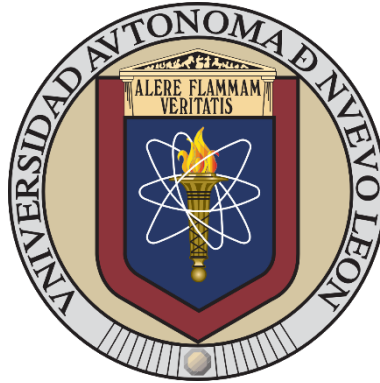


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA POR

***Actinomadura madurae* Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS**

ESPECÍFICOS EN RATONES BALB/C

POR

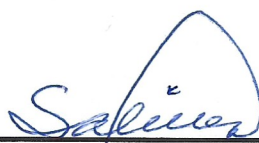
I. B. BENITO BRIONES BAUTISTA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA
EN CIENCIAS con Orientación en Inmunología Médica**

Julio, 2025

DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA POR
***Actinomadura madurae* Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS**
ESPECÍFICOS EN RATONES BALB/C

Aprobación de la Tesis.



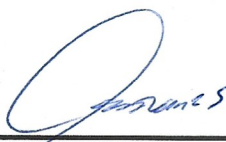
Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director



Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Co-Director



Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

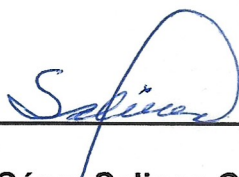
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA POR
***Actinomadura madurae* Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS**
ESPECÍFICOS EN RATONES BALB/C

Presentado por:

I.B. Benito Briones Bautista

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Servicio y Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y la codirección de la Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" con el número de registro: **IN23-00006**.



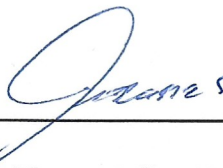
Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director de Tesis



Dra. C. Anna Velia
Vázquez Marmolejo

Codirector



Dr. C. Manuel Guadalupe
Mejía Torres

Miembro de la Comisión

Dedicatoria

A Dios por darme la oportunidad de poder haber vivido esta etapa y darme la paciencia, sabiduría, y resiliencia para volverme mejor ser humano y profesionalista.

A mi madre, Rosaelia Alejandra Bautista García, por darme el regalo de la vida, cuidarme con tu amor para siempre ser mejor persona, siempre alentar mi curiosidad de conocimiento, alentar mis ganas de superarme en todo aspecto, siempre ver el potencial en mí y apoyarme en todos mis decisiones, objetivos y proyectos.

A mi padre, Benito Briones de León, por enseñarme tantas lecciones de vida, ser mi mayor ejemplo de trabajo duro y de amor por la familia. Por siempre darme el soporte emocional, económico y motivarme a salir de mi zona de confort apoyándome en todos mis objetivos y metas.

A mi hermano, Fernando Briones Bautista, por ser mi mejor amigo y mi compañero de aventuras, gracias por hacerme mejor ser humano.

A mi novia, Fernanda Coronado Rodríguez, por estar siempre a mi lado apoyándome en cada momento, decisión o idea que tenga. Siempre darme aliento y amor cuando me sentía abrumado, por creer y confiar en mi potencial siempre. Te amo y gracias, por tanto.

A todas las personas que han sido parte de esta aventura llamada vida y que me han puesto hasta este lugar.

Agradecimientos

A mi director de tesis y jefe del Servicio de Inmunología, el Dr. C. Mario César Salinas Carmona, por permitirme ser parte del programa de maestría y del departamento, siempre velar por mis intereses, bienestar y su confianza depositada en mí, así como compartirme su vasto conocimiento, sus experiencias e interés por la inmunología.

A mi codirectora, la Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo, por permitirme trabajar en su laboratorio, así como guiarme en el proceso de aprendizaje y diseño experimental de cada paso del proyecto, así como su apoyo en cada seminario.

Al Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres, miembro de comisión del proyecto, por apoyarme en cada momento desde antes de pertenecer al programa, por alimentar mi curiosidad en la inmunología, resolver mis dudas de conocimiento que surgieron en el proceso y velar por mis intereses en el proyecto.

A los profesores del Servicio de Inmunología: Dra. Alma Yolanda Arce, Dra. María de los Ángeles Castro, Dr. Carlos Eduardo Medina, Dr. Adrián Rosas, Dra. Nallely López, Dr. Noé Macías y Dr. Ángel González, por ser pilares en mi formación tanto profesional como personal, siempre estar disponibles para cualquier duda que surgiera, transmitirme su conocimiento en la inmunología, darme una amplia retroalimentación tras cada clase y seminario, aportarme con su ejemplo grandes valores como el compromiso y la dedicación; e incluso escucharme y orientarme en momentos personales.

A la Q.C.B. Rocío Rojas Rico, por siempre ayudarme en la realización de todos los experimentos, por toda la paciencia, tu amistad y soporte emocional cuando algo no salía. Sin tu valioso apoyo y entrega no hubiera sido posible haber realizado tanto.

A mis compañeros de generación, futuros M.C. Óscar Castillo y M.C. Edgar Montes, por siempre apoyarnos desde el primer día y por hacer este camino mucho más ameno y agradable.

A mis compañeros de posgrado, Kenia, Raquel, Diana, Tomás, Luisa, Luis Carlos, Emilio, Oliver y Michelle, por todos los momentos agradables, así como el apoyo y conocimiento que me transmitieron que me volvieron mejor estudiante y persona.

A todo el personal del departamento de Inmunología, Brenda, Gloria, Isary, Lucero, Kevin, Rodolfo, Bere, Alejandro, Paloma por hacer que la maquinaria de trabajo siga avanzando y hacer que el trabajo sea un lugar más cómodo.

A los becarios del departamento de Inmunología, Paola Martínez, Jocelyn Chiu, Juan Ángel III, Jesús Campillo, Gil Hernández y Andy Salazar, por su valioso apoyo en cada parte del proyecto a pesar de sus responsabilidades académicas.

A la Dra. C. Carmen Amelia Molina Torres por todo el apoyo personal y metodológico que nos brindó que sin duda fue invaluable para poder sacar adelante el proyecto; de igual manera al Dr. C. Lucio Vera Cabrera por facilitarnos las instalaciones de su laboratorio, así como brindarnos el apoyo con material para que este proyecto se llevase a cabo. Así mismo a todo el personal, las químicas Anabel y Mayra, y los médicos pasantes Alejandro, Vania y Marlene del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” quienes siempre estuvieron con las puertas abiertas para brindarme apoyo para poder llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Ivette Miranda Maldonado y al Dr. C. Juan Carlos Segoviano Ramírez por el apoyo metodológico brindado; así como la realización del análisis y el apoyo extra para mi enseñanza.

Al CONAHCYT (SECIHTI) por la beca que se me brindó para poder llevar a cabo mis estudios en el programa de Maestría en Ciencias (CVU/Becario 1312805)

RESUMEN

I.B. Benito Briones Bautista

Fecha de Graduación: Julio, 2025

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA POR *Actinomadura madurae* Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN RATONES BALB/C

Número de páginas: 93

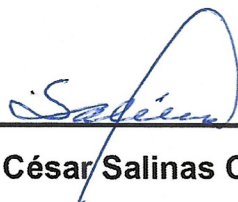
Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Área de estudio: Inmunología

Propósito y diseño del estudio: El micetoma es una infección inflamatoria, crónica, granulomatosa que afecta a poblaciones socioeconómicamente vulnerables y si no es tratada puede llevar a afectaciones como deformación, amputación o la muerte. *Actinomadura madurae* es el 2do agente causal bacteriano más común a nivel mundial, sin embargo, aún no se entiende en su totalidad su inmunopatología. Los modelos experimentales han sido de utilidad para reproducir la enfermedad del humano y estudiar mecanismos que participan en su desarrollo y resolución, así como probar blancos terapéuticos; sin embargo, intentos previos con este microorganismo no han sido exitosos en establecer la enfermedad. Como objetivo de este trabajo, se propusieron esquemas de reinfección para analizar las características clínicas propias de la enfermedad, así como la histopatología del sitio infectado para confirmar el establecimiento del micetoma. También, se determinaron anticuerpos IgM e IgG en los diversos esquemas de reinfección.

Contribuciones y conclusiones: En los esquemas infecciones repetidas utilizados no se observó el establecimiento del micetoma, pero en la histopatología, sí se identificaron diferentes subpoblaciones celulares características de un proceso inflamatorio, con indicadores de lesión tisular, pero ausencia de microcolonias. Además, se demostró la presencia de anticuerpos específicos IgM e IgG en todos los grupos de reinfección, al no dar reacción cruzada frente a antígenos de otros agentes causales del micetoma.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras	VII
Lista de Tablas	X
Lista de Abreviaturas	XI
Nomenclatura	XIII
 CAPÍTULO 1	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El micetoma	1
1.2. Etiología	2
1.3. Patogénesis del micetoma	4
1.3.1. Factores del patógeno	5
1.3.2. Factores del huésped	6
1.4. Respuesta inmune frente al micetoma.	8
1.4.1. Respuesta inmune celular del micetoma	10
1.4.2. Respuesta inmune humoral del micetoma	11
1.5. Epidemiología	12
1.6. El género <i>Actinomadura</i>	14
1.6.1. <i>Actinomadura madurae</i>	16
1.7. Micetoma en México	17
1.7.1. Micetoma por <i>Actinomadura madurae</i> en México	21
 CAPÍTULO 2	
2. ANTECEDENTES.	26
2.1. Modelo experimental de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> en ratones BALB/c	26
2.2. Infección experimental por <i>Actinomadura madurae</i> en ratón	30
2.3. ELISA diagnóstico para <i>Nocardia brasiliensis</i>	32
2.4. Determinación de anticuerpos de <i>Actinomadura madurae</i> en Sudán	34
 CAPÍTULO 3	
3. JUSTIFICACIÓN	37

CAPÍTULO 4

4. HIPÓTESIS	38
------------------------	----

CAPÍTULO 5

5. OBJETIVOS	39
5.1. Objetivo General	39
5.2. Objetivos Específicos	39

CAPÍTULO 6

6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1. Animales de experimentación	40
6.2. Cepa bacteriana.	40
6.3. Ensayo de curva de crecimiento	41
6.4. Preparación del inóculo	42
6.5. Esquema de infección	43
6.6. Evolución clínica	43
6.7. Obtención de sueros	44
6.8. Sacrificio de animales	45
6.9. Obtención de bazo y ganglio	45
6.10. Conteo de células de bazo y ganglio	46
6.11. Análisis histopatológico	47
6.12. ELISA para determinar anticuerpos específicos IgM anti- <i>Actinomadura madurae</i>	48
6.12.1. Obtención de Extracto Celular Crudo de <i>Actinomadura</i> <i>madurae</i>	48
6.12.2. Estandarización de la técnica ELISA	49
6.13. ELISA para determinar anticuerpos específicos IgG anti- <i>Actinomadura madurae</i>	50
6.14. Análisis Estadístico	51

CAPÍTULO 7

7. RESULTADOS.	53
7.1. Ensayo de Curva de Crecimiento	53
7.2. Análisis de la evolución clínica de la infección en cojinete plantar	54
7.2.1. Cambios macroscópicos de las extremidades infectadas	58
7.3. Medidas y celularidad de bazo	60
7.4. Medidas y celularidad de Ganglio	62
7.5. Análisis Histopatológico	64
7.6. Determinación de Anticuerpos IgM específicos anti- <i>Actinomadura</i> <i>madurae</i>	67
7.7. Determinación de Anticuerpos IgG específicos anti- <i>Actinomadura</i> <i>madurae</i>	73

CAPÍTULO 8	
8. DISCUSIÓN.	78
CAPÍTULO 9	
9. CONCLUSIÓN	85
CAPÍTULO 10	
10.PERSPECTIVAS.	86
CAPÍTULO 11	
11. BIBLIOGRAFÍA	87
Apéndice	
Apéndice A: REACTIVOS.	91

Lista de Figuras

Figura	Página
1. Micetoma por <i>Madurella mycetomatis</i> con tríada de signos característicos	2
2. Tipos de respuesta inmune frente a micetoma	9
3. Distribución del “Cinturón del Micetoma”	13
4. Distribución del micetoma por género en México	17
5. Distribución geográfica de los casos según entidad federativa	20
6. Grano de micetoma por <i>Actinomadura madurae</i> .	21
7. Corte histopatológico de HyE de grano de <i>Actinomadura madurae</i>	22
8. Micetoma por <i>Actinomadura madurae</i>	22
9. Evolución clínica del micetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> en ratones BALB/c	27
10. Lesión de micetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	28
11. Evolución histopatológica del micetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	29
12. Dimensión del cojinete plantar de ratones BALB/c inoculados con <i>A. madurae</i>	31
13. Concentraciones de anticuerpos anti- <i>Nocardia brasiliensis</i>	34
14. Curva de crecimiento de <i>Actinomadura madurae</i>	53
15. Comparación de volumen de cojinete plantar de ratones infectados con una dosis con <i>Actinomadura madurae</i> frente a grupo control	54
16. Comparación de volumen de cojinete plantar de ratones re infectados cada 30 días con <i>Actinomadura madurae</i> frente a grupo control	55
17. Comparación de volumen de cojinete plantar de ratones re infectados cada 15 días con <i>Actinomadura madurae</i> frente a grupo control	56
18. Comparación de volumen de cojinete plantar de ratones re infectados cada 7 días con <i>Actinomadura madurae</i> frente a grupo control	57
19. Comparación del peso de bazos de ratones control frente a infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	61
20. Comparación de medidas de bazos de ratones control frente a infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	61

21. Comparación de número de células de bazo de ratones control frente a infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	62
22. Comparación del peso de ganglio de ratones control frente a infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	63
23. Comparación de tamaño longitudinal de ganglio de ratones control frente a infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	63
24. Comparación del número de células de ganglio de ratones control frente a infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	64
25. Análisis histopatológico en el tejido de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	66
26. Análisis de la presencia de marcadores de daño en tejido de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	66
27. Análisis de las condiciones óptimas de la técnica de ELISA para determinar IgM en sueros de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i> .	67
28. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i> . Anti-IgM: 1:500	68
29. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i> . Anti-IgM: 1:1000	69
30. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i> . Anti-IgM: 1:1500	70
31. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i> . Anti-IgM: 1:2000	71
32. Promedios de absorbancia para determinación de anticuerpos IgM anti- <i>Actinomadura madurae</i> en condiciones óptimas	72
33. Promedios de absorbancia para determinación de anticuerpos IgM específicos anti- <i>Actinomadura madurae</i> .	73
34. Análisis de las condiciones óptimas de la técnica de ELISA para determinar IgG en sueros de ratones infectados con <i>Actinomadura madurae</i>	74

35. Promedios de absorbancia para determinación de anticuerpos IgG anti- <i>Actinomadura madurae</i> en condiciones óptimas	75
36. Promedios de absorbancia de anticuerpos IgG anti- <i>Actinomadura madurae</i> según el esquema de reinfección	76
37. Promedios de absorbancia para determinación de anticuerpos IgG específicos anti- <i>Actinomadura madurae</i> .	77

Lista de Tablas

Tabla	Página
1. Agentes etiológicos del micetoma	3-4
2. Frecuencia de micetoma por grupos de edad	18
3. Ocupaciones de pacientes afectados por micetoma	19
4. Localización del micetoma por región corporal	20
5. Distribución por estado del micetoma por <i>Actinomadura madurae</i>	23
6. Epidemiología del micetoma por <i>Actinomadura madurae</i>	24
7. Localización corporal del micetoma por <i>Actinomadura madurae</i>	25
8. Esquema de inoculación de <i>Actinomadura madurae</i>	30
9. Presencia de anticuerpos según cada grupo experimental	36
10. Promedios de densidad óptica por grupo experimental	36
11. Escala de signos de inflamación en micetoma por <i>Actinomadura madurae</i>	44
12. Variables de estudio histopatológico	47
13. Cambios macroscópicos de la evolución clínica	58
14. Resultados de análisis histopatológico	65

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
α -defensinas	Alfa-defensinas
β -defensina-3 humana	Beta-defensina-3 humana
LL-37	Catelicidina humana
UV	Del espectro electromagnético “Ultravioleta”
HLA	Del inglés “Human Leukocyte Antigens”
IL-8 (CXCL8)	Interleucina 8 o quimiocina motivo CXC-ligando 8
CXCR2	Receptor de Interleucina 8
TSP4	Proteína Trombospondina-4
NOS2	Proteína Óxido nítrico sintasa inducible
CR1	Proteína Receptor del complemento 1
IL-1	Interleucina 1
CCL5	Quimiocina motivo CC ligando 5 (RANTES)
CD15	Clúster de diferenciación 15. Molécula lacto-N-(neo) fucopentosa III
CD68	Cúmulo de diferenciación 68
CD3	Cúmulo de diferenciación 3
CD20	Cúmulo de diferenciación 20
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
TLR2	Del Inglés “Toll-Like receptor 2”
TLR4	Del inglés “Toll-Like receptor 4”
Th2	Del inglés “T helper 2 cells”
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
Th1	Del inglés “T helper 1 cells”
IFN- γ	Interferón gamma

Abreviatura	Significado
TNF- α	Del inglés “Tumor Necrosis Factor— Alpha”
CD4	Clúster de diferenciación 4
IL-2	Interleucina 2
G+C	Relación guanina-citosina
Mol.	Moles
DDS	Diaminodifenilsulfona
ATCC	Del Inglés “American Type Culture Collection”
BHI	Del Inglés “Brain Heart Infusion”
CFW	Cepa de ratón “Charles River Swiss Webster”
CD1	Cepa de ratón exogámica 1
BALB/c	Cepa de ratón “Baltimore Institute of Cancer Biology” original
ELISA	Del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
HCL	Ácido Clorhídrico
PBS	Del inglés “Phosphate Buffered Saline.”
YD	Del inglés “Yeast Dextrose”
ECC	Extracto Celular Crudo
ANOVA	Del inglés “Analysis of Variance”
DMEM	Del inglés ” Dulbecco's Modified Eagle Medium”
NOC3	De inglés “Nucleolar complex-associated protein 3”
NOC4	De inglés “Nucleolar complex-associated protein 4”
16 s	Gen de ARN ribosomal 16s
HUJEG-1	Cepa “Hospital Universitario “José Eleuterio González”-1”

Nomenclatura

1. %	Por ciento
2. °C	Grados Celsius
3. mm.	Milímetros
4. °	Grados
5. Psi	Libras por pulgada cuadrada
6. UFC/ mL	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
7. µL	Microlitros
8. mL	Mililitros
9. cm.	Centímetros
10. p/V	Peso sobre volumen
11. kDa	Kilo Dalton
12. M	Molaridad
13. Xg	Fuerzas gravitacionales
14. N	Normalidad
15. L	Litros
16. µg/mL	Microgramos por mililitro
17. pH	Potencial de Hidrógeno
18. NH ₄ Cl	Cloruro de Amonio
19. nm.	Nanómetros
20. n	Tamaño de muestra
21. p	Valor de significancia
22. células/mL	Células por mililitro
23. mg	Miligramo
24. mm ³	Milímetros cúbicos
25. π	Pi
26. G	Del inglés “Gauge”

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El micetoma

El micetoma es una enfermedad infecciosa, inflamatoria, granulomatosa y crónica que puede ser causada por agentes fúngicos, y se denomina eumicetoma, o bacterianos, donde recibe el nombre de actinomicetoma [Fahal, 2004]. Esta enfermedad afecta a la piel, tejido subcutáneo y en casos graves o desatendidos, puede llegar a afectar estructuras profundas como las articulaciones y huesos [Zijlstra, 2016]. El micetoma típicamente se presenta como una tríada de signos característicos, los cuales consisten en la aparición de un edema subcutáneo similar a tumoraciones, formación de múltiples senos y fístulas en el tejido subcutáneo y la descarga de pus con granos, los cuales contienen el agente infeccioso en su interior como se muestra en la figura 1 [Hao, 2022 y Verma, 2019]. Cabe destacar que incluso en casos donde la enfermedad se presenta de manera extensa por el cuerpo, no se presentan manifestaciones sistémicas o la presencia de dolor. En algunos casos donde existe afectaciones a las regiones de tórax, cabeza o cuello, pueden observarse síntomas respiratorios o neurológicos [Welsh, 2007]. Esta enfermedad, si no recibe un tratamiento adecuado, puede llevar a consecuencias graves como la deformación de la zona afectada, discapacidad, amputación del área infectada o hasta la muerte [Hao, 2022].



Figura 1. Micetoma por *Madurella mycetomatis* con la tríada de signos característicos.

1.2 Etiología

Se han reportado más de 70 especies de hongos y bacterias como responsables del desarrollo de micetoma, aunque este número suele ir en aumento día a día con el avance de nuevas técnicas moleculares de identificación [Hao, 2022]. Uno de estos nuevos agentes etiológicos se ha descrito en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde a partir de un paciente mexicano diagnosticado con micetoma, y a través de secuenciación genómica completa del ADN de un aislado, se encontró una especie nueva del género de *Actinomadura*, denominada *Actinomadura Welshii* [Vera-Cabrera,2025].

Los agentes etiológicos de esta enfermedad suelen ser saprófitos del suelo o de las plantas [Relhan, 2017]. Cerca del 90% de los micetomas de origen fúngico, ocurren por cuatro tipos de agentes causales que incluyen *Madurella*

mycetomatis, *Scedosporium apiosermum*, *Trematosphaeria grisea* y *Leptosphaeria senegalensis* [Hao, 2022]. El micetoma bacteriano, llamado actinomicetoma, es causado por especies aerobias que pertenecen principalmente a los géneros de *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura*, donde *Nocardia brasiliensis*, *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae* son las especies más frecuentes [Relhan, 2017; Husain, 2023]. Una de las primeras metodologías de clasificación que se llevó a cabo para los micetomas fue a través de la coloración de sus granos, donde coloraciones blancas, amarillas, o rojizas solían relacionarse principalmente a un agente bacteriano, mientras que los de color negro solían asociarse a micetoma de origen micótico [Relhan, 2017].

TABLA 1

Agentes etiológicos de micetoma.

Eumicetoma		Actinomicetoma
<i>Trematosphaeria grisea</i>	<i>Cylindrocarpon cyanescens</i>	<i>Streptomyces somaliensis</i>
<i>Madurella mycetomatis</i>	<i>Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Actinomadura madurae</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Leptosphaeria senegalensis</i>	<i>Actinomadura pelletieri</i>
<i>Exophiala jeanselmei</i>	<i>Leptosphaeria thompkinsii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>Pseudallescheria boydii</i>	<i>Polycytella hominis</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pseudochaetosphaeronema Larense</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>

TABLA 1 (Continúa)

<i>Fusarium solani</i>	<i>Pyrenochaeta mackinnonii</i>	<i>Nocardia caviae</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	<i>Nocardia farcinica</i>
<i>Phialophora verrucosa</i>	<i>Neotestudina rosatii</i>	<i>Nocardia transvalensis</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Plenodomus avramii</i>	<i>Nocardia dassonvillei</i>
<i>Curvularia geniculata</i>	<i>Acremonium falciforme</i>	
<i>Curvularia lunata</i>	<i>Acremonium kiliense</i>	
<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Acremonium recifei</i>	

Fuente: Husain, U., 2023

1.3 Patogénesis del micetoma

Los patógenos causantes de micetoma se encuentran en el suelo principalmente, aunque pueden ubicarse en plantas, principalmente en espinas. Estos ingresan al cuerpo humano a través de la destrucción de la impermeabilidad de la principal barrera física del cuerpo humano, que es la piel, esto principalmente por picaduras de astillas de madera, espinas de las plantas o heridas accidentales previas que dejan al descubierto las capas inferiores de la piel inoculando al agente etiológico y haciendo que el microorganismo prolifere en los tejidos subcutáneos. Esto induce una respuesta inflamatoria, tanto de manera local como sistémica en el huésped [Hao, 2022]. El período de incubación puede variar desde 3 meses hasta 9 años dependiendo el agente [Husain, 2023].

Si bien se ha encontrado la presencia de anticuerpos contra estos agentes causales en un número de individuos, son pocos los que desarrollan la enfermedad y esto se puede atribuir a diversos factores de los patógenos como del huésped. Existen condiciones que predisponen al desarrollo de la enfermedad como lo son un estado de salud mermado, la presencia de comorbilidades como diabetes o estar en estado de desnutrición, que pueden derivar en una infección invasiva y con mayor diseminación [Relhan, 2017]. Así mismo, la genética puede llegar a tener un papel en el desarrollo de la afección [Verma, 2018].

La enfermedad no se transmite de persona a persona, aunque familiares de un individuo con micetoma que habitan la misma zona tienen una mayor probabilidad de desarrollarla; los factores ambientales compartidos, la predisposición genética o inmunológica podrían influir en el aumento de la susceptibilidad. A pesar de considerarse la inoculación del agente causal en la zona afectada como la principal vía de ingreso, el antecedente de traumatismo está presente en solo un tercio de los casos [Jerez, 2012]. El micetoma no tiene vector ni reservorio animal conocido, aunque se ha encontrado la presencia de micetoma en diversas especies animales [Ziljstra, 2016].

1.3.1 Factores del patógeno

Si bien algunos de estos agentes etiológicos como *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova* y *Nocardia cyriacigeorgica* afectan principalmente a pacientes inmunosuprimidos, otras afectan a individuos inmunocompetentes, como el caso

de *Nocardia brasiliensis*; esto se le atribuye a que tiene la capacidad de sobrevivir a la primera línea de la respuesta inmune innata de los fagocitos [Relhan, 2017]. Algunos resultados de estudios han demostrado que *Nocardia brasiliensis* es resistente a ciertas α -defensinas, péptidos de neutrófilos humanos 1–3, β -defensina-3 humana y catelicidina LL-37 [Ziljstra,2016]. Otras adaptaciones que se han encontrado en los agentes etiológicos son que, tras la inoculación inicial, el microorganismo modifica su pared celular e induce la producción de melanina que lo protege de la destrucción por métodos físicos como rayos UV, como el caso de *Madurella mycetomatis* [Ziljstra, 2017], así como la lisis de los tejidos infectados a través de enzimas y oxidantes [Relhan, 2017].

1.3.2 Factores del huésped

Dado que en áreas endémicas el micetoma se observa con mayor frecuencia en ciertas familias, pareciera que existen factores ambientales o genéticos relevantes en el desarrollo de esta enfermedad [Fahal, 2012]. Aquellos ligados a la genética y a la susceptibilidad hacia los microorganismos se muestran en un estudio de Verwer *et al.* donde descubrieron que una enzima, quititriosidasa, se une a la quitina del hongo en el grano del micetoma, explicando como la respuesta inmune elimina el patógeno. Un polimorfismo que disminuye la actividad de la quititriosidasa se asoció con una mayor probabilidad de eumicetoma [Verma,2018]. Así mismo, estudios de asociación genética en Sudán utilizando controles sanos y pacientes con micetoma mostraron que existen diferencias significativas en los tipos de HLA entre grupos, así como en la

distribución de alelos de genes asociados con la respuesta inmune y la síntesis de hormonas sexuales [Ziljstra, 2016]. En uno de los estudios, se analizaron polimorfismos de un solo nucleótido en genes relacionados con la función de neutrófilos en la enfermedad, destacando 11 polimorfismos en ocho genes con diferencias en aquellos que codifican para IL-8 o CXCL8, su receptor específico, CXCR2, así como para TSP4, NOS2 y CR1. En los pacientes con micetoma, se observaba una mayor producción de IL-8 y se confirmó con niveles altos en suero. Por otra parte, para NOS2 se encontró menor producción de óxido nítrico y en suero de manera indirecta a través de menores cantidades de nitrito y nitrato. También se estudió el papel de IL-1 y CCL5 en la formación de granulomas del micetoma, identificando variaciones genéticas, entre los alelos de los pacientes afectados y los de controles sanos [Fahal, 2013 y Mahmoud, 2013].

Dentro de los factores ambientales, se sabe que las áreas endémicas se caracterizan por ser moderadamente áridas, de humedad baja y una temporada corta de lluvias. Un estudio por el centro de investigación de micetoma de la Universidad de Khartoum profundizó estos análisis para identificar la prevalencia del micetoma por predictores ambientales y relacionar las áreas donde estos se encuentran. Se estudiaron datos demográficos y clínicos de 6,983 pacientes confirmados con micetoma atendidos entre 1991 y 2018; y utilizando algoritmos de modelado, así como regresiones y *Machine Learning* se estudió la relación entre ocurrencia del micetoma y factores ambientales. Para el eumicetoma, los factores más relevantes incluyeron el índice de aridez, concentración de calcio en el suelo, humedad, temperatura diurna media, la proximidad al río más

cercano, presencia de ganado, que incluye vacas, cabras y pollos, y de los árboles *Acacia mellifera* y *Faidherbia albida*. Para el actinomicetoma, los predictores incluyeron índice de aridez, distancia al río y a cuerpos de agua como lagos o estanques, humedad, concentraciones de sodio y hierro en suelo, la presencia de ganado, principalmente vacas y ovejas, y la temperatura media del trimestre más frío del año. La proximidad al agua fue el principal factor, seguido por la temperatura media del trimestre más frío del año (18-25 °C) y la baja concentración de sodio en suelos áridos [Fahal, 2023].

1.4 Respuesta inmune frente al micetoma

Tres tipos de reacciones en tejidos se reconocen en la patología del micetoma que pueden llegar a coexistir y se observan similares a las que se encuentran en la tuberculosis [Ziljstra, 2016]. Las células del sistema inmunológico innato intentan fagocitar e inactivar estos organismos, pero en el avance de la enfermedad finalmente no logran alcanzar este objetivo [Relhan,2017]. La reacción de tipo 1 se caracteriza porque el grano está rodeado por neutrófilos, que en ocasiones pueden invadir su interior y fragmentarlo. Afuera de esta zona, ubicamos otra región de tejido granuloso que contiene macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. En la periferia se encuentra un tejido fibroso con células mononucleares. Hay una presencia también de arteriolas hipertrofiadas y las células nerviosas muestran edema; así como las glándulas sudoríparas; este fenómeno se llama *Splendore-Hoepli* [Ziljstra, 2016 y Hao,2022]. En las reacciones de tipo 2, el tejido difiere, ya que los neutrófilos han desaparecido y

los macrófagos, así como las células multinucleadas empiezan a fagocitar el material del grano. En la reacción de tipo 3, se observa un granuloma bien organizado con células gigantes de Langhans y en el centro se observa el material remanente. A pesar de estas respuestas inflamatorias, no se puede eliminar los granos. También las células gigantes pueden contener hifas con la capacidad de formar nuevos granos [Ziljstra, 2016]. Es importante mencionar que los tres tipos de manifestaciones no son eventos separados, ya que ocurren en tiempos similares, pero reflejan las diferentes etapas de la patogénesis del micetoma agudo a crónico [Hao,2022]. Dentro de los nódulos linfáticos cercanos, se observa la presencia de los gránulos y neutrófilos, que conservan la arquitectura normal del tejido; sin embargo, en casos avanzados el tejido fibrótico reemplaza al tejido linfoide; además, se encuentran células plasmáticas con cuerpos de Russell [Ziljstra, 2016].

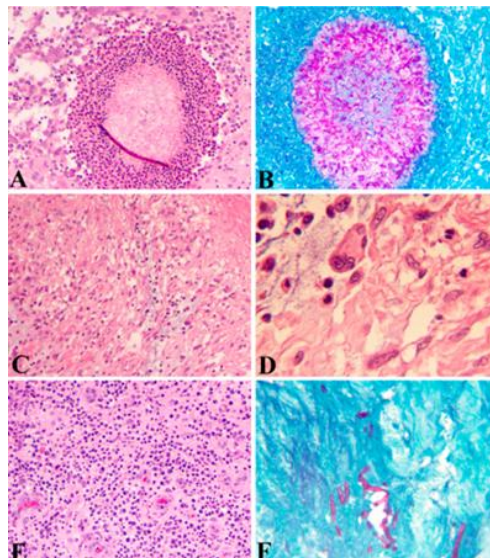


Figura 2. Tipos de respuesta inmune frente al micetoma. (A) Elementos fúngicos rodeados por neutrófilos y posteriormente por células plasmáticas,

macrófagos, linfocitos, eosinófilos y vasos sanguíneos. (B) Tinción de PAS mostrando elementos fúngicos. (C) y (D) Macrófagos y células gigantes de Langerhans predominantes en un granuloma. (E) Granulomas epitelioides que contienen linfocitos, células plasmáticas y células epitelioides, además de vasos sanguíneos proliferados. (F) Tinción PAS mostrando una pequeña cantidad de elementos fúngicos en un granuloma.

Se demostró mediante técnicas de inmunohistoquímica que la zona de reacción tipo I mostró tinción positiva para CD15, es decir neutrófilos; en la zona II fue positiva para CD68, macrófagos, y CD3 correspondiente a linfocitos T; mientras que la zona III contenía células CD20+ que suelen ser linfocitos B. En la reacción de tipo II, no se observó la presencia de neutrófilos, y los granos estaban rodeados por macrófagos y células gigantes de Langhans. Esto fue confirmado por inmunohistoquímica, que también mostró la presencia de células CD3+. Se detectaron IgG, IgM y complemento en la superficie del grano y en los filamentos dentro del mismo [Fahal,2003]. Dentro del actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis* se encontró que neutrófilos y macrófagos cercanos al agente causal tienen una expresión aumentada y persistente de TLR2, así como una expresión de TLR4 en las etapas principales, que desapareció en las etapas posteriores [Ziljstra, 2017].

1.4.1 Respuesta inmune celular del micetoma

Las respuestas de Linfocitos T parecen tener una importancia en el desarrollo del micetoma. La respuesta tipo Th2, aquella mediada por IL-10 e IL-4, se ha

encontrado en las lesiones y en nódulos linfáticos de la infección por *Streptomyces somaliensis*. Los macrófagos estimulados con conidios vivos de *Pseudallescheria boydii* también inducen una respuesta tipo Th2; mientras que las hifas inducen una respuesta Th1. La infección experimental por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c provoca el desarrollo de una lesión después de 30 días, con senos, microabscesos y gránulos causados por la expresión de interleucina 10 [Zijlstra, 2016]. Los linfocitos Th2 y las citocinas asociadas desempeñan un papel importante en la activación y diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas para la producción de anticuerpos, así como en la generación de células B de memoria [Hao, 2022]. La respuesta Th1 se encuentra en la fase aguda de la infección y en individuos sanos de áreas endémicas [Zijlstra, 2016]. Las citocinas de la respuesta tipo Th1 en suero, que incluyen IFN- γ , TNF- α e IL-2, se encontraron aumentadas en pacientes infectados con *Madurella mycetomatis*, en comparación con el grupo de control. Las células T CD4+ de tipo Th1 y sus citocinas asociadas están principalmente involucradas en la activación de la fagocitosis [Hao,2022].

1.4.2 Respuesta inmune humoral del micetoma

Los anticuerpos también desempeñan un papel en la patogénesis; en ratones BALB/c inmunocompetentes, los de isotipo IgM indujeron una protección específica en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*. Esta respuesta inmunitaria estuvo restringida a IgM, ya que IgG no mostró un efecto protector [Salinas-Carmona, 2004]. Se postula que la desaparición de los anticuerpos IgM

y la aparición de IgG explican el inicio lento y el retraso en el desarrollo del actinomicetoma experimental [Relhan, 2017].

La demostración de la presencia de anticuerpos contra el organismo causante puede ser de valor diagnóstico. La serodiagnos es de gran ayuda en la identificación y clasificación de los organismos, esencial para el tratamiento médico y el seguimiento de estos pacientes; el diagnóstico serológico presenta muchas ventajas sobre las técnicas de cultivo e histopatología, ya que ambas requieren una biopsia, lo que podría favorecer la diseminación del organismo [Fahal, 2003]. Una prueba ELISA descrita por Salinas Carmona y colaboradores ha sido útil en la confirmación clínica de micetoma por *N. brasiliensis* con infección activa, así como para estudiar la respuesta al tratamiento; esto ha llevado a que sea reconocida por la Organización Mundial de la Salud como la única prueba aprobada para diagnóstico del micetoma [Salinas-Carmona, 1993].

1.5 Epidemiología

Por diversas razones, siendo la principal la falta de un control epidemiológico debido a la naturaleza desatendida de la enfermedad, es difícil determinar la incidencia y la distribución geográfica precisa del micetoma [Fahal, 2003 y Verma, 2018]. Esta enfermedad afecta principalmente a sectores poblacionales desfavorecidos económicamente, en áreas rurales remotas de países tropicales y subtropicales entre las latitudes 30° Norte y 15° Sur, en una región denominada “Cinturón del Micetoma”; esta incluye países como Sudán, Somalia, Senegal, Yemen, India, México y Venezuela [Hao,2022].



Figura 3. Distribución del “Cinturón del Micetoma” en color verde claro y en verde oscuro países donde se ha reportado casos de micetoma.

La incidencia global del eumicetoma y el actinomicetoma no está distribuida equitativamente. El primero representa solo el 40% de los casos, mientras que el actinomicetoma, el 60% restante [Hao, 2022]. La distribución geográfica de los microorganismos causantes de manera individual es variable. Esta observación puede explicarse desde una perspectiva ambiental, incluyendo factores como las precipitaciones, la temperatura y la humedad [Fahal, 2023]. El eumicetoma es endémico de regiones secas que se caracterizan por tener un clima extremo, con periodos de lluvia cortos, estaciones secas prolongadas y temperaturas diarias que oscilan entre 45-60 °C durante el día y 15-18 °C por la noche, lo cual favorece la supervivencia de los patógenos causantes. En estas áreas, de la que destaca principalmente África, las infecciones fúngicas son responsables de más del 70 % de los casos de micetoma. El actinomicetoma es

más prevalente en regiones cálidas y húmedas, como América Central y del Sur. En México, del 92 al 96% de los casos de micetoma corresponden a actinomicetoma, causado principalmente por *Nocardia brasiliensis*, en el 78 % de los casos y *Actinomadura madurae* con un 9 - 10 % [Hao, 2022; Lopez-Martinez, 2013].

El micetoma puede afectar a todos los grupos de edades, sin embargo, ocurre con mayor frecuencia en hombres jóvenes en el rango de 20 a 40 años. En países de ingresos bajos y áreas endémicas, este grupo suele representar a los miembros más productivos de la sociedad. Ninguna ocupación está exenta, aunque los pastores y agricultores suelen ser los más afectados. Además, el micetoma es poco común en niños, que representa entre el 3.0 % y el 4.5 % de todos los casos en zonas endémicas [Ziljstra, 2017]. Debido a que la afectación ocurre en sectores poblacionales económicamente desfavorecidos, en zonas geográficas de remoto o difícil acceso, así como a la poca preparación del personal de salud y de las instalaciones médicas. Todo esto agregado a que la enfermedad es de carácter crónico y al desenlace discapacitante que suele tener, han hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasifique como una “Enfermedad Tropical Desatendida” [Verma, 2018].

1.6 El género *Actinomadura*

Son un conjunto de microorganismos que pertenecen al orden de los actinomicetales, y tienen como características principales el ser bacterias Gram-positivas, no ácido-alcohol-resistentes, con un metabolismo aerobio y no móviles,

que forman un micelio abundante y extenso, el cual no fragmenta; y que, en ocasiones, se pueden presentar hifas aéreas con cadenas hasta de quince esporas. Las actinomaduras son organismos quimioorganotróficos, con un metabolismo de los carbohidratos del tipo oxidativo, y que crecen en un rango de temperaturas de entre 10 y 60 °C. Su pared celular es de tipo III/B y está compuesta por un peptidoglucano con ácido meso-diaminopimérico, ácido N-acetilmurámico, y el peptidoglucano es de tipo ácido algínico. Se caracterizan por presentar en los hidrolizados totales los siguientes azúcares: galactosa, glucosa, manosa, ribosa y madurosa. Esta última se encuentra en pequeñas cantidades, y es característica de estos microorganismos. Su pared se conforma por fosfolípidos principales a los del tipo difosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. Las actinomaduras no contienen ácidos micólicos, y la relación G+C en su ADN es de 66-77 mol%. Las actinomaduras se encuentran principalmente distribuidas en los suelos [Serrano, 2001]. Este género se considera que tiene relevancia médica, y en la actualidad se le asocian 27 especies, de las cuales, *Actinomadura latina*, *Actinomadura madurae* y *Actinomadura pelletieri* son clínicamente importantes [Filippi, 2008].

El actinomicetoma causado por *Actinomadura* se caracteriza por una gran agresión a los tejidos donde se localiza, pudiendo llegar a producir lesiones importantes tanto a nivel de los tendones como de los huesos; esto debido a la capacidad de estos microorganismos de producir diversas sustancias con alta capacidad lítica de proteínas [Serrano, 2001 y Goodfellow, 1990].

1.6.1 *Actinomadura madurae*

La *Actinomadura madurae* fue aislada por primera vez por M. H. Vincent, en el año de 1894, en Argelia, de un caso de actinomicetoma. Este microorganismo fue denominado originalmente como *Streptothrix madurae*, y posteriormente fue clasificado dentro del género *Actinomadura* por Lacey, Goodfellow y Alderson [Serrano, 2001]. *Actinomadura madurae* es un microorganismo comúnmente aislado en áreas secas y a menudo tropicales [Bonifaz, 2021]. El hábitat natural de *Actinomadura madurae* es la tierra y los vegetales [Jerez, 2012]. En general, basta el examen en fresco para diagnosticar *Actinomadura madurae*. Sus granos son visibles a simple vista, con un tamaño de 1.5 a 2 mm, voluminosos, semiduros y fáciles de manipular, de color blanco o cremoso [Serrano, 2001].

El actinomicetoma debido a *Actinomadura madurae* es clínicamente indistinguible del eumicetoma; sin embargo, el de origen bacteriano es más agresivo, progresa rápidamente y tiende a ser inestable en comparación con el eumicetoma. La ubicación clínica principal incluye los miembros inferiores, particularmente los pies, que presentan la tríada clásica de signos y síntomas que son: edema y tumefacción indolora, con un proceso exudativo leve y fístulas que desarrollan una deformidad severa. El micetoma por *Actinomadura madurae* presenta afectación ósea, incluyendo periostitis, erosión ósea o cavitación [Bonifaz, 2021]. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que este agente causal se encuentra distribuido de manera homogénea en todo el mundo [van de Sande, 2013].

1.7 Micetoma en México

En 1912, Cicero reportó los primeros 5 casos de micetoma en México, y si bien se han hecho esfuerzos por difundir los conocimientos de esta enfermedad existe un bajo número de centros diagnósticos que ha limitado su capacidad de estudio. México es el país de Latinoamérica que registra el mayor número de casos de micetoma por año. El último estudio epidemiológico que se llevó a cabo en 11 centros diagnósticos distribuidos por todo el territorio de México, recopilando la epidemiología y describiendo diversos factores del micetoma se encontró que desde el año de 1954 y hasta 2012, se contabilizaron un total de 3933 casos, obteniendo un promedio total de 73 casos nuevos por año. También se encontró que la relación Hombre: Mujer de esta enfermedad era de 3:1, lo cual es concordante con diversa literatura a nivel global; este predominio se puede deber a factores, como los laborales, por su cotidiana exposición a estos agentes causales, incluso algunos autores mencionan el posible papel de hormonas sexuales en la capacidad del aumento o disminución de la presencia del agente causal.



Figura 4. Distribución del micetoma por género en México

Los grupos de edad donde se presentó la mayor incidencia fue entre las edades de 15 a 60 años, representando el 75% de los casos. Cabe señalar, que hubo un número importante de casos en los grupos de 0 a 15 años y de 61 a 80 años, si bien en estos grupos no es común que se presente, estos porcentajes son concordantes con la literatura global.

TABLA 2

Frecuencia de micetoma por grupos de edad

Edad (años)	n.º	%
0-15	132	3.94
16-30	1,172	35.00
31-40	747	22.32
41-50	616	18.40
51-60	392	11.70
61-80	290	8.64
Total	3,349	100.00

Fuente: Lopez-Martinez, 2013.

Los principales grupos laborales donde se registraron casos fueron los trabajadores del campo, siendo el 58% de los pacientes registrados, seguido por trabajadores del hogar de zonas rurales con un 22%, ya que estos dos grupos están expuestos hacia los agentes etiológicos con mayor facilidad, además de que el riesgo se aumenta debido a que estas personas en ocasiones no usan un calzado ni vestimenta que limite o proteja del riesgo de traumatismos.

TABLA 3**Ocupaciones de pacientes afectados por micetoma**

Ocupación	n.º	%
Campesinos	1,823	58.41
Amas de casa	680	21.79
Obreros	179	5.74
Estudiantes	127	4.06
Albañiles	99	3.13
Empleados	63	2.02
Comerciantes	48	1.53
Trabajadores de limpieza	40	1.28
Choferes	26	0.83
Profesionistas	10	0.32
Otros	28	0.89
Total	3,123	100.00

Fuente: Lopez-Martinez, 2013.

Se registró un total de 24 estados con presencia de casos de micetoma, y las 3 entidades federativas con mayor número de casos fueron en primer lugar el estado de Jalisco con un total de 676 casos, seguido de Morelos con 429 casos y Nuevo León registró un total de 347. Además, la región corporal más afectada fueron las extremidades inferiores con un 60% de los casos, seguido de la región del tronco y, por último, la extremidad inferior con un 20 y 13% respectivamente.

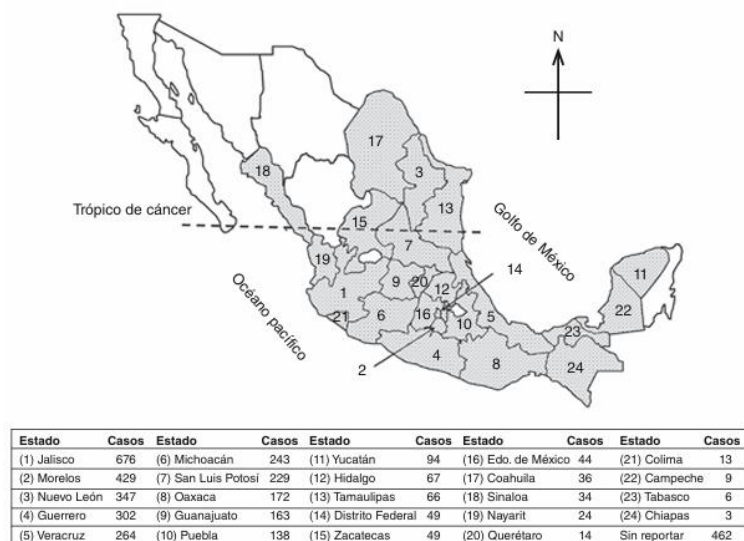


Figura 5. Distribución geográfica de casos por entidad federativa

TABLA 4

Localización del micetoma por región corporal

Localización	Casos	%
Extremidades inferiores	2,061	60.29
Tronco	675	19.76
Extremidades superiores	459	13.43
Cabeza y cuello	74	2.16
Dos o más regiones	149	4.36
Total	3,418	100.00

Fuente: Lopez-Martinez, 2013.

Así mismo se elucidó que en México, la principal causa de micetoma es de origen bacteriano, siendo *Nocardia brasiliensis* la principal etiología con el 65% de los casos, seguida de *Actinomadura madurae* con un 8-9% de los casos [Lopez-Martinez, 2013].

1.7.1 Micetoma por *Actinomadura madurae* en México

La primera vez que se describió un micetoma por *Actinomadura madurae* fue en 1894 por Vincent en un aislado de un paciente africano en Argelia. El micetoma que se forma por este agente etiológico produce granos de color blanco y blandos, que tienen medidas entre 1 y 10 mm. de diámetro, y se pueden identificar en examen directo por su tamaño y bordes característicos que se observa en la figura 6, y de forma más precisa, a través de cortes histopatológicos, donde se observan granos multilobulados con bordes festonados y una banda periférica que se tiñe intensamente de azul, con un centro sin color.



Figura 6. Biopsia de lesión de micetoma por *Actinomadura madurae* con grano característico en su interior.

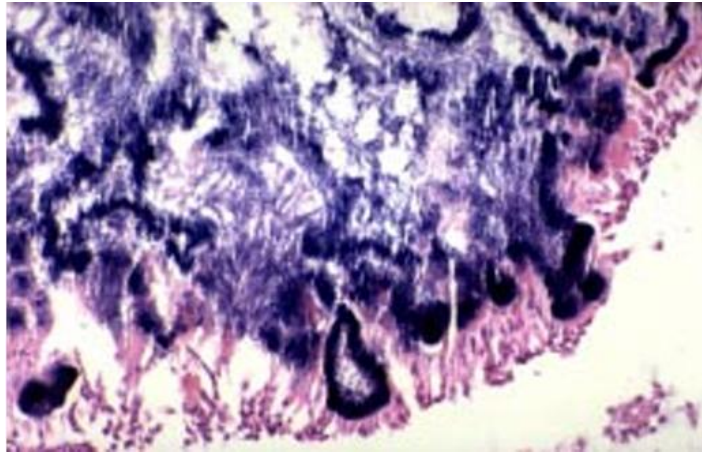


Figura 7. Corte histopatológico de Hematoxilina y Eosina de grano de *Actinomadura madurae*.

En 1949, se estudió el primer micetoma por este agente infeccioso en México, y actualmente, la estadística más reciente muestra que en este país, *Actinomadura madurae* representa hasta el 10% de los casos de micetoma. Desde una perspectiva clínica, el micetoma por *Actinomadura madurae* se localiza principalmente en la parte media del pie, y suele afectar la planta y bordes de este, a diferencia de otros agentes etiológicos.



Figura 8. Micetoma por *Actinomadura madurae*

Las localizaciones fuera de la región del pie son poco frecuentes, sin embargo, se ha encontrado micetoma en la región de las manos, espalda y tronco; además, en ocasiones es difícil encontrarlo por las pocas fístulas que puede formar y la forma voluminosa que genera el edema, el cual se asemeja a procesos tumorales de otro origen.

Una diferencia significativa entre el micetoma por *Actinomadura madurae* y otros agentes etiológicos es su predominio en el sexo femenino; mientras que los otros micetomas, en su conjunto, afectan en relación de 3 hombres por 1 mujer; en el caso de *Actinomadura madurae* la relación es de 2 mujeres a 1 hombre. El estado que presentó mayor frecuencia fue Guanajuato, seguido de Puebla y en tercer lugar Oaxaca.

TABLA 5

Distribución en México por estados del micetoma por *Actinomadura madurae*

MICETOMAS POR ACTINOMADURA MADURAE DISTRIBUCIÓN POR ESTADOS		
Guanajuato	23	(32.3%)
Puebla	9	(12.6%)
Oaxaca	8	(11.24%)
Michoacán	7	(9.8%)
Hidalgo	6	(8.4%)
Querétaro	3	(4.2%)
Jalisco	3	(4.2%)
Coahuila	2	(2.8%)
Sinaloa	2	(2.8%)
Guerrero	2	(2.8%)
Estado de México	1	(1.4%)
Ags, Chis, D.F., Dgo.		
N.L., Ver, Zac.	7	(9.8%)

Fuente: Lopez-Martinez, 2013.

En la distribución específica se encontró que hubo predominancia en el sexo femenino, a diferencia de la estadística global de todos los micetomas, con un 60.5% de los casos. En cuestión de edad, el rango más frecuente fue de 31 a 45 años con un 49% de los casos, y de 46 a 60 años con un 28%.

TABLA 6

Epidemiología del micetoma por *Actinomadura madurae*

MICETOMAS POR ACTINOMADURA MADURAE		
71 casos		
Sexo:		
Femenino	43	(60.5%)
Masculino	28	(39.4%)
Edad:		
0 - 15 a	0	
16 - 30 a	11	(15.4%)
31 - 45 a	35	(49.2%)
46 - 60 a	20	(28.1%)
60 o más	5	(7.0%)
Ocupación :		
Hogar	36	(50.7%)
Campeños	24	(33.8%)
Otros	11	(15.4%)

Fuente: Lopez-Martinez, 2013.

Las ocupaciones con mayor número de casos fue en primer lugar la del trabajo del hogar con un 50%, seguido por trabajadores del campo con un 33%. Además de que la localización más común del micetoma por *Actinomadura madurae* fue en la región del pie con un 93%.

TABLA 7

Localización corporal del micetoma por *Actinomadura madurae*

LOCALIZACIÓN DE MICETOMAS POR <i>ACTINOMADURA MADURAE</i>		
En el pie	66	(92.9%)
Espalda	2	(2.8%)
Otros (brazo,nalga)	2	(2.8%)
Doble localización pie e inguinal	1	(1.4%)

Fuente: Lopez-Martinez, 2013.

El esquema tradicional para el tratamiento de este actinomicetoma consiste en el uso de DDS y trimetoprim-sulfametoxasol, sin embargo, en casos graves donde hay un compromiso de estructuras óseas se ha utilizado kanamicina 15 mg/kg-peso/día, más trimetoprim-sulfametoxasol, durante 14 días, posteriormente se continúa con un periodo de descanso en el cual se administra DDS 100 mg al día, con trimetoprim-sulfametoxasol constituyendo un ciclo de 4 semanas [Aguilar, 2000].

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c

En el año de 1999, Salinas-Carmona y colaboradores, desarrollaron un modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c y describieron los cambios clínicos e histopatológicos similares a la enfermedad del humano. Para llevar a cabo este modelo experimental se utilizaron ratones BALB/c hembras y machos con edades de 9 a 12 semanas de edad. La cepa bacteriana para este trabajo fue *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 aislada de un paciente con actinomicetoma humano atendido en el Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Además, esta cepa fue confirmada por el Centers for *Disease Control and Prevention* de los Estados Unidos de América, y se mantuvo en cultivo en agar Sabouraud. Esta cepa está registrada con el código 700358 de la ATCC. La bacteria se cultivó en medio BHI (Infusión Cerebro-Corazón) y posteriormente se preparó una suspensión unicelular con una concentración de 10^7 UFC/ mL en la fase logarítmica de crecimiento de la bacteria. A los animales se les inyectó 100 μ L de la suspensión en solución salina sin adyuvante en el cojinete plantar posterior de los ratones. Los animales infectados fueron observados diariamente para evaluar la inflamación, así como la formación de abscesos, fístulas y

presencia de secreciones purulentas. Cada semana tras la infección, se sacrificó un grupo de 5 animales por dislocación cervical, hasta llegar a los 300 días de infección. Las extremidades afectadas se removieron para su estudio histopatológico. Dentro de la evolución clínica se encontró que la inflamación estuvo presente desde las primeras 72 horas después de la inyección de *Nocardia brasiliensis*; el diámetro promedio del cojinete plantar posterior antes de la infección era de 3 a 4 mm, alcanzando un máximo de 7 mm después de 3 días. El edema creciente continuó durante todo el periodo observado. La hiperemia y pequeños abscesos también estuvieron presentes hasta el día 14; y después, una clara disminución del edema en los siguientes 14 días, como se muestra en la figura 9.

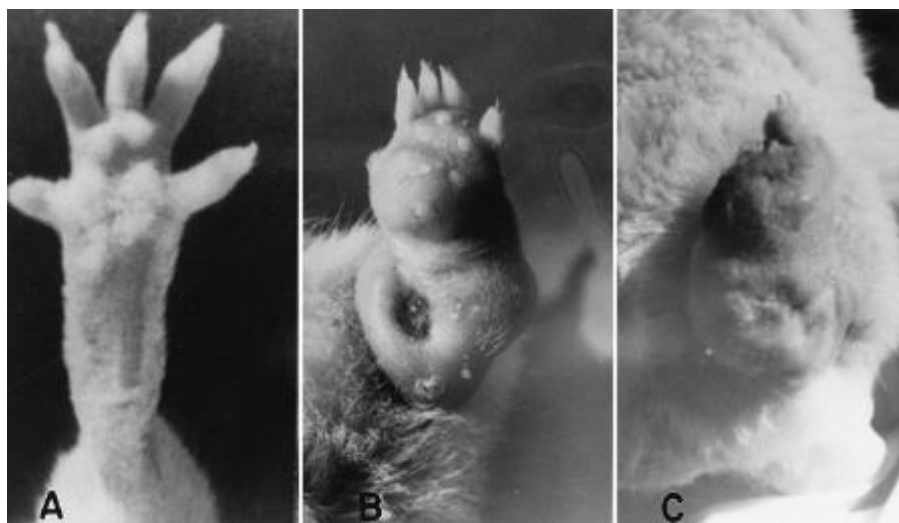


Figura 9. Evolución clínica del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

Se registraron signos de inflamación desde el día 1 hasta el 200 de la infección, utilizando la siguiente escala clínica para la evaluación:

+, para un edema leve; ++, cuando se observaba edema de 7 mm más absceso y ulceración; +++, cuando había la presencia de edema, abscesos y secreción de gránulos; +++, micetoma desarrollado. El 80% de los ratones infectados desarrollaron una lesión típica de micetoma similar a la que se observa en la figura 10 donde todos estos signos son evidentes; de igual forma la destrucción ósea también estuvo presente en la enfermedad crónica.



Figura 10. Lesión de micetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Para el estudio histopatológico, el material purulento obtenido de las lesiones de micetoma fue teñido en laminillas de vidrio utilizando fucsina carbólica de Kinyoun y azul de metileno. Este material se caracterizó por la presencia de células mononucleares y polimorfonucleares, además se encontraron abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes en agregados además

de una formación filamentosa. Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina de tejido embebido mostraron una intensa respuesta inflamatoria caracterizada por granulocitos altamente aglomerados en múltiples microabscesos con límites mal definidos durante los primeros 7 días después de la infección. Para el día 10, observaron un aumento en el número de macrófagos en la periferia de la lesión, así como macrófagos con una apariencia espumosa, como se observa en la infección de lepra. A los 30 días tras la infección, se observaron abscesos múltiples bien definidos claramente limitados por estos macrófagos espumosos, con micro colonias centrales de *N. brasiliensis*, como se muestra en la figura 11 [Salinas-Carmona,1999].

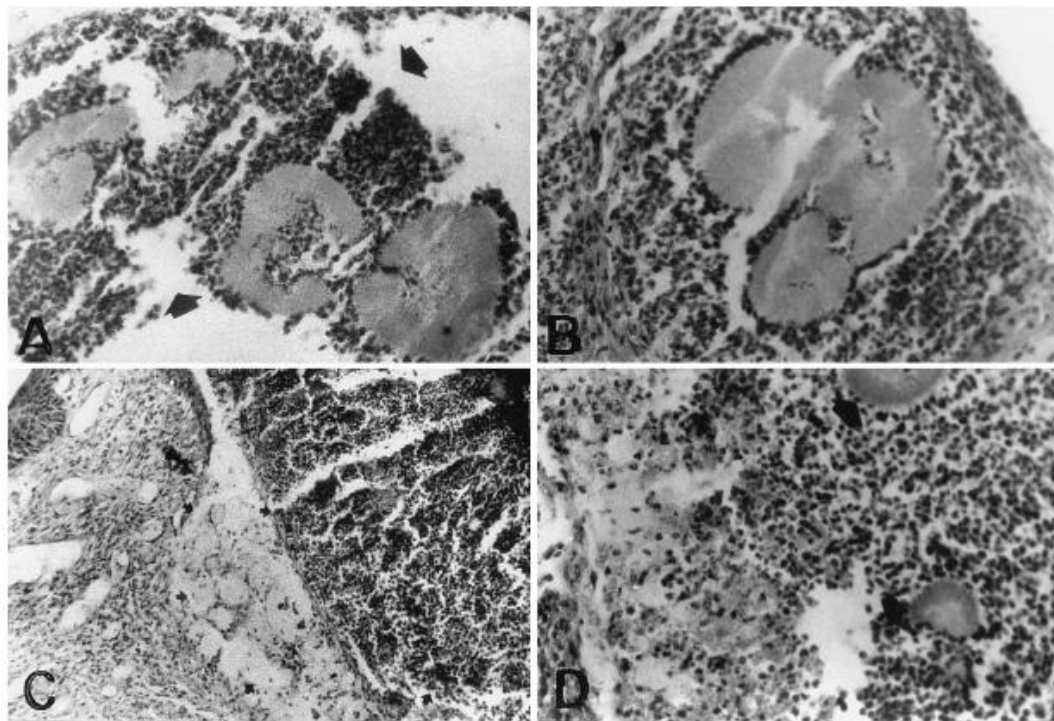


Figura 11. Evolución histopatológica del micetoma por *Nocardia brasiliensis*.

2.2 Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón

Hasta la fecha no se ha desarrollado un modelo experimental de micetoma por *Actinomadura madurae* que reproduzca la enfermedad del humano. En el año 2000, Palma-Ramos y colaboradores plantearon establecer un modelo experimental de infección basado en el desarrollado para *Nocardia brasiliensis*, donde la vía de administración fue el cojinete plantar, para acercarse a las condiciones naturales de la infección. Para esto, en 3 cepas de ratón (CFW, CD1 y BALB/c) se inyectaron 0.1 mL en el cojinete plantar de la extremidad inferior con diversas cepas de *Actinomadura madurae*: la primera fue obtenida del Grupo Internacional de Investigación de Actinomicetos Patógenos (GIIAP1), una segunda cepa ATCC (19425) y granos provenientes de un paciente humano infectado con *Actinomadura madurae* lavado con solución salina estéril. El esquema de inoculación utilizado se muestra en la tabla 8.

TABLA 8

Esquema de inoculación de *Actinomadura madurae*

CUADRO I. ESQUEMA DE INOCULACIÓN				
Lote	A. Madurae	No. de dosis 3000 x 10 ⁸ UFC/mL	No. de dosis 600 x 10 ⁸ UFC/mL	No.
CFW	GIIAP1	1		
	GIIAP1	2		
CD1	GIIAP1	1		
	GIIAP1	2		
Balb/c	GIIAP1		1	
	ATCC 19425		1	
	Granos			1

Específicamente en ratones BALB/c, no se observa diferencia en el aumento de tamaño de los cojinetes de los animales independientemente de la cepa de microorganismo utilizada, ya que desde la semana 1 se alcanza el máximo diámetro (0.4 cm) y a partir de la semana tres este disminuyó y se mantuvo el mismo valor hasta el final del experimento. También se inoculó un lote de ratones con granos provenientes de un paciente con actinomicetoma por *A. madurae* los cuales fueron administrados vía cojinete plantar en solución salina isotónica. La respuesta de los animales a esta forma de inoculación presentó aumento de volumen de la pata, únicamente durante una semana, ya que la dimensión del pulpejo regresó a sus niveles normales a partir de la segunda semana como se observa en la figura 12 [Palma-Ramos, 2000].

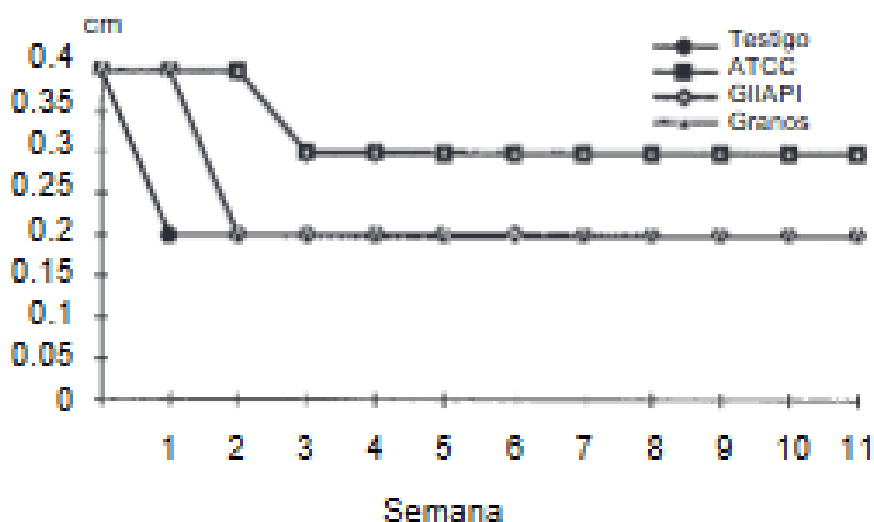


Figura 12. Dimensión del cojinete plantar de ratones BALB/c inoculados con *A. madurae*.

2.3 ELISA diagnóstico para *Nocardia brasiliensis*

En 1996, derivado de la poca información sobre el uso de serología en el diagnóstico rutinario de infecciones por *N. brasiliensis* y debido a que el diagnóstico se basaba en hallazgos clínicos y cultivos microbiológicos, que pueden tardar más de dos semanas debido al crecimiento lento de estos microorganismos, Salinas-Carmona y colaboradores describen una ELISA usando como antígeno las proteínas de 26 y 24 kDa de *Nocardia brasiliensis* para el diagnóstico serológico y su utilidad para el monitoreo de la respuesta durante el tratamiento.

Se utilizó la cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para obtener un extracto crudo. La bacteria se cultivó en medio BHI durante 7 días a 37 °C sin agitación. Luego, se recolectó y se deslipidizó con una mezcla de etanol-éter en dos etapas, 1:1 y 1:3 y se secó al vacío. La biomasa obtenida se trituró con polvo de vidrio y se suspendieron en una solución de Tris-HCl con acetato de magnesio, agitándose magnéticamente durante la noche a 4 °C. Las células intactas se eliminaron por centrifugación a 1,200 ×g durante 15 minutos, y el sobrenadante se ultra centrifugó a 144,000 ×g por 3 horas. Finalmente, se dializó contra agua destilada durante 24 horas a 4 °C, obteniendo un sobrenadante amarillo claro, que fue liofilizado y almacenado a -20 °C. Se aislaron dos antígenos inmunodominantes del extracto crudo de *Nocardia brasiliensis* en dos etapas. Primero, para eliminar la reactividad cruzada con antígenos micobacterianos, el extracto crudo se disolvió en PBS y se precipitó con sulfato de amonio. Tras

centrifugación, el precipitado se descartó, y el sobrenadante se dializó contra solución salina durante 4 días a 4 °C y se liofilizó. En la segunda etapa, la muestra liofilizada se reconstituyó en PBS y se trató con DNasa I, luego se centrifugó, se dializó contra agua destilada por 24 h a 4 °C y se aplicó a una columna Sephadex G-100 equilibrada con PBS. Se recolectaron fracciones de 2 mL y se midió su absorbancia a 280 nm, utilizando marcadores de peso molecular para calibración.

Se realizó la ELISA en placas de poliestireno de 96 pozos siguiendo el método de Engvall y Perlmann con modificaciones. Los antígenos purificados de 26 y 24 kDa, a una concentración de 0.5 µg/pozo, se incubaron a 4 °C durante la noche. Tras lavados con PBS-Tween 20, se bloqueó con leche descremada al 5% y se incubó con sueros de pacientes y controles a una dilución 1:500 a 37 °C por 1 h. Luego, se añadió anticuerpo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa y se incubó por otra hora. Se usó o-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno como sustrato cromogénico y ácido sulfúrico 1 N como reactivo de detención. La absorbancia se midió con un lector de placa a 492 nm. Como resultados, se detectaron valores de absorbancia iguales o superiores a 0.3 en 26 sueros correspondientes a pacientes con diagnóstico activo de *Nocardia brasiliensis*. Por otra parte, los sueros de individuos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y *leprae*, 53 en total, presentaron valores por debajo de esta absorbancia. De los 30 casos de micetoma, 29 superaron el punto de corte, 0.3, mientras que solo un suero, de un paciente con micetoma por *Actinomadura madurae*, mostró un valor ligeramente inferior lo cual demostró la capacidad específica de detección de esta prueba serológica. En el grupo control sano, un suero presentó una absorbancia

por encima de 0.3; correspondiente a un estudiante de posgrado que había trabajado durante tres años en la purificación de antígenos de *Nocardia brasiliensis*, aunque estaba clínicamente sano. La tabla de resultados se muestra en la figura 13 [Salinas-Carmona, 1993].

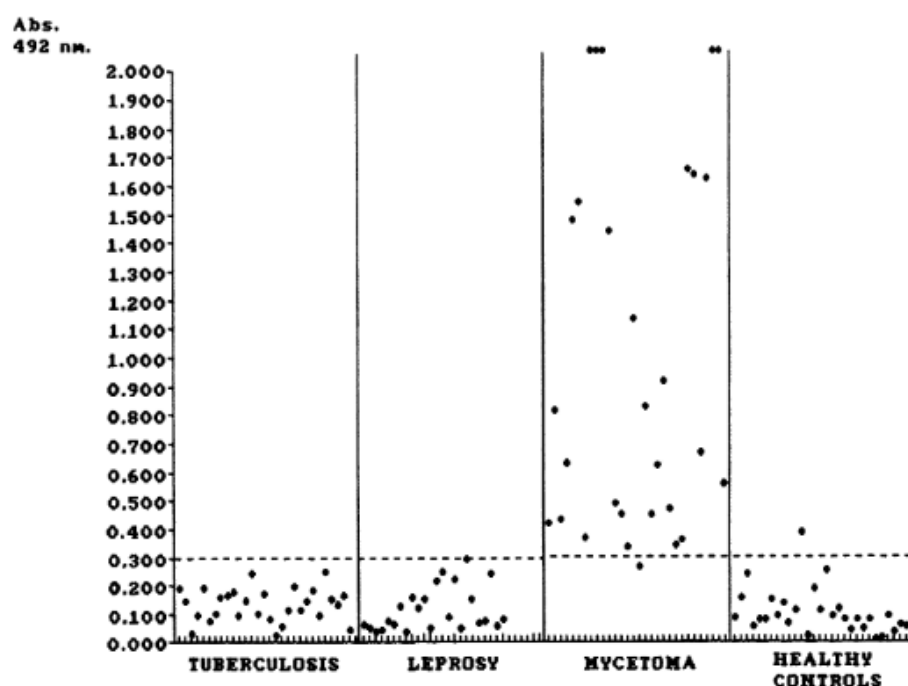


Figura 13. Concentraciones de anticuerpos anti-*Nocardia brasiliensis*.

2.4 Determinación de anticuerpos de *Actinomadura madurae* en Sudán

En el año de 1983, en Sudán se midieron anticuerpos en suero de habitantes de un área endémica para dos agentes etiológicos de micetoma, *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae*. Para realizar esto, se cultivó el microorganismo en un medio de cultivo líquido, se disgregó el crecimiento cosechado, se centrifugó, y el sobrenadante se liofilizó. Se utilizaron los siguientes grupos a los cuales se les obtuvo suero:

1. 160 sudaneses que vivían en Gezira.
2. 40 sudaneses que vivían en Jartum, sin evidencia de infección por micetoma, ni exposición a áreas de alta prevalencia de micetoma.
3. 10 pacientes infectados con *Streptomyces somaliensis*.
4. 10 pacientes infectados con *Actinomadura madurae*.
5. 10 europeos que nunca habían viajado al extranjero.

Los sueros fueron almacenados en congelación a -20 °C, se utilizaron los procedentes de los dos grupos de pacientes con diagnóstico de micetoma como control positivo y los de individuos europeos sirvieron como control negativo, como se observa en la tabla 9. Se utilizó el procedimiento ELISA descrito por Voller y colaboradores en 1976, donde se puede observar que en todos los pacientes con diagnóstico establecido se puede detectar la presencia de anticuerpos anti-*Actinomadura madurae*; sin embargo, no es posible utilizarla como una técnica de diagnóstico diferencial al presentar reacciones cruzadas con *Streptomyces somaliensis*, además de determinar el umbral de detección de manera arbitraria como se observa en la tabla 10 [Taha, 1983].

TABLA 9

Presencia de anticuerpos según cada grupo experimental

Category	Antigen			
	<i>S. somaliensis</i>		<i>A. madurae</i>	
	No. with antibodies	No. tested	No. with antibodies	No. tested
Group (i)				
Men	10		6	
Women	1		1	
Total	11	160	7	160
Group (ii)	1	40	0	40
Groups (iii) & (iv)	10	10	10	10
Group (v)	0	10	0	10

Fuente:Taha,1983

TABLA 10

Promedios de densidad óptica por grupo experimental

O.D.	Group (i)		Group (ii)	Group (iii)	Group (iv)
	<i>S. somaliensis</i>	<i>A. madurae</i>			
0.5	148	153	39	0	0
0.5-0.75	7	5	1	5	6
0.76-1	3	2	0	3	4
>1	2	0	0	2	0
Total	160	160	40	10	10

Fuente:Taha,1983

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El micetoma por *Actinomadura madurae* es una enfermedad infecciosa, crónica y discapacitante, si no es tratada, de la cual aún no se comprende su inmunopatología. La infección única no induce micetoma; se necesita un modelo experimental con reinfecciones que reproduzca la enfermedad del humano y permita estudiar la respuesta inmune, así como los mecanismos inmunopatológicos involucrados.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La reinfección con *Actinomadura madurae* induce micetoma en ratones BALB/c y anticuerpos específicos.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollar un modelo experimental de micetoma por reinfecciones con *Actinomadura madurae* en ratones BALB/c.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las condiciones de infección con *Actinomadura madurae* para inducir micetoma en ratones BALB/c y estudiar la evolución clínica de la infección.
2. Estudiar la histopatología del tejido infectado.
3. Estandarizar una técnica de ELISA para determinar anticuerpos específicos durante la etapa aguda y crónica de la infección.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales de Experimentación

En este estudio se utilizaron un total de 25 ratones BALB/c machos de 12-14 semanas de edad, con pesos entre los 24-30 g. Los animales de experimentación permanecieron todo el tiempo en condiciones libres de patógenos; los ratones vivieron dentro de cajas de plástico acrílico con una capa de encamado de aserrín previamente esterilizado en autoclave bajo calor húmedo a 121 °C a 15 psi. La temperatura de las cajas se mantuvo en un rango de 20-25 °C y su alimentación consistió en LabDIET (Purina), así como agua destilada estéril *ad libitum*. La iluminación fue 12/12 controlada automáticamente, en cumplimiento de la normativa mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Los ratones permanecieron almacenados en el área de reproducción y experimentación del bioterio perteneciente al Departamento y Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Cepa Bacteriana

La cepa utilizada para el presente proyecto es *Actinomadura madurae* y fue gentilmente proporcionada por el Dr. José Alexandro Bonifaz Trujillo de un paciente diagnosticado con micetoma por *Actinomadura madurae*; así mismo,

fue identificada por el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de manera molecular a través de amplificación de 16 s RNA con los primers NOC3 y NOC4. La cepa fue cultivada en un tubo de medio inclinado con agar sangre; y expandida en placas Petri con agar BHI (Infusión Cerebro Corazón), que fueron incubadas a 37 °C hasta observar crecimiento. Posteriormente, se transfirieron las colonias a caldo BHI e incubadas en baño de agua a 37 °C con agitación constante a 75 RPM.

6.3 Ensayo de Curva de Crecimiento

De un caldo de cultivo de 5 días de crecimiento, se tomaron 500 µL con pipeta automática y puntilla estéril, y se agregaron a un potter estéril con 5 mL de solución salina estéril adicionada con Tween-80 0.05% p/v. Se maceró el contenido del potter con pistilo hasta homogeneizar el inóculo y obtener una suspensión homogénea. Se tomó 100 µL de la muestra y se sembró en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de medio BHI (Becton Dickinson; BIOXON 211200, México). El matraz se colocó en baño en agua a 37 °C y 75 RPM de agitación constante. Cada 24 horas, se tomaron 1000 µL de medio del matraz en agitación y se agregaron a potter estéril, posteriormente la muestra se maceró hasta obtener una suspensión homogénea. De la muestra macerada, se tomó 100 µL y se agregó a tubos Eppendorf estériles con 900 µL de solución salina estéril. A partir de aquí se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ... 10^{-n}).

Se tomaron 50 mL de los tubos Eppendorf que fueron sembrados en placas con agar BHI y se extendieron con asas de Drigalsky estériles para extender las colonias. Las placas se dejaron 30 minutos al interior de la campana de flujo laminar o hasta que se observó que se secaron; posteriormente se dejaron en incubación a 37 °C. A las 24 horas se llevó la placa a un contador para observar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias; si las placas mostraban un número incontable de colonias en la dilución menor, se ajustó la dilución mayor hasta llegar al día 8. Este ensayo se hizo por triplicado y en 2 ocasiones independientes.

6.4 Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo, se siguió la siguiente metodología: A partir de un cultivo de crecimiento óptimo de *Actinomadura madurae* en caldo BHI obtenido previamente en el Ensayo de Curva de Crecimiento, se recolectó el contenido del matraz en tubos cónicos estériles de 50 mL dentro de la campana de flujo laminar; se centrifugaron a 3000 RPM durante 5 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y el pellet de la masa bacteriana se resuspendió hasta 50 mL con solución salina estéril dentro de la campana de flujo para preservar la esterilidad. Este proceso se repitió en 4 ocasiones para retirar cualquier remanente del medio de cultivo. Tras la última decantación, se colocó el pellet dentro de un potter estéril para su macerado, hasta lograr una suspensión homogénea sin grumos de masa bacteriana. El macerado se colocó de nueva cuenta en un tubo estéril previamente pesado y se centrifugó para obtener el peso húmedo. Se

hicieron los cálculos necesarios para ajustar la concentración del inóculo a 20 mg/ 50 μ L.

6.5 Esquema de infección

Para este proyecto, se propuso realizar la inducción del micetoma por *Actinomadura madurae* a través de reinfecciones en el cojinete plantar posterior, para lo cual se seleccionaron 5 grupos de ratones previamente descritos con una n = 5 animales por grupo.

1. Grupo infectado con una sola dosis
2. Grupo reinfectado cada 7 días, un total de 12 dosis.
3. Grupo reinfectado cada 15 días, un total de 11 dosis.
4. Grupo reinfectado cada 30 días, un total de 5 dosis.
5. Grupo inoculado con Solución Salina estéril en una sola ocasión.

Con el inóculo se llenaron jeringas estériles de 1 mL sin aguja y se verificó que no contuviera aire en el interior, se colocó una aguja naranja (25 G) en la jeringa y se purgó antes de realizar la inoculación de 50 μ L en el cojinete plantar.

6.6 Evolución Clínica

Antes de la infección y cada tercer día, se midió el largo, ancho y alto de la región infectada, es decir el cojinete plantar posterior, con un vernier manual. durante 170 días, para observar y registrar el volumen de la inflamación, y la aparición de lesiones características del micetoma. El cálculo del volumen de la extremidad infectada se llevó a cabo a través de la fórmula de la elipse:

$$V = \left(\frac{\pi}{6}\right) * Largo * Ancho * Alto \quad (1)$$

Estos datos se calcularon con cada medición, así mismo cada semana se tomaron fotografías de las extremidades infectadas para llevar un control visual y evaluar el progreso de la infección de manera cualitativa con la siguiente escala mostrada en la tabla 11.

TABLA 11

Escala de signos de inflamación en micetoma por *Actinomadura madurae*

	+	++	+++	++++
Signos de Inflamación	Edema	Edema úlceras y abscesos	Edema, Úlcera, abscesos y descarga de material purulento	Micetoma desarrollado

6.7 Obtención de sueros

En los días 5 y 45 postinfecciones se obtuvo muestras de sangre de todos los ratones. El procedimiento se llevó a cabo después de anestesiarse a los animales con 5 µL de anestésico Zoletil 100, por punción en el plexo venoso retro-orbitario del ratón con una pipeta Pasteur estéril. La sangre se recolectó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 3,500 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente, y el suero se recuperó en alícuotas de 100 µL que fueron almacenadas en ultracongelador a –80° C para su posterior uso.

6.8 Sacrificio de animales

El sacrificio se llevó a cabo mediante sobredosis de anestesia por vía intraperitoneal utilizando Zoletil 100. Una vez que se dejó de observar actividad respiratoria por parte de los animales debido al efecto del analgésico, se llevó a cabo una dislocación cervical para garantizar una terminación humana e indolora de los ratones. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normativas éticas (NOM-062-ZOO-199) y protocolos aprobados previamente por el Comité de Bioética y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, asegurando el cumplimiento de los estándares éticos de la investigación animal.

6.9 Obtención de bazo y ganglio poplíteo

Tras el sacrificio se obtuvo de manera quirúrgica el bazo de los ratones; para esto, se colocó el cuerpo en posición decúbito lateral derecho y se realizó asepsia con torundas con alcohol al 70% y yodopovidona (Isodine). Posteriormente, se realizó un corte longitudinal con tijeras quirúrgicas en la región del cuadrante superior izquierdo debajo del reborde costal del cuerpo del animal para retirar la piel y el peritoneo para exponer los órganos del animal. Con apoyo de pinzas sin dientes se tomó el bazo y se colocó en una caja Petri limpia con PBS estéril para prevenir la deshidratación del tejido.

Para la obtención del ganglio poplíteo, se tomó una pinza para sujetar la extremidad infectada y se realizó un corte en la parte interior del muslo del

animal, exponiendo el tejido muscular, posteriormente con apoyo de pinzas sin dientes se retiró el tejido capa a capa para observar el ganglio en la parte posterior y una vez retirado se colocó en placa Petri con PBS estéril.

Los bazos y ganglios de cada animal se midieron de manera longitudinal y se registró el peso de cada órgano con apoyo de una balanza analítica.

6.10 Conteo de células de bazo y ganglio

Los bazos se disgregaron utilizando pinzas estériles sin dientes hasta obtener una suspensión lo más homogénea posible, que se recuperó en un tubo cónico de 15 mL, y el remanente de la caja Petri se lavó con 5 mL de DMEM y se recolectó hasta llevarlo a 10 mL de volumen final en el tubo cónico. Se centrifugó a 3500 RPM durante 5 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de medio DMEM y se llevó a 10 mL con solución de lisis (NH₄Cl) al 1x y se dejó 10 minutos en agitación de vaivén. Transcurrido este tiempo, se repitió el proceso de centrifugación; se descartó el sobrenadante, y se resuspendió en 10 mL de DMEM y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de DMEM. Posteriormente, se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se hizo una dilución 1:10 en ácido acético al 2% y se colocaron 10 µL en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el conteo de células.

Para obtener la cuenta de células de ganglio, se repitió la metodología omitiendo el tratamiento con solución de lisis, y tras la última centrifugación

solamente se resuspendió en un volumen de 2 mL. Se llevaron a cabo dos conteos por observadores independientes y fueron promediados para su cálculo.

6.11 Análisis histopatológico

Posterior al sacrificio de los ratones, se extrajo quirúrgicamente el cojinete plantar infectado de los ratones infectados cada 7 días, y se colocaron en 25 mL de formaldehído al 10%, después de un cambio, se dejó durante 7 días antes del procesamiento de la muestra para los cortes histológicos y la tinción con Hematoxilina y Eosina. El análisis fue llevado a cabo por un observador cegado experto para investigar los parámetros característicos del micetoma que se enlistan en la tabla 12.

TABLA 12

Variables de estudio histopatológico

Celulares	Inflamación y Daño	
Polimorfonucleares	Necrosis	Microabscesos
Linfocitos	Paniculitis	Miositis
Células Plasmáticas	Inflamación Perineural	Atrofia
Eosinófilos	Neuritis	
Células Cebadas	Osteomielitis Aguda	
Células Espumosas	Vasculitis	
Fibroblastos	Úlceras	

6.12 ELISA para determinar anticuerpos específicos IgM anti-*Actinomadura madurae* presentes en suero hiperinmune de ratones re infectados

6.12.1 Obtención de Extracto Celular Crudo de *Actinomadura madurae*

De un cultivo previo de *Actinomadura madurae* se agregó la biomasa a tubos estériles de 50 mL sin llenar más del 50% de su capacidad. Se agregó agua destilada estéril hasta llenarlo y se centrifugó a 3000 RPM a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante; y se repitió este proceso al menos 3 veces o hasta observar que el sobrenadante fuera de apariencia cristalina. La biomasa resultante se deslipidizó con una mezcla de solventes éter: etanol en proporción 1:1 por una hora en vaivén a temperatura ambiente, y se centrifugó con las condiciones previas y se descartó el sobrenadante. Se repitió este proceso con una proporción éter: etanol de 1:3 y se dejó mezclando por 1 hora en vaivén; posteriormente se centrifugó a las mismas condiciones descritas previamente y se desechó el sobrenadante. Tras la deslipidización de la biomasa, se dejó secar cubriéndola del exterior durante toda la noche en una campana de extracción. Una vez secada, se pulverizó con un mortero hasta observar un polvo fino, y se pesó para obtener el rendimiento. La biomasa resultante se agregó a un matraz Erlenmeyer al cual se le agregó buffer de extracción Tris-Acetato de Magnesio y se llevó a cabo un proceso de sonicación de la muestra (Branson Sonifier 450) en un total de 3 ciclos de 2 minutos cada uno; y la muestra se colocó en agitación en frío toda la noche. El extracto celular crudo resultante se vació en un tubo, se centrifugó con las condiciones

previamente descritas y se descartó el precipitado. El ECC se colocó en una membrana de diálisis en un matraz de 3 L con agua destilada en agitación y se hicieron cambios de agua cada 2 horas y después se dejó dializar durante toda la noche. Terminado este proceso se recolectó el extracto y se midió su concentración de proteínas por el método de Bradford.

6.12.2 Estandarización de la técnica ELISA

Como antígeno se utilizó el ECC de *Actinomadura madurae* obtenido previamente, se agregó en placa de 96 pocillos (Corning, #3599) un total de 200 µL a una concentración de 0.5 µg/mL por pozo y se incubó durante 24 horas a 4 °C; se realizaron tres lavados de 3 minutos y dos lavados de 4 minutos con solución de lavado, 200 µL, posteriormente se bloqueó con 300 µL de leche descremada (OXOID, #LP0031) al 5% en PBS durante 24 horas y se lavó la placa cinco veces de la misma manera que se describió anteriormente. Después se agregaron 200 µL de los sueros de los ratones de los grupos infectados y del control, obtenidos en el día 5 después de la primera infección; ya que todos los ratones tenían menos de 7 días ninguno había sido reinfectado. Los sueros se probaron a diversas diluciones: 1:20, 1:40 y 1:50, esto para evitar que exista un desequilibrio en la concentración entre antígeno y anticuerpo que interfiera en la formación de inmunocomplejos, este efecto se llama prozona, al haber exceso de anticuerpo; y postzona, cuando hay mayor cantidad de antígeno que el anticuerpo disponible. La placa se dejó en incubación a 37° C durante 1 hora y se realizaron cuatro lavados de 3 minutos y un quinto lavado de 4 minutos. Posteriormente, se agregó el segundo anticuerpo (160 µL Anti-IgM de ratón

conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch, #115-035-020) a diferentes diluciones: 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, y se dejó en incubación a 37° C durante 1 hora. Se agregó 160 µL del sustrato cromógeno, peróxido de hidrógeno con o-fenilendiamina (Sigma-Aldrich, P9029), y se dejó en incubación durante 30 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 40 µL ácido sulfúrico 1N (BioRad, #R10). En todos los pasos la placa de 96 pocillos fue recubierta de una capa de papel aluminio. La placa se analizó en un espectrofotómetro (STAT FAX 3200, Awareness Technolgy, INC.) a 492 nm con filtro en 630 nm para determinar las lecturas de absorbancia.

6.13 ELISA para determinar anticuerpos específicos IgG anti-*Actinomadura madurae* presentes en suero hiperinmune de ratones re infectados

Como antígeno se utilizó ECC de *Actinomadura madurae* obtenido previamente, se agregó en una placa de 96 pocillos (Corning, #3599) un total de 200 µL a una concentración de 0.5 µg /mL y se incubó durante 24 horas a 4 °C; se realizaron cuatro lavados de 2 minutos y un quinto lavado de 3 minutos con solución de lavado, 200 µL, posteriormente se bloqueó con 300 µL de leche descremada (OXOID, #LP0031) al 5% en PBS durante 24 horas y se lavaron cinco veces, cuatro lavados de 3 minutos y un quinto de 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 200 µL de los sueros de los ratones de los grupos infectados en los diferentes esquemas de reinfección y del control, el cual fue obtenido en el día 45 después de la primera infección. Los sueros se probaron

a diversas diluciones: 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500; esto para evitar que exista un desequilibrio en la concentración entre antígeno y anticuerpo que interfiera en la formación de inmunocomplejos, este efecto se llama prozona, al haber exceso de anticuerpo; y postzona, cuando hay mayor cantidad de antígeno que el anticuerpo disponible. La placa se dejó en incubación a 37° C durante 1 hora y se realizaron cuatro lavados de 2 minutos y un quinto lavado de 3 minutos. Posteriormente, se agregó 200 µL del segundo anticuerpo, Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch #315-035-045), que se usó a una dilución de 1:1000; y se dejó en incubación a 37 °C durante 1 hora. Se agregó 160 µL del sustrato cromógeno, peróxido de hidrógeno con o-fenilendiamina (Sigma-Aldrich, #P9029) y se dejó en incubación durante 30 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 40 µL ácido sulfúrico 1N (BioRad, #R10). En todos los pasos la placa de 96 pocillos fue recubierta con capa de papel aluminio. La placa se analizó en un espectrofotómetro (STAT FAX 3200, Awareness Technolgy, INC) a 492 nm con filtro en 630 nm para determinar las lecturas de absorbancia.

6.14 Análisis Estadístico

Para llevar a cabo los análisis, se hicieron pruebas en todos para determinar la normalidad de estos. En muestras mayores a 50 datos se llevó a cabo la prueba de Kolmogórov-Smirnov; mientras que en aquellos donde había menos de 50, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para el aumento del volumen del cojinete plantar de ratones infectados contra el grupo control, se llevaron a

cabo pruebas t de Student no pareadas. Para el análisis histopatológico, se utilizaron pruebas no paramétricas, U de Mann-Whitney y para comparar el tamaño de los órganos bazo y ganglio, se llevó a cabo una prueba t de Student no pareada con corrección de Welch. Para los resultados de la prueba ELISA se llevó a cabo una prueba de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Dunnett o de Tukey para comparar frente al grupo control o entre todos los grupos, respectivamente. Se considera como estadísticamente significativo aquellos resultados con valor de p menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Ensayo de curva de crecimiento

De manera inicial, se obtuvo el crecimiento óptimo de la bacteria *Actinomadura madurae* a una temperatura de 37 °C en condiciones de agitación a 75 RPM en baño de agua con agitador. Se observó desde el primer hasta el sexto día un aumento exponencial en el total de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) pertenecientes a la fase logarítmica de crecimiento, con un máximo de 1.83×10^8 UFC/mL, y a partir del séptimo y octavo día se observa un aplanamiento en el crecimiento de la bacteria que corresponde a la fase estacionaria de cultivo como se observa en la figura 14.

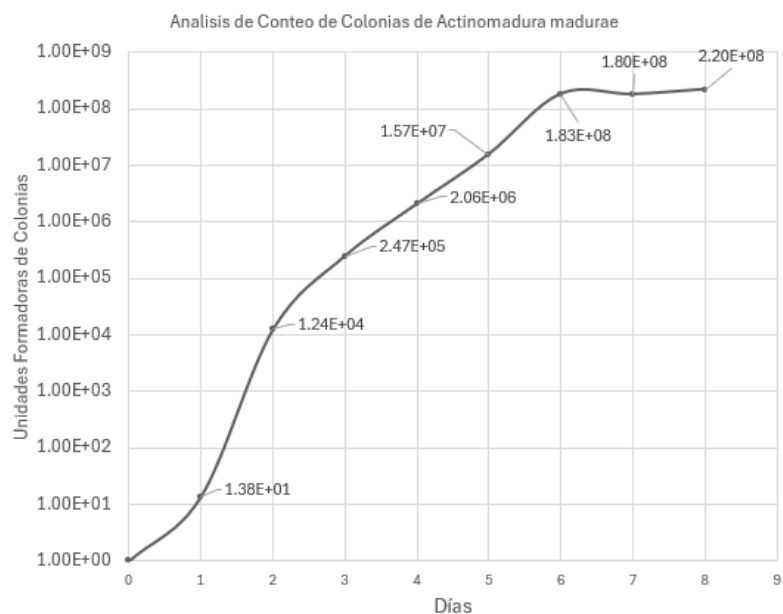


Figura 14. Curva de crecimiento de *Actinomadura madurae*.

7.2 Análisis de la evolución clínica de la infección en cojinete plantar

Tras haber realizado la infección en ratones BALB/c, se evaluó el volumen de la inflamación del sitio de infección como una característica clínica del micetoma. En la figura 15, que corresponde al grupo de ratones BALB/c infectados con una sola dosis de *Actinomadura madurae*, se observa una inflamación que alcanza un pico máximo de 270 mm³ en el día 5, característico de la etapa aguda, que comienza a disminuir hasta llegar a un volumen similar al del grupo control, 55 mm³, entre el día 15 al 21 y a partir de aquí se mantiene constante hasta el final del experimento.

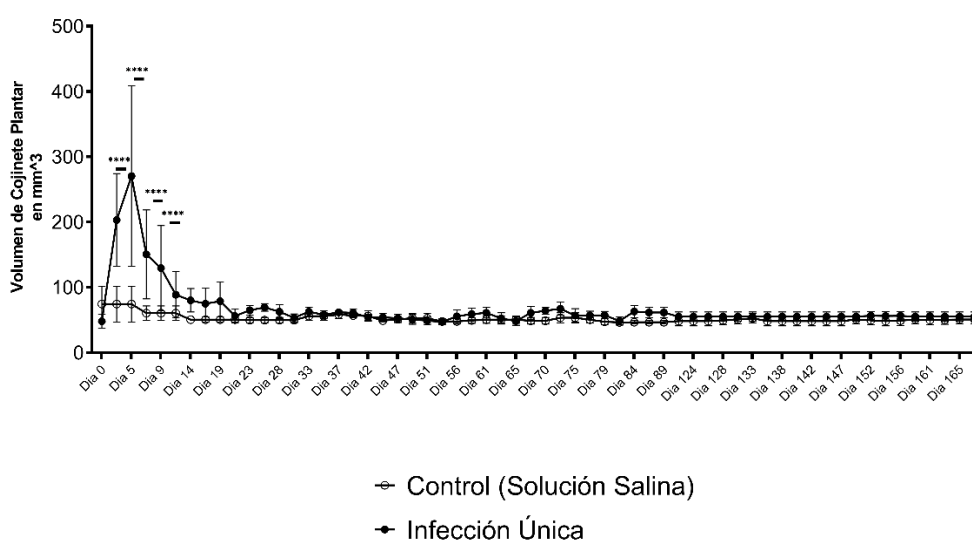


Figura 15. Comparación del volumen del cojinete plantar de ratones infectados con una dosis con *Actinomadura madurae* frente a grupo control. n = 5. **** = $p < 0.0001$.

Para el grupo de ratones que fueron reinfectados con *Actinomadura madurae* cada 30 días, se observó un comportamiento similar al descrito para el

grupo de dosis única en los primeros días, donde se presentó un pico de inflamación de 262 mm³ al día 5, que comenzó a disminuir durante los siguientes días, hasta observar un volumen similar al del grupo control a partir del día 21, con un promedio de 59 mm³. Después de cada reinfección, 5 en total, se observó un aumento en el volumen de la extremidad infectada menor al de la fase aguda, sin embargo, disminuyó con el paso de los días, sin observarse una inflamación característica de la fase crónica, como se muestra en la figura 16.

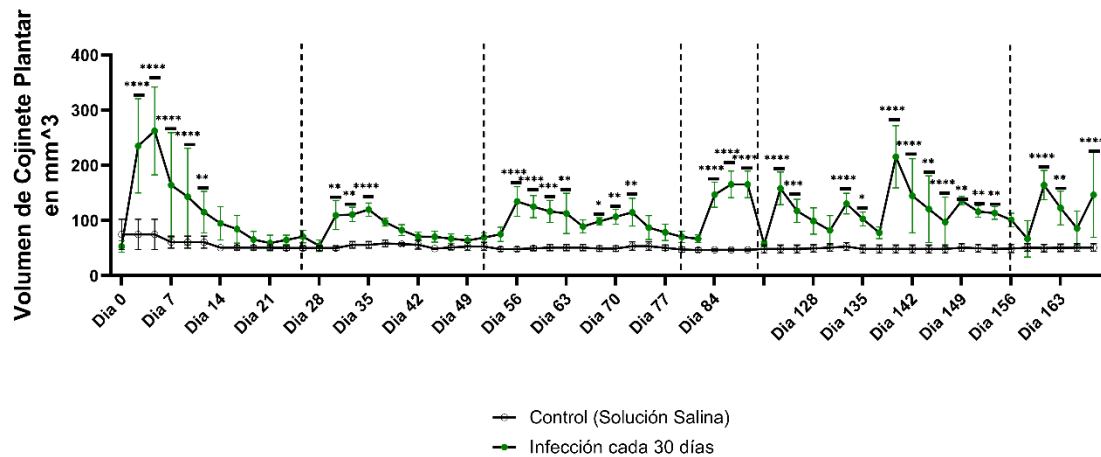


Figura 16. Comparación del volumen del cojinete plantar de ratones re infectados cada 30 días con *Actinomadura madurae* frente a grupo control. n = 5. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

Para el grupo de ratones re infectados cada 15 días se observó un comportamiento de inflamación aguda como el descrito en los grupos previos con su característico pico de inflamación, 236 mm³, a los 5 días. A partir de aquí disminuyó sin llegar al volumen de los ratones que no fueron infectados. Después de cada reinfección, un total de 10, se observaron picos de aumento de la inflamación en los primeros tres días y a partir de aquí disminuyó, con una

tendencia de aumento del volumen máximo después de cada reinfección en los primeros 70 días, que varió de 150 a 190 mm³, y este comenzó a disminuir en las siguientes reinfecciones. Ninguno de los picos de inflamación llegó a ser mayor que el mostrado en la etapa aguda de inflamación como se muestra en la figura 17.

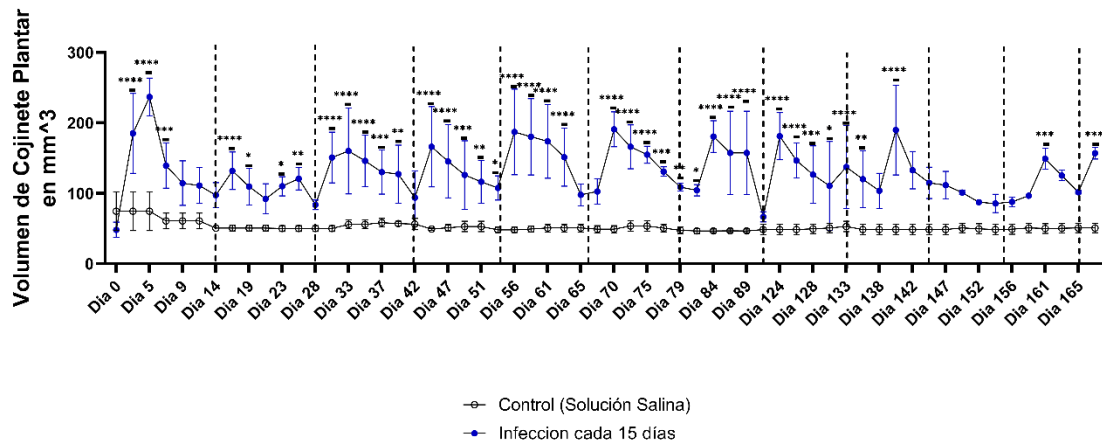


Figura 17. Comparación del volumen del cojinete plantar de ratones re infectados cada 15 días con *Actinomadura madurae* frente a grupo control. n = 5. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

Para el grupo de ratones re infectados cada 7 días, de igual manera que en los grupos anteriores, se observó un pico de inflamación al día 5 de 293 mm³, que disminuyó con el paso de los días; en este grupo de ratones se observó que en las primeras dos reinfecciones correspondientes al Día 7 y 14, no hubo un aumento significativo del volumen del cojinete infectado, y no es hasta después de la tercera reinfección en el día 21, que se observó un aumento significativo del volumen de la extremidad infectada. Las reinfecciones se suspendieron a partir del día 42, para observar si el progreso natural de la enfermedad daba

lugar al establecimiento el micetoma; sin embargo, se observó el efecto contrario, ya que el volumen del cojinete plantar disminuyó a niveles similares de los ratones control, alrededor del día 110. A partir de aquí se reinició el esquema de reinfección donde se observó de nuevo el aumento del volumen de la extremidad afectada como se aprecia en la figura 18.

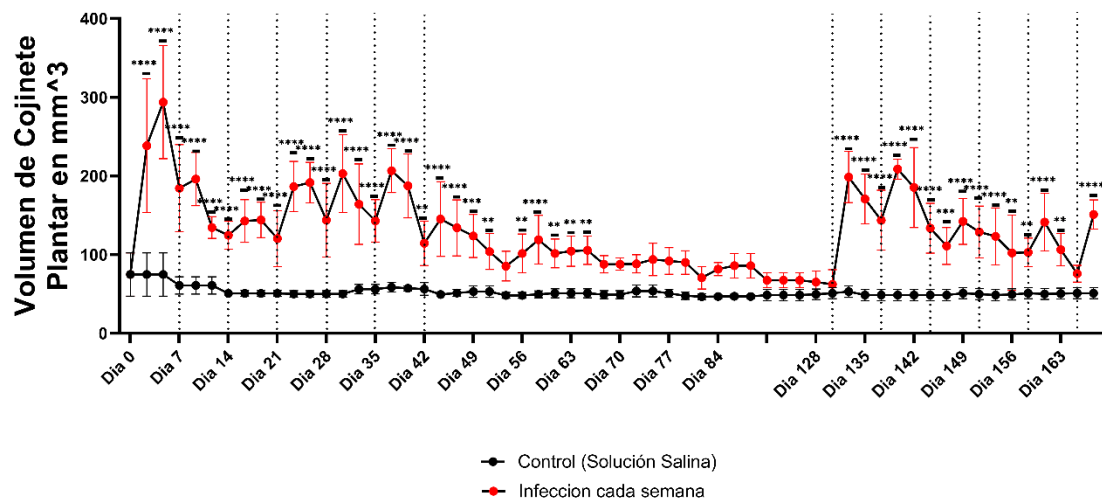
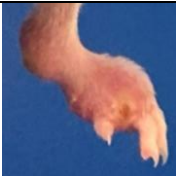
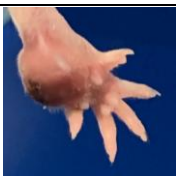
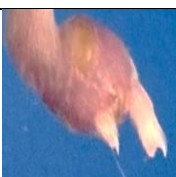
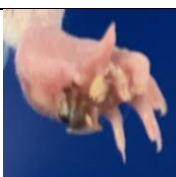
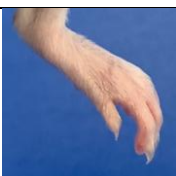
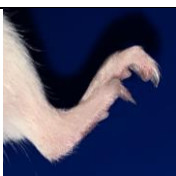


Figura 18. Comparación del volumen del cojinete plantar de ratones re infectados cada 7 días con *Actinomadura madurae* frente a grupo control. $n = 5$. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

7.2.1 Cambios macroscópicos de las extremidades infectadas

TABLA 13

Cambios macroscópicos de la evolución clínica

Ratones BALB/c	Día 5	Día 170
Infección Única		
	+	
Reinfección cada 30 días		
	+	++
Reinfección cada 15 días		
	++	+++
Reinfección cada 7 días		
	+	+++
Sin Infección		

En la tabla 13 se muestran imágenes representativas de las extremidades infectadas en cada esquema de reinfección. La primera imagen de cada grupo corresponde a la observada en el día 5 post primo infección que corresponde al día registrado como el pico máximo de la inflamación en la etapa aguda, mientras que la segunda imagen corresponde al proceso inflamatorio que se observó a los 170 días. El grupo de infección única desarrolló un aumento de volumen y endurecimiento de la región infectada, sin mostrar alguna otra alteración y al paso de los 170 días se observó que la extremidad había regresado a su tamaño normal, la cual no mostró ningún cambio permanente ni signos de tejido lesionado, similar al grupo de ratones control que no fueron infectados.

Para el grupo de ratones infectados cada 30 días, en el día 5 se observó un comportamiento similar al descrito previamente con un edema y una tumoración del tejido infectado, sin mostrar la presencia de otras características macroscópicas de daño como formación de costras o abscesos, y al final del proceso de reinfección, en el día 170, se observó un edema, además de la deformación del tejido, la pérdida de pelo en toda la región del pie, aparición de pequeñas úlceras y costras sin presentar descarga de material purulento o abscesos observables.

En los ratones con reinfección cada 15 días en la fase aguda, se observó un aumento del volumen y una tumoración de la extremidad, similar a los grupos anteriores, con pequeños abscesos y una costra en el sitio de las lesiones. En la fase crónica se observó una deformación del tejido, la pérdida de pelo en la

región afectada, tejido cicatricial, así como la formación de úlceras con costra, la secreción de material purulento tras las reinfecciones y el adelgazamiento de la piel circundante a la lesión.

Por su parte, en el grupo de ratones reinfectados cada 7 días en la fase aguda observamos un aumento de volumen y endurecimiento del área afectada sin mostrar mayor daño o presencia de otras características clínicas como en los grupos anteriores; sin embargo, al pasar los 170 días, se observó deformación en el tejido afectado, así como tejido cicatricial, formación de úlceras que sangraban y abscesos que drenaban material purulento debido al adelgazamiento del grosor de la piel circundante a las lesiones.

En el grupo control nunca se observaron cambios macroscópicos relacionados con daño del tejido.

7.3 Medidas y celularidad de bazo

Tras realizar la extracción quirúrgica del bazo, se obtuvo el peso y la longitud del órgano, así como la cuenta de las células mononucleares donde se observó un aumento en el peso del grupo control con un promedio de 162 mg en comparación de 312 mg obtenidos en los bazos de ratones infectados con *Actinomadura madurae* con una diferencia estadísticamente significativa, como lo muestra la figura 19.

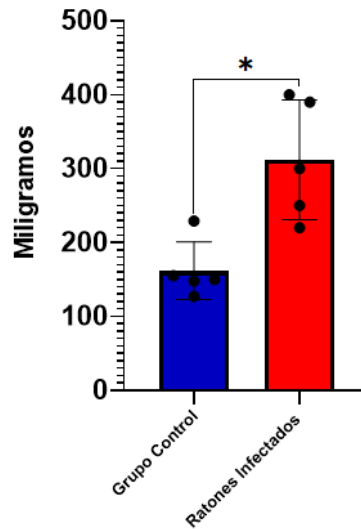


Figura 19. Comparación del peso de bazos de ratones control frente a infectados con *Actinomadura madurae* n = 5. * = $p < 0.05$.

En la figura 20, se muestra el análisis de la longitud de los bazos obtenidos, en donde el grupo de ratones infectados midieron en promedio 2.08 cm frente a los 1.55 cm obtenidos en el grupo control, esta diferencia es estadísticamente significativa.

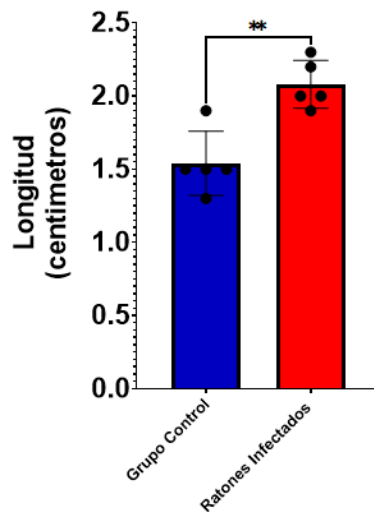


Figura 20. Comparación de medidas de bazos de ratones control frente a infectados con *Actinomadura madurae*. n = 5. ** = $p < 0.01$.

Por su parte en el análisis del número de células mononucleares del bazo, en los ratones infectados hubo un aumento con un total de 1.29×10^8 células/mL comparado al observado en ratones no infectados con un número de 2.88×10^7 , esta diferencia es estadísticamente significativa.

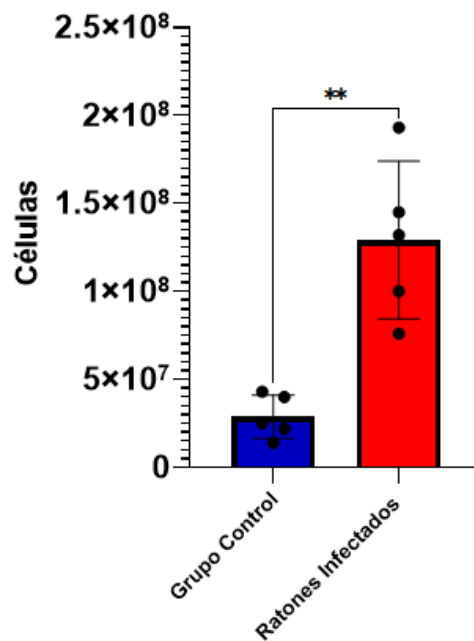


Figura 21. Comparación del número de células de bazo de ratones control frente a infectados con *Actinomadura madurae*. n = 5. ** = $p < 0.01$.

7.4 Medidas y celularidad de ganglio

Se llevaron a cabo la toma de medidas de peso, longitud y la cuenta del número de células del ganglio poplíteo de ratones infectados y no infectados. Como se demuestra en la figura 22, se observó un aumento del peso de los ganglios de ratones infectados, con un promedio de 74 mg frente a los 17 mg obtenidos de animales control, con una diferencia estadísticamente significativa.

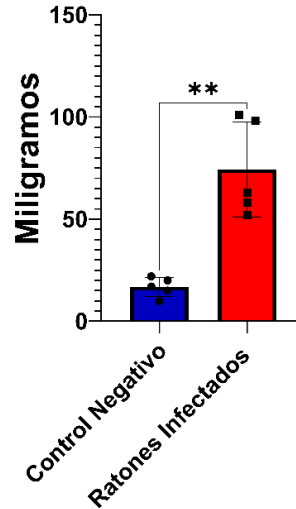


Figura 22. Comparación del peso de ganglio de ratones control frente a infectados con *Actinomadura madurae*. n = 5. ** = $p < 0.01$.

Además, se observó un aumento del tamaño longitudinal de los ganglios de los ratones infectados, con un promedio aproximado de 5 mm, frente a aquellos que pertenecieron al grupo control con 2.52 mm de promedio, donde se observó una diferencia estadísticamente significativa, como lo muestra la figura 23.

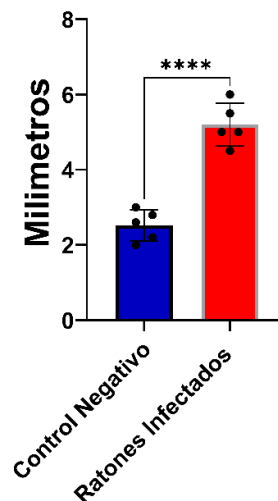


Figura 23. Comparación del tamaño longitudinal de ganglio de ratones control frente a infectados con *Actinomadura madurae*. n = 5. **** = $p < 0.0001$.

Por último, al analizar la cuenta de células de ganglio de los ratones infectados se observó un aumento de estas frente al grupo control, en los que se obtuvieron 3.75×10^5 células/mL frente a las 1.42×10^7 células/mL que se observaron en ratones infectados, con una diferencia estadísticamente significativa como lo muestra la figura 24.

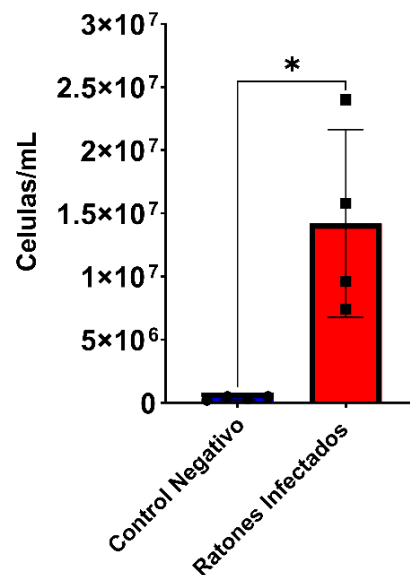


Figura 24. Comparación del número de células de ganglio de ratones control frente a infectados con *Actinomadura madurae*. n = 5. * = $p < 0.05$.

7.5 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se llevó a cabo a través de observador cegado experto, y se investigó la presencia de poblaciones celulares, así como de marcadores de daño al tejido posterior a la infección por *Actinomadura madurae* en ratones BALB/c, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

TABLA 14

Resultados de análisis histopatológico

		Neg 1	Neg 2	Neg 3	Neg 4	Neg 5	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5
Células	PMN	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
	Linfocitos	+	-	-	+	+	++	++	++	++	++
	Plasmáticas	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+
	Eosinófilos	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	Cebadas	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++
	Espumosas	-	-	+	-	+	+	++	++	++	++
	Fibroblastos	-	-	+	+	+	++	+	++	++	++
Lesión Tisular	Edema	L	M	L	M	M	L	M	L	L	L
	Congestión	M	M	L	L	M	M	M	L	L	L
	Necrosis	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Paniculitis	-	-	-	-	-	++	+++	++	++	++
	Inflamación perineural	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
	Neuritis	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++
Lesión Ósea	Osteomielitis	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++
Cambios Vasculares	Vasculitis	-	-	-	-	-	-	++	-	++	+
	Trombos Sépticos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cambios Linfoides	Hiperplasia Linfoide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piel	Úlceras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Actinomadura	Microabscesos	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
	Bacterias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lesión Muscular	Miositis	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	++
	Atrofia	-	-	-	-	+	+	++	++	+	+

Como se puede observar en la tabla 13, la presencia de poblaciones celulares es mayor en los ratones que fueron infectados comparados con el grupo control, destacando la alta presencia de polimorfonucleares, linfocitos, macrófagos de tipo espumoso y fibroblastos. Todos los parámetros analizados demostraron ser estadísticamente significativos, como se muestra en la figura 25. Se describe en la tabla como +, presencia baja; ++, presencia media; y +++, alta presencia; -, sin presencia.

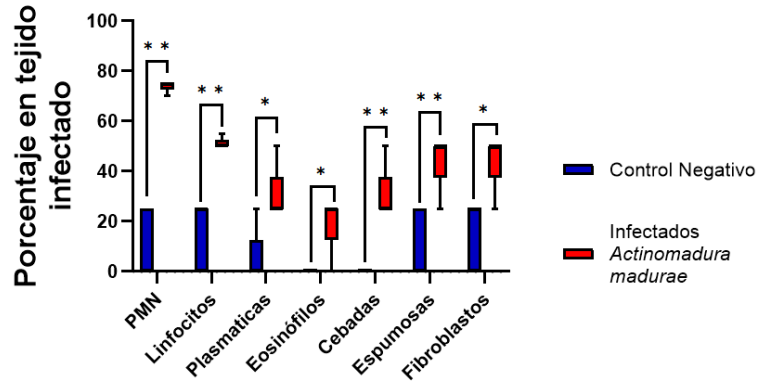


Figura 25. Análisis histopatológico en el tejido de ratones infectados con *Actinomadura madurae*. n = 5. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Por otra parte, también se analizaron indicadores de daño al tejido infectado, y se observó aumento en la inflamación perineural, neuritis, miositis y paniculitis comparado con los ratones del grupo control, los cuales no presentaron casi ninguno de los marcadores de daño a excepción de congestión vascular y atrofia en uno de los ratones. Todos los parámetros tuvieron diferencias estadísticamente significativas, como se observa en la figura 26.

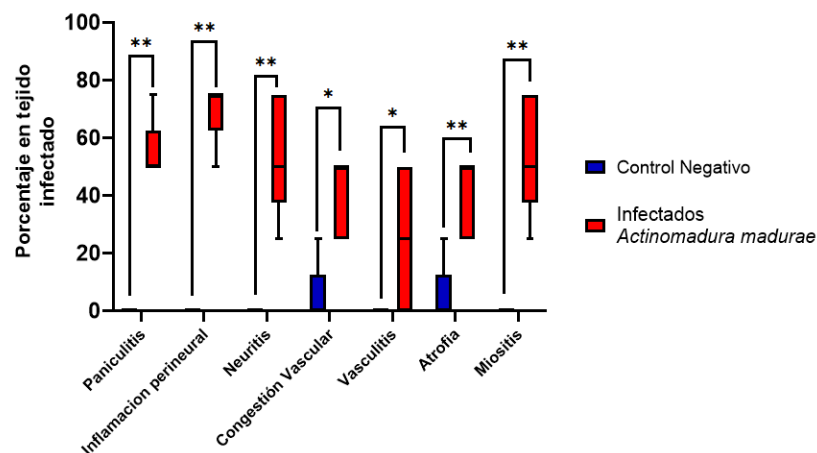


Figura 26. Análisis de la presencia de marcadores de daño en tejido de ratones infectados con *Actinomadura madurae* n = 5. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

7.6 Determinación de Anticuerpos IgM específicos anti-*Actinomadura*

madurae

Para la determinación de anticuerpos específicos IgM anti-*Actinomadura madurae* se estandarizó una prueba de ELISA indirecto basándose en la estrategia previamente utilizada para *Nocardia brasiliensis*. De las diferentes diluciones del suero de ratón probadas y del anticuerpo anti-IgM se obtuvieron los promedios de absorbancias que se muestran en la figura 27.

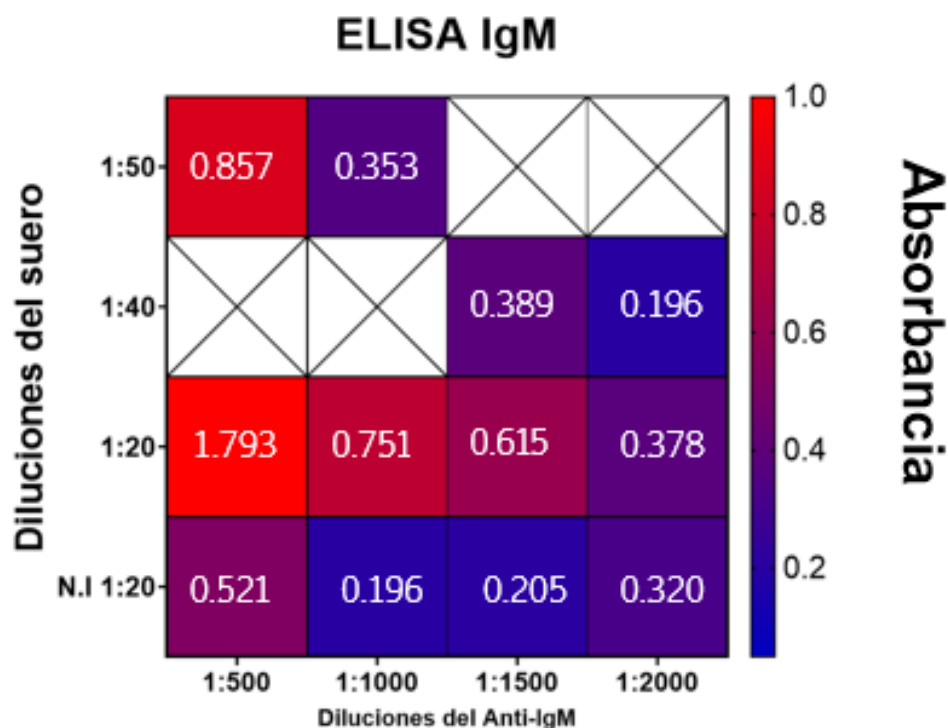


Figura 27. Promedios de absorbancias de anticuerpos IgM en diferentes diluciones de sueros de ratones infectados y de anti-IgM de ratón. n = 3.

Se analizaron estadísticamente los promedios de absorbancia obtenidos con las diferentes diluciones de suero de ratón y de anti-IgM para determinar

cuáles eran óptimas para hacer la determinación de anticuerpos IgM anti-*Actinomadura madurae*. De lo anterior, se observó que tanto, la dilución 1:50 como la de 1:20 cuando se probaron con la dilución 1:500 del anti-IgM de ratón. mostraron una diferencia estadísticamente significativa comparada con los sueros de los ratones no infectados, sin embargo, estas lecturas de absorbancia incluyendo la del grupo control están por encima de 0.5.

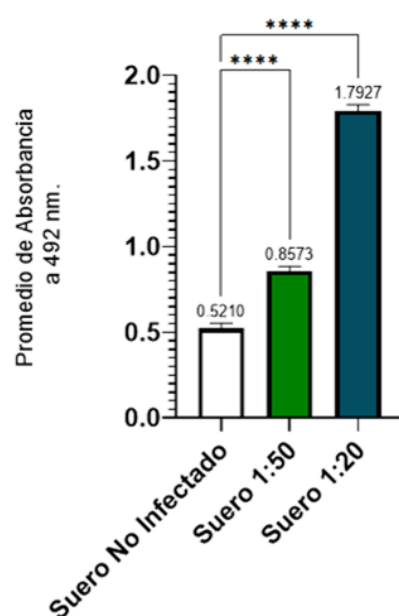


Figura 28. Promedios y *fold change* de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con *Actinomadura madurae* con Anti-IgM: 1:500. $n = 3$; **** = $p < 0.0001$.

Para el ensayo en el que se pusieron a prueba las diluciones del suero 1:20 y 1:50 con anti-IgM a dilución 1:1000, se observó que los promedios de las absorbancias fueron de 0.75 y 0.35, respectivamente, comparados con 0.19 de los sueros del grupo control; sin embargo, la dilución de 1:20 mostró una

diferencia estadísticamente significativa que no se observó en la dilución 1:50, como se muestra en la figura 29.

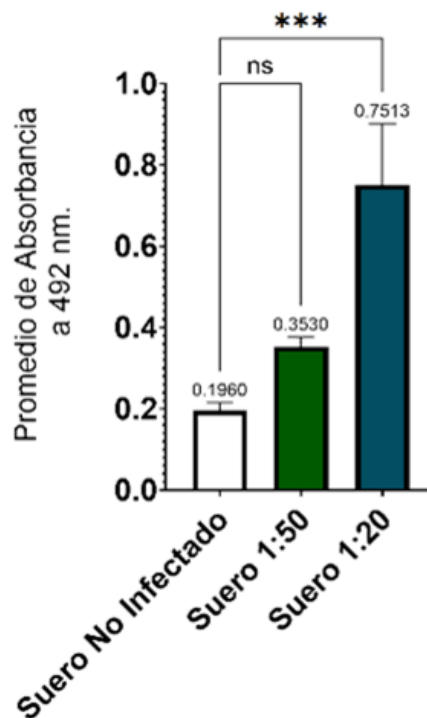


Figura 29. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con *Actinomadura madurae* con Anti-IgM: 1:1000. $n = 3$; *** = $p < 0.001$.

En el tercer experimento, se probaron los sueros de ratones diluidos 1:20 y 1:40 y el anticuerpo anti-IgM a una dilución 1:1500 en donde se obtuvieron resultados de absorbancia muy similares a los observados para la dilución anti-IgM 1:1000. Para el suero de ratones infectados, en la dilución 1:20 se observaron valores de absorbancia en promedio de 0.61, mientras que para 1:40 fue de 0.38; además de que en comparación con el promedio de absorbancia del

grupo control que fue de 0.20, tanto la dilución 1:20 como 1:40, mostraron una diferencia estadísticamente significativa, como se muestra en la figura 30.

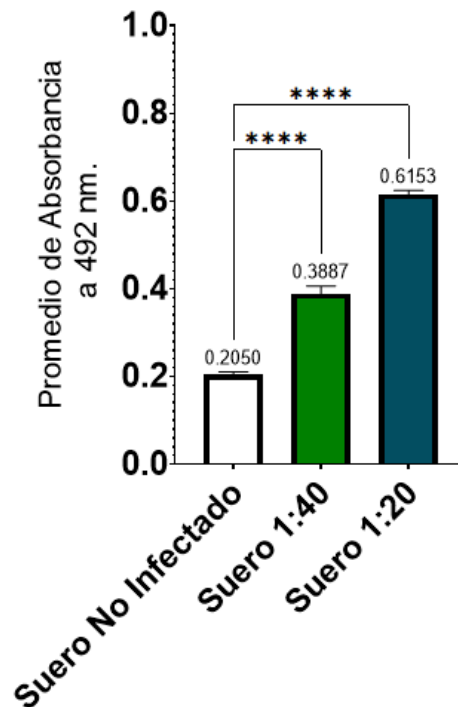


Figura 30. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con *Actinomadura madurae* con Anti-IgM: 1:1500. $n = 3$; **** = $p < 0.0001$.

Por último, se probó los sueros de ratones infectados a las diluciones 1:20 y 1:40 con el anti-IgM a una dilución de 1:2000, y se obtuvieron promedios de absorbancia de 0.37 y 0.19, respectivamente, comparados con el promedio del grupo control que fue de 0.32. Estos resultados no mostraron ser estadísticamente significativas frente a los ratones del grupo control como se muestra en la figura 31.

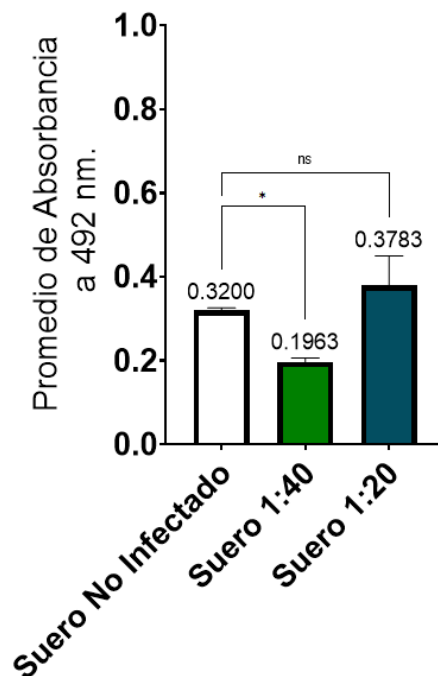


Figura 31. Promedios de absorbancia de diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con *Actinomadura madurae* con Anti-IgM: 1:2000. $n = 3$; * = $p < 0.05$.

De todos los experimentos anteriores se encontró que cuando se utilizó el suero de ratones infectados con *Actinomadura madurae* 5 días postinfección a una dilución de 1:20 y anti-IgM de ratón obtenida en conejo a dilución 1:1500, se obtienen las condiciones óptimas para determinar anticuerpos IgM anti-*Actinomadura madurae*.

Posteriormente, esto fue confirmado por tres ensayos independientes hechos por triplicado donde se obtuvieron lecturas de absorbancia similares a los obtenidos en el proceso de estandarización, con una variabilidad inter-ensayo mínima lo cual mostró una diferencia estadísticamente significativa frente a los sueros de ratones no infectados como se observa en la figura 32.

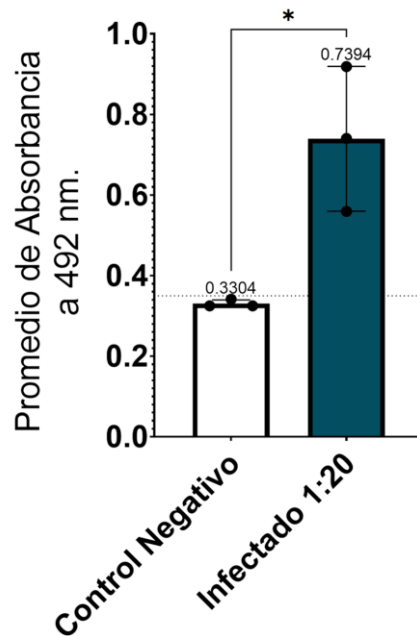


Figura 32. Determinación de anticuerpos IgM anti-*Actinomadura madurae* en sueros de ratones en condiciones óptimas. $n = 3$; $* = p < 0.05$.

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos IgM anti-*Actinomadura madurae*, el suero de ratones infectados se probó frente al ECC de *Nocardia brasiliensis*, el agente causal más común de micetoma bacteriano, replicando las condiciones previamente estandarizadas y se observó que el suero de ratones infectados con *Actinomadura madurae* reacciona de manera específica frente al ECC de este agente causal con un promedio de absorbancias cercano a 0.6, similar al obtenido durante la estandarización de la técnica; por otra parte, este suero al enfrentarse al ECC de *Nocardia brasiliensis* arrojó un promedio de absorbancia cercano a 0.2. El suero de ratones infectados frente a ECC de *Actinomadura madurae* mostró una diferencia estadísticamente significativa frente a los otros grupos, por lo que se establece que las IgM en suero de ratones

infectados con *Actinomadura madurae* son específicas y no muestran reacción cruzada al compararlos con ECC de *Nocardia brasiliensis*, como se muestra en la figura 33.

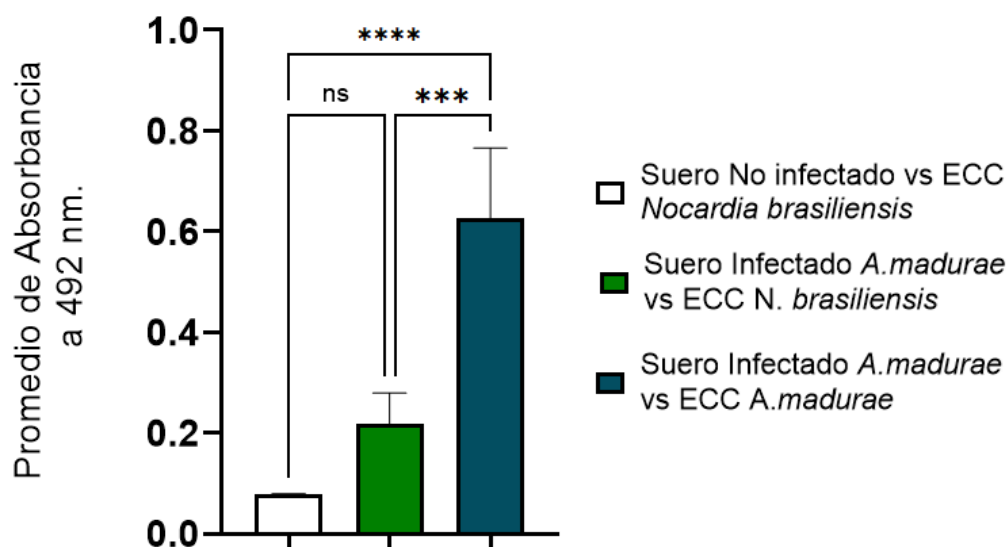


Figura 33. Promedios de absorbancia para determinación de anticuerpos IgM específicos anti-*Actinomadura madurae*. n = 3; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

7.7 Determinación de Anticuerpos IgG específicos anti-*Actinomadura madurae*

Para la determinación de anticuerpos específicos IgG anti-*Actinomadura madurae* se estandarizó una prueba de ELISA indirecto basándose en la estrategia previamente utilizada para *Nocardia brasiliensis*. De las diferentes diluciones del suero de ratón probadas, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500, con el anticuerpo anti-IgG a dilución 1:1000, se obtuvieron los promedios de absorbancias que se muestran en la figura 34.

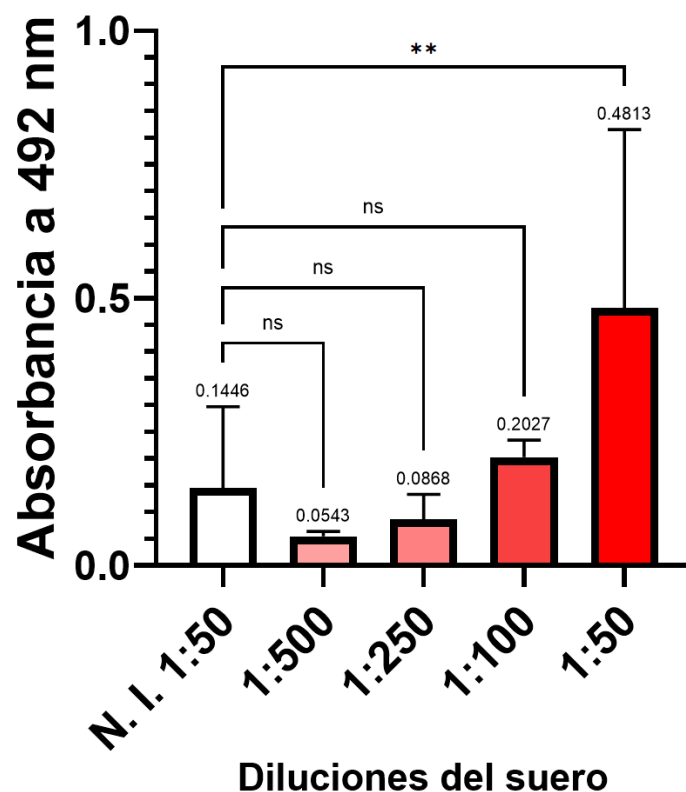


Figura 34. Promedios de absorbancias de anticuerpos IgG en diferentes diluciones de sueros de ratones infectados con anti-IgG de ratón 1:1000. $n = 3$; $** = p < 0.01$.

De estos experimentos se determinó que utilizando el suero de ratones infectados con *Actinomadura madurae* 45 días postinfección a una dilución de 1:50 y con anti-IgG de ratón obtenida en conejo a dilución 1:1000 se obtiene un promedio de absorbancia de 0.52 con una diferencia estadísticamente significativa comparada con el suero del grupo control sin infección obteniendo así las condiciones óptimas para determinar anticuerpos IgG anti-*Actinomadura madurae*.

Posterior a esto, se realizaron tres ensayos independientes hechos por triplicado para verificar los resultados de estas condiciones estandarizadas que se muestran en la figura 35, donde se observó un promedio de absorbancia de 0.92 frente al 0.24 del grupo control con una variabilidad inter-ensayo mínima, lo cual mostró una diferencia estadísticamente significativa frente a los sueros de ratones no infectados como se observa en la figura 35.

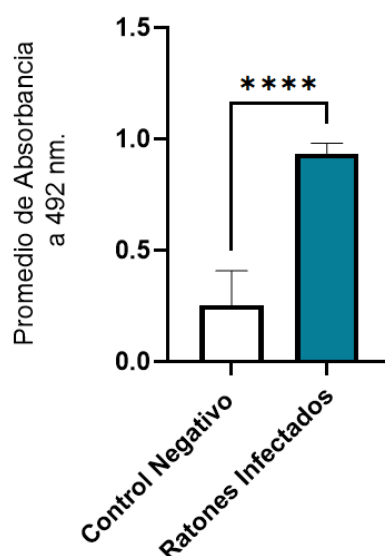


Figura 35. Determinación de anticuerpos IgG anti-*Actinomadura madurae* en sueros de ratones en condiciones óptimas. $n = 3$; **** = $p < 0.0001$.

Una vez comprobadas estas condiciones se determinó la presencia de anticuerpos específicos IgG anti-*Actinomadura madurae* en los diversos esquemas de reinfección, para observar si existía diferencia en la concentración de anticuerpos presentes según el número de reinfecciones. Se observó que el grupo control mostró un promedio de absorbancias de 0.17, mientras que en todos los grupos de ratones infectados con *Actinomadura madurae* se obtuvieron promedios de absorbancias por arriba de 0.35 hasta 0.59 y que además

mostraron una diferencia estadísticamente significativa en todos los grupos frente al control. Además, se probó como control de reacción cruzada suero de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* frente al ECC de *Actinomadura madurae*, que mostró absorbancias de 0.12 lo cual indicó que no existe reacción cruzada y se observa en la figura 36.

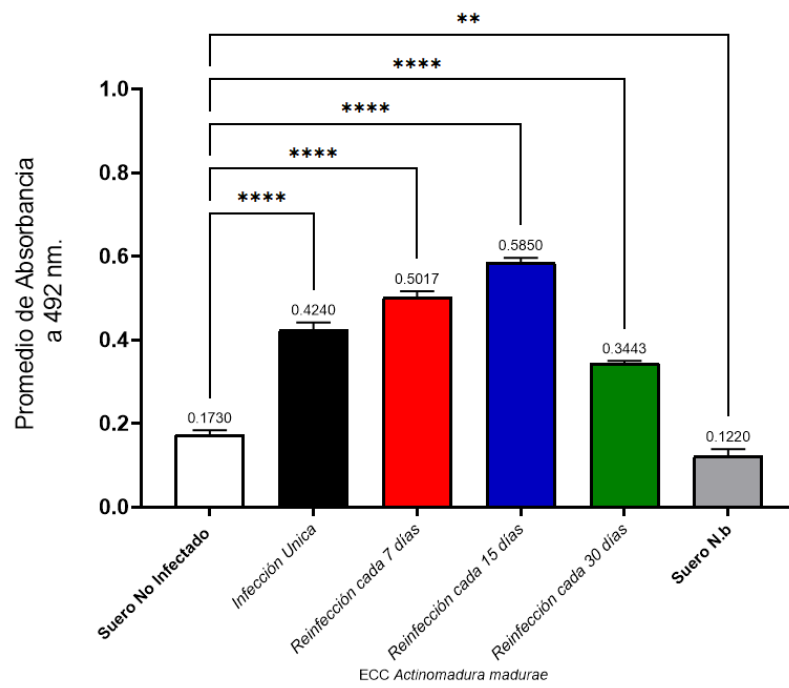


Figura 36. Promedios de absorbancia de anticuerpos IgG anti-*Actinomadura madurae* en los diferentes esquemas de reinfección frente al control sin infección o sueros de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*. $n = 3$; ** = $p < 0.01$; **** = $p < 0.0001$.

De igual manera que en la estandarización de ELISA de IgM, se estudió la especificidad de los anticuerpos IgG anti-*Actinomadura madurae* poniendo a prueba el suero de ratones infectados frente al ECC de *Nocardia brasiliensis*, y se pudo observar que ninguno de los grupos mostró promedios de absorbancias

elevados, de 0.05 a 0.06, sin diferencias estadísticamente significativas; se agregó como control positivo suero de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*, el cual mostró un promedio de absorbancia de 0.90, que fue estadísticamente significativo comparado con los sueros de ratones infectados con *Actinomadura madurae*, por lo que de igual manera se concluye que las IgG en suero de ratón infectado con *Actinomadura madurae* independientemente de las veces que se haya expuesto son específicas y no arrojan una reacción cruzada frente a otros agentes causantes de micetoma, esto se observa en la figura 37.

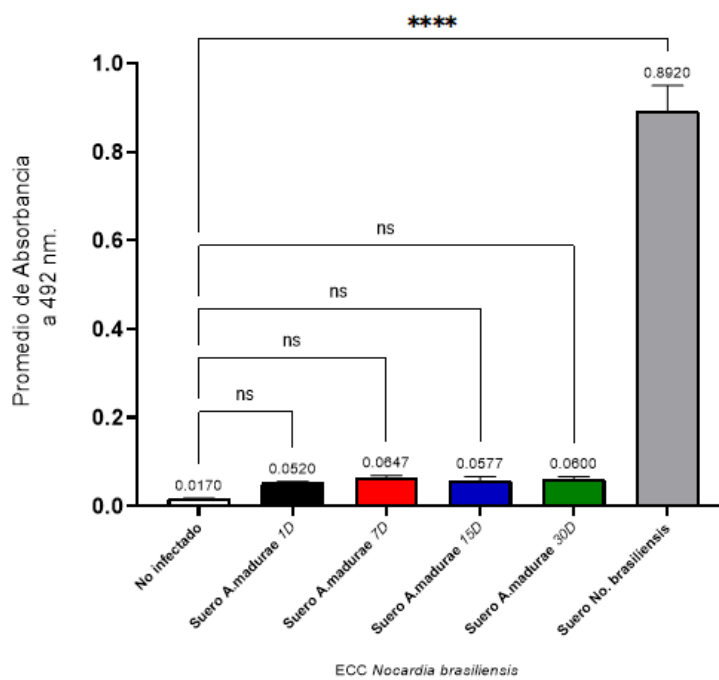


Figura 37. Promedios de absorbancia para determinación de anticuerpos IgG específicos anti-*Actinomadura madurae*. n = 3; **** = $p < 0.0001$.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

El micetoma es una enfermedad que suele afectar a los estratos más vulnerables de la sociedad que la ha llevado a ser nombrada como enfermedad tropical desatendida por la OMS y que si no es tratada puede complicarse e incluso llevar a la muerte [Ziljstra, 2016 y Relhan, 2018], y a pesar de que su presentación clínica suele ser muy similar, el origen de la enfermedad puede ser muy heterogéneo debido a los diferentes agentes etiológicos que causan este proceso infeccioso [Van De Sande, 2015], de todos estos, *Actinomadura madurae* es el segundo más frecuente de origen bacteriano; sin embargo, aún existe un amplio desconocimiento de los mecanismos inmunopatológicos que llevan al establecimiento de la infección, la formación del micetoma o de su resolución [Ziljstra, 2016]. Un método de estudio para estas enfermedades son los modelos experimentales en animales que reproducen las características de la infección del humano y que previamente han sido utilizados como en el micetoma por *Nocardia brasiliensis*, lo que ha permitido estudiar los mecanismos inmunes en el establecimiento de la enfermedad o en su resolución. Así mismo, nos dan la oportunidad de investigar nuevos blancos terapéuticos para este tipo de enfermedades. [Salinas-Carmona, 1999]

Actualmente, no ha sido posible desarrollar un modelo experimental que reproduzca el micetoma por *Actinomadura madurae* del humano. Es importante estudiar primeramente las condiciones óptimas de crecimiento para que el

microorganismo conserve su virulencia. En este trabajo, se realizó una expansión del microorganismo en medio sólido BHI y se observó que había un crecimiento óptimo de la bacteria en las placas cercano al día 7. Han sido descritas diversas formas de cultivo de este microorganismo; Gerber en 1969 llevó a cabo sus experimentos utilizando medios YD y medio de Bennet sólidos para el crecimiento en condiciones de agitación a 210 RPM y 28 °C donde obtuvo un crecimiento ideal a los 7 días. Bonifaz en 2015 mencionó que el Agar Lowenstein-Jensen es de alta utilidad debido a la exigencia nutritiva de *Actinomadura madurae*; Verma y colaboradores en el 2019 publicaron que algunos medios apropiados para el crecimiento son agar sangre o Sabouraud y que las colonias crecen en un periodo de 7 a 10 días de incubación; todas estas fechas similares a los resultados encontrados en este trabajo.

Para el crecimiento en medio de cultivo líquido, se realizó una curva de crecimiento bacteriana y se establecieron sus fases a través de la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias obtenidas cada día donde se observó que la fase logarítmica correspondía del día 2 hasta el 6 para a partir de aquí iniciar la fase estacionaria, por lo que se seleccionó el día 5 como óptimo para llevar a cabo la infección de los ratones. Estudios previos como Palma-Ramos y colaboradores utilizaron medio BHI para el crecimiento de *Actinomadura madurae*, mencionando que pasaron 14 días hasta obtener una cantidad de biomasa considerable midiendo la cantidad de unidades formadoras de colonia por la técnica de nefelometría [Palma-Ramos, 2000]. Otros estudios como el de Harada y colaboradores utilizaron medio de crecimiento Infusión Cerebro

Corazón adicionada con glucosa 2% y obtuvieron un crecimiento óptimo a 32 °C a los 7 días, sin llevar a cabo un análisis del crecimiento. [Harada,2004].

Para los ensayos de infección en este estudio se probaron reinfecciones cada 7, 15 y 30 días, así como una sola dosis. Es importante mencionar que nunca se había intentado previamente un modelo experimental que indujera micetoma por *Actinomadura madurae* a base de reinfecciones. De los resultados obtenidos observamos que en la infección de dosis única se presenta un pico de inflamación al día 5 que se resuelve después de 21 días regresando al volumen registrado antes de la infección sin desarrollar micetoma. Este resultado es similar a lo reportado por Palma-Ramos y colaboradores en el 2000, donde a pesar de probar diferentes cepas de la bacteria no lograron inducir el desarrollo del micetoma. En los esquemas de reinfección de cada 30, 15 y 7 días se observaron picos de inflamación al día 5 similares al de la dosis única, y después de cada reinfección se presentaban nuevamente este pico de inflamación con lesiones características del micetoma tales como úlceras, abscesos con supuración y deformación de tejido; hasta el momento no existen reportes en la literatura que hayan observado estas características de daño al intentar modelos de infección con *Actinomadura madurae* en ratones. Gumaa y colaboradores en 1981 llevaron a cabo un modelo de infección experimental de micetoma en cabras con un esquema de reinfecciones, utilizando *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Nocardia brasiliensis*. Las cabras recibieron hasta un total de 8 reinfecciones y observaron volúmenes máximos de inflamación cerca de la tercera semana de infección y que, a partir de la sexta,

las lesiones eran detectables solo por palpación del área infectada, a pesar de que *Actinomadura pelletieri* suele ser más infecciosas que *Actinomadura madurae*, no fue posible establecer el micetoma con ninguno de los dos patógenos. Previamente, Rippon y colaboradores encontraron la presencia de un factor con acción proteolítica que tiene actividad sobre el colágeno. A partir de aquí se ha postulado que la collagenasa es importante para su patogenicidad. Esto se comprobó posteriormente en ratones C57Bl/6, los cuales al comparar infecciones con *Actinomadura madurae* que contenía collagenasa y otra que no, se observó que en la primera se presentaban lesiones micetomáticas; en cambio en la cepa sin collagenasa no se observó esto. Sin embargo, estos resultados parecen mostrar sesgo debido al uso de cortisona en el inóculo ya que al inyectar ambas cepas en ratones sin el uso de cortisona no se formaron lesiones de micetoma. [Rippon y Peck, 1967 y Rippon y Lorincz, 1964]. Parece ser que *Actinomadura madurae* humana no tiene la suficiente virulencia o patogenicidad para infectar a la cepa de ratón propuesta considerando el fondo genético distinto entre especies, o que esta enfermedad parece establecer la enfermedad en organismos que presentan un estado de inmunosupresión por lo que es posible que se deban modificar diversas variables cepa para lograr establecer el modelo experimental.

De los resultados de este trabajo, queda la posibilidad de usar diferentes cepas y sexo de ratones, que, al tener un fondo genético distinto y, por lo tanto, una respuesta inmune diferente, pueda favorecer el establecimiento del micetoma. De igual forma, la modificación del esquema de reinfecciones, como

lo son la frecuencia o la concentración del inóculo bacteriano, u otras cepas de la bacteria, son posibles variables que permitan el desarrollo de un modelo experimental por *Actinomadura madurae*.

En este trabajo, el análisis histopatológico al día 170, del tejido de ratones reinfectados con *Actinomadura madurae* mostró diversas poblaciones celulares características de un proceso inflamatorio como polimorfonucleares, linfocitos, macrófagos y células espumosas; así como de marcadores de daño tisular y microabscesos, reportados también en el micetoma por *Nocardia brasiliensis* [Salinas-Carmona, 1999]; sin embargo, no se observaron granulomas que indiquen el establecimiento del micetoma.

El diagnóstico del micetoma por *Actinomadura madurae* actualmente se realiza por cultivos microbiológicos de las biopsias del tejido infectado, sin embargo, tiene como limitante el tiempo que se tarda en obtener el resultado, así mismo en ocasiones no es posible determinar el agente causal. También se han utilizado técnicas de biología molecular, pero son costosas y poco accesibles. A la fecha no se cuenta con una prueba serológica de diagnóstico diferencial temprano. Se ha mencionado previamente que estas pruebas no suelen ser confiables debido a que su sensibilidad y especificidad suele ser baja y que se pueden arrojar falsos positivos. En este trabajo se estandarizó una técnica de ELISA para demostrar la presencia de anticuerpos IgM en la fase aguda de la infección, que mostraron ser específicos al no presentar reacción cruzada frente a antígenos de *Nocardia brasiliensis*. De igual manera se demostró la presencia de IgG en la fase crónica, en el grupo de ratones infectados y en los reinfectados

se comprobó su especificidad al no mostrar reacción cruzada hacia antígenos de *Nocardia brasiliensis*, el agente causal más común del actinomicetoma. Taha en 1983 había hecho ensayos de mediciones de anticuerpos a través de ELISA en pacientes diagnosticados con micetoma por *Actinomadura madurae* a diferentes tiempos y de igual manera se encontró que todos tenían la presencia de anticuerpos IgG, sin embargo, algunos de ellos mostraban reacción cruzada con *Streptomyces somaliensis* [Relhan, 2017]. También llegó a encontrar la presencia de anticuerpos específicos para *Actinomadura madurae* hasta en 11% de los individuos analizados, sin embargo, no todos tenían manifestación clínica que indicara la presencia de micetoma. Esto muestra que existe un papel activo de los anticuerpos en la resolución de la infección [Taha,1983]. Kamalam y colaboradores previamente habían mencionado que hay una mayor participación de la inmunidad humoral en la infección por *Actinomadura madurae* que en *pelletieri* [Kamalam, 1987]. Así mismo, Palma-Ramos a través de inmunoperoxidasa específica contra *Actinomadura* demostró la presencia de un cemento, un polisacárido ácido sulfatado, el cual parece unir a las bacterias en granos y limitar la respuesta inmune; derivado de esto es posible que parte de los anticuerpos IgM e IgG formados contra esta bacteria sean específicos frente a este “cemento”, inhibiendo la formación de gránulo y permitiendo la posterior destrucción del patógeno, lo cual podría indicar la ausencia del micetoma en los ratones reinfectados [Palma-Ramos,2005]. De igual manera se ha reportado que en otros agente de micetoma los anticuerpos IgM son quienes confieren una mayor protección, a diferencia de los IgG, por lo que parece ser que este comportamiento aparece de igual manera con este agente etiológico, por lo que

estudiar la cinética de los anticuerpos en diferentes tiempos tras las reinfecciones permitiría saber si los títulos aumentan tras cada infección y si esta respuesta es quien participa en la resolución de la infección y el impedimento del establecimiento del micetoma.

Salinas-Carmona y colaboradoras reportaron que la prueba de ELISA para el diagnóstico de *Nocardia brasiliensis* es útil para el diagnóstico y el seguimiento terapéutico, ya que mostró mayor concentración de anticuerpos en sueros de pacientes con la enfermedad activa, sin reacción cruzada con otros agentes etiológicos de enfermedades que forman granulomas como *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis* o *Actinomadura madurae* al categorizarlas correctamente como negativo a *Nocardia brasiliensis* [Salinas-Carmona, 1993]. De igual manera, la prueba de ELISA estandarizada en este proyecto permite detectar anticuerpos IgM e IgG específicos, que al ser probada con sueros de pacientes con micetoma por *Actinomadura madurae* puede ser de utilidad clínica para un diagnóstico diferencial temprano.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

La reinfección con *Actinomadura madurae* en ratones BALB/c no indujo el micetoma, pero sí induce la formación de anticuerpos específicos.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

En la infección o reinfección de ratones con *Actinomadura madurae*, es importante investigar las subpoblaciones celulares, así como la producción de citocinas pro y antiinflamatorias presentes en el tejido infectado y en los órganos linfoides en las diferentes etapas de la infección, con el propósito de conocer los mecanismos inmunológicos involucrados en la resolución o el establecimiento del micetoma.

CAPÍTULO 11

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, P. L., Desgarennnes, M. D. C. P., Gutiérrez, J. P., Rivera, I., & Rangel, S. R. (2000). Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. Revista del Centro Dermatológico Pascua, 9(1), 19-24.

Ahmed, A. A., van de Sande, W., & Fahal, A. H. (2017). Mycetoma laboratory diagnosis. PLoS neglected tropical diseases, 11(8), e0005638.

Bonifaz A. (2015) Micología Médica Básica: Propiedades generales de los actinomicetos y Micetoma. McGraw-Hill Medical. México. 725p

Bonifaz, A., Tirado-Sánchez, A., Vazquez-Gonzalez, D., Araiza, J., & Hernández-Castro, R. (2021). Actinomycetoma by *Actinomadura madurae*: Clinical Characteristics and Treatment of 47 Cases. Indian dermatology online journal, 12(2), 285–289. https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ_474_20

Fahal A. H. (2004). Mycetoma: a thorn in the flesh. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 98(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(03\)00009-9](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(03)00009-9)

Fahal A. H., Bakhiet S. M. (2023). Mycetoma and the environment. PLoS Negl Trop Dis 17(11): e0011736. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011736>

Fahal, A. H., van de Sande, W. W. J. (2012). The Epidemiology of Mycetoma. Curr Fungal Infect Rep. 6, 320–326. <https://doi.org/10.1007/s12281-012-0102-1>

Filippi N, Jorge, Quezada S, Felipe, Lagos L, Marcela, & García C, Patricia. (2008). Micetoma por *Actinomadura madurae* en el pie: Reporte de un caso en Chile. Revista médica de Chile, 136(11), 1448-1452. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872008001100011>

- Gumaa, S. A., & Abu-Samra, M. T. (1981). *Experimental mycetoma infection in the goat. Journal of Comparative Pathology*, 91(3), 341–346. doi:10.1016/0021-9975(81)90003-7
- Hao, X., Cognetti, M., Burch-Smith, R., Mejia, E. O., & Mirkin, G. (2022). Mycetoma: Development of Diagnosis and Treatment. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(7), 743. <https://doi.org/10.3390/jof8070743>
- Harada, K. I., Tomita, K., Fujii, K., Masuda, K., Mikami, Y., Yazawa, K., & Komaki, H. (2004). Isolation and structural characterization of siderophores, madurastatins, produced by a pathogenic *Actinomadura madurae*. *The Journal of Antibiotics*, 57(2), 125-135.
- Husain U, Verma P, Suvirya S, Priyadarshi K, Gupta P. (2023). An overview of mycetoma and its diagnostic dilemma: Time to move on to advanced techniques. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* ;89:12-7
- Gerber, N. N. (1969). Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri* and *Actinomadura madurae*. *Applied microbiology*, 18(1), 1-3.
- Jerez, R., Schafer, F., Fich, F., García, P., León, P., & González, S. (2012). Micetoma actinomicótico por *Actinomadura madurae*. *Revista chilena de infectología*, 29(4), 459-463. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000400018>
- Kamalam, A., & Thambiah, A. S. (1987). A clinico-pathological study of actinomycotic mycetomas caused by *Actinomadura madurae* and *Actinomadura pelletieri*. *Mycopathologia*, 97(3), 151–163. doi:10.1007/bf00437238
- Mahmoud, N., Fahal, A., & Wendy van de Sande, W. J. (2013). Association of IL-10 and CCL5 single nucleotide polymorphisms with tuberculosis in the Sudanese population. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 18(9), 1119–1127. <https://doi.org/10.1111/tmi.12141>

Palma-Ramos A. & Castrillon, Laura & Desgarennnes, C.P. & Fuentes, F.R.. (2005). Histochemical characterization of mycetomas due to *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis* and *Madurella mycetomatis*. 49. 51-58.

Palma-Ramos A., Castrillón RLE & Elija SJJ, et al. Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón. Rev Cent Dermatol Pascua. 2000;9(2):96-101.

Relhan, V., Mahajan, K., Agarwal, P., & Garg, V. K. (2017). Mycetoma: An Update. Indian journal of dermatology, 62(4), 332–340. https://doi.org/10.4103/ijid.IJD_476_16

RIPPON, J. W., & LORINCZ, A. L. (1964). COLLAGENASE ACTIVITY OF STREPTOMYCES (NOCARDIA) MADURAE. The Journal of investigative dermatology, 43, 483–486.

Rippon, J. W., & Peck, G. L. (1967). Experimental infection with *Streptomyces madurae* as a function of collagenase. The Journal of investigative dermatology, 49(4), 371–378. <https://doi.org/10.1038/jid.1967.151>

Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. (2004). Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. Infect Immun; 72: 5597–604.

Salinas-Carmona, M. C., Welsh, O., & Casillas, S. M. (1993). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. Journal of clinical microbiology, 31(11), 2901-2906.

Salinas-Carmona MC, Torres-Lopez E, Ramos AI, Licon-Trillo A, Gonzalez-Spencer D.(1999).Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. Infect Immun 67:<https://doi.org/10.1128/iai.67.5.2428-2432.1999>

Serrano, J. A., Díaz, C., F, & Uzcátegui, N., M. (2001). El género *Actinomadura*. Aspectos de su taxonomía, microbiología patología, clínica y terapéutica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 21(2), 34-37.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200010&lng=es&tlng=es.

Taha A. (1983). A serological survey of antibodies to *Streptomyces somaliensis* and *Actinomadura madurae* in the Sudan enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77(1), 49–50.

Van de Sande, W. W. (2013). Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta-analysis. PLoS neglected tropical diseases, 7(11), e2550.

Van De Sande, W., Taha, H., & Fahal, A. (2015). Mycetoma: epidemiology, treatment challenges, and progress. Research and Reports in Tropical Medicine, 31. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s53115>

Vera-Cabrera L, Molina-Torres CA, Crane AE, Cantú-Alvarez MG, Aguilera Valenciano MA, Gallardo-Rocha A, et al. (2025) *Actinomadura welshii* sp. nov., a New Mycetoma Agent in Mexico. PLoS Negl Trop Dis 19(4): e0013016.

Verma, P., & Jha, A. (2019). Mycetoma: reviewing a neglected disease. Clinical and experimental dermatology, 44(2), 123–129. <https://doi.org/10.1111/ced.13642>

Zijlstra, E. E., van de Sande, W. W. J., Welsh, O., Mahgoub, E. S., Goodfellow, M., & Fahal, A. H. (2016). Mycetoma: a unique neglected tropical disease. The Lancet. Infectious diseases, 16(1), 100–112. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00359-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00359-X)

APÉNDICE

Reactivos

Agar BHI (1 litro)

1. Pesar 52 g de Agar BHI BD Bioxon.
2. Agregar 1 litro de agua destilada en matraz Erlenmeyer.
3. Disolver completamente calentando la mezcla hasta que hierva en agitación.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 psi durante 45 minutos.
5. Dejar enfriar hasta que esté manejable.
6. Vertir 20mL en placas Petri estériles.
7. Dejar solidificar al interior de campana de flujo laminar hasta llegar a temperatura ambiente.
8. Sellar y refrigerar hasta su uso.

Caldo BHI (1 Litro)

1. Pesar 37 g del polvo de Caldo BHI BD Bioxon.
2. Agregar 1 litro de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
3. Mezclar bien hasta que el polvo se disuelva completamente con calor.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 psi durante 45 minutos.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Almacenar en refrigeración (2–8 °C) hasta su uso.

Solución salina estéril adicionada con Tween-80 (0.05% p/v) [1 litro]

1. Pesar 8.5 g de NaCl.
2. Agregar 900 mL de agua destilada estéril en un matraz Erlenmeyer.
3. Agregar 0.5 g (0.47 mL) de Tween-80.
4. Mezclar con agitación hasta disolver.
5. Ajustar el volumen final a 1000 mL con agua destilada.
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 45 minutos.
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
8. Almacena en refrigeración (2–8 °C).

Solución de Lisis (NH₄Cl) [100 mL]

1. Pesar 1.0 g de NH₄Cl en balanza analítica.
 2. Agregar 80 mL de agua destilada en vaso de precipitado.
 3. Disolver completamente el NH₄Cl con agitación.
 4. Completar el volumen a 100 mL de agua destilada.
 5. Almacenar a 4 °C.
- Nota: No usar después de 1 mes de almacenamiento.

Ácido Acético al 2% (1 Litro)

Precaución: Colocar guantes y equipo de seguridad (el ácido glacial es corrosivo y sus vapores son tóxicos).

1. Medir 20 mL de ácido acético glacial, usando una pipeta graduada, en campana de extracción.
2. Agregar el ácido a un matraz Erlenmeyer con 500 mL de agua destilada.
 - a. Nota: Siempre agregar el ácido al agua, nunca al revés.
3. Mezclar bien con agitación suave.
4. Completar el volumen a 1000 mL con agua destilada.
5. Etiquetar claramente con concentración, fecha y precauciones.
6. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente cerrado.

Formaldehído al 10% (1 Litro)

1. Calcular el volumen de formaldehído al 38%, necesario para obtener formaldehído al 10%:
 - a. $V1 = \frac{C2 \cdot V2}{C1} = \frac{10\% \cdot 1000 \text{ mL}}{38\%} = 263 \text{ mL}$
2. Medir 263 mL de formaldehído 38% con pipeta graduada.
3. Colocar en un recipiente apropiado (ámbar).
4. Agregar lentamente agua destilada hasta completar 1 litro.
5. Mezclar suavemente para homogeneizar.
6. Etiquetar el recipiente con concentración, fecha y precauciones.
7. Guardar en lugar fresco y ventilado, con tapa segura.

PBS-Tween 20 (1 Litro)

1. Preparar 1 litro de PBS (pH 7.0).
2. Medir 0.5 mL de Tween 20 con una micropipeta o jeringa.
3. Agregar el Tween 20 al PBS.
4. Mezclar hasta que el Tween 20 se disuelva.
5. Almacenar la solución en un frasco limpio a 4 °C.

Nota: Agitar antes de usar para asegurar homogeneidad.

Buffer de acetatos pH 5.0

1. Medir 2.86 mL de Ácido acético en pipeta graduada en campana de extracción.
2. Pesar 0.41 g de Acetato de sodio anhidro.
3. Pesar 0.68 g de Acetato de sodio trihidratado.
4. Agregar a un matraz Erlenmeyer con 250 mL de agua destilada
5. Mezclar hasta homogeneizar los componentes.
6. Llevar el volumen hasta 500 mL con agua destilada
7. Ajustar el pH a 5.0.
8. Refrigerar a 4 °C.

PBS pH 7.2-7.4 (250 mL)

1. Pesar 0.055 g de KCl.
2. Pesar 0.2875 g de Na_2HPO_4 .
3. Pesar 0.05 g de KH_2PO_4 .
4. Pesar 2.015g de NaCl.
5. Colocar los reactivos en un vaso de precipitado de 500 mL.
6. Disolver con 100 mL de agua bidestilada.
7. Ajustar el pH en un rango de 7.2 a 7.4.
8. Trasvasar a un matraz volumétrico de 250 mL y aforar con agua bidestilada.
9. Colocar en un recipiente y almacenar en refrigeración a 4 °C.

Solución de Lavado

1. Tomar 199.8 mL de PBS.
2. Añadir 200 μL de Tween 20 (1:1000).
3. Homogenizar la dilución.
4. Agregar a un frasco y almacenar en refrigeración a 4 °C.

Solución de Bloqueo (Leche descremada al 5% en PBS) [50 mL]

1. Pesar 2.5 g de leche descremada
2. Añadir 25 mL de PBS a un vaso de precipitado
3. Colocar la leche en el vaso de precipitados
4. Añadir 25 mL de PBS
5. Disolver hasta obtener mezcla homogénea.

Nota: Preparar en el momento del ensayo.

Sustrato Cromógeno

Nota: Cubrir previamente un tubo cónico de 50 mL con papel aluminio.

1. Pesar 0.1274 g de ácido cítrico.
2. Pesar 0.1817 g de fosfato dibásico de sodio.
3. Colocarlos en el tubo y añadir 20 mL de agua bidestilada
4. Ajustar a pH 5.0
5. Llevarlo a 25 mL
6. Agregar 0.01 g de O-fenilendiamina
7. Agregar 3 μL de peróxido de hidrogeno al 30%.
8. Mezclar por inversión.

Solución para detener la reacción

1. Agregar 3 mL de agua bidestilada en matraz volumétrico de 10 mL.
2. Agregar 1.53 mL de ácido sulfúrico 1N al matraz.
3. Aforar con agua bidestilada.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Benito Briones Bautista

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Título de tesis: DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA POR *Actinomadura madurae* Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN RATONES BALB/C

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Nuevo Laredo, Tamaulipas, México; el 25 de Mayo de 1998, hijo de Benito Briones de León y Rosaelia Alejandra Bautista García.

Educación: Egresado de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado obtenido de Licenciatura en Ingeniería Biomédica en el año 2023.