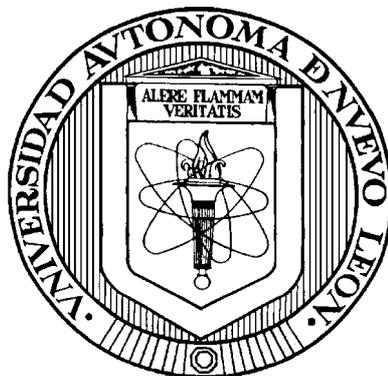


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE
Nocardia brasiliensis QUE INDUCEN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR
EN RATONES BALB/c Y EN HUMANOS”**

Por

M.C.P. BÁRBARA CASTRO MATTEOTTI

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Febrero, 2008

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE
Nocardia brasiliensis QUE INDUCEN LA RESPUESTA INMUNE
CELULAR EN RATONES BALB/c Y EN HUMANOS**

Presentado por:

M.C.P. BÁRBARA CASTRO MATTEOTTI

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “José Eleuterio González” y en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la dirección del Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano y la co-dirección del Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera y el Dr. Sc. Mario César Salinas Carmona.

Director de Tesis

Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano

Co-director de Tesis

Co-director de Tesis

Dr.Sc. Lucio Vera Cabrera

Dr.Sc. Mario C. Salinas Carmona

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE
Nocardia brasiliensis QUE INDUCEN LA RESPUESTA INMUNE
CELULAR EN RATONES BALB/c Y EN HUMANOS**

Aprobación de la Tesis:

Dr med. Oliverio Welsh Lozano
Director de Tesis

Dr Sc. Lucio Vera Cabrera
Co-director de Tesis

Dr Sc. Mario César Salinas Carmona
Co-director de Tesis

Dr Sc. Noemí Waksman Torres
Comisión de Tesis

Dr med. José Carlos Jaime Pérez
Comisión de Tesis

Dr, Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por regalarme la vida y acompañarme en cada paso.

A Charlie, mi esposo y mejor amigo, por compartir su vida conmigo y por su amor, paciencia y apoyo en todo momento.

A nuestro bebé, que nos ha llenado de felicidad y cuya llegada esperamos llenos de amor.

A mis papás Roberto y Rosalía, por darme la vida y por su amor y apoyo incondicional en cada una de mis metas.

A mis hermanos Daniella y Roberto, por estar siempre a mi lado.

Al Dr. Oliverio Welsh, director de esta tesis y profesor de dermatología.

Al Dr. Lucio Vera, co-director de esta tesis.

Al Dr. Mario César Salinas, co-director de esta tesis.

Al Dr. Jorge Ocampo Candiani, Jefe del Servicio de Dermatología.

Al personal del Servicio de Dermatología y Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica.

Al personal del Departamento de Inmunología, especialmente a la QFB Alejandra Gallegos y Dr Sc. Luz Isabel Pérez.

Al Dr. Adrián Rendón y personal del CIPTIR, en especial a la Enf. Susana Covarrubias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Definición.....	1
1.2 Historia.....	2
1.3 Datos epidemiológicos.....	2
1.4 Etiología.....	3
1.5 Fisiopatología e inmunología del micetoma.....	5
1.5.1. Participación de la inmunidad celular.....	6
1.5.2. Participación de la inmunidad humoral.....	6
1.5.3 Citocinas.....	8
1.6 Antígenos de filtrado de cultivo.....	10
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
2.1 Microorganismos.....	12
2.2 Producción de antígenos de filtrado de cultivo.....	12
2.3 Precipitación de las proteínas del AFC con sulfato de amonio.....	13
2.4 Fraccionamiento del AFC.....	13
2.5 Análisis del AFC y las fracciones.....	14
2.6 Animales.....	15
2.7 Inmunización de ratones.....	15
2.7.1. Preparación del inóculo.....	15
2.7.2. Inoculación de los ratones.....	16
2.8 Inducción del micetoma experimental en ratones.....	16
2.9 Grupo control.....	16

2.10	Determinación de la producción de citocinas en esplenocitos de ratones.....	16
2.11	Selección de pacientes para el estudio	17
2.12	Proliferación de células mononucleares y determinación de la producción de IFN- γ en sangre de pacientes	18
2.13	Análisis estadístico	19
3.-	RESULTADOS.....	21
3.1	Análisis electroforético del AFC.....	21
3.2	Fraccionamiento del AFC	22
3.3	Inmunogenicidad en ratones.....	23
3.4	Respuesta inmune celular en humanos	24
4.-	DISCUSIÓN.....	29
5.-	CONCLUSIONES.....	33
	BIBLIOGRAFÍA.....	34
	APÉNDICES	45
	APÉNDICE A.- Carta de consentimiento informado.....	45
	APÉNDICE B.- Cuestionario de antecedentes de los pacientes.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla

Página

I.-	Características de los pacientes participantes en el estudio.....	25
-----	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

1.- Actinomicetoma causado por <i>N. brasiliensis</i>	1
2.- Gránulo de <i>Nocardia brasiliensis</i>	2
3.- Filamentos de <i>Nocardia brasiliensis</i>	4
4.- AFC de <i>N. brasiliensis</i> analizado en SDS-PAGE al 15%.....	21
5.- Fracciones semi-purificadas de AFC analizadas en SDS-PAGE al 12%.....	22
6.- Producción de IFN- γ en esplenocitos de ratones BALB/c.....	23
7.- Pacientes con actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i> que participaron en el estudio.....	26
8.- Proliferación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes	27
9.- Producción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica de pacientes.....	28

RESUMEN

Bárbara Castro Matteotti

Fecha de Graduación: Febrero, 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis* QUE INDUCEN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN RATONES BALB/c Y EN HUMANOS.

Número de páginas: 43

Candidato para el grado de
Doctor en Medicina.

Área de Estudio: Ciencias de la Salud.

Propósito y Método del Estudio: El micetoma es una infección subcutánea crónica, causada por bacterias u hongos. En México, la mayoría de los casos son causados por *Nocardia brasiliensis*. La fisiopatología del micetoma se conoce de manera parcial. El propósito de este trabajo fue identificar antígenos de filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*, capaces de inducir la respuesta inmune celular en ratones BALB/c y en pacientes con micetoma, y determinar el patrón de citocinas producidas ante estos antígenos. Se determinó la concentración de IFN- γ , IL-1 α e IL-4 en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados e infectados con *N. brasiliensis*. Los cultivos celulares fueron estimulados con filtrado de cultivo (AFC) crudo de *N. brasiliensis* y 5 fracciones protéicas semi-purificadas de AFC, separadas por electroforesis (P1, P2, P3, P4, P5). Posteriormente, se utilizó AFC crudo y las fracciones que estimularon la producción de IFN- γ en los ratones, para estimular la producción de IFN- γ y proliferación de células mononucleares de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, individuos con tuberculosis y controles sanos.

Contribuciones y Conclusiones: El AFC crudo y 3 fracciones protéicas (P3, P4 y P5) estimularon una producción significativa de IFN- γ en ratones infectados. La producción de IL-1 α e IL-4 fue mínima en todos los grupos. En los ensayos en humanos, sólo el AFC crudo estimuló una producción significativa de IFN- γ y proliferación celular en el grupo de pacientes con actinomicetoma. Estos resultados sugieren que en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* se encuentran antígenos que son reconocidos por los pacientes con actinomicetoma y no producen estimulación cruzada en pacientes con tuberculosis y controles sanos; siendo candidatos potenciales para el desarrollo de una prueba inmunológica para el diagnóstico de actinomicetoma.

FIRMA DEL ASESOR: _____

NOMENCLATURA

AFC	Antígenos de filtrado de cultivo
g	Gramos
IFN- γ	Interferón gamma
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-4	Interleucina 4
k-Da	Kilodaltones
L	Litro
M	Concentración Molar
mg	Miligramos
ml	Mililitro
μ g	Microgramos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución buffer de fosfatos
PHA	Fitohemaglutinina A
pg	Picogramos
P1	Fracción 1 de AFC
P2	Fracción 2 de AFC
P3	Fracción 3 de AFC
P4	Fracción 4 de AFC
P5	Fracción 5 de AFC
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
V	Voltios

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Definición

El micetoma es una infección localizada de evolución crónica, que afecta la piel, tejido celular subcutáneo, hueso y en ocasiones órganos adyacentes. Se caracteriza clínicamente por la presencia de una tumoración firme, con múltiples abscesos y fístulas con drenaje purulento que contiene gránulos formados por microcolonias del agente causal. Las características de estos gránulos dependen del microorganismo causante de la infección.^{1,2,3,4,5,6.}



Figura 1.- Actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*.

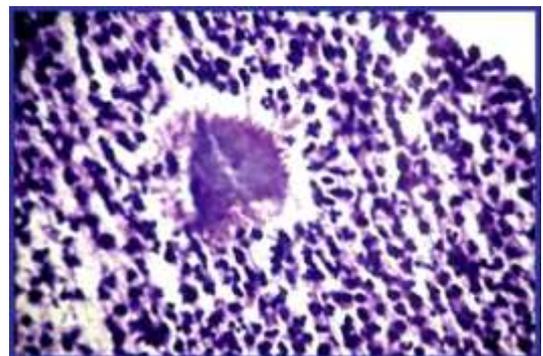


Figura 2.- Gránulo de *N. brasiliensis* (HE, 40x).

1.2. Historia

Esta entidad clínica fue descrita en 1842 por John Gill en la región de Madura, India,¹ y más tarde fue denominada “Pie de Madura” por Colebrook. En 1860 Carter determinó su etiología fúngica y propuso el término micetoma (“tumor por hongos”)^{1,2}. En 1913 Pinoy distinguió dos grupos según su etiología: actinomicetomas, causados por actinomicetos aerobios, y eumicetomas, causados por hongos verdaderos.⁷ En México, el primer caso fue descrito por Cicero en el año de 1902.

1.3 Datos Epidemiológicos

El micetoma se presenta en zonas geográficas cercanas al Trópico de Cáncer, donde predomina el clima tropical y subtropical, y afecta con mayor frecuencia a personas que viven en áreas rurales de países en desarrollo.^{5,6} Los microorganismos productores de micetoma han sido aislados del suelo, de restos vegetales, de madera y plantas, en especial de las acacias y otras plantas espinosas. La infección se adquiere por inoculación del microorganismo a través de la piel, mediante traumatismos con espinas o fragmentos de madera. Es por esto que las lesiones predominan en extremidades inferiores, aunque también pueden localizarse en el tronco, cabeza, cuello, y extremidades superiores.^{8,9,10,11}

El micetoma se considera la “micosis” profunda más frecuente en Nuestro país, con una incidencia de 70 casos por año; siendo el estado de

Nuevo León uno de los estados con mayor número de casos registrados (más de 450 casos en el periodo 1956-1990).¹² En relación a la epidemiología local, en el Hospital Universitario “José E. González”, que es uno de los principales centros de referencia del noreste del país, se registraron 101 casos en el período de 1990 al 2003, con un promedio de 8 casos al año. De estos casos, el 42% eran provenientes del estado de Nuevo León y el 37% de San Luis Potosí, Tamaulipas y Coahuila. En esta misma serie, se confirmó el diagnóstico de actinomicetoma en 85 casos, siendo *Nocardia brasiliensis* el agente etiológico en el 71% de ellos. Es importante mencionar que las edades de estos pacientes oscilaron entre 12 y 89 años, con una media de 37; y que el 37% presentaban algún grado de incapacidad funcional debida al micetoma. Cabe destacar también, que se observó un gran número de casos que abandonaron el tratamiento, ya que 8 pacientes no volvieron después de la primera cita y 63 dejaron de asistir antes de concluir el tratamiento.¹³

1.4. Etiología

En México, el 98% de los casos son causados por bacterias y sólo el 2% por eumicetos; de los actinomicetomas, el 86% son causados por *Nocardia brasiliensis*, seguido por *Actinomadura madurae* (8%) y *Streptomyces somaliensis* (4%).¹²

Nocardia brasiliensis es una bacteria que pertenece al orden Actinomicetales, familia *Nocardiaceae* y género *Nocardia*.

El género *Nocardia* está filogenéticamente relacionado con otros géneros bacterianos, tales como: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*. *Nocardia brasiliensis* es un bacilo aerobio, intracelular facultativo, no móvil, grampositivo y parcialmente ácido-alcohol resistente. Produce filamentos ramificados tanto en cultivos como en los tejidos, que al microscopio se observan como filamentos microsifonados (0.5-1 μ), que se fragmentan en formas cocoides y bacilares. Tiene una pared celular semejante a la de las micobacterias, compuesta por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos nocardiomicólicos.^{14,15,16} Crece en medio Sabouraud o mycosel a temperatura ambiente, observando el desarrollo de colonias en 8-10 días. Las colonias son de color blanco-amarillento y en ocasiones con tonalidad naranja; tienen un aspecto acuminado o surcado, que se ha descrito como “rosetas de maíz”; son secas y de consistencia dura. Para diferenciarla de otras especies de *Nocardia* se utilizan algunas de sus propiedades bioquímicas, tales como la descomposición de tirosina y urea, licuefacción de gelatina e hidrólisis de caseína .¹

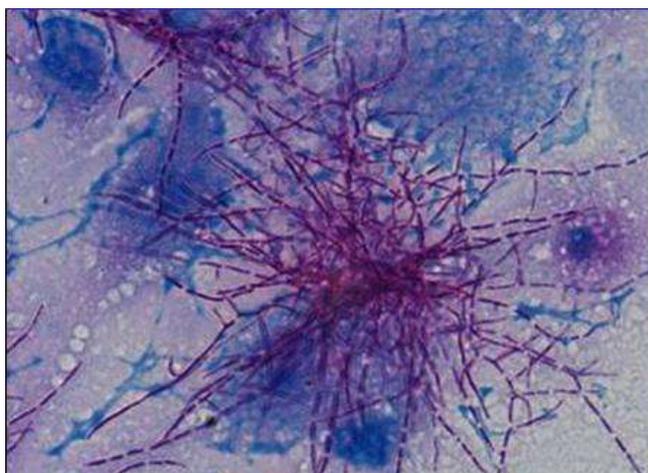


Figura 3.- Filamentos de *Nocardia brasiliensis* (tinción Kinyoun, 100x).

1.5. Fisiopatología e inmunología del actinomicetoma.-

Una vez que ha ocurrido la inoculación en el hospedero, pueden ocurrir dos eventos: que la bacteria sea eliminada por la inmunidad innata del huésped impidiendo que se instaure la infección, o que la bacteria logre evadir los mecanismos inmunológicos causando una infección crónica. Es importante destacar que debido a su abundancia en el medio que nos rodea, muchos hayamos tenido contacto con este actinomiceto; y la realidad es que aún en regiones endémicas, muy pocos individuos desarrollan micetoma.¹⁷

Hasta el momento, no se conoce por completo la patogénesis de las infecciones por *Nocardia* y los mecanismos que le permiten instalarse crónicamente en los tejidos de ciertos individuos. Su virulencia parece depender principalmente de su capacidad de evadir o modular la respuesta inmune del huésped.^{18, 19, 20}

Los mecanismos inmunológicos que se desarrollan ante las infecciones por *Nocardia* se conocen de manera incompleta; pero se ha demostrado en humanos y en modelos murinos, que tanto la inmunidad innata como la adaptativa participan en la resistencia del hospedero; y que de ésta última, se estimula tanto la inmunidad celular como la humoral.^{15,18,19,20,21} Aún se necesitan estudios más específicos para determinar cuál de ellas juega el papel primordial en la inmunopatología del micetoma.

1.5.1. Participación de la Inmunidad Celular.

Existen diversos estudios que apoyan la importancia de la inmunidad celular en el desarrollo del micetoma. A partir de 1953, González-Ochoa y colaboradores publicaron diversos estudios sobre la respuesta inmune en pacientes con actinomicetoma, mostrando que los pacientes con pruebas cutáneas positivas a nocardina y tuberculina tenían un pronóstico favorable; mientras que los que tenían altos títulos de anticuerpos fijadores de complemento y precipitinas, presentaban una enfermedad más severa y pobre respuesta al tratamiento.²² En 1977, Mahgoub y colaboradores, reportaron resultados similares.²³

Poco después, Ortiz-Ortiz y colaboradores, observaron tanto en pacientes como en animales de experimentación, que la hipersensibilidad celular a extracto bacteriano crudo o antígenos purificados de *Nocardia brasiliensis*, se asociaba con una evolución clínica satisfactoria.^{24,25,26}

En 1977, Folb encontró que el inocular ratones atímicos con *Nocardia brasiliensis*, no se formaban granulomas y los animales morían de enfermedad diseminada; mientras que en ratones sanos la infección permanecía localizada y en muchos de los casos se resolvía de manera espontánea.²⁷ Posteriormente, Vera-Cabrera y colaboradores reportaron resultados similares en ratas atímicas.²⁸

1.5.2. Participación de la Inmunidad Humoral.

En relación a la inmunidad humoral, no está claro el papel de los anticuerpos circulantes anti-nocardia en la protección del hospedero.

Algunos estudios sugieren que no tienen un papel relevante o pueden incluso empeorar las lesiones.²⁹ En 1982, Rico y colaboradores, mostraron que los ratones depletados de linfocitos B e inoculados con *Nocardia brasiliensis*, tenían un mejor pronóstico en el desarrollo de micetoma que los controles.³⁰

En 1992, Salinas, Vera y cols. describieron que los pacientes con micetoma causado por *N. brasiliensis* reconocían 3 proteínas inmunodominantes de un extracto citoplasmático, las cuales tenían un peso molecular de 61-, 26- y 24-kDa.³¹ Posteriormente, el mismo grupo desarrolló una prueba inmunoenzimática (ELISA) para detectar anticuerpos séricos contra estas proteínas en pacientes infectados por *N. brasiliensis*, encontrando que existe relación entre el título de anticuerpos y la evolución del micetoma.^{32,33,34}

En 1996, Salinas-Carmona y colaboradores, demostraron que la inmunidad humoral pasiva en ratones experimentales previene el desarrollo de micetomas, no así el suero hiperinmune de animales curados espontáneamente o inmunizados.³⁵

En el 2002, el mismo grupo reportó que la inmunización activa con una proteasa caseinolítica de extracto celular de *Nocardia brasiliensis*, tenía un efecto protector contra el desarrollo de micetomas experimentales en ratones; mientras que la inmunización pasiva con suero anti-proteasa

inducía sólo una protección transitoria contra la infección. Estos últimos resultados sugieren que deben ser otros factores humorales no relacionados con anticuerpos, los responsables de este efecto protector de la inmunidad humoral; siendo las citocinas, candidatos importantes para atribuirles este efecto.²⁹

Dos años después, se investigó el efecto de la inmunización activa y pasiva con los antígenos P24, P38 y P64 de *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c; encontrando que existe un efecto protector de anticuerpos IgM (activa- y pasivamente inducidos), contra la infección experimental por esta bacteria en ratones.³⁶

1.5.3. Citocinas.

Existe muy poca información sobre la participación de las citocinas en la fisiopatología del micetoma, y poco se ha estudiado si existe producción de citocinas –y de qué tipo- ante el estímulo con antígenos de filtrado de cultivo.

Los primeros datos sobre la producción de citocinas en modelos experimentales de micetoma, fue publicado en 1999 por Salinas-Carmona y colaboradores. En este trabajo se estudió la proliferación celular, producción de inmunoglobulinas y concentración de citocinas en cultivo de células mononucleares de ratones inoculados con *N. brasiliensis*, encontrando un aumento importante en los niveles de IFN- γ , y aumento moderado de IL-4, IL-6 e IL-10 en los primeros 4 días post-infección. La proliferación de linfocitos se detectó del día 7 al día 60 post-inoculación.³⁸

Recientemente, Zúñiga de Jesús en su tesis doctoral estudió la secreción *in vitro* de citocinas por macrófagos en respuesta a diversas dosis de *N. brasiliensis* ATCC 700358 en fase de crecimiento exponencial (virulenta) o estacionaria (avirulenta). Se encontró un efecto diferencial de *N. brasiliensis* con respecto a la secreción de citocinas, ya que, a diferencia de la fase estacionaria, en la fase de crecimiento exponencial a dosis baja, *N. brasiliensis* mostró ser inductor de IL-10. Se evidenció también un efecto inhibitorio del microorganismo sobre la producción de TNF- α , particularmente en su fase exponencial. Pero en general, en cualquiera de sus fases y a diversas dosis, *N. brasiliensis* resultó ser un pobre inductor de todas las citocinas estudiadas (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10).¹⁷

En el 2004, se publicó un trabajo sobre la producción de citocinas y proliferación de linfocitos en pacientes con actinomicetoma y en controles sanos, utilizando como antígenos el extracto celular crudo de *Nocardia brasiliensis* y 5 fracciones antigénicas del mismo. Se observó que todos los antígenos probados indujeron proliferación de linfocitos en ambos grupos, siendo ésta más alta en los pacientes que en los controles. Las citocinas evaluadas fueron IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 y TNF- α , observando que la producción de IL-4 fue muy baja en pacientes y nula en controles, mientras que IL-10 e IL-12 fueron producidas en muy baja cantidad en ambos grupos. En los pacientes con micetoma se observó una producción más alta de TNF- α que en los controles; mientras que la producción de IFN- γ fue significativamente mayor en el grupo control, esto último en contraste con lo observado en el trabajo realizado previamente por Salinas-Carmona.³⁸ Con

los resultados de este estudio podría asumirse que por los niveles bajos de IFN- γ y elevados de IL-4 y TNF- α , los pacientes con micetoma activo presentan una respuesta TH1 deficiente.³⁹

1.6. Antígenos de filtrado de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, *Nocardia brasiliensis* es un organismo relacionado filogenéticamente con *M. tuberculosis*, para el cual se ha demostrado que las proteínas que excreta al medio de cultivo tienen un importante efecto estimulante de la inmunidad celular.^{40,41,42,43, 44,45}

Recientemente, Morcos y colaboradores identificaron fracciones proteicas de filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* que eran reconocidas por suero de pacientes con micetoma causado por este actinomiceto; y posteriormente evaluaron la capacidad de estas proteínas de inducir respuesta inmune celular mediante pruebas cutáneas en cobayos sensibilizados con *N. brasiliensis*. De las fracciones identificadas, las fracciones con pesos moleculares aproximados de 90-, 65- y 15- kDa, fueron las que produjeron mayor induración en las pruebas cutáneas realizadas en cobayos.⁴⁶ No se ha determinado si estos antígenos son capaces de inducir la respuesta inmune en humanos.

El objetivo general de esta tesis fue identificar antígenos de filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis* que inducen la respuesta inmune celular en ratones BALB/c y en pacientes con actinomicetoma; así como determinar el patrón de citocinas producidas ante estos antígenos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar antígenos de filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis* capaces de inducir una respuesta inmune celular en ratones BALB/c y en humanos, así como el tipo de citocinas producidas ante estos antígenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir, purificar y fraccionar el AFC de *Nocardia brasiliensis*.
2. Determinar la capacidad del AFC purificado de inducir la respuesta inmune y el tipo de citocinas producidas, en ratones BALB/c inmunizados e infectados con *N. brasiliensis*.
3. Identificar las fracciones de AFC que inducen la respuesta inmune celular en ratones BALB/c inmunizados e infectados con *N. brasiliensis*, así como el tipo de citocinas producidas.
4. Determinar la capacidad del antígeno crudo y de aquellas fracciones que hayan mostrado inmunogenicidad en el ratón, de inducir la producción de IFN- γ y proliferación celular en pacientes con micetoma.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1. Microorganismos

Se utilizó la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358), aislada de un paciente con micetoma con diseminación pulmonar diagnosticado en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario-UANL. La cepa se conservó en leche descremada al 2% a -70°C hasta su utilización.

2.2. Producción de antígenos de filtrado de cultivo (AFC)

La cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1 fue cultivada por 72 horas en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 25 ml de infusión cerebro-corazón (Difco Lab, Detroit, Mich.) a 37°C, en agitación (110 rpm). Después de su crecimiento, la masa bacteriana fue compactada por centrifugación y lavada en 3 ocasiones con solución salina estéril, para posteriormente ser fragmentada en células individuales y filamentos cortos en un mortero con solución salina estéril. A continuación, se inocularon 10 ml de esta

suspensión bacteriana en matraces Erlenmeyer de 2 litros, con 500 ml de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.). Se incubaron en agitación (110 rpm), a 37°C durante 15 días. Después de la incubación, se separó la masa bacteriana con papel filtro Whatman No.1 y se esterilizó por filtración utilizando filtros de 0.22 µm (Millipore, Billerica, Ma). El AFC fue concentrado por liofilización y almacenado a -20°C hasta su utilización.⁴⁶

2.3. Precipitación de las proteínas del AFC con sulfato de amonio

El liofilizado fue resuspendido en el mínimo volumen de agua bidestilada, se agregó sulfato de amonio sólido a razón de 561 gr/litro, y se disolvió por agitación durante 2 horas a 4°C.⁴⁷ El precipitado fue recolectado por centrifugación a 3000 rpm y resuspendido en el mínimo volumen de solución de sulfato de amonio al 80%. Se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 5 minutos, y se realizaron 3 lavados más con sulfato de amonio al 80%. Los precipitados se resuspendieron finalmente en solución buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4, y se dializaron extensamente contra agua bidestilada y PBS pH 7.4. Después de la diálisis, el AFC fue nuevamente liofilizado y conservado a -20°C hasta su utilización.

2.4. Fraccionamiento del AFC

Para obtener las fracciones semi-purificadas, se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 12% con gel concentrador al 4%, de 10 cm x 12 cm x

3 mm, con un sistema de buffer discontinuo de Laemmli.⁴⁸ Se procesaron alícuotas de 10 mg de AFC liofilizado, resuspendido en la mínima cantidad de solución salina estéril. El AFC se mezcló con una solución buffer preparada con SDS al 2.5%, 2-mercaptoetanol 2.5% (vol/vol), glicerol y azul de bromofenol, y se calentó en agua en ebullición por 2 minutos.

Se realizó electroforesis con un voltaje constante de 120 volts durante aproximadamente 8 horas a 4°C. Al terminar la electroforesis, el gel se fraccionó manualmente a nivel de cada banda proteica, utilizando 30 µl de marcadores pre-teñidos a cada lado del gel como guías de peso molecular (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen Co., Carlsbad CA., Cat.10748-010). Estos marcadores contienen 10 bandas pre-teñidas con pesos moleculares de 177.3-, 110.7-, 79.8-, 61-, 47.8-, 35.9-, 24.5-, 18.7-, 13.9- y 5.9-kDa.

Cada una de las fracciones fue electroeluída durante 2 horas a 120 Volts. Se utilizó un concentrador con buffer glicina 384 mM-tris 250 mM como buffer de electrodos y una dilución 1:10 de este mismo buffer en la cámara de electroelución.^{31,50} Después de la electroelución, las fracciones se dializaron durante 2 hr contra PBS, pH 7.4, a 4°C.

2.5. Análisis del AFC y las Fracciones

El AFC y las fracciones semi-purificadas se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%, utilizando la técnica de electroforesis descrita

previamente. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y azul de Coomassie, y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.⁵¹

Antes de utilizar el AFC y las fracciones en los cultivos celulares, fueron esterilizadas utilizando filtros de 0.22 μm (Spin-X, Corning Inc. Corning, NY).

2.6. Animales

Se utilizaron 3 grupos de 6 ratones BALB/c machos de 9-12 semanas de edad. Los animales provinieron de la colonia donada por el Dr. Carl Hansen (*Small Animal Section, Veterinary Resources Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) y se mantuvieron bajo condiciones normales, recibiendo alimento para roedores purina y agua *ad libitum*.

Se siguieron las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999) para el trabajo con animales experimentales.

2.7. Inmunización de Ratones

2.7.1. Preparación del Inóculo

Después de su crecimiento en medio BHI (Difco Lab, Detroit, Mich.) a 37°C por 72 horas, se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una

concentración de 1×10^7 UFC de *N.brasiliensis* en fase logarítmica de crecimiento. La suspensión bacteriana fue inactivada a 121°C por 20 minutos.⁵²

2.7.2. Inoculación de los Ratones

Un grupo de 6 ratones fue inyectado en 3 ocasiones con 100 µl de esta suspensión en el cojinete plantar, con un intervalo de dos semanas entre cada inyección.⁵²

2.8. Inducción de Micetoma Experimental en Ratones

Se inyectaron 6 ratones con 100 µl de una suspensión celular con 1×10^7 UFC de *N. brasiliensis* en fase logarítmica de crecimiento, en el cojinete plantar.³⁸ El inóculo fue preparado como se describió previamente, sin ser inactivado.

2.9 Grupo control

Como control, un grupo de 6 ratones recibió 100 µl de solución salina estéril en el cojinete plantar.

2.10. Determinación de la Producción de Citocinas en Esplenocitos de Ratones

Seis semanas después de la inoculación, los animales fueron

sacrificados por dislocación cervical y se les extirpó el bazo en condiciones de esterilidad. Se realizó una suspensión de esplenocitos en medio RPMI-1640 y se depositó en tubos con Ficoll-diatrizoato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), en proporción 2:1. La mezcla fue centrifugada a 1300 rpm por 30 minutos (centrífuga Beckman TJ-6, no. serie 14184, no, cat. 340439.). La fase intermedia de células mononucleares fue separada, lavada en 3 ocasiones con medio RPMI-1640 y ajustada a una concentración de 1×10^6 cél/ml de RPMI-1640 pH 7.4, suplementado con bicarbonato de sodio 1 g/L, sulfato de gentamicina 50 μ g/ml y 10% de suero de ternera fetal. Se depositaron 2×10^5 células en 200 μ l en micro-placas de fondo plano y se estimularon con 5 μ g de AFC, 1 μ g de las 5 fracciones semi-purificadas (P1, P2, P3, P4 o P5) o fitohemaglutinina A (PHA). Los cultivos se incubaron por 24 horas a 37°C, con 5% CO₂ a humedad constante. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos para separar las células (centrífuga Benchtop Beckman mod. Allegra-64R; Cat No. 367586; Serie ALV99A07).³⁸ Se determinó la concentración de IFN- γ , IL-1 α e IL4 en el sobrenadante, utilizando un método comercial de ELISA en micro-placas (Pierce-Endogen, Rockford, IL). Los cultivos se realizaron por triplicado.

2.11. Selección de Pacientes para el Estudio

Se incluyeron siete pacientes (4 hombres y 3 mujeres) con diagnóstico de micetoma activo por *Nocardia brasiliensis*, con edades de

a 59 años, sin otros factores de co-morbilidad asociados. El diagnóstico se realizó en base al examen directo de la secreción y estudio histopatológico; el agente etiológico fue confirmado con cultivo y pruebas bioquímicas. El diagnóstico y tratamiento de todos los pacientes se llevó a cabo en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José E. González” de la UANL, en Monterrey, N.L. México.

Se incluyeron también 7 pacientes con infección activa por *Mycobacterium tuberculosis* (6 casos de tuberculosis pulmonar y 1 tuberculosis miliar), con menos de 1 mes de tratamiento, PPD positivo y sin otras enfermedades asociadas. Todos los pacientes fueron de sexo masculino, con edades de 19 a 43 años y acudieron al Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias (CIPTIR) del Hospital Universitario “José E. González” donde se realizó el diagnóstico y se inició el tratamiento. En todos los casos se confirmó el diagnóstico por cultivo de *M. tuberculosis*.

Como controles participaron 7 individuos sanos (3 hombres y 4 mujeres), de 22 a 27 años de edad; sin antecedentes médicos relevantes y con PPD negativo.

Todos los pacientes participaron de manera voluntaria y firmaron una carta de consentimiento informado.

2.12. Proliferación de Células Mononucleares y Determinación de la Producción de IFN- γ en Sangre de Pacientes

Se tomó una muestra de 12 ml de sangre del antebrazo izquierdo a cada paciente, en jeringas con 0.5 ml de heparina. Se realizó una dilución 1:1 con RPMI-1640, y las muestras fueron depositadas en tubos con Ficoll-diatrizoato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en una proporción 2:1. Se centrifugaron a 1300 rpm por 30 minutos (centrífuga Beckman TJ-6, no. serie 14184, no, cat. 340439), y posteriormente se separó la interfase de células mononucleares. Las células se lavaron 3 veces con RPMI-1640 y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml de RPMI-1640 suplementado como se mencionó previamente. Se colocaron 2×10^5 cél/200 μ l en dos micro-placas de fondo plano y se estimularon con 5 μ g de AFC, 1 μ g de las fracciones que mostraron inmunogenicidad en los ratones o PHA. Se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ a humedad constante. Después de 24 hr de incubación, una de las placas fue centrifugada a 10,000 rpm por 5 minutos para separar las células (centrífuga Benchtop Beckman mod. Allegra-64R; Cat No. 367586; Serie ALV99A07) y se determinó la concentración de IFN- γ en el sobrenadante mediante ELISA en microplacas (Pierce-Endogen, Rockford, IL). La segunda placa fue incubada durante 5 días bajo las mismas condiciones, agregando 10 μ l de ³H-Timidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 24 hr antes de la cosecha. Después de cosecharlos, se determinaron las cpm con un espectrómetro de radiación beta (Beckman LS6000TA). Los cultivos se realizaron por triplicado.

2.13. Análisis estadístico.

La concentración de citocinas se expresó en pg/ml y la proliferación celular en índice de estimulación; todos expresados como medias de cultivos triplicados. El índice de estimulación se calculó dividiendo la media de los valores de cultivos estimulados entre la media de los valores de cultivos no estimulados. Se calculó la media y desviación estándar de cada grupo y las diferencias entre ellos se analizaron con las pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Análisis Electroforético del AFC

El análisis del AFC de *N. brasiliensis* mediante SDS-PAGE mostró más de 30 bandas, con rango de peso molecular de 8- a 180-kDa. Después de la precipitación con sulfato de amonio, se eliminó una gran cantidad de pigmentos de color café que se encontraban presentes en el extracto crudo, conservando el mismo patrón de bandas proteicas. Las características del AFC se muestran en la figura 1.

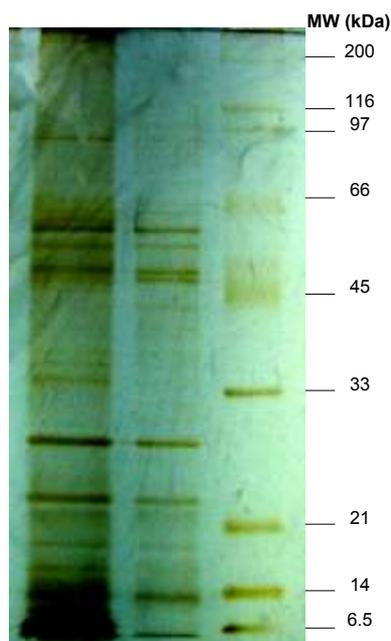


Fig 4.- AFC de *N. brasiliensis* analizado en SDS-PAGE 15%. Línea 1, AFC (15 µg); línea 2, AFC precipitado con sulfato de amonio 80% (15 µg); línea 3, marcadores de peso molecular. El gel se tiñó con nitrato de plata.

3.2 Fraccionamiento del AFC

Después del fraccionamiento y electroelución de los geles, se obtuvieron 12 fracciones semi-purificadas. En base a su pureza relativa y su concentración, se seleccionaron 5 de ellas para realizar los ensayos en ratones. El peso molecular aproximado de las fracciones seleccionadas fue: 29-kDa (P1), 22-kDa (P2), 20-kDa (P3), 18-kDa (P4) y 14-kDa (P5). (Fig. 2).

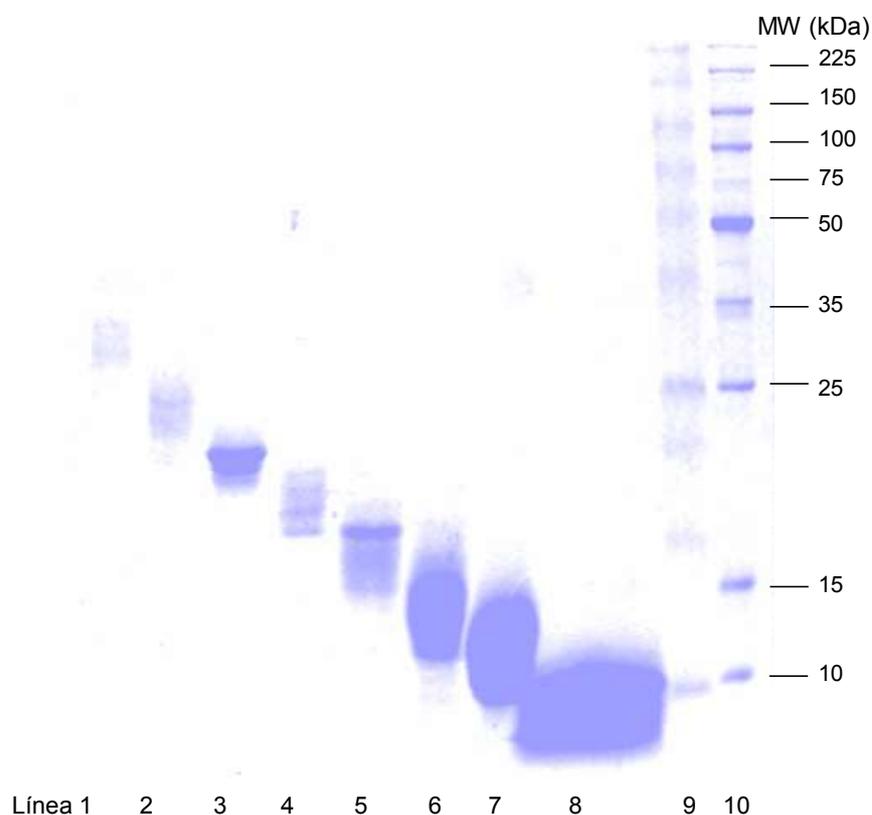


Fig 5.- Fracciones semi-purificadas de AFC analizadas en SDS-PAGE 12%, teñido con azul de Coomassie. Línea 2, P1 29-kDa (20 μ l); línea 3, P2 22-kDa (20 μ l); línea 4, P3 20-kDa (20 μ l); línea 5, P4 18-kDa (20 μ l); línea 6, P5 14-kDa (20 μ l); línea 9, marcadores de peso molecular (BIORAD, Hercules, CA, no. cat. 161-0317); línea 10, marcadores de peso molecular (PROMEGA, Madison, WI, no.cat. V8491).

3.3. Inmunogenicidad en Ratones

El patrón de citocinas en los ratones mostró que la producción de IFN- γ fue significativamente más alta en el grupo infectado, particularmente cuando las células fueron estimuladas con AFC ($p= 0.001$), pero también cuando se probaron las fracciones P3, P4 y P5 ($p= 0.007$, 0.009 y 0.009 , respectivamente). No se observó una producción significativa de IFN- γ en los grupos inmunizado y control. Estos resultados se presentan en la figura 3.

La producción de IL-1 α e IL-4 fue mínima en los tres grupos al estimular con todos los antígenos estudiados, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

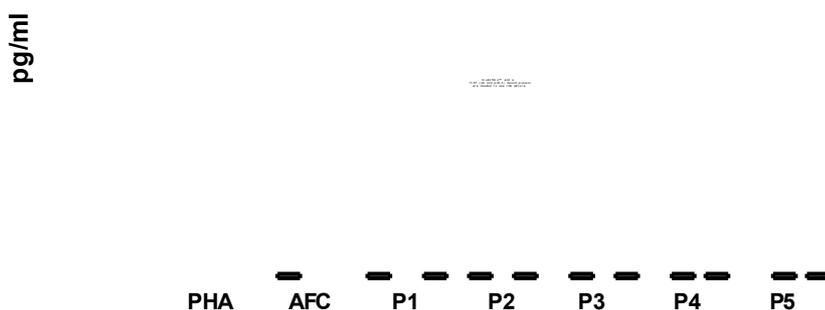


Fig 6.- Producción de IFN- γ en esplenocitos de ratones BALB/c. PHA indujo una mayor producción de IFN- γ en los ratones infectados. El AFC y en menor grado las fracciones P3, P4 y P5 estimularon una producción significativa de IFN- γ en el grupo infectado ($p = 0.001$, 0.007 , 0.009 y 0.009 , respectivamente).

En base a los resultados obtenidos en los ratones, se seleccionaron las fracciones P3, P4 y P5 para ser estudiadas en los pacientes. Las características de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla 1.

La producción de IFN- γ y la proliferación de células mononucleares fue significativamente más alta en los pacientes con micetoma, pero únicamente al estimular los cultivos con AFC ($p= 0.001$ y 0.001 , respectivamente). En contraste, las fracciones P3, P4 y P5 a dosis de $1 \mu\text{g}$, no fueron capaces de estimular la producción de IFN- γ y la proliferación celular en humanos. No se observó estimulación cruzada en pacientes con tuberculosis ni en controles sanos.

La mayor estimulación en pacientes fue inducida por el mitógeno PHA. Tanto la proliferación celular como la producción de IFN- γ fueron mayores en los controles sanos que en los pacientes con micetoma o tuberculosis. Sin embargo la diferencia no fue significativa, con un valor de p de 0.091 (fig. 4 y 5).

Tabla 1.- Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Sexo/ Edad (años)	Diagnóstico	Cultivo	PPD	Tratamiento (al tiempo del ensayo)
Pacientes con micetoma				
M/50	Micetoma en espalda x 6 años	<i>N. brasiliensis</i>	NR	-
M/51	Micetoma en pie derecho x 2 años	<i>N. brasiliensis</i>	NR	TMP-SMX/Amikacina x 5m.
F/27	Micetoma en pie izquierdo x 1 año	<i>N. brasiliensis</i>	NR	-
F/46	Micetoma en muslo der. x 20 años	<i>N. brasiliensis</i>	NR	Moxifloxacina x 2 m.
F/13	Micetoma en pie derecho x 3 años	<i>N. brasiliensis</i>	NR	TMP-SMX/Amikacina x 3m.
M/59	Micetoma en pie izq. x 11 años	<i>N. brasiliensis</i>	NR	TMP-SMX/Amikacina x 5m.
M/42	Micetoma en pie derecho x 2 años	<i>N. brasiliensis</i>	NR	TMP-SMX/Amikacina x 3m.
Pacientes con tuberculosis				
M/43	Tuberculosis pulmonar	<i>M.tuberculosis</i>	+	-
M/20	Tuberculosis pulmonar	<i>M.tuberculosis</i>	+	R/I/P/E x 1 sem.
M/34	Tuberculosis miliar	<i>M.tuberculosis</i>	+	R/I/P/E x 2 sem.
M/19	Tuberculosis pulmonar	<i>M.tuberculosis</i>	+	-
M/36	Tuberculosis pulmonar	<i>M.tuberculosis</i>	+	-
M/22	Tuberculosis pulmonar y pleural	<i>M.tuberculosis</i>	+	R/I/P/E x 2 sem.
M/31	Tuberculosis pulmonar	<i>M.tuberculosis</i>	+	R/I/P/E x 1 m.
Controles sanos				
F/22	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA
F/22	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA
M/22	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA
F/24	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA
M/27	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA
M/25	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA
F/24	Sano; sin antecedentes relevantes	NR	-	NA

TMP-SMX= trimetoprim-sulfametoxazol, R= rifampicina, I= isoniazida, P= pirazinamida, E= etambutol, NR= no realizado, NA= no aplica, m= mes(es).



Figura 7.- Pacientes con actinomictoma por *N. brasiliensis*, que participaron en el estudio. A, paciente 1, actinomictoma en espalda; B, paciente 2, actinomictoma en pie derecho; C, paciente 3, actinomictoma en pie izquierdo; D, paciente 4, actinomictoma en muslo derecho; E, paciente 6, actinomictoma en pie izquierdo; F, paciente 5, actinomictoma en pie derecho; G, paciente 7, actinomictoma en pie derecho.

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (sin comprimir).

AFC	P3	P4	P5
Grupo control			
Pacientes con micetoma			
Pacientes con tuberculosis			

Fig 8.- Proliferación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes. Solamente el AFC estimuló de manera significativa la proliferación celular en el grupo de pacientes con micetoma ($p = 0.001$). No se observó estimulación cruzada en pacientes con tuberculosis y controles sanos.

pg/ml

Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (sin comprimir).

	PHA	AFC	P3	P4	P5
Grupo control					
Pacientes con micetoma					
Pacientes con tuberculosis					

Fig 9.- Producción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica de pacientes. PHA indujo una mayor producción de IFN- γ en los controles sanos, comparado con los pacientes con micetoma y tuberculosis ($p= 0.091$). Solamente el AFC estimuló de manera significativa la producción de IFN- γ en los pacientes con micetoma ($p= 0.001$). No se observó estimulación cruzada en pacientes con tuberculosis y controles sanos.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

La producción de citocinas y su papel en la patogénesis del micetoma se conoce de manera parcial; en este trabajo observamos una producción significativa de IFN- γ y mínima o nula de IL-4 en respuesta a los antígenos estudiados en ratones infectados. Esto sugiere un predominio de citocinas TH1 en respuesta a estos antígenos en el modelo murino.

En este trabajo, se observó inducción de la respuesta inmune celular al AFC de *N. brasiliensis* únicamente en los ratones que fueron infectados con bacterias viables. Las células mononucleares de los ratones inmunizados con bacterias inactivadas por calor no indujeron producción de IFN- γ , ni proliferación de linfocitos. En otros experimentos, se ha demostrado que es posible obtener una respuesta inmune ante diversos antígenos celulares después de inmunizar con bacterias inactivadas con la técnica utilizada en este trabajo.⁵² Estos resultados podrían indicar la necesidad de bacterias viables en los tejidos del hospedero para que los antígenos de filtrado de cultivo sean reconocidos por su sistema inmune. Esta observación también sugiere la posibilidad de que estos antígenos sean producidos y liberados por *Nocardia brasiliensis* a los tejidos del hospedero en el curso de la infección; y que éstos sean antigénicamente diferentes a

las proteínas intracelulares, si no todos, al menos los antígenos inmunodominantes.

Las células de los pacientes con actinomicetoma, mostraron una producción significativa de IFN- γ y proliferación celular, al ser estimuladas con AFC; sin embargo, las fracciones estudiadas (P3, P4 y P5) a dosis de 1 μ g, no produjeron ninguna respuesta. Esto probablemente se deba a que a la dosis utilizada no es suficiente para inducir una respuesta inmune en humanos. En otros ensayos utilizando fracciones de *M. tuberculosis* y *M. leprae* se ha observado que 1 μ g es suficiente para detectar una respuesta TH1.^{44,45,47} Para descartar esta posibilidad, en antígenos de difusión de Nocardia, será necesario probar dosis mayores de las fracciones purificadas y obtener una curva dosis-respuesta, con el fin de determinar la dosis óptima.

Es posible también, que durante el proceso desnaturalizante utilizado en SDS-PAGE, las fracciones perdieran sus propiedades antigénicas. Por este motivo, es necesario evaluar otros procesos para obtener fracciones de AFC en condiciones no-desnaturalizantes.

En contraste con estudios previos^{22,39} observamos una respuesta más baja al mitógeno PHA en los cultivos celulares obtenidos de pacientes con micetomas activos, comparada con la de los controles sanos; esta baja respuesta fue similar a la observada en los pacientes con tuberculosis. A

pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, los resultados sugieren que podría existir cierto grado de deficiencia en la inmunidad celular en los pacientes con micetoma activo. No está claro si esta respuesta inmune más baja pudiera haber participado en el desarrollo del micetoma, o si ésta es secundaria al proceso infeccioso crónico. Se ha reportado que *Nocardia spp.* produce diversos inmunomoduladores e inmunosupresores; sin embargo, no se conoce su papel en la fisiopatología del micetoma.^{53,54,55}

Han sido múltiples los estudios que han intentado desarrollar una prueba que evalúe la respuesta inmune celular a *Nocardia brasiliensis*, con utilidad en el diagnóstico y pronóstico del actinomicetoma. En 1953, González-Ochoa utilizó filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* para realizar pruebas cutáneas en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, *A. bovis*, otras micosis profundas e individuos sanos, encontrando reacciones cutáneas positivas pero carentes de especificidad.²² En otros trabajos se han utilizado extractos citoplasmáticos^{24,25} o polisacáridos de la pared celular²²; y de manera similar, las reacciones cruzadas han sido obstáculos para desarrollo de pruebas útiles, debido a la conocida similitud antigénica entre nocardia y diversas micobacterias.^{21,22,24,25,26}

En *M. tuberculosis* se ha observado que los antígenos de filtrado de cultivo son más específicos que sus extractos celulares; el caso mejor conocido es el PPD, que ha demostrado ser una excelente herramienta para detectar la infección por esta micobacteria^{44,45}. Los antígenos inmunodominantes del PPD se han identificado y aislado, probando diferentes fracciones del extracto crudo, obteniendo así antígenos con mayor especificidad, como por ejemplo: CFP10-ESAT6.^{40,41,42,43,44,45}

En nuestro estudio, el AFC de *N. brasiliensis* no produjo estimulación cruzada en cultivos de pacientes con tuberculosis, y esto puede ser la base para el desarrollo de pruebas específicas para detectar las infecciones por nocardia, que sean de utilidad en el diagnóstico temprano y pronóstico de los pacientes con actinomicetoma.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. En el AFC de *N. brasiliensis* se encuentran antígenos que son reconocidos por pacientes con actinomicetoma activo, y no producen estimulación cruzada con antígenos de *M. tuberculosis*.
2. El AFC precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio) conserva sus propiedades antigénicas.
3. Las fracciones de filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* P3, P4 y P5 a dosis de 1 μg , estimulan producción de IFN- γ solamente en ratones infectados con *N. brasiliensis*, no así en el grupo inmunizado con bacterias muertas por calor ni en humanos.
4. El AFC de *N. brasiliensis* es antigénicamente activo y por lo tanto podría emplearse en estudios posteriores, con la finalidad de desarrollar una prueba diagnóstica sensible y específica para el diagnóstico temprano y pronóstico de los pacientes con actinomicetoma.

BIBLIOGRAFIA

1. Carter, HV. On a new striking form of fungus disease principally affecting the foot and prevailing endemically in many parts of India. Trans Med Phys Soc Bombay 1860. 104-142.
2. Carter, HV. On mycetoma or the fungus disease of India. J & A Churchill. Londres. 1874.
3. Lavalle, P., Clínica y terapéutica de los micetomas. Dermatología Internationalis 1966; 5; 117-120.
4. Welsh, O. Mycetoma current concepts in treatment. Int J of Dermatol 1991; 30; 387-398.
5. Welsh, O., Salinas-Carmona, M.C., y Rodríguez, M.A. Mycetoma. Infectious Diseases. EUA. J.B. Lippincott Co. 5a edición. 1994. 1402-1406.
6. Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, M.C. Mycetoma. Clin Dermatol 2007; 25; 195-202.
7. Pinoy, E. Actinomycoses and mycetomes. Bull Inst Pasteur 1913; 11; 929-938.
8. González-Ochoa, A. Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Rev Inst Salubr Enf Trop 1962; 22 ; 15-24.

9. González-Ochoa, A. Geografía de las micosis profundas. Rev Inv Salud Pub 1975; 35; 19; 85-96.
10. Rippon, JW. Mycetoma. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. EUA. WB Saunders Co. 1982. 79-114.
11. Welsh, O. López, R. Micetomas con diseminación pulmonar. Med Cut I.L.A 1985; 13; 517-523.
12. López-Martínez, R., Méndez-Tovar, L.J., Lavalle, P., Welsh, O., Saúl, A., Macotella-Ruiz, E. Epidemiology of mycetoma in México: Study of 2105 cases. Gac Med Mex 1992; 128; 477-481.
13. Cantú-Garza, H.A. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con micetoma en la consulta de dermatología del Hospital Universitario "José E. González", periodo 1990-2003. Tesis de Especialidad en Dermatología. México: Universidad Autónoma de Nuevo León: 2004.
14. Williams, T., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol.4. EUA. Williams & Wilkins Co. 1989. 2333-2362.
15. McNeil, M. y Brown, J. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Reviews. 1994. 357-417.
16. Kwapinski, JB. Seeliger, HPR. Investigations on the antigenic structure of actinomycelates: IX serological classification of the nocardiae with the polysaccharide fractions of their cell walls. Mycopathol 1965; 25; 173-182.
17. Zúñiga J, J.M., Efecto de mediadores inmunológicos en la producción de citocinas por macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*. Tesis

Doctorado en Ciencias. México: Universidad Autónoma de Nuevo León: 2004.

18. Boiron, P. Nocardia, host defenses and immune diagnosis. In: Jacobs, P.H., Nall, L., (Ed), Fungal Disease, biology, immunology and diagnosis. Marcell Dekker. 1997. 265-79.
19. Salinas-Carmona, M.C., Castro-Corona, M.A., Licón-Trillo, A. Mecanismos de patogenicidad de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. Med Universitaria 2002; 4; 97-101.
20. Beaman, BL. Nocardia species: host-parasite relationships. Rev Clin Microbiol 1994; 7; 213-264.
21. González-Ochoa, A. Virulence of Nocardia. Canadian Journal of Microbiology 1973; 19; 901-904.
22. González-Ochoa, A., Baranda, F., Una prueba cutánea para el diagnóstico de micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. Rev Inst Salub y Enf Trop 1953; 13; 189-97.
23. Mahgoub, E.S., Gumma, S.A. y El Hassan, A.M., Immunological status of mycetoma patients. Bull Soc Pathol Exot 1977; 70; 48-53.
24. Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M.F., Bojalil, L.F. Cytoplasmic antigens form Nocardia eliciting a specific delayed hypersensitivity. Infect Immun 1972; 5; 879-882.
25. Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. . Clin Exp Immunol 1972; 12; 1409-1413.

26. Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M.F., Bojalil, L.F. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from *Nocardia*. *Sabouraudia* 1972; 10; 147-151.
27. Folb, P.I., Timme, A. y Horowitz, A. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect Immun* 1977; 18; 459-66.
28. Vera-Cabrera, L., Rodríguez-Quintanilla, M.A., Boiron, P., Salinas-Carmona, M.C. y Welsh, O. Experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J Mycol* 1998; 8; 183-87.
29. Licón-Trillo, A., Castro-Corona, A., Salinas-Carmona, M.C., Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *FEMS Immun Med Microbiol* 2003; 37; 37-44.
30. Rico, G., Ochoa, R., Oliva, A., González-Mendoza, A., Walter, S. y Ortiz-Ortiz, L. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *J Immunol* 1982; 129; 1688-93.
31. Vera-Cabrera, L. Salinas-Carmona, MC. Welsh, O. Rodríguez, MA. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 1992; 30; 1183-1188.
32. Salinas-Carmona, M.C., Welsh, O., Casillas, S.M. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol* 1993; 31; 2901-2906.

33. Salinas-Carmona, M.C., Castro-Corona, M.A., Sepúlveda-Saavedra, J. y Pérez, L.I. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Clin and Diag Lab Immunol 1997; 4; 133-137.
34. Salinas-Carmona, MC. Anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies in patients with actinomycetoma and their clinical usefulness. Gac Med Mex 2001; 137; 1-8.
35. Salinas-Carmona., MC. Vera-Cabrera, L. Welsh, O. Rodríguez, M. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. Zbl Bakú 1992; 276; 390-397.
36. Salinas-Carmona, M.C., Pérez-Rivera, I. Humoral Immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. Infection and Immunity 2004; 72; 5597-5604.
37. Abbas, AK., Lichtman, AH., Andrew, H., Pober, JS., Inmunología celular y molecular. España. McGrawHill-Interamericana. 4ª edición. 2002. 243-279.
38. Salinas-Carmona, M.C., Torres-López, E., Ramos, A.I., Licon-Trillo, A., González-Spencer, D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. Infection and Immunity 1999; 67; 2428-2432.
39. Méndez-Tovar, L.J., Mondragón-González, R., Vega-López, F., Dockrell, H.M., Hay, R., López-Martínez, R., Manzano-Gayossa, P., Hernández-Hernández, F., Padilla-Desgarenes, C. y Bonifaz, A. Cytokine

- production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia* 2004; 158; 407-414.
40. Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J., Heron, I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infection and Immunity* 1991; 59; 1905-10.
41. Boesen, H., Jensen, B.N., Wilcke, T., Andersen, P. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 1995; 63; 1491-97.
42. Sorensen, A.L., Nagal, S., Houen, G., Andersen, P., Andersen, A.B., Purification and Characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 1995; 63; 1710-17.
43. Elhay, M., Oettinger, T., Andersen, P. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infection and Immunity* 1998; 66; 3554-56.
44. Johnson, P.D.R., Stuart, R.L., Grayson, M.L., Olden, D., Clancy, A., Ravn, P., Andersen, P., Britton, W.J., Rothel, J.S. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diag Lab Immunol* 1999; 6; 934-37.
45. vanPinxteren, L.A.H., Ravn, P., Agger, E.M., Pollock, J., Andersen, P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diag Lab Immunol* 2000; 7; 155-60.

46. Morcos-González, M.A. Identificación de fracciones inmunodominantes celulares y humorales de filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis*. Tesis Doctorado en Medicina. México: Universidad Autónoma en Nuevo León: 2004.
47. Nagai, S., Nagasuga, T., Matsumoto, J., Tuberculin peptide from culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis*. Am R Resp Dis 1980; 121; 551-557.
48. Laemmli, VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227; 680-685.
49. Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jabsen, S., Rasmussen, P., Elhay, M.J. y Andersen, P. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization. Infect Immunol 1998; 66; 3492-3500.
50. Weldingh, K., Hansen, A., Jacobsen, S. y Andersen, P. High resolution electroelution of polyacrilamide gels for the purification of single proteins from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. Scand J Immunol 2000; 51; 79-86.
51. Bradford, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72; 248-254.
52. Salinas-Carmona MC, Ramos AI, Pérez-Rivera I. Immunogenicity is unrelated to protective immunity when induced by soluble and particulate antigens from *Nocardia brasiliensis* in BALB/c mice. Microbes Infec 2006; 8; 2531-2538.

53. Komaki H, Nemoto A, Tanaka Y, Takagi H, Yazawa K, Mikami Y, Shigemori H, Kobayashi J, Ando A, Nagata Y. Brasilicardin A, a new terpenoid antibiotic from pathogenic *Nocardia brasiliensis*: fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 1999; 1; 13-9.
54. Shigemori H, Komaki H, Yazawa K, Mikami Y, Nemoto A, Tanaka Y, Sasaki, In Y, Ishida T, Kobayashi J. Brasilicardin A, a novel tricyclic metabolite with potent immunosuppressive activity from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J Org Chem* 1998; 20; 6900-6904.
55. Usui T, Nagumo Y, Watanabe A, Kubota T, Komatsu K, Kobayashi J, Osada H. Brasilicardin A, a natural immunosuppressant, targets amino acid transport system L. *Chem Biol* 2006; 11; 1153-1160.

ABSTRACT

The ability of culture filtrate proteins to induce a cellular immune response in infected mice and humans was investigated. A crude extract culture filtrate of *Nocardia brasiliensis* (CFA) and 5 semi-purified CFA fractions (P1, P2, P3, P4, P5) were used to stimulate BALB/c mice spleen cell cultures. The animals were divided into three groups: the first group was infected with 1×10^7 CFU of *N. brasiliensis* in the footpad, the second group was immunized with heat-killed bacteria and the third was injected with sterile saline. IFN- γ , IL-1 α and IL-4 concentrations were determined in culture supernatants. Protein fractions eliciting IFN- γ production in mice, as well as the CFA, were used to stimulate IFN- γ production and *in vitro* cell proliferation assays with peripheral blood mononuclear cells of patients with actinomycetoma by *N. brasiliensis*, individuals with pulmonary tuberculosis, and healthy controls. In mice, CFA and 3 of the protein fractions (P3, P4 and P5) induced significant IFN- γ production in the infected group. In humans, only the CFA induced IFN- γ production and cell proliferation in the group of patients with actinomycetoma. There was no stimulation in tuberculosis patients and healthy controls. These results suggest that culture filtrate antigens are recognized by patients with active actinomycetoma and do not cross-react with *M. tuberculosis* antigens; being therefore potential candidates to develop a diagnostic test.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Bárbara Castro Matteotti

Candidata para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis* QUE INDUCEN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN RATONES BALB/c Y EN HUMANOS.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía:

Datos Personales: Nacida en La Paz, Baja California Sur el 18 de Enero de 1976, hija de Roberto Castro Hirales y Rosalía Matteotti Springa.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Especialidad en Dermatología en 2006; y del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, grado obtenido Médico Cirujano en 2001, con mención honorífica de excelencia, segundo lugar de generación.

Experiencia Profesional: Consulta privada de Dermatología en Monterrey, Nuevo León desde 2006.

APÉNDICE A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

“Identificación de antígenos de filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis*, que inducen la respuesta inmune celular en ratones BALB/c y en humanos”.

Información sobre el estudio

El objetivo de esta investigación es identificar proteínas producidas por *Nocardia brasiliensis*, que sean capaces de despertar la respuesta inmune en personas que tengan antecedente de micetoma causado por esta bacteria; así como en pacientes con tuberculosis y personas sanas como controles negativos.

Procedimiento a realizar

Lo invitamos a participar en este estudio de la siguiente manera:

Donando una muestra de sangre de 12 ml, la cual será extraída de su brazo izquierdo. Esta muestra será procesada, para que podamos analizar si las células sanguíneas producen unas sustancias llamadas citocinas y proliferan al estar en contacto con proteínas excretadas por *N. brasiliensis*; lo cual es una manera de saber si estas proteínas desencadenan la respuesta inmune celular en un individuo.

Todos los resultados obtenidos de esta investigación serán confidenciales. La muestra donada por usted será identificada con una clave y no se revelará su identidad. Tampoco se realizarán estudios adicionales con su muestra.

Es probable, que los resultados obtenidos en este trabajo sean publicados en alguna revista o libro científico; pero en ningún momento serán revelados los datos personales que de usted se obtengan al participar en este estudio. Usted no recibirá ninguna compensación por participar en esta investigación; no tendrá costos adicionales por su participación y su decisión para tomar parte en el estudio es totalmente voluntaria.

Usted tiene la libertad de decidir si acepta participar en esta investigación. Si decide no hacerlo, esto no afectará su atención médica futura en esta institución.

Riesgos posibles

Existen riesgos que se pueden presentar al momento de tomar la muestra de sangre. Puede sentir una molestia o dolor transitorio en el sitio de punción, la cual puede persistir por minutos u horas; de igual manera, puede presentarse equimosis o hematomas en ese sitio. Algunas personas experimentan mareo o síncope (desmayo) al momento de la punción.

Si usted presenta alguna complicación por el procedimiento realizado, tendrá derecho a que se le brinde la atención médica requerida sin costo alguno.

Si tiene dudas adicionales relacionadas con esta investigación, puede dirigirse con el investigador principal, la Dra. Bárbara Castro Matteotti, al

teléfono 83-48-14-65 o 83-46-94-00 ext. 198; o en la consulta externa no. 10 del Hospital Universitario, ubicado en Madero y Gonzalitos S/N, col. Mitras Centro en Monterrey, N.L.

Este estudio está registrado en la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado, de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la U.A.N.L.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación en cualquier momento del desarrollo de la misma.

Además, entiendo que estoy en la libertad de retirarme en el momento que desee y si tomo esta decisión no me afectará en la futura atención médica que requiera en el Hospital Universitario.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y en ningún momento se violará mi privacidad.

Nombre del paciente

Firma del paciente

Investigador principal

Firma del investigador

Nombre del testigo 1

Firma del testigo 1

Firma del testigo 2

Firma del testigo 2

Monterrey, N.L. a ____ del mes de _____ de _____

CUESTIONARIO DE ANTECEDENTES DE LOS PACIENTES
PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

“Identificación de antígenos de filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis*, que inducen la respuesta inmune celular en ratones BALB/c y en humanos”.

Clave de Identificación: _____

Edad: _____

Sexo: Masculino / Femenino

Antecedentes personales de enfermedades crónicas o recientes:

Cirugías recientes: _____

Medicamentos de uso crónico: _____

Otros medicamentos que tome actualmente: _____

Antecedentes familiares (diabetes, tuberculosis, micetoma, enfermedades reumatológicas, inmunodeficiencia, otras): _____

Fecha de diagnóstico de micetoma o tuberculosis: _____

Resultados y fecha de estudios confirmatorios: _____

Tratamiento (medicamentos y fecha de inicio): _____

Fecha de aplicación de PPD: _____ Resultado: _____

Fecha de toma de muestra sanguínea: _____

Dra. Bárbara Castro Matteotti
Investigador principal, DERMATOLOGÍA