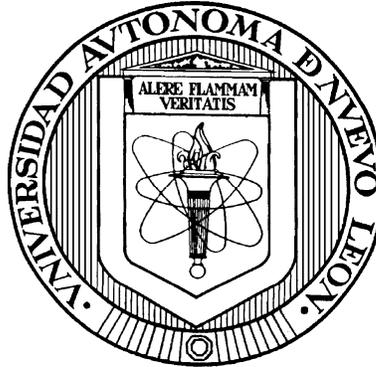


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



**“EFECTO DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES IgG E IgM Anti-*Nocardia brasiliensis* EN LA INFECCIÓN IN VITRO DE MACRÓFAGOS DE RATÓN ”**

**POR**

**M.C. MARÍA DEL REFUGIO ROCHA PIZAÑA**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación terminal en Inmunología**

**Monterrey, N.L., Julio del 2010**

Aprobación de la Tesis:

---

**Dr. Mario César Salinas Carmona**

Director de Tesis

---

**Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza**

Co-director de Tesis

---

**Dra. Luz Isabel Pérez Rivera**

Comisión de Tesis

---

**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**

Comisión de Tesis

---

**Dr. Augusto Rojas Martínez**

Comisión de Tesis

---

**Dr. Dionicio A Galarza Delgado**

Subdirector de Estudios de Postgrado

**Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología Molecular e Inmuno-infectología, del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona y la co-dirección de la Doctora Alma Yolanda Arce Mendoza.**

**Vo. Bo.**

---

**Dr. Mario César Salinas Carmona**

Director de Tesis

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**María del Refugio Rocha Pizaña**

Candidato para el Grado de

**Doctor en Ciencias con orientación terminal en Inmunología**

Tesis: “Efecto de los anticuerpos policlonales IgG e IgM *anti-Nocardia brasiliensis* en la infección *in vitro* de macrófagos de ratón”

**Campo de estudio:** Inmunología.

### **Biografía.**

Lugar de Nacimiento: Monclova, Coahuila, México.

Fecha: 9 de Noviembre de 1977.

Padres: Ismael Rocha Ortiz y Rosalinda Pizaña de Rocha.

### **Educación.**

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Grado obtenido: Químico Farmacéutico biólogo en 2000.

Maestría: Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Grado obtenido: Maestro en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

## AGRADECIMIENTOS

**A quien se volvió más que alguien a quien agradecer, se volvió la razón de ser, de vivir, de morir, del pasado, del futuro, quien me mostró con gran paciencia cuanto me amaba, a quien aprendí a buscar, a amar, por quien disfruto mucho más cada cosa, y quien me hace desear ser mejor.... Mi Dios creador.**

A mi familia: **Ing. Ismael Rocha Ortiz y Rosalinda Pizaña de Rocha**, mis papás que amo y son los autores intelectuales y responsables de todo lo que soy, gracias por escucharme con mis sesiones interminables de preguntas, gracias papá por tu paciencia y gracias mamá por enseñarme quién es Dios, ¡gracias por todo lo que me dan!. A mis hermanos que son una bendición de Dios y un orgullo muy grande: **Rosario, Israel, Myriam, Liz, C. Erick y H. Ariel**, definitivamente Dios les llenó de talentos. Mis cuñados, cuñadas: **Merari, Claudia, Juan Carlos y Eduardo**, gracias por su apoyo, por sus palabras, por su preocupación, no tengo suficientes palabras para agradecerles. Mis sobrinos preciosos que tienen poderes mágicos, con un abrazo y un sonrisa hacen que el mundo vuelva a ser hermoso! **Areli, Keren, Sarita, Erick, Mariana, Cristy, Paola, Jocabeth, Carlos Ariel y David** los amo!.

Departamento de Inmuno que me animaron y me ayudaron muchísimo en este tiempo:, **Araceli, Lizy, Brendita, Lizete, Lupita, Andrés, Alex Cortes, Gloria, Franki, Alberto y Dra. Maricela García** gracias por el Micro y por tu tiempo para escuchar, y a los que ya se fueron: **Humberto, Lulú y Julieta**.

En especial al laboratorio de Inmuno-molecular e Inmuno-Infectología: son hermosísimas personas y sin duda alguna ha sido un gusto y un privilegio convivir con ustedes: **Igor Medina, Adrián Rosas T., Fernando Escudero, Pily Morales, Francisco Hdz., Ivonne Vázquez, Alberto, Diana, Merari**, ¡son geniales!, mi agradecimiento por todo lo que he aprendido de ustedes!

A la gente de bioquímica, gracias por su ayuda y TAANTOOS favores que me hacían!! Gracias!!: **Jorge Ascacio, Jorge Lara, Iván Marino, Oscar Fajardo, Víctor Ortíz, Dianita, Alan, Alí**.

A mi amigo **Iram Rodríguez**, muchas cosas pudieron ser gracias a tu ayuda, sabes que tienes mi agradecimiento y mi amistad para siempre. A **Luz Castellanos**, realmente fuiste una lucecita en muchos momentos, te quiero lux, gracias por todo!.

A las misses!: Isabel Pérez, Paty Acosta, Velia Vázquez, Ale Gallegos: “las palabras enseñan, pero el ejemplo graba” le doy tantas gracias a Dios por ponerlas en mi camino, por enseñarme con su vida lo amoroso que es Dios, por toda su ayuda, por sus consejos, por sus valiosísimas palabras y no hay duda: “para este momento llegue!” Tenía que aprender de ustedes, mujeres sabias la bendición de Dios sea todo el tiempo sobre sus casas!!

A los Doctores por su enseñanza: **Dr Mario César Salinas Carmona, Dra. Alma Yolanda Arce M, Dra. Isabel Pérez, Dra Velia Vázquez, Dr Ernesto Torres, Dra Hermina Martinez**, definitivamente gracias, porque mi propósito de estar aquí se cumplió gracias a ustedes: APRENDÍ.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES.....	5
2.1. Descripción taxonómica, morfológica y bioquímica del género <i>Nocardia</i> y de la especie <i>brasiliensis</i> .....	5
2.2. Infección en humanos por el género <i>Nocardia</i> .....	6
2.3. Epidemiología de <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	7
2.4. Características del micetoma inducido por <i>N. brasiliensis</i> .....	8
2.5. Formas de evasión de patógenos intracelulares de la actividad microbicida del macrófago.....	9
2.6. Interacción <i>N. brasiliensis</i> -sistema inmune del hombre.....	11
2.6.1. Respuesta inmune celular.....	12
2.6.2. Respuesta inmune humoral.....	13
2.6.3. Respuesta inmune innata.....	15
2.6.3.1. Macrófagos.....	16
2.6.3.1.1. La vía de entrada de los microbios al macrófago: Receptores celulares.....	18
2.6.3.1.2. Receptores de opsoninas (Fc y RC).....	20
2.6.3.1.3. Citocinas producidas por los macrófagos en respuesta a la infección por <i>N. brasiliensis</i> .....	23

	<b>Página</b>
2.6.3.2. Papel del anticuerpo IgM en la resolución de la enfermedad por patógenos intracelulares.....	24
2.7. Usos de la proteína verde fluorescente.....	25
<b>CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 4: OBJETIVOS</b>	
4.1. Objetivo general.....	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
<b>CAPÍTULO 5: ESTRATEGIA GENERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 6: MATERIALES</b>	
6.1. Reactivos químicos y medios de cultivo.....	29
6.2. Biológicos.....	30
6.3. Equipo.....	30
6.4. Programas computacionales.....	31
<b>CAPÍTULO 7. METODOLOGÍA</b>	
7.1. Construcción de un plásmido con el promotor de la Superóxido Dismutasa de <i>N. brasiliensis</i> y la GFP.....	33
7.2. Construcción del promotor LacZ-GFP y del promotor gentamicina-GFP.....	34
7.2.1. Análisis de la secuencia del promotor LacZ de <i>E. coli</i> .....	38
7.3. Condiciones de cultivo y almacenaje para <i>N.brasiliensis</i> ATCC700358..	39
7.4. Transformación de <i>N. brasiliensis</i> .....	40
7.5. Obtención de extracto de proteínas de la cepa <i>N.brasiliensis</i> GFP.....	41
7.6 Producción de sueros policlonales IgM e IgG anti- <i>N. brasiliensis</i> en ratones BALB/c.....	42

7.7. Protocolo para preparar la suspensión de <i>N. brasiliensis</i> (filamentos) para la infección de macrófagos.....	43
7.8. Ensayos de virulencia de la cepa modificada de <i>N. brasiliensis</i> en ratones BALB/c.....	44
7.8.1. Verificación de la presencia de plásmido en la cepa modificada....	45
7.9. Preparación de suspensión unicelular de <i>N. brasiliensis</i> GFP.....	46
7.10. Manejo de la línea celular J774.....	47
7.11. Ensayos de fagocitosis.....	47
7.12. Ensayos <i>in vitro</i> de infección de macrófagos con la forma filamentosa de <i>N. brasiliensis</i> .....	49
7.12.1. Tinción Kinyoun.....	50
7.12.2. Medición de citocinas por ELISA.....	50
7.13. Ensayos en citometría para expresión de la GFP y CD11b.....	50

## CAPÍTULO 8: RESULTADOS

8.1 Construcción del plásmido y expresión de la fluorescencia en <i>Escherichia coli</i> .....	52
8.2. Prueba de fagocitosis para evidenciar la fluorescencia de la GFP en el interior del macrófago.....	53
8.3. Morfología de la cepa <i>N. brasiliensis</i> GFP ( <i>N.bra.GFP</i> ).....	55
8.4. Obtención de extracto de proteínas de la cepa <i>N.bra.GFP</i> .....	56
8.5. Inducción de micetoma por la cepa <i>N.braGFP</i> en ratones BALB/c.....	58
8.6. Verificación de la presencia de plásmido en la cepa modificada.....	60
8.7. Western blot de sueros IgM e IgG anti-Nocardia.....	61
8.8. Obtención de suspensión unicelular de <i>N. braGFP</i> .....	62
8.9. Ensayos de fagocitosis en macrófagos infectados con las cepas <i>N.braGFP</i> y <i>N.bra.WT</i> .....	63

	<b>Página</b>
8.9.1. Comparación del perfil de citocinas producidas por los macrófagos infectados por las cepas <i>N.braGFP</i> y <i>N.braWT</i> .....	64
8.10. Ensayos de infección en macrófagos con <i>N.brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos IgM ó IgG anti-Nocardia.....	65
8.10.1. Comparación del índice de fagocitosis de los macrófagos infectados con las bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM e IgG anti-Nocardia.....	67
8.10.2. Comparación de la producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por los macrófagos infectados con <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos IgM e IgG anti-Nocardia.....	68
8.10.3. Cinética comparativa de macrófagos infectados con <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos policlonales IgM ó IgG anti-Nocardia.....	69
8.11. Infección de macrófagos J774 con formas cocobacilares de <i>N. brasiliensis</i> .....	70
8.11.1. Producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por macrófagos infectados con las formas cocobacilares aisladas de <i>N. brasiliensis</i> .....	72
8.12. Ensayos de la expresión del receptor CD11b.....	73
8.13. Ensayos de la expresión de la GFP.....	74
<b>CAPÍTULO 9: DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>CAPITULO 11: PERSPECTIVAS.....</b>	<b>85</b>
<b>CAPITULO 12 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>86</b>
<b>APÉNDICE A.....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Programa para la amplificación de los promotores SOD, LacZ y gentamicina.....	36
Cuadro 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los promotores SOD, LacZ y gentamicina.....	37

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Esquema de la Estrategia General .....	28
Figura 2. Estrategia de clonación para el promotor SOD .....	34
Figura3. Estrategia de construcción para el promotor LacZ.....	35
Figura 4. Estrategia de construcción para el promotor de gentamicina.....	36
Figura 5. Construcciones de los promotores de gentamicina, LacZ y la GFP.....	38
Figura 6. Análisis de la secuencia del plásmido con el promotor LacZ.....	39
Figura 7. Verificación de virulencia de la cepa modificada.....	45
Figura 8. Colonias candidatas que expresan la GFP.....	52
Figura 9. Citometría de Flujo para la GFP.....	53
Figura 10. Análisis de fluorescencia para el ensayo de fagocitosis.....	54
Figura 11. Clonas candidatas de <i>N.bra</i> GFP.....	55
Figura 12. Morfología de la cepa <i>N.bra</i> GFP .....	56
Figura 13. Extracto proteico de las <i>N.bra</i> GFP y <i>N.bra</i> WT .....	57
Figura 14. Análisis en el programa GelPro Analyzer.....	58
Figura 15. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados con la <i>N.bra</i> GFP .....	59
Figura 16. Gránulo obtenido de micetoma de ratones infectados con la cepa <i>N.bra</i> GFP .....	60
Figura 17. Extracción de DNA plasmídico para la cepa de <i>Nbra</i> GFP y la cepa sin modificar.....	61
Figura. 18. Western blot de los sueros obtenidos IgM e IgG anti- <i>Nocardia</i> ..	62
Figura 19. Gradientes de sacarosa y percoll.....	63
Figura. 20. Índice de Fagocitosis por macrófagos infectados con la cepa <i>N.bra</i> .GFP y <i>N.bra</i> .WT.....	64

Figura 21. Cinética de comparación de la producción de las citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por los macrófagos infectados con la <i>N.bra.GFP</i> y <i>N.bra.WT</i> .....	65
Figura 22. Cinética de infección de macrófagos J774 con <i>N.brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos IgM e IgG anti- <i>N.bra</i> .....	66
Figura 23. Índice de Fagocitosis de bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM e IgG anti- <i>Nbra</i> .....	67
Figura 24. Índice fagocítico de bacterias opsonizadas por anticuerpos IgM e IgG anti- <i>Nbra</i> en macrófagos de cavidad peritoneal de ratones BALB/c..	68
Figura 25. Gráficas de la cinética de producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por macrófagos infectados con <i>N.brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos IgM ó IgG anti- <i>Nbra</i> .....	69
Figura 26. Cinética comparativa del porcentaje de macrófagos infectados con <i>N.brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos policlonales IgM ó IgG anti- <i>Nbra</i> .....	70
Figura 27. Cinética de infección de macrófagos J774 con formas cocobacilares de <i>N.brasiliensis</i> .....	71
Figura 28. Gráficas de la cinética de producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por los macrófagos infectados con las formas cocoides y filamentos de <i>N. brasiliensis</i> .....	72
Figura 29. Expresión del receptor CD11b en macrófagos infectados con <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos IgM o IgG anti-Nocardia.....	73
Figura 29. Expresión de la GFP en macrófagos infectados con <i>N.brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos IgM o IgG anti-Nocardia.....	75

## ABREVIATURAS

<b>BALB/c</b>	Cepa de ratones blancos
<b>BHI</b>	Brain Infusion Hearth (Agar Infusión Cerebro-corazón)
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Calcio
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DNA</b>	Desoxiribonucleic acid (Acido desoxirribonucleico)
<b>DNAc</b>	DNA complementario al RNA mensajero
<b>dNTPs</b>	Desoxirribunucleosidos trifosfatados
<b>DMEM</b>	Dubelcco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima)
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
<b>g</b>	Gramos
<b>HeLa</b>	Línea celular de cáncer epitelial
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>hrs</b>	Horas
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G

<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Kb</b>	Kilopares de bases
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>LB</b>	Luria B (caldo de crecimiento)
<b>M</b>	Concentración Molar
<b>min</b>	Minutos
<b>mg</b>	Miligramos
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección
<b>MQ</b>	Agua ultrapura (NANO pore)
<b><i>Nbra</i>GFP</b>	<i>Nocardia brasiliensis</i> con la proteína verde fluorescente
<b><i>Nbra</i>WT</b>	<i>Nocardia brasiliensis</i> tipo silvestre o sin modificación
<b>nm</b>	nanómetros
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida)
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora salina de fosfatos
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

<b>pg</b>	Picogramos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	$-\log [H^+]$ o concentración de iones hidrógeno presentes en solución
<b>psi</b>	Libras por pulgada cuadrada
<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico (ARN)
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Acido Ribonucleico mensajero
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo celular cuyas iniciales toman el nombre del Roswell Park Memorial Institute.
<b>SDS</b>	Lauril sulfato de sodio
<b>seg</b>	Segundos
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima para amplificación o copiado de DNA)
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>Th1</b>	T helper 1 (Población de linfocitos T cooperadores subtipo 1)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumoral Necrosis Factor (Factor de Necrosis Tumoral)
<b>temp</b>	Temperatura
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>vol</b>	Volumen

## RESUMEN

**M.C. María del Refugio Rocha Pizaña** Fecha de graduación: Julio del 2010

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

**Título del estudio:** “Efecto de los anticuerpos policlonales IgG e IgM anti-*Nocardia brasiliensis* en la infección in vitro de macrófagos de ratón”

**Número de páginas:** 93 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Inmunología

**Área de Estudio:** Inmunología

**Propósito y Método del Estudio:** *Nocardia brasiliensis* es un actinomiceto saprófito, patógeno para animales y humanos. México es uno de los países con mayor número de casos de micetoma reportados y el 90% de éstos son debidos a la especie *brasiliensis*. *Nocardia* es una bacteria intracelular facultativa que se multiplica y sobrevive dentro de las células del sistema inmune. Los mecanismos involucrados en la evasión microbicida del macrófago por *N. brasiliensis* son poco conocidos. Se ha demostrado que los anticuerpos IgM pero no los IgG son capaces de prevenir el desarrollo del micetoma por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c. Es importante estudiar el efecto in vitro de los anticuerpos IgM e IgG en la infección por *N. brasiliensis* de los macrófagos y evaluar si el anticuerpo usado por la bacteria para entrar al macrófago, influye en el desencadenamiento de una serie de eventos que culminan con su supervivencia o en la muerte intracelular. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto in vitro de los anticuerpos policlonales IgM e IgG anti-*N. brasiliensis* en la resistencia a la infección de macrófagos. Se construyó una cepa recombinante de *N. brasiliensis* que expresa la proteína verde fluorescente. Se evaluó la virulencia de la cepa modificada en el establecimiento del micetoma en ratones BALB/c. Se realizaron ensayos de infección en la línea celular de macrófagos de ratón J774 con *Nocardia* opsonizada con anticuerpos IgM e IgG anti-*Nocardia* se comparó el índice de fagocitosis en ambas condiciones y la producción de las citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ .

**Contribuciones y Conclusiones:** Se logró modificar la cepa de *N. brasiliensis* HJEG-1, (ATCC 70358) que produce la proteína verde fluorescente, y además se comprobó que su virulencia es similar a la de la cepa original infectando ratones BALB/c. Se encontró que el anticuerpo IgM disminuye la internalización de *Nocardia* hacia el macrófago, hasta 45 veces menos que la fagocitosis promovida por el anticuerpo IgG y además se observó que disminuye la producción de IL-12 por los macrófagos, a diferencia de los anticuerpos IgG los cuales elevan la producción de esta citocina.

---

Dr. Mario César Salinas Carmona.  
Director de tesis

---

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza.  
Co-director

## CAPÍTULO 1.

### INTRODUCCIÓN

Los microbios han existido antes que la especie humana, y han coexistido con nosotros a lo largo de miles de años. Sin embargo, hay puntos de desequilibrio documentados a lo largo de la historia de la humanidad, en los que se marca el daño que pueden ocasionar los microorganismos sobre la población humana en forma de epidemias. Actualmente la vacunación ofrece una disminución notoria del número de muertes ocasionadas por microorganismos, sin embargo, se reporta que un tercio de la población mundial ha tenido contacto con *Mycobacterium tuberculosis* y a principios de este siglo en EUA, la muerte por neumococo era la segunda causa después del cáncer. Además, existe un número notorio en constante incremento de individuos infectados de malaria en el mundo. Esto nos indica el alto impacto de los patógenos intracelulares que son responsables del contagio y muerte de un gran número de individuos alrededor del mundo. Una de las causas por la que estos microorganismos intracelulares persisten en el hombre, es por su habilidad de entrar a las células, sobrevivir y multiplicarse dentro de ellas.

A la fecha, se han desarrollado un gran número de estudios para entender la relación patógeno intracelular-hombre, y han contribuido a describir características y propiedades de algunos microbios para superar los sistemas

microbicidas de los organismos superiores. En cuanto al hospedero humano, en ocasiones accidental, en otras situaciones como reservorios principales, se han descrito un gran número de factores por los cuales su sistema inmune o de defensa es vencido para dar lugar a la enfermedad: el estado de nutrición, edad, sexualidad, nivel socioeconómico del individuo y las alteraciones en genes, entre otros, son algunos de estos factores. También se conoce ahora que hay puntos importantes durante la infección: la entrada del microorganismo, invasión y colonización en el tejido del hospedero, la superación de las defensas del hospedero y la lesión o alteración funcional de los tejidos.<sup>1</sup> Con toda esta información debería ser cada vez más sencillo controlar las enfermedades ocasionadas por los microbios intracelulares, pero a pesar de todo lo que actualmente se conoce, aún no es posible prevenir las infecciones ocasionadas por muchos de estos microorganismos.

Según A. Casadevall el microbio no desarrolla estrategias para dañar, sino que, simplemente trata de sobrevivir en el medio ambiente, así como nuestra especie. Muchos de los llamados “factores de virulencia” no son armas desarrolladas específicamente para atacar al hombre, en realidad parecen ser mecanismos de supervivencia, que les han permitido vivir en el medio ambiente hostil, donde existe un número mucho mayor de microorganismos que también se encuentran en esta lucha por subsistir.<sup>2</sup> El punto de vista de Casadevall sin duda, es interesante ya que muchos de los genes llamados “factores de virulencia” están

altamente conservados, no solamente en microorganismos del mismo género sino también en especies emparentadas filogenéticamente. Esto nos lleva a la reflexión de que un microorganismo, por ejemplo alguna cepa bacteriana, que reside en determinada región, no afecta a la población humana en igual forma, por lo que en una misma familia la enfermedad ocasionada por microorganismos intracelulares, en ocasiones no se presenta en todos los miembros por igual e incluso puede afectar solamente a uno de los miembros.

De modo que, todavía nos queda mucho por entender de la interacción patógeno intracelular-hombre; aún hay interrogantes sobre la forma en que los microorganismos se adaptan en la célula para persistir, y aún tenemos que comprender mejor el proceso que ocasiona una pérdida del control en los mecanismos microbicidas en el humano.

En el servicio de inmunología del Hospital Universitario de la U.A.N.L. en Monterrey N.L., se ha estudiado por años a *Nocardia brasiliensis*, patógeno intracelular que ocasiona el actinomicetoma, con resultados bastante fructíferos. Se ha logrado desarrollar el modelo de enfermedad en ratones de la cepa BALB/c,<sup>3</sup> se han identificado los antígenos bacterianos que inducen la mayor respuesta de anticuerpos o inmunodominantes<sup>4</sup>, esto a su vez ha permitido desarrollar un método de diagnóstico para individuos infectados con esta especie bacteriana.<sup>5</sup> Además se han realizado una serie de ensayos en los que se ha evaluado la respuesta inmune contra esta bacteria (proliferación de linfocitos T, producción de

anticuerpos y sus isotipos, producción de citocinas, entre otros). Uno de los hallazgos más sobresalientes que se ha encontrado es que los anticuerpos del tipo IgM, previenen el desarrollo de micetoma en el modelo de ratón, y además se ha observado que en ratones con el micetoma ya establecido disminuyen la lesión ocasionada por la bacteria de una forma muy notoria. Contrario a lo conocido hasta ahora, específicamente en esta enfermedad, los anticuerpos IgG de memoria no previenen ni disminuyen la lesión. También se determinó que el complemento no participa en la actividad observada por el anticuerpo IgM. Estos hallazgos han abierto un gran número e interrogantes que es necesario responder para darnos un mejor entendimiento de la enfermedad y la forma en que podemos limitarla o prevenirla. La pregunta que surge para esta tesis, es si el anticuerpo IgM o IgG empleado para opsonizar a *Nocardia brasiliensis*, activará en el interior del macrófago una serie de señales que permitirán que la bacteria sobreviva o que sea eliminada.

## CAPÍTULO 2.

### ANTECEDENTES

#### 2.1. Descripción taxonómica, morfológica y bioquímica del género *Nocardia* y de la especie *brasiliensis*.

*Nocardia brasiliensis* pertenece a la familia *Nocardiaceae* del orden de los Actinomicetales. Se relaciona filogenéticamente con los géneros *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Corynebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* y *Tsukamurella* actinomicetos que contienen ácidos micólicos en su pared celular y que ocasionan enfermedades en animales y humanos.<sup>6</sup> *Nocardia brasiliensis* se deriva en dos taxones descubiertos posteriormente a su descripción: *Nocardia pseudobrasiliensis* y *Nocardia mexicana*.<sup>7</sup>

En cuanto a la morfología del género *Nocardia*, es característico su desarrollo en forma de filamentos, los cuales se distribuyen en forma aérea y hacia el sustrato de crecimiento y tienen como característica fragmentarse en bacilos y cocobacilos. En medios BHI y Sabouraud crece lentamente en pH desde 6 hasta 9 y en temperaturas de 10 a 45 °C. Las colonias tienen forma “algodonosa” con coloración naranja debido a los pigmentos carotenoides producidos.<sup>8,9</sup>

La pared celular de la especie *brasiliensis* y algunas de las otras especies de *Nocardia* contienen azúcares como la arabinosa y galactosa, ácido meso-

diaminopilémico, ácido murámico, ácidos micólicos, ácidos tubérculo-esteáricos y menaquinonas.<sup>10</sup> El péptidoglicano de *Nocardia* es de tipo A1 $\gamma$ , que contiene ácido diamino meso-A2pm y ácido murámico en forma N-glicosilada, la fracción polisacárida es rica en azúcares (arabinosa y galactosa). Los ácidos micólicos que contiene la pared celular poseen átomos de 44 a 64 carbonos y de dos a tres uniones de ácidos grasos no saturados.<sup>11</sup>

## **2.2. Infección en humanos por el género *Nocardia*.**

Las especies de *Nocardia* son actinomicetos saprofitos y aeróbicos, que se encuentran en el medio ambiente. Si bien muchas de las especies de *Nocardia* no son dañinas para el hombre,<sup>12,13</sup> algunas de estas especies sí son altamente patógenas para los animales y el humano, por ejemplo *N. asteroides* se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson<sup>14</sup> e infecciones invasivas severas; *N. brasiliensis*, con infecciones subcutáneas y *N. pseudobrasiliensis* se ha relacionado con nocardiosis no-cutáneas (sistémicas, pulmonares o de sistema nervioso central).<sup>6</sup> Beaman B. ha descrito que las cepas patógenas de las especies de *Nocardia* tienen tropismo por órganos particulares y clasifican al menos seis tipos de nocardiosis: pulmonar, sistémica, del sistema nervioso central, extrapulmonar, cutánea - subcutánea y linfocutánea y el actinomicetoma.<sup>15</sup> Otras de las especies que se han clasificado como patógenas son: *Nocardia farcinica*, *Nocardia otitidiscavarium* y *Nocardia transvaliensis*.<sup>6,16</sup> El número de casos de nocardiosis se

ha incrementado en los últimos años, debido a que en la actualidad estas bacterias presentan resistencia a muchos medicamentos.<sup>17</sup>

### **2.3. Epidemiología de *Nocardia brasiliensis*.**

El micetoma es endémico en países tropicales o subtropicales con latitudes cercanas al plano ecuatorial. Los factores como la temperatura, la lluvia, el tipo de suelo, la vegetación, el tipo y cantidad de población humana, determinan la especie de microorganismo que induce micetoma en la región. Por ejemplo, en Sudán el micetoma es una enfermedad endémica debido a las condiciones económicas y sociales. Si bien, el primer agente causal de micetoma en Sudán es *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* ocasiona el 2-6% de las infecciones.<sup>11</sup>

En un estudio de supervivencia realizado en México, se analizaron 2105 casos de micetoma en un período cercano a 30 años (1965-1985), se encontró que la incidencia de esta enfermedad es de 70 casos por año, afectando un 76% a los hombres y un 24% a mujeres. Asimismo se observó que los estados con mayor incidencia en México fueron Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Morelos y Guerrero. La mayoría de los casos de micetoma en México, son producidos por *N. brasiliensis*, siendo el agente causal de hasta el 90% de los reportados para esta enfermedad.<sup>18 19</sup>

#### **2.4. Características del micetoma inducido por *N. brasiliensis*.**

*Nocardia brasiliensis* produce en humanos el actinomicetoma o micetoma actinomicótico. El micetoma, se caracteriza por la formación de múltiples abscesos que contienen gránulos cuya coloración, tamaño y consistencia dependen del microorganismo que ocasiona la lesión granulomatosa. El período de incubación del micetoma no se conoce, se piensa que puede ser de un rango de meses a años. Debido a que *Nocardia brasiliensis* es saprofito del suelo, los trabajadores del campo son mayormente afectados, y es muy común observar lesiones que se localizan en las extremidades inferiores, y que son posteriores a traumatismos. Además, la especie *Nocardia* puede colonizar las manos, los brazos, el esternón, los pulmones, y el mediastino.<sup>8</sup> La lesión inicial comprende una pequeña área de inflamación en el sitio de inoculación primario. La progresión de la enfermedad es muy lenta y puede, en algunos casos llegar a la infección completa del pie. La inflamación puede llegar a ser tan pronunciada que el pie puede asumir una curvatura convexa.<sup>20</sup> Las lesiones por micetoma se pueden extender hacia el tejido adyacente produciendo una tumefacción mayor, nuevos abscesos y drenaje diario del material líquido de los gránulos, puede incluso invadir hueso.<sup>21</sup> Se considera que de los casos por micetoma, las lesiones por *N. brasiliensis* pueden ser más agresivas, celulares, infiltrativas y destructivas que las lesiones ocasionadas por otros agentes causales.<sup>11</sup>

## **2.5. Formas de evasión de patógenos intracelulares de la actividad microbicida del macrófago.**

Para algunos microorganismos intracelulares como *Mycobacterium* se han encontrado una serie de estrategias usadas para detener la acción microbicida de los monocitos, algunas son: bloquear los intermediarios reactivos de oxígeno, inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, la neutralización del pH del fagosoma, la resistencia a enzimas lisosomales y la inducción de las proteínas de shock térmico dentro del macrófago.<sup>22</sup>

En general, el aspecto genético de la *Nocardia* se ha investigado poco y sólo unos pocos genes han sido secuenciados.<sup>23</sup> En un estudio sobre la expresión de los genes de *N farcinica* cuando infecta macrófagos, se demostró que se expresan mayormente los genes involucrados en la defensa frente a los intermediarios reactivos de oxígeno producidos por el fagocito. Algunos de estos genes son: los que codifican para la alquilhidroperóxido reductasa, la catalasa, la superóxido dismutasa, la tiorredoxina reductasa, la glutatión peroxidasa y la peptido metionino sulfóxido reductasa; se piensa que estos genes son esenciales para evadir los mecanismos bactericidas del fagocito y por lo tanto la supervivencia de la bacteria.<sup>24</sup> Algunas enzimas producidas por especies de *Nocardia* se han relacionado con la virulencia de las cepas. Beaman y cols. usaron anticuerpos monoclonales específicos para SOD con los cuales bloquearon su efecto sobre el superóxido, estableciéndose así que la *Nocardia* es protegida por SOD del estrés oxidativo tanto in vitro como in vivo durante cualquier fase de

crecimiento.<sup>25</sup> La catalasa y la SOD han sido implicadas como factores de virulencia en *N. asteroides* y en otros organismos como *Streptococcus pyogenes*<sup>26</sup> y *Escherichia coli*<sup>27</sup> por mencionar algunos.

Por otro lado, la patogénesis de la especie *N. asteroides* es capaz de inhibir en los fagocitos la fusión fagosoma-lisosoma; neutralizar la acidificación fagosomal; detoxificar los productos microbicidas del metabolismo oxidativo; modificar la función del fagocito; crecer dentro de los fagocitos.<sup>6</sup> Además algunas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos bioactivos secundarios como la brasilcardina terpenoide, la cual posee actividad inmunosopresora<sup>28</sup>.

En el laboratorio de Inmunología Molecular del Hospital Universitario, Medina I. en su tesis doctoral, produjo una proteína recombinante de SOD de *N. brasiliensis*, para inmunizar ratones, encontrando que no se establecía el micetoma en los ratones inmunizados, por lo que se sugiere que para *N. brasiliensis* la SOD también es un factor de virulencia.<sup>29</sup> Igualmente se observó un efecto protector en ensayos en los que se usaron anticuerpos anti-proteasa y anti-p61, anti-p24 y anti-p26, lo que sugiere que estas proteínas también pudieran estar relacionadas con la virulencia. Pero aún no ha sido determinado la totalidad de factores de virulencia de *N. brasiliensis*.

## 2.6. Interacción *N. brasiliensis*-sistema inmune del hombre.

Una de las principales características de los patógenos intracelulares es que evaden al sistema inmune, residiendo en el interior de las células, éstas les confieren un nicho donde además aprovechan los nutrientes celulares para multiplicarse, pero un hecho imprescindible para estos patógenos es lograr escapar de los mecanismos microbicidas del interior de las células. La respuesta adaptativa típica contra estos microorganismos incluye la participación de los linfocitos T, los cuales son los encargados de activar a los macrófagos para que eliminen a los microorganismos de una forma más efectiva. Así tenemos que la inmunidad innata juega un papel importante en limitar el crecimiento bacteriano, pero también es necesaria la inmunidad adquirida, ya que se encarga de la eliminación de los microbios.

En cuanto a *Nocardia brasiliensis*, una vez que ha sido inoculada a través de un traumatismo induce un infiltrado de células polimorfonucleares a su alrededor y se inicia la inflamación en esta área. Después de la liberación de quimiocinas durante este proceso, los macrófagos llegan al sitio para fagocitar a las bacterias. Posteriormente los linfocitos se acumulan progresivamente formando microabcesos.<sup>8</sup>

### 2.6.1. Respuesta inmune celular

La respuesta del sistema inmune en contra de patógenos intracelulares es de tipo Th1 principalmente.<sup>30</sup> La protección es inducida una vez que ocurre la disminución de IL4 y el aumento en la producción de INF- $\gamma$  por los linfocitos específicos de antígeno. En cuanto a la respuesta celular inducida por *Nocardia*, en un ensayo in situ en tejido humano se observó que en el micetoma se encontraban linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> rodeados por agregados de neutrófilos y macrófagos.<sup>31</sup> En el modelo de micetoma en ratón se ha observado que los linfocitos obtenidos de bazo y nódulos linfoides proliferan in vitro después de ser estimulados con el antígeno inmunodominante p24 o con bacterias muertas por calor. Los análisis por citometría de flujo demostraron que hay una disminución del 50% de linfocitos CD4<sup>+</sup>.<sup>3</sup> Estos resultados son apoyados por ensayos realizados en ratones atímicos infectados con micetoma, donde se reportó que existía una respuesta defectuosa contra *Madurella micetomatis*.<sup>32</sup> En otro ensayo en la misma cepa de ratón se observó que cuando los animales eran infectados con *N. brasiliensis* o *N. asteroides* se producía una infección diseminada, no producían granulomas y había un gran número de ratones que morían.<sup>33</sup> En ratones irradiados se reconstituyó con una población de linfocitos B específicos contra extractos de *Nocardia* que eran incapaces de producir anticuerpos, pero montaron una reacción de hipersensibilidad retardada efectiva y controlaron la infección por *Nocardia*, lo que demuestra la importancia de la respuesta inmune celular en la resolución de la enfermedad.<sup>34</sup> Aún queda mucho por entender en relación a este tipo de respuesta

contra *Nocardia brasiliensis*, pero es claro que es importante en la contención (por la formación de granulomas) y en la eliminación, por la propiedad de los linfocitos T de activar a los macrófagos.

### **2.6.2. Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral juega un papel importante contra cualquier microorganismo, ya que es la encargada de neutralizar y opsonizar la bacteria, entre otras importantes funciones. En la respuesta inmune humoral contra *Nocardia brasiliensis*, contrario a otras enfermedades, la presencia de anticuerpos de memoria son un indicador de que la enfermedad está activa.<sup>4</sup> En un estudio inicial se analizaron 16 sueros de pacientes con micetoma, se hicieron reaccionar con el extracto proteínico obtenido de *Nocardia brasiliensis* y se observó que existía un fuerte reconocimiento de al menos seis bandas de proteínas, tres de estas bandas (p24, 26 y 61) mostraban especificidad contra *N. brasiliensis*.<sup>35</sup>

Posteriormente a la identificación de estas bandas inmunodominantes se eligió la proteína p24 y la proteasa para desarrollar una prueba de ELISA para el diagnóstico de pacientes con micetoma, en donde se trabajó con 30 sueros y se observó que la proteína p24 era específica para micetoma por *Nocardia brasiliensis*. No se observó reacción cruzada con alguna otra bacteria, y además los pacientes con micetoma tenían altos títulos de anticuerpos contra este antígeno y se

correlacionaba con la enfermedad activa. En este ensayo, no se observó la utilidad de la proteasa en el diagnóstico de la enfermedad activa, pero en antecedentes previos se encontró que los pacientes en remisión tenían títulos altos de anticuerpos contra esta proteína.<sup>36</sup> En otro estudio con pacientes que tenían actinomicetoma, se confirmó que los títulos elevados de anticuerpos se relacionaban con un mal pronóstico de la enfermedad.<sup>37</sup> Debido a esta relación se realizó un análisis en la producción de anticuerpos secretados por los pacientes con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* y se encontró que las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 eran producidas mucho más abundantemente en los pacientes que en los controles, siendo los subtipos IgG3 e IgG4 los de mayor producción, y que los niveles de IgM eran iguales para los controles<sup>38</sup>. En el modelo de micetoma de ratón se presenta una producción de anticuerpos semejante al perfil producido en humanos, con reacción alta hacia los antígenos inmunodominantes p61, p26 y p24 y los títulos de anticuerpos que se alcanzan también son similares para ambas especies.<sup>3</sup>

Si bien los antecedentes parecen indicar que la presencia de anticuerpos no favorece la resolución de la infección, en un estudio publicado recientemente se demostró el papel protector de los anticuerpos IgM producidos contra *N. brasiliensis* usando bacterias muertas por calor<sup>39</sup> y anticuerpos específicos contra los antígenos de *N. brasiliensis*<sup>40</sup>. También otros investigadores encontraron que los anticuerpos contra las proteínas con actividad de catalasa y peroxidasa de *N.*

*asteroides* son capaces de inducir protección.<sup>41</sup> Aún no se conoce la forma en que los anticuerpos del isotipo IgG específicos contra antígenos de *Nocardia* pueden ejercer esta protección y cómo es que en los pacientes con esta enfermedad (también en el modelo de ratón), se presentan los títulos altos de anticuerpos en la enfermedad activa y aparentemente no ayudan en su resolución.

### **2.6.3. Respuesta inmune innata.**

La forma en que los componentes del sistema eliminan a los agentes extraños es muy particular para cada microorganismo, pero es bien conocido que la entrada de los patógenos intracelulares hacia las células, les confiere protección contra los demás componentes del sistema inmune, tales como los anticuerpos, el complemento, etc. Siendo las células fagocíticas, los monocitos o macrófagos el tipo celular mayormente usado.

Por esta razón nos centraremos en esta parte en los macrófagos, detallando los receptores, las citocinas y el papel protector por IgM recientemente descubierto, contra algunos microorganismos intracelulares, incluyendo por supuesto a *Nocardia brasiliensis*.

### **2.6.3.1. Macrófagos.**

El sistema fagocítico mononuclear constituye la segunda población celular del sistema inmune innato. Estas células con su capacidad fagocítica permiten al microorganismo, una mayor probabilidad de entrar a la célula, además su vida media es mayor que algunos tipos celulares, por ejemplo, los monocitos cuya vida llega a ser de meses en circulación a diferencia de los polimorfonucleares cuya vida es más corta y otra característica importante que hace a este tipo celular preferencial por los intracelulares, es que poseen menor actividad antimicrobiana que los polimorfonucleares.<sup>22</sup> Cuando los macrófagos son expuestos a productos microbianos o a citocinas como INF- $\gamma$ , se activan para fagocitar y destruir los microorganismos, secretan citocinas pro-inflamatorias y presentan los antígenos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En estos macrófagos se aumenta la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno y de óxido nítrico los cuales son elaborados en los lisosomas de los macrófagos para destruir los microorganismos ingeridos. También contienen mayores cantidades de enzimas lisosomales que destruyen a los microbios fagocitados cuando se fusionan a los lisosomas. Los intermediarios reactivos de oxígeno también pueden liberarse en los tejidos adyacentes, y pueden lesionarlos. Además estimulan la inflamación aguda mediante la secreción de citocinas, principalmente TNF, IL-1 y quimiocinas y mediadores lipídicos de vida corta, como el factor activador de plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos. La acción de estas citocinas es producir una inflamación local donde hay acumulación

de neutrófilos, que también facilita la fagocitosis y la destrucción de los microbios.<sup>1</sup>

Pese a que están bien estudiados los efectos benéficos de algunos factores del macrófago, incluso llamados “mecanismos de defensa”, como el interferón gamma y los intermediarios reactivos de oxígeno, algunos investigadores han mostrado el efecto negativo de estas moléculas por ejemplo: los intermediarios reactivos de oxígeno son tóxicos para los microorganismos, pero en ensayos en los que se agregaron receptores a macrófagos de ratón para estimular una mayor producción de intermediarios, se observó que no existía una efectiva eliminación de *Mycobacterium bovis*.<sup>42</sup> Otro ejemplo es el hierro intracelular, mientras que la disminución del hierro es regulada por mecanismos en el interior del monocito, para evitar que microorganismos como *Lysteria monocytogenes* sobrevivan en su interior, al disminuir el hierro también se pierde la activación de mecanismos microbicidas como la generación dependiente de hierro de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno.<sup>43</sup> Estos hallazgos nos invitan a considerar si el papel conocido de cada componente microbicida sirve realmente como un “arma” para la eliminación de los microbios o una “herramienta” que pudiera usar el microbio para su beneficio.

La complejidad de todos los mecanismos involucrados en la interacción hospedero-parásito, tanto en uno como en otro participante, es además

incrementada con algunos antecedentes que indican que existen al menos tres poblaciones o tipos de macrófagos: Macrófagos activados por la vía clásica, es decir activados por INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; Macrófagos activados por la vía alternativa su activación depende de IL-4 ó glucocorticoides; y Macrófagos tipo II, los cuales requieren para su activación antígenos que se unan a TLR y la estimulación del FcR mediante inmunocomplejos. Estas poblaciones poseen características muy particulares, entre algunas su capacidad de producir o no, componentes para la eliminación de los microorganismos, como los intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno. Además está establecido que según el estímulo inicial que reciben estas células pudiendo ser citocinas como INF-gamma, TNF ó IL-4, incluso los anticuerpos y los receptores celulares que son estimulados, son determinantes para que la célula adquiriera un tipo específico de funcionalidad.<sup>44</sup>

#### **2.6.3.1.1. La vía de entrada de los microbios al macrófago: Receptores celulares.**

Así como es necesario que se abra una puerta, por decirlo de esta forma a la superación del patógeno de las barreras naturales, que en el caso de *Nocardia brasiliensis* es el traumatismo, también es necesario evaluar las posibles puertas o rutas de entrada de la bacteria hacia la célula fagocítica.

La bacteria entra hacia el macrófago por fagocitosis a través de receptores de fucosa o manosa, o por medio de los receptores Fc (RFc) o a través de

receptores de complemento (RC). La entrada de la bacteria vía receptores Fc induce al interior de la célula la producción de ROI y esto debería ayudar al aumento de la resistencia hacia el microorganismo. Por otro lado, la entrada vía RC causa endocitosis en la que obviamente no se estimula la producción de los ROI lo que permitiría la supervivencia del microorganismo. Al estimular el microorganismo el proceso de fagocitosis por anticuerpos, en el interior de la célula da origen a una serie de señales que desencadenan diversos procesos en la célula, como el rearrreglo del citoesqueleto, la alteración de la permeabilidad de la membrana, la activación de mecanismos para la eliminación del microbio, la producción de quimiocinas y citocinas pro y antiinflamatorias, la activación de la apoptosis y la producción de moléculas accesorias para la presentación de antígeno así como el inicio de la respuesta inmune adquirida.<sup>45</sup>

Se conoce además que la entrada de las bacterias hacia el macrófago, puede estimular la expresión de receptores que aumenten su entrada hacia el interior celular. En el 2005 Sendide y cols investigaron si la unión de la micobacteria a los macrófagos modulaba la actividad de los receptores de superficie y si potenciaba esto el proceso de internalización de la bacteria. Ellos encontraron que efectivamente la activación del receptor CD14 por medio de fosfatidilinositol a través de TLR2 conducía al reclutamiento de un segundo receptor que actuaba en cooperación para optimizar la internalización de la bacteria.<sup>46</sup>

En otro trabajo, el análisis de expresión de los receptores en los macrófagos de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y HIV-1 indujo un aumento

en la expresión de CD14, mientras que los monocitos de pacientes sanos tuvieron una baja expresión del receptor CD11c esto indica que la expresión diferencial de los mismos, permiten una mayor entrada de *M tuberculosis* hacia el macrófago<sup>47</sup>,

#### **2.6.3.1.2. Receptores de opsoninas (Fc y RC)**

Las partículas opsonizadas por anticuerpos son acoplados por receptores en la célula que reconocen el fragmento Fc de los anticuerpos. Se conocen al menos 6 receptores Fc: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\epsilon$ RI, Fc $\epsilon$ RII y Fc $\alpha$ RI, que se agrupan en dos clases: los que contienen motivos ITAM en sus dominios intracelulares que reclutan quinasas y activan cascadas de fosforilación y los que contienen motivos ITIM que reclutan fosfatasas que inhiben señales.

A su vez, los receptores activadores pueden ser de baja (Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA) o alta afinidad (Fc $\gamma$ RI) hacia la región constante del anticuerpos. La expresión diferencial de estos receptores (inhibidores o activadores) es una llave clave para la modulación de la respuesta inmune. También se ha observado que estos receptores muestran diferencias significativas en cuanto a su afinidad a los diferentes isotipos de IgG indicando que ciertos isotipos son mayormente regulados que otros.<sup>48</sup> Se ha descrito la importancia del receptor Fc $\gamma$ RI ó (CD64) para contribuir a la protección contra infecciones bacterianas, usando ratones

Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> se demostró que la fagocitosis, la liberación de citocinas, y la presentación de antígeno se limitan.<sup>49</sup>

Se ha reportado que el receptor Fc, cuando es estimulado por complejos inmunes (anticuerpos del isotipo IgG - Antígeno) produce un aumento de IL-10, este aumento se ha delimitado hacia el receptor Fc $\gamma$ RI (o CD64), y a su vez, el aumento en IL-10 induce un incremento en la expresión de CD64. La IL-10 es un regulador directo e indirecto de la IL-12, por lo que su aumento da como consecuencia una disminución de IL-12, que como se mencionó anteriormente conduce a una disminución de IFN- $\gamma$ , favoreciendo también la supervivencia de la bacteria en el hospedero. Además este receptor también está relacionado con los procesos de fagocitosis, presentación de antígeno, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y con la liberación de mediadores inflamatorios, siendo evidente su importancia tanto en la inmunidad innata como en la adquirida.

Los macrófagos expresan receptores CR1, CR2, CR3 y CR4 para la degradación de la fracción C3 del complemento, e interaccionan con otros componentes de las vías de activación del complemento clásica, alternativa o inducida por lectinas. Se dice que CR3 es un receptor promiscuo, ya que posee otros ligandos además de iC3b, como el fibrinógeno. Su papel en la fagocitosis controlada ha sido muy estudiado y el mecanismo de ingestión mediado por CR3 difiere del mediado por los

receptores Fc. Se dice que estos receptores actúan como “entrada segura” para microorganismos.

Es conocido que para *Mycobacterium tuberculosis* existen dos principales vías para introducirse hacia los monocitos y que estas dos vías son inducidas por la bacteria para asegurar su entrada: primera; *Mycobacterium* secreta abundantes cantidades de fibronectina, lo que promueve su entrada vía los receptores de fibronectina. Segunda; *Mycobacterium* induce la activación de la fracción C3 de complemento, con lo cual la bacteria entra vía receptores de complemento. Otros estudios sobre receptores de opsoninas confirman que para *Mycobacterium tuberculosis* el receptor CR3 es la principal puerta de entrada hacia el macrófago, y que la estimulación de esta vía conduce a la endocitosis, la inhibición de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y promueve la disminución de IL-12 que es un estimulador de la producción de IFN- $\gamma$ , por lo que éste también se disminuye, siendo la consecuencia de todos estos procesos la supervivencia bacteriana.<sup>50,51</sup> Interesantemente también se ha encontrado que la IgM promueve la entrada de *Cryptococcus neoformans* a través de los receptores CR3 y CR4.<sup>52</sup> Por estos antecedentes podemos pensar que probablemente para *Nocardia brasiliensis* opsonizada por anticuerpos este receptor pueda funcionar como una puerta de entrada hacia el macrófago, que aunque le permitiría la supervivencia a la bacteria, no sabemos si este receptor pueda tener alguna preferencia por los anticuerpos IgM.

### 2.6.3.1.3. Citocinas producidas por los macrófagos en respuesta a la infección por *N. brasiliensis*.

En la caracterización de la respuesta inmune en el modelo de ratón del micetoma inducido por *Nocardia brasiliensis*, se observaron en el suero altos niveles de INF- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10 durante los primeros 4 días de infección, después de este tiempo disminuyeron los niveles de citocinas mientras que para IL-1 y TNF- $\alpha$  no se observó un aumento significativo.<sup>3</sup>

Las citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 son importantes en la eliminación de los microorganismos y en la regulación de la respuesta inmunitaria contra patógenos intracelulares. Se sabe que IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos y aumenta sus efectos bactericidas a través de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, y esto ha sido confirmado en estudios tanto in vivo<sup>53</sup> como in vitro<sup>54</sup>. En un trabajo publicado en el 2004 por Pereira y cols. se realizó un tamizaje extenso de los genes expresados en macrófagos de ratón activados con IFN- $\gamma$ . Si bien este tamizaje no fue fino, sí fue de utilidad en la confirmación de algunos de los genes implicados en la regulación de los receptores, después de la activación de los macrófagos con IFN- $\gamma$ .<sup>55</sup> Silva y Faccioli en el año de 1992 reportaron que el TNF, tiene una función en la resistencia contra la infección por *N. brasiliensis* en cepas de ratones BALB/c.<sup>56</sup>

En una investigación realizada recientemente en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario de la Autónoma de Nuevo León, se

analizó la producción de citocinas in situ en ratones BALB/c infectados con *Nocardia brasiliensis* y se encontró que en el sitio de infección se producían citocinas tanto pro como anti-inflamatorias.<sup>57</sup>

### **2.6.3.2. Papel del anticuerpo IgM en la resolución de la enfermedad por patógenos intracelulares.**

Recientemente se realizó un estudio más completo en cuanto a ensayos de protección mediante inmunización activa y pasiva, específicamente contra los antígenos p24, p26 y p61 de *Nocardia brasiliensis* y se encontró, que hubo protección parcial contra el micetoma en la inmunización activa, y protección total en inmunización pasiva con sueros hiperinmunes ricos en IgM y específicos contra los antígenos de *Nocardia*. Esta protección, además se corroboró al eliminar los anticuerpos IgM de los sueros y observar que ya no había protección contra el establecimiento del micetoma. Se descartó que esta propiedad se debiera a la acción del complemento, ya que también se observó esta protección en sueros inactivados por calor.<sup>58</sup> Además se encontró un efecto protector con esta clase de anticuerpo para la infección por Neumococo, donde se observó que este anticuerpo junto con las células B y los linfocitos T, era necesario para la protección contra la sepsis por neumococo y sugiere que IgM tiene un papel modulador en esta protección.<sup>59</sup> Para el intracelular *Criptococcus neoformans*, se ha visto que anticuerpos IgM, IgG1 e IgA específicos contra la cápsula también

protegen a ratones de contraer la enfermedad ocasionada por este microorganismo.<sup>60</sup>

Sin duda queda mucho por entender sobre el papel de este anticuerpo en la resolución de la enfermedad y si inhibe alguna función de los microbios, si ayuda a una mejor opsonización, o si la vía de entrada hacia el macrófago, a través de este anticuerpo, inducirá factores que ayuden a contener mejor y eliminar el microorganismo.

## **2.7. Usos de la proteína verde fluorescente (GFP)**

Para llevar a cabo nuestros estudios de supervivencia bacteriana, se requería utilizar el método de unidades formadoras de colonia, pero inconvenientemente de este estudio, es que *Nocardia* tiene crecimiento en filamentos, lo que no nos permitiría ver la cantidad real del crecimiento bacteriano. Por lo tanto un método más eficiente para determinar la supervivencia y el crecimiento bacteriano dentro del macrófago es la incorporación de un reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en la bacteria, que es fácilmente cuantificable mediante citometría de flujo y que ya ha sido usado con éxito para estudios de supervivencia en otras especies bacterianas.<sup>61</sup> El uso de la GFP va en incremento cada año, entre otros, se han empleado como reportero para la localización de proteínas en el interior de las células,<sup>62</sup> la identificación de genes expresados en fagosomas,<sup>63</sup> y muchos otros más usos que se han encontrado para esta proteína.<sup>64</sup>

## CAPÍTULO 3.

### JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos involucrados en la evasión microbicida del macrófago por *Nocardia brasiliensis* son poco conocidos. Se ha demostrado que los anticuerpos IgM pero no los IgG son capaces de prevenir la infección por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c. Por lo tanto, es importante estudiar su efecto en la infección del macrófago in vitro.

## **CAPÍTULO 4.**

### **OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

**Evaluar el efecto in vitro de los anticuerpos policlonales IgM e IgG anti-*Nocardia brasiliensis* en la resistencia a la infección en macrófagos.**

#### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Construir una cepa recombinante de *N. brasiliensis* ATCC700358 que exprese la proteína verde fluorescente.**
- 2. Evaluar la virulencia de la cepa *N. brasiliensis* GFP mediante la inducción de micetoma.**
- 3. Comparar el índice de fagocitosis de *N. brasiliensis* opsonizada con sueros IgM y sueros IgG policlonales anti-*Nocardia*.**
- 4. Cuantificar y comparar la producción de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12, en respuesta a la infección del macrófago por *N. brasiliensis* opsonizada con anticuerpos policlonales IgM o IgG.**

## CAPÍTULO 5.

### ESTRATEGIA GENERAL

Para la estrategia general se siguió el proceso que se esquematiza en la figura 1. El primer objetivo específico consistió en desarrollar un plásmido portador de la proteína verde fluorescente e introducirlo a *Nocardia brasiliensis* ATCC700358 y así tener una cepa con la proteína verde fluorescente para la medición de la viabilidad bacteriana. En el segundo objetivo, una vez modificada la cepa de *Nocardia* se evaluó la persistencia de la virulencia mediante la inducción de micetoma en ratones BALB/c, además se hicieron ensayos de fagocitosis y citocinas. El tercer y cuarto objetivo consistieron en infectar macrófagos de la línea celular J774 de ratón con *Nocardia brasiliensis* sin opsonizar u opsonizada con anticuerpos IgM o IgG y medir la cinética de producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  así como el índice de fagocitosis con las diversas condiciones.

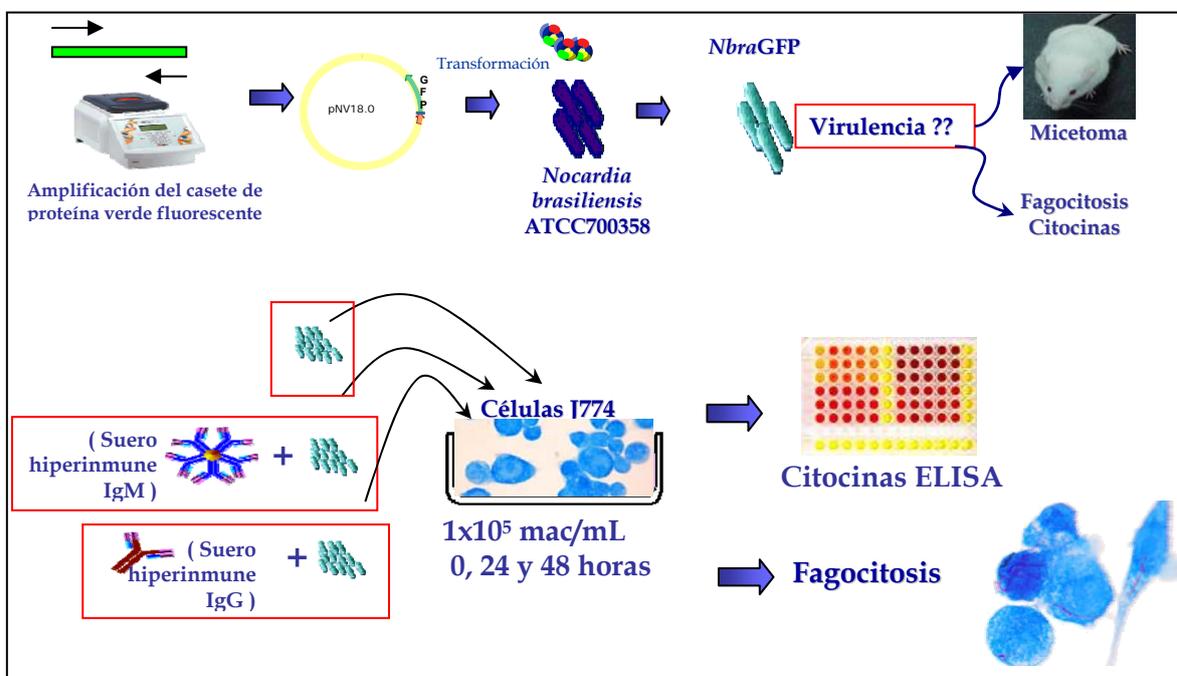


Figura 1. Esquema de la Estrategia general.

## CAPÍTULO 6.

### MATERIALES

#### 6.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los diferentes juegos de iniciadores para amplificar los productos de interés, se adquirieron de las compañías SIGMA GENOSYS (Woodlands, Tx) y de Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT Coralville, IA). Para los cultivos de células se usaron los medios RPMI y D-MEM o Dubelcco's Modified Eagle's Medium, aminoácidos no esenciales y suero bovino fetal (Gibco, EUA), Penicilina G y estreptomycin (SIGMA), para los cultivos bacterianos: medio Luria Bertani o LB de SIGMA, medio enriquecido de infusión cerebro corazón o BHI de DIFCO (Detroit, MI, EUA). Además se usaron los siguientes reactivos: alcohol isopropílico, alcohol etílico absoluto, metanol de J.T.BAKER (Phillipsburg NJ., EUA). Aceite mineral, acetato de sodio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, agar, agarosa, bisacrilamida, B-mercaptoetanol, cloruro de calcio, dimetilsulfóxido, EDTA, glicerol anhidro, glucosa, hidróxido de amonio, TEMED, persulfato de amonio de SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, EUA). Azul de Coomassie de BIO-RAD (Hercules, CA. EUA). Leche svelty de NESTLE. Tubos para gradientes de la marca Beckman. Cámaras Lab-Tek™ Chamber Slide™ System de 4 pozos de NUNC.

## 6.2 Biológicos.

Las enzimas Taq DNA polimerasa, T4 DNA Ligasa y de restricción se adquirieron de la compañía New England Biolabs (NEB, Beverly MA, EUA). El anticuerpo CD11b de CALTAG Laboratorios (Carlsbad CA EUA), el kit de citocinas ELISA Ready-SET-Go para TNF- $\alpha$  e IL-12, de eBIOSCIENCE. El plásmido pNV18.1 fue donado por el Dr Jun Ishikawa (Universidad de Tokio Japón). El plásmido pRU1701 fue adquirido de la compañía ADGENE Cambridge MA EUA. y las células electrocompetentes™ TOP10OR del estuche TOPO®XL-PCR Cloning de Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA). La cepa de *Nocardia brasiliensis* ATCC 700358 con la que se trabajó, fue aislada de un paciente con actinomicetoma y confirmada taxonómicamente por June Brown en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades En Atlanta, GA, EUA y por Patrick Boiron en el Observatorio Francés para la Nocardiosis. Se usó la línea celular J774A.1 designada por la ATCC con la clave ATCC TIB-67.

Parte de los ensayos de esta tesis se realizaron con cepas de ratones BALB/c de 8 a 10 semanas de edad se mantuvieron a un temperatura entre 20 y 25 °C con agua estéril y alimento para roedores.

## 6.3 Equipo.

Se emplearon los siguientes equipos y aparatos: Fluorómetro Versa Fluor de Biorad y filtros de Excitación 485-495 nm y Emisión 515-525 nm de la misma marca microondas marca Goldstar, potenciómetro modelo 420A marca ORION, mechero

fisher 1201-21, pipeteador Pipet-aid Drumond Scientific Co., plancha de calentamiento marca CORNING PC-35, baño seco Thermolyne Type 17600 Dry-Bath, electroporador BIO-RAD Pulse Controller Plus Gene pulser II, Incubadora con CO<sub>2</sub> InCuSafe modelo MCO-18AIC marca SANYO, campana de seguridad SterilChemGARD II Advance Modelo SG403TX marca The Baker Company, campana de seguridad clase II Labcono Purifier class II, Microscopio óptico marca Zeiss con hasta 100 aumentos, refrigerador-congelador General Electric, fuente de poder Gibco BRL Electrophoresis Power Supply Model 250, termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller, M.J. Research, Inc. Para los gradientes se usó una centrífuga de columpio refrigerada modelo TJ-6 marca Beckman, se usó además una centrífuga refrigerada modelo 5417R Eppendorf , centrífuga modelo 5403 también de la marca Eppendorf, concentrador vacío modelo 5301 Eppendorf, congelador de -80 °C modelo VIP Series de SANYO, Horno de microondas modelo MS-1144DP marca LG, transiluminador UV modelo T1201 de la marca SIGMA-ALDRICH, un sistema purificador de agua EASYpure II RF, balanza analítica modelo SA210 marca Scientech.

#### **6.4 Programas computacionales.**

Para la digitalización y el análisis de los geles se utilizaron los programas GEL DOC 1000/PC y Gelpro32 analyzer de BIO-RAD (Hercules, CA. EUA). Los programas utilizados vía INTERNET fueron: Entrez NCBI (National Centre for

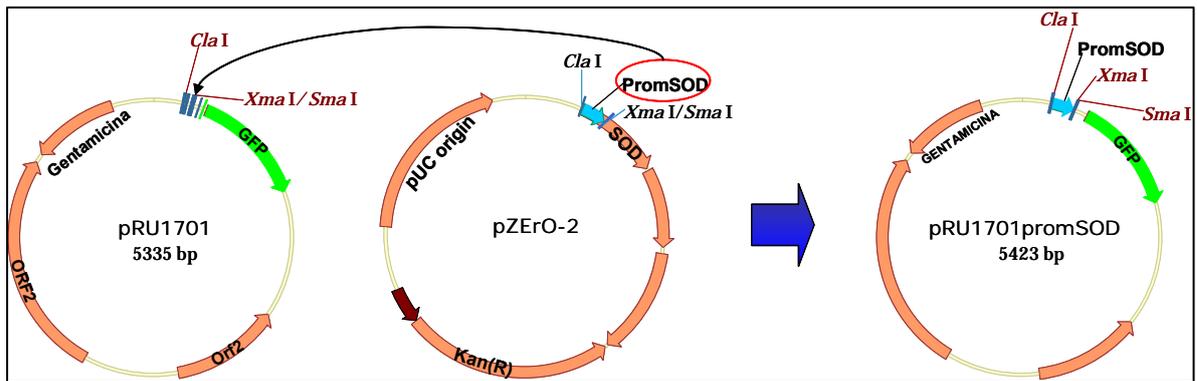
Biotechnology Information), BLAST Network Service (Blaster), Gen Bank (ICGEB, Trieste, Italia), CLUSTALW, para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism IV, el programa utilizado para comunicación en la red fue Microsoft Internet Explorer 6.0. El procesador de texto utilizado fue Microsoft Word XP Home Edition (Microsoft Corporation) y el procesador gráfico fue Microsoft Photo Editor (Microsoft Corporation).

## CAPÍTULO 7.

### METODOLOGÍA

#### 7.1. Construcción de un plásmido con el promotor de la Superóxido Dismutasa de *N. brasiliensis* y la GFP.

Se buscó tener un plásmido portador de la GFP que estuviera dirigido por un promotor que *Nocardia* pudiera reconocer y así transcribir el gen de interés. Se iniciaron las construcciones plasmídicas ensamblando tres partes esenciales: el gen de la GFP, un origen de replicación y un promotor reconocible para *Nocardia brasiliensis*. Se adquirió el plásmido comercial pRU1701, que es portador del DNAC para la GFP, esta secuencia ya ha sido modificada para emitir fluorescencia 130 veces mayor que la proteína verde original<sup>65</sup>. También se trabajó con el plásmido pNV19.1 que contiene un origen de replicación para *Mycobacterium* y con el cual el Dr. Ishikawa (quien amablemente donó la construcción plasmídica) logró transformaciones exitosas en *Nocardia farcinica*. La primer construcción que se realizó fue incluir el promotor de la Superóxido dismutasa (SOD) de *Nocardia brasiliensis*, río arriba del gen de la GFP. La secuencia de la SOD fue obtenida en la tesis de Doctorado de Marisol Espinoza R.<sup>66</sup>, la estrategia se describe en la figura 2, en donde se agrega además los sitios de restricción que se emplearon.



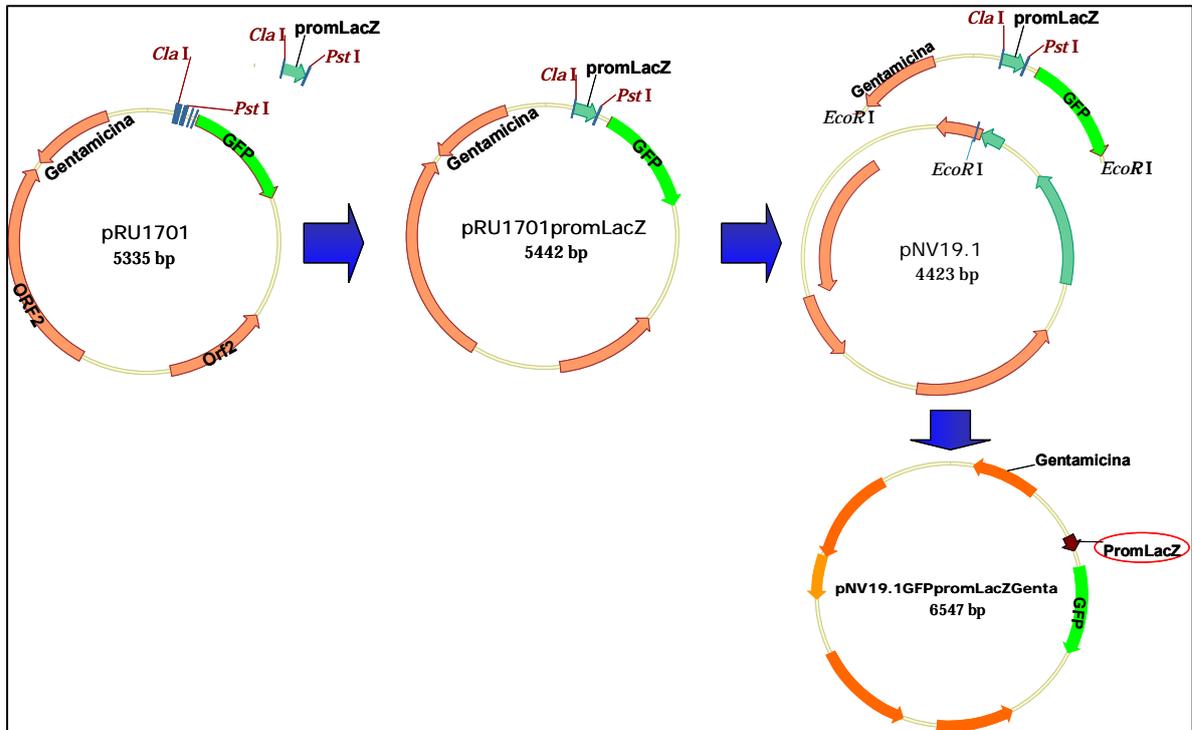
**Figura 2. Estrategia de clonación para el promotor SOD.** Estrategia de clonación para obtener un plásmido portador de la GFP con un promotor de SOD de *Nocardia brasiliensis*.

La construcción pRU1701SOD se usó para transformar en la cepa calcio competente de *E.coli* TOP10. Se crecieron las bacterias transformadas en placas con agar LB-kanamicina a 37°C por 18-20 horas. Se esperaba ver colonias fluorescentes al colocarlas en la lámpara de luz UV, pero no lo observamos, de modo que crecimos colonias de las obtenidas en la transformación en medio LB líquido y esperamos 24 horas a un crecimiento visible de la biomasa bacteriana. Centrifugamos la biomasa y la colocamos en la lámpara de luz UV para visualizar pero no se observó la fluorescencia. En el análisis de la secuencia se identificó la falta de un segmento río arriba del promotor probablemente necesario para su reconocimiento.

## 7.2. Construcción promotor LacZ-GFP y promotor gentamicina-GFP.

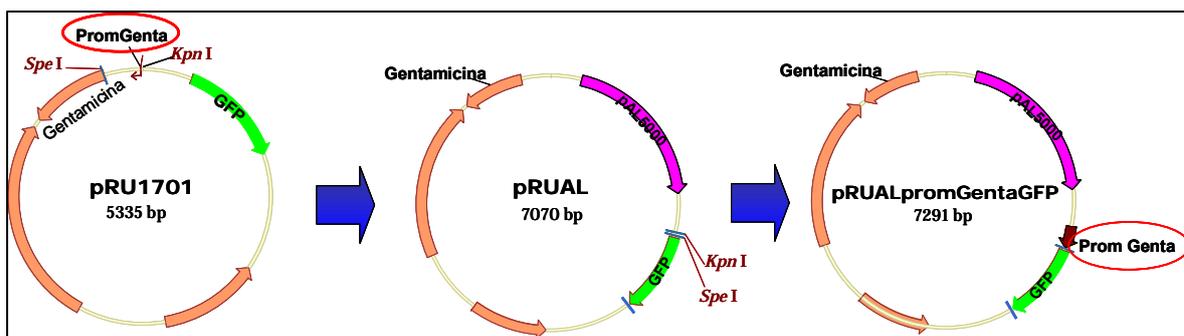
Para obtener una construcción exitosa que tuviera un promotor que dirigiera la transcripción del gen de la GFP se trabajó con otros dos promotores disponibles en el laboratorio; el promotor LacZ de *E.coli* y el promotor de

gentamicina. En las figuras 3 y 4 se describe esquemáticamente la estrategia que se siguió para las construcciones y los sitios de corte e inserción de los fragmentos clonados.



**Figura 3. Estrategia de construcción para el promotor LacZ.** Estrategia de construcción del plásmido portador del promotor LacZ de *E. coli* y la GFP.

En un trabajo previo en nuestro laboratorio se obtuvieron transformaciones exitosas de *Nocardia brasiliensis* con una modificación del plásmido pRU1701 (plásmido pRUAL) y se obtuvieron colonias resistentes a la gentamicina, por lo que el uso del promotor de este gen representó un buen candidato para que dirigiera la transcripción de nuestro gen de la GFP. (Ver figura 4).



**Figura 4. Estrategia de construcción para el promotor de gentamicina.** Estrategia de construcción que se realizó a partir del plásmido pRUAl para la incorporación del promotor de gentamicina a la GFP.

Para todas nuestras amplificaciones se usaron condiciones estándar para PCR que se muestran en el cuadro 1 Y 2 y los primers usados para las amplificaciones se muestran en el apéndice A.

**Cuadro 1.** Programa para la amplificación de los promotores SOD, LacZ y gentamicina.

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1. Desnaturalización inicial	95	5 min
2. Desnaturalización	94	40 seg
3. Apareamiento	60	1 min
4. Extensión	72	1 min
5. Ir al paso 2, 28 ciclos		
6. Extensión prolongada	72	7 min

**Cuadro 2.** Condiciones de PCR para la amplificación de los promotores SOD, LacZ y gentamicina.

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
Buffer 10X	5 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 $\mu$ l	2 mM
dNTP's (10 mM)	1.5 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Primer 1 (100 mM)	2 $\mu$ l	200 pmol
Primer 2 (100 mM)	2 $\mu$ l	200 pmol
Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	2.5 U
H <sub>2</sub> O	36.5 $\mu$ l	----
DNA	0.5 $\mu$ l	----
Volumen final	50 $\mu$ l	----

Finalmente se transformaron bacterias calcio-competentes de *E. coli* TOP 10 con los plásmidos obtenidos, para ver la expresión de la fluorescencia para corroborar la funcionalidad de los promotores. En la figura 5 se muestran las dos construcciones que se crecieron en biomasa para ver en el transiluminador de luz UV y evidenciar la producción de la proteína verde fluorescente (Figura 8 en resultados).

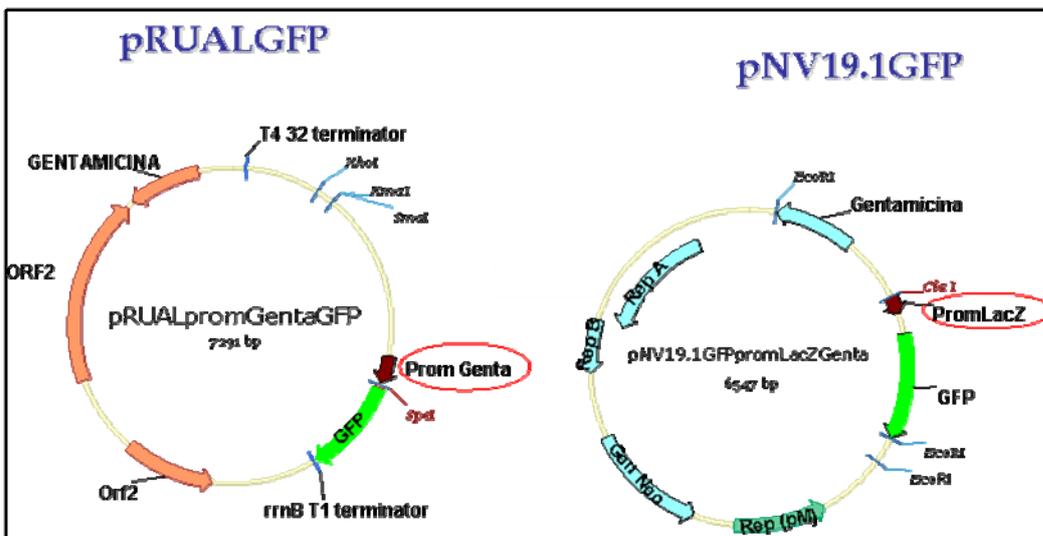
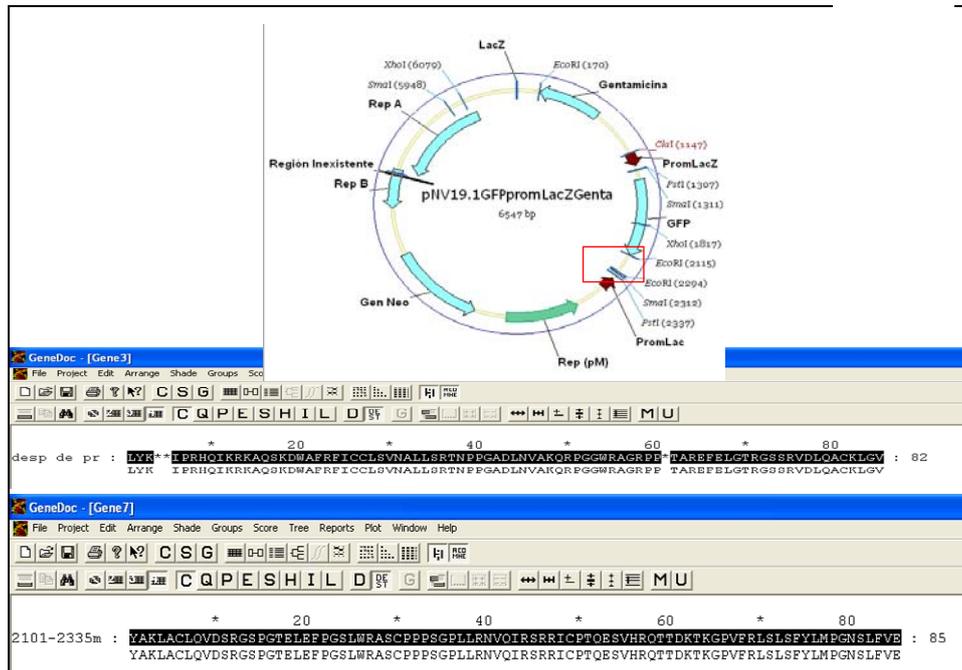


Figura 5. Construcciones de los promotores de gentamicina, LacZ y la GFP. Plásmidos portadores de los promotores de gentamicina y LacZ y de la Proteína verde fluorescente (GFP).

### 7.2.1. Análisis de la secuencia del promotor LacZ de *E. coli*.

Como se puede observar más adelante en los resultados, una de las construcciones no expresaba la GFP por lo que se hizo un análisis en el programa GENDOC con el cual se encontró un transcrito reverso o inverso a la secuencia (ver figura 6) que pudiera estar bloqueando la expresión de la GFP, por lo que se continuaron los ensayos con el plásmido que si estaba expresando la GFP.



**Figura 6. Análisis de la secuencia del plásmido con el promotor LacZ.** En el cual se observa que se está produciendo un transcrito reverso que pudiera estar bloqueando el transcrito (mRNA) de la secuencia de la GFP y por lo tanto no hay expresión (ver en detalle la figura en la secuencia 2101-2335 en la cual no hay un codón stop para la secuencia promovida por el promotor LacZ inferior).

### 7.3. Condiciones de cultivo y almacenaje para *N. brasiliensis* ATCC700358

Se tomó una alícuota de *N. brasiliensis* almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se inoculó en un matraz con medio BHI y gentamicina a una concentración de  $26\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , se dejó incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  sin agitación por 72 horas. Al término de ese tiempo se decantó el medio líquido y se arrastró la masa bacteriana con solución salina estéril, para posteriormente centrifugar en un tubo falcon de 50 ml a 3500 rpm 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 10 ml de solución

salina estéril y se disgregó (con ayuda de un homogenizador manual de vidrio dounce) hasta obtener una suspensión homogénea de aspecto lechoso. Esta suspensión se transfirió a un tubo falcon de 50 ml. Este proceso fue usado para los ensayos de infección de ratones, para los ensayos de separación de las formas bacterianas (con percoll), así como para el almacenaje de alícuotas de la cepa bacteriana. En este último proceso, la masa bacteriana homogenizada se lleva a centrifugación nuevamente, se descartó el sobrenadante, se agregó BHI con gentamicina a una concentración de 26 µg/ml mas glicerol al 40% y se guardaron alícuotas de 1ml a -80 °C.

#### **7.4. Transformación de *N. brasiliensis*.**

Para la transformación de *Nocardia brasiliensis*, se obtuvo el homogenizado descrito anteriormente y la masa bacteriana fue lavada en agua miliQ estéril en vez de solución salina, y centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C y finalmente resuspendida en solución de electroporación (glicerol al 10% en agua miliQ estéril). De esta mezcla se tomaron 90 µl y se pusieron en una celda para electroporación enfriada previamente y se agregaron 5 µg de DNA plasmídico, se procedió a la electroporación y una vez dado el pulso eléctrico se pasó esta mezcla a un tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía 800 µl de medio BHI estéril. Este tubo fue incubado por 18 horas a 37° C y con agitación suave. Posteriormente se centrifugó el tubo a 1200 rpm por 5 minutos desechándose posteriormente a esto la parte del sobrenadante, y se resuspendió en aproximadamente 200 µl que

fueron plaqueados en cajas con agar BHI más gentamicina a 26 µg/ml e incubados a 37 °C por 4 días. Se levantaron colonias resistentes a gentamicina y que emitían fluorescencia al ponerlas al transiluminador de luz UV.

#### **7.5. Obtención de extracto de proteínas de la cepa *N. brasiliensis* GFP.**

Para la obtención de proteínas intracelulares de *Nocardia* se llevó a cabo lo siguiente: Se inoculó con la cepa de *N. brasiliensis* un matraz erlenmeyer de 1 litro con 200 ml de medio BHI estéril y gentamicina 26 µg/ml y se dejó creciendo por 1 semana a 37 °C y sin agitación. Al término de este tiempo se recolectó la masa bacteriana que además fue lavada con agua destilada estéril. La masa fue posteriormente deslipidizada con una mezcla de etanol-éter en las proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y se dejó en un refractario de vidrio por 18 horas hasta la evaporación completa del solvente. La masa bacteriana deslipidizada fue pesada y colocada en un mortero donde se agregó el mismo peso de la masa en polvo de vidrio y se maceró por una hora. La mezcla se pasó a un tubo falcon de 50 ml y se agregaron 45 ml de buffer de extracción que contiene Tris-HCL 0.1M y acetato de magnesio 0.1M, para dejarse agitando por 18 horas a 4° C. Esta mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos y este paso de extracción se repitió en 3 ocasiones más. Todos los volúmenes del sobrenadante recolectado (aproximadamente 135 ml) se colocaron en membranas de poro de exclusión de 10,000 daltones y se dializaron con agua destilada para la eliminación de sales.

El medio dializado fue almacenado en alícuotas y guardado a -20° C hasta su uso. Se corrió un gel SDS-PAGE del 8-18% y fue teñido con azul de Coomassie para corroborar la presencia de proteínas.

#### **7.6. Producción de sueros de policlonales IgM e IgG anti-*N. brasiliensis* en ratones BALB/c**

Para la producción de anticuerpos policlonales de IgM e IgG anti-*Nocardia* se inmunizaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad en el cojinete plantar con bacterias homogenizadas (de la cepa modificada y también de la cepa sin modificar) y ajustadas a  $1 \times 10^7$  bacterias/ml y muertas por calor (esterilización a 121° C y a 20 psi por 15 minutos). A los 7 días de la inmunización los animales fueron sangrados del plexo retroorbitario. A los 15 días post-inmunización los ratones fueron re-inmunizados con bacterias muertas por calor y a los 21 días se sacrificó a los ratones recolectando la sangre por punción cardiaca. Todos los sueros fueron filtrados con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , inactivados por calor a 56 °C por 30 minutos y almacenados a -20 °C hasta su uso. Para demostrar la producción de anticuerpos del tipo IgM (en el suero de 7 días) y anticuerpos del tipo IgG (en el suero de 21 días) anti-*N. brasiliensis* se realizó un Western blot y las tiras se revelaron con dichos sueros.

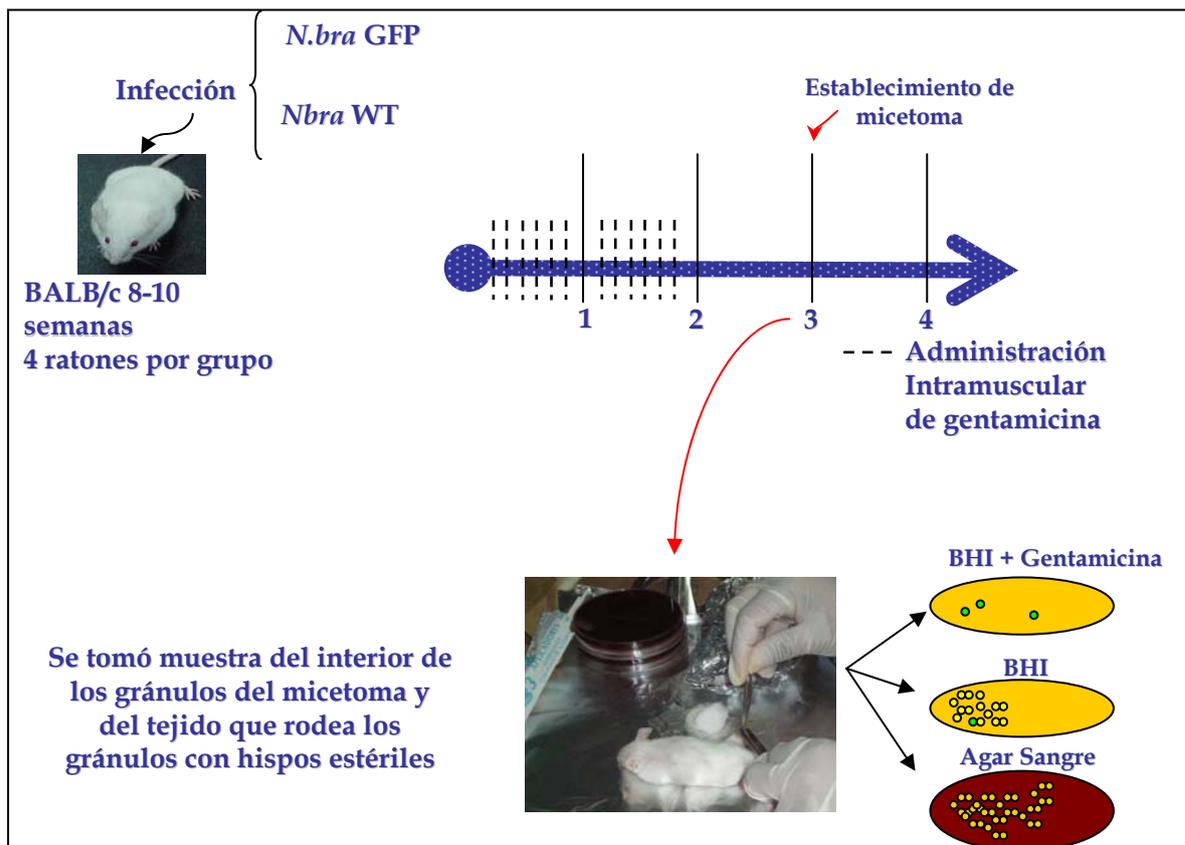
### **7.7. Protocolo para preparar la suspensión de *N. brasiliensis* (filamentos) para la infección de macrófagos.**

Para los ensayos de infección con formas filamentosas de *N. brasiliensis*, se tomó la metodología desarrollada por el Dr H. Treviño en su tesis doctoral<sup>67</sup> que consistió en hacer lavados del cultivo de 72 horas de *Nocardia brasiliensis* con solución de PBS IX y posteriormente se homogenizó con el dounce (aproximadamente 10-15 ml). Esto se llevó a un volumen de 30 ml (con PBS IX) y se dejó sedimentando por 10 minutos. Después de sedimentar se obtuvo un sobrenadante que se transfirió a otro tubo y se centrifugó a 780 rpm por 10 minutos, el sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo (repetir el paso). El sobrenadante se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se llevó a centrifugación nuevamente a 200g por 15 minutos. El sobrenadante se mezcló con glicerol llevándolo a una concentración final de 20% de glicerol y se realizaron alícuotas de 1 ml, guardándose a -80 °C hasta su uso. Para verificar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) se hicieron diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024). Se pusieron 500 µl de PBS y se agregaron 500 µl de la alícuota almacenada a -80 °C (con esto se obtiene la dilución 1:1). Se tomaron 500 µl de la anterior dilución para agregarlos a otro tubo que contiene 500 µl de PBS (con esto se obtiene la dilución 1:2) y así sucesivamente hasta la última dilución. Se tomaron 100 µl de cada dilución para sembrarse en agar sangre y así tener una cuantificación aproximada del número de UFC por tubo.

La segunda opción para ver el número de bacterias fué llevar a una dilución 1:100 (la suspensión obtenida del último centrifugado) con PBS 1X y se agrega 1:1 colorante de contraste como carbol fucsina ó azul de metileno. Se colocan en la cámara de Neubauer 10  $\mu$ l de esta mezcla y se hizo la cuenta de bacterias por cuadro. Se realiza un promedio de las bacterias contadas por cuadros para dividir entre  $2.5 \times 10^{-7}$ . Con este cálculo se obtuvieron las bacterias por ml de la suspensión homogénea obtenida. Para realizar la cuenta de bacterias de una forma más sencilla, se tomaron fotos de los cuadros de la cámara y el conteo se llevó visualizando las bacterias en el programa Paint de Windows marcando las bacterias contadas mediante puntos.

#### **7.8. Ensayos de virulencia de la cepa modificada de *N. brasiliensis* en ratones BALB/c.**

Se trabajó con 2 grupos de 4 ratones BALB/c de 8-10 semanas, para ver la inducción de micetoma por la cepa modificada, se inyectaron 100  $\mu$ l de homogenizado de *Nocardia brasiliensis* GFP y de *Nocardia brasiliensis* sin modificar correspondiente a  $1 \times 10^7$  UFC en el cojinete plantar del ratón y se midieron los milímetros de inflamación cada semana hasta la formación del micetoma en el cojinete plantar del ratón. En los grupos infectados con la cepa modificada, se administró gentamicina en 3mg/ml en el sitio de la infección, para inducir la retención de plásmido en la cepa modificada (Ver figura 7).



**Figura 7. Verificación de virulencia de la cepa modificada.** Se evaluó la virulencia mediante el establecimiento de micetoma. Se trabajó con grupos de 4 ratones BALB/c. Se hicieron 3 experimentos por separado.

### 7.8.1. Verificación de la presencia de plásmido en la cepa modificada.

Se realizó una extracción plasmídica (protocolo anteriormente descrito en la construcción de los plásmidos portadores de la GFP) de la cepa modificada antes y después de la inducción del micetoma, para ver la presencia del plásmido o ver si la secuencia había sido incorporada en el genoma de la bacteria.

### 7.9. Preparación de suspensión unicelular de *N. brasiliensis* GFP.

Se preparó un gradiente de percoll a diferentes porcentajes desde el 100 hasta el 10%, observándose que en el porcentaje más bajo se obtenía una suspensión unicelular homogénea. Se prepararon 8 ml de percoll al 10%, poniendo 0.72 ml de percoll en 7.2 ml de agua destilada estéril y con 0.08 ml de glucosa 2.5M y esta solución se depositó en tubos estériles especiales para gradientes. A partir de un cultivo de 72 horas de *Nocardia brasiliensis* GFP se preparó una suspensión homogenizada con el dounce por 10 minutos. La suspensión se dejó reposar por 10 minutos para tomarse del sobrenadante 8 ml que fueron depositados cuidadosamente en la parte superior de la solución de percoll al 10%. El tubo se centrifugó a 3000 rpm por 40 minutos en una centrífuga de columpio. Después de transcurrido el tiempo de centrifugación, la muestra se recolectó con una jeringa estéril y se depositó aproximadamente 300 µl en tubos eppendorf de 2 ml. Se realizaron lavados a los tubos agregándose 5 volúmenes de solución salina estéril a cada tubo, se mezclaron varias veces por inversión. Los tubos se centrifugaron a 2936 rpm por 10 minutos, se tiró el sobrenadante y se repitió el lavado una vez mas pero con PBS 1X, y se dejó en un volumen de aproximadamente 300 µl, el cual contenía la suspensión de bacterias unicelulares.

Para cuantificar las bacterias obtenidas, se preparó una mezcla 1:1 de la suspensión bacteriana unicelular y carbol fucsina y esto se llevó a la cámara de Neubauer donde se contaron las bacterias presentes en la solución y se siguió el procedimiento descrito en el punto 7. 7.

### **7.10. Manejo de la línea celular J774**

Se trabajó con la línea celular de macrófagos de ratón J774 denominada ATCC TIB-67. Esta línea celular fue producida a partir de células de cavidad peritoneal de ratones BALB/c. La línea celular se cultivó y fue expandida en medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina, HEPES 0.25 mM y suero bovino fetal al 10%. Una vez que llegó a confluencia, las células fueron suspendidas en DMEM con L-glutamina, suero bovino fetal al 10% y DMSO al 5%. Se hicieron alícuotas de  $1 \times 10^6$  células por ml y se congelaron a  $-80$  °C hasta su uso.

### **7.11. Ensayos de fagocitosis**

Para la realización de los ensayos de fagocitosis se utilizaron macrófagos, los cuales fueron: 1) de la línea celular J774 (descrita arriba). 2) Macrófagos de cavidad peritoneal de ratones BALB/c.

A partir de un vial de la línea celular J774 almacenado a  $-80$  °C, se descongeló el vial y se centrifugaron las células a 1300 rpm por 5 minutos y se hicieron dos lavados con DMEM y suero bovino fetal al 10%. Posterior a esto se depositaron las células en frascos de  $25 \text{ cm}^2$ , hasta llegar a confluencia, para luego pasarse a frascos de  $75 \text{ cm}^2$ . Para la obtención de macrófagos de cavidad peritoneal se utilizaron ratones BALB/c de 10 semanas de edad, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente se retiró la piel del abdomen y se introdujeron 8 ml de medio RPMI estéril para enjuagarse la cavidad

peritoneal. Se hicieron masajes al abdomen del ratón por aproximadamente 1 minuto para desprender los macrófagos. Se introdujo una jeringa estéril al abdomen para retirar el medio RPMI inyectado y se depositó este líquido que contenía las células, en placas de vidrio dejándose reposar por 2 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se quitó el sobrenadante y se puso medio RPMI con suero bovino fetal al 10% y se dejaron reposar las células por 12 horas. Las células fueron colocadas en placas de cultivo de 12 pozos, a las que previamente se acondicionó con cubreobjetos estériles depositados en el fondo y se agregaron 4x10<sup>5</sup> células por pozo. También se trabajó con cámaras Lab-Tek™ Chamber Slide™ System de 4 pozos, poniéndose en éstas 1.5 x 10<sup>5</sup> células por pozo.

Los ensayos de infección se realizaron con una proporción macrófago-bacteria 1:3 y se dejaron incubar por 1 hora a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, se hicieron dos lavados con PBS 1X para retirar las bacterias no fagocitadas. Se hizo un último lavado con solución salina al 0.5% y se dejaron secar los cubreobjetos al aire. Se fijaron los cubreobjetos con metanol absoluto y se dejaron secar para teñirse posteriormente con Kinyoun.

Para medir el índice de fagocitosis se contaron 200 células (en diferentes campos) y se sacó el porcentaje de las células con bacterias en el interior y se multiplicaron por el promedio del número de bacterias dentro de éstas células.

### **7.12. Ensayos *in vitro* de infección de macrófagos con la forma filamentosa de *N. brasiliensis*.**

Para los ensayos de infección se trabajó en placas de cultivo de 12 pozos con  $4 \times 10^4$  células por pozo e infectándose con una proporción de bacterias 1:40 de la suspensión unicelular y 1:3 de la suspensión de filamentos. Las placas fueron adaptadas con cubreobjetos cortados, lavados y esterilizados, depositados al fondo de las placas. Las bacterias unicelulares y las filamentos fueron opsonizadas 30 minutos previos a la infección con 20  $\mu$ l de suero (aproximadamente volumen 1:1 respecto al volumen en el que se resuspendieron las bacterias en PBS) e incubados a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los macrófagos fueron infectados con las bacterias opsonizadas, y se incubaron por una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al término del tiempo se hicieron dos lavados con PBS 1X para eliminar las bacterias no fagocitadas. Después se agregó medio DMEM y se dejaron las células hasta 24, 48 y 72 horas. Al término de los tiempos elegidos, se recolectaron los sobrenadantes en tubos eppendorf y se centrifugaron a 1300 rpm. Se colocaron los sobrenadantes en nuevos tubos y se guardaron en -80 °C. Estos sobrenadantes se usaron para medir posteriormente las citocinas mediante un kit comercial. Por otra parte, los cubreobjetos del fondo del pozo fueron lavados con solución salina al 0.5% y posteriormente procesados como se describió en los ensayos de fagocitosis.

Para los ensayos preliminares de citometría, se usaron placas de 12 pozos, sin cubreobjetos. Una vez que se retiró el sobrenadante de los pozos, se hicieron 2

lavados con PBS 1X para recuperar la monocapa de células adherentes las cuales se depositaron en tubos para citometría.

#### **7.12.1. Tinción Kinyoun**

Los cubreobjetos con los macrófagos infectados fueron secados al aire y fijados con metanol al 100%. Posteriormente se tiñeron de la siguiente manera:

1. Se agregó al cubreobjetos carbol fucsina por 7 minutos.
2. Se enjuagó al chorro de agua.
3. Se destiñeron brevemente en etanol al 50% y se enjuagó inmediatamente al chorro de agua.
4. Se agregó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% por un minuto y se enjuagó al chorro de agua.
5. Se agregó azul de metileno por 1 minuto y se lavó al chorro de agua.

#### **7.12.2. Medición de citocinas por ELISA**

Las citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  fueron medidas con reactivos comerciales siguiendo las especificaciones del kit comercial para ELISA de eBiosciences.

#### **7.13. Ensayos en citometría para expresión de la GFP y CD11b.**

Para medir la expresión del receptor CD11b y la GFP, las células obtenidas del ensayo de infección (resuspendidas en PBS 1X) se centrifugaron a 1300 rpm

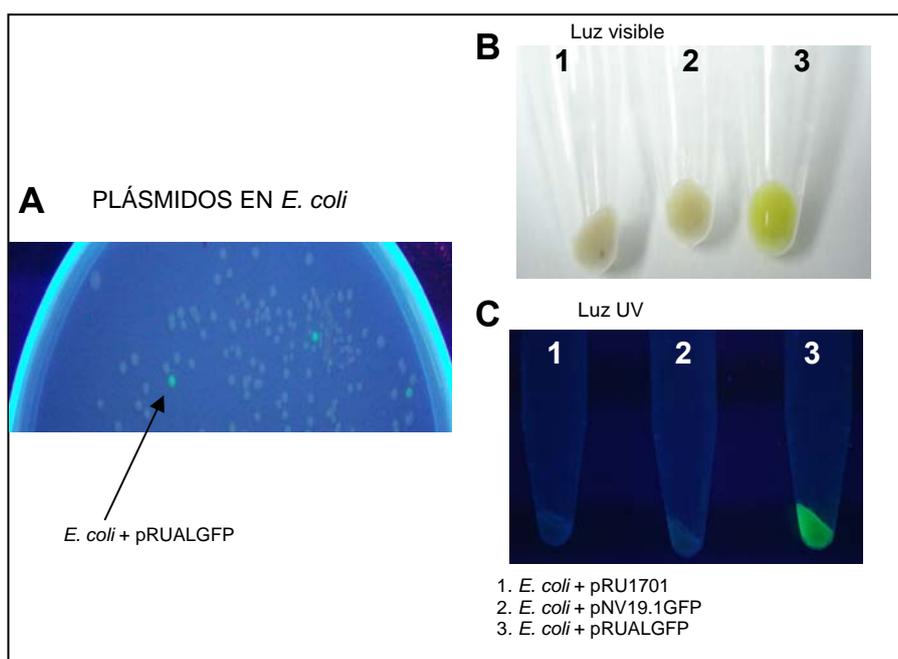
por 5 minutos. Se decantaron, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron en las mismas condiciones. A la pastilla obtenida se agregó 1  $\mu$ l del anticuerpo CD11b (CATLAG) y se dejó incubar 1 hora a 4 °C, en oscuridad. Después de este tiempo se hicieron dos lavados con 2 ml de PBS 1X para retirar el anticuerpo no unido y se resuspendió la pastilla en 500  $\mu$ l de PBS 1X y 5  $\mu$ l de formaldehído al 2% hasta su procesamiento en el citómetro.

## CAPÍTULO 8.

### RESULTADOS

#### 8.1 Construcción del plásmido y expresión de la fluorescencia en *Escherichia coli*.

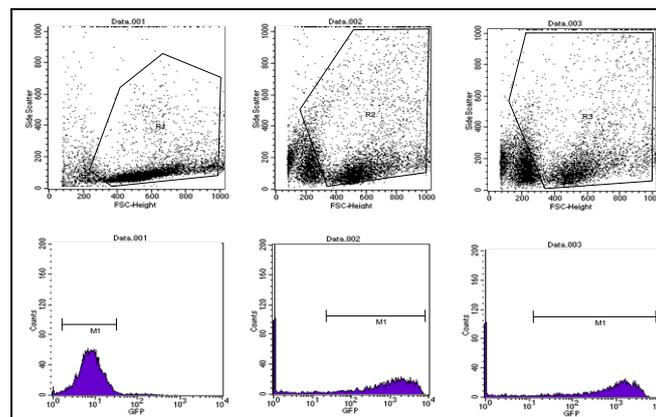
Los plásmidos construidos fueron transformados primeramente en *E. coli* para verificar si la proteína fluorescente se producía y visualizar la intensidad de su fluorescencia. Se levantaron colonias candidatas de los plásmidos construidos y se crecieron en medio líquido para obtener biomasa suficiente y corroborar fluorescencia en el transiluminador (Figura 8).



**Figura 8. Colonias candidatas que expresan la GFP. A)** Colonias candidatas que expresan la GFP. **B)** Masa bacteriana de las clonas candidatas construídos con los dos plásmidos, Como puede verse el tubo 3 portador del promotor de resistencia a la gentamicina, posee una coloración verde aún en luz visible, lo cual es correcto de acuerdo a la versión de GFP con la que se esta trabajando. **C)** Visualización de la fluorescencia en el transiluminador de luz UV.

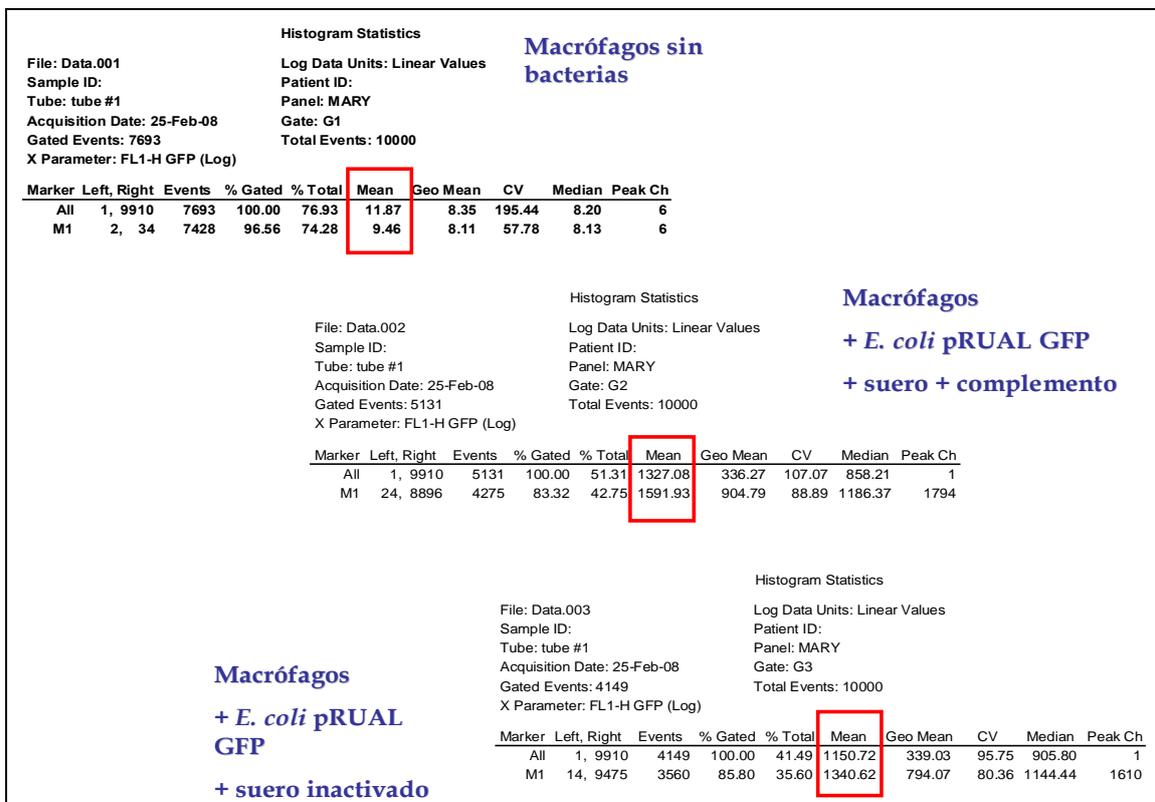
## 8.2. Prueba de fagocitosis para evidenciar la fluorescencia de la GFP en el interior del macrófago.

Para asegurarnos que la GFP expresada por la bacteria era lo suficientemente fuerte para ser detectada dentro de los macrófagos después de la fagocitosis, se realizó un ensayo de citometría. En este ensayo se demostró que las macrófagos que fagocitaron las bacterias fluorescentes, presentaban fluorescencia en el rango detectable para la GFP. En la figura 9 se observa la selección de la población de macrófagos y el aumento en la intensidad de la fluorescencia de los macrófagos que fagocitaron bacterias.



**Figura 9. Citometría de Flujo para la GFP.** Citometría de Flujo de la fagocitosis de macrófagos retados con la cepa de *E.coli* TOP10 que posee el plásmido con el promotor de la gentamicina y la GFP. En la parte superior selección de la población de macrófagos y en la inferior la medida de la intensidad de fluorescencia en la que se observa el aumento de la fluorescencia en el canal de detección de la proteína verde fluorescente, en las células que fagocitaron las bacterias fluorescentes.

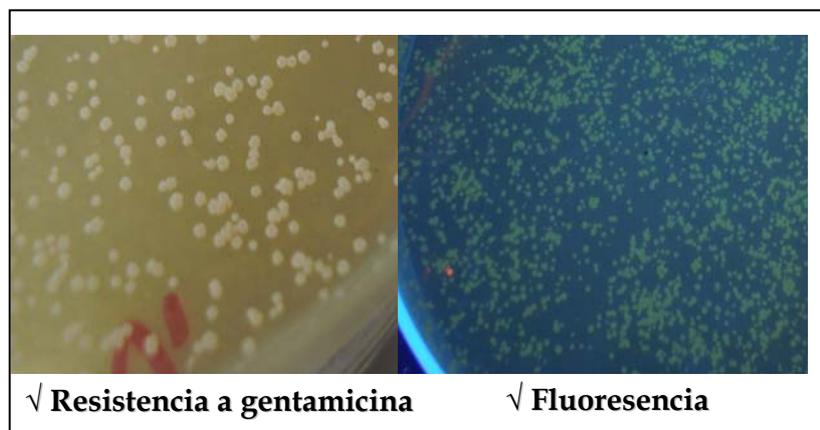
La figura 10 presenta una imagen de las gráficas obtenidas por el citómetro de flujo, el cual arroja datos precisos del aumento de la fluorescencia de los macrófagos que fagocitaron las bacterias fluorescentes. La emisión de fluorescencia es hasta 100 veces mayor que la emitida por los macrófagos que no fueron retados con bacterias.



**Figura 10. Análisis de fluorescencia para el ensayo de fagocitosis.** En recuadros rojos aparece la intensidad media de fluorescencia obtenido del citómetro de flujo. El primer cuadro en la parte superior indica la fluorescencia de macrófagos que no fueron infectados los dos siguientes cuadros marcan la fluorescencia de macrófagos infectados con bacterias opsonizadas.

### 8.3. Morfología de la cepa *N.brasiliensis* GFP (*N.bra*.GFP)

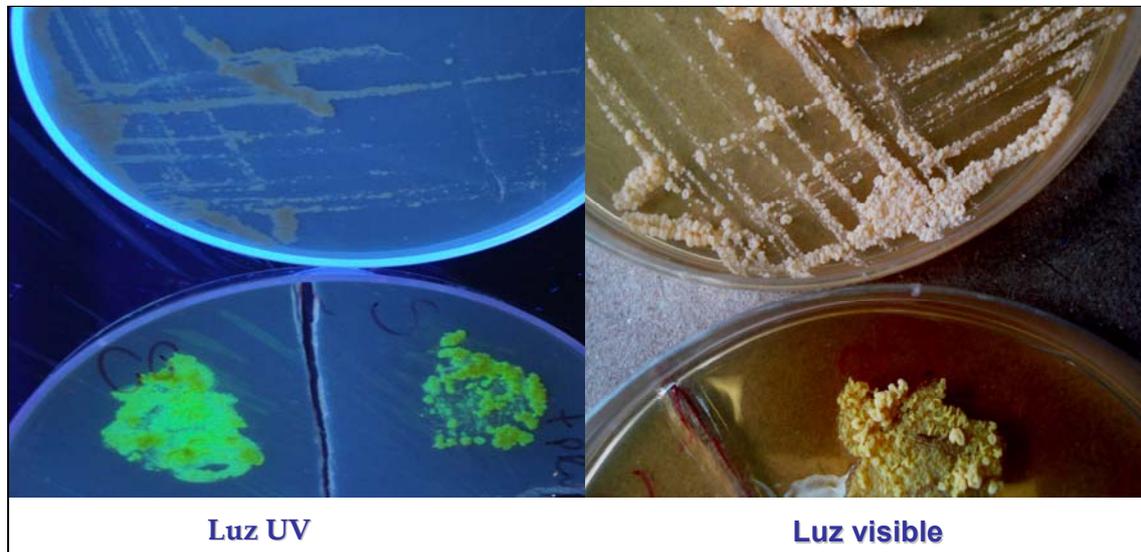
Una vez que se corroboró la intensidad de la fluorescencia emitida, se procedió a transformar la cepa de *Nocardia brasiliensis* ATCC700358, con el protocolo descrito en la metodología. Se obtuvo una alta eficiencia de transformación y se seleccionaron clonas candidatas que mostraron resistencia a la gentamicina y la emisión de la fluorescencia cuando fueron excitadas las colonias con luz UV. (Ver figura 11).



**Figura 11. Clonas candidatas de *N.bra*GFP.** Las bacterias fueron transformadas con el plásmido portador del DNAc para la GFP y un gen de resistencia a la gentamicina.

Se crecieron de nuevo las clonas seleccionadas para hacer una mejor visualización de la morfología de la bacteria. Se observa que las características físicas de la cepa no son modificadas, el aspecto algodonoso se conserva y la forma de crecimiento. La única modificación evidente es la coloración de la cepa, la cual se pierde la coloración naranja para verse de un tonalidad amarilla (Ver figura 12). Se observó también la emisión de la fluorescencia de la cepa

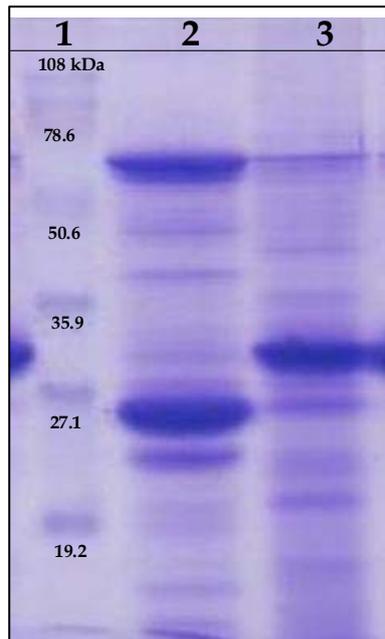
modificada con respecto a la cepa no modificada o tipo silvestre con un transiluminador de luz UV. (Ver figura 12)



**Figura 12. Morfología de la cepa *N.bra*GFP.** En la parte derecha de la imagen se observan las características morfológicas de la cepa, que no pierden su aspecto algodonoso descrito anteriormente, el único cambio físico aparente es la coloración de la cepa. En la imagen de la izquierda es evidente la fluorescencia emitida de la cepa modificada con respecto a la cepa de tipo silvestre.

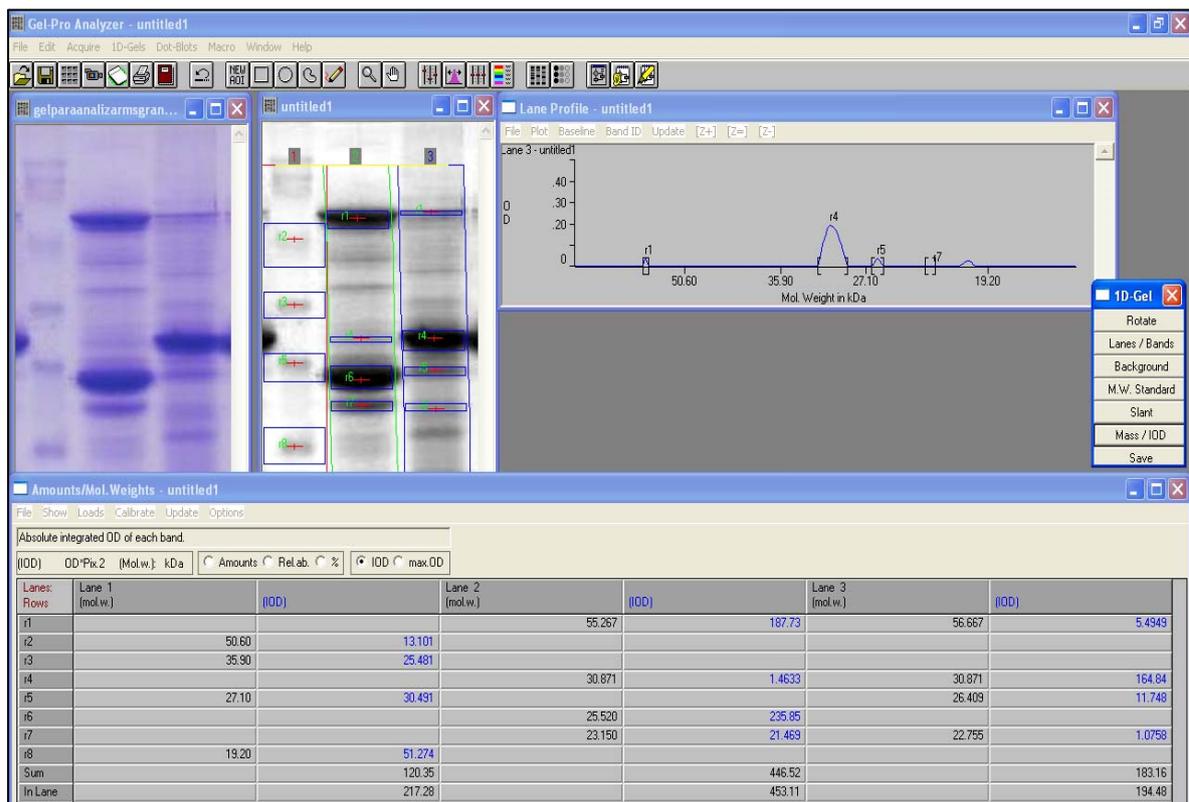
#### 8.4. Obtención del extracto de proteínas de la cepa *N.bra* GFP.

Para verificar la expresión de proteínas de la cepa modificada se realizó una electroforesis en gradiente SDS-PAGE de 8 al 18% (figura 13) y se comparó con la cepa no modificada usando el programa GELPRO Analyzer (figura 14)



**Figura 13. Extracto proteico de las cepas *N.braGFP* y *N.braWT*.** Gel de las proteínas de las cepas *N.braGFP* y la no modificada (*N.braWT*) separadas en un gel discontinuo SDS-PAGE 8-18%. 1) Marcador de peso molecular. 2) Cepa no modificada *N.braWT*. 3) Cepa modificada *N.braGFP*.

Analizando la densidad óptica de las bandas de interés el programa indicó que de la proteína p61 hay una diferencia de 34.16% mayor en el carril del extracto obtenido por *N. brasiliensis* sin modificar, así como un 20.75% para p26 y 19.95% para p24. El promedio nos indica que hay cerca de un 28% menos de las proteínas en la cepa modificada. Lo que también podemos observar es la abundante banda que corresponde a la GFP, lo que nos indica que hay una preferencia en la producción de la GFP. Por estos resultados, se continuó con ensayos de virulencia para ver si la disminución de las proteínas inmunodominantes afectaría la virulencia de la cepa (Figura 14).

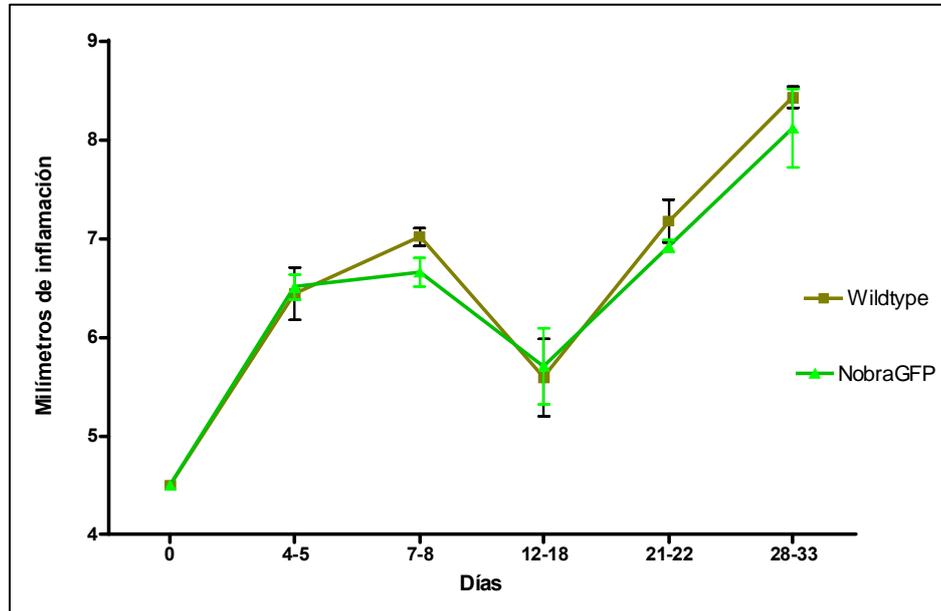


**Figura 14. Análisis en el programa GelPro Analyzer.** Análisis de abundancia de proteínas en el programa GelPro Analyzer. Las proteínas enmarcadas corresponden a la p61, p26 y p24 en las que se analizó la densidad óptica.

### 8.5. Inducción de micetoma por la cepa *N.braGFP* en ratones BALB/c.

En los ensayos de virulencia de la cepa modificada se trabajó con grupos de 4 ratones por grupo, que corresponden a ratones infectados con la cepa sin modificar o wildtype (WT) y ratones infectados con la cepa modificada o *NbraGFP*, y el monitoreo de la inflamación en las patas se observa en la siguiente gráfica, en la que se puede observar que no hay una diferencia significativa en la inflamación de los dos grupos de ratones. Si bien los granulomas presentaban ligeramente un menor tamaño en la cepa modificada, el establecimiento del

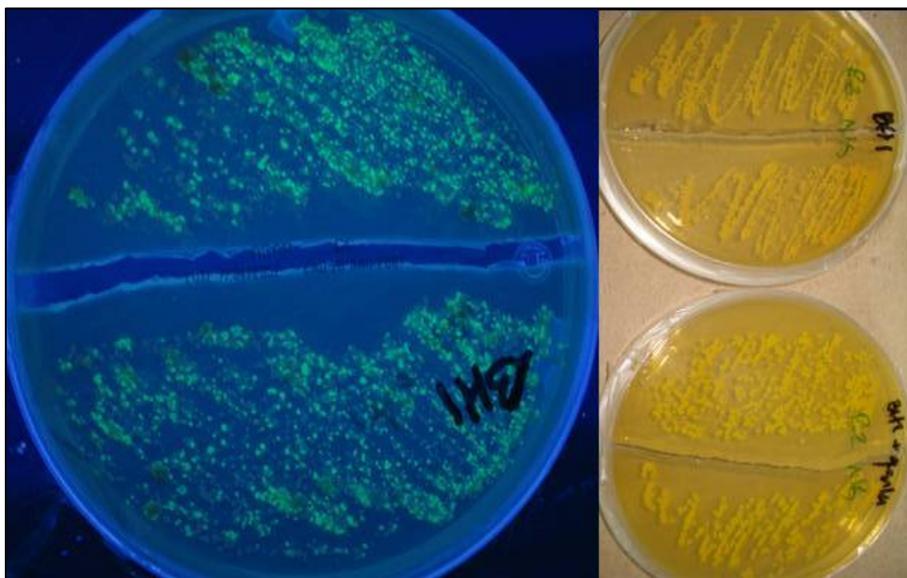
micetoma logró establecerse, por lo que la cepa modificada conserva su propiedad de inducir la enfermedad.(Ver figura 15)



**Figura 15. Desarrollo del actinomictoma en ratones infectados con la cepa *N.braGFP*.** Gráfica del monitoreo de infección de ratones infectados con la cepa *N.braGFP* y la cepa sin modificar. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPadPrism. Anova  $p < 0.05$ . 3 experimentos por separado  $n = 4$  ratones.

Además de verificar la inducción de micetoma, se sacrificaron los ratones y se extrajo el material contenido en los gránulos para verificar que la cepa contenida dentro del gránulo (en el caso de los ratones infectados con la cepa modificada), mantenía la expresión de la proteína fluorescente. El contenido de los gránulos fue verificado mediante el transiluminador de luz UV. Para conocer si el micetoma fue inducido por la cepa modificada, el contenido de los gránulos se sembró en agar BHI sin gentamicina, y en agar BHI con gentamicina. El medio sin antibiótico nos indica la cantidad total de bacterias presentes en el gránulo con

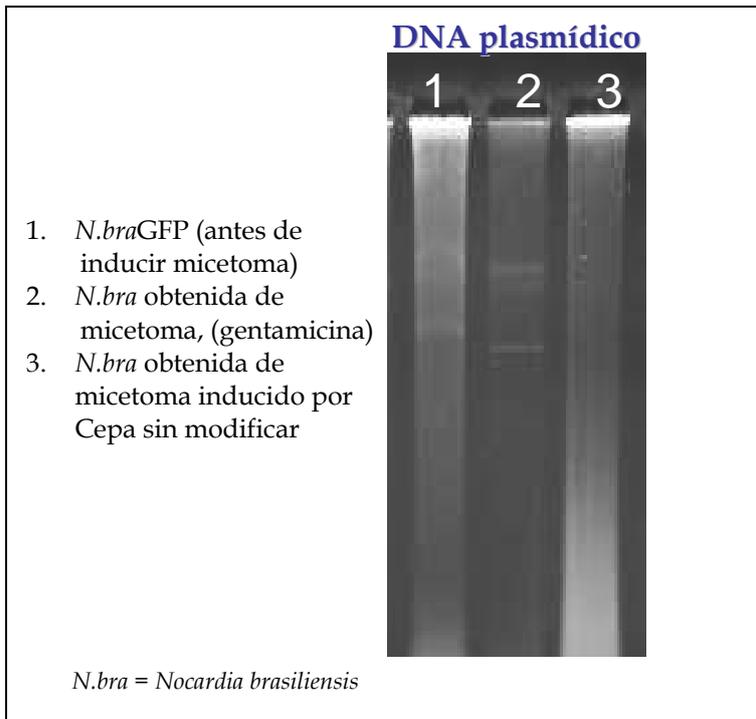
y sin plásmido, mientras que en el agar con antibiótico crecerán únicamente las clonas que conservaron el plásmido.



**Figura 16.** Gránulo obtenido de micetoma de ratones infectados con la cepa *N.braGFP*. Placas de agar BHI o BHI/gentamicina en luz visible (derecha) y en luz ultravioleta (izquierda).

#### 8.6. Verificación de la presencia de plásmido en la cepa modificada.

Para verificar que la cepa que indujo micetoma contenía el plásmido fluorescente y evidenciar que no había sido incorporado al genoma de la bacteria, se realizó una extracción de DNA plasmídico de las bacterias aisladas de los gránulos del micetoma, usando las técnicas descritas por Sambrooks y cols. para la extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina. La verificación se observa en la figura 17.



**Figura 17. Extracción de DNA plasmídico para la cepa de *Nbra*GFP y la cepa sin modificar. Geles de agarosa al 0.8%.**

### 8.7. Western blot de sueros IgM e IgG anti-*Nocardia*

Para cumplir los posteriores objetivos se llevó a cabo un esquema de inmunización de un grupo de ratones BALB/c (ya descrito en la metodología), y se analizó la especificidad de los sueros recolectados mediante Western blot, analizando su reactividad frente a extractos proteínicos de *Nocardia brasiliensis* ( Ver figura 18).

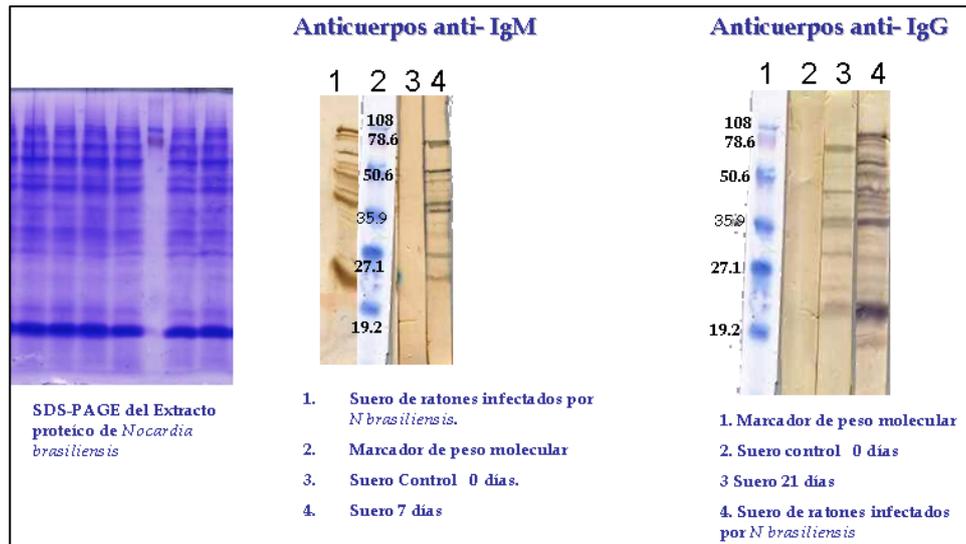
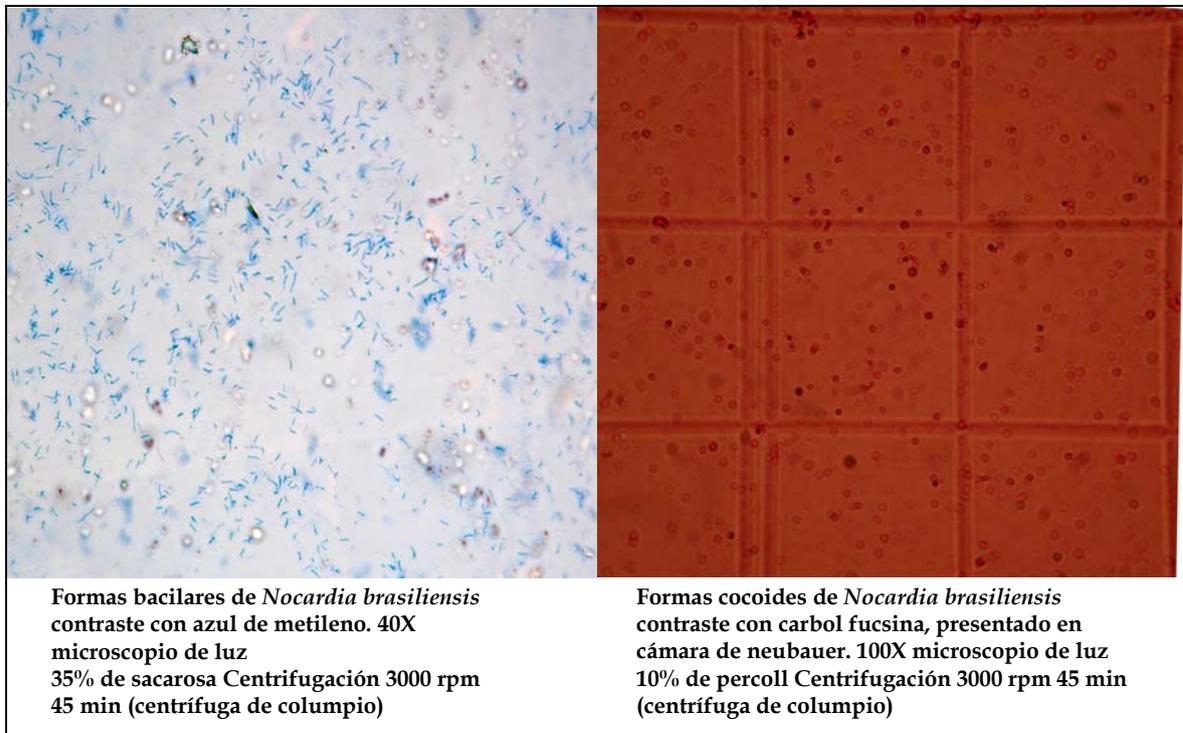


Figura 18. Western blot de los sueros obtenidos IgM e IgG anti-Nocardia.

### 8.8. Obtención de suspensión unicelular de *N.braGFP*.

Para la obtención de una suspensión unicelular que nos permitiera cuantificar por fluorescencia bacterias únicas y no en las formas de filamentos, trabajamos con un gran número de métodos para la separación de las bacterias. Se probó desde agitación suave hasta la utilización del vórtex por 5-10 minutos con perlas de vidrio. También se probaron centrifugaciones a 780 rpm por 5, 10, 20, 30, 40, 60 minutos, camas de algodón y filtros Whatman hasta filtros milipore de 5  $\mu$ m, con los que no se pudieron separar de una forma efectiva los agregados bacterianos de las bacterias solas. También se probaron gradientes de sacarosa de 0 al 100% usando una centrífuga de columpio por 45 minutos a 3000 rpm, en donde se logró separar las formas bacilares de la bacteria con un 35% de sacarosa (Figura 19). Se continuó con gradientes de percoll, en donde se lograron separar formas cocoides,

con 10% de percoll a 3000 rpm por 45 minutos en una centrífuga en columpio (Figura 19).

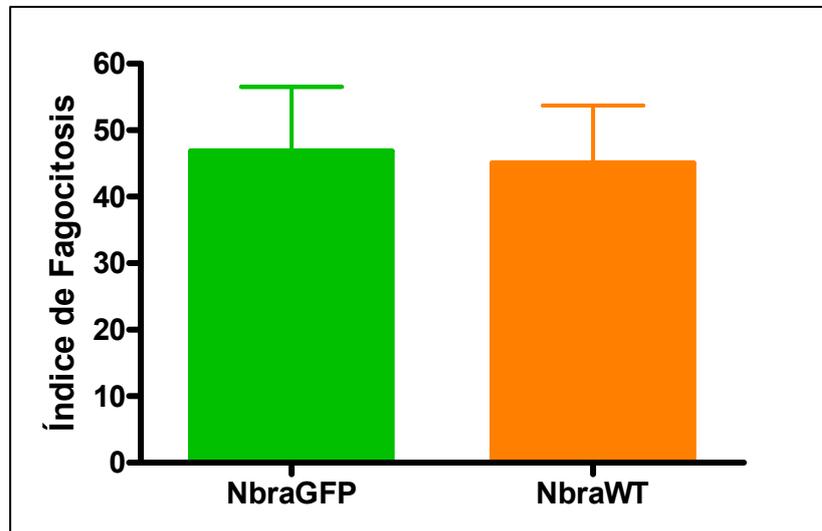


**Figura 19. Gradientes de sacarosa y percoll.** Gradientes de sacarosa y percoll para separar bacterias únicas o unicelulares del resto de agregados de filamentos.

### 8.9. Ensayos de Fagocitosis en macrófagos infectados con las cepas *N.bra*GFP y *N.bra*WT

Para verificar que la cepa modificada con la proteína verde fluorescente no presentara alteraciones que impidieran o limitaran su opsonización y fagocitosis por los macrófagos, se realizó este ensayo de fagocitosis opsonizando con anticuerpos específicos y se cuantificaron 200 células para medir el índice de fagocitosis, en la figura 20 se presenta la gráfica que se obtuvo para comparar la

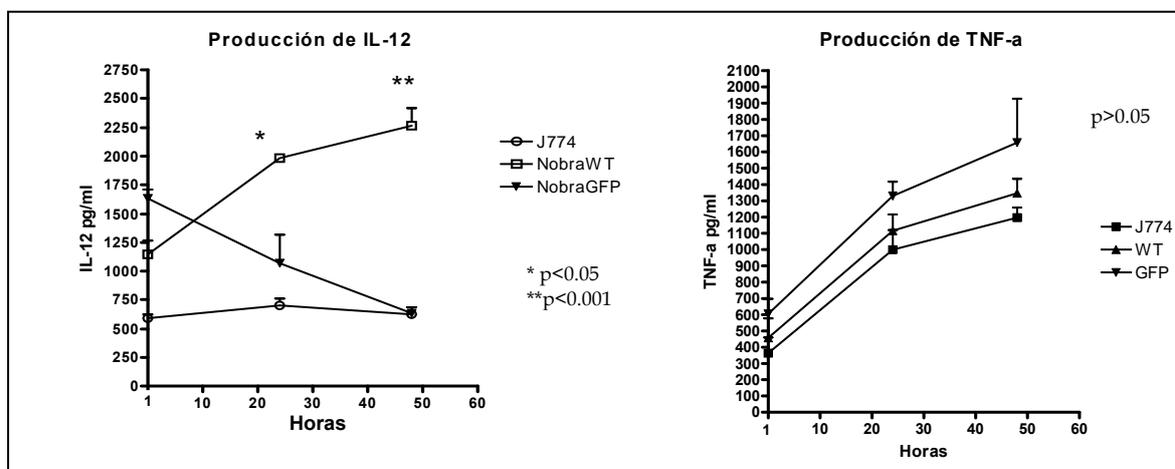
fagocitosis obtenida por las dos cepas. Se observa que no hubo una diferencia significativa en la comparación de la fagocitosis de las dos cepas.



**Figura 20.** Índice de Fagocitosis por macrófagos infectados con la cepa *N.braGFP* y *N.braWT*. Se analizaron los resultados con una prueba T con una  $p > 0.05$ . Las barras representan el resultado de los duplicados de 4 experimentos por separado.

### 8.9.1. Comparación del perfil de citocinas producidas por los macrófagos infectados por las cepas *N.bra.GFP* y *N.bra.WT*.

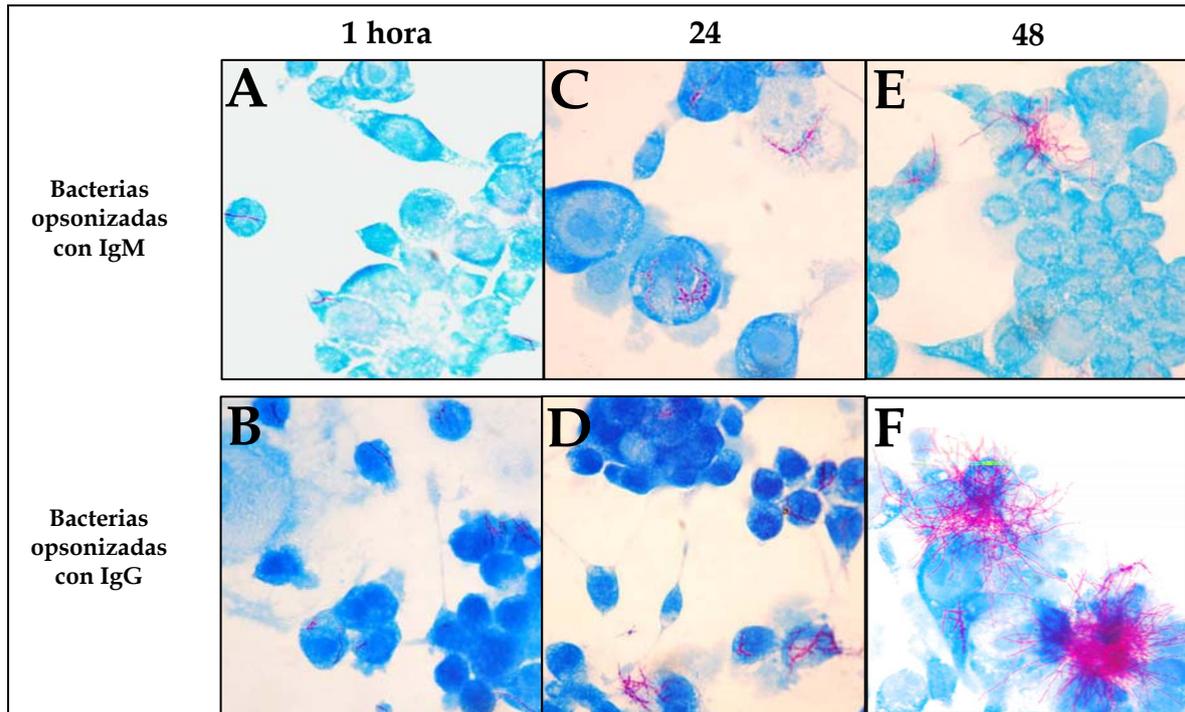
En cuanto al perfil de las citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  observamos que para TNF- $\alpha$  no existe una diferencia significativa entre las dos cepas, pero para IL-12 sí se observa diferencia significativa para la cepa no modificada, pero a las 24 y a las 48 horas, en el tiempo 1 no hay una diferencia significativa, lo que nos indica que al inicio de la fagocitosis la producción de IL-12 es semejante para las dos cepas.



**Figura 21. Cinética de comparación de la producción de las citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos infectados con la *N.bra*.GFP y *N.bra*.WT.** Cinética de comparación de la producción de las citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos infectados con la cepa modificada con la proteína fluorescente (*N.bra*GFP) y la cepa no modificada (*N.bra*WT). Se analizaron los resultados con una prueba Anova de 2 rutas y con análisis múltiple de Bonferroni. Los puntos representan el resultado de los duplicados de 3 experimentos por separado.

### 8.10. Ensayos de infección en macrófagos con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM o IgG anti-Nocardia.

Se realizaron ensayos de infección para comparar la fagocitosis mediada por los anticuerpos IgM e IgG y se visualizaron las células infectadas con tinción de kinyoun y visualizadas en microscopio óptico. En la figura 22 se puede observar que la cantidad de filamentos en el interior de los macrófagos opsonizados con anticuerpo IgM es menor que con las bacterias opsonizadas con anticuerpos IgG, y la multiplicación bacteriana es además mayor para este grupo.

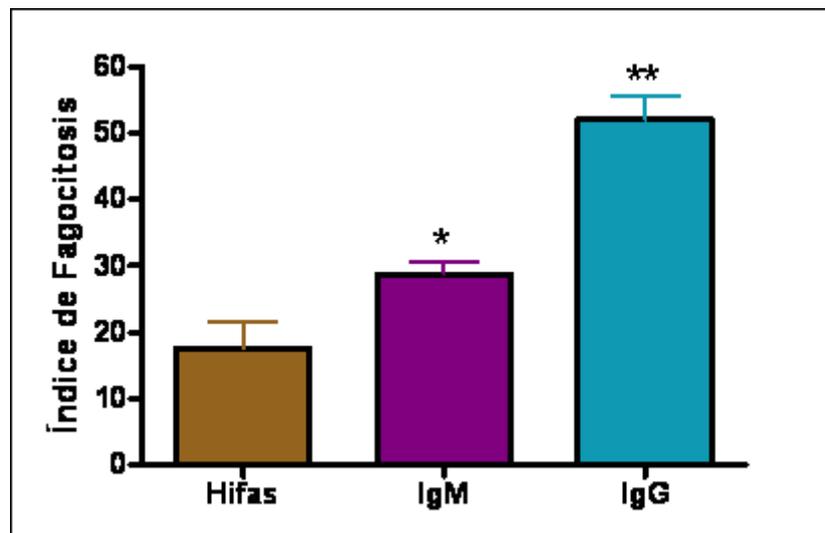


**Figura 22. Cinética de infección de macrófagos J774 con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM e IgG anti-*N.bra*.** Cinética de infección de macrófagos J774 con *Nocardia brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM (A,C y E) e IgG anti-*N.bra* (B, D y F). **A y B)** Infección a 1 hora, células teñidas con Kinyoun, se infectó con una MOI 3:1, es evidente la cantidad de filamentos presentes en los macrófagos infectados con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgG. **C y D)** 24 horas de infección, se observa una multiplicación bacteriana y el aumento del tamaño de las filamentos, **E y F)** 48 horas de infección, se observan grandes ramificaciones de los filamentos bacterianos. Todas las imágenes fueron observadas en microscopía de luz en objetivo de inmersión 100X.

En los cultivos infectados por filamentos opsonizados con anticuerpos IgG anti-*Nocardia* se observó también que el medio cambiaba su pH a las 48 horas, y había un desprendimiento de la monocapa de macrófagos, que ya ha sido reportado además para otros tipos celulares. Esta destrucción aparentemente era menos severa para los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM anti-*Nocardia*.

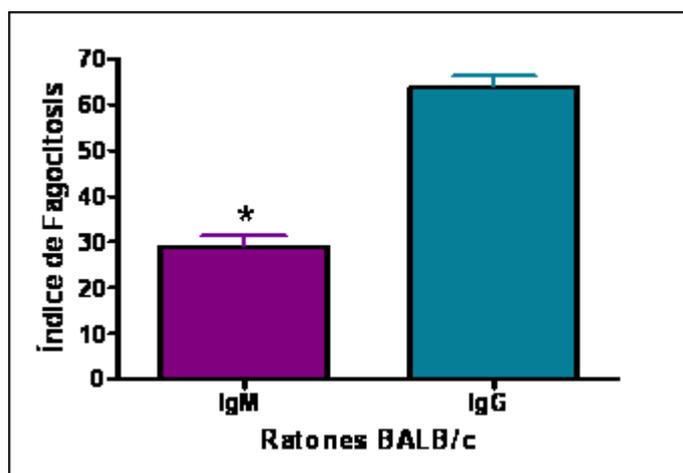
### 8.10.1. Comparación del índice de fagocitosis de los macrófagos infectados con las bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM e IgG anti-Nocardia.

Como se puede observar en la figura 23 la comparación en la opsonización es estadísticamente significativa, siendo IgG el anticuerpo que mejor opsoniza la bacteria permitiendo una mayor introducción de ésta hacia el macrófago.



**Figura 23. Índice de Fagocitosis de bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM e IgG anti-Nbra.** Índice de Fagocitosis comparativo entre las bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM e IgG anti-Nbra. Los datos fueron analizados con pruebas pareadas usando el programa GraphPadPrism \*  $p=0.0157$  (comparación entre IgM e IgG) \*\* $p<0.001$  (entre bacterias sin suero e IgG).

También se probó la diferencia en la opsonización de estos dos anticuerpos usando células de macrófagos de cavidad peritoneal de ratones BALB/c y la gráfica que se obtuvo se presenta en la Figura 24. Se observa que la mayor opsonización, como en células J774, es llevada a cabo por los anticuerpos del tipo IgG.

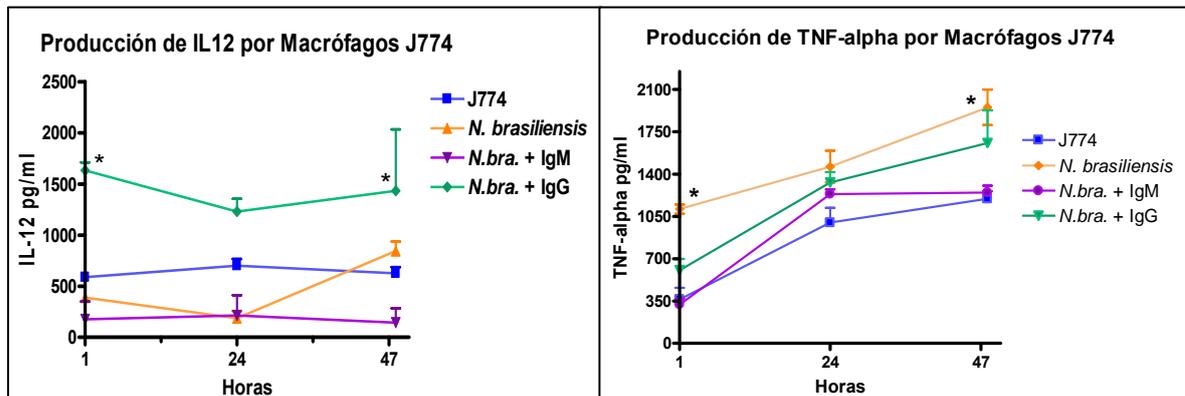


**Figura 24. Índice fagocítico de bacterias opsonizadas por anticuerpos IgM e IgG anti-*Nbra* en macrófagos de cavidad peritoneal de ratones BALB/c.** Índice fagocítico comparativo entre bacterias opsonizadas por anticuerpos IgM e IgG en macrófagos de cavidad peritoneal de ratones BALB/c. Prueba no apareada con corrección de Welch. \* $p < 0.0001$

### 8.10.2. Comparación de la producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM e IgG anti-Nocardia.

En cuanto a la producción de citocinas inducidas por la infección de los macrófagos J774 con *Nocardia brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM e IgG anti-Nocardia se observa en la gráfica de Producción de IL-12 (izquierda) que la producción de IL-12 por macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con IgG fue estadísticamente significativa en 1 y 48 horas comparado con la producción de los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con IgM, donde la producción de IL-12 fue muy baja. Para TNF- $\alpha$  no hubo una diferencia

estadísticamente significativa en los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con IgM o con IgG, pero sí hubo una diferencia estadística para las bacterias que no fueron opsonizadas con anticuerpos. (Figura 25)

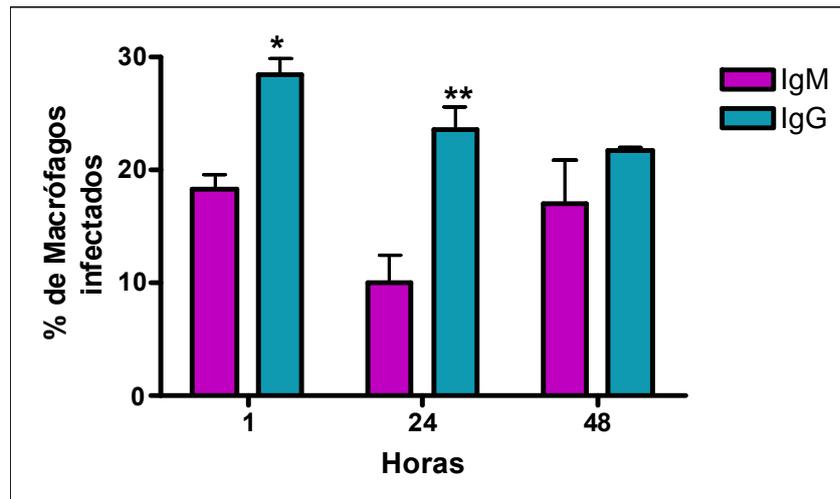


**Figura 25.** Gráficas de la cinética de producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM ó IgG anti-*Nbra*. Para el análisis estadístico se llevó a cabo una Anova de dos rutas y test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$  en ambas gráficas. Bacterias solas, se refiere a bacterias sin opsonización con anticuerpos.

### 8.10.3. Cinética comparativa de macrófagos infectados con *N. brasiliensis* opsonizada con anticuerpos policlonales IgM ó IgG anti-Nocardia.

También se hizo una cinética para cuantificar la cantidad de macrófagos con filamentos al interior, en las 1, 24 y 48 horas y observamos que la tendencia de los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con anticuerpos IgM es que contienen menor número de bacterias. Si bien la cantidad de bacterias aumenta a las 48 horas, hay una disminución de la cantidad de bacterias en el interior a las 24 horas (figura 26). En los cultivos además se observó un menor daño a los

macrófagos por el crecimiento de la *Nocardia* que en los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con IgG. Lo que nos puede indicar que el anticuerpo IgM, además de que introduce un menor número de bacterias logra activar mecanismos al interior del macrófago que pueden limitar la multiplicación bacteriana.

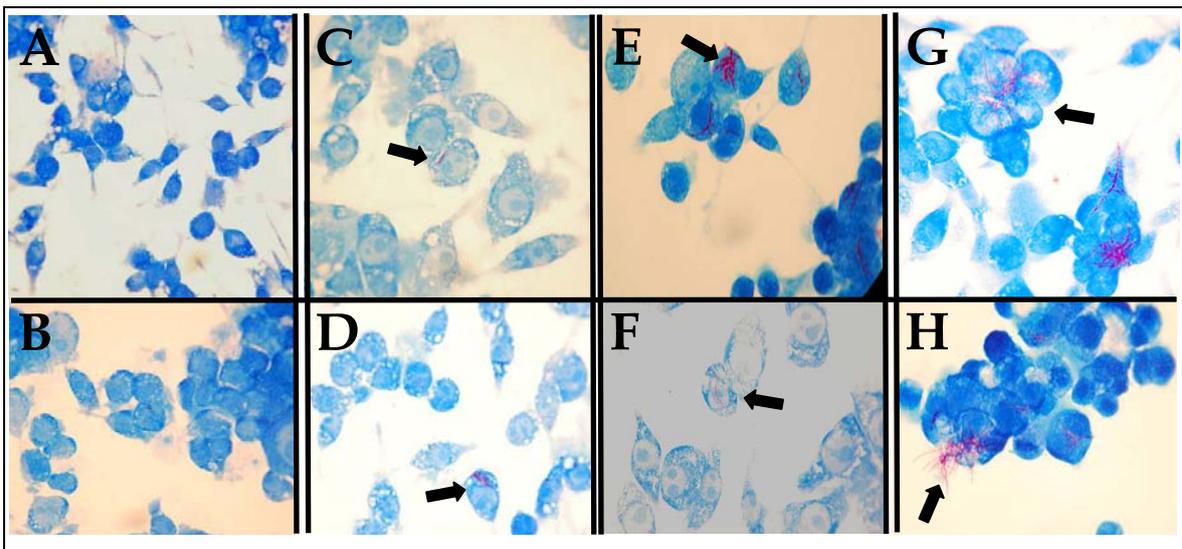


**Figura 26.** Cinética comparativa del porcentaje de macrófagos infectados con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos policlonales IgM ó IgG anti-*Nbra*, a las 0, 24 y 48 horas de infección. Las gráficas se analizaron con Anova de dos rutas y Bonferroni. \* $p < 0.05$

### 8.11. Infección de macrófagos J774 con formas cocobacilares de *N. brasiliensis*.

La suspensión cocobacilar que se logró separar se usó para infectar macrófagos y evidenciar si el crecimiento en filamentos y la forma de agregarse de la bacteria formando complejos de mucho mayor tamaño que del macrófago, sería una de las posibles causas que limitaran la capacidad destructiva del macrófago al serle más difícil degradar los agregados bacterianos. Como podemos ver en la

figura 26 la suspensión de cocos de *Nocardia*, retardan la destrucción de la monocapa de macrófagos que se observa en la infección de los macrófagos con filamentos, sin embargo, aún la forma cocoide logra sobrepasar la actividad microbicida del macrófago y empieza a multiplicarse en su interior. (Figura 27).



**Figura 27. Cinética de infección de macrófagos J774 con formas cocobacilares (unicelulares) de *N. brasiliensis*.** A y B) Infección a 1 hora, células teñidas con Kinyoun, se infectó con una MOI 30:1, C y D) a 12 horas de infección se observa una multiplicación bacteriana las flechas indican formas de filamentos que derivan de las cocoides, E y F) 24 horas de infección, el aumento del tamaño de los filamentos, por la multiplicación bacteriana al interior del macrófago G y H) 48 horas de infección, se observan ramificaciones de los filamentos bacterianos. Todas las imágenes fueron observadas en microscopía de luz en objetivo de inmersión 100X.

### 8.11.1. Producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$ por macrófagos infectados con las formas cocobacilares aisladas de *N. brasiliensis*.

Se analizó la producción de citocinas por los macrófagos infectados con las formas cocoides, mediante una cinética de 3 tiempos y se comparó con los macrófagos infectados con filamentos de *Nocardia* y se observó (Figura 28) que la producción de TNF- $\alpha$  no es semejante a la que se induce con las filamentos. Para IL-12 si hay una diferencia significativa en la producción de filamentos en las 24 y 48 horas con respecto a la línea celular sin infectar. Para la suspensión cocobacilar si hay una diferencia significativa con respecto a la producción de la línea celular, a las 48 horas.

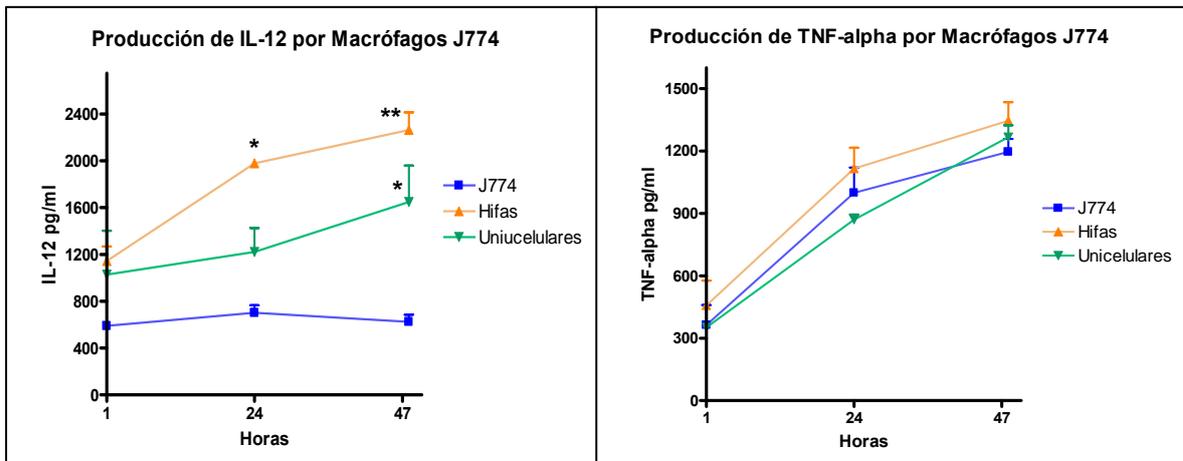


Figura 28. Gráficas de la cinética de producción de citocinas IL-12 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos infectados con las formas cocoides y filamentos de *N. brasiliensis* Para el análisis estadístico se llevó a cabo una Anova de dos rutas y test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (Hifas= filamentos).

### 8.12. Ensayos de la expresión del receptor CD11b.

Para evaluar la expresión del receptor CD11b se realizó también una cinética con respecto al tiempo de 1 a 48 horas de infección. El experimento se realizó por duplicado y la gráfica con los resultados se observa en la figura 29. La expresión del receptor aumenta a las 24 horas, sin embargo la gráfica indica que el aumento también aparece en los macrófagos no infectados. Si bien, no es posible concluir si podemos inferir que la expresión del receptor no aumenta debido a la infección.

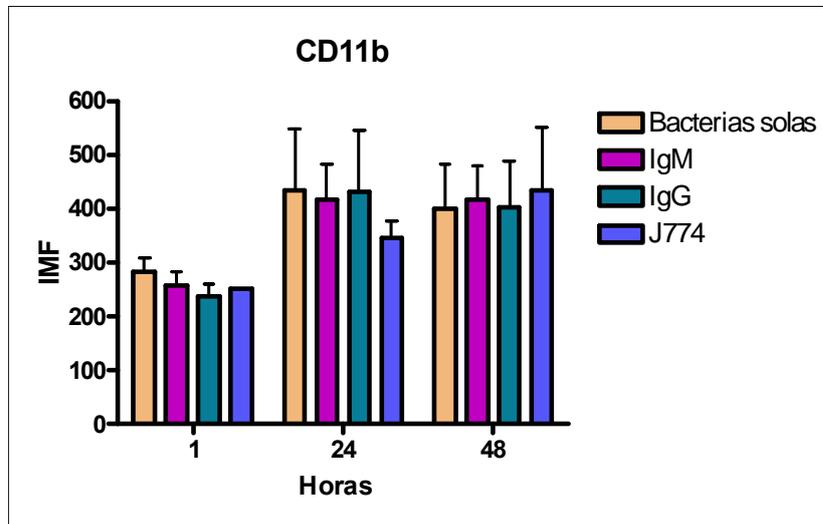


Figura 29. Expresión del receptor CD11b en macrófagos infectados con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM o IgG anti-*Nocardia*. IMF= Intensidad media de fluorescencia. Bacterias solas, se refiere a bacterias no opsonizadas por anticuerpos.

### 8.13. Ensayos de la expresión de la GFP.

Este ensayo se realizó a la par de la expresión del receptor CD11b. El experimento se realizó por duplicado y la gráfica con los resultados se observa en la figura 30. Las barras representativas de la fluorescencia emitida por la GFP a la primer hora de infección muestran una mayor expresión para los macrófagos infectados con las bacterias opsonizadas con el anticuerpo IgG en comparación de las bacterias no opsonizadas y de las bacterias opsonizadas con IgM. Este dato concuerda con el resultado observado en el índice de fagocitosis (figura 23) que muestra un mayor índice para macrófagos infectados por bacterias opsonizadas por IgG. La gráfica de la cinética comparativa en porcentaje de macrófagos infectados (figura 26), muestra una diferencia a esta gráfica de expresión de la GFP, ya que en la primera la tendencia de macrófagos infectados es disminuir a las 24 horas y aumentar a las 48 horas. Sin embargo en esta gráfica de expresión de la GFP podemos ver una tendencia al incremento para los tres grupos hasta las 24 horas, con una ligera disminución a las 48 horas. Este aumento de la fluorescencia detectada, puede ser debido a que como vemos en la figura 22, las bacterias empiezan a multiplicarse y formar filamentos muy grandes.

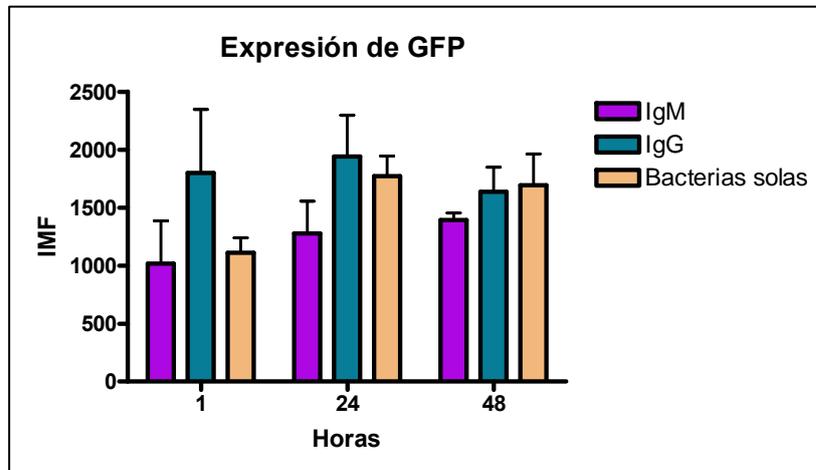


Figura 29. Expresión de la GFP en macrófagos infectados con *N.brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM o IgG anti-Nocardia. IMF= Intensidad media de fluorescencia. Bacterias solas, se refiere a bacterias no opsonizadas por anticuerpos.

## CAPÍTULO 9.

### DISCUSIÓN

Para la separación de los filamentos de bacterias unicelulares, se usó un gradiente de sacarosa al 35%. Con este gradiente se separaron las formas bacilares de los agregados que forma la bacteria. Debido a que la sacarosa es un compuesto altamente osmótico se le ha relacionado con alteraciones de la pared celular, por lo que se recomienda su uso para separación de componentes subcelulares. Ya que las bacterias posteriormente iban a ser sembradas en agar para conteo de UFC, se optó usar el percoll que es un material usado para gradientes de densidad. Este material además, carece de osmolaridad lo que nos permite trabajar con él sin que dañe la pared de las bacterias. En un principio se trabajó en el percoll con la densidad a la cual se obtuvo la separación de las formas bacilares de la sacarosa, pero no se logró obtener el mismo resultado. Con percoll al 10% pudimos separar la bacteria unicelularmente, observándose formas cocobacilares pero no bacilares. Beaman ha reportado la obtención de formas cocobacilares para *Nocardia asteroides*,<sup>68</sup> pero únicamente enriqueciendo la presencia de estas formas en cultivos de 55 horas. En el caso de *Nocardia brasiliensis* se ha comprobado en el laboratorio que sólo los cultivos de 72 horas inducen micetoma, y por esto no se trabajó con otros tiempos de crecimiento (No se ha reportado este dato). Para separación de las formas hifales de bacterias unicelulares en algún tipo de *Nocardia* para poder hacer una comparación de la efectividad, ventajas o

desventajas del método. Observamos que las fracciones de mayor porcentaje de percoll como de sacarosa tienen en común atrapar los agregados de mayor tamaño. Aún en estas fracciones se pueden obtener algunos agregados pequeños e incluso bacterias únicas, lo que nos hace suponer que el mismo proceso por el movimiento mecánico puede fraccionar los agregados grandes desprendiendo los pequeños y las bacterias únicas. Por otro lado, la razón por la que no se pudo escalar del gradiente de sacarosa al gradiente de percoll, hay una alta probabilidad de que las cargas presentes en la solución de 35% de sacarosa (1.022 Molar), permitan una mejor separación de las bacterias. La carga de la sacarosa en la solución parece envolver los lípidos de la pared de la bacteria, favoreciendo la separación de bacilos, en el caso del percoll, que es un medio de baja osmolaridad no se observó la separación de las formas bacilares, pero si de las formas cocoides.

Nos planteamos algunas preguntas en el curso de esta tesis; ¿Los agregados grandes que superan el tamaño de los macrófagos hacen difícil o imposible el proceso de fagocitosis? ¿Y si esto a su vez sería un factor determinante para el establecimiento de la enfermedad?. Estas preguntas las pudimos contestar en los experimentos realizados en la infección con las formas coloides, ya que también en la infección de macrófagos con estas formas, había multiplicación bacteriana y después de 12 horas, se formaban filamentos bacterianos al interior de los macrófagos. En la infección con las formas cocoides de *Nocardia asteroides* llevada a cabo por Beaman, no se realizó una purificación selectiva de las formas, sino que

sólo trabajó con un medio enriquecido con éstas, pudiendo haber formas hifales presentes en la suspensión. La infección de los macrófagos con las formas cocoides nos indica que la virulencia de la bacteria depende más que de su propiedad de agregarse y formar filamentos, probablemente los factores de virulencia mencionados (catalasa, Súperoxido dismutasa, etc), intervienen de una forma más determinante en el establecimiento de la enfermedad.

Otra de los inconvenientes que observamos en esta tesis fue que, una vez que *Nocardia* logra evadir su destrucción dentro del macrófago, empieza a multiplicarse y daña la monocapa de macrófagos llegando a desprenderla. Suponemos que este daño ocurre al menos, por tres situaciones: una es por el mismo crecimiento de la bacteria dentro del macrófago, formando filamentos de 2-5 veces el tamaño del macrófago en tan sólo 12 horas, y grandes ramificaciones de bacterias a las 24 y 48 horas, que sobrepasan por mucho el tamaño de los macrófagos. Estos filamentos de gran tamaño quitan espacio y desprenden bacilos y filamentos que invaden macrófagos vecinos. La segunda forma de daño es por el metabolismo de las bacterias, que al estar en crecimiento y multiplicación constante, producen productos de desecho y requieren nutrientes quitándoles la disposición de ellos a los macrófagos. Además las bacterias, llegan a acidificar el medio en el que están creciendo, lo que obviamente no permite el crecimiento adecuado de los macrófagos los cuales están adaptados a crecer en pH fisiológicos. La tercera forma de daño del macrófago es por medio de un factor que *Nocardia* secreta al medio y que induce la apoptosis de las células. Esto ha sido reportado

por Beaman<sup>69</sup> quien describe que este factor es producido por varias especies de microbios y reporta que *Nocardia asteroides* es capaz de inducir apoptosis en células cerebrales de ratón, células PC12, en una línea celular de rata e incluso en una línea epitelial de células humanas. Beaman asocia la apoptosis con la inhibición de la actividad del proteasoma, y refiere que han relacionado esta propiedad a una fracción de filtrado de *Nocardia* de 3 KDa altamente estable, aunque para las células HeLa únicamente la bacteria viva pudo inducir apoptosis. Ya que este efecto parece no beneficiar a la bacteria, porque la liberaría al medio donde estaría expuesta a los demás componentes del sistema inmune, Beaman sugiere que probablemente éste sea un mecanismo de respuesta del macrófago hacia el ataque del patógeno intracelular. Los géneros bacterianos *Chlamydia*<sup>70</sup>, *Rickettsia*,<sup>71</sup> *Streptomyces*<sup>72</sup> y *Mycobacterium*<sup>73</sup> inhiben la apoptosis como una estrategia para mantenerse dentro de las células. En el caso de *Mycobacterium* incluso, esta capacidad se relaciona directamente con la virulencia de la cepa, siendo las cepas virulentas capaces de inhibir la apoptosis.

En cuanto a la producción de citocinas, para TNF no observamos diferencias en la expresión para los grupos, excepto para las bacterias sin opsonización, en donde la producción de TNF es más alta. En la tesis doctoral de J.M. Zúñiga,<sup>74</sup> relaciona el aumento en la producción de TNF con la cantidad de bacterias con las cuales infectaba. En el trabajo de la Dra. Isabel Pérez R.<sup>75</sup> se observó la presencia de TNF en los sueros de los ratones con un pico a las 9 horas, se debe considerar sin

embargo, que la producción de citocinas es inducida en infección sin opsonización previa de las bacterias. Cabe mencionar también, que en el trabajo del Dr. J.M. Zúñiga midieron citocinas hasta las 12 horas y estos datos son obtenidos a partir de macrófagos infectados con *Nocardia* sin opsonizar.<sup>57</sup> En este trabajo además se menciona, que las citocinas producidas por macrófagos infectados con bacterias opsonizadas no pudieron ser medidas, por lo que no podemos hacer algún punto de comparación en los resultados obtenidos para este trabajo y el del Dr Zúñiga. En un estudio de pacientes con actinomicetoma se cultivaron células mononucleares y se midió la producción de citocinas por la estimulación de células con extracto crudo de *Nocardia brasiliensis* y se encontró que TNF estaba elevado en los pacientes con micetoma comparado con los controles.<sup>76</sup> La producción de TNF se ha relacionado con la resistencia al micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*,<sup>56</sup> y su presencia en los sobrenadantes de los cultivos nos sugiere, que el macrófago está secretándola para tratar de eliminar el microorganismo.

La pregunta inicial de esta tesis ¿cuál sería el papel del anticuerpo IgM anti-*Nocardia* en la resistencia contra el establecimiento del micetoma? es respondida en parte en cuanto a su implicación a nivel de macrófago, ya que pudimos observar que la cantidad de bacterias que son fagocitadas es menor que cuando son opsonizadas con anticuerpos IgG. Al observar la gráfica del índice de Fagocitosis (figura 23) esta resulta hasta el 45% menos en la opsonización con IgM con respecto a IgG. Si comparamos el porcentaje de células que tienen en su

interior bacterias (figura 26) podemos ver que la diferencia entre IgM es 35% menos que para IgG, esta diferencia radica en que el índice de fagocitosis toma en cuenta el promedio de la cantidad de bacterias en el interior del macrófago. En las infecciones con bacterias opsonizadas con anticuerpos IgG no sólo son infectados un número mayor de macrófagos, sino que la cantidad de bacterias que entran es más grande. El anticuerpo IgM ayuda en la resistencia al micetoma impidiendo que un número mayor de bacterias entren al interior de los macrófagos, dejándolas en el exterior donde pueden actuar sobre ellas los demás componentes del sistema inmune.

Por otro lado, como vimos en los antecedentes, en pacientes con actinomicetoma se observan altos títulos de anticuerpos anti-p24, y en pacientes en remisión se observan bajos títulos de anticuerpos anti-p24, pero altos títulos anti-proteasa. Se mencionó también en los antecedentes, el alto título de anticuerpos se correlaciona con la enfermedad activa. En esta tesis pudimos observar que los anticuerpos IgG específicos contra *Nocardia*, favorecen la entrada de la bacteria hacia el macrófago, permitiendo que un mayor número de bacterias sobrevivan y se multipliquen en el interior de la célula. Es interesante saber, que en el trabajo de la Dra. Isabel Pérez se hizo un análisis del sub-isotipo de anticuerpo generado a partir de los antígenos de *Nocardia brasiliensis* y se encontró que p24 promueve la producción de anticuerpos IgG con isotipo IgG1 e IgG2b, el antígeno p61 IgG1, y proteasa IgG2a e IgG3.<sup>75</sup> Esto nos podría indicar que el isotipo mayoritario podría dirigir la respuesta inmunológica a través de la activación o la inhibición de

receptores Fc. Como también se ha comentado en los antecedentes, los anticuerpos monoclonales, que han inducido protección por ejemplo el antígeno p24 y p61 inducen la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a<sup>77,78</sup> el cual está relacionado con la activación del receptor CD64. La activación de este receptor esta asociado a la fagocitosis, la liberación de citocinas, y la presentación de antígeno de forma eficiente para la eliminación de los microorganismos. Para los otros trabajos de protección mediante bacterias muertas por calor, o con anticuerpos anti-proteasa, no se menciona el sub-isotipo de anticuerpo generado. Si bien en este caso trabajamos con anticuerpos policlonales producidos por ratones inmunizados con bacterias muertas por calor, el patrón de proteínas de la cepa modificada difiere de la cepa ATCC700358 en la producción de GFP, la cual podría estar induciendo la producción de un sub-isotipo de anticuerpo diferente al que predominantemente se encuentra en la cepa no modificada.

La disminución de IL-12 en macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con IgM, nos indica que la activación intracelular es diferente a cuando el macrófago es infectado con las bacterias opsonizadas con IgG. Podemos pensar que esta disminución podría ayudar en la eliminación de *Nocardia* en otra manera, pero obviamente aún falta un perfil más completo de expresión de citocinas, para darnos una mejor idea si sería a nivel de regulación o inhibición de algunas citocinas pro-inflamatorias. La implicación de IgM en la resolución de enfermedades como la criptococosis,<sup>52</sup> la infección por *Neumococo*<sup>59</sup> y la tripanosomiasis por *Tripanosomas Africano*<sup>79</sup>, avalan la importancia de este

anticuerpo en la resistencia a la enfermedad y aún se ha propuesto su uso en la terapia contra el cáncer.<sup>80</sup> El mecanismo de acción de IgM en la resistencia para otras enfermedades, se ha asociado con la alteración de la estructura de la cápsula polisacárida, o se le ha dado carácter de inmunomodulador. En la tesis de doctorado de la Dra. Isabel Pérez, *N. brasiliensis* fue opsonizada con el anticuerpo IgM, y crecidas en placas de agar BHI, y se observó una clara disminución en el número de UFC, con respecto al control, y con respecto a las bacterias opsonizadas con IgG específicos para *Nocardia*. Lo que nos indica que además del conocido papel de neutralizante, parece inhibir de alguna forma el crecimiento de esta bacteria.<sup>75</sup>

## CAPÍTULO 10.

### CONCLUSIONES

- Los Anticuerpos policlonales IgM *anti-Nocardia brasiliensis*, inhiben la fagocitosis de la bacteria por el macrófago.
- Los macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis* opsonizada con IgM disminuyen significativamente la producción de IL-12.

## CAPÍTULO 11.

### PERSPECTIVAS

- Identificar los receptores (Fc?, CR3?) usados por las bacterias opsonizadas con IgM, en su entrada hacia el macrófago.
- Identificar el mecanismo intracelular por el cual *Nocardia brasiliensis* opsonizada con anticuerpos IgM inhibe la producción de IL-12.
- Probar la opsonización con anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos inmunodominantes.

## CAPÍTULO 12.

### BIBLIOGRAFÍA

- 
- <sup>1</sup> Abbas A., Lichtman A. 2004. Inmunología Celular y Molecular. 5ta Edición de la Obra en Inglés Elsevier Science.
- <sup>2</sup> Casadevall A., Pirofski L.A. 2007. Accidental virulence, cryptic patogénesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Enviromental Microbes. *Eukaryotic Cell*. 6 (12): 2169-2174
- <sup>3</sup> Salinas-Carmona M.C., Torres-López E., Ramos I. A., Licon-Trillo A., Gonzalez-Spencer D. 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Inf. Immun*. 67(5):2428-2432
- <sup>4</sup> Salinas-Carmona M., Welsh O., Casillas S. 1993. Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation With Mycetoma Infections. *J. Clin. Microb*. 31 (11): 2091-2906.
- <sup>5</sup> Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M., Welsh O., Rodriguez M. 1992. Isolation and Purification of Two Immunodominant Antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J Clin. Microbiol*. 30 (5): 1183-1188.
- <sup>6</sup> Beaman B.L., Beaman L. 1994. *Nocardia* species: Host-parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev*. 7 (2):213-264.
- <sup>7</sup> Ruimy R., Riegel P., Carlotti A., Boiron P., Bernandin G., Monteil H., Wallace Jr R. Christen R. 1996. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. Nov., a new species of *Nocardia* wich groups bacterial Straits previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 46: 259-264.
- <sup>8</sup> Salinas-Carmona MC. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. Review. *Microb & Infect*. 2.1373-1381
- <sup>9</sup> Serrano J.A, Sandoval H.A, Beaman B.L. 2007. Actinomicetoma. Plaza y Valdez Editores, México.
- <sup>10</sup> McNeil M.M, Brown JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev*. 7:357-417.
- <sup>11</sup> Boiron P, Locci R, Goodfellow M, Gumaa SA, Isik K, Kim B, McNeil MM, Salinas-Carmona MC, Shojaei H.1998. *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma. *Med Mycol*. 36 Suppl 1:26-37.

- 
- <sup>12</sup> Baeck K., Kim H., Oh M., Yoon B., Lee I. 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J environ. Sc. Health.* 39: 2465-2472.
- <sup>13</sup> Benavides-López J., Quintero G., Guevara-Vizcaíno A., Jaimes-Cáceres D., Guitierrez-Riñao S., Miranda-García J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo. *NOVA.* 4:82-90.
- <sup>14</sup> Hubble J.P., Cao T., Kjelstrom J.A., Koller W.C. and Beaman B.L. 1995. *Nocardia* species as an etiologic agent in Parkinson's disease: serological testing in a case-control study. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2768-2769.
- <sup>15</sup> Beaman B. L. y Maslan S. 1977. Effect of cyclophosphamide in experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. *Infect. Immun.* 16:995-1004.
- <sup>16</sup> Saubolle M., Sussland D. 2003. Nocardiosis: Review of clinical and laboratory experience. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4497-4501.
- <sup>17</sup> Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T. and Hattori M. 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14925-14930.
- <sup>18</sup> López-Martínez R., Méndez-Tovar L., Lavalle P., Welsh O., Saul A., Macotela-Ruiz E. 1992. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac. Med. Mex.* 128(4): 477-81.
- <sup>19</sup> González-Ochoa, A. 1975. Geografía de las micosis profundas. *Rev. Invest. Salud Pública.* 35:85-96.
- <sup>20</sup> Mariat F., Destombes P. y Segretain G. 1997. The mycetomas: clinical features, pathology, etiology and epidemiology. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 4: 1-39.
- <sup>21</sup> Salinas-Carmona M.C., Castro-Corona M.A., Licon-Trillo A., Welsh O., Nagesh S., Eisenach K.D., Rendon A. 1997. Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Med.* 7: 47-50.
- <sup>22</sup> S.H. Kaufman. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annual Rev Immunol.* 11:129-63.
- <sup>23</sup> Connell N. 2001. Expresión systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr Opin Biotech.* 12:446-449.

- 
- <sup>24</sup> Wu Gang., Nie L. y Zhang W. 2005. Predicted highly expressed genes in *Nocardia farcinica* and the implication for its primary metabolism and nocardial virulence. *A van Leeuw*. Jan;89(1):135-46. Epub 2006 Feb 23.
- <sup>25</sup> Beaman L, Beaman BL. 1990. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect Immun*. Sep;58(9):3122-8.
- <sup>26</sup> Gibson CM y Caparon MG. 1996. Insertional Inactivation of *Streptococcus pyogenes* sod Suggests that prtF Is Regulated in Response to a Superoxide Signal. *Jour.Bacteriol*. 178 (15): 4688-4695.
- <sup>27</sup> Gort, A. S., D. M. Ferber, and J. A. Imlay. 1999. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 32:179-191.
- <sup>28</sup> Shigemori H., Komaki H., Yazawa K., Mikami Y., Nemoto A., Tanaka Y., Sasaki Y., Ishida T. and Kobayashi J. 1998. Brasilicardin A A novel tricyclic metabolite with potent immunosuppressive activity from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Org. Chem*. 63: 6900-6904.
- <sup>29</sup> Medina-Villanueva I. I. 2008. "Papel de las Superóxido Dismutasa en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*". Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.
- <sup>30</sup> Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner, and K. Heeg. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol*. 160:3627-3630
- <sup>31</sup> Guimares C., Castro L., Sotto M: 2003. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop*. 87: 377-384.
- <sup>32</sup> Maghoub E. 1978. Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, nu/nu strain with micetoma agents. *Sabouraudia*. 16: 225-228.
- <sup>33</sup> Folb P., Timme A., Horowitz A. 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic nude mice and in other inbred Mouse Straits. *Infec. Immun*. 18: 459-466.
- <sup>34</sup> Rico G., Ochoa R., Oliva A., Gonzalez-mendoza A., Walker S., Ortiz-Ortiz L. 1982. Enhanced Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B Cells. *J. immunol*. 129 (4): 1688-1693.

- 
- <sup>35</sup> Salinas-Carmona M., Vera L., Welsh O., Rodriguez M. 1992. Antibody Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in Man. *Zhl. Bakt.* 276: 390-397.
- <sup>36</sup> Salinas Carmona M.C., Pérez L.I., Welsh O., Rodriguez M., Rinaldi G. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Med.* 2: 182-188
- <sup>37</sup> González-Ochoa A., Shibayama H., Félix D. y Anaya M. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Proceedings of XII International Congress of Dermatology, p. 542-551, Washington D.C. U.S.A.
- <sup>38</sup> Mendez-Tovar LJ, Mondragon-Gonzalez R, Manzano-Gayosso P, Lopez-Martinez R, Hernandez Hernandez F, Bonifaz A, Anides Fonseca A, Araiza J, Vega-Lopez F. 2004. Immunoglobulins in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Rev Argent Microbiol.* Oct-Dec;36(4):174-8
- <sup>39</sup> Salinas-Carmona M.C., Torres-López E. 1997. Role of Pasive Humoral Immunity in Experimental Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Microbial Phatogenesis and Immune Response II. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 797: 263-265.
- <sup>40</sup> Licón-Trillo A., Castro-Corona M., Salinas-Carmona M.C. 2003. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *Immun. Med. Microbiol.* 37: 37-44.
- <sup>41</sup> Beaman B.L., Black C.M., Doughty F., Beaman L. 1985. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia* asteroids: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Inf Immun.* 47: 135:141.
- <sup>42</sup> Flesch I.E.A, Kaufmann, S.H.E. 1988. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* 56; 1464-69
- <sup>43</sup> Alford, C. E., King T. E. Jr. Campbell P.A. 1991. Role of transferrin, transferrin receptors, and iron in macrophage listericidal activity. *J. Exp. Med.* 174; 459-66
- <sup>44</sup> Mosser David. 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of LeukocyteBiology.* 73:209-212
- <sup>45</sup> Underhill D.M, Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of Microbes Complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825-52
- <sup>46</sup> Sendide K, Reiner NE, Lee JS, Bourgoïn S, Talal A, Hmama Z. 2005. Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of

---

mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1. *J Immunol.* Apr 1;174(7):4210-9.

<sup>47</sup> Rosas-Taraco AG, Arce-Mendoza AY, Caballero-Olin G, Salinas-Carmona MC. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* upregulates coreceptors CCR5 and CXCR4 while HIV modulates CD14 favoring concurrent infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Jan;22(1):45-51

<sup>48</sup> Nimmerjahn F., Ravetch J. 2006. Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity.* 24: 19-28.

<sup>49</sup> Facsinay A., Kimple S., Hellwing S., van Lent P., Hofhuis F, van Ojik H., Sedlik C., Silveira S., Gerber J., Jong Y., Roozendaal R., Aarden L., van den Berg W., Saito T., Mosser D., Amigorena S., Izui S., van Ommen G., van Vugh M., van de Winkel J., Verbeek : 2002. FcγRI (CD64) Contributes Substantially to Severity of Arthritis, Hypersensitivity Responses, and Protection from Bacterial Infection. *Immunity.* 16: 391-402.

<sup>50</sup> Melo M., Catchpole I., Haggart G., Stokes R. 2000. Utilization of CD11b Knockout Mice to Characterize the Role of Complement Receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Macrophages. *Cell. Immun.* 205: 13-23.

<sup>51</sup> Rooyackers A., Stokes R. 2005. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microb. Pathog.* 39: 57-67.

<sup>52</sup> Taborda C., Casadevall A. 2002. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11C/CD18) Are Involved in Complement-Independent Antibody-Mediated Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity.* 16: 791-802.

<sup>53</sup> Stevens, M. G., G. W. Pugh, Jr., and L. B. Tabatabai. 1992. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.* 60:4407-4409.

<sup>54</sup> Jiang, X., and C. L. Baldwin. 1993. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 61:124-134.

<sup>55</sup> Pereira CA, Modolell M, Frey JR y Lefkovits I. 2004. Gene expresión in IFN-γ-activated murine macrophages. *Braz. Journ. Med & Biol Res.* 37:1795-1809.

- 
- <sup>56</sup> Silva C., Faccioli L. 1992. Tumor Necrosis Factor and Macrophage Activation Are Important in Clearance of *Nocardia brasiliensis* from the Livers and Splees of Mice. *Inf. Immun.* 60(9): 3566-3570.
- <sup>57</sup> Solis-Soto J., Quintanilla-Rodríguez L., Meester I., Segoviano-Ramírez J., Vázquez-Juárez J., Salinas-Carmona M.C. 2008. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol. Histopathol.* 23: 573-581.
- <sup>58</sup> Salinas-Carmona M.C., Pérez-Rivera I. 2004. Humoral Immunity through Immunoglobulin M Protects Mice from an Experimental Actinomycetoma Infection by *Nocardia brasiliensis*. *Inf Immun.* 72(10): 5597-5604.
- <sup>59</sup> Fabrizio K., Groner A., Boes M., Pirofski L. 2007. A Human Monoclonal Immunoglobulin M Reduces Bacteremia and Inflammation in a Mouse Model of Systemic Pneumococcal Infection. *Clin. Vac. Immunol.* 14(4): 382-390.
- <sup>60</sup> Mukherjee J., Scharff M., Casadevall A. 1992. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 60: 4534-4541.
- <sup>61</sup> Finlay B., Cossart P. 1997. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. *SCIENCE.* 276: 718-725.
- <sup>62</sup> Feilmeier B., Iseminger G., Schroeder D., Webber H., Phillips G. 2000. Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182 (14): 4068-4076.
- <sup>63</sup> Barker L., Brooks D., Small L. 1998. The identification of Mycobacterium marinum genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Molec. Microbiol.* 29: 1167-1177.
- <sup>64</sup> March J., Rao G., Bentley W. 2003. Biotechnological applications of Green Fluorescent Protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 303-315.
- <sup>65</sup> Karunakaran R., Mauchline T., Hosie A., Poole P. 2005. A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for study gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology.* 151: 3249-3256.
- <sup>66</sup> Espinoza-Ruiz Marisol. 2006. Tesis Doctoral "Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in Vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c". U.A.N.L.
- <sup>67</sup> Treviño-Villarreal J.H. 2009. Tesis Doctoral "El papel de los Lípidos de Superficie de *Nocardia brasiliensis* en el Establecimiento del Actinomicetoma Experimental". U.A.N.L.

- 
- <sup>68</sup> Filice G., Beaman B., Remington J. 1980. Effects of Activated Macrophages on *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* 27(2): 643-649.
- <sup>69</sup> Barry D.P y Beaman B.L. 2006. *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells. *Res. Microbiol.* 158:86-96.
- <sup>70</sup> Byrne G.I., Ojcius D.M. 2004. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microb.* 2: 802-808.
- <sup>71</sup> Clifton D.R, Goss R.A, Sahni S.K. van Antwerp D., Baggs R.B, Marder V.J., Silverman D.J., Sporn L.A. 1998. NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4646-4651
- <sup>72</sup> Koguchi Y., Khono J., Suzuki S., Nishio M., Takahashi K., Ohnuki T., Komatsubara S. 1999. TMC-86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from *Streptomyces* sp. TC 1084 and *Saccharothrix* sp. TC1094 I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. Tokio.* 52:1069-1076
- <sup>73</sup> Danelishvili L., McGarvey J., Li Y.J., Bermudez L.E. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell. Microb.* 5:649-660
- <sup>74</sup> Zuñiga J.M. 2003. Tesis Doctoral. "Efecto de mediadores inmunológicos en la producción de citocinas por macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*". UANL
- <sup>75</sup> Pérez R. I. 2005. Tesis Doctoral. "Comparación del Efecto Protector de la Respuesta Inmune Humoral Inducida por Antígenos Solubles y Particulados de *Nocardia brasiliensis*". UANL
- <sup>76</sup> Méndez-Tovar L., Mondragón -Gonzalez R., Vega-López F., Dockrell H., Hay R., López-Marínez R., Manzano-Gayosso P., Hernández-Hernández F., Padilla-Desgarenes C., Bonifaz A. 2004. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathol.* 158:407-414.
- <sup>77</sup> Castro Corona M. A. 1995. Tesis de Maestría. "Obtención de Anticuerpos monoclonales para buscar a la proteína inmunodominante de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*". UANL.
- <sup>78</sup> González Suárez M. 2009. "Inmunidad Pasiva con anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-p61 en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*". UANL.

---

<sup>79</sup> PanW., Ogunremi O., Wei G., Shi M, Tabel H. 2006. CR3 (CD11b/CD18) is the major macrophage receptor for IgM antibody-mediated phagocytosis of African trypanosomes: diverse effect on subsequent synthesis of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Microbes Infect.* 8(5):1209-18

<sup>80</sup> Vollomers P., Brändlein S. 2007. Tumors: Two swet to remember?. *Molec. Cancer.* 6(78)

## CAPITULO 12.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A., Lichtman A. 2004. Inmunología Celular y Molecular. 5ta Edición de la Obra en Inglés Elsevier Science.
2. Casadevall A., Pirofski L.A. 2007. Accidental virulence, cryptic patogénesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Enviromental Microbes. *Eukaryotic Cell*. 6 (12): 2169-2174
3. Salinas-Carmona M.C., Torres-López E., Ramos I. A., Licon-Trillo A., Gonzalez-Spencer D. 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Inf. Immun.* 67(5):2428-2432
4. Salinas-Carmona M., Welsh O., Casillas S. 1993. Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation With Mycetoma Infections. *J. Clin. Microb.* 31 (11): 2091-2906.
5. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M., Welsh O., Rodriguez M. 1992. Isolation and Purification of Two Immunodominant Antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J Clin. Microbiol.* 30 (5): 1183-1188.
6. Beaman B.L., Beaman L. 1994. *Nocardia* species: Host-parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 7 (2):213-264.
7. Ruimy R., Riegel P., Carlotti A., Boiron P., Bernandin G., Monteil H., Wallace Jr R. Christen R. 1996. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. Nov., a new species of *Nocardia* wich groups bacterial Straits previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 259-264.
8. Salinas-Carmona MC. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. Review. *Microb & Infect.* 2.1373-1381
9. Serrano J.A, Sandoval H.A, Beaman B.L. 2007. Actinomicetoma. Plaza y Valdez Editores, México.
10. McNeil M.M, Brown JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:357-417.

11. Boiron P, Locci R, Goodfellow M, Guma SA, Isik K, Kim B, McNeil MM, Salinas-Carmona MC, Shojaei H. 1998. *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma. *Med Mycol.* 36 Suppl 1:26-37.
12. Baeck K., Kim H., Oh M., Yoon B., Lee I. 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J environ. Sc. Health.* 39: 2465-2472.
13. Benavides-López J., Quintero G., Guevara-Vizcaíno A., Jaimes-Cáceres D., Guitierrez-Riñao S., Miranda-García J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo. *NOVA.* 4:82-90.
14. Hubble J.P., Cao T., Kjelstrom J.A., Koller W.C. and Beaman B.L. 1995. *Nocardia* species as an etiologic agent in Parkinson's disease: serological testing in a case-control study. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2768-2769.
15. Beaman B. L. y Maslan S. 1977. Effect of cyclophosphamide in experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. *Infect. Immun.* 16:995-1004.
16. Saubolle M., Sussland D. 2003. Nocardiosis: Review of clinical and laboratory experience. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4497-4501.
17. Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T. and Hattori M. 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14925-14930.
18. López-Martínez R., Méndez-Tovar L., Lavalle P., Welsh O., Saul A., Macotela-Ruiz E. 1992. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac. Med. Mex.* 128(4): 477-81.
19. González-Ochoa, A. 1975. Geografía de las micosis profundas. *Rev. Invest. Salud Pública.* 35:85-96.
20. Mariat F., Destombes P. y Segretain G. 1997. The mycetomas: clinical features, pathology, etiology and epidemiology. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 4: 1-39.
21. Salinas-Carmona M.C., Castro-Corona M.A., Licon-Trillo A., Welsh O., Nagesh S., Eisenach K.D., Rendon A. 1997. Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Med.* 7: 47-50.
22. S.H. Kaufman. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annual Rev Immunol.* 11:129-63.

23. Connell N. 2001. Expresión systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr Opin Biotech.* 12:446-449.
24. Wu Gang., Nie L. y Zhang W. 2005. Predicted highly expressed genes in *Nocardia farcinica* and the implication for its primary metabolism and nocardial virulence. *A van Leeuw.* Jan;89(1):135-46. Epub 2006 Feb 23.
25. Beaman L, Beaman BL. 1990. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect Immun.* Sep;58(9):3122-8.
26. Gibson CM y Caparon MG. 1996. Insertional Inactivation of *Streptococcus pyogenes* sod Suggests that prtF Is Regulated in Response to a Superoxide Signal. *Jour.Bacteriol.* 178 (15): 4688-4695.
27. <sup>1</sup> Gort, A. S., D. M. Ferber, and J. A. Imlay. 1999. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32:179-191.
28. Shigemori H., Komaki H., Yazawa K., Mikami Y., Nemoto A., Tanaka Y., Sasaki Y., Ishida T. and Kobayashi J. 1998. Brasilicardin A A novel tricyclic metabolite with potent immunosuppressive activity from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Org. Chem.* 63: 6900-6904.
29. Medina-Villanueva I. I. 2008. "Papel de las Superóxido Dismutasa en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*". Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.
30. Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner, and K. Heeg. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 160:3627-3630
31. Guimares C., Castro L., Sotto M: 2003. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cels in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop.* 87: 377-384.
32. Maghoub E. 1978. Experimental infection of athymic nude New Zeland mice, nu/nu strain with micetoma agents. *Sabouraudia.* 16: 225-228.
33. Folb P., Timme A., Horowitz A. 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic nude mice and in other inbred Mouse Straits. *Infec. Immun.* 18: 459-466.

34. Rico G., Ochoa R., Oliva A., Gonzalez-mendoza A., Walker S., Ortiz-Ortiz L. 1982. Enhanced Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B Cells. *J. immunol.* 129 (4): 1688-1693.
35. Salinas-Carmona M., Vera L., Welsh O., Rodriguez M. 1992. Antibody Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in Man. *Zhl. Bakt.* 276: 390-397.
36. Salinas Carmona M.C., Pérez L.I., Welsh O., Rodriguez M., Rinaldi G. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Med.* 2: 182-188
37. Gónzalez-Ochoa A., Shibayama H., Félix D. y Anaya M. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Proceedings of XII International Congress of Dermatology, p. 542-551, Washington D.C. U.S.A.
38. Mendez-Tovar LJ, Mondragon-Gonzalez R, Manzano-Gayosso P, Lopez-Martinez R, Hernandez Hernandez F, Bonifaz A, Anides Fonseca A, Araiza J, Vega-Lopez F. 2004. Immunoglobulins in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Rev Argent Microbiol.* Oct-Dec;36(4):174-8
39. Salinas-Carmona M.C., Torres-López E. 1997. Role of Pasive Humoral Immunity in Experimental Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Microbial Phatogenesis and Immune Response II. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 797: 263-265.
40. Licón-Trillo A., Castro-Corona M., Salinas-Carmona M.C. 2003. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *Immun. Med. Microbiol.* 37: 37-44.
41. Beaman B.L., Black C.M., Doughty F., Beaman L. 1985. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia* asteroids: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Inf Immun.* 47: 135:141.
42. Flesch I.E.A, Kaufmann, S.H.E. 1988. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* 56; 1464-69
43. Alford, C. E., King T. E. Jr. Campbell P.A. 1991. Role of transferrin, transferrin receptors, and iron in macrophage listericidal activity. *J. Exp. Med.* 174; 459-66

44. Mosser David. 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 73:209-212
45. Underhill D.M, Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of Microbes Complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825-52
46. Sendide K, Reiner NE, Lee JS, Bourgoin S, Talal A, Hmama Z. 2005. Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1. *J Immunol.* Apr 1;174(7):4210-9.
47. Rosas-Taraco AG, Arce-Mendoza AY, Caballero-Olin G, Salinas-Carmona MC. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* upregulates coreceptors CCR5 and CXCR4 while HIV modulates CD14 favoring concurrent infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Jan;22(1):45-51
48. Nimmerjahn F., Ravetch J. 2006. Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity.* 24: 19-28.
49. Facsinay A., Kimple S., Hellwing S., van Lent P., Hofhuis F, van Ojik H., Sedlik C., Silveira S., Gerber J., Jong Y., Roozendaal R., Aarden L., van den Berg W., Saito T., Mosser D., Amigorena S., Izui S., van Ommen G., van Vugh M., van de Winkel J., Verbeek : 2002. FcγRI (CD64) Contributes Substantially to Severity of Arthritis, Hypersensitivity Responses, and Protection from Bacterial Infection. *Immunity.* 16: 391-402.
50. Melo M., Catchpole I., Haggart G., Stokes R. 2000. Utilization of CD11b Knockout Mice to Characterize the Role of Complement Receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Macrophages. *Cell. Immun.* 205: 13-23.
51. Rooyackers A., Stokes R. 2005. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microb. Phatog.* 39: 57-67.
52. Taborda C., Casadevall A. 2002. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11C/CD18) Are Involved in Complement-Independent Antibody-Mediated Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity.* 16: 791-802.
53. Stevens, M. G., G. W. Pugh, Jr., and L. B. Tabatabai. 1992. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.* 60:4407-4409.

54. Jiang, X., and C. L. Baldwin. 1993. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 61:124-134.
55. Pereira CA, Modolell M, Frey JR y Lefkovits I. 2004. Gene expresión in IFN- $\gamma$ -activated murine macrophages. *Braz. Journ. Med & Biol Res.* 37:1795-1809.
56. Silva C., Faccioli L. 1992. Tumor Necrosis Factor and Macrophage Activation Are Important in Clearance of *Nocardia brasiliensis* from the Livers and Splees of Mice. *Inf. Immun.* 60(9): 3566-3570.
57. Solis-Soto J., Quintanilla-Rodriguez L., Meester I., Segoviano-Ramírez J., Vázquez-Juarez J., Salinas-Carmona M.C. 2008. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines Turing the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol. Histopathol.* 23: 573-581.
58. Salinas-Carmona M.C., Pérez-Rivera I. 2004. Humoral Immunity through Immunoglobulin M Protects Mice from an Experimental Actinomycetoma Infection by *Nocardia brasiliensis*. *Inf Immun.* 72(10): 5597-5604.
59. Fabrizio K., Groner A., Boes M., Pirofski L. 2007. A Human Monoclonal Immunoglobulin M Reduces Bacteremia and Inflammation in a Mouse Model of Systemic Pneumococcal Infection. *Clin. Vac. Imuunol.* 14(4): 382-390.
60. Mukherjee J., Scharff M., Casadevall A. 1992. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infec. Immun.* 60: 4534-4541.
61. Finlay B., Cossart P. 1997. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Phatogens. *SCIENCE.* 276: 718-725.
62. Feilmeier B., Iseminger G., Schroeder D., Webber H., Phillips G. 2000. Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182 (14): 4068-4076.
63. Barker L., Brooks D., Small L. 1998. The identification of Mycobacterium marinum genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Molec. Microbiol.* 29: 1167-1177.
64. March J., Rao G., Bentley W. 2003. Biotechnological applications of Green Fluorescent Protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 303-315.

65. Karunakaran R., Mauchline T., Hosie A., Poole P. 2005. A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for study gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 151: 3249-3256.
66. Espinoza-Ruiz Marisol. 2006. Tesis Doctoral "Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in Vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c". U.A.N.L.
67. Treviño-Villarreal J.H. 2009. Tesis Doctoral "El papel de los Lípidos de Superficie de *Nocardia brasiliensis* en el Establecimiento del Actinomicetoma Experimental". U.A.N.L
68. Filice G., Beaman B., Remington J. 1980. Effects of Activated Macrophages on *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* 27(2): 643-649.
69. Barry D.P y Beaman B.L. 2006. *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells. *Res. Microbiol.* 158:86-96.
70. Byrne G.I., Ojcius D.M. 2004. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions o fan intracellular phatogen. *Nat. Rev. Microb.* 2: 802-808.
71. Clifton D.R, Goss R.A, Sahni S.K. van Antwerp D., Baggs R.B, Marder V.J., Silverman D.J., Sporn L.A. 1998. NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Ricketssia rickettsii* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4646-4651
72. Danelishvili L., McGarvey J., Li Y.J., Bermudez L.E. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell. Microb.* 5:649-660
73. Koguchi Y., Khono J., Suzuki S., Nishio M., Takahashi K., Ohnuki T., Komatsubara S. 1999. TMC-86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors form *Streptomyces* sp. TC 1084 and *Saccharothrix* sp. TC1094 I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. Tokio.* 52:1069-1076
74. Zuñiga J.M. 2003. Tesis Doctoral. "Efecto de mediadores inmunológicos en la producción de citocinas por macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*". UANL
75. Pérez R. I. 2005. Tesis Doctoral. "Comparación del Efecto Protector de la Respuesta Inmune Humoral Inducida por Antígenos Solubles y Particulados de *Nocardia brasiliensis*". UANL

76. Méndez-Tovar L., Mondragón -Gonzalez R., Vega-López F., Dockrell H., Hay R., López-Marínez R., Manzano-Gayosso P., Hernández-Hernández F., Padilla-Desgarenes C., Bonifaz A. 2004. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathol.* 158:407-414.
77. Castro Corona M. A. 1995. Tesis de Maestría. "Obtención de Anticuerpos monoclonales para buscar a la proteína inmunodominante de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*". UANL.
78. González Suárez M. 2009. "Inmunidad Pasiva con anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-p61 en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*. UANL.
79. PanW., Ogunremi O., Wei G., Shi M, Tabel H. 2006. CR3 (CD11b/CD18) is the major macrophage receptor for IgM antibody-mediated phagocytosis of African trypanosomes: diverse effect on subsequent synthesis of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Microbes Infect.* 8(5):1209-18
80. Vollomers P., Brändlein S. 2007. Tumors: Two swet to remember?. *Molec. Cancer.* 6(78)

## APÉNDICE A

Primers usados para amplificación de los promotores de SOD, LacZ y Gentamicina.

SODAOrf	5' AGGAAGATGCATCGTGGCTGAG 3'
SODAFin	5' AAGCTTGATCAGCCGAAGAAGAGGCCCTTG 3'
PCR	5' GGATCGAATTCATTAGGTGGCGG 3'
PCF	5' GTGACGGTACCATACGCACACCG 3'
PromGentaFin	5' GTTGGGATCCACTAGTATCGTTGCTG 3'
PromSODA-PciI	5' GTGCAGTAACATGTGCTAACCGATCGGGTGTAG 3'
GFPBgIII	5' GTGCAGTAAGATCTGTGAGCAAGGGCGAGGAAC 3'