

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“Caracterización de la Respuesta Inmune Protectora Inducida
en Ratones BALB/c por una Cepa Atenuada de *Nocardia
brasiliensis*”**

Por

Q.C.B. KEVIN ALBERTO FLORES ALDABA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS
Con Orientación en Inmunología Médica**

Mayo 2022

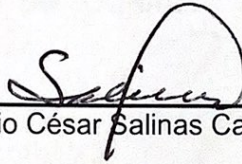
**“Caracterización de la Respuesta Inmune Protectora Inducida
en Ratones BALB/c por una Cepa Atenuada de *Nocardia
brasiliensis*”**

Aprobación de tesis:




Dr. C. Lucio Vera Cabrera

Director



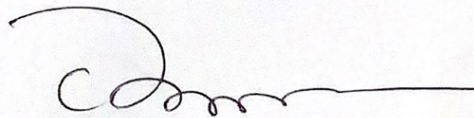
Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Co-Director



Dr. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Miembro de la comisión



Dr. Med Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**“Caracterización de la Respuesta Inmune Protectora Inducida
en Ratones BALB/c por una Cepa Atenuada de *Nocardia
brasiliensis*”**

Aprobación de tesis:

Dr. C. Lucio Vera Cabrera

Director

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Co-Director

Dr. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Miembro de la comisión

Dr. Med Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**“Caracterización de la Respuesta Inmune Protectora Inducida
en Ratones BALB/c por una Cepa Atenuada de *Nocardia
brasiliensis*”**

Presentado por: Kevin Alberto Flores Aldaba

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología humoral y el laboratorio de Inmunología celular del Servicio y Departamento de Inmunología del Hospital Universitario y en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario bajo la dirección del Dr. C. Lucio Vera Cabrera y la co-dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González” con el número de registro: **IN20-00004**. Apoyado por CONACYT proyecto de infraestructura 317294.

Dr. C. Lucio Vera Cabrera

Director de Tesis

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Codirector de Tesis

Dr. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Miembro de la comisión

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Juan Flores y Jaqueline Aldaba que me han apoyado en cada decisión que he tomado en la vida y nunca me han juzgado por el camino que he decidido seguir, gracias por siempre estar ahí para mí.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis amigos Martin, Bequer, Edson, Edwin y Yazmín que siempre estuvieron ahí para mí cuando más lo necesitaba, muchas gracias por su apoyo incondicional. Agradezco también a mi familia por su apoyo incondicional y también a la doctora Velia Vázquez que siempre estuvo ahí en cada experimento para ayudarme. A su vez agradezco al doctor Lucio y al doctor Salinas que fue un gran mentor y siempre me impulsó a dar lo mejor de mí por más difícil que el panorama se veía, me llevo muchas enseñanzas de él que me han hecho una mejor persona tanto en mi vida académica como mi vida personal.

Agradezco también a Melike Özaltan por haberme acompañado en la recta final de este proyecto cuando más estresado y perdido me sentía y estar para mí cuando lo necesité a pesar de la distancia entre nosotros, gracias por darme tu tiempo y querer compartir tu vida conmigo, seni seviyorum.

También un especial agradecimiento a mi amigo y compañero de laboratorio Pablo Espinoza, que trabajo arduamente codo a codo conmigo cada día durante los experimentos y que sin su ayuda este proyecto no hubiese podido ser terminado.

Quiero agradecer a mí mismo, por no rendirme cuando las cosas se veían grises y parecía que no llegaba a ningún lado y también a todas las personas que creyeron en mí, pero especialmente a las que no creyeron.

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El micetoma	1
1.2. Epidemiología	2
1.3. <i>Nocardia brasiliensis</i>	3
1.4. Respuesta inmune contra <i>N. brasiliensis</i>	4
1.4.1 Respuesta celular	4
1.4.2 Respuesta humoral.....	6
1.5 Antecedentes	8
1.6 Justificación	10
1.7 Hipótesis	11
1.8 Objetivo general.....	12
1.9 Objetivos específicos	12
2 METODOLOGÍA	13
2.1 Cultivo bacteriano	13
2.2 Preparación del inóculo	13
2.3 Infección experimental	14
2.4 Evaluación del tamaño de la lesión.....	16
2.5 Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo	16
2.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos del isotipo IgG por medio de ELISA.....	22

2.6.1	Obtención de un extracto de proteínas a partir de la cepa parental	22
2.6.2	Cuantificación de anticuerpos IgG.....	26
3	RESULTADOS.....	28
3.1	Evaluación del desarrollo de la enfermedad en los ratones infectados con P0 o P200.	28
3.2	Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T en bazo y cojinete plantar de los ratones infectados.....	31
3.2.1	Análisis de la respuesta inmune celular tras la infección con P0 y P200.....	31
3.2.2	Análisis de la respuesta protectora de linfocitos T tras la infección con P200.....	35
3.3	Análisis de la respuesta inmune humoral: cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG en suero de los ratones infectados.....	43
4	DISCUSIÓN	46
5	CONCLUSIONES	53
6	PERPESCTIVAS.....	54
7	BIBLIOGRAFÍA	55
8	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	62

ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BHI	Caldo infusión cerebro-corazón
BSA	Albumina sérica bovina
BSL	Laboratorio de bioseguridad
FSC	Forward scatter
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
NK	Células asesinas naturales
P0	Cepa parental de <i>N. brasiliensis</i>
P200	Cepa atenuada de <i>N. brasiliensis</i>
PBS	Buffer de sales de fosfato
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PKC	Proteína cinasa C
RPM	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SFB	Suero fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SOD	Super óxido dismutasa
SSC	Side scatter
TCR	Receptor del linfocito T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos contra marcadores de membrana de linfocitos T.

Tabla 2. Anticuerpos contra citocinas producidas por linfocitos T.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Distribución geográfica mundial de los casos de micetoma.
- Figura 2** Esquema de los grupos experimentales y tiempos de toma de muestras.
- Figura 3** Estrategia de selección usada para el análisis de la respuesta inmune.
- Figura 4** Dot plots representativos.
- Figura 5** Gel SDS-PAGE 10% teñido con azul Coomassie.
- Figura 6** Evolución de la inflamación después de infectar con P0 y P200.
- Figura 7** Lesiones representativas a las 10 semanas posterior a la infección con P200 o P0.
- Figura 8** Evolución de las lesiones en los animales inmunizados con P200 y re-infectados a los 90 días con P0
- Figura 9** Respuesta de células Th1 productoras de interferón gama, local (cojinete plantar) y sistémica (bazo) posterior a la infección con P0 o P200.
- Figura 10** Respuesta de células Th2 productoras de IL-4, medidas en forma local o sistémica posterior a la infección con P0 o P200.
- Figura 11** Respuesta de células Th17 productoras de IL-17, medidas en forma local (cojinete plantar) o sistémica (bazo) posterior a la infección con P0 o P200.
- Figura 12** Respuesta de células Tregs productoras de IL-10 medidas en forma local (cojinete plantar) o sistémica (bazo) posterior a la infección con P0 o P200.
- Figura 13** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Th1).
- Figura 14** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Th1).
- Figura 15** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Th2).
- Figura 16** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Th2).
- Figura 17** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Th17).
- Figura 18** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Th17).
- Figura 19** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Treg).
- Figura 20** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (Treg).
- Figura 21** Respuesta humoral del isotipo IgG en los ratones infectados con P0 o P200.
- Figura 22** Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0 (IgG).
- Figura 23** Diferenciación de células T cooperadoras vírgenes a los diferentes tipos de subpoblaciones.

Q.C.B. Kevin Alberto Flores Aldaba Fecha de titulación: Mayo 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del trabajo: “Caracterización de la Respuesta Inmune Protectora Inducida en Ratones BALB/c por una Cepa Atenuada de *Nocardia brasiliensis*”

Número de páginas:

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

Área de Estudio: Inmunología Médica.

Resumen: El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica subcutánea, de carácter inflamatorio, indoloro, deformante y destructivo; es producida mediante inoculación traumática en el tejido subcutáneo con material contaminado por microorganismos. En México, *Nocardia brasiliensis* produce más del 65% de los casos.

Objetivo: Caracterizar la respuesta inmune protectora inducida en ratones BALB/c por una cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis*.

Resultados: No se observaron grandes diferencias en la respuesta Th1 pero si en la tipo Th2 posterior a la infección con cada una de las cepas, por lo cual no se vio reflejado en la concentración de anticuerpos ya que en ambos grupos experimentales se encontraron cinéticas similares. Los ratones re-infectados con la cepa P0 desarrollaron una potente respuesta de IgG. A su vez, la mayor diferencia fue en la respuesta de tipo Th17 y de Tregs en la fase crónica del grupo control, del P200 y el grupo que fue infectado con ambas cepas.

Conclusión: La respuesta Th1 no parecer ser la clave de la resolución como se proponía en la hipótesis, aunque si está presente y es probable que esté actuando como efector. Por otro lado, la respuesta mediada por IL-10 e IL-17 parecen ser fundamentales para el curso de la patología.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El micetoma.

El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica, no contagiosa, inflamatoria, progresiva y destructiva que afecta principalmente a la piel y el tejido subcutáneo, pero puede llegar a extenderse a otros tejidos como músculos, huesos y a los órganos subyacentes¹. La infección inicia después de que el patógeno alcanza el tejido subcutáneo a través de heridas en la piel después de un traumatismo accidental con un objeto contaminado. El agente etiológico de esta patología puede ser tanto una bacteria (actinomicetoma) o un hongo (eumicetoma)^{1,2}. La infección se presenta principalmente en las extremidades, siendo las inferiores las más frecuentemente afectadas, aunque también pueden encontrarse en manos, brazos, cabeza, espalda y glúteos³.

Esta patología se caracteriza por ser de naturaleza indolora, provocar tumefacción y la formación de múltiples microabscesos generados por la acumulación de polimorfonucleares, macrófagos y posteriormente linfocitos alrededor de las bacterias para impedir su diseminación, pero no las elimina, además, se presenta la descarga de secreciones purulentas que contiene gránulos en el sitio afectado. Así, el micetoma puede causar la pérdida de la función del miembro afectado, deformación y en algunos casos puede ser difícil de tratar y llegar a ser fatal^{1,4}.

El diagnóstico se confirma identificando al agente etiológico por observación microscópica, análisis histopatológico de la lesión y el aislamiento mediante cultivo; asimismo, se utilizan imágenes de rayos X del sitio afectado para determinar si la lesión está localizada o se ha propagado al tejido subyacente². El tratamiento depende de diversos factores como el agente etiológico, el grado de avance del proceso, y las condiciones del paciente. Se sabe que el actinomicetoma es más sensible a tratamientos, lo que hace que la recuperación sea más rápida, aunque algunos pacientes no muestran respuesta a la terapéutica convencional en las fases más tardías, por lo que se suele recurrir a la cirugía⁵.

1.2. Epidemiología.

Es una enfermedad endémica de regiones tropicales y subtropicales, principalmente en países ubicados entre las latitudes 15°S y 30°N popularmente llamado como cinturón del micetoma, como lo son México, Venezuela, Argentina, Sudán, Somalia, India, entre otros^{1,3,5}.

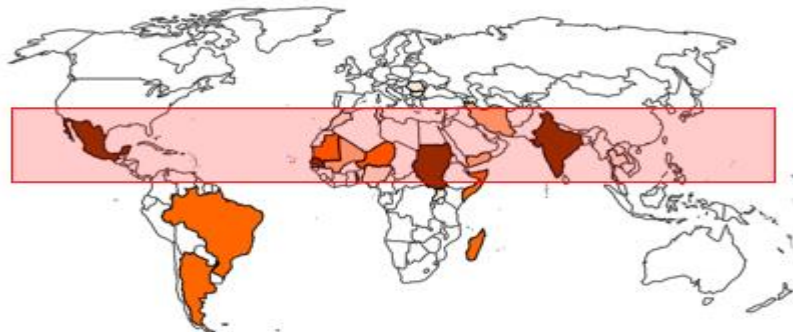


Figura 1. Distribucion geografica mundial de los casos de micetoma. Países donde el micetoma es considerada una enfermedad endémica³.

En países del continente americano son más frecuentes los casos de actinomicetoma mientras que en África predomina el eumicetoma^{4,6}. En un estudio realizado con datos de casos a nivel mundial la mayoría de estos corresponden a actinomicetos siendo un 50% y los casos de eumicetoma un 40% mientras que el resto son de etiología desconocida³.

En México, esta es una enfermedad relevante debido a la cantidad de casos reportados. Afecta exclusivamente a habitantes de zonas rurales como campesinos y amas de casa de esas regiones donde la mayoría de estos casos se presentaron en hombres guardando una relación de 3:1 con respecto a los casos en mujeres. Dentro del territorio nacional los estados más afectados fueron Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero y Veracruz, El 96% de los casos reportados en México son de actinomicetoma, de los cuales, el agente etiológico más frecuentemente aislado es *Nocardia brasiliensis*, con una frecuencia del 65.5% de todos los casos reportados⁷.

1.3. *Nocardia brasiliensis*.

Nocardia brasiliensis es un actinomiceto saprófito e inmóvil que habita en el suelo, tiene un metabolismo aerobio y es positivo a la tinción de Gram y de Kinyoun. Esta bacteria produce largos filamentos en agar sólido como el agar BHI especialmente luego de 3-4 días de cultivo⁸. Dentro de los componentes de su pared celular se encuentran ácidos micólicos como los que se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis* esto porque al igual que esta bacteria pertenece al orden de *Corynebacterineae* y pose una pared celular de tipo IV, esta pared celular está compuesta de ácidos grasos, carbohidratos como la galactosa y

arabinosa, además de ácidos micólicos, ácido murámico, melaquinonas y ácidos tubérculo-esteáricos^{5,9}.

Al ser una bacteria intracelular, tiene la capacidad de sobrevivir a los mecanismos efectores del sistema inmune ya que puede resistir la muerte intracelular en los fagocitos y consecuentemente multiplicarse dentro de ellos, lo anterior se debe a que estas bacterias poseen diversas proteasas, catalasas y super óxido dismutasas^{8,10,11}.

1.4. Respuesta inmune contra *N. brasiliensis*.

1.4.1 Respuesta celular.

La respuesta inmune en contra de *Nocardia* ha sido estudiada desde tiempo atrás en modelos experimentales en animales principalmente en *Nocardia asteroides* y posteriormente en *Nocardia brasiliensis*, uno de los primeros estudios que se realizaron demostró la importancia y el impacto que la respuesta inmune celular tiene durante el proceso infeccioso, se determinó que los linfocitos T son un componente esencial en la resistencia a la infección en ratones infectados con *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, esto debido que al infectar ratones que carecían de timo estos sufrieron una infección diseminada teniendo una mortalidad del 100%, lo que no ocurrió con ratones de la misma cepa que si tenían el timo, además que los ratones sin timo no desarrollaban el granuloma, así que los linfocitos T juegan un papel central en el desarrollo de los granulomas¹², lo anterior también fue confirmado por Beaman y su equipo de trabajo ya que al transferir células T previamente sensibilizadas a ratones que

carecían de timo tuvieron una mayor tasa de supervivencia a la infección por *N. asteroides*¹³. En la infección por *Nocardia brasiliensis* se puede observar un gran infiltrado de neutrófilos los cuales llegan al sitio de infección y forman el granuloma posterior a la inoculación, sin embargo, en estudios en *N. asteroides* se ha observado que estos polimorfonucleares no son capaces de eliminar a la bacteria a pesar de que poseer sus funciones microbicidas normales¹⁴, lo anterior se atribuye a la catalasa y super óxido dismutasa que la bacteria posee, ya que en cuando estas enzimas están presentes en altas concentraciones los neutrófilos pierden la capacidad de eliminarla, sin embargo, cuando estas bacterias se tratan primero con anticuerpos anti-SOD y posteriormente expuestas a los fagocitos, estos ahora son capaz de destruir a las bacterias^{10,11}.

En un modelo de actinomicetoma experimental de infección con *N. brasiliensis* en ratones BALB/c se encontró una elevada proliferación de linfocitos en bazo y ganglios linfáticos además que las citocinas de la respuesta Th1 y Th2 están involucradas en la respuesta inmune sistémica contra la infección, ya que fue detectado el aumento en la concentración sérica de estas citocinas en los ratones durante el curso de la infección¹⁵.

Por otro lado, en el mismo modelo experimental, se ha descrito que la respuesta inmune local difiere de lo encontrado a nivel sistémico. Se ha observado que, aunque de forma temprana en el área de la inflamación y los microabscesos hay producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-6 cuyas funciones son principalmente protectoras, se mantiene un microambiente inmunosupresor en el área afectada durante el todo el curso de

la infección (etapa aguda y crónica). Este consiste en un aumento de células T reguladoras, y citocinas, tales como la IL-10, IL-13 y TGF- β , que suprimen la respuesta inmune efectora lo que correlaciona positivamente con la severidad de la inflamación y la carga bacteriana^{4,16-18}. La evidencia anterior sugiere que *N. brasiliensis* tiene la capacidad de modular la respuesta inmune a su favor de forma local, modulándola mediante diversos mecanismos, lo que es un importante factor para su supervivencia y multiplicación con el fin de establecer la enfermedad crónica¹⁹.

En biopsias humanas de pacientes con actinomicetoma también han sido comprobada la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ y han sido también asociados con la prevención de la diseminación de la infección, aunque no son capaces de resolver la infección local²⁰.

1.4.2 Respuesta humoral.

La respuesta inmune humoral en contra de *N. brasiliensis* ha sido estudiada en humanos infectados, colectando su suero y usando un extracto crudo de proteínas de la bacteria para determinar los antígenos inmunodominantes de este patógeno esto con el fin de poder desarrollar una prueba diagnóstica de fácil acceso, rápida y específica, a partir de esto se sabe que la bacteria es capaz de producir una respuesta de anticuerpos^{21,22}. Altos títulos de anticuerpos con la misma especificidad que los encontrados en el suero de pacientes con actinomicetoma fueron encontrados en el modelo experimental en ratones BALB/c desarrollado por el equipo del doctor Salinas, demostrando así, que la respuesta de estos roedores es similar a la del humano¹⁵.

Además, el grupo del doctor Salinas ha demostrado que, aunque comúnmente no se atribuye a la respuesta humoral como efectiva en las infecciones contra bacterias intracelulares que en el caso de *N. brasiliensis* esta puede tener un papel importante en la protección ante esta infección, ya que la transferencia de anticuerpos monoclonales del isotipo IgM en ratones previa a la infección experimental mostró conferir protección completa, sin embargo, al transferir anticuerpos monoclonales IgG estos no conferían protección y al contrario exacerbaban las lesiones, resaltando así la importancia de la respuesta de anticuerpos en el actinomicetoma^{23,24}.

1.5. Antecedentes.

La atenuación de diversos microorganismos ha sido usada a través de la historia, este se trata de un proceso de cambios genéticos que conduce a una pérdida de virulencia de los microorganismos patógenos pero que conserva la capacidad de inducir una respuesta inmune en huéspedes susceptibles siendo su principal y más importante uso en la producción de vacunas²⁵, como ejemplo se encuentra el bacilo de Calmette y Guérin, una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuado por 230 subcultivos usado en diversos países como México para prevenir la meningitis tuberculosa y tuberculosis diseminada^{26,27}.

Para lograr la atenuación existen diversos métodos que pueden ser utilizados y se han desarrollado a lo largo de los años, como lo son:

- Subcultivo (*Mycobacterium bovis* BCG).
- Mutagénesis química (*Salmonella enterica* Ty21a).
- Deleción de genes esenciales para la virulencia o regulación.

En el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica el equipo del doctor Vera-Cabrera subcultivó una cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 130 veces, la cual al ser inoculada en ratones BALB/c producía la inflamación aguda, sin embargo, no producía la infamación crónica respecto al grupo infectado con la cepa parental, e interesantemente, los ratones que habían sido inoculados con cepa parcialmente atenuada y eran posteriormente inoculados con la cepa parental, desarrollaban lesiones menos intensas que el grupo control

solo infectado con la cepa sin subcultivar e inclusive algunos eran capaces de resolver la infección²⁸.

Posterior a este estudio, el mismo grupo de trabajo puso a prueba una cepa de *N. brasiliensis* subcultivada 200 veces a la que llamaron P200 y se dieron a la tarea de indagar con mayor profundidad, encontrando que esta bacteria solo era capaz de producir la inflamación aguda pero con el tiempo todos los ratones se recuperaban en su totalidad, a diferencia de los infectados con la cepa parental, así también, se observó que la protección que esta bacteria otorgaba ante una infección secundaria con la cepa parental era una protección completa ya que los ratones eran capaces de resolver la infección en su totalidad. Esta cepa P200, también presento algunos cambios fenotípicos como su forma de crecimiento en caldo (como una suspensión y no como agregados), la pérdida total de su ácido-alcohol resistencia, la pérdida de la expresión de algunas proteínas cuando se analizó por SDS-PAGE bidimensional e inclusive cambios en su genoma completo. En este último análisis P200 presentó la pérdida de 17 regiones del genoma que afectan a 213 genes, 16 SNPs y 12 duplicaciones de secuencias cortas de nucleótidos^{29,30}.

Aunque las características anteriores de esta cepa son conocidas, aún no conocemos como es la respuesta inmune que esta *N. brasiliensis* P200 induce tras su inoculación, ni se ha caracterizado la inmunidad protectora que confiere, por lo que en este estudio nos avocamos a su análisis.

1.6. Justificación

Es importante conocer la fisiopatogenia del micetoma por *N. brasiliensis* para identificar estrategias terapéuticas efectivas contra la enfermedad. Por ello es importante identificar los efectores de la respuesta inmune responsables de la resolución de la infección.

1.7. Hipótesis

En los ratones BALB/c infectados con una cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis* predomina una respuesta celular Th1 y existe una mejor respuesta humoral que los infectados con la cepa parental.

1.8. Objetivo general

Caracterizar la respuesta inmune protectora inducida en ratones BALB/c por la cepa atenuada *Nocardia brasiliensis* P200.

1.9 Objetivos específicos

1. Evaluar el desarrollo natural de la enfermedad en ratones infectados con cada una de estas cepas.
2. Analizar las subpoblaciones de linfocitos T en bazo y cojinete plantar de los ratones infectados.
3. Determinar los niveles de anticuerpos IgG en suero de los ratones infectados en ambos grupos.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Cultivo bacteriano.

Tanto la cepa parental de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (pasaje 0, obtenida de una lesión) como la cepa atenuada (pasaje 200, obtenida a través de subcultivos) congeladas a -80°C se inocularon en botella con agar Sabouraud el cual fue incubado de 48 a 72 horas a 37°C hasta observar colonias blancas, las cuales se resembraron en un matraz Erlenmeyer con caldo BHI e incubarlo por 48 horas en agitación (110 rpm) a 37°C. Pasado el periodo de incubación y observar el crecimiento, el contenido del matraz se vertió en un tubo de 50mL, y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. La masa celular obtenida tras la centrifugación fue resuspendida en 2 mL de caldo BHI para luego ser transferido a más matraces que de igual manera contenían caldo BHI para luego ser incubadas de la misma manera que los caldos anteriores, esto con el objetivo de obtener más masa bacteriana de cada una de las cepas.

2.2. Preparación del inóculo.

Una vez obtenido suficiente masa bacteriana de cada una de las cepas a estudiar, se preparó el inóculo para la infección de la siguiente manera³¹:

1. Los cultivos de los matraces con caldo BHI fueron vertidos en tubos de 50mL los cuales fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos para obtener un botón celular.

-
2. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 5mL de agua estéril con el fin de lavar la masa bacteriana, este paso fue repetido dos veces más.
 3. Una vez se hicieron los lavados, fue resuspendido cada botón celular con 3-5mL de agua estéril, esta suspensión obtenida de cada matraz fue macerada con un potter de cristal estéril y después recolectada en un solo tubo de 50 mL el cual había sido pesado con anterioridad.
 4. Ya en el tubo pesado con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible se hicieron las siguientes centrifugaciones en el orden que se indica desechando el líquido sobrenadante después de cada una:
 - a. 100 rpm por 10 minutos.
 - b. 100 rpm por 10 minutos.
 - c. 3500 rpm por 20 minutos.
 5. Después de eliminar el sobrenadante, el tubo se pesó nuevamente pero ahora con la masa bacteriana para así obtener el peso de esta al sustraer el peso inicial del tubo.
 6. Al obtener el peso de la masa bacteriana esta fue resuspendida en la cantidad requerida de solución salina para obtener una concentración de 20mg por cada 50 μ L.

2.3. Infección experimental.

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 10 semanas de edad que se mantuvieron bajo condiciones BSL2 en el IMSS Centro De Investigación Biomédica Del Noreste a cargo del Dr. Javier Vargas Villarreal. Se les

proporcionó alimento comercial LabDiet, la cual contiene una composición bromatológica ideal para alimento de roedores de laboratorio y agua estéril ad libitum. Los animales se observaron diariamente y la iluminación será 12/12 controlada con temporizador, de acuerdo con la norma NOM-062-ZOO-1999.

Los ratones fueron infectados con 50µL del inóculo previamente preparado en el cojinete plantar utilizando jeringas de 1mL, se evaluaron 3 grupos con 30 ratones cada uno:

- Grupo infectado con la cepa parental.
- Grupo infectado con la cepa atenuada.
- Grupo infectado con la cepa atenuada y 90 días después re-infectados con la cepa parental en el cojinete plantar contra-lateral.

Estos grupos fueron evaluados en los tiempos que se observan en el siguiente esquema, dichos tiempos en donde se obtuvieron las muestras de tejido o sangre para llevar a cabo cada análisis ($n=5$ por cada tiempo).

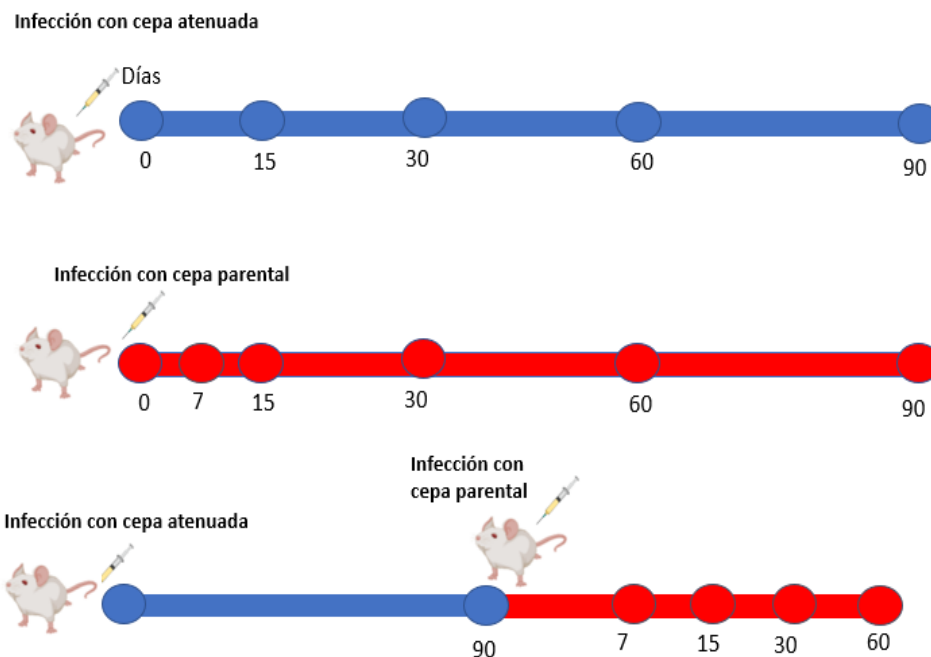


Figura 2. Esquema de los grupos experimentales y tiempos de toma de muestras.

2.4. Evaluación del tamaño de la lesión.

La inflamación observada en el cojinete plantar fue medida mediante un vernier cada 7 días desde el inicio del estudio hasta que este culminó. Para obtener el volumen del cojinete plantar en cada semana se utilizó la ecuación elipsoidea (ancho x alto x altura) multiplicando el producto por el factor 0.5235999.

2.5 Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo

Se tomó una muestra de sangre de los ratones de cada grupo en los tiempos ya mencionados a través del seno retro-orbital (aproximadamente 0.5mL) la cual se colectó en tubos de 1.7mL se dejaron coagular por una hora y se centrifugaron a 4°C por 10 minutos para separar el suero del coagulo y se almacenó a -80°C (estas muestras serán utilizadas para la cuantificación de

anticuerpos), posteriormente los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical, una vez esto, se obtuvo de manera aséptica y con material estéril el bazo y en el cojinete plantar infectado. Para el caso del bazo este fue disgregado en PBS 1X para obtener una suspensión y posteriormente esta se pasó por un colador celular con diámetro de 70 μ m (Falcon #352350), y así obtener una suspensión unicelular. En el caso del cojinete plantar infectado de cada grupo, primero se digirieron utilizando colagenasa (SIGMA #C7657-100MG) durante 30 minutos a 37°C a una concentración de 0.5 mg/mL (3mL por cada cojinete plantar). Una vez pasada esta incubación el cojinete plantar fue disgregado para después pasarse por un colador celular como el mencionado anteriormente, estas suspensiones celulares se resuspendieron en 5mL (bazo) y 1mL (cojinete plantar) de medio de cultivo RPMI y se contaron en una cámara de Neubauer. Posterior al conteo se colocaron las células en placas de 12 pocillos, cada pocillo contenía 500,000 células y se suspendieron en medio RPMI-1640 (GIBCO) adicionado con SFB (GIBCO), L-glutamina 2mM y penicilina con estreptomicina 1X posteriormente se agregó Brefeldina A 2 μ g/mL del kit Cytofix/Cytoperm w/golgiplug (BD #555028) y PMA 20 ng/mL + Ionomicina 1 μ g/mL (SIGMA #I0634-1MG) con el objetivo de estimular la secreción de citocinas, estos últimos con el fin de bloquear la secreción de proteínas y estimular la secreción de citocinas para así poder detectar las moléculas de interés de manera, así, se colocó 1mL del medio por pocillo. Las placas fueron posteriormente a la incubadora donde por 4 horas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Al término de la incubación, las células fueron colocadas en tubos para citometría (Falcon) y se lavaron dos veces con PBS 1X/BSA 0.5% estéril

centrifugando a 1300 rpm por 5 minutos a 4°C y descartando el sobrenadante. Una vez hecho esto se siguió el siguiente protocolo de tinción con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluoroforo	Número de catálogo (BD)
Anti-CD3	APC-CY7	560590
Anti-CD4	PACIFIC BLUE	558107

Tabla 1. Anticuerpos contra marcadores de membrana de linfocitos T.

Anticuerpo	Fluoroforo	Número de catálogo (BD)
Anti-IFN- γ	ALEXA FLUOR 700	557998
Anti-IL-4	APC	554436
Anti-IL-10	PE	554467
Anti-IL-17A	PERCP-CY5.5	560666

Tabla 2. Anticuerpos contra citocinas producidas por linfocitos T.

Tinción extracelular

- Se agregaron 40 μ L de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 diluidos 1:100 en PBS 1X/BSA 0.5%.
- Fueron incubadas las células por 30 minutos a 4°C en oscuridad.
- Se realizaron 2 lavados con 1mL de PBS 1X/BSA 0.5% de la misma manera mencionada anteriormente.

Tinción intracelular

- Utilizando el kit Cytofix/Cytoperm w/golgiplug (BD #555028), se agregaron 250 μ L de Fixation/Permeabilization solution e incubaron por 20 minutos a 4°C.

-
- Se lavaron dos veces con 0.5mL 1X BD Perm/Wash buffer.
 - Se agregaron 40µL de anticuerpos anti-IL-4, IL-10, IL-17A e IFN-γ diluidos 1:100 en PBS 1X/BSA 0.5%.
 - Fueron incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad.
 - Se lavaron dos veces con 0.5mL 1X BD Perm/Wash buffer.
 - Y el botón celular se resuspendió en 500 µL de PBS 1X/BSA 0.5% y se almacenaron a 4°C en la oscuridad.
 - A la mañana siguiente (aproximadamente 10 horas posterior a la tinción) las muestras fueron inyectadas en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD) adquiriendo 10,000 eventos CD3+ y CD4+ por tubo para posteriormente analizarse los datos con el software FlowJo v10.7.1.(BD, New Jersey)

Nota: Previo al análisis de las muestras se estandarizó el panel de los diferentes marcadores fluorescentes utilizando controles FMO (fluorescencia menos uno) por cada marcador y controles sin teñir para así hacer la compensación.

Para estudiar la respuesta de las células T y determinar qué tipo de respuesta predomina en cada una y los cambios que existen entre la infección con cada cepa se analizaron la respuesta Th1, Th2, Th17 y Treg por medio de las moléculas que predominan en cada una de estas, IFN-γ, IL-4, IL-17 e IL-10 respectivamente, para esto se hizo uso de una estrategia de selección que se muestra en la figura 3. Brevemente, primero se determinaron los eventos singulares y de ahí fueron tomados estos eventos para seleccionar el grupo que corresponde a las células linfoides por complejidad y tamaño haciendo uso del SSC y FSC, respectivamente, posterior a esto se seleccionó solo a las células T

excluyendo a las células B y NK por medio de su positividad del marcador CD3, estas células después se tomaron y solo se seleccionaron las células CD4 positivas que corresponden a las células T cooperadoras y finalmente de ese último grupo de células se analizó su positividad para las citocinas de cada una de las respuestas analizadas. Cabe mencionar que como se ha descrito, se hizo uso del PMA y de la ionomicina con el fin de producir una activación independiente del TCR y estimular así la secreción de citocinas por medio de la activación de diversas vías de señalización como la vía de señalización de la PKC y así hacer evidente el patrón de citocinas que es secretado por cada grupo experimental³² (figuras 3 y 4).

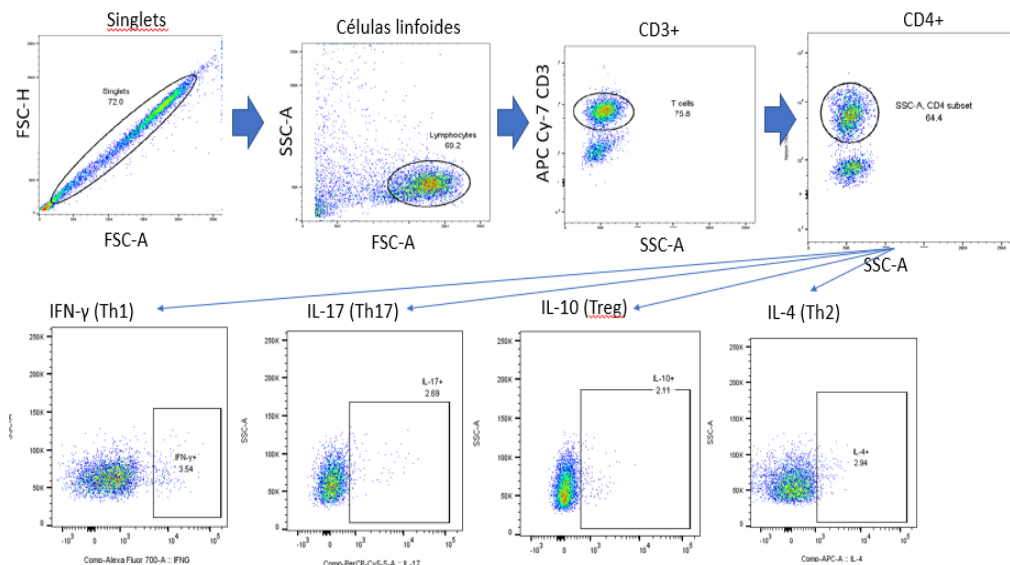
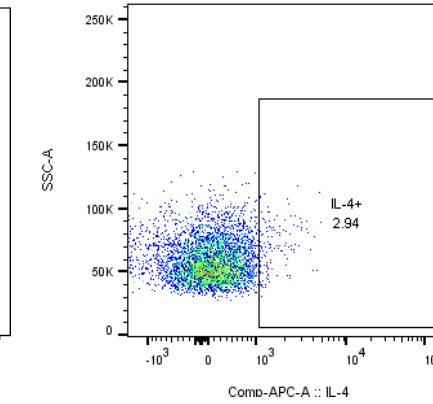
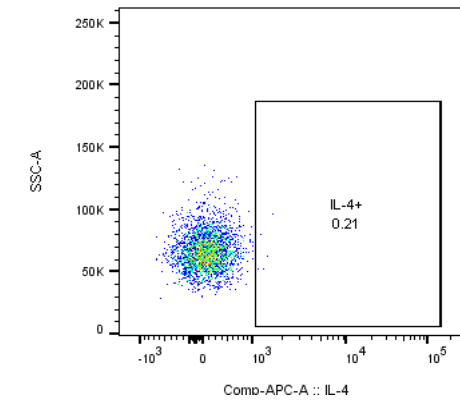
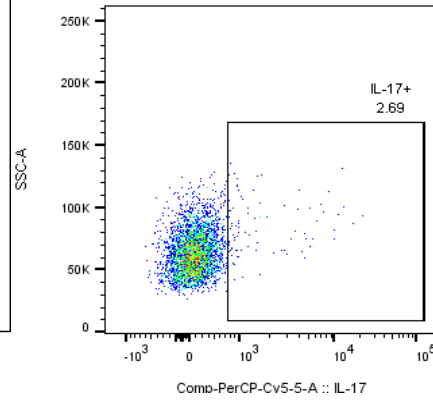
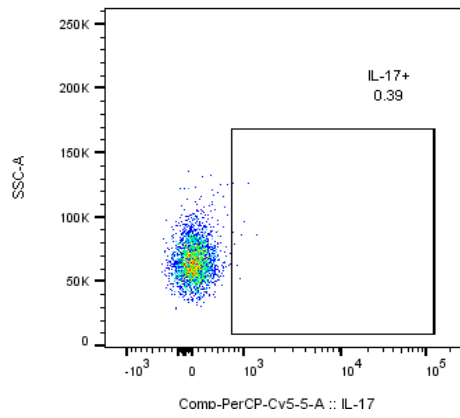
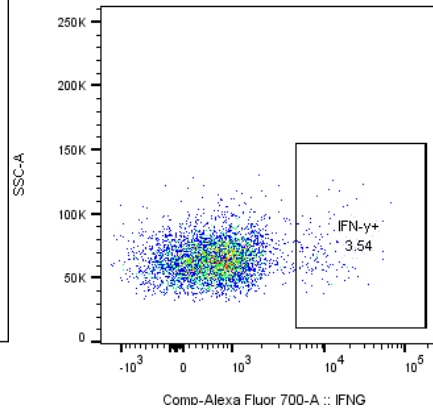
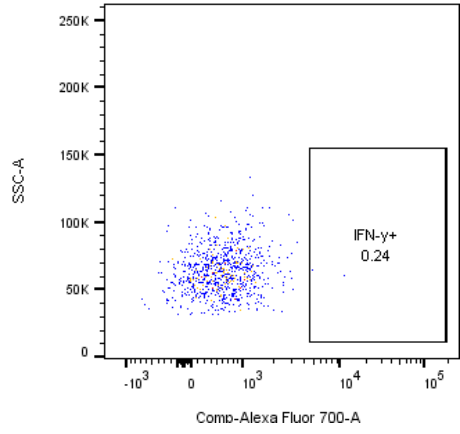


Figura 3. Estrategia de selección usada para el análisis de la respuesta inmune.



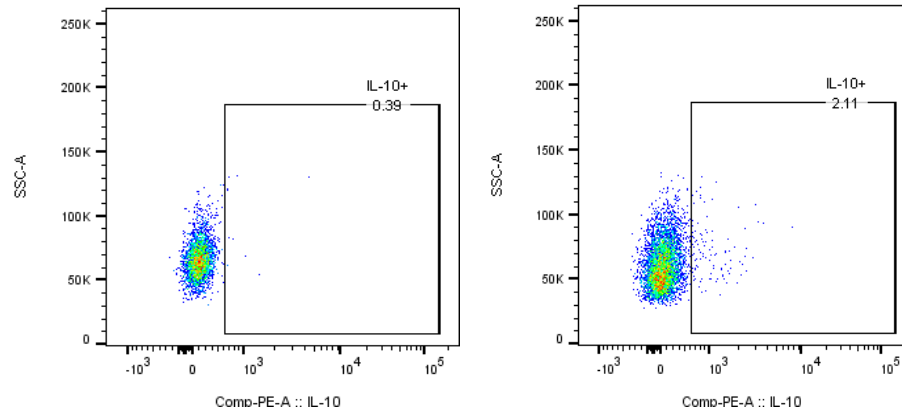


Figura 4. Dot plots representativos. Células previamente agregado el estímulo (izquierda) del PMA y ionomicina y posterior al estímulo con estas moléculas (derecha).

2.6. Evaluación de la respuesta de anticuerpos del isotipo IgG por medio de ELISA.

2.6.1 Obtención de un extracto de proteínas a partir de la cepa parental.

Para el desarrollo de una prueba ELISA en la que se pueda visualizar la cinética de anticuerpo IgG generados contra antígenos de *N. brasiliensis* se requirió de la obtención de un extracto crudo de proteínas las cuales puedan adherirse al fondo de la placa para que en contacto de suero de ratones infectados estos puedan unirse a los antígenos inmunodominantes y se obtenga una señal que será proporcional al concentración de anticuerpos en la muestra, este extracto de proteínas se obtuvo de la siguiente manera:

- Se cultivo la cepa parental de *N. brasiliensis* (P0) de la misma manera en la que se describe en la preparación del inóculo, la

bacteria fue aislada de una lesión, y de igual forma se expandió con el fin de obtener suficiente masa bacteriana.

- Esta masa fue colectada en un tubo de 50mL donde se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm a 4°C y se descartó el medio sobrenadante.
- Se procedió a hacer 5 lavados con agua estéril centrifugando de la misma manera.
- Una vez lavada la bacteria y con el fin de retirar los lípidos de la masa bacteriana se vertió en un vaso de precipitado en que había sido pesado anteriormente, y se agregó 30mL de éter anhidro y etanol (50:50) y se dejó agitación por 1 hora.
- Después de este tiempo se retiró la mezcla de solventes y se agregó la misma mezcla, pero en proporción 70:30 y se extrajo por una hora.
- Luego de lo anterior se hizo una última extracción con éter anhidro al 100% durante 1 hora y después se retiró el solvente y se dejó evaporar durante toda la noche.
- Una vez con la masa deslipidizada y seca se pesó el vaso con lo obtenido y se calculó el peso de la bacteria sustrayendo a este peso el peso del vaso sin la bacteria obtenido previamente.
- Esta masa se reconstituyó con un buffer de lisis estéril con la siguiente composición: Tris-HCl 50mM, EDTA10mM, NaCl 100mM, pH=8.1 ajustado con NaOH y diluido en agua. Esto a manera de

que la concentración fuera de 400mg de bacteria por cada mL de buffer de lisis.

- Una vez teniendo la bacteria suspendida en este buffer se agregó a tubos (1.5 mL por tubo) para lisis con matriz B (MP) que contiene perlas de sílica de 0.1mm los cuales se colocaron en el equipo FastPrep (MP) en donde se hicieron 5 ciclos de 60 segundos a 6 m/s con reposo de 2 minutos en hielo entre cada ciclo con el fin de lisar la bacteria.
- Al final los tubos se centrifugaron a 13300 rpm por 8 minutos a 4°C.
- Después de lo anterior se colectó el sobrenadante y este fue filtrado con filtros de 0.45µm de poro y se colocó en un vial para su posterior liofilización.
- Este extracto fue llevado a congelarse a -80°C en el ultracongelador.
- Al día siguiente, pasadas al menos 12 horas este extracto se le dio una congelación rápida en baño de acetona con hielo seco para liofilizarse durante 12 horas, el resultado se almacenó a 4°C y luego se reconstituyó en 1mL de agua estéril y se hicieron alícuotas.

Una vez ya obtenido el extracto a este se le determinó su concentración de proteínas con el método de Bradford y se evaluó su calidad por medio de una electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (gel concentrador 5%, gel separador 10%) usando el protocolo estándar indicado por BioRad <https://www.bio->

rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf) cargando 15µg del extracto por pocillo con buffer de carga con β-mercaptoetanol y se corrió a 80 voltios en el gel separador y a 120 voltios una vez en el gel separador para después ser teñido con azul de Coomassie por 20 minutos y desteñido con solución desteñidora que consiste de metanol:agua:ácido acético glacial (50:40:10).

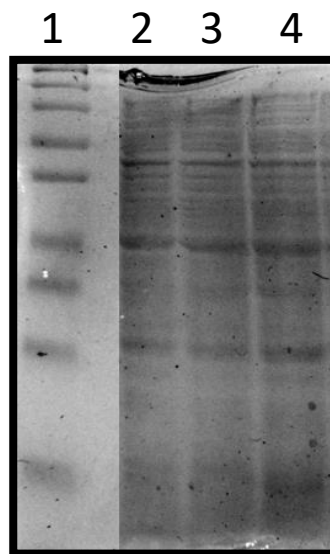


Figura 5. Gel SDS-PAGE 10% teñido con azul Coomassie. Carril 1: Marcadores de peso moleculares; Carril 2: extracto proteico 20 µg; Carril 3: extracto proteico 20 µg Carril 4: extracto proteico 20 µg;

2.6.2 Cuantificación de anticuerpos IgG.

Con el fin de hacer una cuantificación de la concentración de anticuerpos de isotipo IgG posterior a la infección en los grupos de estudios se elaboró una ELISA usando el extracto de proteínas de la bacteria anteriormente obtenido y se realizó de la forma que se describe a continuación:

- Se usaron placas de 96 pocillos (Corning Costar 96-well serocluster microplates 3795) en donde se colocó 0.5µg del extracto por pocillo disueltos en 200µL en un buffer de acetatos con pH de 5 y se incubó por 18 horas a 4°C¹⁵.
- Pasada la incubación, el contenido se decantó y se hicieron 3 lavados con 200µL PBS 1X/Tween 20 0.1%.
- Se realizó un bloqueo con leche descremada al 5% por 30 minutos.
- De nueva cuenta el contenido se decantó y se hicieron 3 lavados con 200µL PBS 1X/Tween 20 0.1%.
- Posterior a esto se agregaron 200µL de los sueros de los ratones infectados diluidos 1:100 en PBS 1X/leche descremada 1.5% y Tween 20 al 0.1% (cada suero por triplicado) y se incubó a 37°C por una hora.
- Se decantó y se hicieron 3 lavados con 200µL PBS 1X/Tween 20 0.1%.
- Se incubó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch #315-035-045) diluido 1:5000 en

PBS 1X/Tween 20 0.1% y leche descremada al 1.5% agregando 200µl por pocillo y se incubó por 1 hora a 37°C.

- Se decantó y se hicieron 3 lavados con 200µL PBS 1X/Tween 20 0.1%.
- El revelado se llevó a cabo con OPD del kit SIGMAFAST OPD (Sigma #P9187) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se colocaron 150 µl de solución a cada pocillo y se incubó por 30 minutos en oscuridad.
- Se agregó ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1N, stopping solution R10, Jackson 862211) para detener la reacción.
- Las placas fueron colocadas en un lector de microplacas para ser leídas a una absorbancia de 450nm y los resultados se capturaron.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Evaluación del desarrollo de la enfermedad en los ratones infectados con P0 o P200.

Posterior a la inoculación con la cepa P0 y P200 se evaluó la inflamación de la lesión midiendo el cojinete plantar infectado de los ratones cada 7 días y el volumen de estas lesiones se graficó, como se observa en la figura 6; después de una semana de la inoculación con cualquiera de las dos cepas hubo una inflamación aguda, sin embargo, en el grupo infectado con la cepa P200 esta disminuyó en las siguientes semanas hasta volver a las medidas basales previo a la infección. En el grupo infectado con P0, la inflamación también disminuyó hasta la semana 5 hasta que en la semana 6 la inflamación comenzó a aumentar drásticamente hasta tener diferencias estadísticamente significativas desde la semana 8 hasta la semana 12 (figuras 6 y 7), logrando evidenciar que la bacteria P200 en efecto es incapaz de producir la fase crónica de la enfermedad.

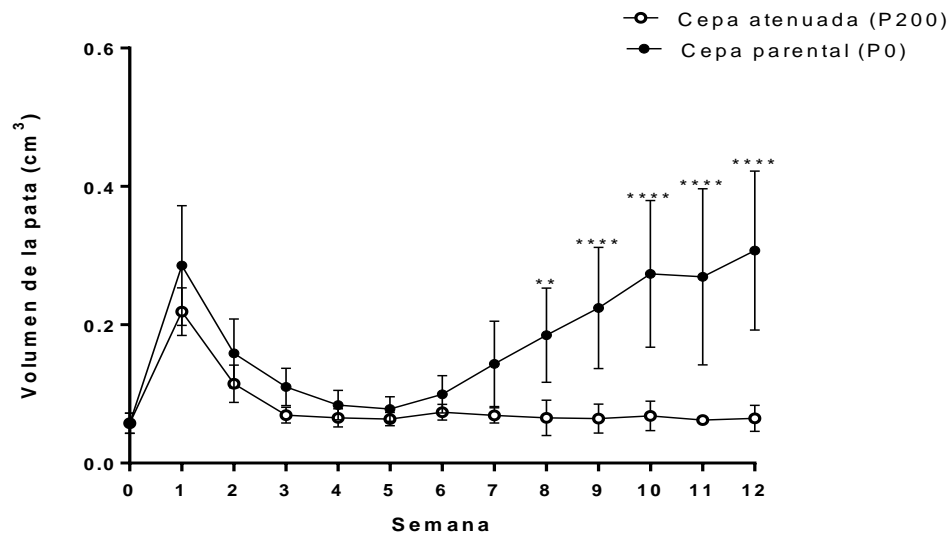


Figura 6. Evolución de la inflamación después de infectar con P0 (círculos abiertos) y P200 (círculos cerrados). Cada punto representa la media del volumen del cojinete plantar de 5 ratones. Los asteriscos denotan significancia estadística. Los dos grupos fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, a un nivel de significancia $p < 0.05$.

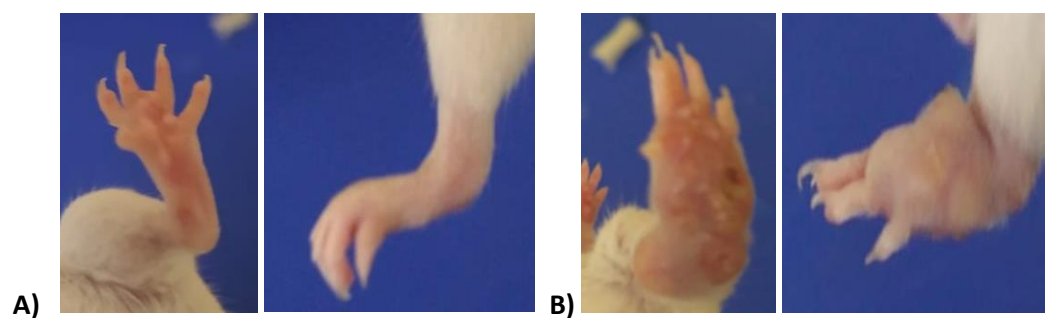


Figura 7. Lesiones representativas a las 10 semanas posterior a la infección con P200 (A) o P0 (B).

A su vez, se evaluó si la infección previa con P200 era capaz de inducir una respuesta protectora contra P0. En la figura 8 se muestra la evolución de las

lesiones al inocular P0 a los ratones previamente infectados con P200; se observó una inflamación aguda la cual disminuyó hasta obtener las medidas basales a la semana 4 mientras. Como control se inocularon ratones de la misma edad con P0, pero sin haberlos infectado con P200. En ellos la inflamación fue en aumento desde la semana 6 y habiendo diferencias significativas en la semana 7 y 8 del estudio. Confirmando así la resistencia que la previa infección con esta cepa atenuada (P200) puede brindar contra una infección secundaria con la bacteria virulenta.

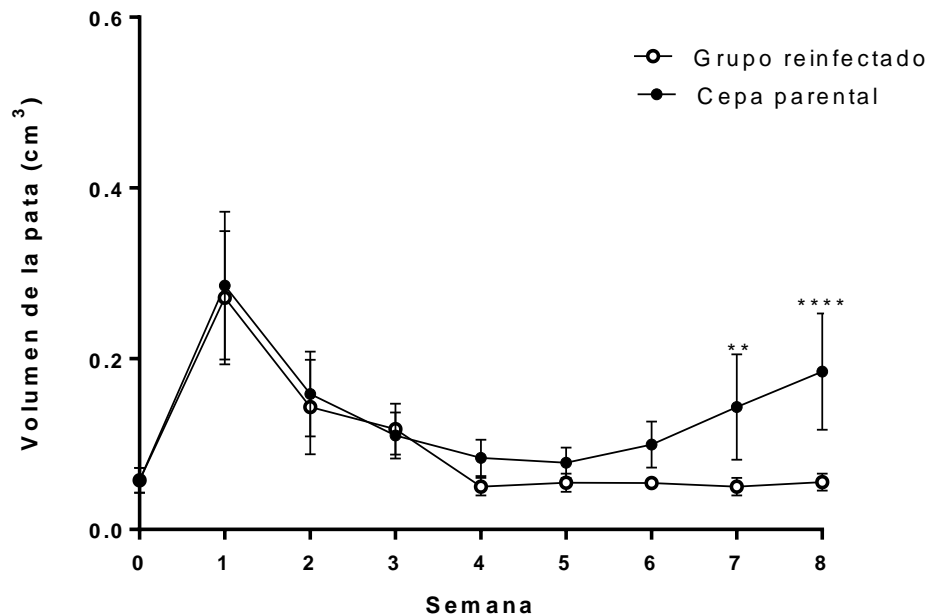


Figura 8. Evolución de las lesiones en los animales inmunizados con P200 y re-infectados a los 90 días con P0. Cada punto representa la media de 5 animales; la desviación estándar está representada como barras. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$, aquellos grupos con una significancia estadística están marcados con asteriscos.

3.2 Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T en bazo y cojinete plantar de los ratones infectados.

3.2.1 Análisis de la respuesta inmune celular tras la infección con P0 y P200.

Con el fin de conocer los mecanismos implicados, tanto durante el desarrollo de la infección natural (que se conocen en parte) como de aquellos involucrados en la resistencia observada al inocular con P200, se midieron varias citocinas tanto en el sitio de la lesión, el cojinete plantar, como en el bazo que representa al estado inmunológico general del animal.

Cuando se analizó la respuesta Th1 al medir los niveles de IFN- γ como se pudo observar que la respuesta en bazo al día 15 y 90 es mayor en los ratones que fueron infectados con la cepa P200 mientras en el día 60 la respuesta fue mayor en los infectados con P0, sin embargo, solo en el día 90 se tiene una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (figura 9).

En los resultados obtenidos en el sitio de la infección no existe ninguna diferencia significativa entre ambos grupos, pero si existe en ambos grupos una disminución considerable de esta respuesta en el día 90, siendo significativo este descenso solo en la infección con P200 comparado con los tiempos anteriores que presentaban una mayor presencia de esta respuesta (figura 9).

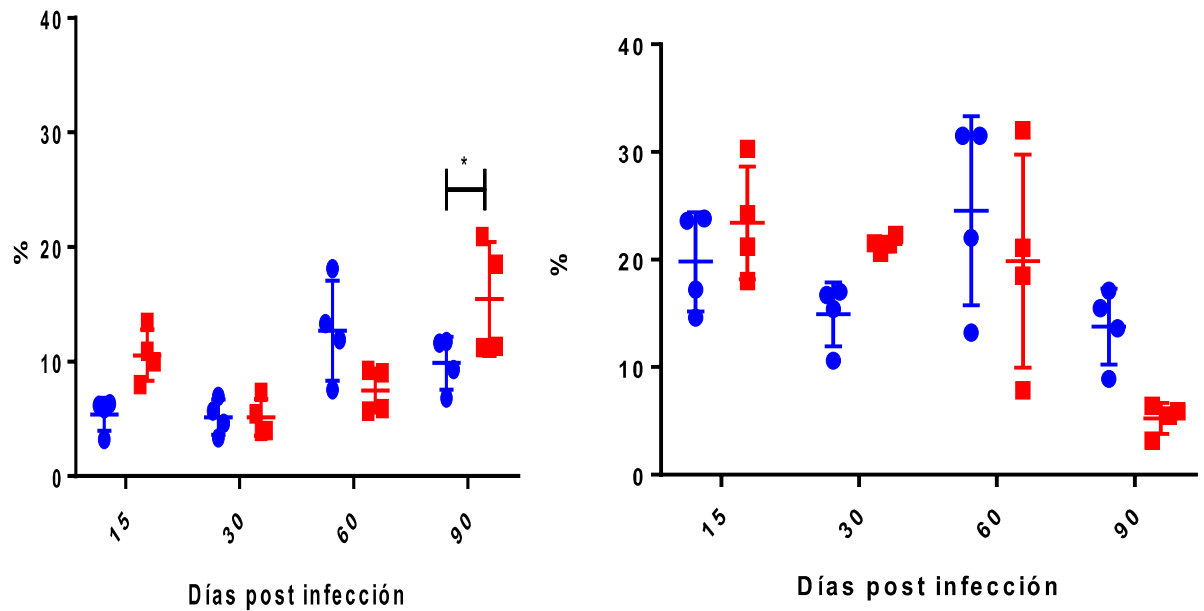


Figura 9. Respuesta de células Th1 productoras de interferón gama, local (cojinete plantar, derecha) y sistémica (bazo, izquierda) posterior a la infección con P0 (círculos) o P200 (cuadrados). Cada punto representa la media de 4 animales. Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

En la figura 10 se observan los resultados obtenidos del análisis de la respuesta Th2 en donde en el bazo puede verse como la respuesta es muy similar durante la mayoría de los tiempos a excepción de que en el día 30 se presentó una respuesta significativamente mayor en los ratones infectados con la cepa P0, interesantemente, de forma local se observan dos diferencias significativamente más grande en los días 30 y 60 en los ratones infectados con la cepa atenuada, la cual disminuye en el día 90 siendo en este punto muy similar a los datos obtenidos con P0 como pasa también en el día 15.

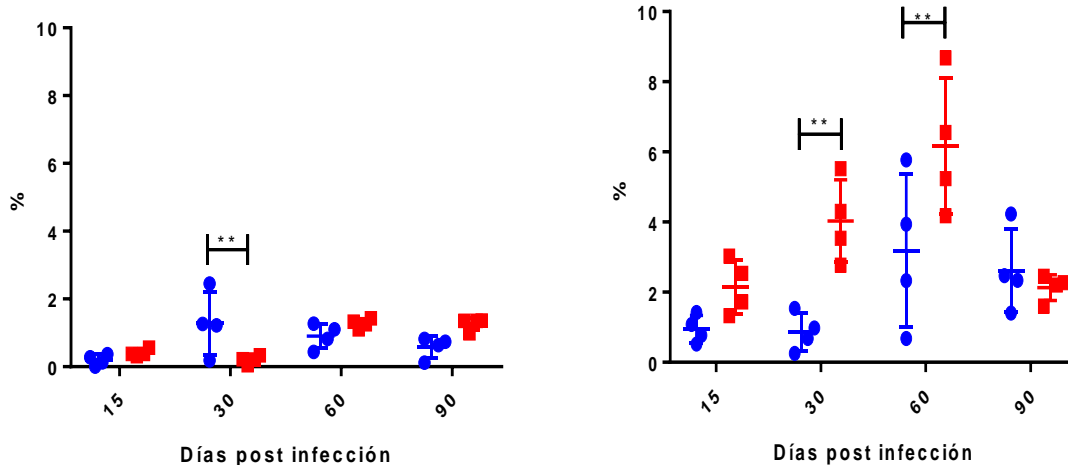


Figura 10. Respuesta de células Th2 productoras de IL-4, medidas en forma local (cojinete plantar, derecha) o sistémica (bazo, izquierda) posterior a la infección con P0 (círculos) o P200 (cuadrados). Cada punto representa la media de 4 animales. Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

En la figura 11 se muestran los datos obtenidos del análisis de la respuesta tras analizar la respuesta Th17 en cada uno de los grupos infectados, aquí se ve que en el bazo una respuesta similar en ambos grupos hasta el día 60, pero en el día 90 existe una clara diferencia significativa mayor en los ratones infectados con la cepa atenuada de *N brasiliensis*. En el tejido infectado se ve una tendencia a ser mayor en el grupo de P200, pero sin alcanzar significancia estadística, al contrario de lo observado en bazo existe una importante diferencia significativa en el día 90, que muestra una potente respuesta Th17 en el grupo infectado con P0 mientras que P200 desciende hasta niveles similares al día 15.

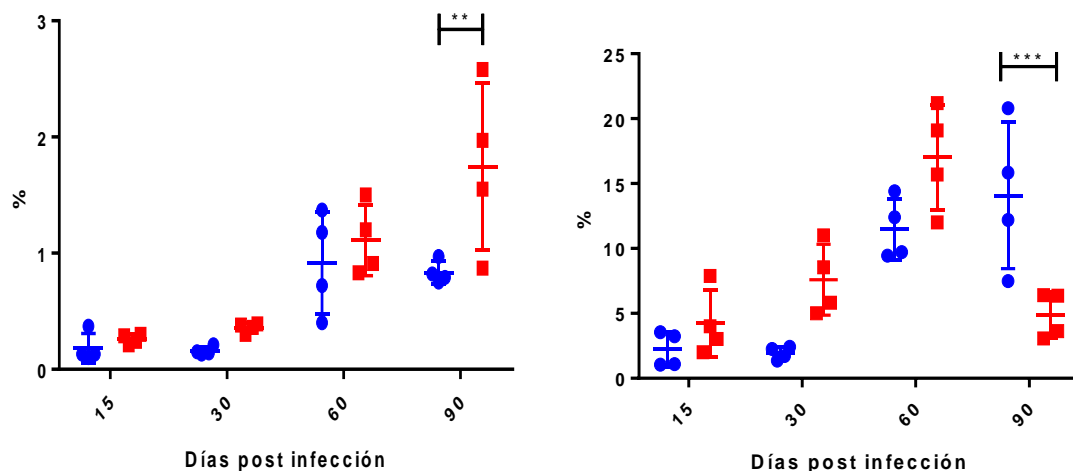


Figura 11. Respuesta de células productoras de IL-17, medidas en forma local (cojinete plantar, derecha) o sistémica (bazo, izquierda) posterior a la infección con P0 (circuitos) o P200 (cuadrados). Cada punto representa la media de 4 animales. Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

La respuesta Treg se analizó usando como marcador la citocina antiinflamatoria IL-10 y en la figura 12 se observa de manera interesante se tiene un comportamiento muy parecido a lo encontrado en la respuesta Th17, en el bazo hasta el día 60 los resultados no mostraron diferencias y fueron similar pero en el día 90 hay una diferencia significativa mayor en el grupo infectado con P200, mientras que de forma local en el área afectada hubo una diferencia significativa mayor en el grupo infectado con la cepa parental.

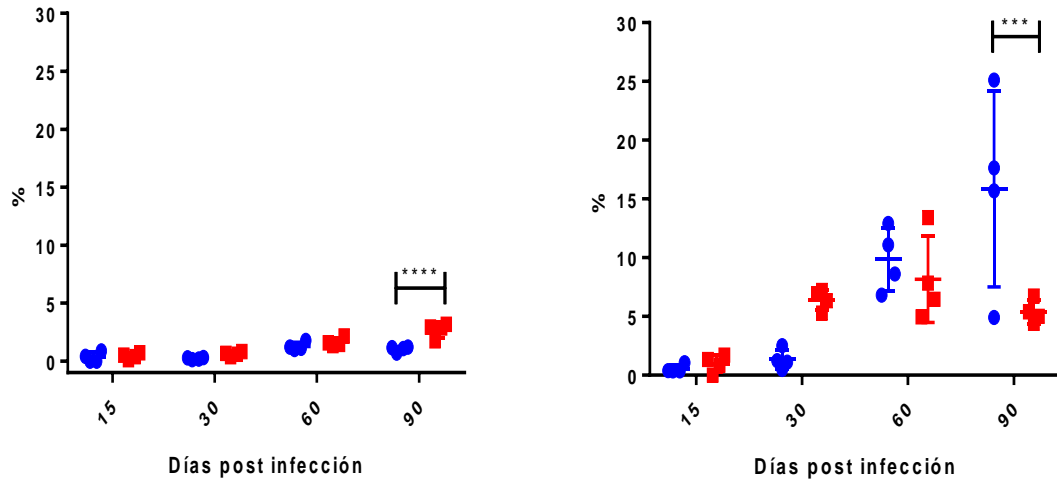


Figura 12. Respuesta de células Tregs productoras de IL-10 medidas en forma local (cojinete plantar, derecha) o sistémica (bazo, derecha) posterior a la infección con P0 (círculos) o P200 (cuadrados). Cada punto representa la media de 4 animales. Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

3.2.2. Análisis de la respuesta protectora de linfocitos T tras la infección con P200.

Después de 90 días de haber infectado con P200, este grupo de ratones se retó con la cepa P0, para determinar el nivel de resistencia inducido con la cepa atenuada. Como control se inoculo un grupo de animales de la misma edad, también con P0. Al cuantificar las células productoras de interferón gama en el bazo (Figura 13), observamos que el grupo control tuvo una respuesta significativamente mayor en los días 7 y 15 posterior a la infección, mientras que en el día 60 no hubo ninguna diferencia (figura 13). En el cojinete plantar se observaron niveles semejantes en ambos grupos de animales (figura 14).

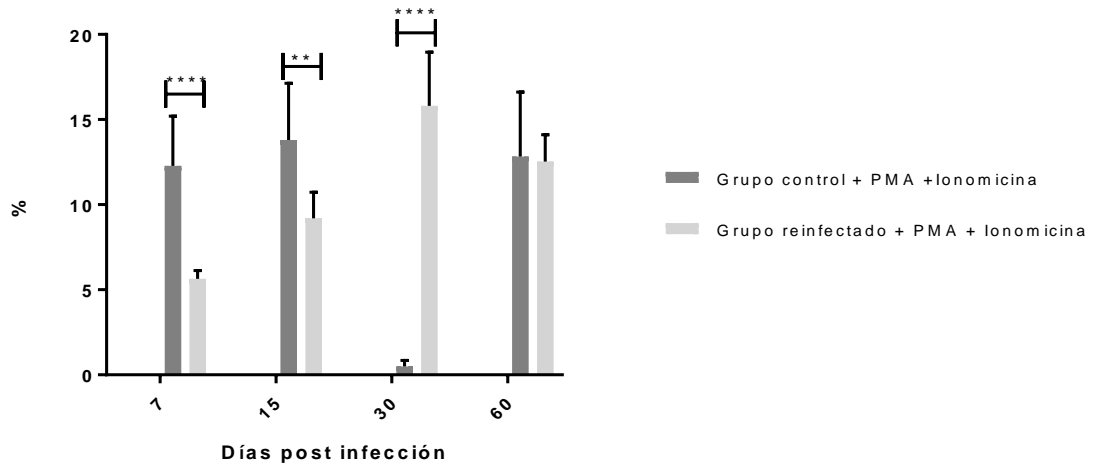


Figura 13. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Th1 de bazo productoras de interferon gamma en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

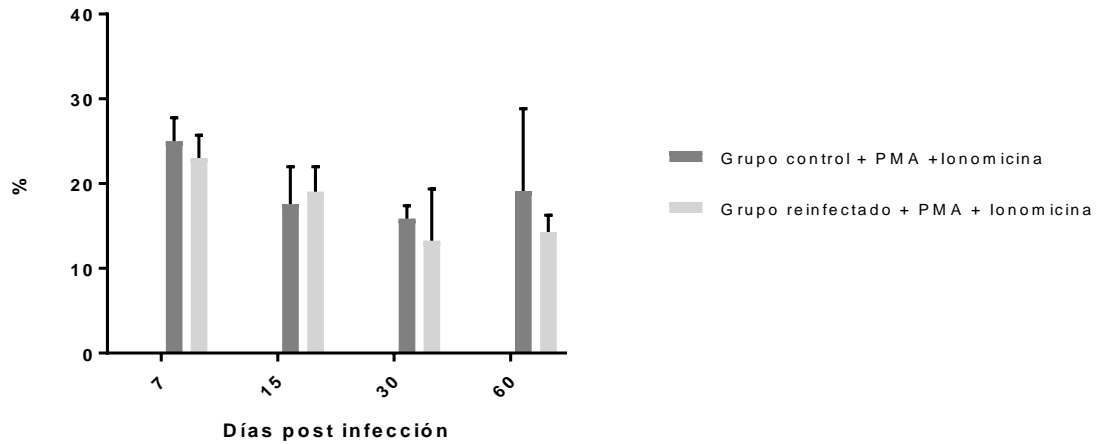


Figura 14. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Th1 de cojinete plantar productoras de interferon gama en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

El análisis de la respuesta Th2, medida como porcentaje de linfocitos T productores de IL-4, no hubo diferencia alguna y la respuesta fue muy constante durante el curso de la infección (figura 16).

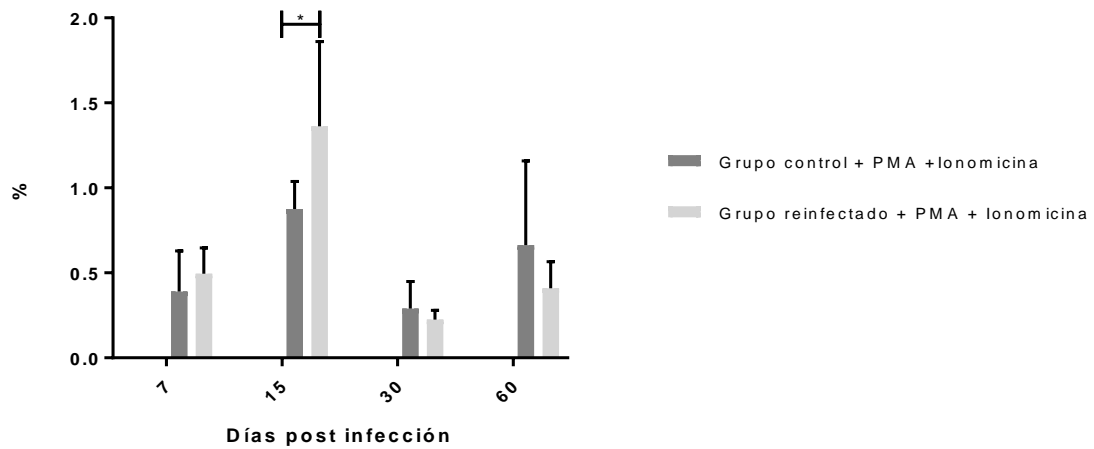


Figura 15. Ensayo de proteccion inducida por P200 a la infecci3n por P0. Respuesta de celulas Th2 de bazo productoras de IL-4 en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 d1as con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estad1sticas fueron determinadas con el m3todo de ANOVA de 2 v1as con comparaci3n m3ltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

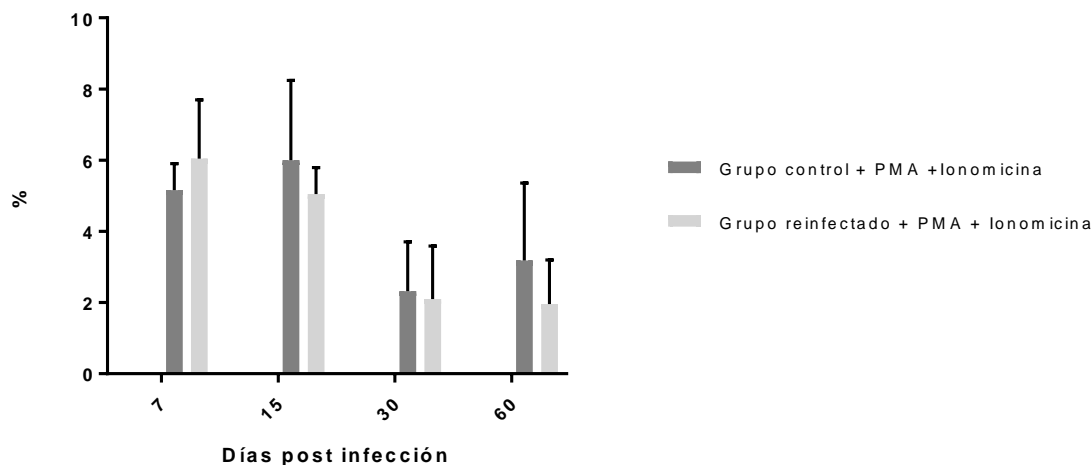


Figura 16. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Th2 de cojinete plantar productoras de IL-4 en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

Al medir la cantidad de linfocitos productores de IL-17, observamos que en el bazo no hubo una diferencia entre ambos grupos (figura 17); sin embargo, en la Figura 18 se muestra que en el sitio de la infección al día 7 existe una mayor respuesta inflamatoria mediada IL-17 en el grupo re-infectado, el día 30 muestra una disminución de esta respuesta y datos similares entre grupos, aunque es de resaltar que en la fase crónica (día 60) existe una diferencia significativamente mayor con respecto al grupo control.

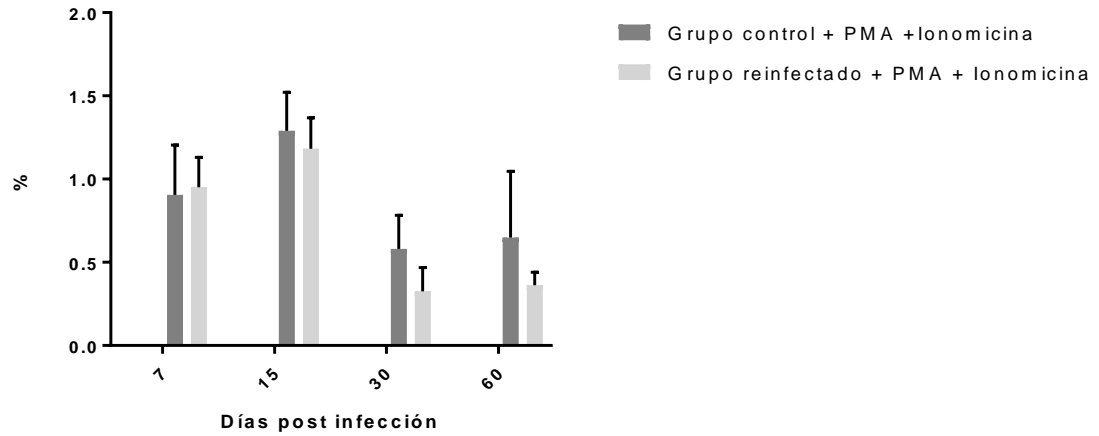


Figura 17. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Th17 de bazo en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

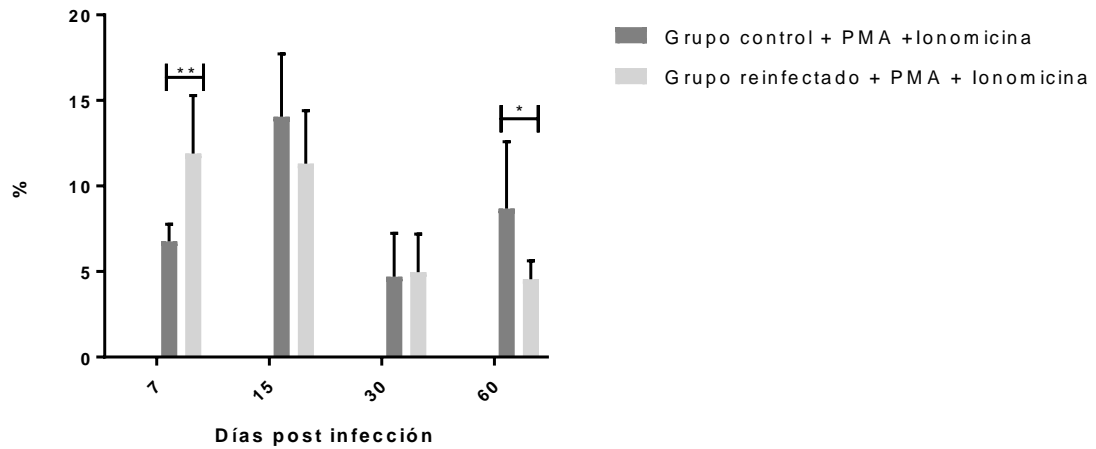


Figura 18. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Th17 de cojinete plantar en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

Como una forma de medir la respuesta inmune reguladora, medimos los niveles de células T productoras de IL-10; en las células del cojinete plantar. observamos niveles más altos en el grupo inoculado con P0. En los ratones inmunizados con P200, los niveles fueron decreciendo con el tiempo. La respuesta general, medida en el bazo fue muy baja.

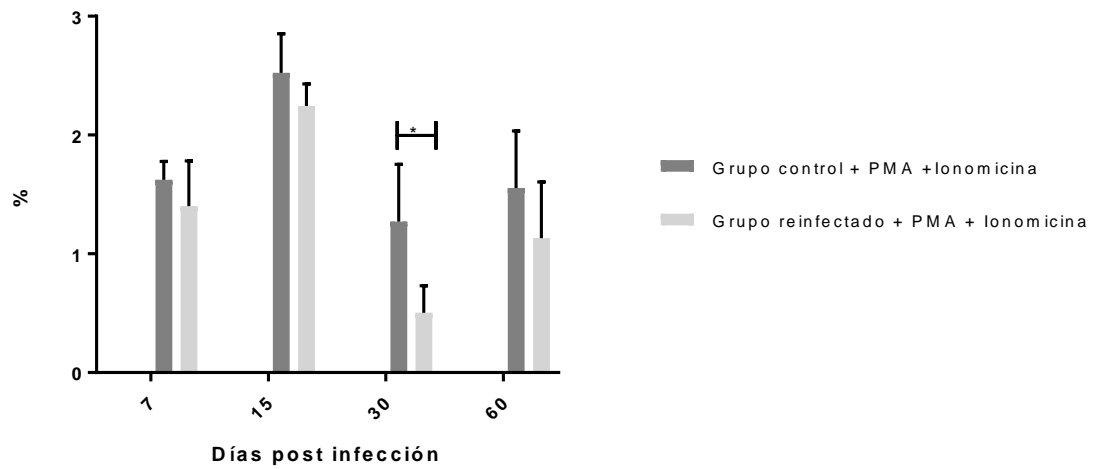


Figura 19. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Tregs de bazo productoras de IL-10, en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

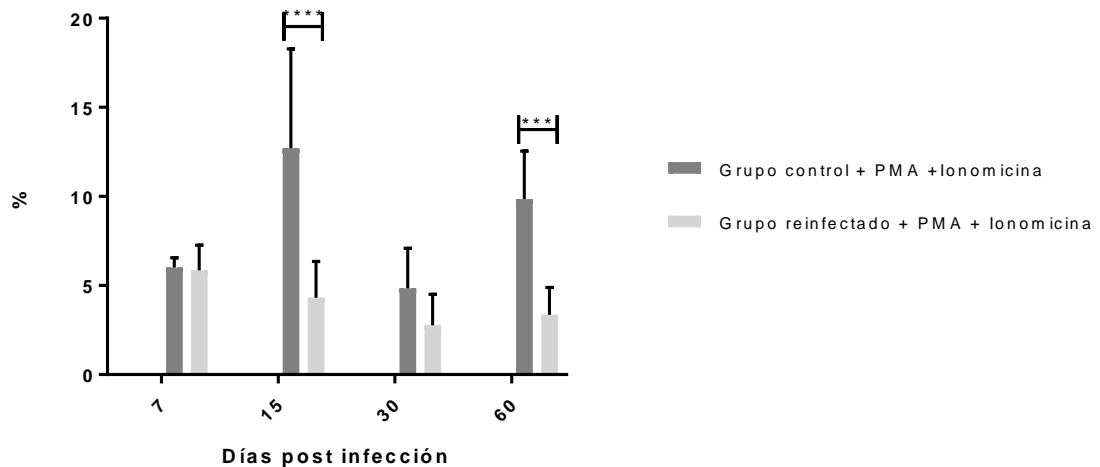


Figura 20. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta de células Tregs de cojinete plantar en los animales inmunizados con P200 e infectados a los 90 días con P0 (Gris), y en los ratones control (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

3.3 Análisis de la respuesta inmune humoral: cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG en suero de los ratones infectados.

En los animales infectados por primera vez con P0 o P200, se observó una cinética similar de aparición de anticuerpos (Figura 21).

Determinación de anticuerpos IgG anti *N. brasiliensis* en suero

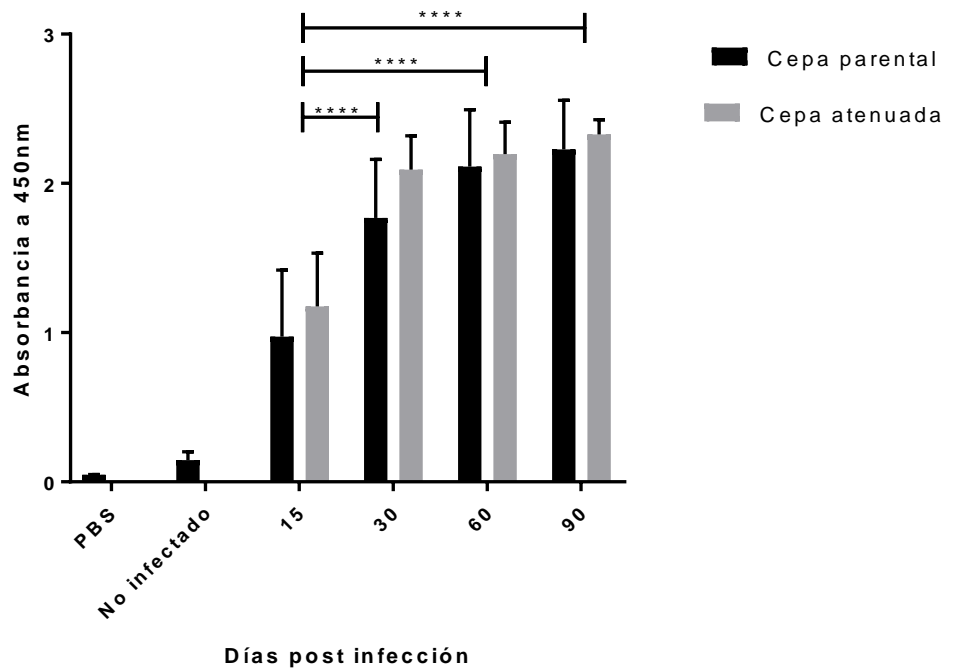


Figura 21. Respuesta humoral del isotipo IgG en los ratones infectados con P0 (negro) o P200 (gris). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

En el día 90, cuando los ratones inmunizados con P200 se retaron con P0 (Figura 22), se observó un incremento muy grande a los 7 días, que se mantuvo durante los 60 días del análisis. El grupo inoculado con P0 mostro un patrón típico, de incremento del nivel de anticuerpos, aunque menor al de los animales del grupo pre inmunizado con P200.

Determinación de anticuerpos IgG anti *N. brasiliensis* en suero

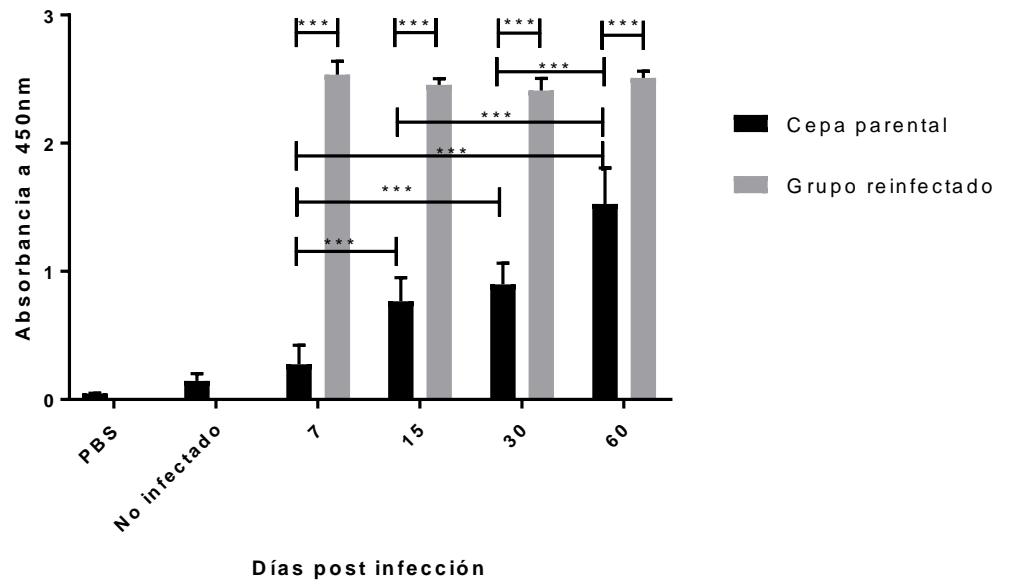


Figura 22. Ensayo de protección inducida por P200 a la infección por P0. Respuesta humoral del isotipo IgG en los ratones inmunizados con P200 y reinfecados a los 90 días con P0 (gris). Grupo control infectado con P0 (negro). Posibles diferencias estadísticas fueron determinadas con el método de ANOVA de 2 vías con comparación múltiple de Sidak, con una significancia $p < 0.05$.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*, de acuerdo a experimentos en ratones y lo observado en casos de actinomicetoma en humanos²⁰, las células T son muy importantes para evitar la diseminación de la infección y formar el granuloma a pesar de que no son capaces de eliminar al agente etiológico^{12,13}.

Las células T cooperadoras son importantes efectoras y juegan un papel importante en la inflamación. Durante muchos años el paradigma de la respuesta Th1/Th2 fue usado para explicar varios fenómenos que envuelven a la respuesta inmune adaptativa, sin embargo, esto cambió con el descubrimiento de la respuesta Th17 y de las células Treg las cuales también juegan un importante rol en la mediación y regulación de la respuesta inmune. La diferenciación de estas células a cada una de estas subpoblaciones dependerá del patógeno presentado por las células presentadoras de antígeno convencionales y cada una de estas respuestas de las células T se caracteriza por la secreción de una o varias citocinas lo que define su función durante el la respuesta inmune³³(figura 23).

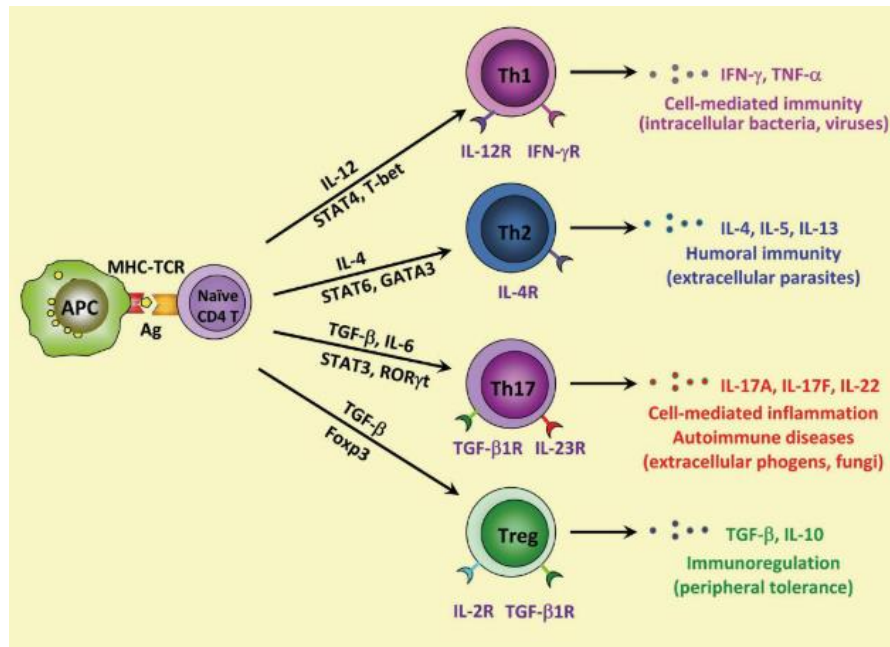


Figura 23. Diferenciación de células T cooperadoras vírgenes a los diferentes tipos de subpoblaciones³³.

Los resultados del análisis de la respuesta de células T que se obtuvieron en el presente estudio muestran que la respuesta Th1 a nivel sistémica y local no es muy diferente posterior a la infección con P0 o P200 (o en el grupo infectado con ambas cepas) e inclusive pareciera ser más potente en la cepa parental durante la fase aguda y de forma sistémica, por lo que puede ser que esta respuesta no esté relacionada directamente con la resolución de la infección que se observa tras la infección con la cepa atenuada y no parece ser la responsable de la protección contra una infección secundaria con la cepa parental a pesar de que esta respuesta es comúnmente asociada con la resolución de infecciones contra patógenos intracelulares como se ha visto en estudios con otras *M. tuberculosis* en donde una robusta respuesta Th1 posterior a la inoculación con una bacteria atenuada se correlaciona con protección contra una infección

secundaria con una cepa virulenta^{34,35} o a lo observado por Shan y Yu en *Nocardia rubra* en donde la administración del esqueleto de la pared celular en ratones C57BL/6 promueve la proliferación de células T CD4+ y la diferenciación a Th1³⁶.

La respuesta inmune de tipo Th2 se asocia a resistencia en contra de diversas bacterias extracelulares, parásitos como helmintos y en respuestas alérgicas³³. En nuestros experimentos observamos que la respuesta sistémica Th2 no es diferente tras la infección con cada una de las cepas estudiadas, sin embargo, de forma local se observa que durante los primeros 60 días la cepa atenuada estimula una respuesta Th2 más potente, en cuanto a esta respuesta en el grupo que desarrolló resistencia solo se ve esa marcada diferencia en el día 15 en el bazo y en el tejido afectado no se ven diferencias. Por lo anterior podría esperarse ver una concentración mayor de anticuerpos IgG en los ratones infectados con la cepa atenuada ya que la respuesta Th2 impulsa la secreción de IgG1 y la diferenciación terminal de las células B³⁷, sin embargo, cuando se analizaron los sueros de los ratones infectados con P0 o P200 no se observó ninguna diferencia significativa e incluso la cinética fue casi idéntica en ambos grupos. En el grupo inmunizado con P200 y re-infectado con P0, se observó una fuerte respuesta de IgG desde el día 7 hasta el final del estudio, lo que ha de deberse a la generación de una buena respuesta de memoria como se ha observado que ocurre en la vacunación con *M. tuberculosis* atenuada la cual ha sido demostrada por Kaushal y colaboradores mediante citometría de flujo para identificar células de memoria posterior a esta vacunación³⁴ y también por Triccas

et al, en un estudio con *M. tuberculosis* SO2³⁸. Esta fuerte respuesta de anticuerpos, en el grupo que desarrolló protección, podría tener un papel importante en la resistencia contra la posterior infección con la cepa virulenta (P0), ya que aunque normalmente la respuesta humoral no se asocia a la resolución de infecciones intracelulares, hay evidencia de que puede brindar protección en contra de patógenos intracelulares como *Listeria*³⁹, *Salmonella*⁴⁰ y *Francisella*⁴¹. Esto fortalece lo observado previamente en que los sueros de ratones infectados que contenían IgM eran capaces de brindar protección contra *N. brasiliensis* si se administraban previo a la infección²⁴.

En este estudio observamos que la respuesta local Th17 y de Tregs es significativamente mayor en el grupo control infectado con la cepa parental. En el grupo que desarrolló protección la principal diferencia en células IL-10+ e IL-17+ fue en la fase crónica en el tejido afectado, esta regulación que difiere a lo encontrado en los grupos infectados con la cepa P0 que llevan la historia natural de la enfermedad puede estar fuertemente conectada con la resolución de la infección de P200 y la resistencia que esta ofrece a una infección secundaria con P0. La IL-10 es sumamente importante ya que tiene propiedades antiinflamatorias por lo que a pesar de prevenir el desarrollo de lesiones patológicas causadas por una respuesta inmune aguda o crónica contra algún patógeno pero también está involucrada en la persistencia de infecciones bacterianas y virales al interferir con la respuesta inmune adaptativa ya que es capaz de inhibir la respuesta y función del IFN- γ ⁴², sin embargo, cabe mencionar que la secreción de IL-10 no es necesariamente atribuible a la respuesta de las

células Treg ya que en este estudio solo fue utilizada la IL-10 como marcador y en algunos casos se han reportado células Th1 productoras de IL-10 que se activan de forma temprana en la inflamación aguda que son las mediadoras principales en la inmunosupresión dependiente de IL-10 derivada de células T en infecciones crónicas causadas por patógenos intracelulares como en la leishmaniasis⁴³. Es por lo anterior que la diferencia en los resultados de ambas cepas en las células positivas a IL-10 puede ser un factor clave para el establecimiento o resolución de la enfermedad crónica al mantener un estado de inmunosupresión en el área infectada. Respecto a la respuesta Th17, esta es una fuerte respuesta inflamatoria que se caracteriza por la secreción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, esta actúa principalmente contra bacterias y hongos extracelulares y promueve la llegada de neutrófilos al sitio de infección al promover la secreción de IL-23 y esto es necesario para la formación del granuloma en la infección por *M. tuberculosis*⁴⁴, por la misma razón esta respuesta también junto a la IL-10 puede ser clave para determinar el curso de la enfermedad, ya que en las lesiones también existe un gran infiltrado de neutrófilos que son los que forman los granulomas y se puede confirmar la presencia de una fuerte respuesta Th17 y de Tregs en la fase crónica en los ratones infectados con la cepa P0 pero no en los infectados con P200 o el grupo que desarrolló resistencia ante P0. Previamente se ha descrito que tanto IL-10 como IL-17 son responsables de mantener un microambiente inmunosupresor en el área afectada durante el todo el curso de la infección (etapa aguda y crónica), lo que permite el establecimiento de la enfermedad crónica¹⁷. Este consiste en un aumento de células T reguladoras, y citocinas, tales como la IL-10, IL-13 y

TGF- β , que suprimen la respuesta inmune efectora lo que correlaciona positivamente con la severidad de la inflamación y la carga bacteriana, además que reportan presencia de células de la respuesta Th17 durante todo su estudio^{4,16-18}.

Para finalizar se observa que de forma local la respuesta Th17 y Treg es significativamente mayor en el grupo control infectado con la cepa parental mientras que los ratones inoculados con la cepa atenuada presentan una respuesta más intensa en el bazo. En el grupo que desarrolló protección la principal diferencia en células IL-10+ e IL-17+ se encontró que en la fase crónica del tejido afectado. Esta regulación que difiere a lo encontrado en los grupos infectados con la cepa P0, que llevan la historia natural de la enfermedad, puede estar fuertemente conectada con la resolución de la infección de P200 y la resistencia que esta ofrece a una infección secundaria con P0. La IL-10 es sumamente importante ya que tiene propiedades antiinflamatorias, por lo que a pesar de prevenir el desarrollo de lesiones patológicas causadas por una respuesta inmune aguda o crónica contra algún patógeno, también está involucrada en la persistencia de infecciones bacterianas y virales al interferir con la respuesta inmune adaptativa, ya que es capaz de inhibir la respuesta y función del IFN- γ ⁴²; sin embargo, cabe mencionar que la secreción de IL-10 no es necesariamente atribuible a la respuesta de las células Treg ya que en este estudio solo fue utilizada la IL-10 como marcador y en algunos casos se han reportado células Th1 productoras de IL-10 que se activan de forma temprana en la inflamación aguda son las mediadoras principales en la inmunosupresión

dependiente de IL-10 derivada de células T en infecciones crónicas causadas por patógenos intracelulares como en la leishmaniasis⁴³. Es por lo anterior que la diferencia en los resultados de ambas cepas en las células positivas a IL-10 puede ser un factor clave para el establecimiento o resolución de la enfermedad crónica, al mantener un estado de inmunosupresión en el área infectada. Respecto a la respuesta Th17, esta es una fuerte respuesta de tipo inflamatoria intensa que se caracteriza por la secreción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, actúa principalmente contra bacterias y hongos extracelulares y promueve la llegada de neutrófilos al sitio de infección al promover la secreción de IL-23 por lo cual es necesario para la formación del granuloma en la infección por *M. tuberculosis*⁴⁴; por la misma razón esta respuesta también junto a la de IL-10 puede ser clave para determinar el curso de la enfermedad, ya que en las lesiones también existe un gran infiltrado de neutrófilos que son los que forman los granulomas; además se puede confirmar la presencia de una fuerte respuesta Th17 y de Tregs en la fase crónica en los ratones infectados con la cepa P0, pero no en los infectados con P200 o el grupo que desarrolló resistencia ante P0. A su vez evidencia directa del grupo de trabajo del doctor Salinas ha demostrado lo involucradas que están ambas citocinas durante el curso de la enfermedad; los describen que se mantiene un microambiente inmunosupresor en el área afectada durante el todo el curso de la infección (etapa aguda y crónica). Este consiste en un aumento de células T reguladoras, y citocinas, tales como la IL-10, IL-13 y TGF- β , que suprimen la respuesta inmune efectora, lo que correlaciona positivamente con la severidad de la inflamación y la carga bacteriana, además reportan la presencia de células de la respuesta Th17 durante todo su estudio^{4,16-18}.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

La cepa atenuada de 200 pasajes es incapaz de inducir el desarrollo la fase crónica del actinomicetoma, así también se ha confirmado que la infección primaria con esta bacteria atenuada por subcultivo provee resistencia ante una infección secundaria con la cepa parental.

La respuesta Th1 no parecer ser la clave de la resolución como se proponía en la hipótesis, la respuesta mediada por IL-10 e IL-17 parece ser fundamental para el curso de la patología.

Existe una mayor respuesta Th2 en el área afectada tras la infección con la cepa atenuada. la respuesta de anticuerpos se mantiene muy similar en ambos grupos, pero la reinfección con la cepa parental induce una rápida respuesta de anticuerpos, la cual persistió durante todos los días analizados.

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

- Evaluar la generación de células de memoria tras la infección con la cepa atenuada mediante marcadores de memoria por citometría de flujo.
- Identificar el patrón de reconocimiento de los anticuerpos generados por la cepa atenuada mediante Western Blot.
- Analizar la actividad neutralizante de los anticuerpos generados por la infección con la cepa atenuada mediante ensayos *in vitro*.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

1. Fahal, A. H. Review Mycetoma. *Khartoum Med. J.* **04**, 514–523 (2011).
2. Vera-Cabrera, L. *et al.* Host defenses in subcutaneous mycoses. *Clin. Dermatol.* **30**, 382–388 (2012).
3. van de Sande, W. W. J. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
4. Solis-Soto, J. M. *et al.* In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol. Histopathol.* **23**, 573–581 (2008).
5. Welsh, O., Vera-Cabrera, L. & Salinas-Carmona, M. C. Mycetoma. *Clin. Dermatol.* **25**, 195–202 (2007).
6. Lim, F. J., De Klerk, N., Blyth, C. C., Fathima, P. & Moore, H. C. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. *Respirology* **21**, 648–655 (2016).
7. López-Martínez, R. *et al.* Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac. Med. Mex.* **149**, 586–592 (2013).
8. Salinas-Carmona, M. C. *Nocardia brasiliensis*: From microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* **2**, 1373–1381 (2000).

-
9. Trevino-Villarreal, J. H., Vera-Cabrera, L., Valero-Guillén, P. L. & Salinas-Carmona, M. C. Nocardia brasiliensis cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **80**, 3587–3601 (2012).
 10. Beaman, B. L., Black, C. M., Doughty, F. & Beaman, L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of Nocardia asteroides: Importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* **47**, 135–141 (1985).
 11. Beaman, L. & Beaman, B. L. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of Nocardia asteroides within the intact host. *Infect. Immun.* **58**, 3122–3128 (1990).
 12. Folb, P. I., Timme, A. & Horowitz, A. Nocardia infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* **18**, 459–466 (1977).
 13. Deem, R. L., Beaman, B. L. & Gershwin, M. E. Adoptive transfer of immunity to Nocardia asteroides in nude mice. *Infect. Immun.* **38**, 914–920 (1982).
 14. Filice, G. A., Beaman, B. L., Krick, J. A. & Remington, J. S. Effects of human neutrophils and monocytes on Nocardia asteroides: Failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J. Infect. Dis.* **142**, 432–438 (1980).

-
15. Salinas-Carmona, M. C., Torres-Lopez, E., Ramos, A. I., Licon-Trillo, A. & Gonzalez-Spencer, D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **67**, 2428–2432 (1999).
 16. Meester, I., Rosas-Taraco, A. G. & Salinas-Carmona, M. C. Retnla down-regulation and IL-13-rich environment correlate with inflammation severity in experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Pathog. Dis.* **67**, 214–220 (2013).
 17. Rosas-Taraco, A. G., Perez-Liñan, A. R., Bocanegra-Ibarias, P., Perez-Rivera, L. I. & Salinas-Carmona, M. C. *Nocardia brasiliensis* induces an immunosuppressive microenvironment that favors chronic infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **80**, 2493–2499 (2012).
 18. Salinas-Carmona, M. C., Rosas-Taraco, A. G. & Welsh, O. Systemic increased immune response to *Nocardia brasiliensis* co-exists with local immunosuppressive microenvironment. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **102**, 473–480 (2012).
 19. Salinas-Carmona, M. C., Zúñiga, J. M., Pérez-Rivera, L. I., Segoviano-Ramírez, J. C. & Vázquez-Marmolejo, A. V. *Nocardia brasiliensis* modulates IFN-, IL-10, and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c mice. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 263–271 (2009).
 20. Guimarães, C. C., Castro, L. G. M. & Sotto, M. írian N. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and

-
- eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop.* **87**, 377–384 (2003).
21. Salinas-Carmona, M. C., Vera, L., Welsh, O. & Rodríguez, M. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zentralblatt fur Bakteriol.* **276**, 390–397 (1992).
 22. Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, M. C., Welsh, O. & Rodriguez, M. A. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1183–1188 (1992).
 23. Gonzalez-Suarez, M. L., Salinas-Carmona, M. C. & Pérez-Rivera, I. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **57**, 17–24 (2009).
 24. Salinas-Carmona, M. C. & Pérez-Rivera, I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* **72**, 5597–5604 (2004).
 25. Lin, I. Y. C., Van, T. T. H. & Smooker, P. M. *Live-attenuated bacterial vectors: Tools for vaccine and therapeutic agent delivery.* *Vaccines* **3**, (2015).
 26. Ravenel, M. P. La Vaccination Préventive Contre la Tuberculose par le “BCG”. *Am. J. Public Heal. Nations Heal.* (1928).
doi:10.2105/ajph.18.8.1075-a
 27. Philipp, W. J. *et al.* Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium*

tuberculosis H37Rv and from *M. bovis*. *Microbiology* (1996).

doi:10.1099/13500872-142-11-3135

28. Vera-Cabrera, L. *et al.* Genomic changes associated with the loss of *Nocardia brasiliensis* virulence in mice after 200 In Vitro passages. *Infect. Immun.* **30**, 2761–2762 (2012).
29. Gonzalez-Carrillo, C. *et al.* Genomic changes associated with the loss of *Nocardia brasiliensis* virulence in mice after 200 In Vitro passages. *Infect. Immun.* **84**, 2595–2606 (2016).
30. Vera-Cabrera, L., Ortiz-Lopez, R., Elizondo-Gonzalez, R., Perez-Maya, A. A. & Ocampo-Candiani, J. Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *J. Bacteriol.* **194**, 2761–2762 (2012).
31. Almaguer-Chávez, J. A. *et al.* Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. *BMC Infect. Dis.* **11**, 290 (2011).
32. Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L. & Chen, H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**, 3834–3842 (2013).
33. Leung, S. *et al.* The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 182–189 (2010).
34. Kaushal, D. *et al.* Mucosal vaccination with attenuated *Mycobacterium tuberculosis* induces strong central memory responses and protects

-
- against tuberculosis. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
35. Aguilar, D. *et al.* Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (phoP) SO2 strain. *Clin. Exp. Immunol.* **147**, 330–338 (2007).
36. Wang, G. *et al.* *Nocardia rubra* cell-wall skeleton promotes CD4+ T cell activation and drives Th1 immune response. *Int. J. Biol. Macromol.* **101**, 398–407 (2017).
37. McNeela, E. A. & Mills, K. H. G. Manipulating the immune system: Humoral versus cell-mediated immunity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 43–54 (2001).
38. Nambiar, J. K. *et al.* Protective immunity afforded by attenuated , PhoP - deficient *Mycobacterium tuberculosis* is associated with sustained generation of CD4 1 T-cell memory. *Eur. J. Immunol.* **42**, 385–392 (2012).
39. Edelson, B. T. & Unanue, E. R. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity* **14**, 503–512 (2001).
40. Uppington, H. *et al.* Effect of immune serum and role of individual Fc γ receptors on the intracellular distribution and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages. *Immunology* **119**, 147–158 (2006).
41. Lu, Z. *et al.* Generation and characterization of hybridoma antibodies for immunotherapy of tularemia. *Immunol. Lett.* **112**, 92–103 (2007).

-
42. Mege, J. L., Meghari, S., Honstette, A., Capo, C. & Raoult, D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 557–569 (2006).
 43. Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. & Sacks, D. CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **204**, 285–297 (2007).
 44. Curtis, M. M. & Way, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* **126**, 177–185 (2009).

CAPITULO 8

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Q.C.B. Kevin Alberto Flores Aldaba

TESIS DE MAESTRÍA

Tesis: “Caracterización de la Respuesta Inmune Protectora Inducida en Ratones BALB/c por una Cepa Atenuada de *Nocardia brasiliensis*”

Edad: 25 años.

Campo de Estudio: Ciencias Biomédicas.

Biografía: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 24 de Noviembre de 1996, hijo de Juan Alberto Flores Cantú y Jaqueline Aldaba Plata.

Educación: Completó sus estudios de nivel medio superior en la Preparatoria #7 ubicada en la colonia Hacienda los Morales, San Nicolás de los Garza el 2014. Posteriormente obtuvo su grado como Licenciado Químico Clínico Biólogo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2019.