticuerpo, por 2 horas a temperatura ambiente
- 13.- Lavar con solución buffer PBS por 5 minutos.
- 14.- Aplicación de DAB al 0.05% + H₂O₂ al 0.04% en buffer PBS.
- 15.- Lavar con solución buffer PBS 2 veces por 5 minutos. .
- 16.- Colocar en Hematoxilina por 1 minuto.
- 17.- Lavar con agua destilada 2 veces
- 18.- Deshidratar con alcohol de menor a mayor concentración
 - a).- Alcohol 50% por 5 minutos.
 - b).- Alcohol 70% por 5 minutos.
 - c).- Alcohol 90% por 5 minutos.
 - d).- Alcohol 100% por 5 minutos.
- 19.- Aclarar con xilol por 5 minutos.
- 20.- Montaje con entellan.

Método de Inmunocitoquímica

Las laminillas a procesar se colocan en una estufa eléctrica, para disolver el exceso de la parafina. Se colocan en xilol para desparafinar por completo.

Se pasan por alcohol de mayor a menor concentración, posteriormente se lavan con solución de buffer, enseguida se someten al metanol y peróxido de hidrógeno, para la eliminación de la peroxidasa endógena, se vuelven a lavar con buffer, y se introducen a un cóctel de suero de rata y conejo normales (1:500 c/u) diluídos en PBS pH 7.2 con 0.5% Triton X -100 (PBS TX 100) por 2 a horas temperatura ambiente. Después del lavado, se efectuó la inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra las citocinas de ratón IL-1 beta, IL-6, IL-12, IFN - gama y TFN - alfa (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Fueron usados a una dilución de 1:500 en PBS-TX100 e incubados por 12 h a 4ª C.

Después de varios lavados, los cortes fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa. (1:500) diluídos en PBS pH 7.2 con 0.5% Triton X-100 (PBS TX100), enseguida con el fin de que la peroxidasa fuera revelada se aplicó la solución de 3,3 Diaminobenzidina (Sigma) al 0.05% + H₂O₂ al 0.04% diluídos en PBS pH 7.2. Se vuelven a lavar con solución buffer, para después teñir las laminillas con hematoxilina para contrastar el tejido, de nuevo se efectúan varios lavados con solución de buffer, enseguida se deshidrata el tejido con alcohol, para después efectuar la aclaración con xilol y por último pegar con entellan los cubre-objetos a cada una de la laminillas. El análisis microscópico fue realizado en las mismas áreas en secciones seriadas para cada citocina.

Los controles fueron:

- 1) la omisión de los anticuerpos primarios,
- 2) la absorción en fase-líquida con el antígeno homólogo.
- 3) usando un cóctel de suero ratón-conejo no inmune.
- 4) grupo control con solución salina estéril

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

De la región plantar se analiza la presencia y distribución de las citocinas proinflamatorias en el tejido del ratón BALB/c infectado con *N. brasiliensis*. Durante el curso de la infección fue evidente la presencia de reacción positiva de las citocinas que participan en la respuesta inmune temprana en contra de esta bacteria. Después de 24 horas post-infección células inmunoreactivas a todas las citocinas proinflamatorias fueron detectadas en gran cantidad, en las diversas zonas de la infección.

Resultados del conteo de células inmunoreactivas a las citocinas

Zona I	Epidermis
Zona II	Dermis
Zona III	Periferia de la región de los neutrofilos que rodean a la bacteria

Respuesta	Leve:	1 – 5 células
Respuesta	Moderada:	6 – 10 células
Respuesta	Intensa:	mas de 10 células

.
.

Día 1

En la zona I fue intensa para la IL – 12, mientras que en la zona II también fue intensa para IL – 12 y TNF alfa, y en la zona III se detecto respuesta intensa para IL – 6 e IFN gama y moderada para IL – 1 beta.

Día 2 en la zona I se detecto respuesta intensa para IL – 1 beta e IL – 12 , zona II se encontró respuesta intensa para IL – 12 y TNF – alfa , y en la zona III fue intensa para IL – 6 e IFN gama y moderada para la IL - 1 beta.

Día 3 en la zona I hubo una respuesta intensa para IL – 1 beta e IL -12, mientras que en la zona II La IL – 12 y TNF – alfa la respuesta fue intensa, y la zona III fue intensa tanto para la IL – 6 e IFN gama y moderada para IL – 1 beta.

Día 4 para la zona I la IL – 12 se detecto respuesta intensa y moderada de IL – 1 beta, para la zona II la IL-12 y TNF alfa se detectaron intensamente, mientras que en la zona III las que tuvieron respuesta intensa fue la IL – 6 e IFN gama y moderada la IL – 1 beta.

En el 7 dia en Zona I, La IL – 12 se detecto respuesta intensa, en la zona II se detecto intensa para IL – 12 y TNF alfa, para la zona III la respuesta mas intensa fue para la IL – 6 y moderada para IL – 1 beta e IFN gama.

Durante el día 30 la IL -12 se reporta con intensa respuesta en la zona I y II, mientras que el TNF alfa fue intenso en la zona II y en la zona III moderada para IL – 1 beta y e IFN.

Para el día 90 en la zona I y II la respuesta de la IL – 12 fue moderada, El TNF - alfa en zona II fue intensa, y para la zona III se detecta intensa para IL – 6 y moderada para IL – 1 beta.

La mayoría de las células dendríticas (Células de Langerhans) de la epidermis mostraron inmunoreactividad a IL-1 beta en los primeros días de infección (Fig. 2). Estas células disminuyeron después de 7 y 30 días. Durante el curso de la infección algunas células (espumosas y linfocitos) de la periferia de los

abscesos mostraron inmunoreactividad a esta citocina, no se observaron células inmunoreactivas en la dermis entre los sitios de máxima inflamación.

Se detectaron algunas células inmunoreactivas redondas (linfocitos) a IL - 6 en epidermis y dermis, únicamente durante los primeros días. Mientras que una fuerte inmunoreactividad estuvo presente en las células de la periferia del sitio de inflamación (Fig. 3). Además algunas células musculares mostraron inmunoreactividad a esta citocina.

Durante todo el curso de la infección células dendríticas de la epidermis y la dermis mostraron intensa inmunoreactividad a IL-12 (Fig. 4). En comparación con la zona de inflamación donde solo se detectó una baja respuesta de células inmunoreactivas.

El IFN-gama fue producido en gran cantidad durante los primeros días de infección, principalmente en las células que rodean al sitio de la inflamación, aunque también se detectaron algunas células inmunoreactivas en la dermis a partir del 3 día del curso del experimento mientras que en la epidermis no hubo respuesta a esta citocina (Fig. 5).

Algunas células de la epidermis y una gran cantidad de células de la dermis fueron inmunoreactivas al TNF-alfa (Fig. 6). En el sitio de inflamación no se observaron células inmunoreactivas a TNF-alfa, por lo que se encontraron diferencias en la producción de esta citocina.

En la tabla 1 se agrupan los resultados observados durante el análisis microscópico hecho en las 3 zonas específicas:

Tabla 1

	IL-1 beta			IL- 6			IL-12			INF - gama			TNF - alfa		
	ZONAS			ZONAS			ZONAS			ZONAS			ZONAS		
DIAS	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	+	-	++	+	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+	+++	-
2	+++	-	++	+	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+	+++	-
3	+++	-	++	+	+	+++	+++	+++	+	-	+	+++	+	+++	-
4	++	-	++	-	-	+++	+++	+++	+	-	+	+++	+	+++	-
7	+	-	++	-	-	+++	+++	+++	+	-	+	++	+	+++	-
30	-	-	++	-	-	+++	+++	+++	+	-	+	++	+	+++	-
90	-	-	++	-	-	+++	++	++	+	-	+	+	-	+++	-

Tabla 1. Se muestran los resultados de la presencia y distribución de las células productoras de citocinas pro-inflamatorias durante el curso de la infección.

Zona: I Epidermis.

Zona: II Dermis.

Zona: III Periferia de la región de neutrofilos que rodean a las bacterias.

- = 0 células

+ = 1 a 5 células positivas en un campo de 400 micras cuadradas.

++ = 6 a 10 células positivas en un campo de 400 micras cuadradas.

+++ = Más de 10 células positivas en un campo de 400 micras cuadradas.

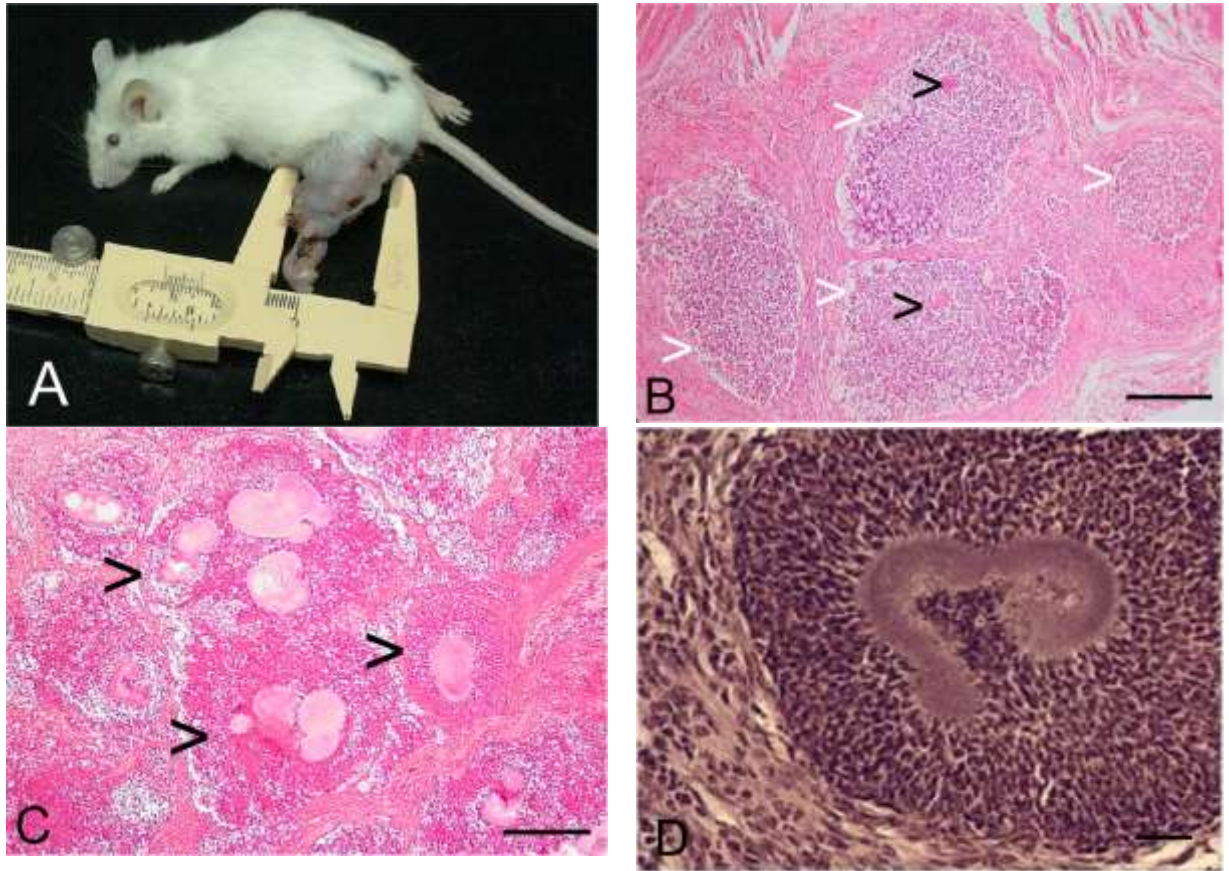


Figura 1.

A) Ratón de 30 días post-infección.

B) Fotomicrografías de abscesos (flechas blancas) en la región plantar del ratón 30 días post-infección, las colonias de bacterias están ceca del centro del microabsceso. (flechas negras) (barra=300 μ m).

C) 90 días post-infección hay más microabscesos (flechas negras) con colonias más grandes (barra=350 μ m).

D) Microabsceso 30 días post-infección (barra=60 μ m).

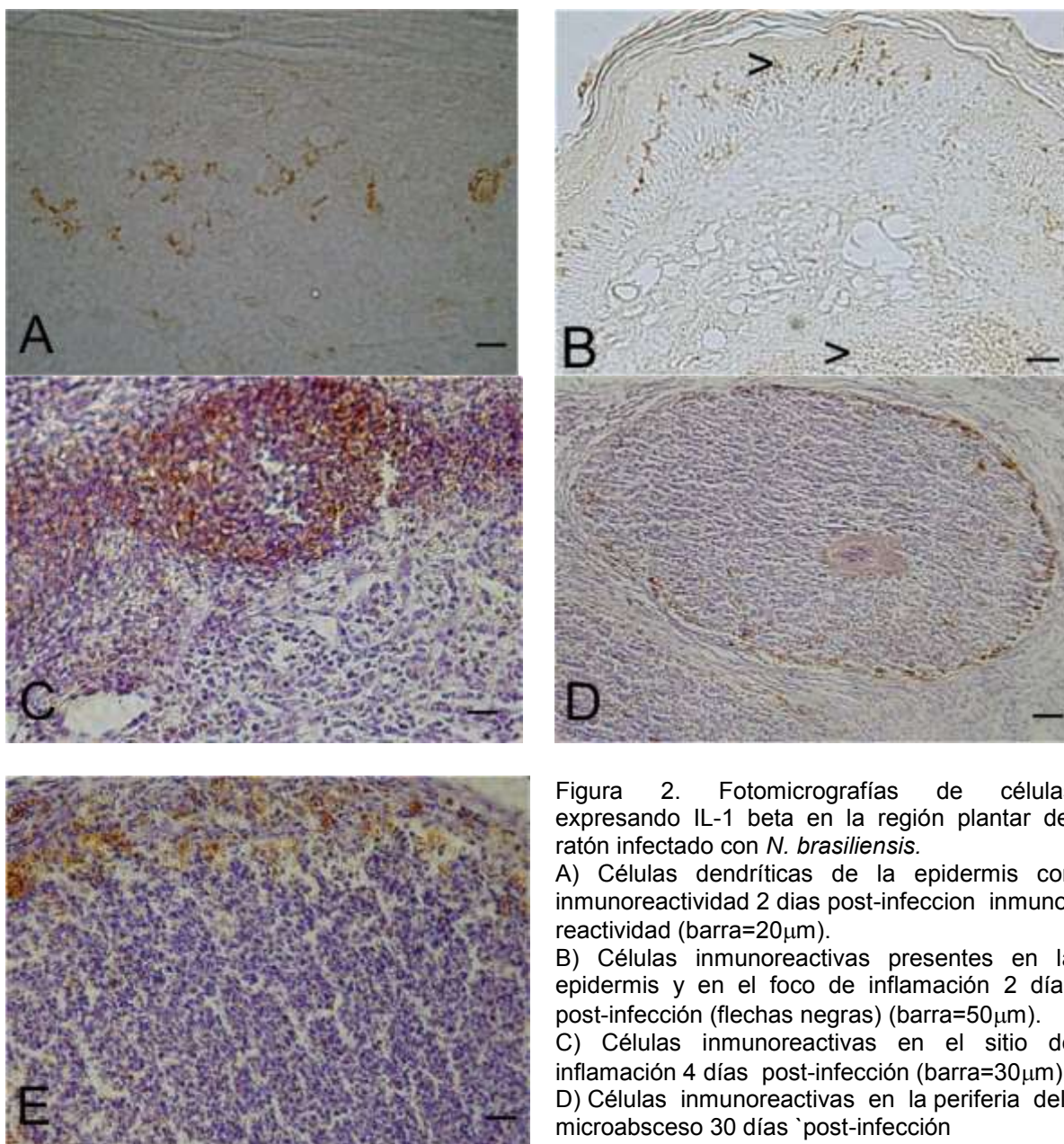


Figura 2. Fotomicrografías de células expresando IL-1 beta en la región plantar del ratón infectado con *N. brasiliensis*.

A) Células dendríticas de la epidermis con inmunoreactividad 2 días post-infección inmunoreactividad (barra=20 μ m).

B) Células inmunoreactivas presentes en la epidermis y en el foco de inflamación 2 días post-infección (flechas negras) (barra=50 μ m).

C) Células inmunoreactivas en el sitio de inflamación 4 días post-infección (barra=30 μ m).

D) Células inmunoreactivas en la periferia del microabsceso 30 días post-infección (barra=90 μ m).

E) Células inmunoreactivas en la periferia del microabsceso 30 días post-infección (barra=30 μ m).

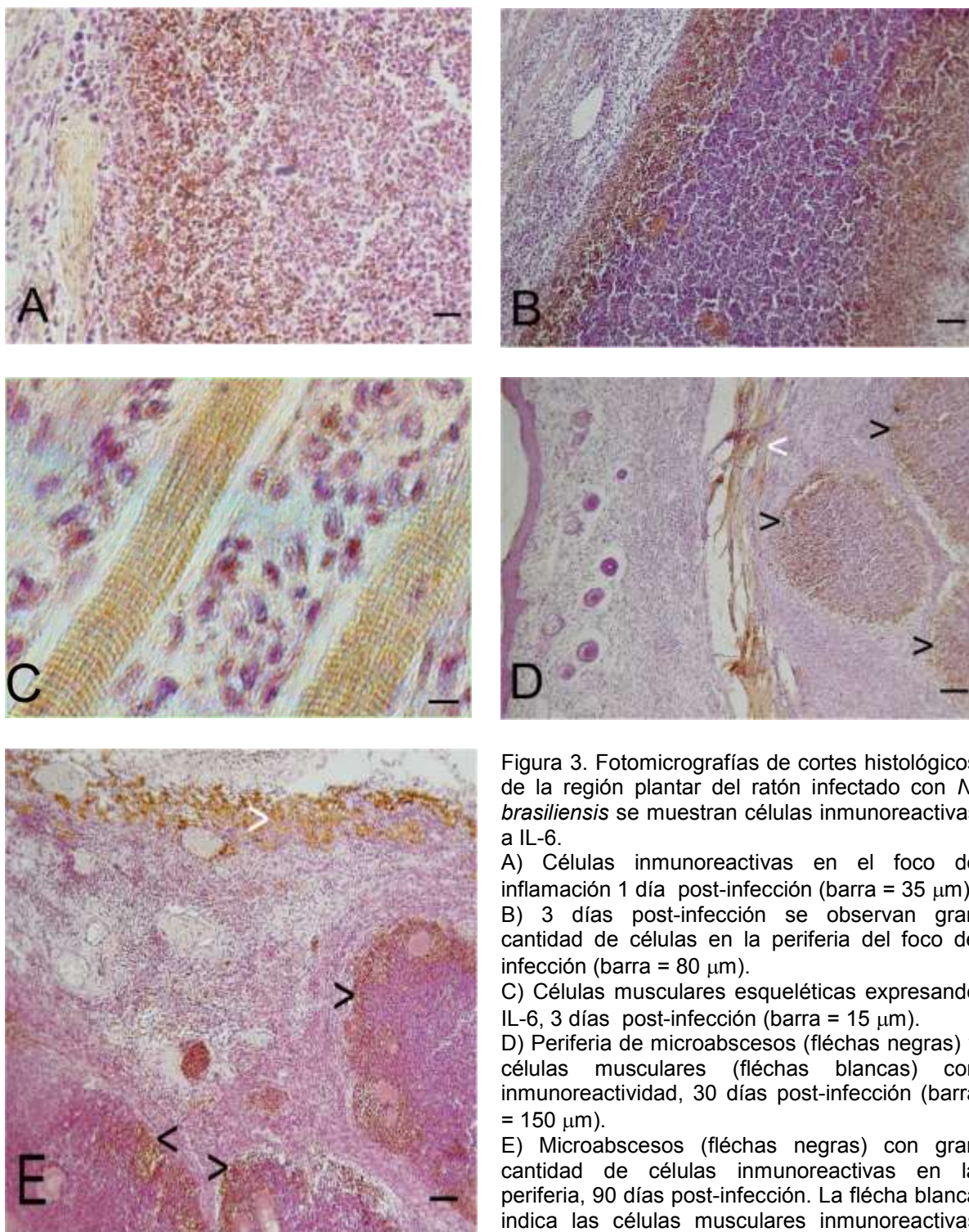


Figura 3. Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón infectado con *N. brasiliensis* se muestran células inmunoreactivas a IL-6.

A) Células inmunoreactivas en el foco de inflamación 1 día post-infección (barra = 35 μ m).

B) 3 días post-infección se observan gran cantidad de células en la periferia del foco de infección (barra = 80 μ m).

C) Células musculares esqueléticas expresando IL-6, 3 días post-infección (barra = 15 μ m).

D) Periferia de microabscesos (fléchas negras) y células musculares (fléchas blancas) con inmunoreactividad, 30 días post-infección (barra = 150 μ m).

E) Microabscesos (fléchas negras) con gran cantidad de células inmunoreactivas en la periferia, 90 días post-infección. La flécha blanca indica las células musculares inmunoreactivas (barra = 180 μ m).

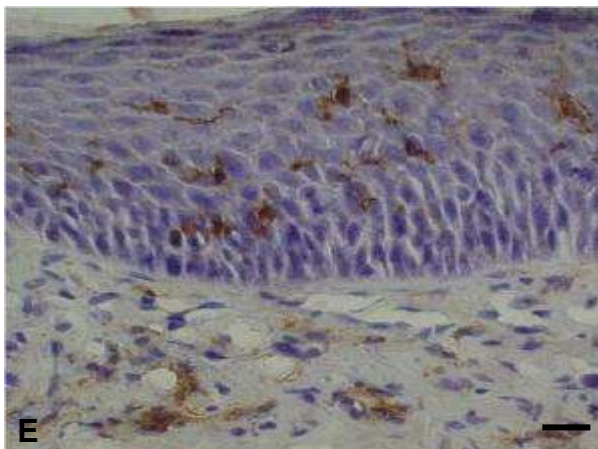
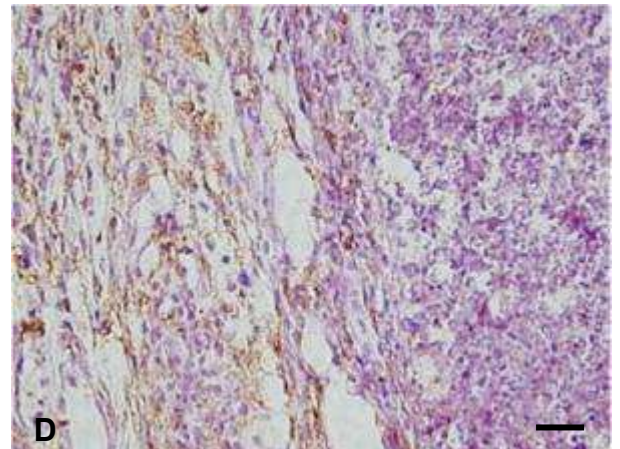
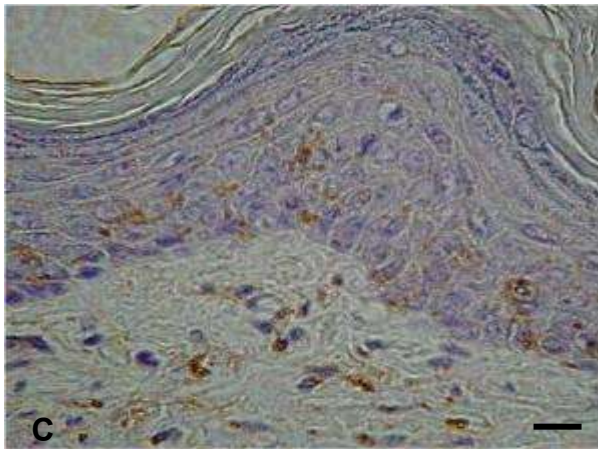
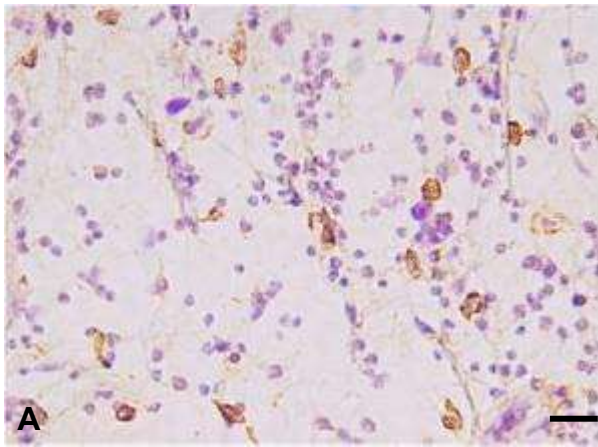


Figura 4. Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón infectado con *N. brasiliensis*, se muestran células inmunoreactivas a IL-12.

A) Células inmunoreactivas en la dermis 1 día post-infección (barra = 30 μ m).

B) Células de Langerhans inmunoreactivas en la epidermis, 2 días post-infección (barra = 25 μ m).

C) Células inmunoreactivas en epidermis y dermis, 7 días post-infección (barra = 18 μ m).

D) 30 días post-infección las células inmunoreactivas están presentes en la dermis pero no en el microabsceso (barra = 35 μ m).

E) Células de Langerhans positivas 90 días post-infección (barra = 18 μ m).

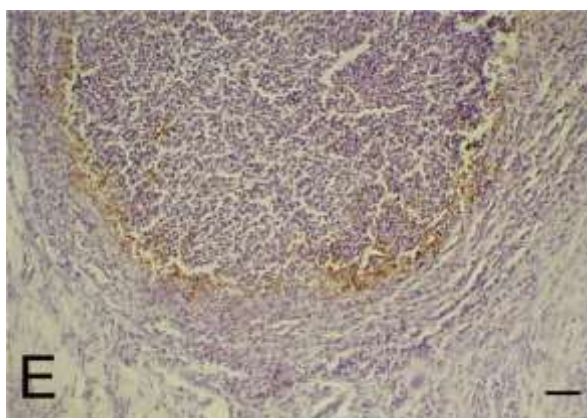
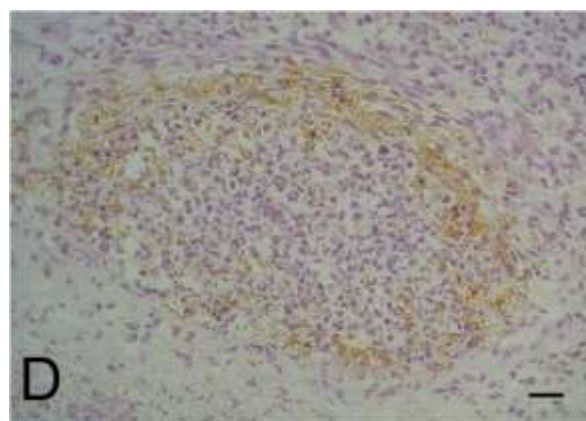
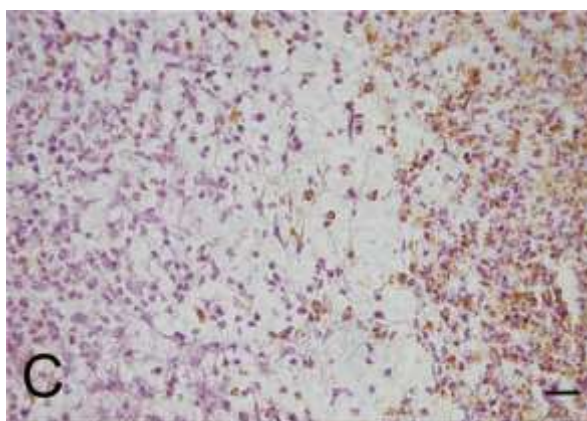
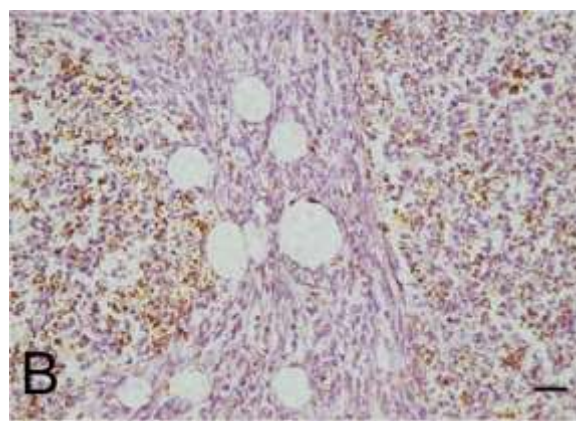
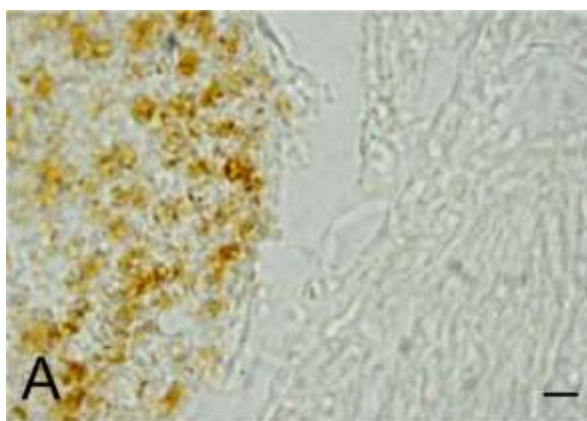


Fig. 5. Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón infectado con *N. brasiliensis*, donde se muestran células inmunoreactivas a IFN - gama.

A) Células inmunoreactivas en el sitio de inflamación, 1 día post-infección (barra = 20 μ m).

B) Células inmunoreactivas en sitios de inflamación, 2 días post-infección (barra = 50 μ m).

C) Células inmunoreactivas en sitios de inflamación y en algunas células de la dermis, 4 días post-infección (barra = 40 μ m).

D) Células inmunoreactivas en la periferia del microabsceso en formación, 7 días post-infección (barra = 45 Células inmunoreactivas en sitios de inflamación, 48 horas post-infección (barra = 50 μ m).

E) Microabsceso con células positivas en la periferia, 30 días post-infección (barra = 60 Células inmunoreactivas en sitios de inflamación, 48 horas post-infección (barra = 50 μ m).

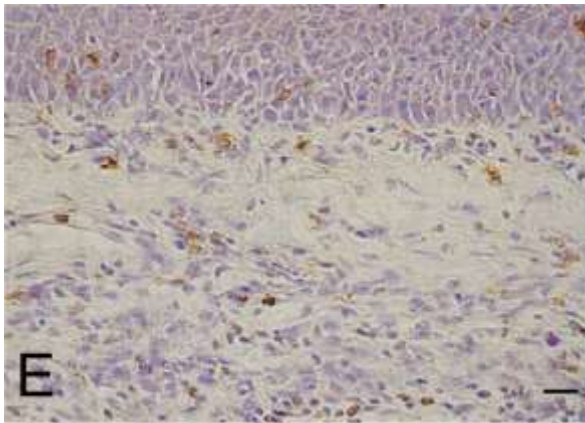
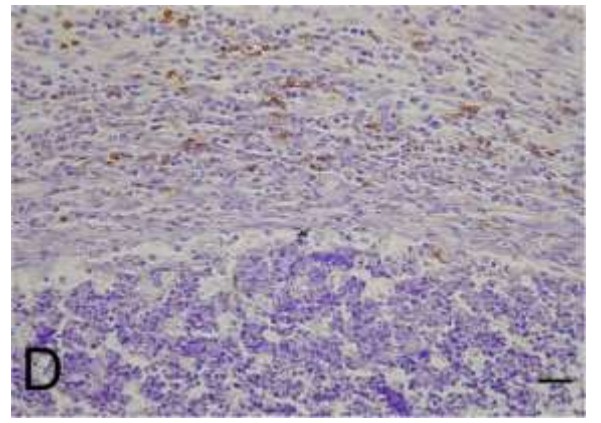
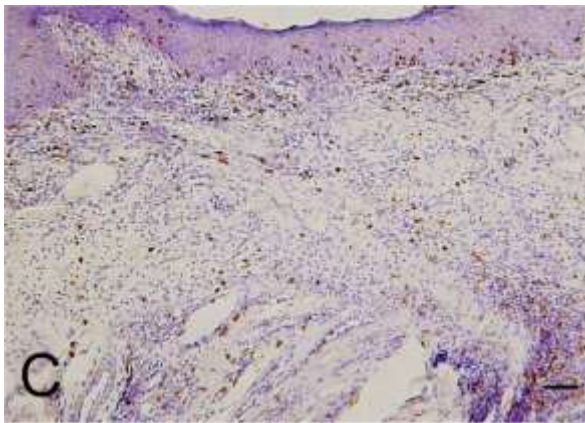
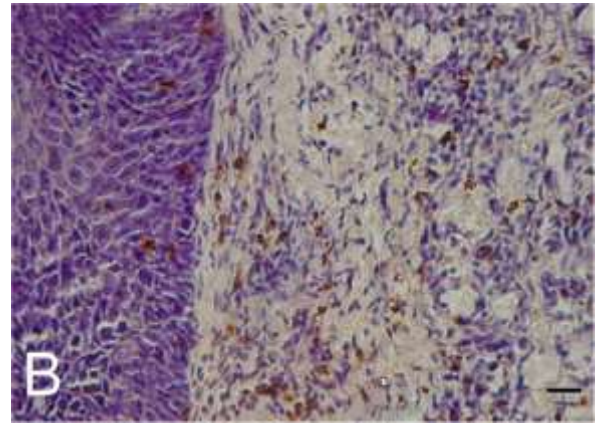
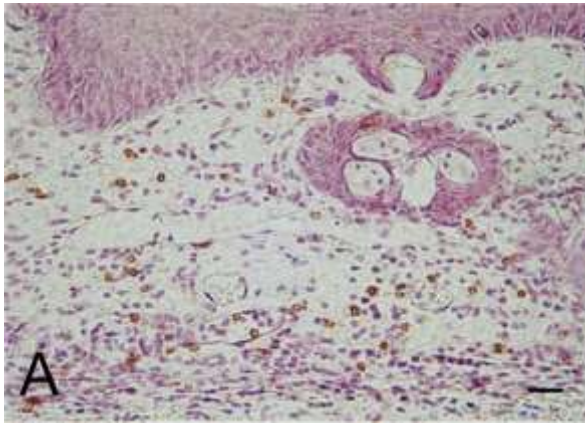


Figura 6 Fotomicrografías de cortes histológicos de la región plantar del ratón infectado con *N. brasiliensis*, se muestran células inmunoreactivas a TNF-alfa.

A: 1 día post-infección, se observan células de la dermis que expresan TNF-alfa (barra = 30 μ m).

B: 2 días post-infección, se observan células de la epidermis y dermis inmunoreactivas (barra = 25 μ m).

C: 2 días post-infección, las células inmunoreactivas no están presentes en el foco de infección (barra = 90 μ m).

D: 3 días post-infección (barra = 40 μ m).

E: 30 días post-infección. Las células productoras de TNF-alfa solo están presentes adyacentes al foco de infección (barra = 25 μ m).

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

El actinomicetoma experimental con *Nocardia brasiliensis* produce una elevada reacción del sistema inmunitario en el ratón BALB/c, esto se ha demostrado por la gran cantidad de células inmunoreactivas positivas a las citocinas proinflamatorias en la fase inicial del 1 al 7 día y en la fase tardía de 30 y 90 días de la infección.

De manera general se acepta que la respuesta inmunológica es de suma importancia en la fisiopatogenia del micetoma; sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no son suficientes para definir los mecanismos de defensa y su participación en el desarrollo de la enfermedad, tal vez cierta tolerancia inmunológica limite la capacidad para inhibir la multiplicación bacteriana (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera 2004).

La localización y el tipo de citocinas que producen cierto tipo de células durante el curso de la infección en este modelo experimental de actinomicetomas mostraron una compleja interacción entre la respuesta inmune del hospedero y patogenicidad de la bacteria. La respuesta innata y adaptativa del hospedero es dirigida por una compleja red de citocinas y sus receptores. Las citocinas juegan un papel central, como iniciadoras, mediadoras y reguladoras de la inflamación cutánea (Guimaraes et al., 2003; Trinchieri, 2003; Mariathasan y Monack 2007) y del consiguiente proceso patológico-molecular en el tejido de la piel (Wilson et al., 1998). La resistencia o susceptibilidad hacia la bacteria intracelular esta relacionado con los distintos perfiles de la producción de citocinas (Hessle et al., 2005). Algunos perfiles de citocinas están asociadas con la eliminación bacteriana mientras que otras pueden demostrar la progresión de la enfermedad (Yamamura et al., 1991; Zhang y Tarleton 1996; Bekker et al., 2000). En este trabajo los resultados de la localización de células productoras

de citocinas indican su participación en el control de la replicación y aislamiento bacterial. La determinación del fenotipo de una célula productora de citocinas depende de varios factores como la edad, sitio de la exposición inicial al antígeno, dosis de la bacteria, constitución genética, estado de salud etc. (Seder y Paul., 1994; Howard y Zwillig., 1998; Kasuga-Aoki et al., 1999; Adkins et al., 2000; Hessle et al., 2005). En este estudio se demostró que las células dendríticas, células redondas pequeñas (linfocitos), células redondeadas grandes (macrófago) y células cilíndricas (músculo), producen diferentes citocinas. Aunque algunas células parecen que producen simultáneamente varias citocinas (Ken-ichi et al., 1990; Langhorne et al., 2004). En estudios posteriores se podrá aclarar estos hallazgos.

La Interleucina 1 beta se comporta casi igual a lo que reporta (Bechan et al., 2006). Es producida por células dendríticas de la epidermis al inicio de la infección y juega un papel esencial en la iniciación de la respuesta primaria en la piel (Enk et al., 1993) probablemente desencadena la activación de otras células inmunitarias como son linfocitos T y macrófagos. Mientras que en el hallazgo en la zona de la infección provocó la manifestación de IL – 6 y se mantuvo hasta la etapa tardía, quizás mediando la respuesta inflamatoria. (Mariathasan y Monack., 2007).

La Interleucina 6 muestra actividad biológica múltiple (Kishimoto, 2005). Se hizo presente en el foco de la infección, propiciando la síntesis de proteínas de la fase aguda y con efectos sistémicos de la inflamación, dando lugar a su función reguladora de la respuesta inmune (Naka et al., 2002; Nishimoto y Kishimoto., 2006). La detección de esta citocina en el músculo esquelético es posiblemente debido al daño celular como ha sido reportado (Jonsdottir et al., 2000; Pedersen et al., 2001). Estos resultados fueron similares cuando se investigó la IL – 6 en un cuadro clínico de meningitis bacteriana (Bociaga-Jasik et al., 2001).

Quizás propicia una participación abundante de células productoras de citocinas proinflamatorias en la fase de inicio de la enfermedad.

La Interleucina 12 fue producida por células de Langerhans en epidermis y dermis en todo el curso de la infección, se cree que desencadena el estímulo a macrófagos, células NK y linfocitos T especialmente a células denominadas Th1, como lo reporta (Alber et al., 2006). Considerando que es la única citocina presente durante todo el curso de la infección y en las diferentes zonas, podemos sugerir que esta citocina determina el tipo y la duración de la respuesta inmune adquirida (Trinchieri. 1995; Watford et al., 2003; Trinchieri 2003).

Interferón gama se detectó por la presencia de inmunoreactividad de células espumosas en el sitio de la infección, quizás pudiera ser importante en la protección del huésped ya que esta citocina favorece la diferenciación de linfocitos T a Th1 para producir citocinas con funciones inmunoregulatoras (Alber et al., 2006).

Las células inmunoreactivas a TNF alfa en el curso de la infección solo fueron encontradas en la dermis y epidermis, pero no en el sitio de la inflamación, probablemente participa en la formación de granuloma en piel como se ha reportado en pulmón (Kasahara et al., 1989).

Es importante mencionar que *N. brasiliensis* secreta factores similares a la brasilicardin A y brasilinolide A, que tienen una potente actividad inmunosupresora de linfocitos (Shigemori et al., 1998). Incluso más fuertes que la conocida inmunosupresión por agentes como ciclosporina A. Quizás estos factores también jueguen un papel modulador en la población de células productoras de citocinas proinflamatorias (Curfs et al., 1997).

En resumen, las citocinas proinflamatorias, sintetizadas en diferentes células, son fuertemente expresadas durante el curso de la infección con bacteria intracelular *N. brasiliensis*. El patrón de las células inmunoreactivas a estas citocinas muestra diferencias en la distribución y cantidades durante el curso de la infección.

N. brasiliensis es capaz de sobrevivir a esta fuerte respuesta inmune, parece que esta bacteria maneja la reacción de defensa del hospedero hacia su propia ventaja, para sobrevivir y crecer, quizás secretando factores que modifican los tipos de citocinas producidas, quizás la terapia con citocinas proinflamatorias (bloqueando o estimulando), pueden ayudar en la fase aguda de la enfermedad para el control de la infección.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Las citocinas pro-inflamatorias IL-1 beta, IL- 6, IL-12, IFN - gama y TNF - alfa participan activamente durante la infección aguda y crónica de *Nocardia brasiliensis* en *Mus musculus* (ratón cepa BALB/c).

Las células dendríticas (Langerhans) producen IL-1 beta durante la infección aguda, e IL-12 durante todo el curso de la infección.

La IL-1 beta e IFN - gama se produce en células espumosas de los microabscesos.

La IL- 6 se produce por los linfocitos de la periferia de los microabscesos y por células musculares esqueléticas en la infección crónica.

La IL-12 se produce por diferentes tipos celulares de la dermis, pero no por células del microabsceso.

El IFN - gama se produce por células cercanas a las bacterias, principalmente durante la infección aguda.

El TNF - alfa se produce por linfocitos de epidermis y dermis, pero no por células del microabsceso.

LITERATURA CITADA

Adams DO. and Hamilton TA. 1984. The cell biology of macrophage activation. Annu. Rev. of Immunol. 2: 283-318.

Aderem A. and Underhill DM. 1999 Mechanisms of phagocytosis in macrophage. Annu. Rev. Immunol. 17: 593-623.

Adkins B., Bu Y., Cerero E. and Perez R. 2000. Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. J Immunol. 5: 2347-2353.

Akira S., Taga T. and Kishimoto T. 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv. Immunol. 54: 1-78.

Alber G., Al-Robaiy S., Kleinschek M., Knauer J., Krumbholz P., Ritcher J., Schoeneberger S., Schuetze N., Schulz S., Toepfer K., Voigtlaender R., Lehman J. and Mueller U. 2006. Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members. Ernst Schering Res Found Workshop. 56: 107-127.

Angeles AM. and Sugar AM. 1987. Rapid diagnosis of nocardiosis with an enzyme immunoassay. J. Infect. Dis. 155: 292-296.

Balkwill FR. and Burke F. 1989. The cytokine network. Immunol. Today. 10: 299-304.

Bancroft JD., and Cook HC. 1994. Manual of histological techniques and their diagnostic applications. Churchill-Livingstone, Edinburgh BC – 238.

Beaman BL. and Beaman L. 1994. Nocardia species. Host parasite relationships, Clin. Microbiol. Rev. 7; 213-264.

Bechan GI., Egeler RM. and Acrecí RJ. 2006. Biology of langerhans cells and langerhans cell histiocytosis. Int. Rev. Cytol. 254: 1-43

Bekker LG., Moreira AL., Bergtold A., Freeman S., Ryffel B. and Kaplan G. 2000. Effects of tumor necrosis factor alfa in murine mycobacterial infection are dose dependent. Infect Immun. 12: 6954-6961.

Bhalodia AM., Lertzman BH., Kantor GR., Granick MS. 1998. Localized cutaneous *Nocardia brasiliensis* mimicking foreign body granuloma. Cutis. 61: 161 – 163.

Bociaga-Jasik M., Garlicki A., Kalinowska-Nowak A. and Sobczyk-Krupiarz I. 2001. The role of cytokines in bacterial meningitis. *Przegl Lek.* 58: 1055 – 1058.

Brown-Elliot BA., Brown JM., Conville PS. and Wallace RJ Jr. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. Based on current molecular taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 252 - 282.

Calcagni E. and Elenkov I. 2006. Stress system activity innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1069: 62-76.

Cardona PJ., Llatjos R., Gordillo S., Díaz J., Ojanguren I., Ariza A. and Ausina V. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 52:156-63.

Castro JG. and Espinoza L. 2007. *Nocardia* species infections in a large county hospital in Miami: 6 years experience. *J Infect.* 54: 358-361.

Cohen MC. and Cohen S.1996. Cytokine function. a study in biologic diversity. *Am J. Clin. Pathol.*105: 589-598.

Conde C., Mancilla R., Fresan M. and Ortiz-Ortiz L. 1983. Immunoglobulin and Complement in Tissues of Mice Infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immunity.* 40; 1218 – 1222.

Conville PS., Fischer SH., Cartwright CP. and Witebsky FG. 2002. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J. Clin Microbiol.* 38: 158 – 164.

Craddock D. and Thomas A. 2006. Cytokines and late-life depresión. *Essent. Psychopharmacol.* 7: 42-52.

Curfs JHAJ., Meis JFGM. and Hoogkamp-Korstanje JAA. 1997 A primer on cytokines; sources, receptors, effects and inducers. *Clin. Microbiol Rev.* 10: 742-776.

Deem MS., Beaman BL. and Gershwin ME. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect. Immun.* 38: 914 - 920.

Dinareello CA. 2000. The role of the interleukin-11997 Interleukin-1 receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N. Engl J Med.* 343: 732-734.

Enk AH., Angeloni VL., Udey MC. and Katz SI. 1993. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. J. Immunol. 150: 3698-4704.

Fujiwara N. and Kobayashi K. 2005. Macrophages in Inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 4: 281- 286.

Georghiou PR. and Blacklock ZM. 1992. Infection with Nocardia species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. Med J. Aust. 156: 692 - 697.

Gogos CA., Drosou E., Bassaris HP. and Skoutelis A. 2000. Pro - versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. J. Infect Dis.; 181: 176 – 180.

González – Ochoa A., Shibayama H., Félix D. and Anaya M. 1962. Immunological aspects of actinomycotic and nocardiosis. Excerpt. Med. Int. Congr. Series. 55: 542-551.

Griffin JD., Cannistra SA., Sullivan, R. and Demetri, GD. 1990. The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. Int. J. Cell Cloning. 1: 35 – 44.

Guimaraes CC., Castro LG. and Sotto MN. 2003. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. Acta Trop. 87: 377-384.

Hassan AM., Fahal AH., Ahmed AO., Ismail A. and Veress B.: 2001. The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by Streptomyces somaliensis Trans R. Soc Trop Med Hyg.; 95: 89-92.

Hessle CC., Andersson B. and Wold AE. 2005. Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. Cytok. 30: 311-318.

Hironaga M., Mochizuki T. and Watanabe S. 1990. Acute primary cutaneous nocardiosis. J. Am. Acad. Dermatol. 23: 399-400

Howard AD. and Zwilling BS. 1998. Cytokine production by CD4 and CD8 T cells during the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Clin Exp Immunol. 113: 443-449.

Jonsdottir IH., Schjerling P., Ostrowski K., Asp S., Richter EA. and Pedersen BK.: 2000. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. J Physiol.; 528: 157-163.

Julkunen I., Sareneva T., Pirhonen J., Ron T., Melen K. and Matikainen S. 2001. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth factor Rev.* 12: 171-180.

Kamimura D, Ishihara K., and Hirano T. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 149: 1-38.

Kanangat S., Meduri GU., Tolley EA., Patterson DR., Meduri CU., Pak C., Griffin JP., Bronze MS. and Schaberg DR. 1999. Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect Immun.* 67: 2834-2840.

Kasahara K., Kobayashi K., Shikama Y., Yoneya I., Kaga S., Hashimoto M., Odagiri T., Soejima K., Ide H., Takahashi T. and Yoshida T. 1989. The role of monokines in granuloma formation in mice: the ability of interleukin 1 and tumor necrosis factor- α to induce lung granulomas. *Clin Immunol Immunopathol.* 51: 419-425.

Kasuga-Aoki H., Takai S., Sasaki Y., Tsubaki S., Madarame H. and Nakane A. 1999. Tumour necrosis factor and interferon- γ are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*. *Immunol.* 96: 122-127.

Ken-ichi A., Lee F., Miyajima A., Soichiro M. and Yokota T. 1990. Cytokines coordinators or immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry.* 59: 783.

Kiernan JA. 1990. Histological and histochemical methods: Theory and practice. Pergamon Press, Oxford. BC – 152

Kishimoto T. 2005. IL-6: From Laboratory to Bedside. *Clin Rev Allergy Immunol.* 28: 177-186.

Kofteridis D., Mantadakis E., Mixaki I., Stefanidou M., Maraki S., Alexandrakis M. and Samonis G. 2005. Primary cutaneous nocardiosis in 2 patients on immunosuppressants. *Scand J. Infect Dis.* 37: 507 – 510.

Land G., McGinnis MR., Standeck J., and Gatson A. 1991. Aerobic Oathogenic Actinomycetales. In manual of Clinical Microbiology. Fifth edition edition 340-359 Edited by Ballows A., Hausler W. J., Herrman K.L. Isenberg H.D. and Shadomy H.J. American Society for Microbiology Washington, DC. USA

Langhorne J., Albano FR., Hensmann M., Sanni L., Cadman E., Voisine C. and Sponaas AM. 2004. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev.* 201: 35-47.

Lichon V. and Khachemoune A. 2006. Mycetoma: a review. Am. J. Clin. Dermatol. 7: 315 – 321.

Mariathasan S. and Monack DM. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. Nat Rev Immunol. 7: 31-40.

Marinic I., Gagro A. and Rabatic S. 2006. Regulatory T cells. Acta Med Croatica. 60: 447 – 456.

Marodi L. 2006. Innate cellular immune responses in newborns. Clin. Immunol. 118: 137 – 144.

Meduri GU., Kanangat S., Stefan J., Tolley E., Schaberg D. 1999. Cytokines IL-1beta, IL- 6, and TNF-alfa enhance in vitro growth of bacteria. Am. J Respir. Crit. Care Med. 160: 961-967.

Mendez-Tovar LJ., Mondragón-González R., Vega-López F., Dockrell HM., Hay R., Lopez-Martinez R., Manzano-Gayoso P., Hernández-Hernández F., Padilla-Desgarenes C. and Bonifaz A. 2004. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. Mycopathologia; 158; 407-414.

Mosmann T R., 1992. T lymphocyte subsets. Cytokines and effector functions. Ann. N Y Acad. Sci. 664: 89-92.

Mueller U. 2006. Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members. Ernst Schering Res Found Workshop. 56: 107-127.

Naka T., Nishimoto N. and Kishimoto. 2002. The paradigm of IL – 6: from basic science to medicine. Arthritis Res. 4: 5233-5244.

Nishimoto N. and Kishimoto T. 2006 Interleukin 6: from bench to bedside. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2: 619 – 626.

Nossal GJV. 1993. Life, death, and the immune system. Sci. Am. 269: 52 – 62.

Paul-Pletzer K. 2006. Tocilizumab: blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders. Drugs Today (Barc). 42: 559-576.

Pedersen BK., Steensberg A. and Schjerling P. 2001. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. J Physiol. 536: 329-337.

Perez-Blanco, M., Hernandez-Valles, R., Fernandez-Zeppenfeldt, G. and Yerres F. 1996. Mycetoma. Invest. Clin. 37: 61 – 73.

Pilet C. 2003. Edmond Nocard, a forerunner in Microbiology, comparative pathology and public health. Acad. Natl. Med.; 187: 1397 – 1402.

Porat R., Clark BD., Wolff SM. and Dinarello CA.; 1991 Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1. Science. 254: 430 –432.

Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R., 2006. Role of the innate immune system and host-commensal mutualism. Curr Top Microbiol Immunol. 308: 1-18.

Reiner SL. 2007. Development in motion: helper T cells at work. Cell. 129: 33 – 36.

Revol A., Espinoza-Ruiz M., Medina-Villanueva I. and Salinas-Carmona MC. 2006. Expresión of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. Can. J. Microbiol. 52: 1255 – 1260.

Rico G, Ochoa R, Oliva A. Gonzalez-Mendoza A., Walter SM. and Ortiz-Ortiz L. 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. The J. of Immuno. 129: 1688-1693

Sachs MK. 1992. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection acquired from a cat scratch: case report and review. Clinical Infection Diseases 15: 710-711.

Salinas-Carmona MC. Welsh O. and Casillas SM. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with Micetoma infections. J. Clin Micro. 31: 2901-2906

Salinas-Carmona MC., Torres-Lopez E., Ramos AI., Licon-Trillo A. and 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.

Salinas-Carmona, MC. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. Micro. Infect. 2: 1373-1381

Salinas-Carmona, MC. and Perez-Rivera I. 2004. Humoral immunity through Immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. Infect Immun; 72: 5597 – 5604.

Salinas-Carmona MC., Ramos, AI. and Perez-Rivera I. 2006 Immunogenicity is unrelated to protective immunity when induced by soluble and particulate antigens from *Nocardia brasiliensis* in BALB/c mice. Microbes Infect. 8: 2531 – 2538.

Schwartz JG., McGough, DA., Thorner RE., Fetchick RJ., Tio FO. and Rinaldi MG. 1988. Primary lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection: three case reports and a review of the literature. Diagn. Microbiol. Infect Dis.; 10: 113 – 120.

Scott P. and Kaufmann SHE., 1991. The rol of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. Immunol. T. 12: 346-348.

Seder RA. and Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. Annu Rev Immunol. 12: 635-673.

Serrano JA. y Sandoval AH. 1992. Manual de Laboratorio para el estudio de los Actinomicetales Patógenos, Talleres Gráficos Universitarios, Universidad de los Andes

Shigemori H., Komaki H., Yazawa K., Mikami Y., Nemoto A., Tanaka Y., Sasaki T., In Y., Ishida T. and Kobayashi J. 1998. Brasilicardin A. A Novel Tricyclic Metabolite with Potent Immunosuppressive Activity from Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. J Org Chem; 63: 6900-6904.

Shtrichman R. and Samuel CE. 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. Curr Opin Microbiol. 4: 251-259.

Silva CL. and Faccioli LH. 1992. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from the livers and spleens of mice. Infection and Immunity. 60: 3566-3570.

Sladkova T. and Kostolansky F. 2006. The role of cytokines in the immune response to influenza a virus infection. Acta Virol. 50: 151-162.

Stockinger, B. and Veldhoen, B. 2007. Differentiation and function of Th T cells. Curr. Pin Immunol. 19: 281 – 286.

Sugar, A.M., Schoolnik G. K. and Stevens DA. 1985. Antibody response in human nocardiasis: Identification of two immunodominant culture-filtrate antigens derived from *Nocardia asteroides*. The Journal of Infectious Diseases. 151: 865-901.

Toellneer KM., Gulbranson JA. and Gordon J. 1997. Memory B cells and diversity of their members. Semin. Immunol. 9: 229-234.

Trinchieri G. 1993. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. Immunol. Today. 14: 335-338.

Trinchieri G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 13: 251-276.

Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3: 133-146.

Vassalli P. 1992. The pathophysiology of tumour necrosis factor. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452.

Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona MC., Welsh O. and Rodríguez M.A. 1992. Isolation and Purification of two Immunodominant Antigens from *N. brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 30: 1183-1188.

Vivier E. 2006. What is natural in natural killer cells? *Immunol Lett.* 107:1-7.

Watford WT., Moriguchi M., Morinobu A. and O'Shea JJ. 2003. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 361-368.

Welsh O. 1991. Mycetoma Current concepts in treatment, *International J. of Dermatology.* 30: 387-398.

Welsh O., Salinas MC. and Rodriguez MA. 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma in Current. *Topics in Medical Mycol.* 6: 47-71.

Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, MC. 2007. Micetoma. *Clin Dermatol.* 25: 198 – 202.

Wilson M., Seymour R. and Henderson B. 1998. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun.* 66: 2401-2409.

Woods J.A., Vieira VJ. and Keylock KT. 2006. Exercise. Inflammation and innate immunity. *Neurol Clin.* 24: 585-599.

Wortman PD. 1995. Concurrent Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosi* and Actinomycetoma Caused by *Nocardia brasiliensis*. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32: 390-392

Yamamura M., Uyemura K., Deans RJ., Weinberg K., Rea TH., Bloom BR. and Modlin RL. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 254: 277-279.

Zhang L. and Tarleton RL. 1996. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol.* 84: 203-213.

Zlotnik H. and Bucley HR. 1980. Experimental production of actinomycetoma in BALB/C mice. *Infect. Immun.* 29: 1141-1145.

APENDICE A

EQUIPO

Estufa de Incubación
Histoquineto
Mezcladora
Microscopio
Micrótopo
Micro pipetas de 0.5 - 2µl
Micro pipetas de 5 - 10 µl
Micro pipetas de 10 - 100 µl
Potenciómetros 430
PH metro
Balanza Analítica
Refrigerador
Congelador -20
Horno Térmico para parafina

REACTIVOS

Alcohol Etanol absoluto
Alcohol Metanol absoluto
Fosfato de potasio Monobásico
Fosfato de Potasio di básico
Diaminobenzidina
Cloruro de Sodio
Cepas de Nocardia brasiliensis HUJEG-1 ATCC700358
Anticuerpos contra IL-1beta, IL- 6, IL-12, INF - gama y TNF - alfa.

SOLUCIONES

PBS 0.2 M

- a agua destilada
- b Fosfato de potasio Monobásico
- c Fosfato de Potasio dibasico

Caldo de Infusión Cerebro Corazón

- 100 ml de agua bidestilada
- 3.7 g de polvo de caldo

Solución NaCl 0.9 %

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

JOSE LUIS VAZQUEZ JUAREZ

Candidato al grado de Maestro en Ciencias Veterinaria

Tesis: Presencia y distribución de Células productoras de IL-1beta, IL-6, IL-12, IFN- gamma y TNF-alfa en la Infección con *Nocardia brasiliensis*

Campo de estudio: Salud Animal

Biografía: Nacido en Monterrey N.L., el 28 de Agosto de 1957. Hijo del Sr. Pablo Vázquez Rojas⁺ y Sra. Maria de los Ángeles Juárez Vda. de Vázquez

Profesional: Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Estudios Universitarios Monterrey N.L., Medico Veterinario Zootecnista 1983

Diplomado: En animales de Laboratorio, Instituto Nacional de la Nutrición S. Z. y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL de 1994-1995

EXPERIENCIA PROFESIONAL

Institución: Hospital Universitario de la UANL
Entrenamiento: Técnico en Enfermería de Quirófano de 1973 -1984

Institución: Facultad de Medicina de la UANL Bioterio
Entrenamiento: Producción de animales de laboratorio, Cirugía Experimental de 1984 a la fecha

Institución: Escuela de Medicina del ITESM Bioterio
Entrenamiento: Experimentación e investigación con Animales de laboratorio, de 1991 a la fecha

Institución: Facultad de Agronomía del ITESM
Entrenamiento: Maestro por horas, materia Sanidad Animal 1999-2000

Institución: Centro de Estudios Universitarios de Monterrey
Entrenamiento: Maestro por horas en las materias de Anatomía Inmunología y Genética del 2003-2004.

Institución: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL
Entrenamiento: Maestro por hora, Materia Animales de Laboratorio. 2005 a la fecha