

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**DINÁMICA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T REGULADORES,
TH17 Y TC17 EN EL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR
Nocardia brasiliensis EN RATONES BALB/c.**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

AMIRA RAQUEL PÉREZ LIÑÁN

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre, 2010



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-163/2010.

C. AMIRA RAQUEL PÉREZ LIÑÁN
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**Dinámica de subpoblaciones de linfocitos T reguladores, Th17 y Tc17 en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo al **Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco** y como asesor a la **Dra. Galina Petrovna Zaitseva**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 16 de noviembre de 2010.



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

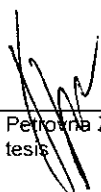
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis, con el título: "Dinámica de subpoblaciones de linfocitos T reguladores, Th17 y Tc17 en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c." que realizó la pasante Amira Raquel Pérez Liñán con número de código 207230958 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

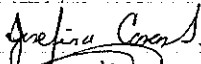
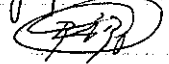
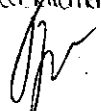
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.


Atentamente,

Las Agujas, Zapopan, Jal., 18 de noviembre de 2010


Dr. Adrián Giovanni Rosas Taraco
Director de tesis


Dra. Galina Petrovna Zaitseva
Asesora de tesis

Nombre completo de los Síndacos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Josefina Casas Solís		18/Nov/10
Dr. Ramón Reynoso Orozco		18/nov/2010
M. C. Verónica Palomera Avalos	Verónica Palomera G	18/Nov/10
Supl. Dra. Galina Petrovna Zaitseva		18/nov/10

V. B. O.
24/11/2010


LUGAR DE TRABAJO

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública con Clave PROMEP/103.5/09/3905.

DEDICATORIA

A mis padres Jorge y Lupita, quienes me brindaron su apoyo incondicional, por impulsarme lejos y mantenerse cerca;

A mi hermano, Jorge Alán por ser mi confidente, mi temple, mi amigo;

A Verónica Palomera por acompañarme y guiarme con paciencia y cariño a lo largo de mi formación.

A todos ustedes que estuvieron a mi lado en los momentos difíciles; que festejaron mis logros; que comprendieron, apoyaron y engrandecieron mis sueños, les agradezco de todo corazón, el que estén en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento:

Al Dr. Mario César Salinas por otorgarme la oportunidad de completar mi formación académica dentro de su departamento.

Al Dr. Adrián Rosas por permitirme trabajar en su laboratorio, por su orientación, paciencia, apoyo, dedicación y compromiso al dirigir esta tesis.

A la Dra. Isabel Pérez y la Dra. Velia Vázquez por sus comentarios que enriquecieron esta tesis.

A Alejandra Gallegos por su disponibilidad y apoyo técnico.

A Reynaldo Rodríguez por su ayuda en el mantenimiento de los ratones.

Al Laboratorio de Hematología por permitir la utilización del citómetro.

Irene y Francisco, por compartir su conocimiento y brindarme su apoyo.

A Jazmín, Alberto, Esmé, Armando, Ale, Corazón y Heidi, por su gran compañerismo y disposición, pero sobre todo por todos los momentos que compartimos dentro y fuera de laboratorio.

A Ivonne Armendariz por brindarme no solo su apoyo incondicional en todo momento sino también su amistad y cariño.

A mi comisión de tesis y mi asesora, por su tiempo y dedicación en esta tesis.

A mi tutora, Verónica Palomera por buscar siempre mi superación profesional, por su apoyo académico y sobre todo, su amistad.

De igual manera agradezco al Espacio Común de Educación Superior (ECOES) y al grupo Santander por la beca otorgada.

ÍNDICE

	Página
Lista de figuras.....	I
Abreviaturas.....	II
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
ANTECEDENTES.....	1
1.1 Actinomicetos.....	1
1.1.1 Taxonomía.....	1
1.1.2 Género <i>Nocardia</i>	2
1.2 Micetoma.....	3
1.2.1 Actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	5
1.2.2 Respuesta inmune contra <i>Nocardia</i>	6
1.2.2.1 Inmunidad innata contra <i>Nocardia</i>	6
1.2.2.2 Inmunidad adquirida contra <i>Nocardia</i>	7
1.2.2.3 Subpoblaciones de linfocitos Th17, Tc17 y Treg.....	8
2. JUSTIFICACIÓN.....	12
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos particulares.....	14
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Materiales.....	16
6.1.1 Equipos utilizados.....	16
6.1.2 Material biológico.....	16
6.1.2.1 Células bacterianas.....	16
6.1.2.2 Animales de experimentación.....	16
6.2 Metodología.....	16
6.2.1 Metodología para el cultivo de células bacteriana.....	16
6.2.2 Metodología para el modelo experimental del Actinomicetoma en ratones BALB/c.....	17
6.2.3 Obtención de tejido para citometría.....	17

6.2.3.1 Preparación de tejido para citometría.....	18
6.2.3.2 Tinción para células T regulatorias.....	18
6.2.3.3 Tinción para células Th17 y Tc17.....	19
6.2.4 Obtención de las proteínas del actinomicetoma.....	19
6.2.4.1 Cuantificación de citocinas.....	20
6.2.5 Análisis estadístico.....	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Establecimiento del actinomicetoma.....	24
7.1.2 Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos Treg, Th17 y Tc17 en el actinomicetoma.....	25
7.2 Esplenomegalia posterior a la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> ..	28
7.2.1 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos Treg, Th17 y Tc17 en el bazo.....	29
7.3 Niveles de citocinas durante el establecimiento del Actinomicetoma.....	32
8. DISCUSIÓN.....	37
9. CONCLUSIONES.....	42
10. PERSPECTIVAS.....	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXO 1	
Equipos utilizados	49
ANEXO 2	
Reactivo para obtención de tejido y células.....	50
ANEXO 3	
Cuantificación de proteínas.....	51
ANEXO 4	
Reactivos para la realización de ELISA.....	53
ANEXO 5	
Curvas de calibración para las citocinas.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Imagen de actinomicetoma causado por <i>Nocardia</i>	3
FIGURA 2. Distribución de micetoma en el mundo.....	4
FIGURA 3. Establecimiento de una infección crónica.....	11
FIGURA 4. Diseño experimental.....	15
FIGURA 5. Etapas del establecimiento del actinomicetoma en modelo murino.....	24
FIGURA 6. Porcentaje de células Treg, Th17 y Tc17 provenientes de tejido obtenido de cojinete plantar durante el establecimiento del actinomicetoma causado por <i>Nocardia brasiliensis</i>	27
FIGURA 7. Esplenomegalia posterior a la infección por <i>N. brasiliensis</i>	28
FIGURA 8. Porcentaje de células Treg, Th17 y Tc17 provenientes de bazo durante el establecimiento del actinomicetoma causado por <i>Nocardia brasiliensis</i>	31
FIGURA 9. Niveles de IL-6, IL-17 A, IL-23, IL-10 y TGF- β en tejido de cojinete plantar durante el establecimiento del actinomicetoma causado por <i>Nocardia brasiliensis</i>	36
FIGURA 10. Curva de calibración de los estándares para IL-6.....	54
FIGURA 11. Curva de calibración de los estándares para IL-10.....	54
FIGURA 12. Curva de calibración de los estándares para IL-17A.....	55
FIGURA 13. Curva de calibración de los estándares para IL-23.....	55
FIGURA 14. Curva de calibración de los estándares para TGF- β	56

ABREVIATURAS

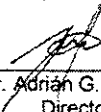
%	Porcentaje
µg	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Alofococianina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain-Heart Infusion (infusión cerebro corazón)
CD4 ⁺	Clúster de diferenciación 4
CD8 ⁺	Clúster de diferenciación 8
cm	Centímetros
CTL	Linfocitos T citotóxicos
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Forkhead/winged-helix transcription factor box P3
G-C	Guanina-Citosina
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GFP	Green Fluorecent Protein (proteína verde fluorescente)
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Amortiguador (del inglés 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid)
IFN-γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6
M	Molar
Medio RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute

mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
°C	Grados Celsius
PBS	Amortiguador salino de fosfato
PE	Ficoeritrina
pg	Picogramos
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media
Tc17	Linfocito T citotóxico 17
TGF- β	Transforming Growth Factor β (Factor de Crecimiento Transformante Beta)
Th17	Linfocito T cooperador 17
TMB	3,3', 5, 5 'Tetrametilbenzdina
Treg	Linfocito T regulatorio
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
μ l	Microlitros

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica, la cual puede ser causada tanto por hongos como por bacterias; en este último caso, la enfermedad es denominada actinomietoma. *Nocardia brasiliensis* (*N. brasiliensis*), un patógeno intracelular facultativo Gram positivo, es una de las bacterias capaces de producir actinomietoma. Vive como saprófito en el suelo y la infección por este microorganismo se produce por inoculación accidental. La infección por *N. brasiliensis* genera una respuesta inflamatoria, con múltiples microabscesos que contienen la bacteria; existe la formación de un granuloma, así como la infiltración de células mononucleares, principalmente, linfocitos. La respuesta de linfocitos Th1 y Th2 ya ha sido evaluada en la infección por *N. brasiliensis*. Actualmente, se conoce del papel de los linfocitos Treg y Th17 y poco de los Tc17 en otras enfermedades infecciosas, pero éstos no han sido estudiados en la infección por *N. brasiliensis*. **OBJETIVO:** Evaluar los niveles de los linfocitos Treg, Th17 y Tc17, así como, sus citocinas relacionadas durante el establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c. **METODOLOGÍA:** Los ratones fueron infectados en el cojinete plantar con *N. brasiliensis* y sacrificados a los días 0, 3, 7, 15, 30 y 60 días posteriores a la infección. Los linfocitos Treg, Th17 y Tc17 fueron analizados a partir de una suspensión celular obtenida del cojinete plantar, así como, en bazo mediante citometría de flujo, mientras que la cuantificación de las citocinas IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 y TGF- β fue por ELISA, utilizando el homogenizado de tejido. **RESULTADOS:** En tejido obtenido de cojinete plantar los linfocitos Th17 y Tc17 se incrementan al día 3 ($P < 0.0001$ y $P < 0.003$), mientras que las células Treg se incrementan al día 7 posteriores a la infección ($P < 0.0001$). Sin embargo, a partir del día 15 se observó que las tres subpoblaciones decayeron hasta presentar niveles similares. En bazo, los linfocitos Treg alcanzan su punto más alto al día 15 ($P < 0.001$) posterior a la infección, mientras que Tc17 ($P < 0.001$) y Th17 ($P < 0.05$) lo alcanzan al día 3. Por otro lado, las citocinas anti-inflamatorias como TGF- β mostraron niveles altos a los días 7 y 30 ($P < 0.01$) e IL-10 al día 15. IL-17A e IL-23 incrementaron gradualmente durante la infección ($P < 0.007$ y $P < 0.002$); y finalmente IL-6 solo se incrementó al día 3 ($P < 0.001$). **CONCLUSIÓN:** Existe un desbalance de las subpoblaciones de linfocitos Treg, Th17 y Tc17 en las etapas tempranas del establecimiento de *N. brasiliensis* lo cual podría estar favoreciendo la permanencia de la enfermedad.

Aprobación de Resumen:



Dr. Adrián G. Rosas Taraco
Director de Tesis

ABSTRACT

BACKGROUND: Mycetoma is a chronic infectious disease produced by fungi or bacteria; in the latter it is called actinomycetoma. One of the causative pathogens is *Nocardia brasiliensis*, which is a Gram positive, facultative intracellular bacterium that lives as saprophyte in soil and enters human skin by traumatic inoculation. Nocardia infection induces an inflammatory response with multiple microabscesses and granuloma formation with abundant large cells and mononuclear infiltration, mainly lymphocytes. Th1 and Th2 lymphocytes response have been evaluated in *N. brasiliensis* infection. T regulatory, Th17, and Tc17 lymphocyte subpopulations are being studied to evaluate their role in immunopathogenesis of several infectious diseases, but there are not data in *N. brasiliensis* infection. **OBJECTIVE:** Evaluate the levels of Treg, Th17 and Tc17, as well as their related cytokine levels during *N. brasiliensis* infection in BALB/c mice. **METHODOLOGY:** Mice infected with *N. brasiliensis* in the footpad were sacrificed at 0, 3, 7, 15, 30, 60 days after infection and levels of Treg, Th17 and Tc17 cells in the obtained tissue and spleen were measured by flow cytometry, and their related cytokines (IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 and TGF- β) in the homogenized tissue were measured by ELISA. **RESULTS:** In footpad tissue, Th17 and Tc17 lymphocytes were increased at day 3 ($P < 0.0001$ and $P < 0.003$), while Treg cells are increased at day 7 post-infection ($P < 0.0001$). However, from day 15 onwards, the three subpopulations decreased until they presented the same levels. In spleen, Treg cells reached its peak at day 15 ($P < 0.001$) meanwhile Tc17 and Th17 at day 3 ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). On the other hand, anti-inflammatory cytokines levels were higher (TGF- β at day 7 and 30, $P < 0.01$; IL-10 at day 15. IL-17A and IL-23 levels were increased gradually during the infection ($P < 0.007$ and $P < 0.002$). Finally, IL-6 was increased at day 3 ($P < 0.001$). **CONCLUSION:** There is an imbalance of Treg, Th17 and Tc17 in the early stage of *N. brasiliensis* that could favor chronic disease.

Aprobación de Abstract:



Dr. Adrián G. Rosas Taraco
Director de Tesis

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ACTINOMICETOS

Los Actinomicetos son un grupo de bacterias tipo Gram-positivo, con alto contenido de G-C en su ADN y son las que conforman el phylum llamado Actinobacteria (1). Este phylum es uno de los más grandes grupos taxonómicos dentro del dominio de las bacterias (2).

El hábitat más común de los Actinomicetos o Actinobacterias es el suelo, donde representan el 25% total de la biomasa. Son de gran distribución pues logran sobrevivir y desarrollarse incluso bajo niveles de nutrientes muy bajos y entre rangos de temperatura muy amplios que van desde 5°C a 65°C (2).

Estos microorganismos son de gran importancia en la reincorporación de compuestos orgánicos al suelo; algunos actúan como agentes oxidativos favoreciendo la producción de humus, reducen nitratos a nitritos, otros incluso, gracias a la presencia de enzimas, pueden descomponer la celulosa, la lignina, o lograr romper proteínas en aminoácidos y en amoníaco (3). La mayoría de estas bacterias tienen un papel benéfico en la naturaleza y sólo unas cuantas especies son capaces de producir enfermedades ya sea en las plantas, animales o el hombre (3).

1.1.1 TAXONOMÍA

El phylum de las Actinobacterias, a su vez se divide en dos subclases: acidimicrobidae y actinobacteridae (4). En éste último grupo se encuentra el orden de los Actinomicetales, los cuales se caracterizan por presentar un crecimiento ramificado de filamentos llamado micelio. Este micelio es análogo al micelio o conjunto de hifas presente en hongos, razón por el cual los Actinomicetales fueron considerados por mucho tiempo pertenecientes al reino fungi (1). Sin embargo, poco después se determinó que la pared celular de

estos microorganismos era rica en lípidos, había presencia de péptidoglicanos y ausencia de quitina confirmando así la naturaleza bacteriana de dichos organismos (5).

A pesar de la gran cantidad de Actinobacterias existentes, solo unas cuantas especies son reconocidas como patógenas para los seres humanos. Estos pocos grupos pertenecen solo al orden Actinomycetales, el cual incluye ocho familias de interés médico. Algunas de las más importantes son: *Actinomycetaceae*, *Meduromycetaceae*, *Streptomyetaceae* y *Nocardiaceae*. A estas bacterias se les encuentra con facilidad en tierras con gran cantidad de materiales orgánicos, así como en aguas pantanosas y diversos detritus en el suelo, y por lo tanto representan un importante riesgo de infección, sobre todo para la población de tipo rural (6).

1.1.2 GÉNERO NOCARDIA

Dentro de la familia *Nocardiaceae* se encuentra el género *Nocardia*, descrito por primera vez por Trevisan en 1889. Estas bacterias son de tipo filamentosas, Gram positivas, aerobias, parcialmente ácido resistentes o no ácido resistentes presentan una extensa ramificación celular (6). Las ramificaciones filamentosas se fragmentan en células pleomórficas que varían en formas de cocos hasta forma de bastón.

Este género es de gran importancia médica por su capacidad para generar distintos tipos de infecciones como: nocardiosis localizada o sistémica, infecciones cutáneas, infecciones linfocutáneas y micetomas (3). Existen tres grupos de *Nocardia* responsables de la mayoría de las infecciones humanas: *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitis caviarum*, todas ellas capaces de desarrollar micetomas (3).

1.2 MICETOMA

El micetoma es una enfermedad crónico-infecciosa que puede ser causada tanto por hongos como *Madurella griseae* o por bacterias como *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis* y *Nocardia brasiliensis*. Al micetoma ocasionado por hongos se le denomina eumicetoma y al producido por bacterias, actinomictoma (6).

El primer caso descrito de micetoma fue en 1842, por Gill en Madura, India. En 1846 Godfrey publicó cuatro casos más a los cuales llamó "morbus tuberculosis pedis". En 1860 se describe la etiología fúngica de un micetoma (5). El primer caso conocido de una enfermedad producida por *Nocardia* fue reportado por Edmond Nocard en 1888 cuando aisló un organismo filamentosos de lesiones granulomatosas en bovinos (7). Dos años después Eppinger reportó el primer caso conocido de *Nocardia* en humanos en un paciente con abscesos cerebrales (3) y no fue hasta 1913 cuando Pinoy describe los micetomas causados por Actinomictos. Por lo tanto, es en esta época cuando quedan establecidos los conceptos eumicetomas y actinomictomas para describir al micetoma causado por hongos y el causado por bacterias, respectivamente (6).

Dicha enfermedad se caracteriza por una inflamación granulomatosa y crónica, con áreas de abscesos las cuales se abren y drenan un exudado con granos, en los cuales se encuentran microcolonias del agente causal (Figura 1). Generalmente, se observa la destrucción pasiva del tejido blando y estructuras anatómicas blandas (6).

A.



B.



Figura1. Lesiones de pacientes con actinomictoma causado por *Nocardia* (6). A) Imagen de actinomictoma en mano derecha; B) Imagen de actinomictoma en pie.

Debido a que las lesiones producidas por el micetoma son indoloras, el periodo de incubación no es muy claro, teniendo así un rango que va desde unos pocos meses a varios años (8). La infección ocurre por inoculación accidental, en heridas producidas como resultado del trabajo en campo, cargar leña o restos vegetales. Es así como cualquier parte del cuerpo que es expuesta, puede ser afectada, sin embargo, los sitios de más frecuencia son, en orden descendente: los pies, sobre todo en la superficie dorsal, manos, brazos, rodilla, cabeza y cuello (9).

El micetoma es endémico de zonas tropicales y subtropicales (Figura 2). La prevalencia para cada tipo de organismo causante de dicha enfermedad depende de factores como topografía, temperatura, tipo de suelo, humedad, vegetación y las condiciones demográficas de la población susceptible a la enfermedad (9).

Distribución de los casos de micetoma en el mundo. Estimación hecha por cantidad de casos reportados en cada país o región

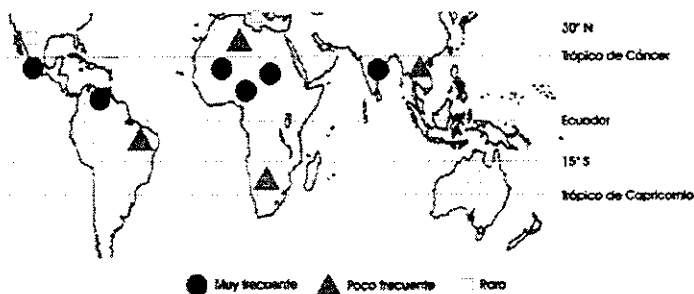


Figura 2. Distribución de micetomas en el mundo (6).

África tiene la mayor cantidad de micetomas reportados en el mundo, sin embargo, la mayoría suelen ser eumicetomas. Un estudio de casos en Sudán reportó que el 71.4% de los casos fueron eumicetomas causados por *Madurella mycetomatis*, mientras que el 18% eran actinomicetomas provocados por *Streptomyces somaliensis* (6). Otro estudio en Somalia arrojó resultados

similares, donde la mayoría de los casos (41%) fueron eumicetomas provocados por *M. mycetamitis* y solo el 23% fueron actinomicetomas, donde *S. somaliensis* fue el agente causal (10).

Por otro lado, en México un estudio llevado a cabo por López Martínez y colaboradores (1992) reveló la existencia de 2015 casos de micetomas, durante un periodo de 30 años (1956-1985). Donde solo el 2.2% fueron eumicetomas provocados por *Madurella grisea* y *M. mycetomatis* mientras que el 97.8% fueron actinomicetomas, donde en el 86.6% de los casos, *N. brasiliensis* fue el agente causal. Así mismo, en dicho estudio se determinó que la distribución por sexo es 4 a 1 en relación hombre-mujer, mientras que las ocupaciones predominantes fueron un 60.2% agricultores y 21.3% amas de casa quienes también realizaban labores en el campo (11).

1.2.1 ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Subclase: Actinobacteridae

Orden: Actinomycetales

Suborden: Corynebacterineae

Familia: Nocardiaceae

Género: Nocardia

Especie: *N. brasiliensis*

En nuestro país, hasta el 2004 se han reportado 1844 casos de actinomicetomas, en donde *N. brasiliensis* es el principal agente etiológico (6). Por lo anterior, en México los actinomicetomas representan un problema de salud pública debido a la frecuencia, cronicidad y secuelas que dicha enfermedad representa.

Nocardia brasiliensis (*N. brasiliensis*), es una especie perteneciente al grupo de los Actinomicetos. Este patógeno intracelular es una bacteria aerobia, de tipo

inmóvil, Gram-positiva, cuyo hábitat natural es generalmente el suelo, sobre todo tierras ricas en materia orgánica (5).

Las infecciones causadas por *N. brasiliensis* ocurren de manera accidental por inoculación del microorganismo en la piel y el tejido subcutáneo (9). Su diagnóstico se lleva a cabo por la presencia de microcolonias o gránulos, el cual es confirmado por un cultivo microbiológico o por serotipificación (5).

1.2.2 RESPUESTA INMUNE CONTRA NOCARDIA

Una vez que sucede la inoculación de *N. brasiliensis*, sus proteínas y las moléculas complejas de su pared bacteriana, funcionan como antígenos induciendo una fuerte respuesta inmune por parte del huésped. En etapas tempranas de la infección la respuesta inmune reclutará fagocitos y polimorfonucleares. En etapas posteriores se infiltrarán linfocitos y macrófagos al sitio de la infección, favoreciendo el proceso de inflamación y fagocitosis de los microorganismos. Algunas veces, es suficiente esta respuesta para eliminar a la bacteria; sin embargo, en otras ocasiones, el microorganismo logra sobrevivir en el interior de los macrófagos, multiplicarse y desarrollar así una infección crónica. Los mecanismos por los cuales dicha bacteria logra evadir la respuesta inmune incluso en personas inmunocompetentes, aún son desconocidos (6, 12).

Para lograr definir los mecanismos inmunes desatados en respuesta a *N. brasiliensis* se han desarrollado modelos de actinomicetoma experimental en ratones así como otros experimentos. Con los cuales se ha encontrado evidencia de la respuesta tanto innata como adquirida.

1.2.2.1 INMUNIDAD INNATA CONTRA NOCARDIA

En los primeros estudios realizados para observar la interacción entre las células de la respuesta inmune y la Nocardia, se encontró que macrófagos peritoneales de ratón, cultivados *in vitro* eran capaces de fagocitar a *N. asteroides*. En estos estudios, también se observó que algunas bacterias

lograban sobrevivir dentro de los macrófagos (13). Por otro lado, se estudió la respuesta de polimorfonucleares y monocitos humanos, los cuales eliminan a los microorganismos mediante mecanismos denominados ataques oxidativos y no oxidativos. En el caso de los organismos intracelulares, se encontró que las células polimorfonucleares eran capaces de eliminar el 90% de *Listeria monocytogenes*, un patógeno intracelular. Sin embargo, en el caso de *N. asteroides*, el porcentaje fue menor; posiblemente debido a la actividad de catalasas dentro de las cepas virulentas de *N. asteroides*. Así mismo se encontró que dicho patógeno era capaz de resistir los ataques oxidativos por parte de los monocitos y neutrófilos (14, 15).

1.2.2.2 INMUNIDAD ADQUIRIDA CONTRA NOCARDIA

Las infecciones causadas por bacterias intracelulares, como *N. brasiliensis*, tienden también a inducir una respuesta inmune mediada por células. En este tipo de reacción, es muy importante el papel de las células TCD4⁺, en especial las productoras de IFN- γ , el cual se encargará de la activación de los macrófagos para la eliminación de los patógenos fagocitados (16).

No obstante, al igual que en otras bacterias intracelulares, *N. brasiliensis* tiene la capacidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedero, escapando del fagolisosoma e inclusive resistiendo los ataques oxidativos. De esta manera, se podría estar causando la activación crónica de las células TCD4⁺ (16).

Estudios llevados a cabo en ratones previamente inmunizados contra *N. asteroides* y deficientes para células T (Nu^{-/-}) mostraron que estos animales son más susceptibles a la infección una vez inoculados con el 50% de la dosis letal de *N. asteroides* GUH-2 vía intravenosa, en comparación a los heterocigotos (Nu^{+/-}) (17). Así mismo, ratones esplenectomizados y por lo tanto con menor eficiencia de células T y menor cantidad de inmunoglobulina, mostraron no ser tan susceptibles a la infección por Nocardia, en comparación a los ratones atímicos congénitamente (Nu^{-/-}). Sin embargo, los ratones esplenectomizados

no fueron capaces de resolver la infección en comparación a los heterocigotos ($Nu^{+/+}$), los cuales sí contaban con células T viables (14).

Esto fue evidencia suficiente para demostrar la importancia de las células T para la defensa del hospedero contra *Nocardias*. Salinas-Carmona y colaboradores desarrollaron e investigaron en un modelo de ratón de actinomicetoma inducido por *N. brasiliensis*, el papel de los linfocitos Th1, Th2, sus citocinas y anticuerpos generados en respuesta al patógeno. En los cuatro primeros días después de la infección se encontraron altos niveles de IFN- γ principal citocina relacionada con la respuesta Th1, que además está asociada con la activación de macrófagos y sus mecanismos microbicidas. Por otro lado, se encontraron altos niveles de IL-4, IL-6, e IL-10, las cuales se relacionan con la respuesta de Th2 y la inducción de la respuesta de anticuerpos. Finalmente, los estudios de anticuerpos anti-*N.brasiliensis* mostraron la presencia de los isotipos de inmunoglobulinas IgM e IgG a partir del día 7 post-infección, los cuales permanecieron en concentraciones similares a lo largo de la infección (5, 12). Por otro lado, se demostró que el anticuerpo IgM obtenido de los primeros días de infección con *N. brasiliensis*, protege parcialmente el desarrollo del actinomicetoma inducido por *N. brasiliensis*, mientras que el anticuerpo IgG aparentemente puede contribuir al desarrollo del actinomicetoma (18, 19). Lo anterior, definió el posible papel de los linfocitos Th1, Th2 y la respuesta de anticuerpos en la infección por *N. brasiliensis*.

1.2.2.3 SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Th17, Tc17 Y Treg

Dentro de las subpoblaciones de los linfocitos T cooperadores (Th) se encuentran las células Th17, un nuevo subtipo de células $CD4^+$ secretoras de IL-17. La IL-17 es una citocina pro-inflamatoria que ha sido relacionada con procesos inflamatorios crónicos (o bien, que presentan una reacción de hipersensibilidad tardía), como artritis, miocarditis, asma, alergias (7) y recientemente con la defensa antimicrobiana (20).

Dentro de la familia de IL-17, se han descrito 6 miembros: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F (21). Sin embargo, solo IL-17A e IL-17F son

homólogos estructuralmente y los dos emplean el mismo receptor IL-17RA (del inglés interleukin-17 receptor A). Tanto IL-17A como IL-17F promueven a su vez, la secreción de G-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos), otra importante citocina para la estimulación de neutrófilos y por lo tanto, un factor importante dentro de un proceso inflamatorio (22). También existe evidencia de que IL-17A e IL-17F inducen la secreción de péptidos antimicrobianos como son las defensinas y las proteínas S100, por lo cual también juegan un papel importante dentro de la defensa antimicrobiana (23, 24).

Los factores involucrados en la polarización de los linfocitos Th17 son la interleucina 1- β , IL-6 y TGF- β (20). También se ha encontrado que IL-23 es una citocina importante para el mantenimiento de Th17 sobre todo en ratones infectados con patógenos intracelulares como son *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esto se comprobó al observar que en ratones deficientes para IL-23 p19 no había respuesta de Th17, pero además había una disminución en la expresión del RNAm de IL-17A (25, 26).

Por otro lado, los linfocitos T citotóxicos son de gran importancia en la defensa contra patógenos intracelulares (principalmente virus) y cáncer. Se diferencian de células precursoras CD8⁺ y al ser activadas por la presentación de antígenos en el contexto de MHC Clase I adquieren la capacidad de liberar perforinas y granzimas para eliminar a la célula blanco (27). Un estudio realizado en sangre periférica humana demostró la expresión de IL-17 en células TCD8⁺. En este estudio se encontró que al estimular células mononucleares con ionomicina/PMA (Acetato de Forbol Miristato), el RNAm para IL-17 se expresaba en altas cantidades tanto en células TCD8⁺, como en TCD4⁺ (28).

Recientemente, en otro estudio llevado a cabo en ratones, se demostró que las células CD8⁺ pueden ser cultivadas *in vitro* bajo la presencia de IL-6, IL-21 y TGF- β para inducir a la diferenciación de Tc17, es decir, células T citotóxicas capaces de producir IL-17. De igual manera se comprobó que dichas células son distintas a otras células T citotóxicas (CTL) no solo por la producción de

IL-17, sino también por mostrar una drástica reducción en la expresión de granzimas B, IFN- γ y factor de transcripción Eomesodermin (Eomes), lo cual reduce la actividad citotóxica de éstas células (27). Otros estudios han relacionado estas células con la respuesta de hipersensibilidad donde desarrollan un papel importante en la respuesta inflamatoria (29). Así mismo, otro estudio, comprobó su papel contra patógenos intracelulares al encontrar dichas células durante los primeros días en tejido de pulmón de ratones infectados con el virus de la influenza tipo A (30).

Finalmente, las células T regulatorias, son una subpoblación de linfocitos encargadas de proteger al huésped de una inflamación excesiva y de prevenir la autoinmunidad (31). Existen varios marcadores moleculares sugeridos para dichas células, sin embargo, los más comunes son CD25⁺ y Forkhead/winged-helix transcription factor box P3 (Foxp3⁺). Las células Tregs producen principalmente IL-10 y TGF- β , citocinas relacionadas con el proceso anti-inflamatorio (31). Estas células tienen la capacidad de suprimir otras subpoblaciones linfocitarias como Th1, Th2 e inclusive las Th17 (32), Figura 3. Existe evidencia de que en ratones carentes de CD25⁺ CD4⁺ se desarrollan enfermedades autoinmunes y alergias, así mismo para los roedores deficientes para el gen Foxp3⁺ (33).

Las células T regulatorias también han sido encontradas durante la infección por *M. tuberculosis*. Scott-Browne en el 2007 desarrolló un proyecto en el que se utilizaron ratones marcados con Foxp3-GFP y después fueron infectados con *M. tuberculosis* encontrando que las células Treg se acumularon en gran cantidad en los sitios donde a su vez, había gran cantidad de células CD4⁺ posiblemente para inhibir las funciones de otras subpoblaciones TCD4⁺, así como, de linfocitos TCD8⁺. Por otro lado, se observó que en ratones a los cuales se les bloqueó la expresión de Foxp3 antes de la infección, la carga bacteriana fue menor en los pulmones comparado con el grupo control (34). Debido a esto, se ha propuesto que las células Treg son un factor importante que permite a los patógenos intracelulares, como son *M. tuberculosis*, sobrevivir dentro de las células y establecer una infección persistente.

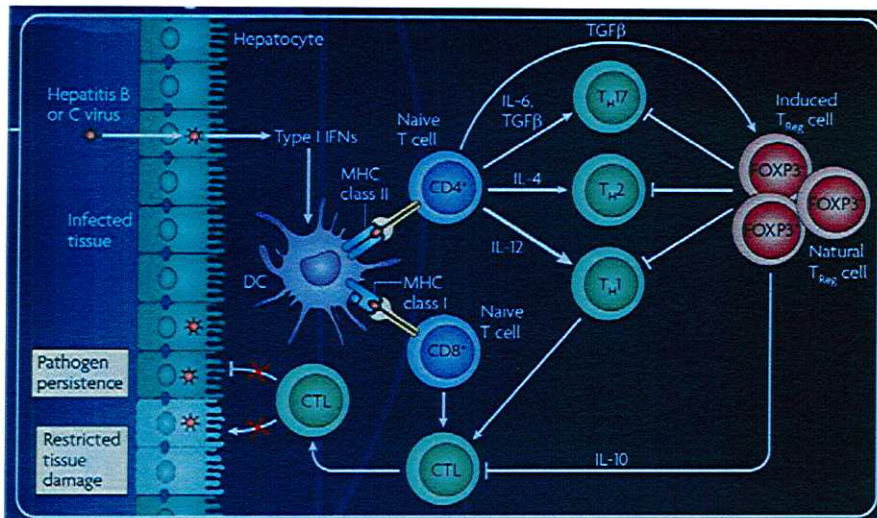


Figura 3. Establecimiento de una infección crónica. Se observa como las células T regulatorias son capaces de suprimir la respuesta de Th17, Th2, Th1 y las células T citotóxicas al momento de una infección por un patógeno intracelular (35).

Actualmente, existe evidencia del papel de las células Th1 y Th2 durante la infección por *Nocardia*. Por otro lado, existe evidencia de que las células Treg, Th17 y Tc17 también participan en la respuesta inmune durante otras enfermedades infecciosas, sin embargo, no se tiene información de éstas subpoblaciones durante una infección por *Nocardia brasiliensis*.

2. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune celular es un factor importante para la eliminación de organismos intracelulares. Actualmente, se conoce del papel de los linfocitos Treg y Th17 y poco de los Tc17 en otras enfermedades infecciosas. Sin embargo, no existe información de la dinámica y el posible papel de estas subpoblaciones linfocitarias y sus citocinas relacionadas, durante el establecimiento del actinomicetoma inducido por *N. brasiliensis*.

3. HIPÓTESIS

Los linfocitos T reguladores, se encuentran en mayor porcentaje que las Th17 y Tc17; de igual manera, los niveles de las citocinas relacionadas con Treg (TGF- β e IL-10) presentan niveles superiores a las citocinas relacionadas con Th17 y Tc17 (IL-6, IL-17, IL-23) en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la dinámica de los linfocitos T reguladores, Th17 y Tc17, así como de sus citocinas relacionadas, en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c y su posible papel en la inmunopatogénesis de la enfermedad.

4.2 Particulares

1.- Determinar los porcentajes de linfocitos T reguladores, Th17 y Tc17 durante el establecimiento del actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

2.- Determinar los niveles de citocinas IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 y TGF- β durante el establecimiento del actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

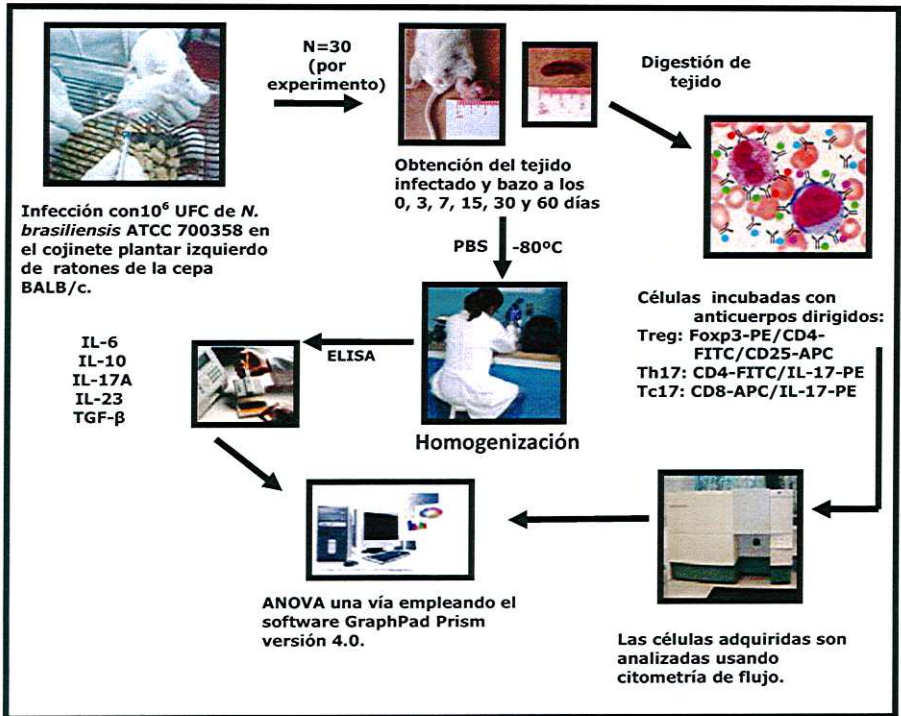


Figura 4. Diseño experimental utilizado para determinar la dinámica de subpoblaciones de linfocitos T reguladores, Th17 y Tc17 en el actinomietoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Equipos utilizados

Los equipos utilizados para este proyecto se encuentran referenciados en el Anexo 1.

6.1.2 Material biológico

6.1.2.1 Células bacterianas

Se utilizó cultivo puro de *Nocardia brasiliensis* de la cepa HJEG-1, la cual fue aislada de un paciente con micetoma en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José E. González (U.A.N.L.) y registrada en la ATCC con el número 700358.

6.1.2.2 Animales de experimentación

Se utilizaron hembras de la cepa BALB/c, de entre 10-12 semanas de edad, con un peso de 20gr \pm 1gr. Se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Inmunología bajo condiciones controladas. Todos los animales fueron alimentados *ad libitum* con agua estéril y alimento para roedores (Purina; México). Se siguieron las normas éticas y de investigación establecidas en el Comité Institucional y referidos en la NOM 062-200-1999.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Metodología para el cultivo de células bacterianas

El modelo de actinomicetoma fue implementado por Salinas-Carmona y Torres-López en 1996 (36). Para reproducir ese modelo se partió de una alícuota de dos mililitros de *Nocardia brasiliensis* cepa ATCC 700358, conservada en leche descremada (Skim Milk Powder OXOID) al 2% en solución salina estéril al 0.9% (Pisa) y almacenada a -80°C; se llevó a 15 ml con agua salina (Pisa), para posteriormente centrifugarla a 3,500 rpm por 10 min. Se realizaron 3

lavados de este tipo. Después del último lavado, la alícuota se resuspendió en 2 ml con agua salina (Pisa) y posteriormente se inocularon 3 matraces Erlenmeyer de vidrio Pyrex con 50 ml de BHI (OXFOID) previamente esterilizado. Finalmente, se incubó a 37°C por 72 hrs para la producción de la biomasa bacteriana.

6.2.2 Metodología para el modelo experimental de actinomicetoma en ratones BALB/c

Después de las 72 hrs, se decantó de los matraces el medio de cultivo y se agregó 10 ml de agua salina al 0.9% esterilizada (Pisa) a la película bacteriana. Ésta se pasó a tubos cónicos de 50 ml estériles. Una vez en los tubos se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min, se decantó y se llevó a 10 ml en otro tubo de 15 ml (Corning), se pasó a un tubo de ensayo para homogenizar con un Potter de 30 ml (Wheaton). La suspensión unicelular se pasó a otro tubo cónico de 15 ml, se esperó a que la solución se asentara, se tomó de la parte media llenando 3 jeringas para insulina (Sensimedical), y se infectaron 30 ratones con 100 μ l (10^6 UFC aproximadamente) en el cojinete plantar izquierdo. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de mechero.

6.2.3 Obtención de tejido para citometría

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, en grupos de 5 a los días 3, 7, 15, 30 y 60 posteriores a la infección y un grupo control sin infectar, considerado como día cero.

Antes de ser recuperado, el tejido fue medido con Vernier, para después ser retirado asépticamente; se obtuvo el tejido de la pata izquierda y el bazo de cada ratón. La inflamación del actinomicetoma y del bazo fue calculada mediante la fórmula del elipsoide ($\pi \times L \times A^2/6$). Donde "L" representa el largo de la pata y "A" el alto. El tejido obtenido del cojinete plantar, fue colocado en tubos cónicos de 15 ml estériles (Corning) con 1 ml de colagenasa y DNAsa y fue incubado a 37°C por 30 min en Baño María. Por otro lado, el bazo fue recuperado y colocado en tubos de 15 ml con 1ml de medio RPMI. (Los reactivos utilizados para la obtención de tejidos y células se encuentran en el Anexo 2).

6.2.3.1 Preparación de tejido para citometría

Posteriormente, el tejido infectado o el bazo, fueron tamizados en filtros celulares de 70 μm (BD Falcon) y las células obtenidas fueron contadas en un hematocitómetro (Baxter). Las células fueron ajustadas a 10^6 células en 100 μl de medio RPMI. Para la tinción de receptores de membranas (CD4, CD8, CD25), así como para las moléculas intracelulares (Foxp3 e IL-17A), se emplearon anticuerpos específicos de ratón contra los blancos de interés y se llevó a cabo de la siguiente manera tanto para el micetoma, como para el bazo:

Tubo 1: células sin teñir como blanco

Tubo 2: tinción para células Treg empleando un equipo (eBioscience) que contiene anticuerpos contra Foxp3-PE, CD4-FITC y CD25-APC

Tubo 3: Se colocaron anticuerpos específicos para las células Th17 y Tc17 (CD4-FITC, CD8-APC e IL-17A-PE)

(Los reactivos utilizados para la obtención de tejidos y células se encuentran en el Anexo 2)

6.2.3.2 Tinción para células T regulatorias

El anticuerpo fue preparado según las especificaciones del estuche comercial, con 0.25 μl de CD4-FITC y 0.3 μl de CD25-APC en 100 μl de amortiguador de tinción, por cada 10^6 células contenidas en cada muestra. Una vez colocado el anticuerpo, las muestras fueron incubadas a 4°C por 30 min en la oscuridad. Después se realizó un lavado agregando 1 ml del amortiguador de tinción y se centrifugó a 1,400 rpm por 5 min. Las muestras se decantaron y se agregó 1 ml de solución de permeabilización. Nuevamente, se volvió a incubar a 4°C por media hora. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 2 ml de amortiguador de lavado 1X, centrifugando a 1,400 rpm por 5 min para luego decantar. Se agregaron 2.5 μl de Foxp3-PE en 100 μl de amortiguador de tinción por cada muestra y se incubó a 4°C por 30 min en la oscuridad. Se realizaron dos lavados con 2 ml de amortiguador de lavado y las muestras se resuspendieron en 500 μl de amortiguador de tinción.

6.2.3.3 Tinción para células Th17 y Tc17

Los anticuerpos fueron preparados según las instrucciones de manufactura con 2.5 μ l de CD8-APC y 0.5 μ l de CD4-FITC en 100 μ l de medio RPMI por cada 10⁶ células contenidas en cada muestra. Una vez colocado el anticuerpo, las muestras fueron incubadas a 4°C por 30 min en obscuridad. Posteriormente, se agregó 1 ml de PBS 0.1M, se centrifugó a 1,400 rpm por 5 min y se decantó. Las células fueron resuspendidas en 500 μ l de solución de permeabilización e incubadas a 4°C por media hora. Se realizaron dos lavados con 2 ml de amortiguador de lavado 1X para luego decantar. Se agregó a cada muestra 0.625 μ l de IL-17A-PE en 100 μ l de amortiguador de lavado y se incubó a 4°C por media hora. Se realizaron dos lavados con 1 ml de amortiguador de lavado y finalmente las muestras fueron resuspendidas en 500 μ l de amortiguador de lavado.

Así mismo, también se realizaron controles para citometría tanto de tejido infectado como de bazo; para lo cual se preparó en tubos de citometría 20 μ l de células, 500 μ l de PBS 0.1 M, y 50 μ l de formaldehído al 2%. En el caso de las células de bazo, se agregó un último paso en el cual se agregó a cada tubo 750 μ l de amortiguador de lisis (Bioscience) para eliminar los eritrocitos, se dejó incubar 10 min, se centrifugó a 1,200 rpm, realizaron 2 lavados con 500 μ l de PBS 0.1 M y se resuspendieron en 500 μ l de PBS.

Finalmente, 10,000 células fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo FACS Calibur.

6.2.4 Obtención de las proteínas del actinomicetoma

El tejido fue obtenido asépticamente y colocado en tubos estériles de cultivo celular de 5 ml (Falcon) que contenían 1 ml de PBS 0.1 M pH 7.2-7.4. El tejido fue homogenizado durante 3 min aproximadamente a velocidad media empleando un homogenizador de tejidos (Biospec). La concentración de proteínas fue calculada por el método de Bradford (Anexo 3) y ajustada a 1 mg/ml para posteriormente medir las interleucinas 10 (IL-10), IL-6, IL-17A, IL-23 (eBioscience) y TGF- β (R&D Systems) por el método de ELISA.

6.2.4.1 Cuantificación de citocinas

Para las ELISAS de las interleucinas 6, IL-10, IL-17A e IL-23 se utilizó el mismo protocolo. (Los reactivos utilizados se especifican en Anexo 4).

La placa para ELISA de 96 pozos se cubrió con 100 µl de anticuerpo de captura, diluido previamente a 1/250 en amortiguador de unión; la placa se cubrió e incubó a 4°C toda la noche. Posteriormente, se realizaron 5 lavados agregando 200 µl de amortiguador de lavado en cada pozo e invirtiendo. Para bloquear, se diluyó 1 parte del Diluyente 5X con 4 partes de agua destilada, se agregó 200 µl a cada pozo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 5 lavados y se agregaron 100 µl de estándar o de muestra en cada pozo por duplicado.

Los estándares fueron preparados de la siguiente manera según las especificaciones de manufactura de cada equipo, sin embargo, aquí se mencionan las concentraciones más altas empleadas de los estándares para cada citocina:

- a) IL-6, 500 pg/ml
- b) IL-10, 400 pg/ml
- c) IL-17, 500 pg/ml
- d) IL-23, 1000 pg/ml

Posteriormente, se hicieron diluciones continuas 1:2 con Diluyente 1X hasta completar 7 estándares y un blanco. (Las curvas de calibración para cada citocina se encuentran referenciadas en Anexo 4).

Una vez completa la placa con los estándares y las muestras, se cubrió y se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente. Luego se realizaron 5 lavados y se agregaron 100 µl de anticuerpo de detección 1/250 diluido en Diluyente 1X; se selló la placa y se dejó incubar por 1 hora. Se realizaron 5 lavados con el amortiguador de lavado, se agregó 100 µl de Avidin-HRP diluido 1/250 con Diluyente 1X y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Una vez completa la incubación se realizaron 7 lavados, se agregó 100 µl de TMB 1X y se incubó 15 min en la oscuridad. Finalmente, se agregó 50 µl de solución de alto y cada placa se leyó a 450 nm.

Por otro lado, la ELISA de TGF- β 1, se realizó de la siguiente manera según el protocolo de manufactura contenido en el estuche comercial. Los reactivos utilizados se encuentran especificados en Anexo 4.

Activación de TGF- β 1,

Se agregó 0.1 ml de HCl 1N a 0.5 ml de cada muestra, se mezcló y se incubó por 10 min. Posteriormente, se neutralizó añadiendo 0.1 ml de NaOH 1.2 N/ HEPES 0.5 M

Preparación de la placa

Se agregó a cada pozo 100 μ l de anticuerpo de captura 4 μ g/ml diluido en PBS 0.1 M pH 7.2-7.4. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 300 μ l de amortiguador de lavado. La placa se bloqueó con 300 μ l de amortiguador de bloqueo en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se realizaron 3 lavados con amortiguador de lavado y se agregó 100 μ l de la muestra o de los estándares.

Para el estándar de concentración más alta se utilizaron 4000 pg/ml; de éste se realizaron diluciones continuas 1:2 hasta completar 7 estándares y un blanco.

Una vez colocados los estándares y las muestras, se incubó por dos horas a temperatura ambiente. En seguida, se realizaron 3 lavados con amortiguador de lavado y se agregó a cada pozo 100 μ l del anticuerpo de detección con biotina diluido a 200 ng/ml en reactivo de dilución, se cubrió la placa y se incubó dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados y se agregó a cada pozo 100 μ l de Estreptavidina-HRP 1/200 en reactivo de dilución, se cubrió y se incubó 20 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. En seguida se realizaron 3 lavados y se agregó 100 μ l de solución de substrato cromógeno (TMB, Sigma Aldrich) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se agregó 50 μ l de solución de alto y la placa se leyó en un espectrofotómetro a 450 nm.

6.2.5 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism Versión 4.0. Se utilizó ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para el análisis de comparación múltiple. Todos los valores con una $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Establecimiento del actinomicetoma

Después de la infección se observó una inflamación progresiva, con áreas de abscesos desde el día 3 y destrucción del tejido blando para el día 30 y 60. Así mismo se observó que la inflamación fue aumentando hasta presentar al día 7 una media de $0.23 \text{ cm} \pm 0.03$, después decayó levemente a $0.16 \text{ cm} \pm 0.016$ para después aumentar considerablemente al día 60 presentando una media de $1.10 \text{ cm} \pm 0.37$ (Figura 5).

A.)

Día cero

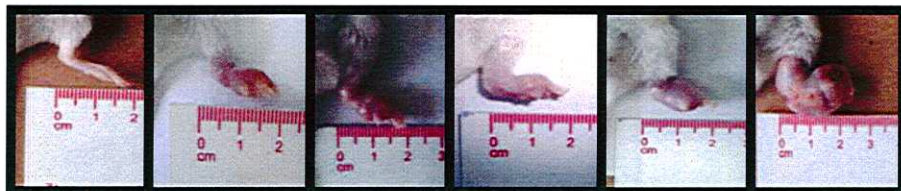
3

7

15

30

60



B.)

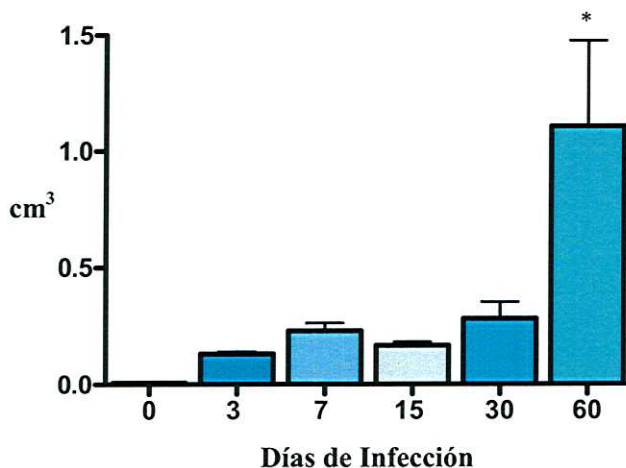


Figura 5. Etapas del establecimiento del actinomycetoma en un modelo murino. A) Imagen representativa de cinco ratones a los días cero, 3, 7, 15, 30 y 60 posteriores a la infección con *N. brasiliensis*. Se observa el proceso inflamatorio y los cambios anatómicos durante la infección. B) Gráfica representativa de la inflamación de la pata en los distintos días, calculada mediante la fórmula del elipsoide y los datos mostrados son la media \pm SEM. * $P < 0.001$

7.1.2 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos Treg, Th17 y Tc17 en el actinomicetoma

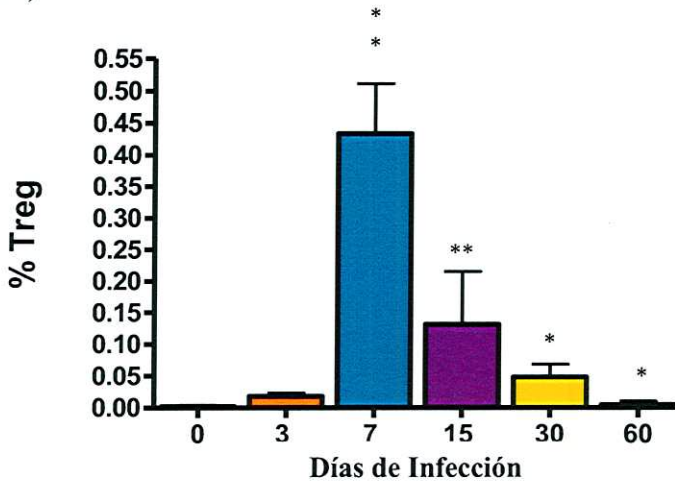
Las subpoblaciones de linfocitos obtenido del tejido del cojinete plantar izquierdo fueron estudiadas por citometría de flujo empelando anticuerpos específicos para marcadores reportados para cada subpoblación. Las células Treg obtenidas del tejido se encontraron significativamente elevadas al día 7 después de la infección comparadas con el día 0 (0.4340 ± 0.0777 vs 0.002 ± 0.002 , $P < 0.001$); los demás días no tuvieron diferencia significativa con respecto al día 0. Sin embargo, después del día 7 se observa una disminución paulatina en el porcentaje de éstas células. Por otro lado, existió diferencia significativa en los días 3 y 7 (0.0180 ± 0.0059 vs 0.4340 ± 0.0777 , $P < 0.001$); 7 y 15 (0.4340 ± 0.0777 vs 0.1320 ± 0.084 , $P < 0.01$); 7 y 30 (0.4340 ± 0.0777 vs 0.0483 ± 0.0196 , $P < 0.001$); y entre 7 y 60 (0.4340 ± 0.0777 vs 0.0050 ± 0.0050 , $P < 0.01$), Figura 6A.

En cuanto a las células Th17, se encontró diferencia significativa entre el día 0 y el día 3 de infección (0.0040 ± 0.0024 vs 0.2840 ± 0.03250 , $P < 0.001$). Así mismo, se encontró diferencia significativa entre los días 3 y 7 de infección (0.2840 ± 0.03250 vs 0.1440 ± 0.0645 , $P < 0.05$); 3 y 15 (0.2840 ± 0.03250 vs 0.0220 ± 0.0102 , $P < 0.001$); 3 y 30 (0.2840 ± 0.03250 vs 0.0500 ± 0.0159 , $P < 0.001$); y entre 3 y 60 (0.2840 ± 0.03250 vs 0.0250 ± 0.0250 , $P < 0.001$), Figura 6B.

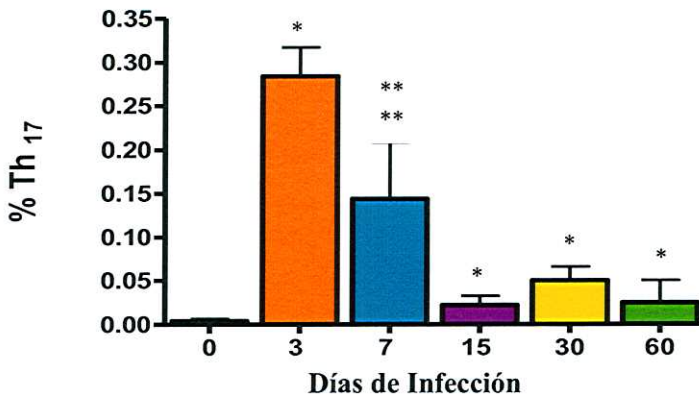
En las células Tc17 se encontró diferencia significativa al igual que las Th17 al día 0 y el día 3 de infección (0.0040 ± 0.0024 vs 0.2120 ± 0.0140 , $P < 0.001$). De igual manera se encontró diferencia significativa entre los días 3 y 7 de infección (0.2120 ± 0.0140 vs 0.0680 ± 0.0655 , $P < 0.05$); 3 y 15 (0.2120 ± 0.0140 vs 0.0020 ± 0.0020 , $P < 0.001$); 3 y 30 (0.2120 ± 0.0140 vs 0.0133 ± 0.0049 , $P < 0.001$); y entre 3 y 60 (0.2120 ± 0.0140 vs 0.0075 ± 0.0075 , $P < 0.001$), Figura 6C.

Finalmente, se puede observar que las células Treg fue la subpoblación de linfocitos estudiados con mayor porcentaje encontrado a partir del día 7 hasta el día 30. Sin embargo, después de alcanzar su máximo punto las tres subpoblaciones celulares mostraron una disminución considerable a partir del día 15, Figura 6D.

A.)



B.)



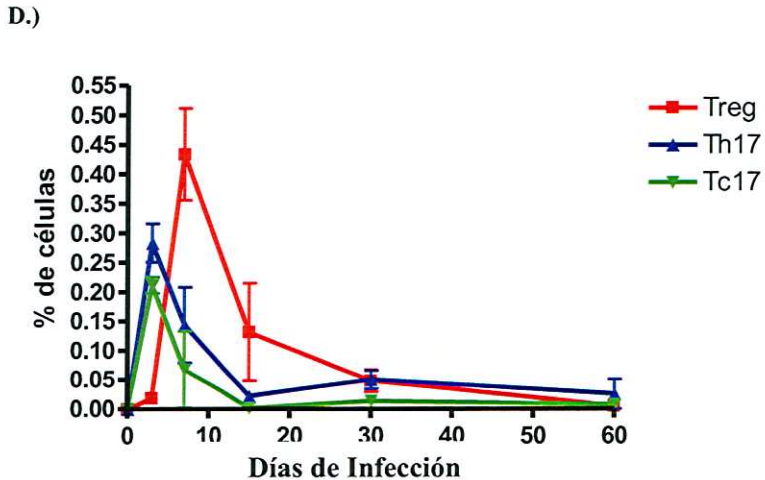
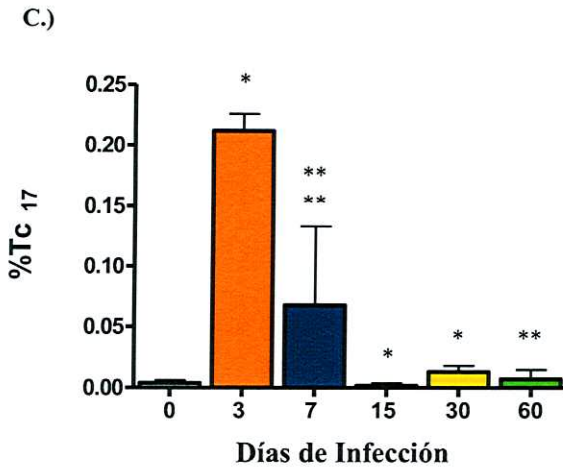
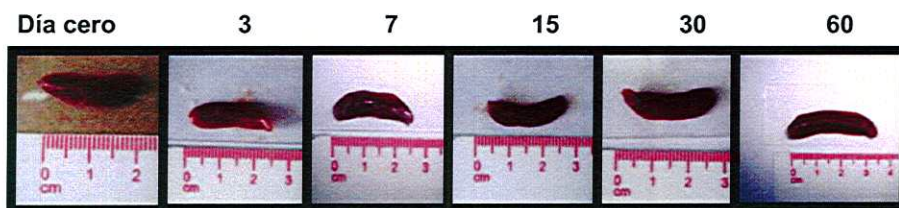


Figura 6. Porcentaje de células Treg, Th1y y Tc17 provenientes de tejido del cojinete plantar durante el establecimiento del actinomietoma causado por *Nocardia brasiliensis*. El porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias fue obtenido utilizando anticuerpos monoclonales específicos y análisis por citometría de flujo. Los presentes datos representan la media de 5 ratones por grupo \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. A) Las células Treg alcanzan su punto máximo al día 7. B) y C) Th17 y Tc17 muestran incremento significativo al día 3 post-infección. D) Dinámica de las tres subpoblaciones. * $P < 0.001$, ** $P < 0.05$.

7.2 Esplenomegalia posterior a la infección por *Nocardia brasiliensis*

En la Figura 7A se observa el aumento en el tamaño del bazo, el cual presentó un tamaño de 2 cm aproximadamente en el grupo control llegando a aumentar 1.5 cm más para el día 60. En la Figura 7B se observa una gráfica representativa del aumento en el volumen de bazo, donde sólo el día 60 tuvo diferencia significativa con respecto al día cero. Así mismo, se observa que a partir del día cero hay un aumento hasta el día 7; posteriormente se observa una disminución al día 15 y 30 y finalmente el aumento en el volumen se dispara para el día 60.

A.)



B.)

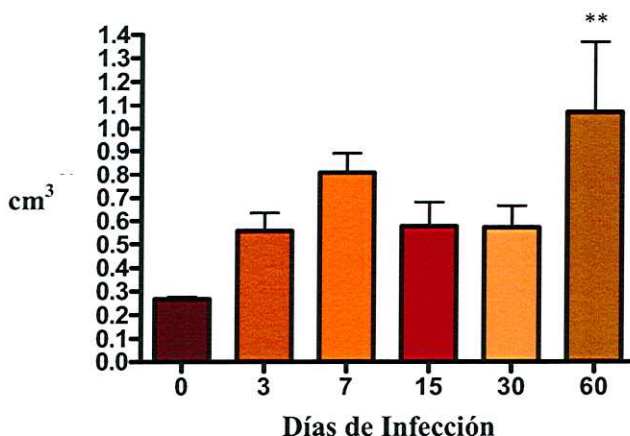


Figura 7. Esplenomegalia después de la infección por *N. brasiliensis* A) Imagen representativa de bazo de cinco ratones a los días cero, 3, 7, 15, 30 y 60 posteriores a la infección con *N. brasiliensis*. Se observa esplenomegalia B) Gráfica representativa de la inflamación de bazo en los distintos días, calculada mediante la fórmula de elipsoide y los datos mostrados son la media \pm SEM. **P<0.05.

7.2.1 Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos Treg, Th17 y Tc17 en el bazo

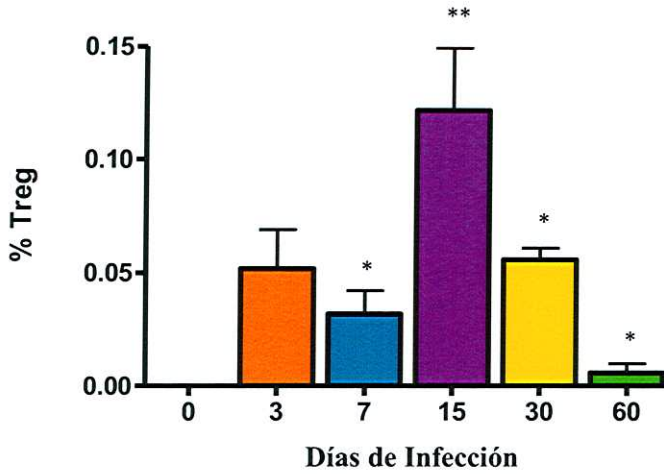
En las células Treg obtenidas de bazo se encontró diferencia significativa con respecto al día 0 en el día 15 de infección (0 ± 0 vs 0.1220 ± 0.0278 , $P < 0.001$). También se encontró diferencia significativa entre los días 3 y 15 de infección (0.0520 ± 0.01715 vs 0.1220 ± 0.0278 , $P < 0.05$); 7 y 15 (0.0320 ± 0.0102 vs 0.0278 , $P < 0.01$); 15 y 30 (0.1220 ± 0.0278 vs 0.0560 ± 0.005 , $P < 0.001$); y entre 15 y 60 días de infección (0.1220 ± 0.0278 vs 0.006 ± 0.0040 , $P < 0.05$), Figura 8A.

En los linfocitos Th17 sólo se presentó diferencia significativa entre el día 0 y el día 3 de infección (0 ± 0 vs 0.0960 ± 0.0175 , $P < 0.05$), en los demás días no presentaron diferencia significativa (Figura 8B).

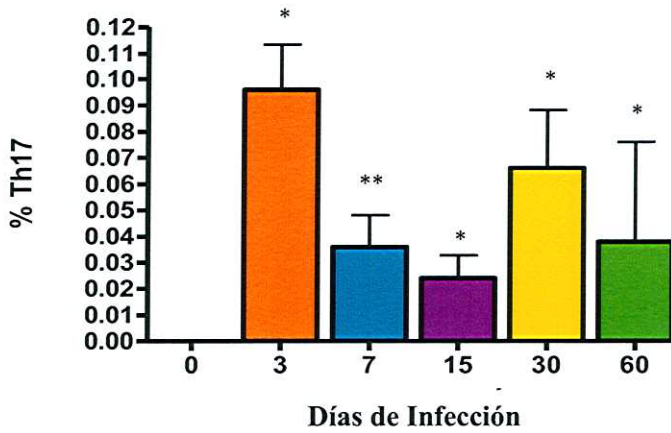
En los linfocitos Tc17 se encontró diferencia significativa con respecto al día 0 en los días 3 y 7 después de la infección (0 ± 0 vs 0.4280 ± 0.0428 , $P < 0.001$ y 0 ± 0 vs 0.1600 ± 0.0324 , $P < 0.01$). De igual manera se encontró diferencia entre los días 3 y 7 después de la infección (0.4280 ± 0.0428 vs 0.1600 ± 0.0324 , $P < 0.001$); 3 y 15 (0.4280 ± 0.0428 vs 0.0340 ± 0.0098 , $P < 0.001$); 3 y 30 (0.4280 ± 0.0428 vs 0.0680 ± 0.0169); 3 y 60 (0.4280 ± 0.0428 vs 0.020 ± 0.020 , $P < 0.001$); 7 y 15 (0.1600 ± 0.0324 vs 0.0340 ± 0.0098 , $P < 0.05$); 7 y 60 (0.1600 ± 0.0324 vs 0.020 ± 0.020 , $P < 0.01$), Figura 8C.

En la Figura 8D, se puede observar la dinámica de las tres subpoblaciones juntas mostradas en el bazo. Se encontró que Tc17 fue la subpoblación de linfocitos estudiada con mayor porcentaje hasta el día 7; en el día 15 se observa un ligero aumento de Treg y a partir del día 30 las tres subpoblaciones mostraron una disminución gradual hasta el día 60 de infección analizada.

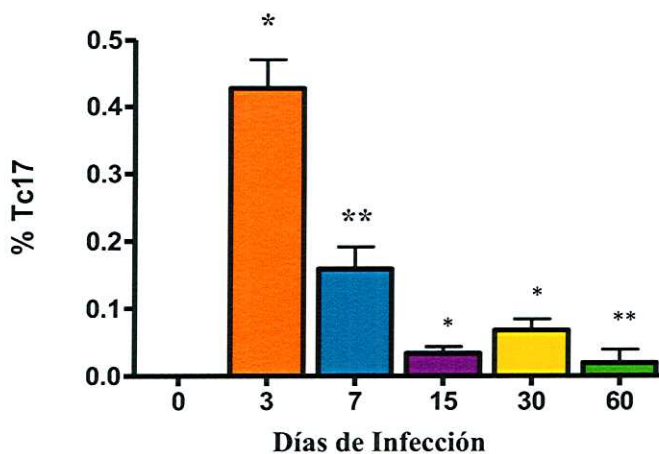
A.)



B.)



C.)



D.)

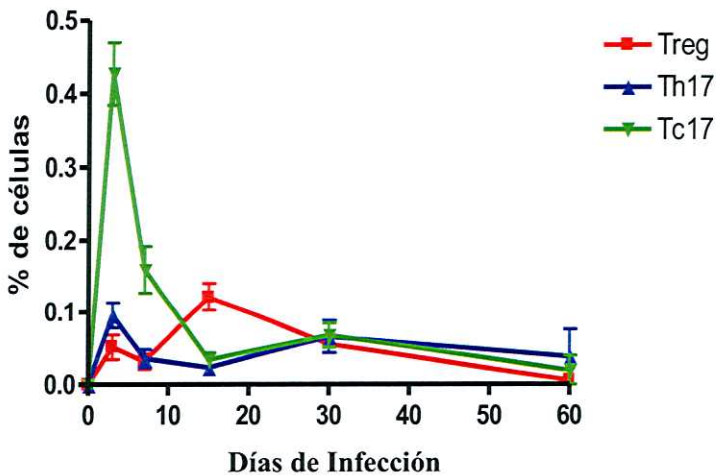


Figura 8. Porcentaje de células Treg, Th1y y Tc17 provenientes de bazo durante el establecimiento del actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. A) Las células Treg alcanzan su punto máximo al día 15. B) y C) Th17 y Tc17 muestran incremento significativo al día 3 post-infección. D) Dinámica de las tres subpoblaciones. El porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias fue obtenido utilizando anticuerpo monoclonales específicos y análisis por citometría de flujo. Los presentes datos representan la media de 5 ratones por grupo \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

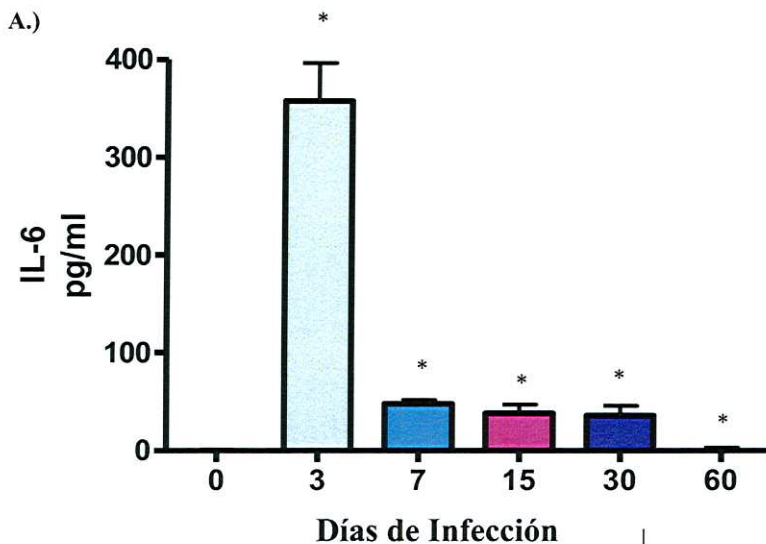
7.3 Niveles de citocinas durante el establecimiento del actinomicetoma.

Los niveles de citocinas IL-6, IL-17A, IL-10, IL-23 y TGF- β fueron obtenidos de homogenizados de tejido del actinomicetoma de ratones y cuantificados por el método de ELISA (Las curvas de calibración se muestran en Anexo 5). Los análisis de IL-6 mostraron una diferencia significativa en relación con el día 0 y el día 3 después de la infección (1.097 ± 0.0975 vs 358.1 ± 38.75 , $P < 0.001$). De igual manera, hubo diferencia significativa entre los días 3 y 7 (358.1 ± 38.75 vs 48.25 ± 3.421 , $P < 0.05$); 3 y 15 (358.1 ± 38.75 vs 38.42 ± 8.728 , $P < 0.001$); 3 y 30 (358.1 ± 38.75 vs 36.31 ± 9.761 , $P < 0.001$); 3 y 60 (358.1 ± 38.75 vs 2.59 ± 0.5395), Figura 9A.

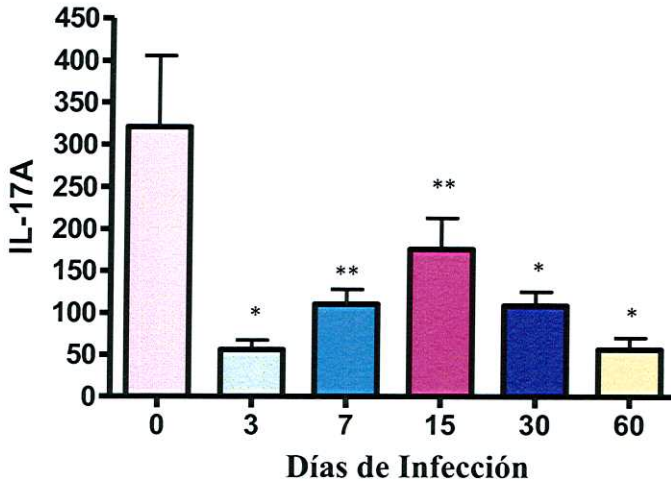
La IL-17A presentó diferencia significativa con respecto al día 0 en los días 3 (321.1 ± 84.70 vs 56.14 ± 11.16 , $P < 0.01$); 7 (321.1 ± 84.70 vs 110.8 ± 17.80 , $P < 0.05$); 30 (321.1 ± 84.70 vs 109.5 ± 16.32 , $P < 0.05$) y 60 días después de la infección (321.1 ± 84.70 vs 56.90 ± 14.34), Figura 9B. Por otro lado, IL-23 mostró un comportamiento similar a la IL-17A presentando diferencia significativa en relación al día 0 en los mismo días 3 (268.6 ± 65.16 vs 47.86 ± 8.96 , $P < 0.0001$); 7 (268.6 ± 65.16 vs 80.29 ± 13.82 , $P < 0.01$); 30 (268.6 ± 65.16 vs 34.89 ± 23.18 , $P < 0.001$) y 60 días después de la infección (268.6 ± 65.16 vs 40.57 ± 13.81 , $P < 0.001$), Figura 9C.

Respecto a las citocinas antiinflamatorias, la IL-10 sólo mostró diferencia significativa entre el día 0 y el día 30 (1413 ± 350.8 vs 427.5 ± 136.7) (Figura 9D). Mientras que el TGF- β presentó diferencia entre el día 0 y los días 3 (103.1 ± 34.19 vs 364.4 ± 43.52 , $P < 0.01$), 7 (103.1 ± 34.19 vs 575.3 ± 27.95 , $P < 0.001$), 15 (103.1 ± 34.19 vs 449.0 ± 53.27 , $P < 0.001$) y 30 días después de la infección (103.1 ± 34.19 vs 580.0 ± 53.12 , $P < 0.001$). A su vez, también hubo diferencia entre los días 3 y 7 (364.4 ± 43.52 vs 575.3 ± 27.95 , $P < 0.05$); 3 y 30 (364.4 ± 43.52 vs 580.0 ± 53.12 , $P < 0.01$); 7 y 60 (575.3 ± 27.95 vs 204.2 ± 10.39 , $P < 0.001$); 15 y 60 (449.0 ± 53.27 vs 204.2 ± 10.39 , $P < 0.01$), 3 y 60 (364.4 ± 43.52 vs 204.2 ± 10.39 , $P < 0.001$), Figura 9E.

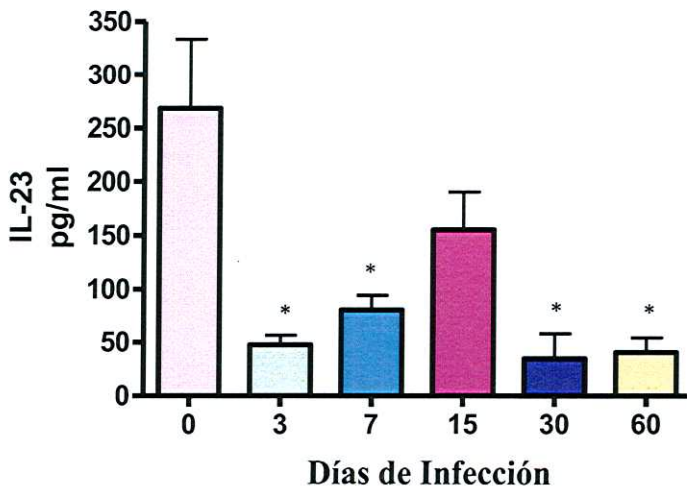
Finalmente, en la Figura 9F se muestra la dinámica de las citocinas juntas, en donde se observa que la IL-10 se secretó en mayor cantidad en comparación del resto y que su comportamiento es inverso a TGF- β . De igual manera se puede observar que tanto IL-17 como IL-23 se comportan de manera muy similar mientras la IL-6 solo tiene su nivel más alto al día 3.



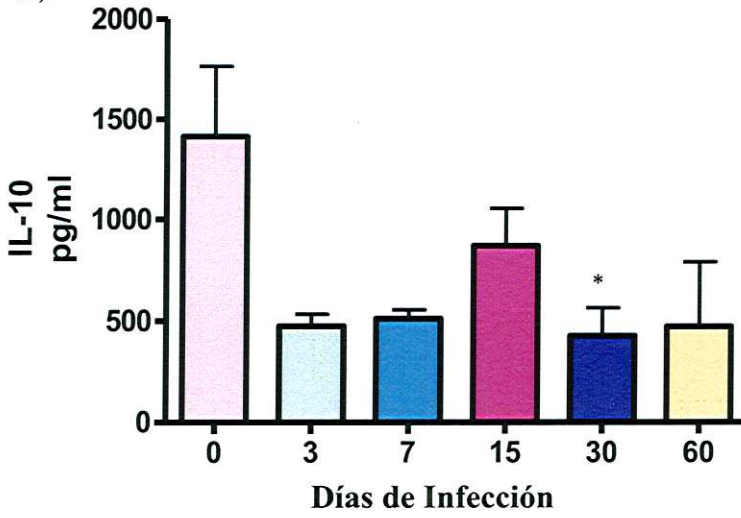
B.)



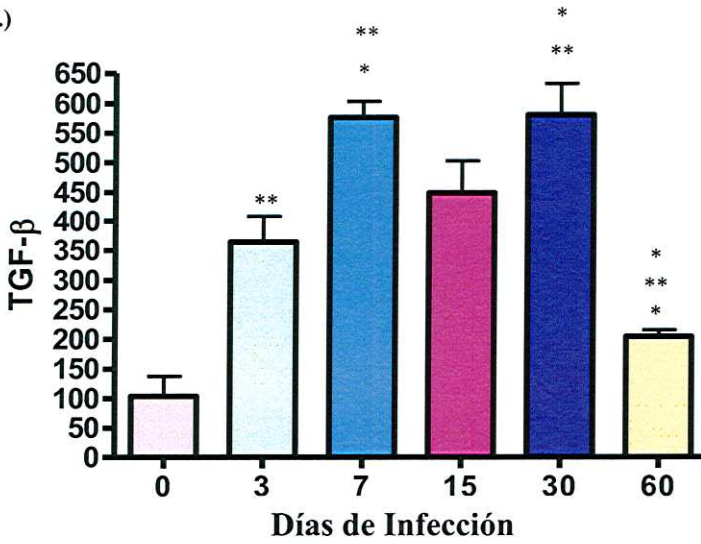
C.)



D.)



E.)



F.)

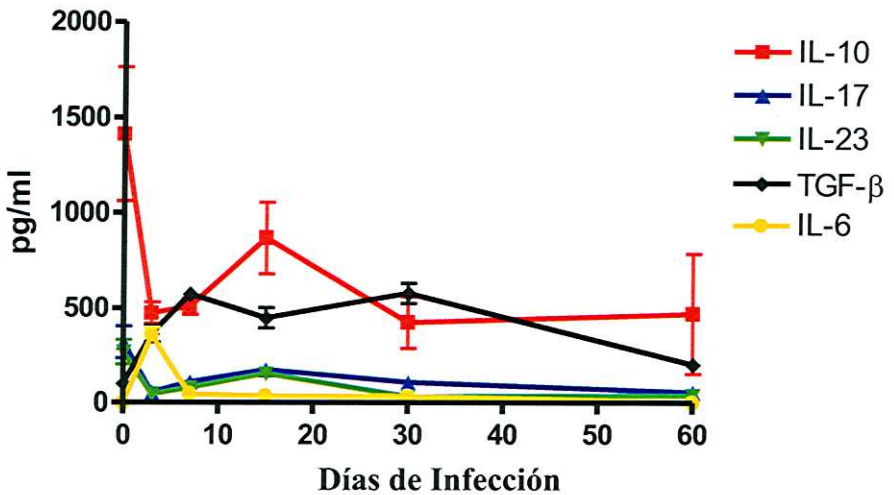


Figura 9. Niveles en tejido de IL-6, IL-17, IL-23, IL-10 y TGF- β durante el establecimiento del actinomietoma inducido por *Nocardia brasiliensis* utilizando prueba de ELISA. Los datos representan la media de cinco ratones por grupo \pm SEM. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando una ANOVA ($P < 0.05$) y la prueba de Tukey. Los datos presentados en las figuras son representativos de tres experimentos llevados con el mismo protocolo. A) Nivel en tejido de IL-6. Su punto máximo fue al día 3 posterior a la infección. B) Nivel en tejido de IL-17A el cual alcanzó su punto máximo al día 15. C) Nivel de IL-23 la cual también llegó a su nivel más alto en el día 15. D) IL-10 presentó su punto máximo en el día 15. E) TGF- β presentó sus puntos máximos en los días 7 y 30. F) Dinámica de las cinco citocinas durante el establecimiento del actinomietoma inducido por *N. brasiliensis*. (* $P < 0.001$ ** $P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

Actualmente, existe evidencia de la importancia de las células TCD4⁺ y TCD8⁺ en la defensa contra organismos intracelulares. Sin embargo, aún no se tiene información suficiente de subpoblaciones específicas como la de los linfocitos Th17, Tc17 y Treg durante la infección por *Nocardia brasiliensis* ni la interacción entre cada subpoblación durante dicha infección.

Pepper *et al* (2009), reportan un estudio en ratones, en el cual se midió el tiempo de vida de las células CD4⁺ durante la infección por *Listeria monocytogenes*, una bacteria intracelular. Se observó que la población de CD4⁺ decaía al día 40 después de la infección. Lo anterior, debido posiblemente a la falta de presentación de antígeno una vez que la enfermedad comienza a resolverse. Por lo cual los autores sugieren el estudiar si dichas células decaen en otras enfermedades persistentes (37). Nuestros resultados obtenidos del tejido de cojinete plantar infectado y de bazo, muestran datos similares, en los que a partir del día 30, las tres subpoblaciones estudiadas comienzan a decaer hasta alcanzar niveles similares muy bajos, a pesar de que la enfermedad es persistente. Lo anterior, podría explicarse a un estado de cronicidad de la enfermedad, donde la bacteria, se encuentra en forma latente dentro de las células fagocíticas, rodeada por fibras de colágena y linfocitos formando el granuloma y a falta de estímulo, no se agregan más de las subpoblaciones de linfocitos estudiadas en este trabajo (38).

Por otro lado, existe evidencia de que TGF- β e IL-6 son importantes para la diferenciación tanto de Th17 como de Tc17 (27, 39). Esto concuerda con nuestros resultados donde los niveles altos de Th17 y Tc17 fueron encontrados al día 3 posterior a la infección, tanto en el cojinete plantar como en bazo, correspondiendo también con el incremento de TGF- β y de IL-6 en el mismo día.

Es interesante notar que al día 3, la IL-6 alcanza su punto máximo, al mismo tiempo que los niveles de IL-10 decrecen; posteriormente, IL-6 disminuye drásticamente manteniéndose a niveles muy bajos hasta el día 60; mientras que IL-10 aumenta y parece estabilizarse. Este comportamiento podría explicarse por la acción supresora que IL-10 pueda tener sobre IL-6. Malefyt *et al* (1991), reportaron un experimento donde la IL-10 suprimía la producción de IL-6 en monocitos activados con lipopolisacáridos y/o IFN- γ (40). Lo anterior, pudiera corroborar los bajos niveles de IL-6, después del incremento de la IL-10 al día 15 de infección. Sin embargo, los bajos niveles de IL-6 no explicarían la presencia de Th17 y Tc17 en los días posteriores. Huber *et al* (2009) describen la diferenciación de Th17 y Tc17 bajo la presencia de IL-6 o IL-21 siempre y cuando exista la presencia de TGF- β (27), citocina que en nuestros resultados parece mantenerse alta en los días subsecuentes. Esto sugiere la presencia de otras citocinas, como la IL-21, podría estar contribuyendo a la diferenciación de las subpoblaciones de Th17 y Tc17. Sin embargo, esta citocina no fue analizada en el presente estudio, lo cual es una limitante del mismo.

Se tienen reportes donde en ratones sanos, la mayor cantidad de IL-17A proviene de células $\gamma\delta$ y no de CD4⁺ (22, 41) esto podría explicar la alta cantidad de IL-17A e IL-23 encontrados al día cero de nuestro experimento. Song *et al* (2008) reportan que durante un proceso inflamatorio de pulmones en pacientes asmáticos, existe una alta cantidad de IL-17 producida por macrófagos alveolares, en lugar de las células Th17, lo que sugiere que estas células son también responsables del proceso inflamatorio (42). Dado que en la respuesta inmune contra *N. brasiliensis* también encontramos la presencia de macrófagos, sería interesante investigar si en este caso, dichas células también se encuentran produciendo IL-17 y el papel que desempeñan durante esta infección. Así mismo, son varios los reportes en los que se describe la interacción entre IL-23 e IL-17 y se sabe que, aunque IL-23 no es necesaria para la diferenciación de IL-17, sí es necesaria para su mantenimiento (43, 44). En nuestros resultados se puede observar cómo IL-17 e IL-23 se comportan de la misma manera, con niveles altos al día cero, los cuales disminuyen al día 3 y alcanzan su pico nuevamente al día 15 para posteriormente decaer. En el caso

de la IL-23 podría relacionarse con el aumento de Th17, principalmente al día 30 de infección y su posterior mantenimiento a nivel bajo en el día 60.

En un inicio IL-10 se describió como una citocina relacionada con las células Th2, poco después se relacionó con las células T regulatorias. Sin embargo, hoy en día existe evidencia de que la producción de dicha citocina no se restringe a Treg, sino que existen muchos otros subtipos celulares como los macrófagos, células dendríticas, TCD8⁺ y TCD4⁺ capaces de producir dicha citocina (45). En este trabajo se encontró una alta cantidad de IL-10 en el día cero. Este resultado pone en duda si la cantidad encontrada de dicha interleucina proviene de otros subpoblaciones celulares capaces de producirla, o bien, lo ratones se encontraban respondiendo a algún tipo de estrés.

En un artículo relacionado Higgins *et al* (2009), estudiaron la presencia de IL-10 durante la infección de *M. tuberculosis* en ratones, encontrando que los ratones "knock out" para esta citocina presentaban alto nivel de mortalidad asociada con la complicación de la enfermedad en comparación con los ratones control; llegando así a la conclusión de que dicha citocina era necesaria para regular la inflamación durante la infección (46). Esto podría explicar porqué dentro de nuestro modelo experimental, también se encontró que los niveles de IL-10 se mantienen e incluso parecen ascender en el día 60. De igual manera parece haber una interacción entre IL-10 y TGF- β . Esta última citocina es necesaria para la diferenciación de las tres subpoblaciones estudiadas. Sin embargo, las vías de activación mediadas por TGF- β para promover una respuesta supresora a través de Treg, o bien, una respuesta inflamatoria a través de Th17 o Tc17, son aún desconocidas. Por lo anterior, sería interesante investigar el comportamiento de estas dos citocinas en los días subsiguientes.

Por otro lado, los niveles altos de células Treg a los días 7 y 15 corresponden al incremento de IL-10 y TGF- β 1 citocinas anti-inflamatorias relacionadas con dicha subpoblación. De igual manera, el incremento de IL-10 al día 15 corresponde con la disminución de la inflamación observada en el actinomicetoma, por lo tanto, su papel en la inmunopatogénesis de la infección por *N. brasiliensis* podría estar al menos involucrada en las etapas tempranas.

Contrario a lo observado en el cojinete plantar, el análisis de las tres subpoblaciones en bazo, muestra que la población de células Tc17 es mayor en comparación de Th17 y Treg, al menos durante los primeros 7 días. Sin embargo, observaciones realizadas en nuestro laboratorio describen que *N. brasiliensis* no se encuentra en el bazo. Por lo que se sospecha que antígenos solubles de la bacteria podrían estar llegando a través de la sangre y estimulando las células de este órgano, activando la respuesta de tipo celular, explicando así la alta presencia de Tc17 y la esplenomegalia encontrados en este experimento.

Anteriormente, se dudaba de que las células Treg fueran una subpoblación linfocitaria específica. Sin embargo, hoy en día existen reportes en los que se describen tanto los marcadores moleculares como las propiedades que definen a estas células. Se sabe que éstas se caracterizan por tener el factor de transcripción Foxp3 y que tienen la capacidad de inhibir a los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas, entre otras (31, 33, 47). En el caso de una infección, el papel de las Treg es mantener el equilibrio, si éste se rompe, y se suprime el proceso inflamatorio, se puede evitar la destrucción del patógeno. En cambio, si la inflamación desencadenada por el mismo microorganismo no es controlada puede causarse daño tisular y afectar las funciones de los órganos y tejidos afectados. En nuestro trabajo se encontró evidencia de que en el tejido del actinomicetoma las células T regulatorias se encontraron en mayor cantidad en comparación de las células Th17 y Tc17, lo que sugiere que este desbalance puede estar permitiendo que el patógeno permanezca y por lo tanto se establezca una enfermedad crónica.

Lo anterior, se ha evidenciado en estudios realizados con *M. tuberculosis*, patógeno intracelular, donde hay formación de granuloma como en el caso de la infección por *N. brasiliensis*. Hougardy *et al* (2007), encontraron que en pacientes con tuberculosis activa, existía un alta cantidad de IFN- γ que respondía al antígeno hemaglutinina unida a heparina o heparin-binding hemaglutinin (HBHA) producido por *M. tuberculosis*, mientras que en pacientes con la enfermedad latente, no se encontraba dicha respuesta; esto debido a la acción supresora de Treg hacia los linfocitos Th1 (48). Los resultados

anteriores corresponden a los encontrados por Marin *et al* en el 2010, los cuales describen haber encontrado una alta cantidad de células Treg en pacientes con tuberculosis activa en comparación con pacientes con la enfermedad latente. Así mismo, se encontró que en este caso, las células Treg eran capaces de inhibir IFN- γ , pero no Th17 (49). Boussiotis *et al* (2000) reportaron la asociación de IL-10 producida por células Treg en el estado de anergia encontrada en pacientes con tuberculosis al PPD (derivado proteico purificado) (50). Finalmente, en otro artículo publicado en el 2010 por Shaffiani *et al* reportaron que las células Treg son capaces de “retrasar” la llegada de otras células TCD4⁺ y TCD8 durante las etapas temprana de tuberculosis (51). Todo lo anterior denota un papel importante de las células Treg durante el establecimiento de una infección y posiblemente de la explicación a la cronicidad de ciertas infecciones.

En el caso de *N. brasiliensis* se ha reportado que la enfermedad puede durar latente por largos periodos de tiempo por lo que sería interesante estudiar si existe alguna respuesta similar a las mencionadas anteriormente. Posiblemente, en el caso de *N. brasiliensis*, las células Treg también estén retrasando la llegada de las células CD4⁺ y CD8⁺ lo que permitiría que el patógeno se establezca y se multiplique en mayor cantidad; de igual manera, si Treg suprime la respuesta de tipo Th1 pero no Th17, esto explicaría la persistencia del patógeno y la cronicidad de la enfermedad. En nuestros resultados se mostró que la primera respuesta de las subpoblaciones estudiadas fue de Th17 y Tc17, posteriormente se incrementó el porcentaje de Treg que por sus características podría regular las acciones inflamatorias mediadas por estas células, sin embargo, no se estudió a los linfocitos Th1 para determinar si inhibe el tráfico de estas células al sitio de la infección.

Para finalizar, artículos han reportado variabilidad en las respuestas inmune durante distintas infecciones dentro de la misma cepa de ratones BALB/c. Steenstra *et al* (1989) compararon la susceptibilidad a la orquitis alérgica experimental (EAO por sus siglas en inglés Experimental Allergic Orchitis) en dos distintas subcepas de ratones BALB/c (BALB/cByJ y BALB/cJ) encontrando que BALB/cByJ resultó ser más susceptible a la EAO en comparación a la cepa

BALB/cJ (52). Así mismo López-Briones *et al* (2009) compararon la susceptibilidad de otras subcepas (BALB/cAnN y BALB/cJ) durante la infección por *Taenia crassiceps*, un parásito de roedores. En donde se encontró que BALB/cAnN era más susceptible a la infección mientras que BALB/cJ mostró ser resistente. Los niveles de linfocitos en las dos subcepas fueron estudiados encontrando que en la cepa susceptible, había un menor porcentaje tanto de células TCD4⁺ como de CD8⁺ (53). Por lo anterior, resultaría interesante estudiar si existe la misma respuesta inmune a la infección por *N. brasiliensis* en otras subcepas de ratones BALB/c e inclusive con otras cepas de ratones.

9. CONCLUSIONES

1. El incremento de Th17 y Tc17 encontrados en el tejido infectado y en bazo, al día 3 de infección, se correlaciona con los niveles de TGF- β 1 e IL-6 encontrados ese mismo día.
2. En tejido de cojinete plantar y en bazo, las células Treg se incrementaron al día 7 y 15 donde las citocinas anti-inflamatorias también alcanzan niveles altos.
3. El incremento de Treg y citocinas anti-inflamatorias se correlacionan con la disminución de la inflamación en el actinomicetoma al día 15 de infección.
4. El aumento de IL-17A e IL-23 podría estar favoreciendo el mantenimiento de al menos de los linfocitos Th17.
5. El desbalance de células Th17/Tc17 y Treg en etapas tempranas de la infección podría estar favoreciendo la formación del actinomicetoma, así como, la enfermedad crónica por *N. brasiliensis*.

10. PERSPECTIVAS

1. Determinar los niveles de IL-21 durante el establecimiento del actinomicetoma.
2. Determinar los niveles de los ARNm de las citocinas estudiadas para evaluar si existe una regulación génica de éstas durante el establecimiento del actinomicetoma.
3. Determinar si Treg suprime o retarda el tráfico de las subpoblaciones de linfocitos como Th1 al sitio de la infección.
4. Determinar la carga bacteriana y su asociación con las subpoblaciones de linfocitos y sus citocinas relacionadas.
5. Determinar si la esplenomegalia encontrada se relaciona con la presencia de antígenos solubles en bazo lo cual promueva la activación de células que causen inflamación en éste órgano.

REFERENCIAS

1. Madigan Michael T., M. J. M. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. PEARSON Prentice Hall, United States of America.
2. McNeil, M. M., and J. M. Brown. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 7:357-417.
3. Trujillo, H. S. 1973. *Actinomycetos: Miroorganismos de la luz*. UAM XOCHIMILCO CBS - GIAP
4. Euzeby, J. P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47:590-592.
5. Salinas-Carmona, M. C. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect* 2:1373-1381.
6. Serrano Jose Antonio , S. A. H., Beaman Blaine L. . 2007. *Actinomycetoma*. Plaza y Valdez, México.
7. Nocard, M. 1888. Note sur la maladie de boeufs de la Guadeloupe: connue sous le nom de farcin. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 2:293-307.
8. Welsh O., S.-C. M. C., Rodriguez M.A. 1994. *Infectious Disease J.B.* Lippincott Company Philadelphia.
9. Boiron, P., R. Locci, M. Goodfellow, S. A. Gumaa, K. Isik, B. Kim, M. M. McNeil, M. C. Salinas-Carmona, and H. Shojaei. 1998. *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma. *Med Mycol* 36 Suppl 1:26-37.
10. Destombes, P., F. Mariat, L. Rosati, and G. Segretain. 1977. [Mycetoma in Somalia - results of a survey done from 1959 to 1964]. *Acta Trop* 34:355-373.
11. Lopez Martinez, R., L. J. Mendez Tovar, P. Lavalle, O. Welsh, A. Saul, and E. Macotela Ruiz. 1992. [Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases]. *Gac Med Mex* 128:477-481.
12. Salinas-Carmona, M. C., E. Torres-Lopez, A. I. Ramos, A. Licon-Trillo, and D. Gonzalez-Spencer. 1999. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun* 67:2428-2432.
13. Bourgeois, L., and B. L. Beaman. 1974. Probable L-forms of *Nocardia asteroides* induced in cultured mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 9:576-590.
14. Beaman, B. L., and L. Beaman. 1994. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* 7:213-264.
15. Filice, G. A., B. L. Beaman, J. A. Krick, and J. S. Remington. 1980. Effects of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*: failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J Infect Dis* 142:432-438.
16. Thomas J. Kindt, R. A. G., Barbara A. Osborne. 2007. *Inmunologia de Kuby*. McGraw Hill, México
17. Deem, R. L., B. L. Beaman, and M. E. Gershwin. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect Immun* 38:914-920.
18. Gonzalez-Suarez, M. L., M. C. Salinas-Carmona, and I. Perez-Rivera. 2009. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57:17-24.
19. Salinas-Carmona, M. C., and I. Perez-Rivera. 2004. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* 72:5597-5604.

20. van de Veerdonk, F. L., M. S. Gresnigt, B. J. Kullberg, J. W. van der Meer, L. A. Joosten, and M. G. Netea. 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42:776-787.
21. Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, L. Rose, and A. H. Reddi. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:155-174.
22. von Vietinghoff, S., and K. Ley. 2009. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* 183:865-873.
23. Iwakura, Y., S. Nakae, S. Saijo, and H. Ishigame. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 226:57-79.
24. Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203:2271-2279.
25. Khader, S. A., and A. M. Cooper. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 41:79-83.
26. Khader, S. A., J. E. Pearl, K. Sakamoto, L. Gilmartin, G. K. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, N. Ghilardi, F. deSavauge, and A. M. Cooper. 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175:788-795.
27. Huber, M., S. Heink, H. Grothe, A. Guralnik, K. Reinhard, K. Eiflein, T. Hunig, H. W. Mittrucker, A. Brustle, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2009. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 39:1716-1725.
28. Shin, H. C., N. Benbernou, S. Esnault, and M. Guenounou. 1999. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 11:257-266.
29. He, D., L. Wu, H. K. Kim, H. Li, C. A. Elmetts, and H. Xu. 2006. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177:6852-6858.
30. Hamada, H., L. Garcia-Hernandez Mde, J. B. Reome, S. K. Misra, T. M. Strutt, K. K. McKinstry, A. M. Cooper, S. L. Swain, and R. W. Dutton. 2009. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* 182:3469-3481.
31. Corthay, A. 2009. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70:326-336.
32. Fletcher, J. M., R. Lonergan, L. Costelloe, K. Kinsella, B. Moran, C. O'Farrelly, N. Tubridy, and K. H. Mills. 2009. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 183:7602-7610.
33. Shimon Sakaguchi, K. W., Yasushi Onishi, Paz Prieto-Martin and Tomoyuki Yamaguchi. 2009. Regulatory cells: How do the suppress immune response? *International Immunology* 21:1105-1111.
34. Scott-Browne, J. P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan, and K. B. Urdahl. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med* 204:2159-2169.
35. Shevach Ethan, D. T. 2010. Regulatory T cells. Macmillan Publishers.

36. Salinas-Carmona, M. C., and E. Torres-Lopez. 1996. Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Ann N Y Acad Sci* 797:263-265.
37. Pepper, M., J. L. Linehan, A. J. Pagan, T. Zell, T. Dileepan, P. P. Cleary, and M. K. Jenkins. 2009. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol* 11:83-89.
38. Solis-Soto, J. M., L. E. Quintanilla-Rodriguez, I. Meester, J. C. Segoviano-Ramirez, J. L. Vazquez-Juarez, and M. C. Salinas Carmona. 2008. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol Histopathol* 23:573-581.
39. Gottfried Alber, T. K. 2007. Regulation of Protective and Pathogenic Th17 Response. *Current Immunology Review* 3:3-16.
40. de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.
41. Smith, S. S., and S. R. Barnum. 2008. Differential expression of beta 2-integrins and cytokine production between gammadelta and alphabeta T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Leukoc Biol* 83:71-79.
42. Song, C., L. Luo, Z. Lei, B. Li, Z. Liang, G. Liu, D. Li, G. Zhang, B. Huang, and Z. H. Feng. 2008. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 181:6117-6124.
43. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage, and A. L. Gurney. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-1914.
44. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
45. Saraiva, M., and A. O'Garra. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10:170-181.
46. Higgins, D. M., J. Sanchez-Campillo, A. G. Rosas-Taraco, E. J. Lee, I. M. Orme, and M. Gonzalez-Juarrero. 2009. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 89:149-157.
47. Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10:490-500.
48. Hougardy, J. M., S. Place, M. Hildebrand, A. Drowart, A. S. Debrie, C. Locht, and F. Mascarot. 2007. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:409-416.
49. Marin, N. D., S. C. Paris, V. M. Velez, C. A. Rojas, M. Rojas, and L. F. Garcia. 2010. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 90:252-261.
50. Boussiotis, V. A., E. Y. Tsai, E. J. Yunis, S. Thim, J. C. Delgado, C. C. Dascher, A. Berezovskaya, D. Rousset, J. M. Reynes, and A. E. Goldfeld. 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 105:1317-1325.

51. Shafiani, S., G. Tucker-Heard, A. Kariyone, K. Takatsu, and K. B. Urdahl. 2010. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med* 207:1409-1420.
52. Steenstra, R., H. Neblett, and C. Teuscher. 1989. Serum testosterone (T) levels in BALB/cByJ and BALB/cJ substrain mice: potential relationship with differential susceptibility to experimental allergic orchitis (EAO). *Autoimmunity* 2:285-289.
53. Lopez-Briones, S., E. Lamoyi, G. Fragoso, M. J. Soloski, and E. Sciutto. 2003. *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. *Parasitol Res* 90:236-242.

EQUIPOS UTILIZADOS

- Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf),
- Centrifuga refrigerada (Eppendorf)
- Micropipetas (Biopette, volúmenes 0.1-2, 0.5-10, 2-20, 20-200 y 100-1000 µl)
- Micropipeta multicanal (Biopette, volumen de 50-300 µl)
- Incubadora (Precision Economy Incubator),
- Refrigerador 4° (SANYO)
- Ultracongelador de -80°C (SANYO)
- Congelador de -20°C (Torrey)
- Autoclave (FELISA)
- Campana de flujo laminar (SterilchemGARD III Advance)
- Citómetro de flujo FACS Calibur (BD, San Jose California)
- Espectrofotómetro (SmartSpec plus, Biorad)
- Lector de microplacas (iMar microplate reader, Biorad)
- Vortex (Labnet)
- Potenciómetro (Fisher Scientific AB15 pH meter)
- Balanza analítica (Scientech SA210)
- Homogenizador de Tejidos (Biospec 985360-395)
- Computadora HP w1907 con Windows Vista
- Se emplearon los software Office, Endnote y Graph Pad Prism.

ANEXO 2

REACTIVOS PARA OBTENCIÓN DE TEJIDO Y CÉLULAS

Medio RPMI (Sigma Aldrich):

El medio se disolvió poco a poco en 100 ml de agua destilada y se vertió en un matraz aforado de 1 lt (Pyrex); se agregó 10 ml de amortiguador 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES SIGMA), 10 ml de solución de aminoácidos no esenciales 100X (SIGMA), 10 ml de piruvato de sodio (SIGMA) y 10 ml de solución penicilina-estreptomicina (SIGMA). Se mezcló y se llevó a un 1 lt con agua destilada. El medio se esterilizó en campana de flujo laminar con filtros Millipore de 0.2 μ m.

Colagenasa DNAsa (Sigma Aldrich):

En un tubo cónico de 50 ml (Corning) se agregó 15 ml de medio RPMI, 4.2 mg de DNAsa y 1200 CDU/mg solid (CDU = collagen digestion units) de Colagenasa. Se mezcló en vortex, y se esterilizó dentro de una campana de flujo laminar B2 de presión negativa empleando filtros Millipore de 0.2 μ m y se realizaron alícuotas de 2 ml en tubos cónicos de 15 ml (Corning) como solución stock 5X.

ANEXO 3

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Método Bradford

A partir de tejidos homogenizados en PBS se realizó la cuantificación de proteínas empleando el método Bradford. Se empleó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA, SIGMA). A partir de una solución BSA a 1 mg/ml, se realizó una dilución 1:50 en 5 ml de agua destilada. Posteriormente se realizaron cinco estándares y un blanco de la siguiente manera:

Estándar	BSA 1:50	H ₂ O destilada	Reactivo Bradford	Concentración µg/ml
Blanco	-	750 µl	750 µl	0
1	75µl	675 µl	750 µl	2
2	225 µl	525 µl	750 µl	6
3	375 µl	375 µl	750 µl	10
4	525 µl	225 µl	750 µl	14
5	675 µl	75 µl	750 µl	18

Por otro lado, cada muestra se diluyó de la siguiente manera:

Dilución de muestra	H ₂ O destilada	Muestra	Reactivo Bradford
1:100	495 µl	5 µl	500 µl
1:500	499 µl	1 µl	500 µl
1:1000	499.5 µl	0.5 µl	500 µl

En placas para ELISA (Costar) se agregó por duplicado 150 μ l de estándar o muestra en cada pozo, y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm.

Reactivo Bradford

Azul de Comassie 0.005gr

Etanol 95% 2.5 ml

Ac. Fosfórico 5 ml

Aforar a 50 ml con agua destilada

ANEXO 4

REACTIVOS PARA LA REALIZACIÓN DE ELISAS (IL-6, IL-10, IL-17 e IL-23)

PBS 1X

NaCl	8.09 gr
KH ₂ PO ₄	0.020 gr
Na ₂ HPO ₄	2.8 gr
KCl	0.2 gr

Aforar a 1 litro

Amortiguador de Lavado:

1lt de PBS 1X y Tween 20 (SIGMA) al 0.05%

Solución de Parada:

50 ml H₂SO₄ 2 N

Reactivos para ELISA de TGF-β1

50 ml de HCl 1 N

50 ml NaOH 1.2/HEPES 0.5 M

PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM; pH7.2-7.4; esterilizado con membrana Millipore de 0.2 μm)

Amortiguador de lavado (0.05% Tween en PBS pH 7.2-7.4)

30 ml del amortiguador de bloqueo (Tween 20 (SIGMA) al 5% en PBS con NaN₃ al 0.05%)

Reactivo de dilución (Suero Bovino al 1.4%, Tween 20 al 0.05% en PBS pH 7.2-7.4; esterilizado en membrana de 0.2 μm)

Solución sustrato: 3,3', 5, 5' Tetrametilbenzidina (TMB para ELISA-SIGMA)

Solución de alto (H₂SO₄) 2 N

ANEXO 5

CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LAS CITOCINAS

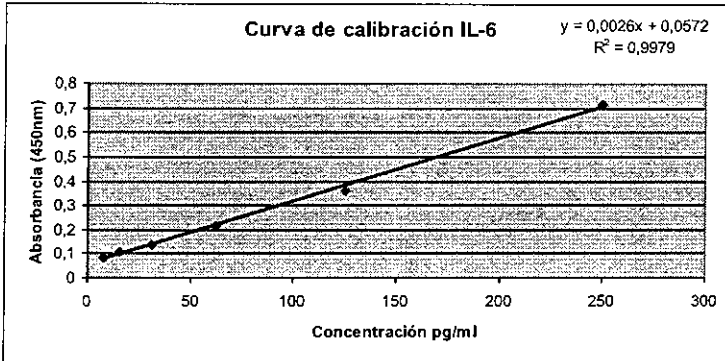


Figura 10. Curva de calibración para los estándares de IL-6 con un punto mínimo de 7.81 y máximo 250 pg/ml

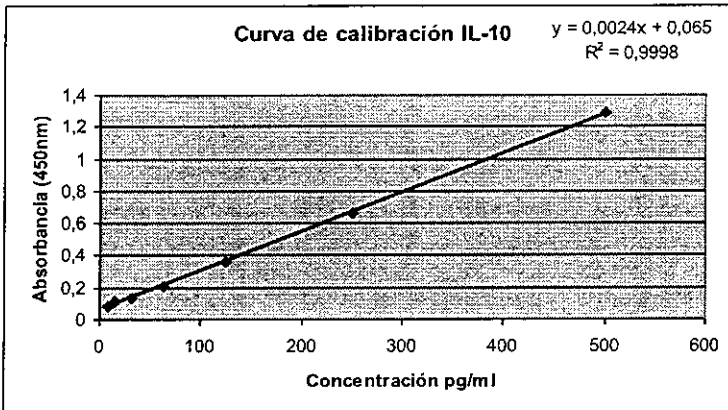


Figura 11. Curva de calibración para los estándares de IL-10 con un punto mínimo de 62.75 y máximo 4000 pg/ml

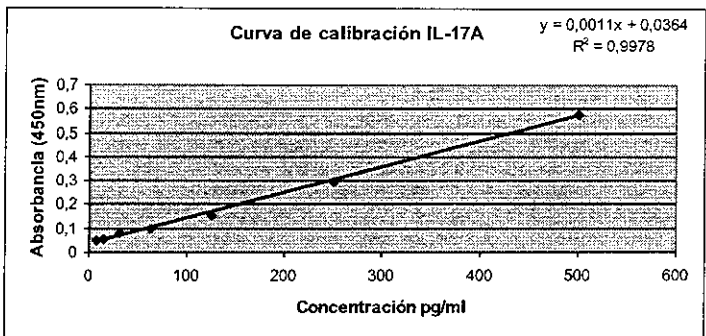


Figura 12. Curva de calibración para los estándares de IL-17A con un punto mínimo de 7.81 y máximo 500 pg/ml

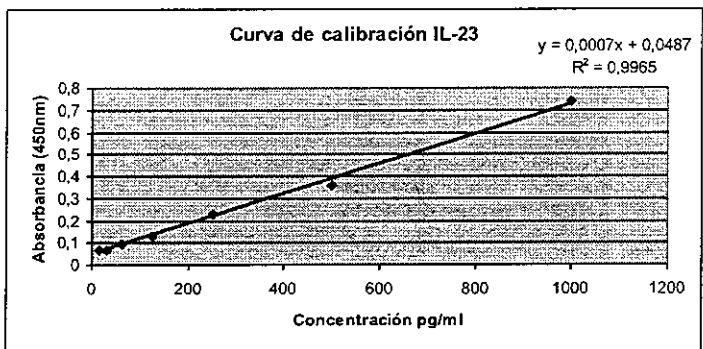


Figura 13. Curva de calibración para los estándares de IL-23 con un punto mínimo de 15.62 y máximo 1000pg/ml

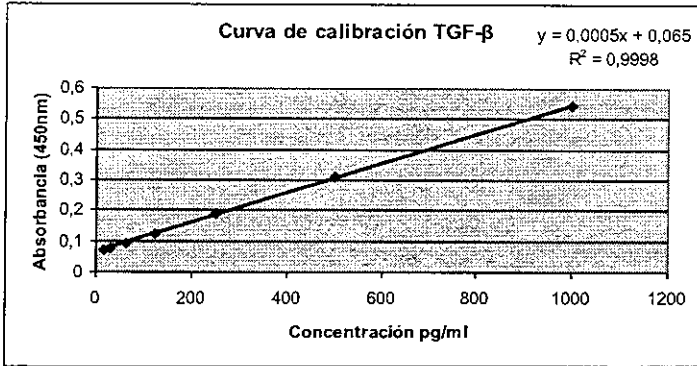


Figura 14. Curva de calibración para los estándares de TGF- β con un punto mínimo de 15.62 y máximo 1000pg/ml