

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina Interna
Servicio de Dermatología



“EFECTO DEL SUBCULTIVO EN LA VIRULENCIA DE
***Nocardia brasiliensis*”**

Por

DRA. JANETH ALEJANDRA ALMAGUER CHÁVEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Septiembre, 2013

**“EFECTO DEL SUBCULTIVO EN LA VIRULENCIA DE *NOCARDIA
BRASILIENSIS*”**

Aprobación de la Tesis:

DR. Sc. LUCIO VERA CABRERA
Director de Tesis

DR. med. OLIVERIO WELSH LOZANO
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. med. JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. Sc. JORGE ENRIQUE CASTRO GARZA
Miembro de la Comisión de Tesis

DRA. Sc. ROSA MARÍA HINOJOSA ROBLES
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“EFECTO DEL SUBCULTIVO EN LA VIRULENCIA DE *NOCARDIA
BRASILIENSIS*”**

Presentado por:

M.C.P. Janeth Alejandra Almaguer Chávez

Desarrollado en:

**Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología y el
Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano
del Seguro Social**

Bajo la Dirección de:

DR. Sc. LUCIO VERA CABRERA
Director de Tesis

Y la Co-Dirección de:

DR. med. OLIVERIO WELSH LOZANO
Co-Director de la Comisión de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios, a mi familia y esposo por todo el apoyo, comprensión y paciencia que me han brindado, especialmente en esta etapa de mi formación académica.

Deseo agradecer enormemente al Dr. Sc Lucio Vera Cabrera, quien siempre me ha apoyado en todo el camino y quien sin su guía y su hambre de conocimiento, esto no hubiera sido posible.

Al Dr. med. Oliverio Welsh Lozano y al Dr. Jorge Ocampo Candiani, por ser mentores en mi formación como dermatóloga, por su sabiduría, su apoyo incondicional y cariño; por mantener siempre las puertas abiertas y por permitirme aprender de ustedes, gracias.

Al MVZ Héctor Gerardo Lozano Garza, al Dr. Sc. Jorge Castro Garza y al Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo incondicional brindado en la realización de los ensayos experimentales.

También a la Dra. Sc. Rosa María Hinojosa Robles, Dr. Sc. José Carlos Jaime Pérez, quienes con su apoyo y aliento me llevaron a la conclusión de este trabajo.

A mis queridas compañeras de laboratorio Wendy Escalante, Paola Rivera y Carmen Molina, por enseñarme y apoyarme en el manejo dentro del laboratorio de investigación y, por sus consejos, gracias.

Y finalmente, a todas aquellas personas que han sido una gran influencia en mi vida profesional: mis amigos, compañeros y maestros,

Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1.0 INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Historia.....	2
1.2 Generalidades.....	2
1.3 Distribución Geográfica.....	3
1.4 Etiopatogenia.....	5
1.4.1 Virulencia.....	13
2.0 MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA: ANTECEDENTES.....	16
2.1 Atenuación bacteriana.....	18
3.0 IMPORTANCIA.....	27
4.0 ORIGINALIDAD.....	28
5.0 JUSTIFICACIÓN.....	29
6.0 HIPÓTESIS.....	30
7.0 OBJETIVOS.....	31
7.1 Objetivo General.....	31
7.2 Objetivos Específicos.....	31
8.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
8.1 Recursos Biológicos.....	32
8.2 Recursos Materiales.....	33

8.3	Recursos Financieros.	37
8.4	Recursos Metodológicos.	37
8.4.1	Preparación de los subcultivos.	37
8.4.2	Ensayos experimentales en murinos.	39
8.4.3	Resistencia a la infección en los Grupos T ₁₀₀ y T ₁₃₀	42
8.4.4	Estudio histopatológico e inmunohistoquímico comparativo de las cepas T ₀ y T ₁₃₀	43
8.4.5	Análisis estadístico.	44
9.0	RESULTADOS.	46
9.1	Resultados para el objetivo 1: Subcultivo de la cepa <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1 en medio líquido hasta 130 pases.	46
9.2	Resultados para el objetivo 2: Realización de ensayos de infección en ratones BALB/c con la cepa <i>Nocardia</i> <i>brasiliensis</i> HUJEG-1 (control) y con las cepas subcultivadas en 40, 80, 100 y 130 ocasiones.	46
9.3	Resultados para el objetivo 3: Determinación del desarrollo de resistencia a la infección en los grupos de subcultivo T ₁₀₀ y T ₁₃₀	53
9.4	Resultados para el objetivo 4: Realización de estudio histopatológico e inmunohistoquímico comparativo entre el grupo control y grupo T ₁₃₀	56
10.0	DISCUSIÓN.	64
11.0	REFERENCIAS.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
FIGURA 1. Esquema de la obtención de los subcultivos	39
FIGURA 2. Ensayos de infección en ratones BALB/c.	41
FIGURA 3. Escala de medición de micetoma por sistema de cruces	42
FIGURA 4. Esquema de re-inoculación con <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1 sin subcultivar	54
FIGURA 5. Resultados de histopatología H&E grupo T ₀ (control) para las semanas 1, 3, 5 y 7	57
FIGURA 6. Resultados de histopatología H&E grupo T ₀ (control) para la semana 12	58
FIGURA 7. Resultados de histopatología H&E grupo T ₁₃₀ retado con <i>N. brasiliensis</i> HJEG-1 sin subcultivar para las semanas 1, 3, 5 y 7 .	60
FIGURA 8. Resultados de histopatología H&E grupo T ₁₃₀ retado con <i>N. brasiliensis</i> HJEG-1 sin subcultivar para la semana 12	61
FIGURA 9. Resultados de inmunohistoquímica <i>N. brasiliensis</i> HJEG-1 no subcultivada para la semana 5 postinfección	62
FIGURA 10. Resultados de inmunohistoquímica en ratones inoculados con T ₁₃₀ y retados con <i>N. brasiliensis</i> HJEG-1 no subcultivada semana 5 postinfección	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
TABLA 1. Desarrollo de micetoma en ratones BALB/c infectados con <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 subcultivadas	53
TABLA 2. Resultados de inmunohistoquímica de biopsias contra CD4, CD8 y CD14	63

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μm	Micras, unidad de medida
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza
BALB/c	Variedad de ratón albino criada en el laboratorio de la especie <i>Mus musculus</i>
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Pares de bases
CFP-10	Culture Filtrate Protein 10
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target-6
kDa	Protein
H&E	Hematoxilina y Eosina
hr	Hora
kDa	kilodalton
M	Molar
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
OMS	Organización Mundial de la Salud

OKT-4	Marcadores de superficie de las células T, llamadas también CD4
OKT-8	Marcadores de superficie de las células T, llamadas también CD8
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina isotónica tamponada con fosfato
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
pH	<i>pondus Hydrogenium</i> . Concentración de iones hidrógeno en una solución
PMN	Células polimorfonucleares
RD	Región de Diferencia
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	superóxidodismutasa
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> o "Statistical Product and Service Solutions"
TDCM	Dicorynomicolato-trehalosa
TDNM	Dinocardiomicolato-trehalosa

RESUMEN

Janeth Alejandra Almaguer Chávez

Fecha de Graduación: Jun, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **“EFECTO DEL SUBCULTIVO EN LA VIRULENCIA DE *Nocardia brasiliensis*”**

Número de páginas: 75

Candidato para el grado de Doctor en Medicina

Área de Estudio: Medicina

Propósito y Método del Estudio: *Nocardia brasiliensis* es un actinomiceto saprófito responsable de originar micetoma en el humano y en animales. La virulencia de *Nocardia brasiliensis* hasta hoy, no ha sido definida completamente. La disminución de la virulencia mediante el subcultivo seriado de otros microorganismos tiene un efecto importante en la atenuación de su virulencia, un ejemplo es *Mycobacterium bovis* que sigue aún utilizándose como vacuna (BCG) en el programa de la Organización Mundial de la Salud. En el presente estudio se llevó a cabo la manipulación de *N. brasiliensis* HUJEG-1 mediante 130 subcultivos seriados con el propósito de atenuar su virulencia; y se probó en un modelo murino de infección experimental comparativo con cepas de diferentes grados del subcultivo. Las lesiones obtenidas en los distintos grupos fueron analizadas y las inducidas por la cepa 130 fueron evaluadas mediante estudio histopatológico e inmunohistoquímico. Finalmente se evaluó el desarrollo de resistencia a la infección en los grupos que fueron previamente sensibilizados con las cepas 100 y 130.

Contribuciones y Conclusiones: Se comprobó que el subcultivo por pasaje seriado de *N. brasiliensis* produce atenuación en la virulencia de esta bacteria; ya que a medida que avanzan los subcultivos, su capacidad para desarrollar micetoma disminuye, formando micetomas en menor número y tamaño comparado con el grupo control. En el grupo previamente sensibilizado por la cepa 130 se correlacionó la gran cantidad de macrófagos espumosos y el intenso infiltrado de células mononucleares con la destrucción de los granos de *N. brasiliensis* y la cura de las lesiones en la mayoría de los ratones, lo que se interpretó como una resistencia parcial a la infección.

Firma del director de tesis _____

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA

La mayor importancia histórica del micetoma se halla en la provincia de Madura en India, de ahí su sinonimia de “pie de Madura” o “maduromicosis”. Fue descrita por primera vez por John Gill en el año de 1842 en ese distrito de la India. Se reportaron a los géneros *Madurella* y *Actinomadura* en 1860. Sabemos que *Nocardia* es ubicuo en el ambiente y pueden distribuirse mundialmente como componentes saprofitos en agua fresca salada, suelo, polvo, vegetación en descomposición e incluso en materia fecal de animales¹. El micetoma fue reconocido como enfermedad en 1861.

1.2 GENERALIDADES

El micetoma es una enfermedad local, crónica y progresiva de la piel, que puede afectar también al tejido subcutáneo, óseo y vísceras en algunas ocasiones². Es causado por una variedad de agentes etiológicos que pueden ser de origen micótico (eumicetoma) o bacteriano (actinomicetoma), los cuales se organizan en grupos o agregados de hifas o filamentos bacterianos, según sea el agente causal, constituyendo granos que pueden ser de diversos tamaños, colores y consistencias, esto, dependiendo de la

especie que cause el micetoma. Existen al menos 20 especies de actinomicetos y hongos que pueden causar micetomas³. La variedad más frecuente en nuestro país es el actinomicetoma y entre sus agentes causales encontramos a: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidis-caviarum*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*. Los agentes causantes del eumicetoma incluyen: *Pseudallescheria boydii*, *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Exophiala jeanselmei*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Neotestudina rosatii*, *Arthrographis kalrae* y especies de *Fusarium*, *Corynespora*, *Polycytella*, *Cylindrocarpon*, *Curvularia* y *Acremonium* entre otros^{3,4}.

La infección clásica producida por *N. brasiliensis* en el humano es el micetoma actinomicótico.

1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El micetoma es una enfermedad que puede presentarse en cualquier parte del mundo, especialmente en las regiones intertropicales, entre el ecuador y el Trópico de Cáncer, sin embargo, conocemos que algunas especies de actinomicetos son más prevalentes en ciertas áreas geográficas con características climatológicas especiales del clima. El ejemplo más característico lo representa *N. brasiliensis* que se aísla de regiones tropicales o subtropicales predominando entre las latitudes 15°S y 30°N⁵.

Actualmente, esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial con predominio en las zonas tropicales y menos frecuentemente en las zonas templadas. La mayoría de casos reportados provienen de México, América del Sur y África y muy pocos casos reportados en Estados Unidos^{3,6,7}. También se reportan casos en India, Arabia Saudita, Venezuela, Yemen y un área en “cinturón” del desierto de Sahara de África que se extiende desde Senegal en la costa oeste, atraviesa Mali, Nigeria, Congo y Sudán hasta la costa este en Somalia. En Europa, ha sido descrito esporádicamente desde 1968 cuando fue aislado *N. brasiliensis* en Checoslovaquia, posteriormente se reportaron casos esporádicos en Alemania, Suiza, Grecia, Holanda y Francia; en Italia el micetoma por *N. brasiliensis* fue reportado por primera vez en 1997 en un individuo inmunocompetente de 55 años con antecedente de lesión subcutánea^{5,8}.

La causa más frecuente de micetoma en Estados Unidos y Canadá es *P. boydii*, mientras que *M. mycetomatis* y *S. somaliensis* predominan en las áreas de África e India. En Japón, *N. asteroides* es el agente más frecuentemente encontrado. En México y América Central, *N. brasiliensis* y *A. madurae* son los agentes más frecuentes^{3,9}.

A nivel mundial, México es el país que tiene mayor número de casos de actinomycetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. La causa principal de micetoma son los actinomicetos hasta en un 98% de los casos y *Nocardia brasiliensis* contribuye hasta en un 86.6% de éstos^{5,10}. En nuestro medio, el estado de Nuevo León y el Hospital Universitario “Dr. José E. González” se ha convertido en un sitio de referencia para la atención de micetomas, con

una frecuencia promedio de 8 casos por año, según lo concluido por el Dr. Cantú-Garza en su tesis de especialidad de dermatología de este hospital en el año 2004 y, la gran mayoría atribuidos a *N. brasiliensis*^{3,11,12,13}.

Como podemos observar, la distribución de los agentes causales a nivel mundial es muy variada, pero en este trabajo nos enfocaremos al agente causal más frecuentemente encontrado en México y en nuestro medio el Noreste de México: *N. brasiliensis*.

1.4 ETIOPATOGENIA

Las especies del género *Nocardia* pertenecen al grupo de organismos que contienen ácidos micólicos incluidos en la familia *Nocardiaceae* del suborden *Corynebacterineae*, que incluye *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella* y *Williamsia*¹⁴. *Nocardia* contiene actualmente más de 50 especies que han sido caracterizadas por métodos moleculares y fenotípicos; son bacilos aeróbicos estrictos, Gram positivos, con ramificaciones, cuyas hifas son fragmentadas y adquieren formas cocobacilares. Se considera que de entre las especies aceptadas, la mitad aproximadamente son reconocidas como patógenos humanos y/o animales¹.

La historia taxonómica del género *Nocardia* está llena de controversia y confusión, inicialmente, fue aislado por el veterinario Edmond Nocard en 1888 de un caso de linfadenitis bovina. Un año más tarde, Trevisan caracterizó al organismo y lo nombró *Nocardia farcinica*, pero en los años

posteriores, a través de estudios fenotípicos, se describió que las cepas obtenidas de *Nocardia farcinica* de dos colecciones distintas realmente pertenecían a dos especies diferentes, con lo que se llegó a la caracterización de *Nocardia asteroides*¹.

La definición aceptada para el género *Nocardia* se basa principalmente en información molecular notablemente a partir de la secuencia del gen 16SrRNA. La primer secuenciación genómica completa de un miembro de *Nocardia* se realizó recientemente por Ishikawa et al. en el 2004 y fue la secuencia de *N. farcinica* IFM10152^{15,16,17}. La secuenciación genómica completa de este actinomiceto ha hecho posible desarrollar acercamientos a la expresión genética de otros actinomicetos. El género *Nocardia*, tiene múltiples cadenas que presentan la capacidad de producir moléculas bioactivas y enzimas, similar a los antibióticos¹⁸.

La secuenciación del gen 16SrRNA es considerada una herramienta valiosa para la identificación de *Nocardia spp.* como ya se ha reportado previamente en diversos estudios^{17,18}. La identificación clínicamente significativa de las especies de *Nocardia* es importante para el correcto diagnóstico y tratamiento de la infección producida por éstas. La identificación de las especies de *Nocardia* puede realizarse por diversos métodos: 1) Identificación convencional obtenida mediante características morfológicas con pruebas bioquímicas y pruebas de sensibilidad a drogas; 2) Técnicas moleculares que involucran el análisis de restricción enzimática (PCR-REA) de las porciones 16SrRNA y 65kDa de los genes; 3) Secuenciación de fragmento 999-bp del gen 16SrRNA; 4) Secuenciación de

la fracción parcial 16S ribosomal del rDNA por el Sistema 500 MicroSeq con una base de datos extensa¹⁷. Las especies de *Nocardia* bien caracterizadas y medicamente significativas incluyen a: *N. abscessus*, *N. asteroides*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. transvalensis*, *N. africana*, *N. paucivorans* y *N. veterana*^{3, 17}.

La caracterización fenotípica de *Nocardia spp.* ha sido descrita utilizando pruebas convencionales para identificación de especies incluyendo reactividad a tirosina, xantina e hipoxantina, así como hidrólisis de gelatina, urea y caseína, alcalinización para citrato, producción de ácido a partir de rhamnosa, actividad α -glucosidasa y α -manosidasa y finalmente se han utilizado las pruebas de pyrrolidonyl aminopeptidasa (PYR) y γ -glutamyl aminopeptidasa. En este caso, *N. brasiliensis* resulta positiva a caseína, ureasa, γ -glutamyl aminopeptidasa, α -glucosidasa y α -manosidasa, así como negativa a rhamnosa, citrato y a pyrrolidonyl aminopeptidasa. Es resistente a lisozima y, en las pruebas de sensibilidad a drogas resulta resistente a eritromicina e imipenem^{9, 16,18,19,20}.

Como se ha mencionado previamente, al igual que el género *Mycobacterium* y *Corynebacterium*, *Nocardia* comparte características como componentes de pared celular, presencia y/o tipo de ácidos micólicos, actividad adjuvante, presencia de sulfolípidos, componentes quelantes de hierro, polifosfatos y actividad serológica cruzada^{21,22}. Además, el género *Nocardia* posee una pared celular tipo IV de peptidoglicanos compuesta por ácido meso-diaminopimelico, arabinosa y galactosa^{1,23}.

La especie *N. brasiliensis* fue originalmente descrita por Linderberg en 1909 como *Discomyces brasiliensis*. Otros sinónimos utilizados todavía a principios del siglo XX en la literatura incluyen: *Streptothrix brasiliensis*, *Oospora brasiliensis*, *Actinomyces brasiliensis* y *Actinomyces violaceus* subsp. *brasiliensis*¹.

N. brasiliensis al igual que las características que definen su género, posee una pared celular rica en ácidos micólicos, similares a los encontrados en especies de *Corynebacterium*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* de ahí que puedan comportarse de manera similar en el hospedero^{1,7}. Clínicamente, difiere de otras especies del género, principalmente en que es asociada a una infección cutánea primaria y generalmente en hospederos por lo demás sanos. *N. brasiliensis* es un microorganismo patógeno Gram positivo, no móvil, saprófito, parcialmente ácido-alcohol resistente, e intracelular facultativo que se ha clasificado como un actinomiceto aerobio. Produce filamentos ramificados tanto en el tejido como en los medios de cultivo que al microscopio se observan como filamentos pseudofragmentados en formas coco-bacilares²⁴. Los actinomicetos aerobios producen infecciones en humanos y animales que son difíciles de diagnosticar debido a su presentación clínica inespecífica que puede ser por involucro local o sistémico¹.

Después de la infección, los microorganismos emiten filamentos en los tejidos y se aglomeran en colonias compactas denominadas “granos” (microcolonias). De las lesiones suele drenar un material filante sero-sanguinolento o purulento en el cual se encuentra el agente causal formando

los granos que en ocasiones pueden observarse a simple vista y orientarnos hacia el agente causal según su tamaño y color, por ejemplo si el grano es color rojo, posiblemente se trate de un actinomiceto; si el grano es color negro posiblemente se trate de un eumiceto^{7,25,18}. Al iniciar el proceso de infeccioso sabemos que ocurre en el sitio de la inoculación una reacción supurativa formada principalmente por células polimorfonucleares, fibrosis y neoformación vascular, siendo así una reacción de tipo granulomatoso que se extiende por contigüidad y puede afectar a tejidos profundos. Guimaraes et al, estudiaron el comportamiento histopatológico del actinomicetoma y del eumicetoma; en ambos grupos se observa un infiltrado de linfocitos CD4+ y CD8+ rodeando a los neutrófilos y agregados de macrófagos. El actinomicetoma mostró mayor cantidad de linfocitos CD8+ ($P=0.02$) y macrófagos ($P=0.01$) comparado con las lesiones de eumicetoma; en ambas lesiones se encontró una depleción de células de Langerhans ($P=0.0004$) comparado con la piel normal, pero sin diferencia entre los 2 tipos de micetoma. Los resultados de estos autores sugieren que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la patogénesis del micetoma, explicando parcialmente el curso crónico de la enfermedad y la pobre respuesta a los tratamientos²⁶.

Aunque los mecanismos de patogenicidad de la infección por *Nocardia* aún no han sido del todo elucidados, se puede señalar que la respuesta inmune celular juega un papel importante en la resistencia a la infección, sin embargo, el papel de la respuesta inmune humoral aún es desconocido y algunos autores han señalado que la producción de anticuerpos se asocia con empeoramiento de las lesiones²⁷. Así mismo, se

sabe que *N. brasiliensis* puede sobrevivir al ataque de las células fagocíticas y, en teoría puede prevenirse la infección mediante vacunación. Algunos datos sugieren que proteínas solubles de los patógenos intracelulares inducen protección en animales de experimentación^{28, 29}. La respuesta inmune inducida mediante células bacterianas recombinantes que secretan antígenos es mayor que aquella inducida por antígenos solubles solos. En modelos animales experimentales inmunizados con vectores (vacunas) se induce una fuerte respuesta mediada por células T y protección efectiva en algunos modelos de infección bacteriana³⁰.

Salinas-Carmona y cols, han trabajado intensamente en el desarrollo de la respuesta inmune del hospedero hacia la infección por *Nocardia brasiliensis*; en publicaciones previas identificaron y aislaron antígenos inmunodominantes a partir del suero de pacientes con infección activa y sin tratamiento, los cuales fueron designados como antígenos proteicos con peso molecular de 61, 26 y 24 kilodaltones (Kd) que se han denominado P61, P26 y P24 respectivamente^{7,27-35}.

Se ha descrito que inmediatamente después de dos semanas de la inoculación en el cojinete plantar del ratón experimental con *N. brasiliensis*, se observan depósitos de inmunoglobulinas y factor C3 de la vía del complemento (C3) en el tejido del sitio de inoculación. Las inmunoglobulinas y C3 se encuentran en los granos actinomicóticos que caracterizan al micetoma y, en el tejido inflamatorio que rodea el sitio de inoculación se observaron células plasmáticas. Aunque los anticuerpos específicos anti-*N. brasiliensis* se pueden llegar a evidenciar tan pronto como a los 14 días post-

infección por ensayo inmunoenzimático, estos anticuerpos pueden ser indetectables en la infección más avanzada. Se conoce que particularmente los anticuerpos subclases IgM juegan un papel muy importante en la resistencia a la infección^{18, 38}.

Como se ha mencionado, existe evidencia de que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la resistencia a la infección por *N. brasiliensis* tanto en humanos como en ratones, cuando ésta se encuentra afectada es indetectable en pacientes infectados con este microorganismo y podría considerarse un factor para un pronóstico reservado en cuanto a la curación de las lesiones. En cambio, el papel de los anticuerpos en esta infección no está claro. Los ratones no depletados de células T que fueron experimentalmente infectados con *N. brasiliensis* e infundidos con anticuerpos sufrieron infecciones más severas que aquellos que no recibieron infusión de anticuerpos¹⁸. El actinomiceto *N. brasiliensis* es un potente adyuvante activador policlonal de células B; sorprende que los animales infectados mostraron bajos títulos de anti-*N. brasiliensis*. Alguna de las posibles explicaciones para esta baja respuesta inmune humoral inicial es que células T supresoras estaban presentes como se encontró en los ratones infectados con *N. brasiliensis* o que los anticuerpos pudieron ser sintetizados pero concomitantemente consumidos en el sitio de infección como ocurre en otras condiciones patológicas. Ésta última posibilidad es apoyada por los datos mostrados en que *N. brasiliensis* tiene anticuerpos específicos anti-*N. brasiliensis* en el sitio de infección (cojinete plantar del ratón) al tiempo en que están ausentes en el suero. La determinación de

anticuerpos contra *N. brasiliensis* en suero y extraídos del tejido se realiza generalmente mediante técnica de ELISA¹⁸.

La infección por *N. brasiliensis* produce una reacción inmunológica importante en el modelo murino (ratones BALB/c). Esto fue observado por Salinas-Carmona y cols mediante la demostración de la producción de citocinas inflamatorias por una gran cantidad de células durante las fases tempranas y tardías de la infección. La localización y el tipo de células que producen ciertas citocinas inflamatorias durante el curso de la infección, muestra una compleja interacción entre la respuesta inmune del hospedero y las estrategias de sobrevivencia de la bacteria. Según la identificación de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ y su localización en la epidermis y dermis durante la fase temprana de infección y posteriormente entre los microabscesos, sugieren una participación de estas citocinas inflamatorias en el control de la multiplicación bacteriana. Esto es, durante los primeros 4 días, el foco inflamatorio se compone principalmente por neutrófilos que rodean a la bacteria, después del 4to día, se forman los microabscesos compuestos de gran cantidad de bacterias, y neutrófilos, y linfocitos y células espumosas en la periferia limitados por un collarate de fibroblastos y células mast. La inmunoreactividad celular es detectada a las 24hr con la producción de todas las citocinas inflamatorias. Durante el curso de la infección, los linfocitos intraepidérmicos y varias células dérmicas son inmunorreactivas a TNF- α , sin embargo, algunas células dérmicas y células dendríticas de la epidermis muestran una inmunorreactividad a IL-1 β durante los primeros 5 días de la infección, las cuales van disminuyendo posteriormente. En cuanto a la IL-6, fue observada la inmunorreactividad a ésta en la periferia de los

microabscesos, principalmente en la fase tardía, lo que pudiera mejorar el reclutamiento de los polimorfonucleares, activar factores de transcripción y disminuir la carga bacteriana. También gracias a este estudio, se sabe que las IL-4 e IL-10 están presentes durante todo el curso de la infección por *N. brasiliensis*. Cabe mencionar que la determinación de la producción de citocinas es dependiente de varios factores como la edad, sitio inicial de exposición al antígeno, carga bacteriana, constitución genética, estado general de salud, entre otros^{29,34,37,39}.

1.4.1 VIRULENCIA

Ahora nos enfocaremos a plasmar la información de la virulencia de este microorganismo que es lo que nos concierne con mayor ímpetu en nuestro trabajo.

En cuanto a la virulencia del género *Nocardia*, es preciso señalar que como parte del grupo CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*) presenta características similares a las del grupo, esto es, comparten factores o tienen similitudes entre ellos como se mencionó previamente^{21,40,41}. Las paredes celulares de los microorganismos del grupo CMN consisten en peptidoglicanos interconectados y complejos polisacáridos-micolato y, se caracterizan por la presencia de ácidos micólicos en su superficie. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga que forman parte de una envoltura celular única responsable de la patogénesis y supervivencia del microorganismo en el interior del hospedero. Los ácidos micólicos son nombrados de acuerdo

al género individual de donde son aislados, como por ejemplo ácidos corynomicólicos (~22-36 carbonos) de *Corynebacterium*, micólicos/eumicólicos (~60-90 carbonos) de *Mycobacterium* y ácidos nocardiomicólicos (~40-60 carbonos) de *Nocardia*. Las micolil-transferasas son una familia de enzimas específicas del grupo CMN debido a su envoltura celular única; los géneros *Corynebacterium* y *Nocardia* sintetizan dicorynomicolato-trehalosa (TDCM) y dinocardiomicolato-trehalosa (TDNM) respectivamente. Las micolil-transferasas son también llamadas proteínas de unión de fibronectina, ya que se involucran en la unión de la fibronectina y en la entrada del organismo a las células del hospedero²¹.

En estudios previos de *N. asteroides* se ha mostrado que su virulencia se relaciona con múltiples factores como la habilidad de inhibir la fusión de fagosoma-lisosoma en los fagocitos, neutralizar la acidificación fagosomal y desintoxicar los productos microbicidas derivados del metabolismo oxidativo. Aunado a esto, varias cadenas de *Nocardia* tienen la capacidad de producir secundariamente metabolitos bioactivos. El papel que juegan estos metabolitos en la virulencia de *Nocardia spp.* no está completamente dilucidado³¹. En un estudio, Beaman y Moring encontraron una relación entre la composición de la pared celular, el estadio de crecimiento y la virulencia de *Nocardia asteroides*, principalmente entre la composición de los ácidos grasos y ácidos micólicos que en diferentes estadios de crecimiento, sugieren diferencias en la virulencia, sugiriendo fuertemente que éstos

ácidos están asociados a la virulencia de *N. asteroides*⁴². Siendo *N. brasiliensis* una bacteria intracelular facultativa es capaz de sobrevivir y dividirse en las células fagocíticas del hospedero, en parte neutralizando los reactivos intermediarios de oxígeno; la superóxidodismutasa (SOD) participa en la sobrevivencia intracelular de diversas especies bacterianas, en particular constituye uno de los factores de virulencia de *Nocardia asteroides*⁴³. Revol et al, realizaron un estudio para clarificar el papel de la superóxidodismutasa (SOD) en la infección temprana por *Nocardia brasiliensis*, con macrófagos peritoneales de ratones BALB/c con resultados no definitivos en su participación como factor de virulencia en *N. brasiliensis*⁴³.

2.0 MODELO EXPERIMENTAL DE MICETOMA: ANTECEDENTES

Aunque el micetoma ha sido reconocido como enfermedad desde 1861, su estudio ha sido ampliamente desarrollado desde su producción en modelos animales^{6,44}. En 1962, González-Ochoa et al, fueron capaces de producir el micetoma típico progresivo con producción de granos, fístulas y sin tendencia a la curación espontánea, tras una sola inoculación de *N. brasiliensis* en una pata de un ratón albino^{3,44,45}. Este ensayo fue reproducido por otros autores en 1963 en ratones, hámsteres y cobayos obteniendo la formación de micetoma, pero la respuesta inmune no fue estudiada^{3,28,33,46}.

La producción experimental de actinomicetoma en animales de laboratorio, permite el estudio de aspectos que aún no tienen respuesta, así como también provee una herramienta importante para ensayos terapéuticos con la finalidad de encontrar agentes terapéuticos más efectivos⁹. La producción de micetoma en el modelo animal produce las siguientes ventajas: 1) La posibilidad de analizar aspectos de la enfermedad pobremente entendidos como la respuesta inmune del hospedero, la virulencia y, 2) Realizar ensayos terapéuticos para encontrar agentes quimioterapéuticos más efectivos^{9,13,47}.

Conde y colaboradores^{6,18} utilizaron ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas infectando la pata de éstos con un preparado de *N. brasiliensis* UPHG-24 suspendida en 0.5ml de 0.15 M de NaCl. La infección por *Nocardia* fue confirmada por estudios histológicos de muestras tomadas de

las patas infectadas a diferentes intervalos de tiempo. La inoculación a ratones con bacteria muerta indujo una respuesta inflamatoria que persistió por 2-3 semanas. Los estudios histológicos mostraron un infiltrado inflamatorio que contenía una gran cantidad de macrófagos en el sitio de inyección, pero nunca se observaron granos actinomicéticos. La virulencia de *N. brasiliensis* UPHG-24 se determinó a las 14h, 48h, 120h y 168h de su curva de crecimiento. Al día 40 post-infección, se realizaron estudios histológicos que mostraron micetoma. No hubo diferencia significativa en la virulencia de *N. brasiliensis* en ninguna de las fases a las 14h, 48h, 120h y 168h. Los datos reportaron también que en ausencia de adyuvantes, *N. brasiliensis* produce micetoma en el ratón experimental tan solo después de 14 días. Los resultados de este estudio también mostraron que la virulencia relativa de *N. brasiliensis* cultivada en PBY (Proskauer-Beck medio modificado por Youmans: 15% agar) no variaron en las diferentes fases de su curva de crecimiento. Se observó un comportamiento idéntico a dosis similares de bacteria cuando se cultivó *N. brasiliensis* en infusión cerebro-corazón (BHI)⁶. Es importante hacer notar que los diferentes modelos experimentales descritos en la literatura para la inducción de micetoma por *Nocardia* difieren en resultados del micetoma obtenido. Los ratones en los que se ha utilizado la infección por *Nocardia* han diferido en la susceptibilidad a la infección por sus diferencias genéticas. Se ha utilizado la inducción de micetoma en diferentes órganos como vía intraperitoneal o intravenosa y en tejido subcutáneo. Es muy posible que la virulencia de *Nocardia* difiera en cada caso. La ruta de inoculación de *Nocardia* es importante para definir el tipo y localización de la infección, así como la

respuesta del hospedero a ella. Aunado a esto, se ha reportado que diferentes cadenas de la misma especie de *Nocardia* tienen tropismo para algunos órganos en particular. Debe tenerse precaución al comparar o interpretar datos obtenidos en diferentes modelos experimentales^{6,47}.

2.1 ATENUACIÓN BACTERIANA

Ahora, es imperativo señalar para el propósito de este estudio, como ya se ha mencionado, el género *Nocardia* comparte características filogenéticas con otros microorganismos como los del género *Mycobacterium* y es sabido, que algunos de estos microorganismos se han modificado con la finalidad de disminuir su virulencia o producir atenuación. El ejemplo más claro está en el bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

Para disminuir la virulencia de los microorganismos (atenuación) se han desarrollado diversos métodos como la exposición a rayos UV, exposición a calor, cambios genéticos, subcultivos, entre otros.

Cuando hablamos del uso de un microorganismo vivo para establecer un estado inmune que defina un valor protector contra la infección espontánea de una bacteria virulenta, es importante que el microorganismo en particular utilizado para la vacunación carezca de la habilidad de producir lesiones de carácter progresivo. Aquél microorganismo del que se intenta obtener una vacuna, debe mantener una condición de avirulencia a pesar de la influencia del ambiente al que pueda exponerse. Debemos considerar además que la susceptibilidad individual juega un papel importante también en el mantenimiento de la avirulencia del microorganismo, así como influye

el modelo animal experimental a utilizar y la vía de introducción del microorganismo.

En otros microorganismos se ha visto la atenuación de la virulencia en animales experimentales, por ejemplo, en *Salmonella enterica* serovar Abortusovis, *Francisella tularensis* y *Mycobacterium microti*^{48,49,50}. Tres cepas clínicas de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica, fueron subcultivadas por pasaje serial y almacenadas a temperatura ambiente en gel de electroforesis por 25 semanas, con lo que se obtuvo una apreciación de variaciones en los patrones del gel de electroforesis, los cuales pueden ser explicados por un par de eventos genéticos espontáneos y los cuales no invalidaron el linaje genético de las cepas⁵¹. Katouli et al, evaluaron la estabilidad de los fenotipos bioquímicos de *E. coli* después del subcultivo y su almacenamiento; evaluaron 72 cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y 21 cepas de *E. coli* fecal, mostrando que un 22% de EPEC y un 43% de las cepas fecales exhibieron cambios en sus reacciones bioquímicas después del subcultivo; en contraste, aquellas almacenadas a -70°C y 4°C no mostraron ningún cambio. El cambio en la fermentación de lactulosa fue el más frecuente (18%) en las cepas. Se observó similitud en las cepas cuando se compararon antes y después del subcultivo, sí sufrieron cambios, pero ligeros y el fenotipo bioquímico de las cepas permaneció constante⁶². También se demostró la alteración del genotipo (fenotipo) flagelar de *E. coli* cepa P12b por medio de subcultivos⁵³.

Otros investigadores demostraron la pérdida de algunos factores de virulencia en *E. coli* enterotoxigénica por subcultivos repetidos. Se estudió la

expresión de labilidad al calor y antígenos de factor de colonización en el subcultivo repetido, las cepas mostraron diferencias en la respuesta a la expresión de estos factores, siendo todas las cepas positivas para ambos factores tras sólo 6 subcultivos⁵⁴.

En especímenes virales también se ha demostrado que el subcultivo modifica su virulencia. En el virus del dengue (DENV) en sus 4 serotipos pudieron ser modificados por pasaje serial en células primarias de riñón de perro, con un resultado final de utilizar vacunas, pudieron manufacturar esos lotes de vacunas en células diploides de mono Rhesus, así mismo fueron inoculadas en este modelo animal logrando que 12 vacunas seleccionadas fueran candidatas para fase 1 en ensayos humanos⁵⁵.

El parvovirus canino (CPV) originalmente derivado de un único virus proveniente de gato, emergió en perros a mediados de 1970 y se diseminó internacionalmente en 1978, este virus fue evolucionando lentamente en la naturaleza. El CPV fue atenuado por pasajes seriales desde el pasaje 0 (cero) que constituía la cepa canina original hasta la 115. Este virus se atenuó en células primarias de riñón de perro. Una segunda línea de atenuación se inició a partir de la cepa 103 y continuada por 9 pasajes más en línea celular renal de felinos. Los pases 30, 50, 80 y 115 fueron probados en virulencia mediante la inoculación en perros y probaron ser significativamente atenuados al pase 80. Esto dio pie al uso de la vacuna CPV utilizada exitosamente en caninos y felinos y que ha sido utilizada por más de 20 años. Posteriormente estos pasajes fueron analizados por PCR

para detectar los cambios en su secuencia y se encontraron 16 cambios en el pasaje 115 comparándolo con el pasaje parental⁵⁶.

Cuando se han comparado las sub-cepas de los virus de las vacunas humanas clásicas, se ha encontrado considerable diversidad en las cepas que fueron subcultivadas por diferentes períodos de tiempo o bajo diferentes condiciones, sugiriendo que las poblaciones de virus son también altamente diversas a diferentes períodos de tiempo durante el proceso. Por ejemplo, la comparación de virus de la rubéola atenuados en formas independientes, muestran pocos o nulos cambios en común⁵⁶.

El pasaje serial es un método que ha sido aplicado de forma frecuente para crear vacunas, las cuales actualmente siguen en uso, aún así la arquitectura genética del proceso aún es ampliamente desconocido para cualquier virus. Aunque muchas secuencias de virus vivos atenuados en relación con sus antepasados de tipo salvaje, aún falta la comprensión de cómo esos cambios se acumulan y cuánta variación estuvo presente durante la atenuación. Esta información es vital si un proceso de atenuación es repetido, extendido o truncado o si se elaborarán múltiples pasajes a partir de una serie de atenuación⁵⁶.

Enfocándonos hacia las micobacterias, que comparten características filogenéticas con *Nocardia*, desde que Koch descubrió el bacilo tuberculoso, se ha obtenido experiencia, que la mayoría de los seres humanos son espontáneamente vacunados contra la tuberculosis en el primer período de vida al tener contacto con el mismo ya sea por vía digestiva, respiratoria, incluso cutánea. Por más de 30 años Calmette y Guérin se dieron a la tarea

de estudiar el bacilo tuberculoso y desarrollar una vacuna para la tuberculosis pulmonar que aún hoy en día es causa de morbilidad y mortalidad. Calmette y Guérin basaron su hipótesis según a lo que obtuvo Pasteur con vacunas de microorganismos vivos atenuados⁵⁷.

Para la obtención de una emulsión fina de bacilos, Calmette y Guérin, obtuvieron un cultivo de *M. bovis* que aislaron en vacas en 1902, este cultivo lo pasaron a medio de cultivo líquido de manera consecutiva y subsecuente durante varios años³⁰. Primero, cultivaron la cepa *M. bovis* en agar enriquecido con yema de huevo y posteriormente en bilis de buey pura esterilizada, la cual obtuvo los mejores resultados. Para los 30 subcultivos (pasajes seriados) en medio bilis-papa, la cepa cesó su capacidad de matar a los conejillos de india. Después de 60 pasajes seriados en medio con bilis, aún continuaba siendo ligeramente virulenta para conejos y caballos, pero totalmente avirulenta para los conejillos de india, monos y becerros. Para 1908 añadieron bilis al cultivo, con lo que notaron un crecimiento más disperso de la bacteria. Para 1912, realizaron experimentos a larga escala en becerros, establecidos en condiciones más similares a la infección natural; estos experimentos fueron repentinamente suspendidos por la Guerra Mundial y posteriormente retomados. Para ese entonces habían publicado que la inyección vía intravenosa y mejor aún la inyección subcutánea del bacilo crecido en bilis en becerros jóvenes, producía la resistencia a la infección natural o experimental y persistía por 12 a 18 meses^{30, 58}.

Calmette y Guérin tuvieron éxito en reducir la virulencia del bacilo

tuberculoso bovino a través de 20 años de subcultivarlo en diferentes medios hasta el medio con bilis que resultó ser el más exitoso. A los 4 años de subcultivos, *M. bovis* perdió su virulencia en el ganado y a los 13 años, perdió la virulencia en todos los animales experimentales utilizados (conejiillos de indias, becerros, vacas, caballos, monos)⁵⁹.

De acuerdo a Calmette y Plotz, el BCG es definitivamente y permanentemente inocuo, aunque se recomienda que para asegurar la perpetuación del estado avirulento del organismo debe crecer en medio de glicerina-caldo-papa con cambios a ciertos intervalos del medio glicerinado a medio papa-bilis o medio líquido de Sauton. Finalmente, el bacilo crecido en bilis que hoy conocemos como bacilo de Calmette y Guérin o BCG y utilizado para la prevención de la tuberculosis meníngea, miliar, extrapulmonar y glandular, fue producto de 230 pasajes seriales y a pesar de intentos por otros investigadores, el BCG no sufrió modificación alguna en el tiempo posterior^{57,60}.

A pesar del éxito en la avirulencia de *M. bovis*, la base de la atenuación de la cepa mutante de Calmette y Guérin, no es totalmente elucidada. Recientemente, Hsu et al⁷¹, han descrito un mecanismo responsable de la atenuación del bacilo de Calmette y Guérin. Una región simple, ausente en todas las cadenas de BCG (RD1), fue deletada de cadenas de cepas virulentas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* y el resultado mutado Δ RD1 fue significativamente atenuado en virulencia tanto en ratones inmunocomprometidos como inmunocompetentes. Esta región mutada Δ RD1 de *M. tuberculosis* demostró también proteger a los ratones ante el

reto respiratorio, similar a lo que hace la BCG. Una mutación específica de transposición que irrumpe *Rv3874 Rv3875* (*CFP-10, ESAT-6*) operon de RD1, causa pérdida del fenotipo citolítico en macrófagos y neumocitos. Esta mutación, resulta en la atenuación de la virulencia en los ratones, como resultado de disminución de la capacidad de invasión a los tejidos. Estos autores concluyen que el mecanismo primario de atenuación del bacilo de Calmette-Guérin es la pérdida de la actividad citolítica mediada por ESAT-6, resultando en la disminución de la capacidad de invasión a los tejidos⁶¹.

Más de 3 billones de individuos en el mundo han sido inmunizados con el bacilo Calmette-Guérin, y sigue en el programa de inmunizaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a su eficacia en prevenir la tuberculosis extrapulmonar en niños, sin embargo en los adultos su eficacia contra la enfermedad pulmonar es variable, posiblemente debido a la exposición al medio ambiente, factores operacionales, demográficos y genéticos. Otra posible explicación para la variabilidad de su eficacia cae en el uso de diferentes cepas hijas, esto es, una vez que se confirmó su seguridad, la vacuna BCG fue diseminada y entonces diferentes laboratorios mantuvieron su propia cepa hija por pasajes hasta que se introdujo la cepa progenitora en los años 1960's. A partir de ahí, se recomendó que no se realizaran más de 12 pasajes seriados de cada lote, por tanto, la vacuna BCG Pasteur 1173P2 corresponde a lo archivado establecido después de 1,173 pasajes seriados⁶².

Por otra parte, Aranaz et al, utilizaron una cepa subcultivada de *Mycobacterium tuberculosis* para sus estudios en los que dedujeron que se

efectivamente se presenta un cambio en los perfiles espoligotipos (spoligotyping: *spacer oligonucleotide typing*) de cepas isogénicas, un (aislado clínico y un subcultivo derivado en el laboratorio) causado por la eliminación de una repetición continua variable, mostrando así su importancia, radicando en que a pesar de ser una misma cepa existieron cambios por deleción, lo que debería considerarse para el diseño de las bases de datos de la tipificación molecular de microorganismos complejos. Esto da un valor agregado a la utilidad de los subcultivos en microorganismos complejos⁶³.

Molina-Torres et al, realizaron pasajes de subcultivos seriados de *M. tuberculosis*, realizaron 100 pasajes en medio Middlebrook 7H9 con y sin enriquecimiento con bilis de búey y demostraron la disminución de su virulencia, los cuales fueron verificados por medio de la citotoxicidad en macrófagos THP-1 y análisis de cambios en microarreglos. El cambio más notable fue un cambio de posición de una banda IS6610 de -1400bp a -1600bp en una cepa Beijing en medio con bilis de búey. El análisis por PCR confirmatorio no reveló cambios genómicos. La actividad citotóxica sí disminuyó en las cepas atenuadas a niveles cercanos a la BCG y de forma más consistente a aquellas cepas cultivadas en medio con bilis de búey⁶⁴.

Finalmente, hemos cubierto los campos de estudio de *Nocardia* y enfocándonos a nuestro patógeno de estudio *Nocardia brasiliensis*, a continuación describiré la importancia, originalidad y justificación de nuestro proyecto de investigación.

3.0 IMPORTANCIA

Hasta la fecha, sólo existen algunos estudios limitados sobre los mecanismos de la virulencia de *Nocardia brasiliensis*, así como de su comportamiento en el hospedero que impide la curación de las lesiones producidas con la consiguiente evolución a la cronicidad y a la resistencia a fármacos. De la misma manera, los mecanismos de la patogénesis de *Nocardia* son complejos y no completamente aclarados. Como se ha señalado anteriormente, Calmette y Guérin realizaron 230 pases de *M. bovis* para la obtención de la vacuna BCG. La importancia de este estudio radica en debido a las características filogenéticas compartidas en entre estos microorganismos, creemos que *Nocardia brasiliensis* puede responder de manera similar a *Mycobacterium bovis* al ser sometida a subcultivos seriados, atenuando así su virulencia y dar un conocimiento más sólido sobre su comportamiento inmunológico, además poder inducir un estado de resistencia a la infección que en un futuro próximo pudiera sentar la base de una terapia biológica entrando en una nueva era de tratamiento contra esta infección.

4.0 ORIGINALIDAD

Solo algunos estudios limitados han hablado sobre los mecanismos de la virulencia de *Nocardia* y *Nocardia brasiliensis*, debido a esto, a la fecha no se han realizado estudios sobre la atenuación de este microorganismo y creemos que puede responder similar a *Mycobacterium bovis* al ser sometido a la atenuación por pasaje seriado, en un futuro pueda ser utilizado como vacuna o como terapia biológica para la infección por *N. brasiliensis*.

5.0 JUSTIFICACIÓN

No hay estudios que reporten el efecto que tiene el subcultivo en la virulencia de *N. brasiliensis*. Desarrollamos este proyecto de investigación con la finalidad de lograr la atenuación de *N. brasiliensis* por medio de subcultivos seriados, así como sentar bases más sólidas sobre sus mecanismos inmunológicos de sobrevivencia en el hospedero, aunado a esto inducir un estado de resistencia a la infección para su uso como terapia biológica o vacunación, además de estudiar histopatológica e inmunohistoquímicamente las biopsias de las lesiones al final del estudio.

6.0 HIPÓTESIS

El subcultivo de *Nocardia brasiliensis* produce atenuación en su virulencia.

7.0 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto que produce el subcultivo en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Subcultivar la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 en medio líquido hasta 130 pases.
2. Realizar ensayos de infección en ratones BALB/c con la cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (control) y con las cepas subcultivadas 40, 80, 100 y 130 pases.
3. Determinar el desarrollo de inducción de resistencia a la infección en los grupos de subcultivo T₁₀₀ y T₁₃₀
4. Realizar el estudio histopatológico e inmunohistoquímico comparativo entre el grupo control y grupo T₁₃₀

8.0 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 RECURSOS BIOLÓGICOS

1. Grupos de **ratones BALB/c hembras** de entre 8-12 semanas de edad. Para la realización de los ensayos comparativos obtenidos a través del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. El cual se encargará del cuidado de los mismos.
2. Cepa de ***Nocardia brasiliensis* HUJEG-1** obtenida de la colección del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología, de la que se obtendrán los 130 subcultivos.

8.2 RECURSOS MATERIALES

Se utilizarán las instalaciones del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología y el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. Así como del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina para las muestras histopatológicas.

A continuación se detallan los recursos materiales utilizados:

a) Aparatos:

- Biological Safety Cabinet Nuaire Model Nu 425400
- Agitador continuo: C24, Classic 24 Incubator Shaker M1247-0004, New Brunswick Scientific
- Low temperature Incubator 815 Precision
- Refrigerador de 4-CCavimez Equipo vertical ipta Champion Cornelius RF-005
- Incubadora de CO₂
- Ultra low Freezer Nuaire NU-6580G
- Básculas Sartorius AG Goltingen Germany PT 150 61003601
- Básculas Sartorius AG Goltingen Germany CP225D 15807987
- Desecador para vacío en vidrio Pyrex DW A215
- Pipet-Aid Drummond Portable XP DRM4-000-101
- Finnpiquette 200 - 1000µl F56489 4500
- Finnpiquette 20-200µl F57188 4500

- Centrífuga 5810R Eppendorf No 581103002
- Autoclave Steam sterilizer Tuttnauer Brickmann 3850E Serie 2001071
- Autoclave Steam sterilizer Tuttnauer Brickmann 2540M serie 9609671
- Ceramic Hot top plate/Stir plate Nuova II SP 18425 Sybron Termolyne
- Vortex Genie Daigger Cat No 22220A
- Vernier calibrado en milímetros

b) Consumibles:

- Agar Mueller Hinton BD Bioxon código 212337
- Agar para infusión cerebro-corazón (BHI) BD Bioxon código 214700
- Infusión cerebro-corazón BD Bioxon código 211200
- Placas Petri de plástico de 100x15mm S y M laboratorios
- Vasos de precipitados:
 - Pyrex 200ml model 4980
 - Kimax 1000ml model 26500
 - Schott Duran 2000ml
- Pipetas:
 - 1ml 1 x 1/10 Pyrex No 7085
 - 5ml 5 x 1/10 Pyrex No 7085
 - 10ml 10 x 1/10 Pyrex No 7085
- Puntillas desechables Eppendorf pipet tips sterile Brinkmann

- 10-200 µl código 2234160-0 5311 960
- 100-1000 µl código 2234170-7 53511 948
- Lazy L spreaders código 2376779-1 PAK Sigma Aldrich
- Microplacas de 24 pozos para cultivo celular de fondo plano
- Lab-Tek II Chamber Slide system Nunc
 - 4 cámaras 62407-294 154526
- “Aplicadores suavécitos” 15cm estériles Desechables Quirúrgicas e Industriales
- Tubos de ensayo 16 X 150ml Pyrex 9825 con tapa de rosca o tapa de aluminio
- Superclear Eppendorf centrifuge tubes of polypropylene 50 ml Centrifuge tubes/ screw caps 21008-178
- Superclear Eppendorf centrifuge tubes of polypropylene 15 ml Centrifuge tubes/ screw caps 21008-103
- Jeringas desechables estériles 1ml, 5ml, 10 ml y 20 ml DL c/aguja de 21g x 32mm
- Agujas de 22G x 1 1/4 (0.70 x 32mm) Terumo CE 0197 NN* 2232R
- Hojas para bisturí Estilo #15 para 3/3L
- Medio RPMI R6504-50L Sigma-Aldrich
- Agua inyectable libre de pirógenos PISA frasco con 500 ml
- Solución salina libre de pirógenos CS PISA, cloruro de sodio inyectable al 0.9%
- Solución de formol 10% buffereado
- Safe Lock Tubes 1.5ml Original Eppendorf 2236320-4

- Gradillas VWR 80 place storage system
- Guantes de latex Blossom latex medical examination gloves medium o small
- Cristal Violeta, Safranina, Lugol, Alcohol-acetona, Fuscina básica. Alcohol ácido, azul de metileno, alcohol etílico 50%, alcohol sulfúrico 1%
- NaCl Amresco 0241-5kg CAS 7647-14-5
- Na₂HPO₄ Analytyka 52850R CAS 7558-79-4
- KH₂PO₄ Analytyka CAS 7778-77-0
- Formalina 4%
- Tinciones Hematoxilina & Eosina, Kinyoun y PAS
- Tinciones para Anticuerpos contra CD4, CD8 y CD14 (Dako Corp., Carpinteria CA)

8.3 RECURSOS FINANCIEROS

El proyecto de tesis fue realizado con el soporte económico de beca PAICYT grant SA 261-09 y con apoyo del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

8.4 RECURSOS METODOLÓGICOS

Es un estudio experimental *in vitro* e *in vivo* prospectivo, longitudinal. Se seleccionó la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (AATCC 700358) como cepa control y a partir de la misma se realizaron los subcultivos a los tiempos 40, 80, 100 y 130. Dicha cepa fue obtenida de la colección del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

8.4.1 Preparación de los subcultivos

Primeramente, para la obtención de cada subcultivo, se toman dos asadas de la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 obtenida de la colección congelada a -70°C (suspendida en medio Skim Milk al 20%), para su crecimiento en agar Sabourad en placa de Petri. De ésta, a los 4-7 días, se obtiene la colonia de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, de la cual se toman 2-3 asadas (asa estéril) y es colocada en un tubo de Potter estéril de 7ml al que se agrega 2.5 mL de

solución salina estéril y se procede a su maceración por 15 segundos, para la obtención de una solución homogénea. Esta solución es ajustada con solución salina estéril al grado de turbidez 1 de McFarland; una vez ajustada dicha solución, se toma 0.1ml de la misma con una pipeta Pasteur estéril y es inoculada a un matraz de Erlenmeyer de 125 ml que contiene 33 ml de medio de cultivo líquido Infusión Cerebro-Corazón (BHI) previamente esterilizada. Se trabaja por duplicado cada matraz. Ambos matraces son colocados en la incubación con agitación constante, lo que llamaremos “condiciones de subcultivo”, esto es, a 110 rpm, 37°C durante 72 horas. Este proceso se repite cada 72 horas avanzando un subcultivo a la vez. Al pasar las 72 hrs del primer subcultivo, se toman los matraces inoculados y se pasa a tubos Eppendorf estériles de 15 ml; 5 ml del caldo de cultivo, correspondiendo un tubo a cada matraz; dichos tubos son colocados en la centrifuga a una velocidad de 2,500 rpm, durante 3 minutos, a una temperatura de 25°C, posteriormente, se obtiene un botón celular bacteriano al fondo de cada tubo, se procede a decantar el medio líquido para dejar solamente el botón celular en el fondo. A este botón celular bacteriano se le añaden 5 ml de solución salina estéril. Una vez obtenida la cepa en solución salina estéril, se toma con una pipeta Pasteur estéril 2.5 ml y se colocan en un tubo Potter estéril, se procede a macerar el botón celular bacteriano durante 25 segundos, al terminar la maceración se ajusta la solución resultante al grado 1 de turbidez de McFarland utilizando solución salina estéril y de esta manera se inoculan 0.1 ml de esta solución en medio líquido

BHI y se pasa nuevamente a condiciones de subcultivo, avanzando un subcultivo a la vez. Estos pasos se realizan de manera subsecuente, consecutiva, hasta la obtención del subcultivo 130. La figura 1 muestra esquemáticamente la realización de los subcultivos.

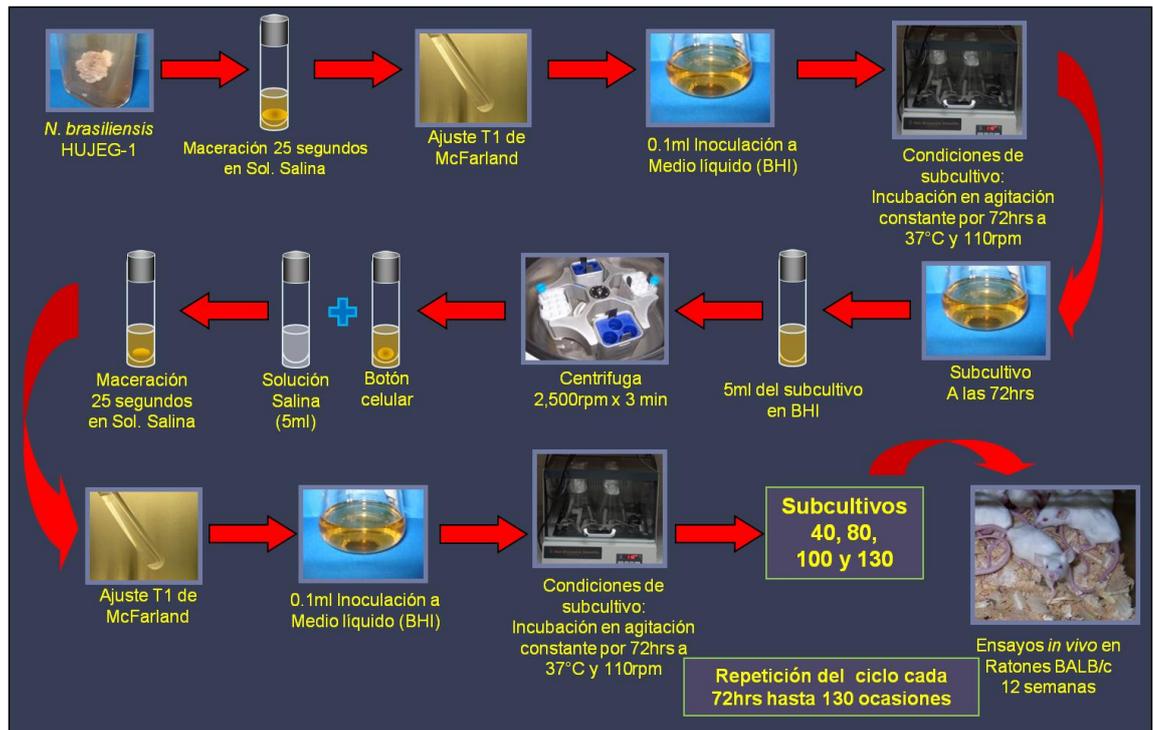


Fig. 1. Esquema de la obtención de los subcultivos.

8.4.2 Ensayos Experimentales en Murinos

Una vez realizados los subcultivos partiendo de la cepa original HUJEG-1, se realizaron los ensayos clínicos *in vivo* en ratones BALB/c, en un tiempo aproximado de 12 semanas (3 meses) cada ensayo. Para esto, se preparó simultáneamente la cepa original HUJEG-1 que se designó como cepa control ó T₀ (Tiempo Cero) y las cepas subcultivadas designadas por el número de subcultivo, a saber:

T₄₀, T₈₀, T₁₀₀ y T₁₃₀ para ser inoculadas en el cojinete plantar derecho de cada modelo animal. Los ensayos *in vivo* se realizaron con las cepas subcultivadas 40, 80, 100 y 130. Se desarrolló micetoma experimental en el modelo murino BALB/c con *N. brasiliensis* HUJEG-1 formando el grupo control y otro grupo infectado con la cepa subcultivada. Cada grupo está representado por 20 modelos animales, ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas de edad. La inoculación se llevó a cabo en el cojinete plantar derecho de cada animal experimental para ambos grupos en cada ensayo (Fig.2).

Para la obtención del inóculo de cada cepa de *N. brasiliensis* utilizada como cepa control y cepa subcultivada se llevó a cabo el método descrito por González-Ochoa y colaboradores, el cual consiste en la inoculación de 0.1mL del inóculo con 20mg de peso húmedo de la cepa *Nocardia brasiliensis* en 50µL por vía subcutánea en el cojinete plantar derecho de cada animal experimental. Una vez realizada la inoculación, se tomaron semanalmente medidas del cojinete plantar inoculado en cuanto su grosor por medio del vernier calibrado en milímetros, así como se designó por el esquema de cruces la infección producida (Fig.3). Sabemos que el grosor del cojinete plantar del modelo animal a utilizar mide en promedio 2.1mm. El sistema de cruces previamente descrito por Gómez-Flores, et al⁴⁹ se basa en lo siguiente: se determina que el modelo experimental presenta 0+ cuando no existe infección; 0.5+ cuando sólo existe ligero eritema; 1+ cuando existe eritema y leve aumento de volumen del cojinete plantar; 2+ cuando existe eritema, aumento de volumen

marcado, ulceraciones y/o nódulos; 3+ cuando aunado a lo anterior existe involucro al talón de la extremidad del animal y, 4+ cuando además de lo anterior, existen fístulas, abscesos e involucro de la totalidad de la extremidad. Esto, nos provee de una descripción clínica de las lesiones. Una vez desarrollado el micetoma y, basados en las características clínicas desarrolladas en ambos grupos, se procedió a la comparación de los grupos. Cada ensayo clínico tuvo una duración de 12 semanas, con lectura semanal de las lesiones como se ha mencionado.

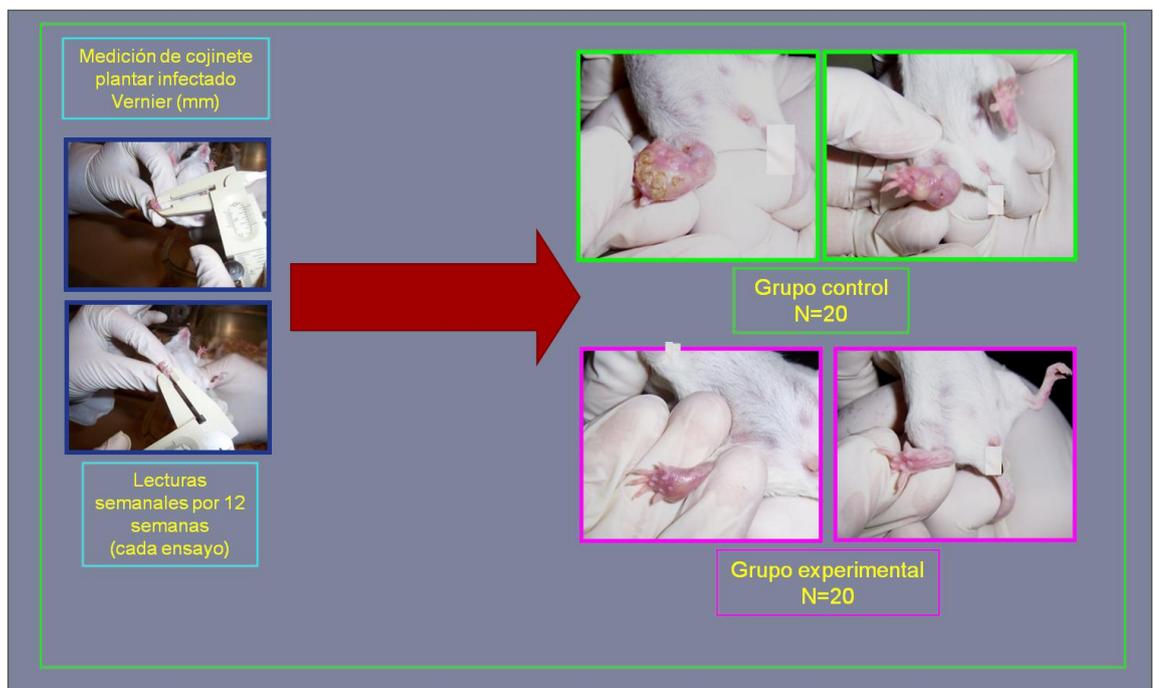


Fig 2. Ensayos de infección en ratones BALB/c

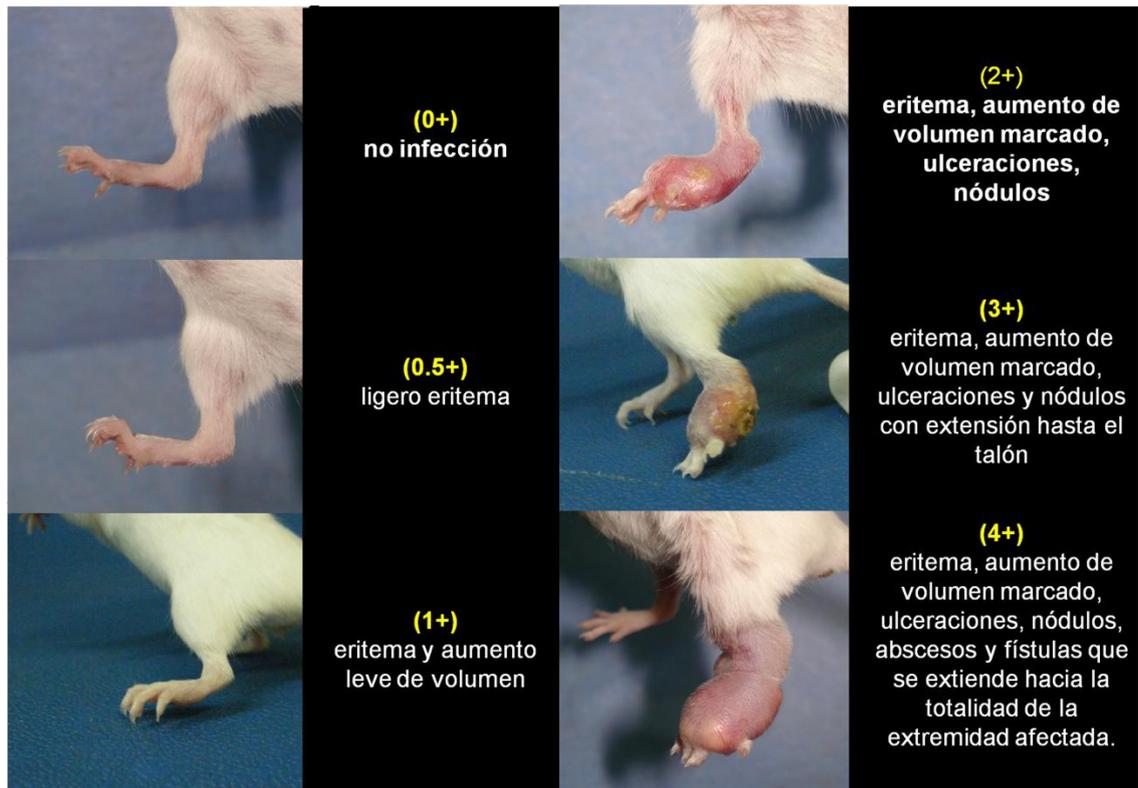


Fig.3. Escala de medición de micetoma por sistema de cruces⁴⁹

8.4.3 Resistencia a la infección en los grupos T₁₀₀ y T₁₃₀

Para la realización de los ensayos de resistencia a la infección se tomaron los grupos T₁₀₀ y T₁₃₀ que fueron previamente inoculados con la dichas cepas subcultivadas por un período de 12 semanas, al término de éstas, al cumplir la semana 13 (ó semana 1 del ensayo de resistencia a la infección) se procedió al reto en el cojinete plantar contralateral (izquierdo) con la cepa no subcultivada T₀ (*Nocardia brasiliensis* HUJEG-1). Para este ensayo se ocuparon 20 ratones por grupo en el ensayo de T₁₀₀ y 30 en cada grupo para el ensayo de T₁₃₀ sin subcultivar siguiendo la metodología antes descrita para la

inoculación de los grupos de ratones. De esta manera, se retó al animal experimental con una cepa conocida virulenta, cuando previamente había sido inoculado con una cepa atenuada en 100 y 130 pasajes seriales respectivamente. Al igual que en los otros ensayos, se realizaron mediciones con un vernier calibrado en milímetros semanalmente y también se realizó la medición por el sistema de cruces. Como verificación, se tomó sangre (500 microlitros) por capilaridad del seno infraorbitario de los ratones y una vez obtenida, se procedió a la centrifugación a 1,500 rpm por 3 min, para la separación del paquete globular y la obtención del suero con la finalidad de determinar la presencia de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 por Western Blot.

8.4.4 Estudio histopatológico e inmunohistoquímico comparativo de las cepas T₀ y T₁₃₀

Para la evaluación histopatológica del proceso infeccioso por *Nocardia brasiliensis* en el modelo murino, se obtuvieron biopsias del cojinete plantar infectado en las semanas 1, 3, 5, 7, 9 y 12 post-inoculación tanto en el grupo control T₀ como en el grupo experimental T₁₃₀. Las muestras fueron conservadas en formalina al 4% para su posterior procesamiento y tinciones en hematoxilina y eosina (H&E), Kinyoun, PAS e inmunohistoquímica para CD4, CD8 y CD14 para identificar los subconjuntos de las células inflamatorias. Las muestras de tejido fueron teñidas con anticuerpos contra CD4

(células T helper), CD8 (células T citotóxicas/supresoras) y CD14 (monocitos). De forma rápida, las secciones de tejido del cojinete plantar afectado, destinados a la inmunohistoquímica fueron deparafinadas, rehidratadas, y sometidas a una secuencia de pasos de incubación iniciando con citrato de sodio (0.01 M) para la recuperación de epítipo. Después de bloquear la actividad endógena de peroxidasa con peróxido de hidrógeno al 1% en metanol, las secciones fueron incubadas en cámara de humedad durante 18 horas a 4°C con anti-CD4 policlonal, anti-CD8 y anti-CD14 (Dako Corp., Carpinteria, CA) diluido 1:200 en PBS. Se prosiguió a enjuagues con PBS y posteriormente las secciones fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado, y diluido 1:500 en PBS. Esto fue seguido de enjuagues en PBS y 20 minutos de incubación en cámara de humedad en estreptavidina-biotina. La actividad de la peroxidasa se visualizó mediante la incubación con 3,3',-diaminobenzidina y tinción de contraste con hematoxilina.

8.4.5 Análisis estadístico

Se procedió a la realización del análisis estadístico con el programa estadístico Statgraphics bajo el rubro de El StatAdvisor, así como ayuda complementaria con los programas SPSS, Sigma Plot y la base de datos en Excel 2007. Para la comparación entre grupos

durante cada ensayo se realizó análisis de varianza de ANOVA y como prueba alternativa la prueba paramétrica de Kruskal-Wallis.

9.0 RESULTADOS

9.1 Resultados para el objetivo 1: Subcultivo de la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 en medio líquido hasta 130 pases.

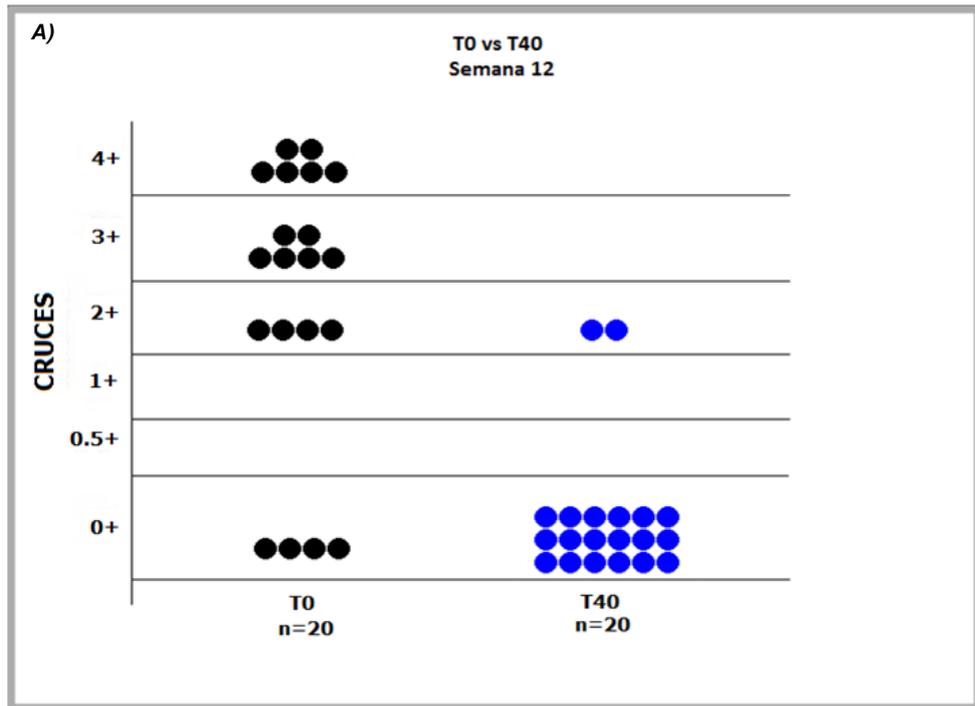
La cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 fue subcultivada consecutivamente en medio líquido infusión cerebro-corazón (BHI), un pase o subcultivo a la vez (cada 72 horas), en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación de Dermatología hasta la obtención de los subcultivos 40, 80, 100 y 130 ocasiones lo cual nos tomó aproximadamente 3.5 años. La obtención de los subcultivos se consideró exitosa ya que se revisó el crecimiento de *N. brasiliensis* en medios agar-sangre, Müeller-Hinton, Sabouraud y BHI antes y después de realizar la inoculación en el modelo murino.

9.2 Resultados para el objetivo 2: Realizar ensayos de infección en ratones BALB/c con la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (control) y con las cepas subcultivadas en 40, 80, 100 y 130 pases.

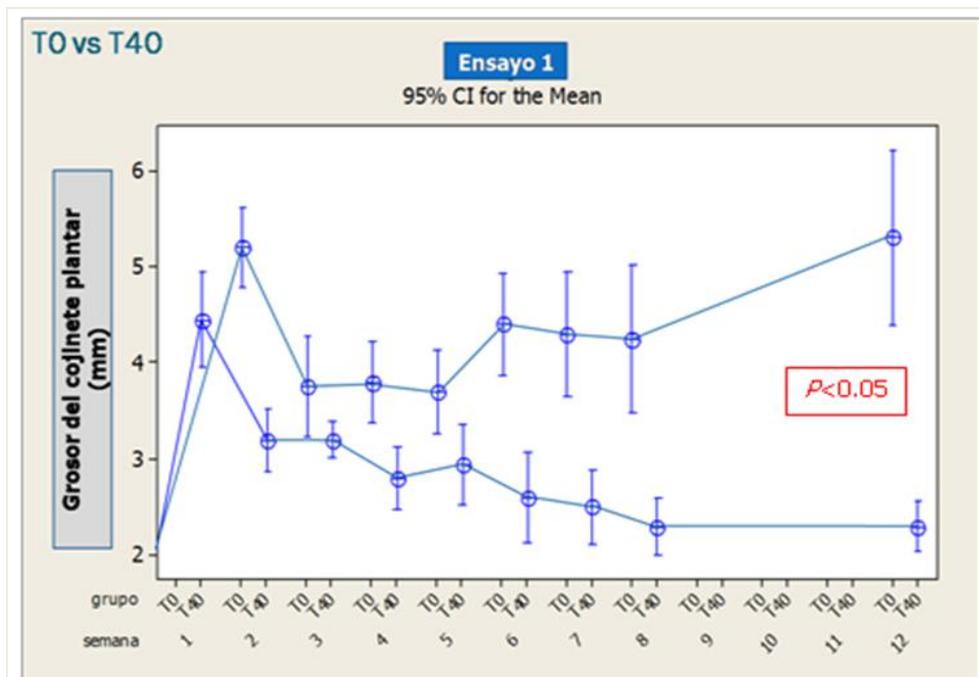
En la gráficas 1 a 4 mostramos la evolución natural de la infección en el ratón cuando se inocula con la bacteria subcultivada a los tiempos 40, 80, 100 y 130 comparándolo con el grupo control (T₀) respectivamente. En los animales inoculados con T₀ existe una

respuesta inicial inflamatoria que va de la mano con una intensa estimulación antigénica producida por el inóculo, así mismo, posteriormente ocurre la disminución gradual del grosor del cojinete plantar del murino. Los micetomas aparecen después de la semana 5-6 de la inoculación. Doce semanas después de la inoculación existe un aumento significativo en el grosor del cojinete plantar caracterizado por la presencia de abscesos y fístulas (medición 4+).

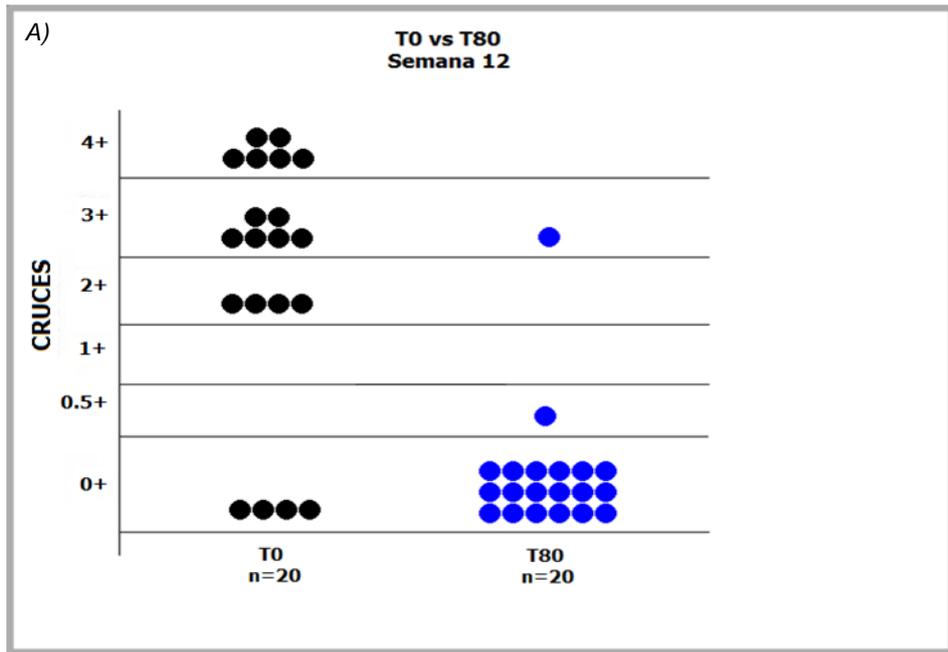
Cuando inoculamos con las cepas *N. brasiliensis* subcultivadas se observa un comportamiento diferente. Después de la respuesta inflamatoria inicial, el grosor del cojinete plantar disminuye significativamente después de la semana 5 post-inoculación en todos los casos (T_{40} , T_{80} , T_{100} y T_{130}). La formación de lesiones de micetoma (consideradas más de 1+) para la semana 12 se observó en 10%, 5%, 0% y 0% para los animales inoculados con las cepas subcultivadas a los tiempos 40, 80, 100 y 130 respectivamente (Tabla 1). Los controles respectivos produjeron micetoma en 80%, 80%, 70% y 60% respectivamente. Para la semana 12 el desarrollo de lesiones en los grupos inoculados con las cepas subcultivadas fue comparado con su propio grupo control (inoculado con T_0) y fue analizado con prueba estadística ANOVA y se observó $P < 0.001$ en todos los casos.



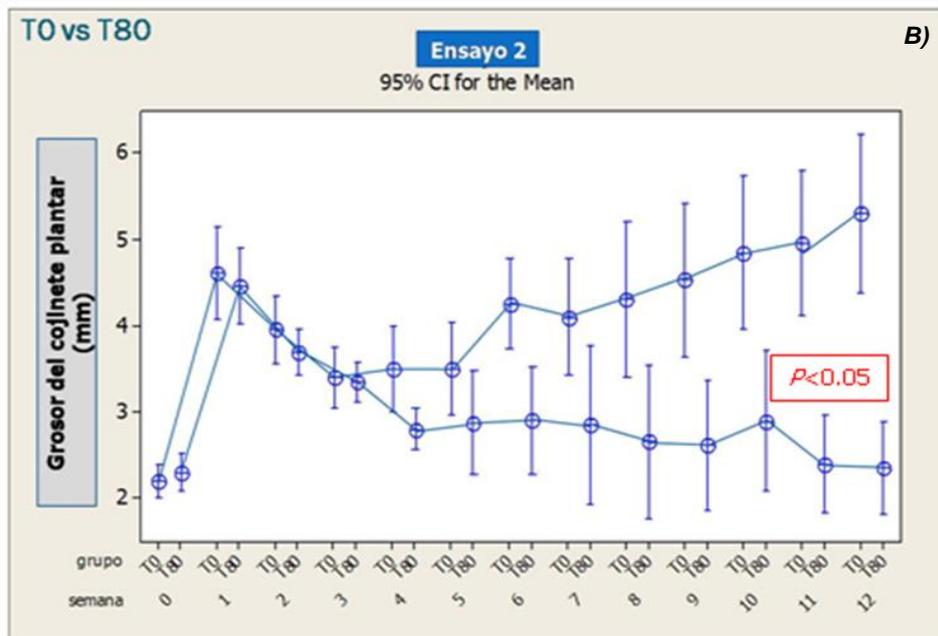
Gráfica 1A. Resultados entre T_0 y T_{40} a la semana 12. En **A)** por escala de sistema de cruces observamos que en el grupo control T_0 existe infección del 80% del grupo, mientras que el grupo subcultivado T_{40} la infección sólo se presentó en el 10%.



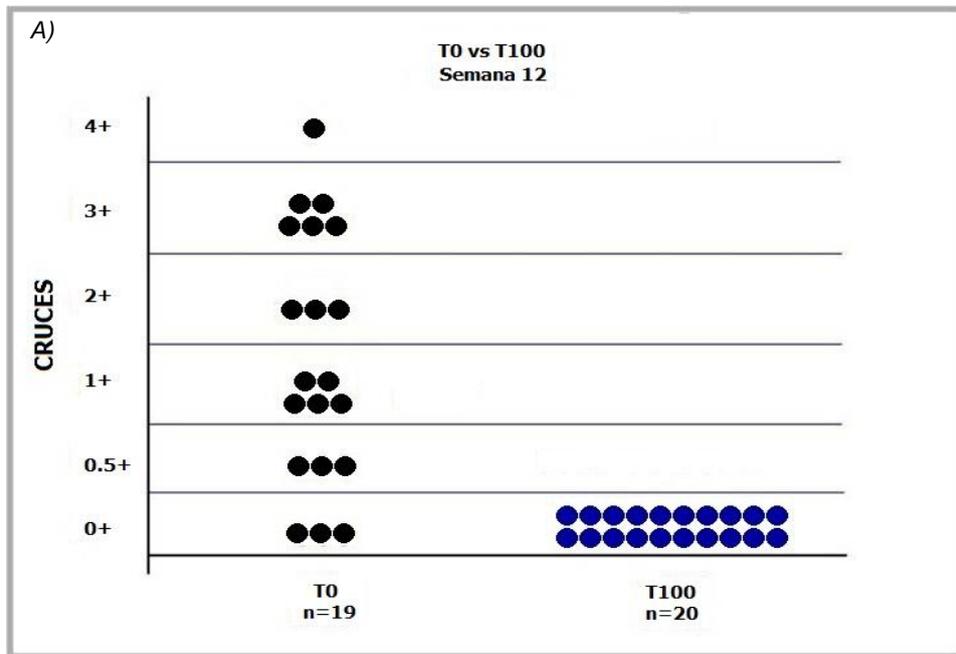
Gráfica 1B. Resultados entre T_0 y T_{40} a la semana 12. Fue evaluado con la prueba de ANOVA mostrando una $P < 0.001$, la barra muestra la desviación estándar.



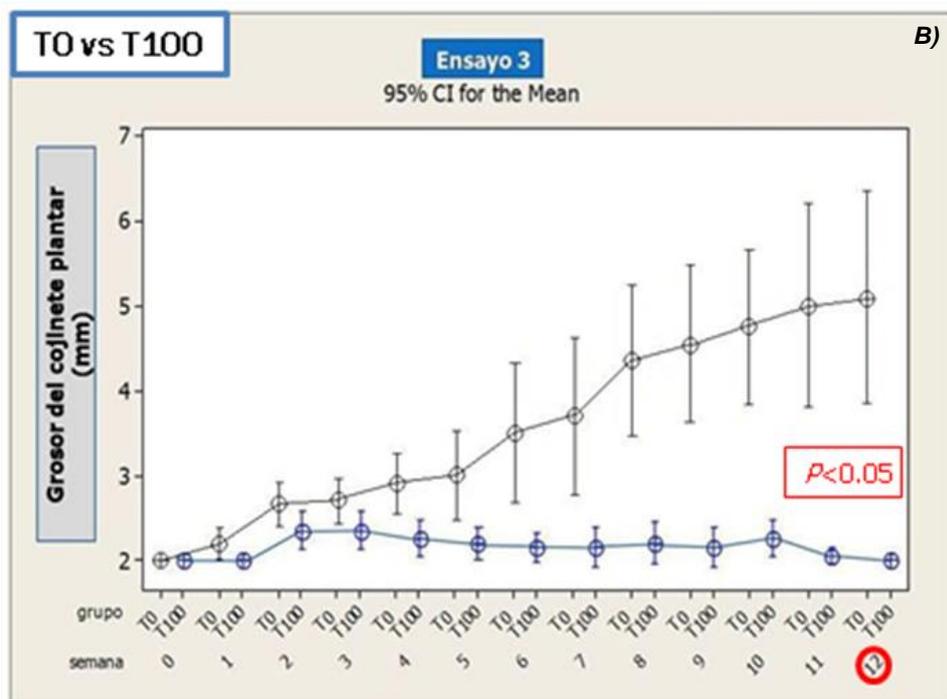
Gráfica 2A. Resultados entre T₀ y T₈₀ a la semana 12. Por escala de sistema de cruces observamos que en el grupo control T₀ existe infección del 80% del grupo, mientras que el grupo subcultivado T₈₀ la infección sólo se presentó en el 5%.



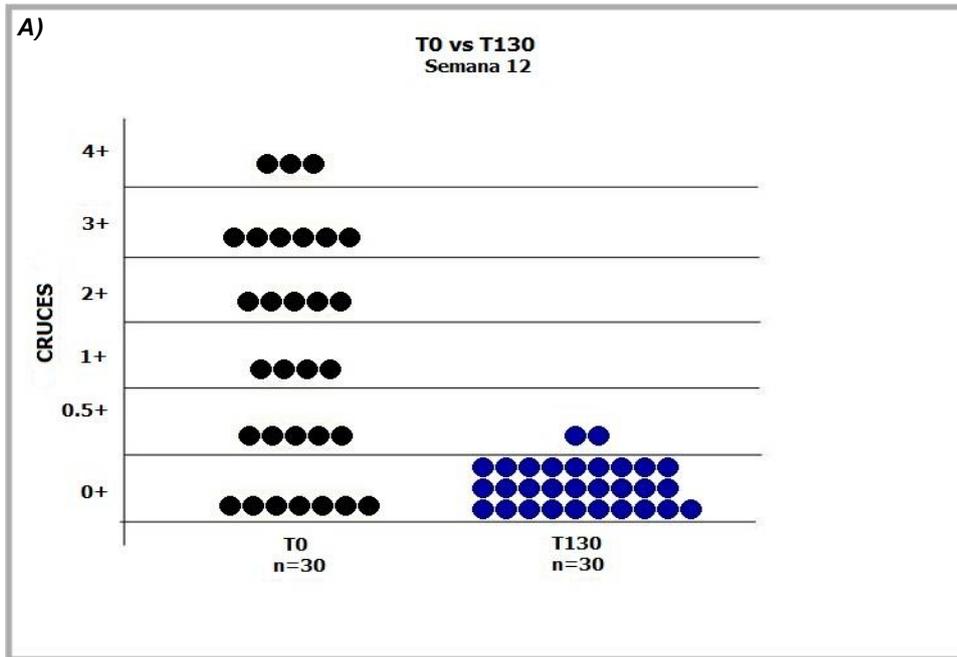
Gráfica 2B. Resultados entre T₀ y T₈₀ a la semana 12. Fue evaluado con la prueba de ANOVA mostrando una $P < 0.001$, la barra muestra la desviación estándar.



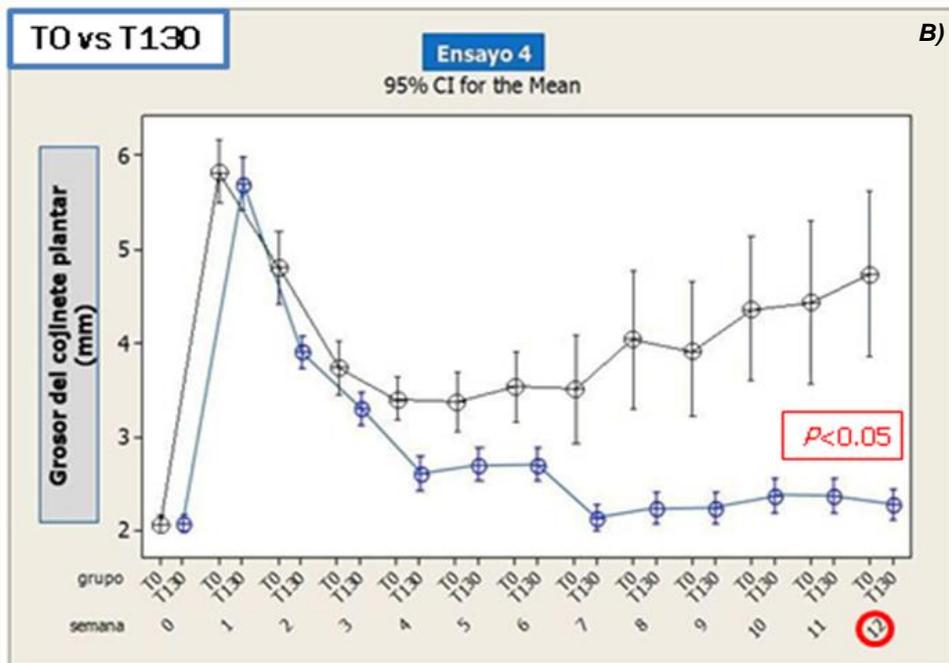
Gráfica 3A. Resultados entre T₀ y T₁₀₀ a la semana 12. Por escala de sistema de cruces observamos que en el grupo control T₀ existe infección del 70% del grupo, mientras que el grupo subcultivado T₁₀₀ la infección estuvo ausente (0%).



Gráfica 3B. Resultados entre T₀ y T₁₀₀ a la semana 12. Fue evaluado con la prueba de ANOVA mostrando una $P < 0.001$, la barra muestra la desviación estándar.



Gráfica 4A. Resultados entre T₀ y T₁₃₀ a la semana 12. Por escala de sistema de cruces observamos que en el grupo control T₀ existe infección del 60% del grupo, mientras que el grupo subcultivado T₁₃₀ la infección estuvo ausente (0%).



Gráfica 4B. Resultados entre T₀ y T₁₃₀ a la semana 12. Fue evaluado con la prueba de ANOVA mostrando una $P < 0.001$, la barra muestra la desviación estándar.

Para este objetivo se graficaron los datos obtenidos en cada uno de los ensayos. En cada gráfica T_0 representa el grupo control, mientras que T_{40} , T_{80} , T_{100} y T_{130} representan los grupos subcultivados en dichas ocasiones. Las gráficas presentadas muestran la media de la altura (grosor del cojinete plantar) en cada semana, con un intervalo de confianza del 95%. Con esto, podemos decir que la media se ubica en ese rango. El círculo indica el valor de la media de la muestra. Se da la comparación entre los grupos control y experimental por semana. Gráficamente, los valores son estadísticamente equivalentes cuando los intervalos se traslapan, de lo contrario, se define una medición como mayor que la otra. La variación de los datos está determinada por la longitud de las barras.

En conclusión, en estos cuatro ensayos podemos observar que el comportamiento es similar para las cepas subcultivadas y las de control, haciendo referencia a que, inmediatamente después de la inoculación ocurre en ambos grupos (tanto experimental como control) una respuesta inflamatoria importante, la cual, va declinando linealmente hasta la semanas 5-6, en las cuales, a partir de este punto, es clínicamente observable la formación del micetoma (aumento de volumen, deformación, nódulos y nodulaciones, fístulas, secreción purulenta o serosanguinolenta). Cabe mencionar que en el ensayo 3 (T_0 vs T_{100}) es de notarse que el desarrollo de la infección, no siguió el patrón antes descrito, es decir, en vez de resaltar la inflamación inicial, ésta se dio de forma gradual hasta que la evidencia

de la infección instalada como tal ocurrió después del mes de la inoculación, al igual que los otros grupos.

Mediante el sistema de cruces puede observarse que en los grupos controles, el desarrollo de micetoma fue siempre mayor, mientras que en los grupos experimentales el desarrollo de micetoma fue menor en todos los tiempos de subcultivos (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Desarrollo de micetoma en ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis* HUJEG-1 subcultivadas

Desarrollo de lesiones	Inóculo utilizado			
	T40	T80	T100	T130
0+	18/20	18/20	20/20	28/30
1+	0/20	0/20	0/20	0/30
2+	2/20	0/20	0/20	0/30
3+	0/20	1/20	0/20	0/30
4+	0/20	0/20	0/20	0/30

9.3 Resultados para el objetivo: Determinación del desarrollo de resistencia a la infección en los grupos de subcultivo T₁₀₀ y T₁₃₀.

Los grupos de ratones BALB/c previamente inoculados con las cepas subcultivadas T₁₀₀ y T₁₃₀ (en el objetivo anterior) en el cojinete plantar derecho después de no haber producido micetoma para la semana 12 ($P < 0.001$), fueron retados al inocular en el cojinete plantar contralateral la cepa control *N. brasiliensis* HUJEG-1 (T₀) y

seguidos semanalmente por 12 semanas (Fig. 4). La evolución natural fue similar a la de las cepas subcultivadas en las primeras 5 semanas post-inoculación pero posterior a esto, se observó una disminución en el desarrollo de lesiones comparado con su respectivo control ($P = 0.021$) (el valor de P fue determinado por la prueba de varianza de ANOVA).

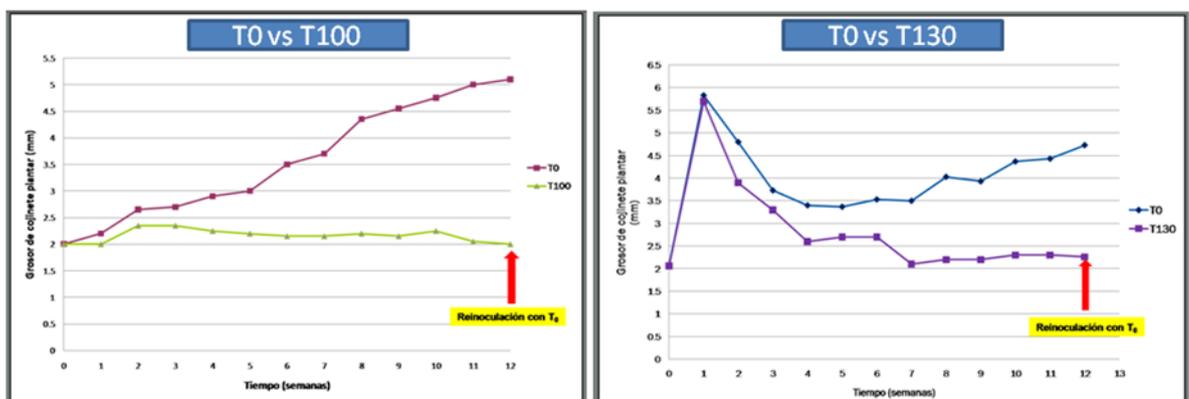
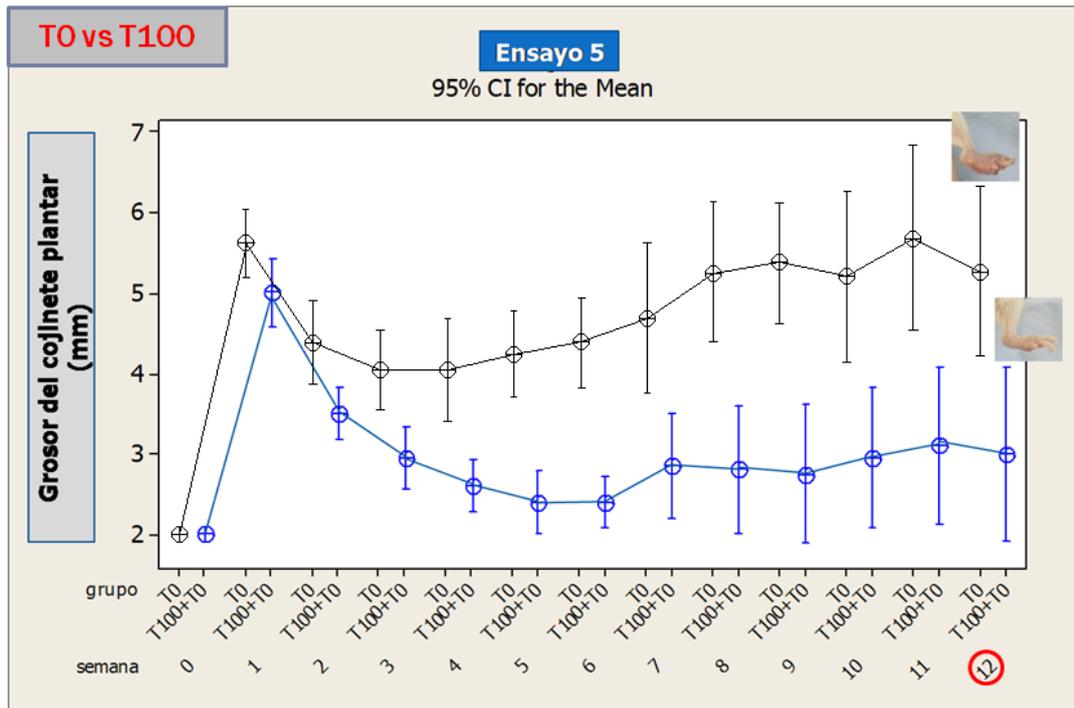
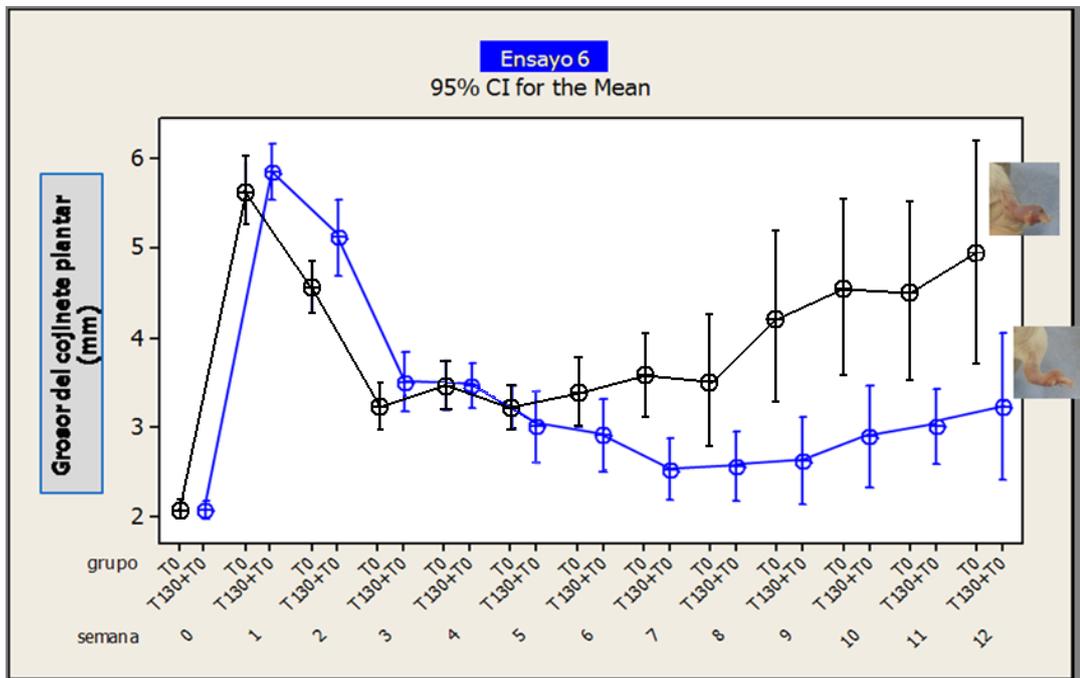


Fig.4. Terminados los ensayos de T₁₀₀ y T₁₃₀ a la semana 12, se realizó la re-inoculación en el cojinete plantar contralateral con *N. brasiliensis* HJEG-1 sin subcultivar.

Los resultados obtenidos de las pruebas de resistencia a la infección se observan en los Gráficos 5 y 6. Con estos resultados podemos deducir que es posible el desarrollo de un estado de resistencia parcial a la infección en el modelo murino previamente sensibilizado con una cepa subcultivada (T₁₀₀ y T₁₃₀). Los mecanismos por los cuales esto es posible, deberán someterse a un estudio minucioso más adelante.



Gráfica 5. Resultados de ensayo de resistencia a la infección en T₀ vs T₁₀₀+T₀.



Gráfica 6. Resultados de ensayo de resistencia a la infección en T₀ vs T₁₃₀+T₀.

9.4 Resultados para el objetivo: Realización de estudio histopatológico e inmunohistoquímico comparativo entre el grupo control y grupo T₁₃₀.

Para este objetivo, se incrementó la “n” del grupo subcultivado, utilizando 30 ratones BALB/c por grupo, con la finalidad de tomar biopsias de los cojinetes plantares tanto del grupo experimental T₁₃₀ como del control (el grupo subcultivado utilizado en este objetivo fue el grupo T₁₃₀). Los resultados de la histopatología con tinción H&E (Fig. 5) muestran que, en el grupo control (no subcultivado) para la semana 1, existen abundantes polimorfomuncleares (PMN) rodeando los fragmentos del inóculo de *N. brasiliensis* (aún no constituídos en granos) como se muestra en la Figura 5. Dos semanas después los granos se encuentran rodeados de una capa de fibrosis, PMN y en la periferia macrófagos espumosos. Para la semana 7 post-inoculación se encuentran abundantes granos y microabscesos en capas de fibrosis concéntricas. Para la semana 12 (Fig.6), se muestran células espumosas gigantes tan grandes como un grano de *Nocardia brasiliensis* (80-130µm) alrededor de los abscesos, con los granos embebidos en el centro de un gran absceso compuesto por PMN y células necróticas. Macroscópicamente se cataloga como lesión de 4+.

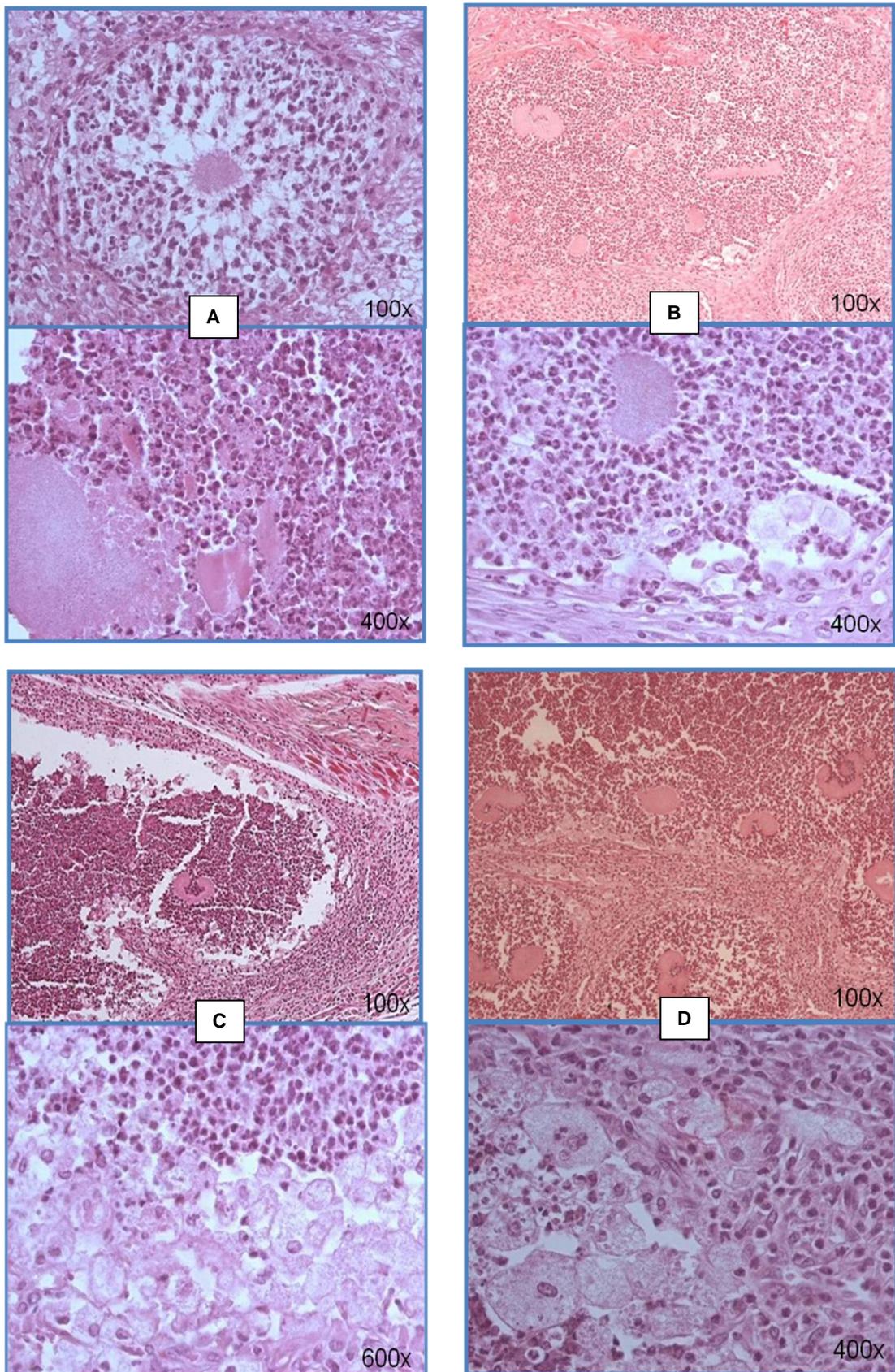


Fig. 5. Resultados de histopatología H&E grupo T₀ (control) para las semanas 1(A), 3(B), 5(C) y 7(D)

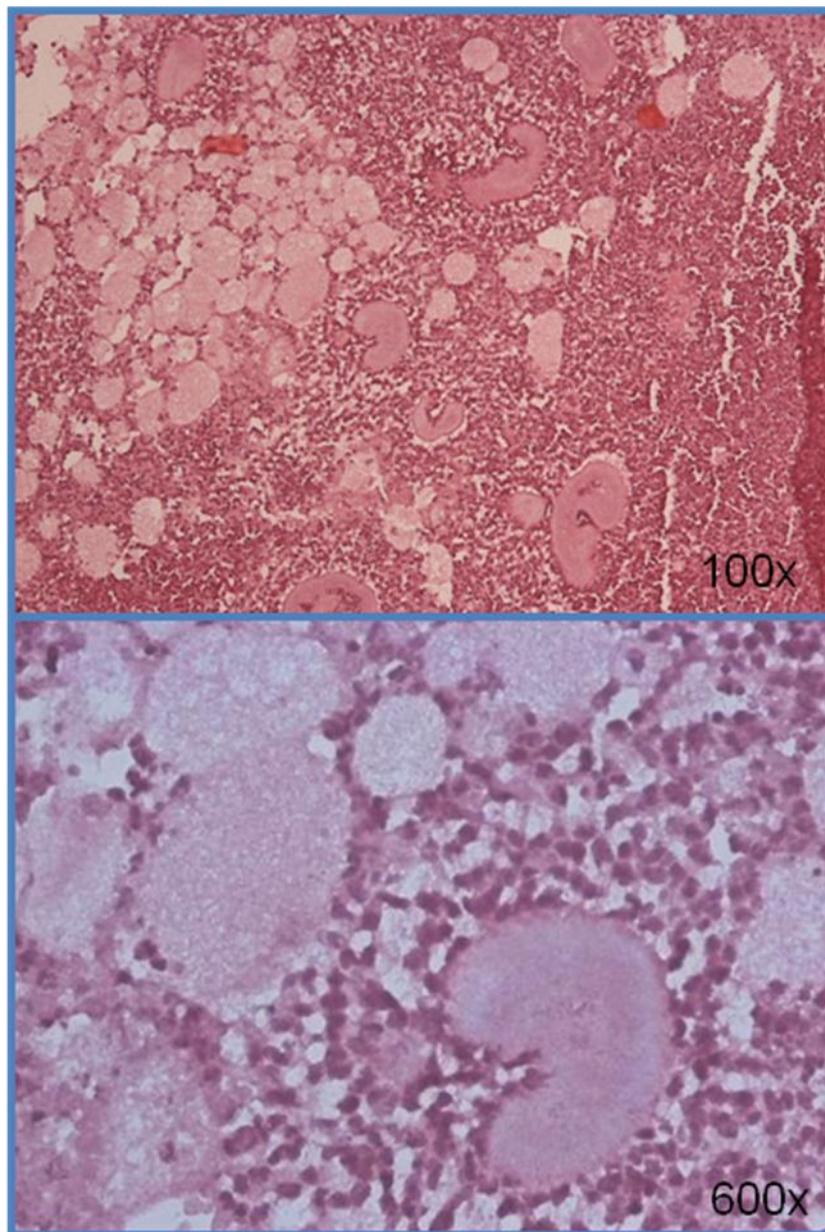


Fig. 6. Resultados de histopatología H&E grupo T₀ (control) para la semana 12 se muestran células espumosas gigantes tan grandes como un grano de *Nocardia brasiliensis* (80-130µm) alrededor de los abscesos, con los granos embebidos en el centro de un gran absceso compuesto por PMN y células necróticas. Macroscópicamente se cataloga como lesión de 4+.

En el grupo T₁₃₀ re-inoculado con T₀ en la semana 1 se obtuvieron los mismos resultados de en el grupo control, esto es, un infiltrado de PMN alrededor de los fragmentos del inóculo (Fig. 7). En la semana 3, los microabscesos que contienen a los fragmentos de inóculo están rodeados de una capa de macrófagos espumosos. A la semana 5, los microabscesos están conformados por pequeñas cantidades de células espumosas comparadas con las que se presentan en la misma semana en el grupo T₀ y los granos se encuentran en diferentes estadios de destrucción. También pudo evidenciarse un infiltrado considerable de células mononucleares en la periferia de los microabscesos entre las fibras de colágena. En la semana 12 post-inoculación se encontró un decremento en el número de animales que presentaron lesiones de micetoma. Las biopsias tomadas de los animales que presentaron lesiones a la semana 12 mostraron abundantes granos contenidos en los microabscesos encapsulados en paredes fibróticas.

En el grupo control, la inmunohistoquímica mostró un infiltrado de linfocitos CD8+ principalmente alrededor de los microabscesos, entre la fibrosis; los macrófagos CD14+ fueron escasos. Los linfocitos CD4+ fueron los más numerosos encontrados. En los animales de lesiones 4+ (a las 12 semanas post-inoculación) se observaron pocos linfocitos y macrófagos, tal vez debido a que la mayoría de las lesiones estaban compuestas por abscesos (Fig.9).

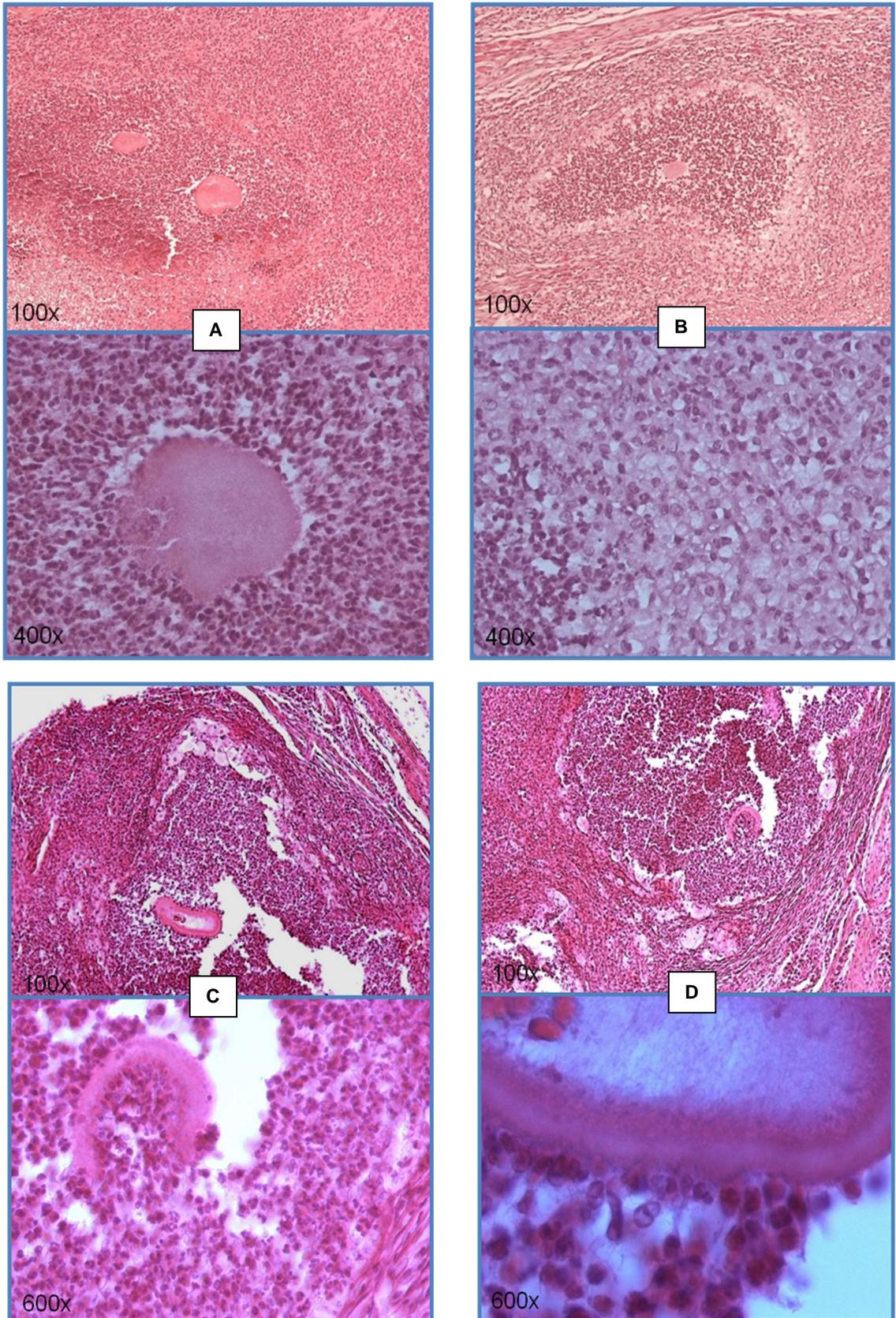


Fig. 7. Resultados de histopatología H&E grupo T₁₃₀ retado con *N. brasiliensis* HUJEG-1 sin subcultivar para las semanas 1(A), 3(B), 5(C) y 7(D).

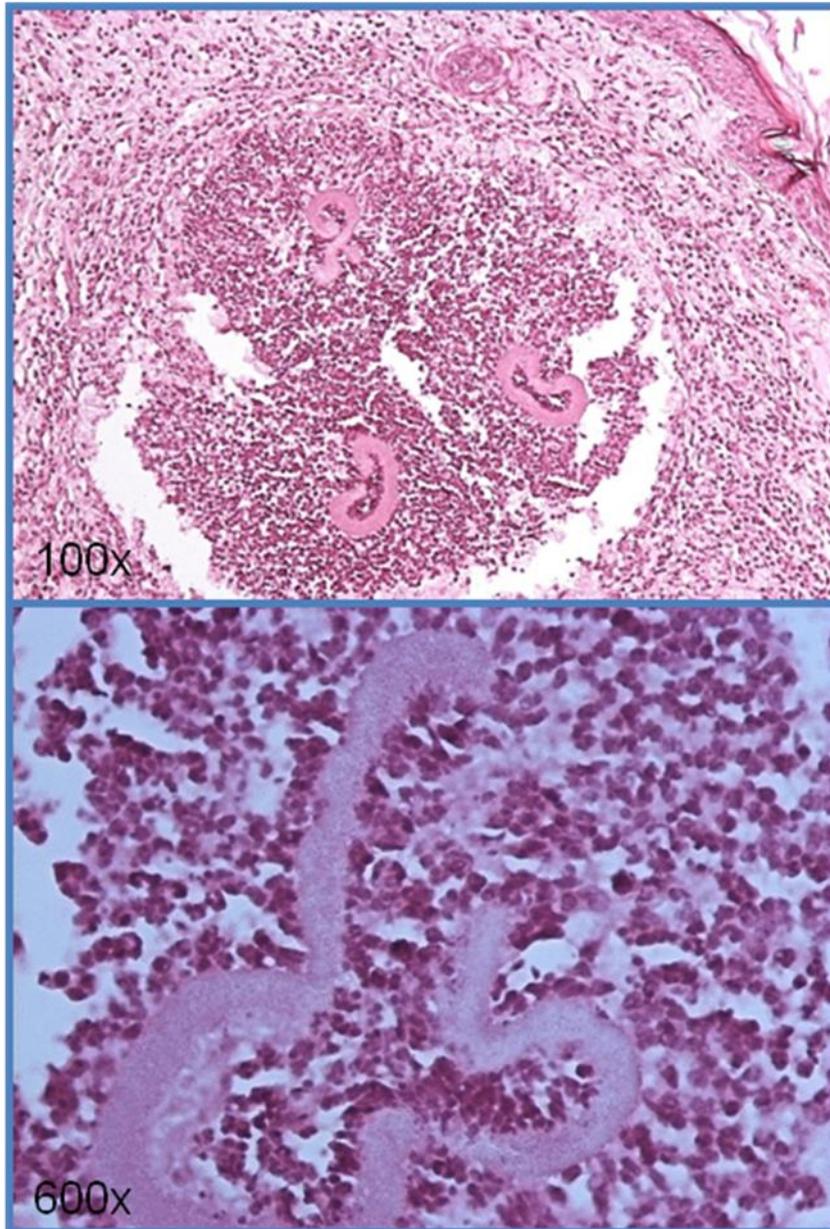


Fig. 8. Resultados de histopatología H&E grupo T₁₃₀ retado con *N. brasiliensis* HUJEG-1 sin subcultivar para la semana 12. Las biopsias tomadas de los animales que presentaron lesiones a la semana 12 mostraron abundantes granos contenidos en los microabscesos encapsulados en paredes fibróticas, así como destrucción de granos de Nocardia.

En el grupo subcultivado T₁₃₀ y re-inoculado con T₀ se observó un patrón diferente (Fig.10). Los linfocitos CD8+ fueron escasos en todas las muestras analizadas, mientras que los linfocitos CD4+ fueron mucho más numerosos después de la semana 5 de la inoculación (Tabla 2). Para este tiempo, la mayoría de las lesiones iniciaron su curación. Los macrófagos CD14+ fueron observados abundantemente en acúmulos en la semana 5 en las áreas de tejido cicatrizal, constituyendo la mayoría de las células presentes.

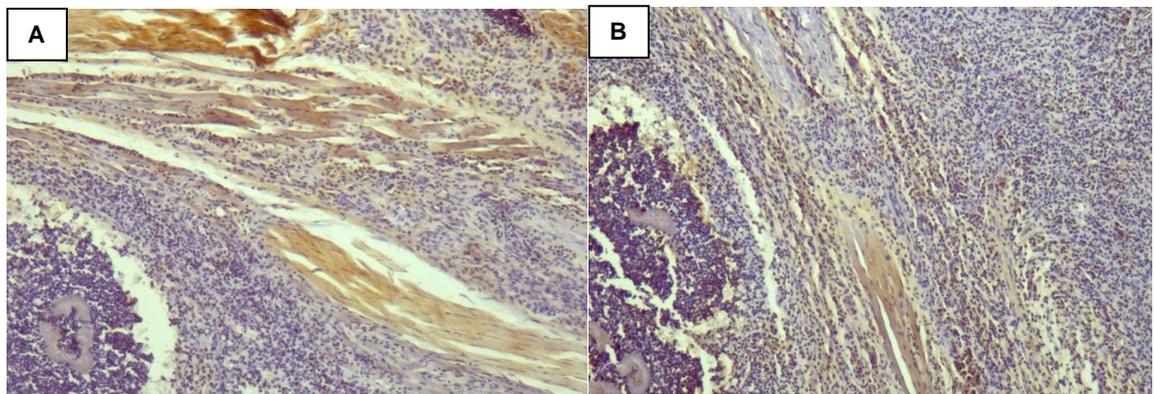


Fig. 9. Resultados de inmunohistoquímica. Semana 5 postinfección en ratones inoculados con *N. brasiliensis* HUJEG-1 no subcultivada. Muestra positividad para células anti-CD4 (A) y anti-CD14 (B) en dilución 1:500. 100x.

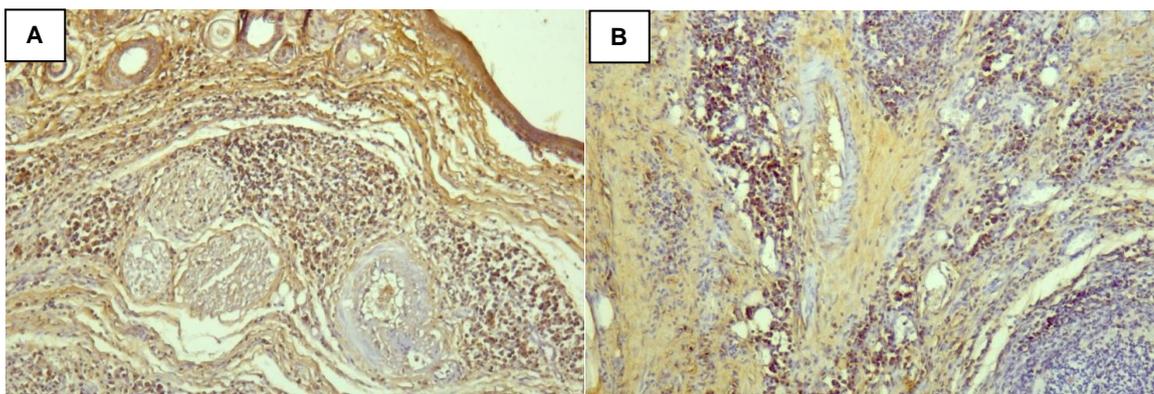


Fig. 10. Resultados de inmunohistoquímica. Semana 5 postinfección en ratones inoculados con T₁₃₀ y retados con *N. brasiliensis* HUJEG-1 no subcultivada. Muestra positividad para CD4+ (A) y CD14+ (B) en dilución 1:500. Los linfocitos T son abundantes alrededor de los microabscesos, entre el tejido cicatrizal (100x).

Tabla 2. Resultados de inmunohistoquímica de biopsias contra CD4, CD8 y CD14.
Semanas después de la reacción a la inoculación contra los anticuerpos:

	CD4		CD8		CD14	
	T0	T130	T0	T130	T0	T130
1	(-)	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	++	(-)	+	(±)	(±)	(±)
5	++	+++	+	(±)	+	+++
12	(±)	++	(±)	(±)	(±)	+++

10.0 DISCUSIÓN

Como se había mencionado anteriormente, la atenuación de los microorganismos puede hacerse por medio de pasajes seriados conocido como subcultivos. Calmette y Guérin realizaron la atenuación de *M. bovis* hasta convertirla en lo que hoy conocemos como vacuna BCG, lo que podemos llamar el ejemplo clásico de la atenuación por subcultivos. El micetoma producido por *Nocardia brasiliensis* es una patología relativamente frecuente en el noreste de México y este agente microbiológico llega a contribuir como agente etiológico hasta en el 86% de los casos de actinomicetoma. Esta entidad aunque sólo en rara ocasión representa un peligro para la vida del paciente, es una enfermedad deformante y discapacitante, por lo que afecta en la calidad de vida de quien la padece. Es parte de nuestra obligación conocer más acerca de este agente etiológico tan común en nuestro medio. Sabemos que *Nocardia brasiliensis* comparte características filogenéticas con otros microorganismos y de ahí desarrollamos la idea que puedan comportarse de un modo similar, alterando su virulencia con este procedimiento, es decir, atenuarse por medio de los subcultivos. La realización de cada uno de los subcultivos se realizó cada 72 hrs obteniendo un subcultivo a la vez hasta obtener los subcultivos a los tiempos 40, 80, 100 y 130 (T₄₀, T₈₀, T₁₀₀ y T₁₃₀). La forma en la que probamos la atenuación de la virulencia, fue inoculando dos grupos de ratones con cepa subcultivada y no subcultivada ya

conocida como virulenta y comparándolos en diferentes etapas de subcultivo. Al término de cada uno de los ensayos experimentales pudimos concluir que se altera la virulencia de *Nocardia brasiliensis* por medio del subcultivo y, que dicho cambio atenúa su virulencia y da como resultado la inducción de micetomas experimentales de menor tamaño, con poca o nula secreción purulenta/sero-sanguinolenta, así como la disminución en la formación de fístulas y nódulos/nodulaciones comparado con un grupo control. Además podemos decir que la capacidad de desarrollar micetoma experimental de las cepas subcultivadas va disminuyendo conforme avanzan los pasajes de subcultivo y que la diferencia entre el grupo control y el subcultivado a los Tiempos 40, 80, 100 y 130 es estadísticamente significativa ($P < 0.05$) al desarrollar micetoma experimental para la semana 12.

Para la semana 5 post-inoculación, las lesiones iniciaron su curación en los animales inoculados con T₁₃₀ y re-inoculados con T₀. Para este tiempo, las lesiones microscópicamente fueron caracterizadas por la presencia de granos huecos semi-destruidos así como por la presencia de un infiltrado intenso de células mononucleares. Estos hallazgos microscópicos son similares a los observados en las ratas Lewis infectadas con *N. brasiliensis*⁶⁵. Estos animales son resistentes naturales a la infección aún cuando se utiliza gran cantidad de bacterias. Presentan una inflamación inicial, pero a partir de este punto las lesiones inician su curación espontáneamente y microscópicamente se observan granos semi-destruidos. Esto

sugiere que la inmunización con la cepa subcultivada T₁₃₀ puede inducir un estado de resistencia, aunque incompleto. Será de vital importancia realizar ensayos de re-inmunizaciones con extractos crudos de la bacteria para determinar si el nivel de resistencia puede incrementarse.

La presencia de escasos linfocitos y macrófagos en el tejido de las biopsias de lesiones humanas de actinomicetoma también han sido descritas^{26,66}. Los linfocitos también están presentes en escasas cantidades en la periferia de los microabscesos, similar a lo que observamos en este trabajo en los ratones infectados con T₀. En la lepra, se han descrito 2 patrones de linfocitos in situ, en las lesiones tuberculoideas CD8+ (OKT8+) las células se encuentran alrededor del granuloma y en las CD4+ (OKT4+) las células se distribuyen a través del granuloma⁷⁷. En los pacientes lepromatosos se encuentran ambos patrones distribuidos en los granulomas sin predilección por la periferia. La organización de los linfocitos T en la lepra tuberculoide refleja una respuesta inmune efectiva. En el actinomicetoma, no hay verdaderos granulomas, en vez estos, los microorganismos se contienen en microabscesos rodeados por una capa de macrófagos espumosos. Los hallazgos microscópicos descritos anteriormente corresponden a “las lesiones por *N. brasiliensis*” las cuales con diferentes a las que se presentan por *N. asteroides*⁶⁸. En el caso de los ratones inmunizados con T₁₃₀ y luego retados con T₀ observamos un aumento en los linfocitos CD4+ así como un abundante infiltrado

de macrófagos (células CD14+) a las 5 semanas después de la inmunización. Las células mononucleares siempre se localizaron en grupos afuera de los microabscesos en el tejido cicatrizal. Aparentemente este notable aumento en el número de macrófagos es responsable de la eliminación de *Nocardia* y de la consecuente curación de las lesiones en nuestros experimentos. La identificación de los antígenos de *N. brasiliensis* que provoca esta respuesta inmune celular así como los mecanismos inmunológicos como las citocinas y células involucradas en la destrucción de los granos, nos ayudará a proveer un mejor conocimiento de los mecanismos de resistencia hacia *N. brasiliensis*.

Algunos estudios sobre la evolución bacteriana han permitido el análisis de los cambios en el genoma producidos por adaptación hacia un medio o nicho en particular. En *E. coli* se ha observado que las mutaciones, deleciones, inserciones, duplicaciones e inversiones en el cromosoma aparecen en tan sólo 2000 generaciones⁶⁹ y los cambios en el cromosoma se incrementan en forma lineal hasta 20,000 generaciones produciendo la pérdida de aproximadamente 1.2% del cromosoma original (durante 20 años de subcultivos). Aunque esto es una gran cantidad de deleciones, la mayoría de la mutaciones observadas en el ADN fueron sinónimas (sin sentido), sin afectar las propiedades biológicas de las bacterias. En nuestro caso parece ser que *Nocardia* necesita tan sólo algunas pocas generaciones para producir cambios en su virulencia, ya que desde los 40 subcultivos ya

observamos una diferencia notable en su virulencia. En *Burkholderia cenocepacia* tan sólo 500 generaciones hicieron posible que esta bacteria fuera incapaz de matar al nematodo *Caenorhabditis elegans*⁷⁰. En ese trabajo, 1000 generaciones tomaron alrededor de 152 subcultivos diarios. Dado el tiempo de la generación de *Nocardia* nos tomó alrededor de 4 años lograr 130 subcultivos. Es difícil calcular el número exacto de generaciones ya que *Nocardia brasiliensis* se divide produciendo filamentos más que por fisión binaria. Será necesario diseñar un experimento para resolver este problema y determinar el número de generaciones para comparar nuestros resultados con otros experimentos en la evolución microbiana.

En el caso de *M. bovis*, filogenéticamente relacionado con *N. brasiliensis*, tomó aproximadamente 230 subcultivos en medio líquido papa-bilis de buey para disminuir su virulencia para ciertos mamíferos incluyendo a terneros, caballos y el hombre⁵⁷. La atenuación de la BCG ha sido explicada por la pérdida de grandes regiones de diferencia (RD) del ADN⁷¹, siendo el más importante RD1 que incluye ORF's que codifican para proteínas ESAT-6 y CFP10. En nuestro caso acerca de *N. brasiliensis*, observamos una disminución significativa en su virulencia, sin embargo, muy recientemente acaba de publicarse la secuencia genómica completa de *N. brasiliensis*⁷² y debemos considerar esto como una herramienta que nos ayude a determinar los cambios genómicos responsables de la atenuación de la virulencia en nuestros ensayos.

Como conclusión, nosotros observamos una disminución notable en la virulencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 después de subcultivarla 130 pases seriados in vitro, comparándolo con una cepa parental. Este puede ser un excelente modelo para estudiar los mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia al micetoma, ya que la inoculación previa con una cepa atenuada produjo una protección contra la infección con la cepa parental o T₀. Así mismo, debemos también considerar la posibilidad de utilizar estas bases para abrir investigación para el desarrollo de una terapia biológica futura contra el actinomicetoma producido por *N. brasiliensis*.

11.0 REFERENCIAS

1. Brown-Elliott, B., J. Brown, P. Conville and R. J. Wallace.(2006). Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 19(2): 259-282.
2. Rodríguez-Nava, V., A. Couble, C. Molinard, H. Sandoval, P. Boiron and F. Laurent (2004). *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *J Clin Microbiol* 42(10): 4530-4535.
3. Welsh, O., L. Vera-Cabrera and M. Salinas-Carmona. Mycetoma. *Clin Dermatol* 25(2): 195-202.
4. R, A. M. a. A. (2008). Developments in the management of mycetomas. *Clinical and Experimental Dermatology*(34): 1-7.
5. Welsh, O., L. Vera-Cabrera, E. Welsh and M. C. Salinas. (2012). Actinomycetoma and advances in its treatment. *Clin Dermatol* 30(4): 372-381.
6. Conde, C., E. Melendro, M. Fresán and L. Ortiz-Ortiz. (1982). *Nocardia brasiliensis*: mycetoma induction and growth cycle. *Infect Immun* 38(3): 1291-1295.
7. Salinas-Carmona, M. (2000). *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect* 2(11): 1373-1381.
8. Farina, C. F. C. s. m. i., L. Andrini, G. Bruno, M. Sarti, M. F. Tripodi, R. Utili and P. Boiron. *Nocardia brasiliensis* in Italy: A nine-year experience. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 39(11/12): 969-974.
9. Licón-Trillo A, Angeles Castro-Corona M, Salinas-Carmona M. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of micetoma. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Jun;37(1):37-44.
10. López Martínez R, Méndez Tovar L, Lavallo P, Welsh O, Saúl A, Macotela Ruíz E. [Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases]. *Gac Med Mex*.128(4):477-81. PubMed PMID: 1308000. Spa
11. Vera-Cabrera L, Johnson W, Welsh O, Resendiz-Uresti F, Salinas-Carmona M. Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona*, and *Rhodococcus*. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1971-6. PubMed PMID: 10325357. eng.
12. Cantú-Garza H. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con micetoma en la consulta de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González" período 1990-2003. [Especialidad]: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2004.
13. Méndez-Tovar L, Mondragón-González R, Vega-López F, Dockrell H, Hay R, López-Martínez R, et al. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia*. 2004 Nov;158(4):407-14. PubMed PMID: 15630549. eng.

14. McMinn E, Alderson G, Dodson H, Goodfellow M, Ward A. Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* and related strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000 Dec;78(3-4):331-40. PubMed PMID: 11386356. eng.
15. Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, et al. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Oct;101(41):14925-30. PubMed PMID: ISI:000224488000044
16. Salinas-Carmona M, Ramos A, Pérez-Rivera I. Immunogenicity is unrelated to protective immunity when induced by soluble and particulate antigens from *Nocardia brasiliensis* in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2006 Aug;8(9-10):2531-8. PubMed PMID: 16935541. eng.
17. Cloud J, Conville P, Croft A, Harmsen D, Witebsky F, Carroll K. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nocardia species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb;42(2):578-84. PubMed PMID: 14766819. eng.
18. Conde C, Mancilla R, Fresan M, Ortiz-Ortiz L. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun*. 1983 Jun;40(3):1218-22. PubMed PMID: 6852920. Eng.
19. Biehle J, Cavalieri S, Felland T, Zimmer B. Novel method for rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes. *J Clin Microbiol*. 1996 Jan;34(1):103-7. PubMed PMID: 8748283. eng.
20. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Delmée M. Distribution of nocardia species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2624-8. PubMed PMID: 15956375. eng.
21. Ramulu H, Adindla S, Guruprasad L. Analysis and modeling of mycolyl-transferases in the CMN group. *Bioinformatics*. 2006;1(5):161-9. PubMed PMID: 17597881. eng.
22. Stackebrandt E, Brambilla E, Richert K. Gene sequence phylogenies of the family microbacteriaceae. *Curr Microbiol*. 2007 Jul;55(1):42-6. PubMed PMID: 17551787. eng.
23. Saboulle, M and D. Sussland. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4497-4501.
24. Chacon-Moreno BE, Welsh O, Cavazos-Rocha N, de la Luz Salazar-Cavazos M, Garza-Lozano HG, Said-Fernandez S, et al. Efficacy of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Nocardia brasiliensis* in vitro and in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan;53(1):295-7. PubMed PMID: 18852277. Pubmed Central PMCID: PMC2612135. eng.
25. González-Ochoa, A. Virulence of nocardie. *Can J Microbiol*. 1973;19(8):901-904.
26. Guimaraes CC, Castro LG, Sotto MN. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop*. 2003 Aug;87(3):377-84. PubMed PMID: 12875932. Epub 2003/07/24. Eng.

27. Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona M, Welsh O, Rodriguez M. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. J Clin Microbiol. 1992 May;30(5):1183-8. PubMed PMID: 1583118. Eng
28. Salinas-Carmona M, Welsh O, Casillas S. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. J Clin Microbiol. 1993 Nov;31(11):2901-6. PubMed PMID: 8263174. eng.
29. Salinas-Carmona M, Torres-López E. Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Ann N Y Acad Sci. 1996 Oct;797:263-5. PubMed PMID: 8993374. eng.
30. Daniel T. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. Int J Tuberc Lung Dis. 2005 Sep;9(9):944-5. PubMed PMID: 16158885. Eng.
31. Wu G, Nie L, Zhang WW. Predicted highly expressed genes in *Nocardia farcinica* and the implication for its primary metabolism and nocardial virulence. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 2006 Jan;89(1):135-46. PubMed PMID: ISI:000237508800015.
32. Salinas-Carmona M, Castro-Corona M, Sepúlveda-Saavedra J, Perez L. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Clin Diagn Lab Immunol. 1997 Mar;4(2):133-7. PubMed PMID: 9067645. eng.
33. Salinas-Carmona M, Vera L, Welsh O, Rodríguez M. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. Zentralbl Bakteriol. 1992 Feb;276(3):390-7. PubMed PMID: 1576408. eng.
34. Salinas-Carmona M, Pérez-Rivera I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. Infect Immun. 2004 Oct;72(10):5597-604. PubMed PMID: 15385456. eng.
35. Castro-Matteotti B, Vera-Cabrera L, Ocampo-Candiani J, Rendón A, Salinas-Carmona M, Welsh O. Immune response to *Nocardia brasiliensis* extracellular antigens in patients with mycetoma. Mycopathologia. 2008 Mar;165(3):127-34. PubMed PMID: 18302006. eng
36. Vera-Cabrera L, Daw-Garza A, Said-Fernández S, Lozano-Garza H, de Torres N, Rocha N, et al. Therapeutic Effect of a Novel Oxazolidinone, DA-7867, in BALB/c Mice Infected with *Nocardia brasiliensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(9):e289. PubMed PMID: 18820738. eng.
37. Solis-Soto J, Quintanilla-Rodriguez L, Meester I, Segoviano-Ramirez J, Vazquez-Juarez J, Salinas Carmona M. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. Histol Histopathol. 2008 May;23(5):573-81. PubMed PMID: 18283642. eng.
38. Gonzalez-Suarez ML, Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009 Oct;57(1):17-24. PubMed PMID: 19624737. eng.

39. Mustafa, T., S. Phyu, R. Nilsen, R. Jonsson and G. Bjune (2000). In situ expression of cytokines and cellular phenotypes in the lungs of mice with slowly progressive primary tuberculosis. *Scand J Immunol* 51(6): 548-556. 72
40. Cardona P, Soto C, Martín C, Giquel B, Agustí G, Andreu N, et al. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2006 Jan;8(1):183-90. PubMed PMID: 16182591. eng.
41. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jul;16(3):463-96. PubMed PMID: 12857778. eng.
42. Beaman B, Moring S. Relationship among cell wall composition, stage of growth, and virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. *Infect Immun.* 1988 Mar;56(3):557-63. PubMed PMID: 3343049. eng.
43. Revol A, Espinoza-Ruiz M, Medina-Villanueva I, Salinas-Carmona MC. Expression of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Canadian Journal of Microbiology.* 2006 Dec;52(12):1255-60. PubMed PMID: ISI:000244783100013
44. González-Ochoa A. [Experimental production of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in the mouse]. *Gac Med Mex.* 1969 Aug;99(8):773-81. PubMed PMID: 5822132. spa.
45. Gonzalez-Ochoa A. Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Isolation of the agent from soils. *Rev Inst Salubr Enferm Trop.* 1962 Jun;22:15-24. PubMed PMID: 13949039. eng.
46. Vera-Cabrera L, Johnson W, Welsh O, Resendiz-Uresti F, Salinas-Carmona M. Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona*, and *Rhodococcus*. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1971-6. PubMed PMID: 10325357. eng.
47. Zlotnik H, Buckley H. Experimental production of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun.* 1980 Sep;29(3):1141-5. PubMed PMID: 7429630. eng.
48. Manabe Y, Scott C, Bishai W. Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2002 Mar;70(3):1566-70. PubMed PMID: 11854245. eng.
49. Uzzau S, Marogna G, Leori G, Curtiss Rr, Schianchi G, Stocker B, et al. Virulence attenuation and live vaccine potential of *aroA*, *crp* *cdt* *cya*, and plasmid-cured mutants of *Salmonella enterica* serovar *Abortusovis* in mice and sheep. *Infect Immun.* 2005 Jul;73(7):4302-8. PubMed PMID: 15972523. eng.
50. Sebastian S, Dillon S, Lynch J, Blalock L, Balon E, Lee K, et al. A defined O-antigen polysaccharide mutant of *Francisella tularensis* live vaccine strain has attenuated virulence while retaining its protective capacity. *Infect Immun.* 2007 May;75(5):2591-602. PubMed PMID: 17296751. eng.
51. Iguchi A, Osawa R, Kawano J, Shimizu A, Terajima J, Watanabe H. Effects of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-

- field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug;40(8):3079-81. PubMed PMID: 12149386. Pubmed Central PMCID: 120646. Epub 2002/08/01. eng.
52. Katouli M, Kuhn I, Mollby R. Evaluation of the stability of biochemical phenotypes of *Escherichia coli* upon subculturing and storage. *J Gen Microbiol.* 1990 Sep;136(9):1681-8. PubMed PMID: 2283499. Epub 1990/09/01. eng.
 53. Ratiner YA, Sihvonen LM, Liu Y, Wang L, Siitonen A. Alteration of flagellar phenotype of *Escherichia coli* strain P12b, the standard type strain for flagellar antigen H17, possessing a new non-fliC flagellin gene flnA, and possible loss of original flagellar phenotype and genotype in the course of subculturing through semisolid media. *Arch Microbiol.* 2010 Apr;192(4):267-78. PubMed PMID: 20174918. Epub 2010/02/23. eng.
 54. Ram S, Khurana S, Singh RP, Khurana SB. Loss of some virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* on repeated subcultures. *Indian J Med Res.* 1992 Nov;95:284-7. PubMed PMID: 1291462. Epub 1992/11/01. eng.
 55. Eckels KH, Dubois DR, Putnak R, Vaughn DW, Innis BL, Henschel EA, et al. Modification of dengue virus strains by passage in primary dog kidney cells: preparation of candidate vaccines and immunization of monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Dec;69(6 Suppl):12-6. PubMed PMID: 14740950. eng.
 56. Badgett MR, Auer A, Carmichael LE, Parrish CR, Bull JJ. Evolutionary dynamics of viral attenuation. *J Virol.* 2002 Oct;76(20):10524-9. PubMed PMID: 12239331. Pubmed Central PMCID: PMC136581. eng.
 57. A., C. (1931). Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.*
 58. (1929). The Calmette-Guerin Vaccine. *Am J Public Health Nations Health* 19(1): 82-83.
 59. Feldman WH. A Study of the Pathogenicity of the Bacillus of Calmette-Guérin (B.C.G.). *American Journal Of Pathology.* 1932;VIII:17. english.
 60. Jason J, Archibald L, Nwanyanwu O, Kazembe P, Chatt J, Norton E, et al. Clinical and immune impact of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination scarring. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6188-95. PubMed PMID: 12379697. eng.
 61. Hsu T, Hingley-Wilson S, Chen B, Chen M, Dai A, Morin P, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct;100(21):12420-5. PubMed PMID: 14557547. eng.
 62. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar;104(13):5596-601. PubMed PMID: 17372194. Pubmed Central PMCID: PMC1838518. eng.
 63. Aranaz A, Romero B, Montero N, Alvarez J, Bezos J, de Juan L, et al. Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* isogenic laboratory strain. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):5388-91. PubMed PMID: 15528751. eng.

64. Molina-Torres CA, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole ST, Vera-Cabrera L. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2010 Apr;59(Pt 4):384-91. PubMed PMID: 20056774. eng.
65. Vera-Cabrera L, Rodríguez-Quintanilla MA, Boltron P, Salinas-Carmona MC, Welsh O. Experimental micetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. Journal Mycol Med 1998, 8(4):183-187.
66. Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Pizaña-Cureño A, Vega-Memije ME, López-Barcenás AP, Arenas-Guzmán R, Padilla-Desgareñes MC, Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. Derm Rev Mex 2007, 51(6):212-218.
67. Modlin RL, Hofman FM, Meyer PR, Sharma OP, Taylor CR, Rea TH: In situ demonstration of T lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: leprosy, rhinoscleroma and sarcoidosis. Clin Exp Immunol 1983, 51(3):430-438.
68. Folb PI, Jaffe R, Altmann G: *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice. Infect Immun 1976, 13(5):1490-1496.
69. Barrick JE, Yu DS, Yoon SH, Jeong H, Oh TK, Schneider D, et al. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature. 2009 Oct 29;461(7268):1243-7. PubMed PMID: 19838166. Epub 2009/10/20. eng.
70. Ellis CN, Cooper VS: Experimental adaptation of *Burkholderia cenocepacia* to onion medium reduces host range. Appl Environ Microbiol 2010, 76(8):2387-2396.
71. Philipp WJ, Nair S, Guglielmi G, Lagranderie M, Gicquel B, Cole ST: Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. Microbiology 1996, 142(Pf11):3135-3145.
72. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Perez-Maya AA, Ocampo-Candiani J. Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. J Bacteriol. 2012 May; 194(10):2761-2. PubMed PMID:22535940. Pubmed Central PMCID: PMC3347167. eng.