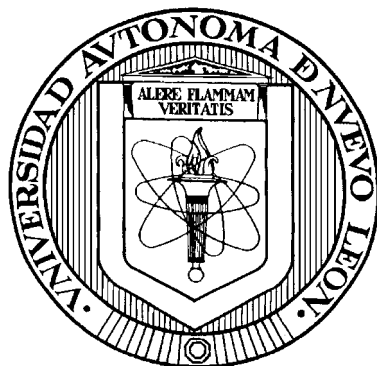


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS CELULAS ESPUMOSAS
DEL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c

Por

M. en C. JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Inmunología

Octubre del 2008

**CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS CELULAS ESPUMOSAS
DEL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL
EN RATONES BALB/c**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Mario César Salinas Carmona, PhD
Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Solís Soto
Co-Director de Tesis

Dr. Bruno Escalante Acosta
Comisión de Tesis

Dr. Oliverio Welsh Lozano
Comisión de Tesis

Dra. Luz Isabel Pérez Rivera
Comisión de Tesis

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado

LUGAR DONDE SE REALIZO EL TRABAJO

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona y la codirección del Dr. Juan Manuel Solís Soto.

Agradezco el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a:

CONACYT: Proyecto #40236-M y #47542

PAICYT UANL: Proyecto #SA162807

También agradezco al CONACYT por la beca otorgada, así como a la Facultad de Medicina de la UANL por todo su valioso apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Mario César Salinas Carmona, por la oportunidad que me otorgó para realizar mis estudios doctorales en el Departamento que dignamente dirige. Al Dr. Juan Manuel Solís Soto por sus aportaciones como Co-director de esta tesis; así mismo a los miembros de la Comisión de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Bruno Escalante Acosta, Director del CINVESTAV unidad Monterrey; al Dr. Alberto Niederhauser García, Coordinador administrativo del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, UANL y a la Dra. Diana Escalante, Jefe del Departamento de Patología del Centro Médico del Noreste del IMSS, por permitirme el uso de su equipo e instalaciones para la realización de parte de este trabajo.

Al Dr. Jorge Piñeiro responsable del laboratorio de Microscopía electrónica de la Facultad de Biología, UANL por su invaluable ayuda en la obtención de los cortes ultrafinos para la microscopía electrónica.

A todas las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo.

Muchas Gracias

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Origen de los Macrófagos.	1
1.1.2. Funciones de los Macrófagos.	2
1.1.2.1. Presentación de Antígenos.	3
1.1.2.2. Fagocitosis.	3
1.1.2.3. Inmunomodulación.	4
1.1.3. Activación de los Macrófagos.	4
1.1.4. La Inflamación.	6
1.1.4.1. Inicio de la Inflamación.	7
1.1.4.2. Resolución de la Inflamación.	8
1.1.4.2.1. Reparación.	9
1.1.4.2.2. Supuración.	9
1.1.4.2.3. Organización.	10
1.1.5. Inflamación Crónica.	10
1.1.5.1. Histopatología de la Inflamación Crónica.	11
1.1.6. Presencia de Células Espumosas en otras Patologías.	12
1.1.6.1. El Caso de la Aterosclerosis.	12
1.1.6.1.1. aP2, Proteína de Unión de Ácidos Grasos de Adipocitos.	14
1.1.6.1.2. Relación Hipoxia y Aterosclerosis.	16
1.1.6.2. Hipoxia e Infecciones Bacterianas.	16
1.1.6.3. Células Espumosas en otros Procesos Patológicos.	17
1.1.7. Definición de Micetoma.	19
1.1.7.1. Etiopatogenia del Micetoma	20

Capítulo	Página
1.1.7.2. Taxonomía y Descripción de <i>Nocardia brasiliensis</i>	21
1.1.7.3. Patogenia de las Infecciones por Actinomicetos.	22
1.1.8. Modelo de Estudio del Actinomicetoma	23
1.1.8.1. Primeros Intentos en la Búsqueda de un Modelo Experimental de Micetoma.	23
1.1.8.2. Descripción Histopatológica de la Lesión Brasiliensis en Animales	24
1.1.8.3. Modelos Experimentales de Actinomicetoma.	26
1.1.8.4. Identificación de Células Productoras de Citocinas en el Actinomicetoma.	28
1.2. Justificación.	29
1.3. Hipótesis.	30
1.4. Objetivo General.	31
1.4.1. Objetivo Específicos	31
2. MATERIAL Y METODOS.	33
2.1. Estrategia General.	33
2.1.1. Ratones.	33
2.1.2. Bacterias.	34
2.1.3. Sacrificio de los Ratones y Obtención de la Biopsia.	35
2.1.4. Preparación de los Cortes Histológicos y Obtención de las Fotomicrografías para el Análisis Morfológico y Morfométrico.	36
2.1.5. Análisis Morfológico del Proceso Inflamatorio, Identificación de las Células Espumosas y Establecimiento de la Cinética de Aparición.	37
2.1.6. Análisis Morfométrico del Granuloma	38
2.1.7. Preparación de Biopsias para Microscopía Electrónica.	40
2.1.8. Identificación Ultraestructural de las Células Espumosas.	40
2.1.9. Identificación del Perfil de Producción de citocinas proinflamatorias y expresión de Marcadores de Superficie de las Células Espumosas.	42
2.1.10. Tinción de Inmunohistoquímica Indirecta.	43
2.1.11. Análisis Estadístico.	44

Capítulo	Página
3. RESULTADOS.	47
3.1. Estudio Morfológico del Sitio de Infección.	47
3.1.1. Aspecto Macroscópico de la Pata del Ratón BALB/c Infeccionada con <i>N. brasiliensis</i>	47
3.1.2. Anatomía Microscópica Normal de la Pata del Ratón BALB/c.	49
3.1.3. Anatomía Histopatológica de la Pata del Ratón BALB/c Infeccionada con <i>N. brasiliensis</i>	51
3.1.4. Cinética de Aparición de las Células Espumosas en el Granuloma.	56
3.1.5. Análisis Morfométrico de las Células Espumosas en el granuloma: Diámetro Promedio, Área Promedio y Número de Células Espumosas por Día.	58
3.1.6. Análisis Ultraestructural de las Células Espumosas Presentes a los Tres Días Postinfección.	64
3.1.7. Expresión de CD64, CD11c, CD40, CD68 y S100 por las Células Espumosas Durante el Establecimiento y Resolución de la Infección.	68
3.1.8. Perfil de Secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF α por las Células Espumosas en Base al Tiempo.	69
4. DISCUSION.	72
4.1. Discusión	72
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	85
5.1. Conclusiones.	85
5.2. Perspectivas.	86
LITERATURA CITADA.	90
APENDICES.	107
APENDICE .- RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.	108

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Área de las Células Espumosas	61
2.	Marcadores de Superficie en las Células Espumosas	68
3.	Perfil de Producción de Citocinas de las Células Espumosas	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aspecto Macroscópico de la Pata de un Ratón BALB/c Infectado con <i>N. brasiliensis</i>	48
2. Aspecto Histológico Normal de la Pata del Ratón BALB/c.	49
3. Piel del Cojinete Plantar del Ratón BALB/c a los 2 Días Postinfección. . .	52
4. Piel del Cojinete Plantar del Ratón BALB/c a los 10 Días Postinfección . .	53
5. Biopsia de Piel de la Pata de Ratón BALB/c a los 3 Días Postinfección (Tinción H-E)	54
6. Biopsia de Piel de la Pata de Ratón BALB/c a los 3 Días Postinfección (Tinción tricrómico de Masson)	55
7. Biopsias de Piel de la Pata de Ratón BALB/c a los 3, 6, 9, 12, 15, 30, 45, 60 y 90 días postinfección con <i>N. brasiliensis</i>	57
8. Diámetro Promedio de los Perfiles de Células Espumosas	59
9. Área Promedio de las Células Espumosas.	60
10. Área de la Población de Células Espumosas Pequeñas	62
11. Relación entre área de las Células Espumosas y Día de la Medición. . .	63
12. Número de Células Espumosas por Campo	64
13. Biopsia de Piel de la Pata de Ratón BALB/c a los 3 Días Postinfección (Microscopía de campo claro de cortes semifinos).	65

Figura	Página
14.Células Espumosas en un Granuloma de 3 Días de Evolución (Microscopía electrónica de transmisión)	67
15.Células Espumosas en Granuloma de 3 Días de Evolución (Microscopía electrónica de Transmisión)	67
16.Marcadores de Superficie en las Células Espumosas	69
17.Perfil de Producción de Citocinas por las Células Espumosas	70

NOMENCLATURA

%	Por ciento
°C	Grado Centígrado
ABC-A1	Casete de Unión a ATP
ACAT-1	A:colesterol-aciltransferasa-1
ANOVA	Análisis de Varianza
aP2	Proteínas de Unión a Ácidos Grasos de adipocitos
apoA1	Apolipoproteína A1
apoE	Apolipoproteína E
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosin Trifosfato
BALB/c	Cepa de ratones blancos
BHI	Infusión de Cerebro y Corazón
CD	Cluster Differentiation
CEA	Antígeno Carcino Embrionario
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetra Acético
FABP	Proteínas de Unión a Ácidos Grasos

G-	Gram negativo
G+	Gram positivo
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
HAM 56	Marcador de macrófagos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
H-E	Hematoxilina y Eosina
HIF-1	Factores Inducibles por Hipoxia
HNE	Hidroxinonenal
HPODE	Acido 13-Hidroperoxioctadienoico
HUJEG-1	Hospital Universitario José Eleuterio González-1
IFN- α	Interferón alfa
IFN- β	Interferón beta
IFN- γ	Interferón gama
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LDL-ox	Lipoproteína de Baja Densidad oxidada
LPS	Lipopolisacaridos
LOX-1	Receptor para LDL-ox similar a lectinas
mAb	Anticuerpos Monoclonales
MAC3	Marcador de macrófagos
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1
MHC-II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
ml	Mililitros
NCSS	Number Cruncher Statistical System

NFκB	Factor Nuclear Kappa B
nm	Nanómetros
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PMA	Acetato Forbol Mirístico
PMN	Polimorfonucleares
PG	Prostaglandinas
Prot. G	Proteína G
RNIs	Reactivos Intermediarios de Nitrógeno
ROIs	Reactivos Intermediarios de Oxígeno
rpm	Revoluciones por Minuto
S100	Proteína S 100
SR-A	Receptor Carroñero A
SR-B	Receptor Carroñero B
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TLR	Receptores Tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRAF	Factor Asociado al receptor de TNF
TRIS	Tris (hidroximetilaminoetano)
TX100	Tritón X100
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
λ	Lambda
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
VCAM-1	Molécula vascular de adhesión celular

RESUMEN

Juan Carlos Segoviano Ramírez. Fecha de Graduación: Octubre de 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS CELULAS ESPUMOSAS DEL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c

Número de páginas: 108

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Inmunología.

Área de Estudio: Inmunología

Propósito y método del Estudio: El actinomicetoma, es una enfermedad infecciosa que en México es causado en el 85% de los casos por *N. brasiliensis*. La inyección experimental de esta bacteria en animales de laboratorio, produce una lesión histopatológica particular denominada “lesión brasiliensis” caracterizada por microabscesos donde se destacan las “células espumosas”.

A partir del modelo experimental de micetoma, inducido en el cojinete plantar de ratones BALB/c mediante la inyección de 10^6 UFC de *N. brasiliensis* (ATCC 700358, antes HUJEG-1), se obtuvieron biopsias del sitio de lesión entre los días 3 y 90 postinfección. A partir de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson e inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales y con el empleo de técnicas de microscopía de campo claro y microscopía electrónica de transmisión, se realizó análisis morfológico y morfométrico del granuloma formado y se determinó la cinética de aparición de las células espumosas, sus marcadores de superficie y su perfil de producción de citocinas inflamatorias.

Contribuciones y Conclusiones: Se demostró la organización granulomatosa del proceso inflamatorio y la presencia de células espumosas a los tres días postinfección. Las células espumosas aumentaron su número con el tiempo de infección y además mantuvieron un patrón crecimiento permanente. El análisis inmunohistoquímico indica que son inmunorreactivas a los anticuerpos monoclonales anti IL-1 β , IL-6, IL-12 e INF- γ y anti CD11c, CD40, CD64 y CD68 a partir del cuarto día postinfección, lo que significa que estas células espumosas, además de producir citocinas proinflamatorias desde etapas tempranas de la respuesta inflamatoria granulomatosa, también comparten algunos marcadores de superficie tanto de células dendríticas como de macrófagos.

Firma del Asesor: _____

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

1.1.1. Origen de los Macrófagos

El sistema mononuclear fagocítico está integrado por células que tienen un origen común, morfología similar y su función principal es la fagocitosis (1). Estas células se originan en la médula ósea, circulan en la sangre y maduran o se activan en los tejidos periféricos. Las primeras células que entran a la sangre proveniente de la médula ósea son los monocitos. Cuando salen al espacio extravascular y una vez que se

asientan en los tejidos, maduran y se convierten en macrófagos (una célula más grande y con mayor actividad fagocítica) (2).

Ante un estímulo externo los macrófagos pueden exhibir propiedades tanto morfológicas como funcionales diferentes. Ya sea que desarrollen abundante citoplasma (células epitelioides) o se fusionen para formar células gigantes multinucleadas. Las células epitelioides y las células gigantes multinucleadas son los componentes principales de los granulomas (3). Los macrófagos se encuentran en el tejido conectivo de todos los órganos y según su localización se denominan de diferente manera: células de la microglía, células de Kupffer, osteoclastos, macrófagos alveolares o células de Langerhans.

1.1.2. Funciones de los Macrófagos

Los macrófagos tienen tres principales funciones: presentación de antígenos, fagocitosis e inmunomodulación. Esta última función la realizan a través de la producción de varias citocinas y factores de crecimiento entre las que se encuentran: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gama (IFN- γ), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-10, (IL-10), Interleucina-18

(IL-18), Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-8 (IL-8) entre otras citocinas (4, 5).

Las respuestas de los macrófagos en la defensa consiste en: reclutamiento de células en el sitio de la infección, reconocimiento de los microbios, fagocitosis y destrucción de los microbios ingeridos. Además producen moléculas con actividad biológica que tienen importantes roles en la respuesta inmune innata y adaptativa.

1.1.2.1. Presentación de Antígenos.

Las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, monocitos y macrófagos) se encargan de degradar los microbios ingeridos y presentar sus antígenos a los linfocitos T para activarlos.

1.1.2.2. Fagocitosis.

Los macrófagos tienen la capacidad de ingerir y eliminar desechos y patógenos invasores. Esta función la llevan a cabo mediante hidrolasas contenidas en vesículas intracelulares (lisosomas). El primer paso es el reconocimiento del microbio por receptores de superficie, posteriormente el fagosoma se fusiona con el lisosoma para llevar a cabo la destrucción del patógeno invasor (6).

Los macrófagos expresan receptores que activan a las células para producir citocinas y sustancias microbicidas, que estimulan la

migración y quimiotaxis de las células a los sitios de infección. Estos incluyen los receptores de manosa, los receptores carroñeros, los receptores de opsoninas, los receptores transmembrana, de siete hélices alfa, acoplados a proteínas G y los receptores tipo Toll (TLR) (7,8).

1.1.2.3. Inmunomodulación.

Entre las citocinas producidas por los macrófagos activados, que participan en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria, la IL-12 representa un puente funcional entre la resistencia innata inespecífica y la subsecuente inmunidad adquirida antígeno específica (9).

1.1.3. Activación de los Macrófagos

La activación de los macrófagos es un paso importante de su maduración funcional y de la inflamación. Las señales de activación incluyen citocinas derivadas de linfocitos T: Interferón gama (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y TNF- α ; lipopolisacaridos bacterianos (LPS); complejos inmunes, mediadores químicos y proteínas de la matriz extracelular como la

fibronectina. Una vez activados muestran mayor capacidad para matar microbios y células tumorales. Aumentan de tamaño y muestran más pseudópodos en la membrana plasmática, además producen una amplia variedad de metabolitos biológicamente activos que fuera de control pueden producir el daño tisular y la fibrosis características de la inflamación crónica. Finalmente los macrófagos activados también expresan receptores de TNF- α .

Durante la infección, la activación de los macrófagos es completada por citocinas sintetizadas por los linfocitos T. Los macrófagos expuestos al LPS u otros estímulos inflamatorios liberan TNF- α mediante el que puede activar a otros macrófagos o así mismos.

Después de la estimulación en su superficie y de la endocitosis, pueden secretar una amplia variedad de productos como: enzimas involucradas en la resistencia antimicrobiana; peptidasas, eicosanoides y otros metabolitos del ácido araquidónico, que contribuyen a la inflamación y a la reparación tisular; citocinas IL-1 y TNF- α que modulan las actividades de leucocitos y células endoteliales y reactivos intermediarios de nitrógeno y oxígeno (RNIs/ROIs) que participan en la defensa del huésped. La estimulación de receptores específicos induce varias rutas de señalización que conducen a la activación de los factores de transcripción como el factor nuclear kappa beta (NF κ B), que contribuyen a la expresión de ciertos genes. La expresión genética y sus productos dependen de la regulación transcripcional y de la

modificación postranscripcional de citocinas inhibitorias (IL-10 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)), producidas por macrófagos, fibroblastos y linfocitos T. Los productos de los macrófagos son lábiles y actúan cerca de la superficie, la sobreproducción de citocinas conduce a daño tisular y son responsables de los efectos sistémicos asociados con una infección diseminada o inflamación crónica, como la pirexia, náusea, malestar, anorexia, pérdida de peso, adenopatía, esplenomegalia y a menudo son resultado de un proceso patológico mediado inmunológicamente (10, 11).

1.1.4. La Inflamación

La inflamación, un componente de la respuesta inmune innata, es una secuencia de eventos, compleja y altamente regulada, que pueden ser provocados por organismos patógenos, agentes mecánicos y químicos nocivos y por la respuesta autoinmune. La respuesta inflamatoria ocurre en el tejido conectivo vascularizado e involucra al plasma, las células circulantes, vasos sanguíneos y sus componentes celulares y extracelulares. Esta se acompaña de aumento en el calibre microvascular, aumento de la permeabilidad vascular, reclutamiento de

leucocitos y liberación de mediadores inflamatorios. Estos eventos se traducen en los signos clásicos de la inflamación: enrojecimiento, edema, calor y dolor (12).

La inflamación es el principal proceso a través del cual el organismo repara tejidos dañados y también es un mecanismo de defensa. En condiciones fisiológicas, una respuesta inflamatoria controlada protege contra daño posterior y limpia el tejido dañado. En situación patológica, la inflamación puede dar como resultado la destrucción tisular y conducir a disfunción orgánica.

El proceso inflamatorio puede ser agudo, con duración que varía de minutos a horas o pocos días. Se caracteriza por la formación de exudados de fluidos y proteínas plasmáticas y por la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos polimorfonucleares (PMN). La inflamación crónica es de duración más larga y se asocia a la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular (2).

1.1.4.1. Inicio de la Inflamación.

Ante un trauma inicial por algún agente extraño, sea físico, químico o biológico, ocurre un abundante flujo de células inflamatorias que llegan al sitio de lesión. El proceso de inflamación se inicia con la liberación de quimiocinas y mediadores solubles secretados por las células

endoteliales, dendríticas, macrófagos y fibroblastos locales. Estas señales alteran el perfil de las moléculas de adhesión y crean un gradiente quimiotáctico que recluta más células de la circulación. Las primeras células en llegar al sitio son los PMN, luego los monocitos y macrófagos y finalmente los linfocitos atraídos por mediadores subsecuentes de la cascada inflamatoria. Los macrófagos participan en la producción, movilización, activación y regulación de las células efectoras inflamatorias e inmunes.

Cuando la inflamación es desencadenada por un patógeno, los macrófagos residentes son estimulados por sus receptores de reconocimiento de patrones moleculares que se expresan en su superficie como parte de la respuesta inmune innata. Entre estos receptores se encuentran la familia de TLR que median respuesta que conducen a la activación de NFκB y a la síntesis de las citocinas anteriormente mencionadas. Por ser los principales productores de estas sustancias, los macrófagos juegan un papel muy importante en el inicio de la inflamación (2).

1.1.4.2. Resolución de la Inflamación.

A la restauración completa de los tejidos hacia la normalidad después de un episodio de inflamación aguda, se le conoce como resolución. Esta ocurre principalmente en tejidos con capacidad

autorregenerativa y buen drenaje linfático en los que ha ocurrido un daño celular mínimo, se ha realizado una rápida eliminación del agente causal y se han removido rápidamente los detritus celulares y exudados.

1.1.4.2.1. Reparación. La inhibición de la inflamación por renovación o desactivación de los mediadores y células inflamatorias efectoras permite al huésped reparar los tejidos dañados. El mecanismo preciso para cambiar de las rutas proinflamatorias a las antiinflamatorias no están bien claro. Los componentes de la resolución incluyen una respuesta celular (apoptosis), formación de mediadores solubles (como citocinas antiinflamatorias: IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β y antioxidantes) y la producción de efectores directos (como inhibidores de proteasas). Los macrófagos juegan un papel igualmente importante en el proceso de desregulación (2).

1.1.4.2.2. Supuración. Ante la persistencia de un agente bacteriano, el exudado y las células inflamatorias inician la formación del pus, acúmulo de PMN vivos, muertos y bacterias, además de detritus celulares y gotas de lípidos. Una vez formado, este acúmulo es rodeado por una membrana que consiste de neutrófilos, ocasionalmente fibroblastos y nuevos capilares, a lo que se le denomina absceso. El absceso puede drenar su contenido a través de un tracto sinuoso hacia las mucosas o la piel (13).

1.1.4.2.3. Organización. Es el reemplazo del tejido lesionado por tejido de granulación. Ocurre cuando se forman grandes cantidades de fibrina que no puede ser hidrolizada por las enzimas fibrinolíticas del plasma y eliminada por los PMN. También cuando hay grandes cantidades de tejido necrótico, exudado o detritus celulares que no pueden ser removidos por los PMN. Durante este proceso se forman nuevos capilares en el material inerte (exudado inflamatorio), los macrófagos migran a la zona y los fibroblastos proliferan dando paso a la fibrosis (13).

1.1.5. Inflamación Crónica

Es una respuesta inflamatoria de duración prolongada (semanas, meses o indefinida) provocada por la persistencia del estímulo. El proceso causa un daño inevitable al tejido. La naturaleza, magnitud y el tiempo de la inflamación crónica depende del balance entre el agente causal y los intentos del cuerpo para eliminarlo.

La cronicidad se puede desarrollar por una progresión de la inflamación aguda por persistencia del estímulo, después de episodios

repetidos de inflamación aguda o *de novo* si el agente causal provoca una respuesta inflamatoria aguda débil (13).

Entre los agentes etiológicos de la inflamación crónica están los microorganismos patógenos que pueden evitar o resistir las defensas del huésped y permanecer en el tejido por periodos prolongados de tiempo como las micobacterias, actinomicetos, o bacterias intracelulares como *Brucella*; numerosos hongos, parásitos (*Schistosoma*), protozoarios y metazoarios, que evitan la fagocitosis o sobreviven dentro de las células fagocíticas y tienden a no producir toxinas que provoquen un daño agudo. Otros agentes inductores causantes de inflamación crónica son los materiales inertes que no pueden ser fagocitados como ácido úrico, astillas, polvo de sílice o asbesto, talco, material de sutura, silicón y ciertas prótesis; algunas sustancias químicas como el berilio y drogas como el alopurinol, fenilbutazona y sulfonamidas. También se ha visto que una regulación anormal de la respuesta inmune contra los tejidos propios (enfermedades autoinmunes) puede desencadenar procesos inflamatorios crónicos y por último algunos procesos patológicos de causa desconocida como la sarcoidosis o la enfermedad de Crohn (13).

1.1.5.1. Histopatología de la Inflamación Crónica.

Además de la organización arriba mencionada, el infiltrado celular cambia: los neutrófilos PMN son remplazados por linfocitos, células

plasmáticas, macrófagos y algunas veces incluso por células gigantes multinucleadas. Los acúmulos celulares pueden tener tamaños milimétricos o abarcar grandes zonas. Los macrófagos modificados (llamados macrófagos epitelioides o células epitelioides) que tienen disminuida su capacidad fagocítica y su perfil secretor, son rodeados por linfocitos. Estos macrófagos epitelioides a menudo se agrupan entre sí y forman células gigantes multinucleadas, cuando los núcleos se agrupan en la periferia se les denomina células tipo Langhans.

En el granuloma encontramos áreas de necrosis tisular causada por el agente etiológico o por el proceso inflamatorio *per se*. En ocasiones dicha necrosis tiene aspecto blanquecino (caseoso) como el observado en las lesiones tuberculosas (13).

1.1.6. Presencia de Células Espumosas en Otras Patologías

Diversos estudios han descrito la presencia de células espumosas en otras patologías.

1.1.6.1. El Caso de la Aterosclerosis.

La aterosclerosis es la única entidad patológica en la que se ha comprobado la transformación de macrófagos en células espumosas

(14). Dentro de este contexto se define a las células espumosas como macrófagos transformados, de forma ovoide, algunos filamentos intracitoplásmicos, escaso retículo endoplásmico rugoso, hipertrofia del aparato de Golgi y abundantes vesículas pinocíticas que contienen en su interior una gran cantidad de lípidos del tipo lipoproteínas de baja densidad (LDL).

En este proceso de transformación se involucra a los receptores carroñeros tipo A y B (SR-A y SR-B) en la internalización de las lipoproteínas aterogénicas y a la A:colesterol-aciltransferasa-1 (ACAT-1) en la esterificación del colesterol libre con ácidos grasos. Varias proteínas han sido implicadas en promover la entrada de colesterol al macrófago, entre ellas está un transportador de membrana denominado ABC-A1 (debido a que tienen un casete de unión a ATP) y la apolipoproteína E (apoE). Estos mecanismos actúan redundantemente (14, 15).

La ABC-A1 media la distribución del colesterol a la apolipoproteína A1 (apoA1) y a la lipoproteína de alta densidad (HDL). La inactivación de promotores ABC-A1 aumenta la aterosclerosis en ratones deficientes de apoE (16, 17). La apoE es un aceptor del colesterol intracelular y componente de las HDL que es altamente expresada en los macrófagos. Además de sus otros efectos sistémicos sobre la depuración de lipoproteínas, está involucrada en la regulación local de la inflamación en la pared arterial (18-24).

1.1.6.1.1. aP2, Proteína de Unión de Ácidos Grasos de Adipocitos. La aP2 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) que se encuentran en el citosol de los adipocitos. Sus funciones incluyen: movilización de ácidos grasos hacia enzimas y compartimentos celulares, modulación del metabolismo de los lípidos y regulación de la expresión de genes (25).

Hay evidencia de que varios genes críticos en los adipocitos (factores de transcripción, citocinas, moléculas inflamatorias, receptores nucleares, transportadores de ácidos grasos y receptores carroñeros) también son expresados en macrófagos (14). aP2 también se expresa en varias líneas celulares de monocitos y macrófagos humanos y murinos estimuladas con acetato forbol mirístico PMA (26). La deficiencia de aP2 reduce significativamente la expresión de varias citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) e IL-6 en macrófagos en reposo y activados con PMA (26). También puede estar involucrada con el ingreso del colesterol al macrófago en reposo y activado expuesto a cargas de LDL y su expresión puede contribuir a la aterosclerosis. Las células espumosas expresan aP2 (26).

Por otro lado en los monocitos y macrófagos activados IL-1, TNF- α , LPS, TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) inducen a la ciclooxygenasa-2 (COX-2), ésta a su vez media la producción de prostaglandinas (PG). Las PG promueven la

ateroesclerosis a través de mecanismos que incluyen activación de quimiotaxis, inducción de permeabilidad vascular, propagación de la cascada de citocinas inflamatorias y estimulación de la migración de células mononucleares, proliferación y síntesis de matriz extracelular (14).

Las células espumosas no expresan COX-2 lo cual correlaciona con datos *in vitro* que demuestran que LDL suprime la expresión de COX-2 en los monocitos y macrófagos humanos (27).

Una vez en el citoplasma, la LDL-oxidada (LDL-ox) induce la transformación en células espumosas y desencadenan los eventos proaterogénicos tales como la expresión de moléculas de adhesión, agentes quimiotácticos, factores de crecimiento y citocinas inflamatorias y proliferación celular (28). Dicha transformación parece involucrar NFκB cuya transcripción puede ser activada por aumento en la expresión de genes proinflamatorios tales como moléculas de adhesión, factor tisular, receptor carroñero LOX-1; o puede ser inhibida mediante altas concentraciones de LDL-ox cuando dicha transcripción ha sido disparada por LPS.

Ciertos lípidos oxidados bioactivos que son componentes de LDL-ox están involucrados en la modulación de la actividad de NFκB: Acido 13-hidroperoxioctadecadienoico (13-HPODE) (29), los fosfolípidos (30, 31), la lisofosfatidilcolina (32-35), la hidroxinonenal (HNE) y otros productos

aldehídos formados durante la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados de LDL (36-40) y finalmente la adiponectina vía TNF- α (15).

1.1.6.1.2. Relación Hipoxia y Ateroesclerosis. También en ateroesclerosis se ha demostrado una relación entre la hipoxia tisular presente inmediatamente por debajo de la placa ateromatosa y la transformación de macrófagos en células espumosas. Esto se ve favorecido por la isquemia presente en dichas áreas en donde se pueden ver abundantes cantidades de células espumosas revelando que dichas células experimentan hipoxia durante el desarrollo de la lesión (41).

1.1.6.2. Hipoxia e Infecciones Bacterianas.

En una infección bacteriana el incremento en el consumo de oxígeno por las bacterias en crecimiento, la acumulación de fagocitos en el sitio de infección y la vasoconstricción local impiden la llegada de oxígeno al sitio de inflamación ocasionando un estado de hipoxia. Los macrófagos presentes en el área de inflamación experimentan hipoxia y pueden estar expresando factores inducibles por hipoxia tipo 1 (HIF-1) tal como los expresan cuando son expuestos a bacterias Gram positivas o Gram negativas. Juntos estos hallazgos indican que los mecanismos mediados por HIF-1 juegan un papel importante ante las infecciones (41).

1.1.6.3. Células Espumosas en otros Procesos Patológicos.

Además de la arterioesclerosis cuyas células espumosas expresan en su superficie marcadores como SR-A y SR-B, existen reportes en la literatura que describen la histopatología de otras enfermedades en donde se han encontrado células espumosas. Entre estas están: la neumonitis toxica por la administración de amiodarona (42); el seudotumor inflamatorio de pulmón, proceso benigno que se caracteriza por el crecimiento desregulado de células inflamatorias: células plasmáticas, células reticuloendoteliales, células inflamatorias transformadas así como células espumosas (43-48). Aunque clínicamente se manifiesta como un tumor, en realidad se trata de un proceso inflamatorio al que también se le ha llamado xantoma, xantogranuloma, fibrogranuloma, granuloma de mastocitos y seudolinfoma (49-52). La inflamación xantogranulomatosa puede involucrar a cualquier órgano (45, 47, 53). Hay reportes de inflamación xantogranulomatosa en apéndice, riñón, vesícula biliar, endometrio, ovarios, trompas de Falopio, epidídimo, vejiga urinaria, hueso, tiroides y glándula adrenal. Existen varias hipótesis que intentan explicar la patogenia de este proceso inflamatorio e incluyen defectos en el transporte de lípidos, obstrucción linfática, desordenes del sistema inmune: quimiotaxis alterada de PMN y macrófagos o respuesta inmune específica alterada ante infecciones por *Proteus* y *Escherichia*. Se cree que estos mecanismos son los responsables de desencadenar la

respuesta inflamatoria y la transformación de los macrófagos hacia células espumosas (54, 61). Ciertas histiocitosis entre las que se encuentra la enfermedad de Erdheim-Chester en donde las células espumosas son CD68⁺, S100⁻ y CD1a⁻ (62, 63). El xantogranuloma juvenil que es una proliferación benigna difusa de histiocitos espumosos, muchos de los cuales son multinucleados (células de Touton) mezclados con linfocitos y eosinófilos. Se caracteriza por expresión variable de ciertos marcadores histiocíticos como CD68, catepsina B y vimentina pero ausencia de marcaje para la proteína S100 (proteína de 100 kDa de peso molecular) (64). El fibroxantoma atípico de células claras es una variante poco invasiva del histiocitoma fibroso maligno. Se compone de grandes células pleomórficas, con citoplasma espumoso, núcleo hiper cromático, CD68⁺, S100⁻, CD3⁻, CD20⁻, CD34⁻ y CEA⁻ (antígeno carcinoembrionario). Estas células espumosas se muestran mezcladas con células gigantes multinucleadas tipo Touton y con células grandes con citoplasma granular y vacuolado parecidas a lipoblastos (65). Finalmente tumores malignos como el carcinoma gástrico (donde hay macrófagos espumosos CD68⁺ y CD31⁺), carcinoma de células renales papilares (donde encontramos macrófagos espumosos CD10⁺ y S100[±] y cristales de colesterol), el carcinoma mamario histiocitoide (cuyas células espumosas son CD68⁻, S100⁻ y CD44⁺) y el histiocitoma fibroso maligno de glándulas salivales (66-69).

1.1.7. Definición de Micetoma

El micetoma es una enfermedad infecciosa, producida por hongos como *Madurella griseae*, *Madurella mycetomatis*, o por bacterias aerobias como *Actinomadurae madurae*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia brasiliensis* etc. Al micetoma producido por hongos se le denomina eumicetoma y al producido por bacterias actinomicetoma (70, 71).

Esta infección afecta la piel, tejidos subcutáneos y pueden llegar al hueso. Se caracteriza por una inflamación granulomatosa, crónica persistente, con áreas de abscesos múltiples que se abren y drenan un material seropurulento. En este material se puede observar gránulos de color variable, formados por microcolonias del agente causal de 1 mm de diámetro rodeadas por células inflamatorias. El estudio histopatológico de la lesión muestra infiltración de neutrófilos PMN y células mononucleares (linfocitos y macrófagos) al igual que fibroblastos que la circunscriben.

Los micetomas son endémicos en países en desarrollo como India, Tailandia, Somalia, Venezuela, Sudán, Senegal, Brasil, México etc. El

agente causal varía según el país, en México cerca del 86% de los casos son producidos por *N. brasiliensis* (70).

1.1.7.1. Etiopatogenia del Micetoma.

La primera descripción de Micetoma fue reportada por Gill en Madura India en 1842. En 1946 Godfrey describe 4 casos de “Morbus tuberculosis pedís” y en 1960 Carter la llamo micetoma acentuando su etiología fúngica. Pinoy en 1813 (72) describe el micetoma producido por bacterias aeróbicas las cuales pertenecen al grupo de los actinomicetos. De esta forma se clasifica al micetoma producido por hongos como eumicetoma y al producido por bacterias como actinomicetoma. El primer caso de enfermedad producido por nocardias fue reportado por el veterinario francés Edmond Nocard en 1888, quien aisló organismos filamentosos de lesiones granulomatosas del ganado bovino (73).

Trevisan creó en 1889 el género *Nocardia* y al aislado de Nocard lo llamó *Nocardia farcinica* (74). En 1890 se reportó el primer caso de infección en humanos por Eppinger. Eppinger aisló un organismo aerobio ramificado y filamentosos de un absceso cerebral al que llamó *Cladothrix asteroides* que luego en 1896 Blanchar denominó *N. asteroides* (75). En 1980 Gordon y Mihn proponen oficialmente el nombre de *N. asteroides* para la especie tipo en lugar de la aislada originariamente en 1988 (76).

1.1.7.2. Taxonomía y Descripción de *N. brasiliensis*.

El género *Nocardia* comprende a un grupo de bacterias de la Familia Nocardiaceae perteneciente al Orden de los Actinomicetales y constituyen el 25% de la biomasa de los actinomicetos.

Son bacterias saprófitas, viven en la superficie de la tierra y hasta dos metros de profundidad, se encargan de la descomposición de los residuos vegetales y animales en las regiones tropicales.

Crece en diversos sustratos orgánicos, en rangos de temperatura muy amplios, utilizando el nitrógeno orgánico e inorgánico. Sensibles al pH ácido, se favorece su crecimiento en pH alcalino. En estudios de aislamiento de especies *Nocardia* en suelos mexicanos, las más abundantes provinieron de suelos de cultivos de caña (77) y *N. brasiliensis* resultó ser la más abundante en todos los casos.

Los actinomicetos nocardiformes descritos en la edición decimonovena del manual de bacteriología de Bergey, incluye en el grupo 22 a los Géneros: *Nocardia*, *Gordona*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (78, 79).

Las bacterias del género *Nocardia* se caracterizan por ser Gram+, aerobias y ácido alcohol resistente. En etapas tempranas de crecimiento en medios de cultivo, tienden a formar filamentos y ramificaciones. En cultivos viejos es común observar células pleomórficas caracterizadas por fragmentos filamentosos bacilares o cocoidales. Algunas cepas ácido-alcohol resistentes crecen en medios simples, dando colonias

opacas o pigmentadas que pueden dar apariencia lisa, rugosa, pastosa o dura (80).

Las bacterias del genero *Nocardia* fueron reconocidas y diferenciadas por su morfología celular. Se han descrito más de 30 especies, aunque actualmente sólo 11 son validas (81, 82).

La morfología de los filamentos depende de las condiciones del cultivo. Las bacterias del genero *Nocardia* crecen a 37°C en agar Saboureaud y sus colonias son rugosas, secas y su color varía del blanco al naranja.

1.1.7.3. Patogenia de las Infecciones por Actinomicetos.

Los actinomicetos pueden producir diferentes tipos de infecciones en el humano como: Nocardiosis sistémica, Nocardiosis del SNC, Nocardiosis pulmonar, Nocardiosis extrapulmonar, Nocardiosis cutánea, subcutánea, linfocutánea y el actinomicetoma (83).

Las infecciones ocurren por inoculación traumática accidental del microorganismo en piel y tejido subcutáneo. Principalmente en extremidades inferiores, aunque pueden presentarse en otros sitios topográficos como en la cara, espalda o tórax (84).

1.1.8. Modelo de Estudio del Actinomicetoma

1.1.8.1. Primeros Intentos en la Búsqueda de un Modelo Experimental de Micetoma.

Dada la importancia de la enfermedad del micetoma, desde hace más de cuatro décadas se han encaminado esfuerzos para poder estudiar y entender a esta enfermedad con el fin de proponer estrategias terapéuticas adecuadas.

Es así como en 1962 González Ochoa logra inducir lesiones de micetoma con formación de granos en ratones (85).

Más tarde, en 1971, Uesaka y colaboradores definen a la lesión brasiliensis como aquella lesión histopatológica producida por la inyección de *N. brasiliensis* con adyuvante en animales de experimentación (86).

1.1.8.2. Descripción Histopatológica de la Lesión Brasiliensis en Animales.

En 1976 Folb y Jaffe describieron las características histopatológicas de la lesión brasiliensis inducida experimentalmente en ratones blancos suizos mediante la inyección de *N. brasiliensis* sin adyuvante en el cojinete plantar (87). Según su descripción la lesión se caracteriza por presentar una reacción inflamatoria local. El edema se presenta a los 2 días postinoculación y persiste hasta el día 21 o más.

Histológicamente la lesión se distingue por la presencia de múltiples microabscesos y un granuloma característico, el cual presenta un patrón multilocular. Cada lóculo tiene zonas bien definidas: en el centro una masa usualmente semicircular de microorganismos (en forma de cinturón) formando un gránulo de apariencia eosinofílica y borde raído. Alrededor del gránulo un conglomerado de granulocitos herméticamente empacados lo delimitan. Presencia de material hialoideo con características tintoriales definidas con varias tinciones histoquímicas en la zona de unión del huésped y el parásito. Rodeando la zona de granulocitos compactos se encuentra una amplia zona con granulocitos e histiocitos en varias proporciones. Un anillo de fibroblastos concéntricos limita cada lóculo.

Folb y Jaffe describieron la aparición a los 10 días postinfección de macrófagos espumosos localizados formando una capa celular en la periferia del lóculo por debajo de la capsula de fibras de colágena. Esta

capa es de grosor variable, mayor en área de necrosis donde se aprecia la respuesta de granulocitos y macrófagos mezclados.

Folb y Jaffe también observaron que la organización inflamatoria granulomatosa aparece desde los 11 días postinoculación y que el número de lóculos aumenta con la edad de la lesión.

Durante el tiempo de evolución se aprecian modificaciones en la morfología del granuloma, para el día 21 postinfección se observa un aumento en el grosor de la capa de células espumosas a expensas del crecimiento de estas células, las cuales ahora se muestran infladas conteniendo grandes cantidades de citoplasma claro y burbujeante. También se observa aumento en el tamaño de mastocitos y en el número de linfocitos.

Para el día 40 las células plasmáticas, algunas con secreción globular, aparecen en la zona fibrosa. Áreas de calcificación se hacen aparentes en la unión de la zona fibrosa-histiocítica especialmente en áreas de necrosis.

Según Folb y Jaffe, la infección del cojinete se acompaña ocasionalmente de la formación de abscesos en otros órganos como en el hígado o de linfadenopatía inguinal con histiocitosis del seno.

Los estudios de microscopía electrónica de la lesión de *N. brasiliensis* demostraron la presencia de organismos dentro del citoplasma de los macrófagos espumosos. Estos organismos fueron notados en la forma intacta y en varios estadios de degeneración.

La inyección intraperitoneal de *N. brasiliensis* produce una lesión muy similar que la descrita arriba para el cojinete plantar (87).

1.1.8.3. Modelos Experimentales de Actinomicetoma.

En 1980 Zlotnik y Buckley describen la producción experimental de actinomicetoma en ratones BALB/c y establecen que la lesión obtenida es similar a la lesión crónica típica del micetoma en humanos (88).

En 1994 Welsh, Rodríguez Quintanilla, Brown y Salinas-Carmona aislaron una cepa de *Nocardia* de un paciente con micetoma dorsal que acudió al departamento de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (UANL). La identificación mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas se realizó en el Departamento de Microbiología de nuestra Facultad, denominándola inicialmente *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1. Confirmaron la especie en The Center for Infectious Diseases de Atlanta Georgia y la registraron en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número 700358.

Desde entonces Salinas-Carmona y colaboradores han venido estudiando la respuesta inmunológica que desencadena *N. brasiliensis* en infecciones inducidas experimentalmente en animales de laboratorio. En 1999 describieron los cambios histopatológicos del actinomicetoma ratones BALB/c y proponen este modelo experimental para el estudio del actinomicetoma (89).

El aspecto microscópico así como histopatológico de las lesiones de actinomicetoma en humanos producido por *N. brasiliensis* es idéntico al aspecto de las lesiones inducidas experimentalmente en el cojinete plantar de ratones (89, 90).

Según su descripción, el edema se presenta entre el día 3 y 5 post infección, muestra un aumento progresivo hasta el día 14 y se mantiene estable.

Para el día 7, los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, presentan un proceso inflamatorio intenso, varios microabscesos con patrón multilocular y demás características histopatológicas descritas previamente por Folb y Jaffe.

La presencia de macrófagos e histiocitos con aspecto espumoso localizados en la periferia de la lesión fue observada en el día 10 postinfección.

Abscesos múltiples bien definidos y claramente delimitados por grandes macrófagos espumosos, con microcolonias de *N. brasiliensis* en el centro fueron observados hasta el día 30 postinfección. Los abscesos se separan entre sí por capas concéntricas de fibroblastos y tejido conectivo infiltrado por linfocitos, granulocitos y células plasmáticas (89, 90). Nuevamente correlacionando estos hallazgos con lo descrito por Folb y Jaffe anteriormente (87).

1.1.8.4. Identificación de Células Productoras de Citocinas en el Actinomicetoma.

Recientemente Solís-Soto y colaboradores demostraron la presencia de células productoras de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias durante el curso de la infección distribuidas en diferentes regiones del micetoma. De acuerdo a su distribución, las citocinas inflamatorias parecen tener una diferente función durante el curso de la infección con *N. brasiliensis* (91).

1.2. Justificación

En el Departamento de Inmunología de esta Facultad, actualmente se cuenta con una línea de investigación en la que se exploran los mecanismos de patogenicidad y virulencia de una cepa de *N. brasiliensis* aislada de un paciente con micetoma en el Hospital José Eleuterio González a la que se le denomina cepa HUJEG-1 y cuyo registro en la ATCC es 700358.

Así mismo se desarrolló un modelo experimental de micetoma en ratones inmunocompetentes BALB/c el cual fue publicado por Salinas-Carmona y colaboradores en 1999.

Aún no se conoce plenamente la respuesta inmune desencadenada por *N. brasiliensis* en el modelo animal arriba descrito.

Por otro lado, no se conoce el papel de las células espumosas en la respuesta inmune del ratón BALB/c durante la infección por *N. brasiliensis*, por lo que estudiar el tiempo de aparición, marcadores de superficie y citocinas que caracterizan a estas células espumosas, nos ayudará a establecer su participación en la resolución del proceso infeccioso.

1.3. Hipótesis

Las células espumosas del actinomicetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*, expresan marcadores de superficie y citocinas característicos de macrófagos.

1.4. Objetivo General

Caracterizar a las células espumosas durante el desarrollo del micetoma experimental por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c.

1.4.1. Objetivos Específicos.

1. Determinar el tiempo de aparición de las células espumosas en el micetoma experimental de ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis*.
2. Identificar la expresión de los marcadores de células dendríticas: CD64, CD11c; de macrófagos: CD40, CD68 y de células de Langerhans: S100 por las células espumosas durante el establecimiento y resolución de la infección.
3. Determinar el perfil de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α por las células espumosas durante la evolución del actinomicetoma.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1. Estrategia General

2.1.1. Ratones

Para el presente estudio, se emplearon ratones BALB/c machos y hembras, de 12 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en el bioterio bajo condiciones ambientales controladas. El protocolo de manejo de los animales se sometió a la aprobación del comité de ética de nuestra institución y se sujetó a las directivas de manejo y cuidado para animales de laboratorio según las regulaciones internacionales y las normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-199).

Se les indujo la formación del micetoma siguiendo el protocolo propuesto por Salinas-Carmona (90). Después de la infección, se

mantuvieron en el bioterio con alimentación y agua a libre demanda hasta el momento de su sacrificio. Se emplearon tres grupos de ratones, con un total de 18 ratones por grupo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.1.2. Bacterias

Las cepa bacteriana de *N. brasiliensis* empleada en este estudio, fue aislada con anterioridad por Oliverio Welsh y Rodríguez Quintanilla de un paciente en el Hospital Universitario de nuestra universidad. Denominada primeramente cepa HUJEG-1, fue caracterizada por June Brown y registrada por Mario César Salinas-Carmona en la American Type Culture Collection (ATCC) con número de registro ATCC 700358. Actualmente son mantenidas en nuestro laboratorio a -20 °C en leche descremada.

Para este estudio, alícuotas de la bacteria se descongelaron a temperatura ambiente. Se lavaron con solución fisiológica estéril bajo el mechero y se centrifugaron (3000 rpm por 10 minutos). El proceso de lavado se repitió hasta eliminar por completo la leche descremada y obtener la solución fisiológica aspecto cristalino. El botón bacteriano resultante de la centrifugación se resuspendió en 1 ml de

solución fisiológica y se inoculó en 250 ml de medio del cultivo de infusión de cerebro-corazón (BHI) al 3.7 % y se incubó a 37 °C.

A las 72 hrs, durante su fase de crecimiento exponencial, se recuperó la masa celular, se lavó nuevamente con técnica estéril con solución salina por centrifugación. El botón resultante se resuspendió en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se homogenizó mediante el empleo de un homogeneizador Potter. Se tomó una alícuota y mediante turbidimetría a una longitud de onda (λ) de 325 nm se determinó la concentración del homogeneizado en unidades formadoras de colonias (UFC) según la técnica estandarizada en nuestro laboratorio (89). El volumen de la suspensión bacteriana se ajustó hasta obtener una lectura espectrofotométrica equivalente a 10^7 UFC/ml. Un volumen de 0.1 ml de esta suspensión ajustada fue inyectado subcutáneamente en el cojinete plantar del tren posterior del ratón.

2.1.3. Sacrificio de los Ratones y Obtención de la Biopsia

Después de la inoculación del agente infectante, se permitió la libre evolución del proceso manteniendo a los ratones con alimento y agua a libre demanda. Los ejemplares fueron sacrificados mediante dislocación cervical: diariamente desde el día 0 hasta el día 12, luego

el día 15 y posteriormente cada quince días hasta el día 90 postinfección. Se resecaron el micetoma, el ganglio poplíteo y el bazo (estos últimos órganos para ser empleados como control positivo durante la inmunotinción). Los órganos fueron fijados inmediatamente en fijador de Carnoy y posteriormente fueron descalcificados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10 % en buffer de TRIS por dos semanas.

2.1.4. Preparación de los Cortes Histológicos y Obtención de las Fotomicrografías para el Análisis Morfológico y Morfométrico

Los órganos fijados en Carnoy se procesaron con la técnica histológica e incluyeron en parafina.

Para el análisis morfológico y la estimación del diámetro promedio de las células espumosas, de cada biopsia procesada, se obtuvieron cortes de 7 micrómetros (μm) de grosor y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E). Mediante microscopía de campo claro, se tomaron series de 5 fotomicrografías del sitio de infección por día, a magnificaciones de 100x, 200x, 400x y 1000x.

Para el análisis morfométrico, posteriormente se hicieron nuevos cortes seriados, de 5 μm de grosor, para evitar superposición de

perfiles celulares y se tiñeron con H-E. Para evitar sobre-estimación de las variables morfométricas a investigar (área y número de las células espumosas por día), los cortes se obtuvieron a intervalos superiores al diámetro promedio de las células espumosas observado en el análisis morfológico.

Mediante microscopía de campo claro, se muestrearon aleatoriamente 5 campos del sitio de infección a magnificación de 400x. Se tomaron tres series de fotomicrografías, una por cada grupo de ratones. Cada serie incluyó 70 fotomicrografías: una fotomicrografía por campo, 5 campos seleccionados aleatoriamente por corte, 12 cortes por biopsia de cada ratón sacrificado por grupo.

La digitalización del campo microscópico se realizó mediante una cámara fotográfica digital, con un lente cuyo factor de tubo es de 20.5, acoplada a un microscopio de campo claro empleando el objetivo 40x.

2.1.5. Análisis Morfológico del Proceso Inflamatorio, Identificación de las Células Espumosas y Establecimiento de la Cinética de Aparición

El análisis morfológico se llevó a cabo sobre las fotomicrografías de campo claro digitalizadas previamente. Se analizaron las

características morfológicas del proceso inflamatorio en el sitio de infección, como son la presencia de edema, infiltrados de células inflamatorias y fagocíticas (PMN y macrófagos), micro hemorragias y presencia de bacterias y exudados así como datos de organización granulomatosa. Especialmente se buscó la presencia de perfiles celulares con características similares a las descritas previamente por Folb y Jaffe para las células espumosas. Estas células son de mayor tamaño en relación a las demás células inflamatorias, redondas, citoplasma claro, ocupado por abundantes vesículas de tamaño variable y un gran núcleo central o ligeramente excéntrico, redondo, heterocromático con nucléolo aparente. Estas células se buscaron en las inmediaciones del proceso inflamatorio o en el caso de que el granuloma ya estuviera organizado, inmediatamente por debajo de la capsula fibrosa de cada uno de los lóculos.

2.1.6. Análisis Morfométrico del Granuloma

Posteriormente a la identificación morfológica de las células espumosas, a partir de las fotomicrografías empleadas para el análisis morfológico, se seleccionó de manera aleatoria una fotomicrografía por día, desde el día 0 hasta el día 90. En dichas imágenes, mediante el uso del software Image Tool ®, se midió el

diámetro de los perfiles de todas las células espumosas presentes. Los valores obtenidos se agruparon por día y se hizo una distribución de frecuencias de los mismos para estimar el promedio y la desviación estándar.

Para estimar el área promedio de las células espumosas se emplearon las series de fotomicrografías tomadas para el análisis morfométrico. Sobre estas, mediante el uso del software Image Tool[®], se realizó la medición del área de todas las células espumosas presentes en el campo microscópico. Los valores se agruparon por día y se les realizó una distribución de frecuencias para conocer el promedio y desviación estándar. Se realizaron contrastaciones estadísticas para comparar los grupos formados.

Para estimar el número de células espumosas por día, nuevamente se emplearon las series de fotomicrografías tomadas con anterioridad. Se recurrió al método de cuenta puntos de Weibel (92), utilizando la plantilla multipropósito. Sobre las series de fotomicrografías se sobrepuso las plantillas y se contabilizaron los puntos extremos y las intersecciones de las líneas de prueba con los perfiles de las células espumosas, se aplicaron las formulas morfométricas publicadas previamente por Weibel (92) y se estimó el número de células espumosas por campo por día.

2.1.7. Preparación de Biopsias para Microscopía Electrónica

Se tomaron biopsias de ratones de tres días de infección y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos. Posteriormente se postfijaron en tetraóxido de osmio y se incluyeron en resina SPURR. Se prepararon cortes semifinos y ultrafinos, de 60 y 600 nanómetros (nm) de grosor respectivamente. Los semifinos para microscopía de campo claro y los ultrafinos para su observación en el microscopio electrónico de transmisión. Previa observación microscópica, los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina y los ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

2.1.8. Identificación Ultraestructural de las Células Espumosas

El objetivo fue el de comprobar que los perfiles celulares identificados como células espumosas mediante microscopía de luz,

reunieran las características ultraestructurales de las células espumosas reportadas previamente por Folb y Jaffe. Así mismo comprobar el momento de aparición de dichas células en la lesión inflamatoria inducida por *N. brasiliensis*.

Se tomaron biopsias de patas de ratón infectados con *N. brasiliensis* a los 3 días postinfección, pues fue el periodo de tiempo más corto en que se identificaron a las células espumosas por microscopía de campo claro.

El análisis ultraestructural de los cortes se realizó primeramente a bajas magnificaciones. Los criterios de búsqueda de las células espumosas fueron los empleados en la microscopía de campo claro. Una vista panorámica a 600x nos permitió identificar la presencia de un granuloma. Una vez identificado el granuloma, se ubicó la cápsula de fibras de colágena y las células espumosas se buscaron inmediatamente por debajo de ésta, pues según las descripciones previas, es el sitio donde se localizan.

Una vez identificadas se aumentó la magnificación de la imagen para documentar por un lado las fibras de colágena de la cápsula fibrosa suprayacente y por otro lado la ultraestructura de dichas células. En este último punto, se resaltó la presencia, distribución y contenido de las vesículas intracitoplásmicas, la morfología, localización y características ultraestructurales del núcleo; su número y el aspecto de la cromatina. La documentación se realizó mediante la digitalización simultánea de las imágenes la grabación de un video digital.

2.1.9. Identificación del Perfil de Producción de Citocinas Proinflamatorias y Expresión de Marcadores de Superficie de las Células Espumosas

Para investigar el perfil de producción de citocinas y la expresión de marcadores de superficie de las células espumosas, se realizó tinción inmunohistoquímica indirecta. Esta se efectuó sobre cortes histológicos de 7 μm de grosor empleando anticuerpos contra algunas citocinas proinflamatorias y algunos marcadores de superficie, que sabemos son producidas o expresadas por monocitos, células dendríticas, macrófagos y células de Langerhans. Las citocinas que se investigaron fueron IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α e IFN- γ . Los marcadores de superficie buscados fueron CD11c, CD64, CD68, CD40 y Proteína S-100. La inmunorreactividad de las células espumosas a los anticuerpos antes mencionados se evidenció mediante el uso de anticuerpos anti IgG conjugados con peroxidasa de rábano y la reacción de precipitación de la diaminobenzidina en presencia de peróxido de hidrógeno.

Simultáneamente a la tinción se corrieron controles negativos que incluyeron cortes de patas de ratones sanos, cortes de patas de ratones a los que sólo se les inyectó solución fisiológica; así mismo

controles internos de la tinción que incluyeron cortes de ratones infectados en los que se omitió el anticuerpo primario durante la inmunotinción.

Después de la tinción y del montaje, los cortes se observaron con microscopio de campo claro. Se buscó la presencia de células espumosas inmunorreactivas, se tomaron series de fotomicrografías del proceso inflamatorio y se registró la inmunorreactividad de estas células a los anticuerpos probados.

El análisis morfológico incluyó la observación de por lo menos tres laminillas por cada día analizado, con 3 cortes histológicos del tejido infectado y 1 corte de bazo cada una.

2.1.10. Tinción de Inmunohistoquímica Indirecta

Los cortes seriados de 7 μm de grosor de las biopsias incluidas en parafina se desparafinizaron y rehidrataron. Se depletaron de peroxidasa endógena mediante el empleo de peróxido de hidrógeno al 0.3 % en metanol. Después de lavar se realizó la tinción inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α e IFN- γ , así como mAb anti CD11c, CD64, CD68, CD40 y Proteína S-100. Los anticuerpos probados se usaron a títulos 1:250 en PBS, pH 7.4 con Tritón X-100

(PBS-TX100) al 0.5 %. Los cortes se incubaron toda la noche a 4 °C. Después de varios lavados con PBS, los cortes se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, con un mAb secundario dirigido contra IgG, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) en PBS-TX100.

La reacción de la peroxidasa se reveló usando tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina (DAB) con peróxido de hidrógeno al 0.01 % en PBS pH7.4. La contrastación de la tinción se realizó con hematoxilina.

Con ésta técnica, la identificación de células inmunorreactivas a los anticuerpos probados, se evidenció mediante la precipitación de DAB debido a su oxidación, catalizada por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno. Las células inmunorreactivas presentaron coloración café pardo sobre un fondo azul.

2.1.11. Análisis Estadístico

El análisis estadístico empleado en este estudio, incluyo distribución de frecuencias con cálculo de valores de tendencia central y dispersión para datos agrupados. El análisis de varianza (ANOVA) de una cola y ANOVA para mediciones repetidas, se empleo para comparar los valores promedio del área de células espumosas

entre sí, estableciendo diferencias cuando el valor p fue menor a 0.05. Para el análisis estadístico se empleó el software Number Cruncher Statistical Systems® (NCSS).

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. Estudio Morfológico del Sitio de Infección

3.1.1. Aspecto Macroscópico de la Pata del Ratón BALB/c Infectada con *N. brasiliensis*

El aspecto macroscópico de la pata desde el momento de infección va cambiando conforme pasa el tiempo. A las 24 hrs sólo se aprecia ligero edema y enrojecimiento localizados principalmente en el dorso y planta de la pata. Hacia el 2º día se aprecia deformación edematosa de la pata que abarcan el dorso, cojinete y los dedos; la piel hiperémica en toda su extensión, algunas costras hemato melicéricas sobre el dorso se extienden hacia los pliegues interdigitales, puntos blanquecinos de exudado purulento se pueden apreciar en la planta. Para el 3er día postinfección se observa mayor extensión de las

costras hemato melicéricas, confluentes, algunas transformadas en úlceras de gran extensión, localizadas en el dorso, con fondo necrótico y purulento, bordes sangrantes y gasto melicérico además de deformidad progresiva por el edema que aparenta desaparición de los dedos de la pata (Figura 1).



Figura 1. Aspecto macroscópico de la pata de un ratón BALB/c infectado con *N. brasiliensis*. A-C) Al 2º día postinfección se observa muestra ligera deformidad del dorso, planta y dedos por edema; enrojecimiento, costras hematomelicéricas. D-F) Al 3er día postinfección, además se observan en el cojinete pústulas y en el dorso úlceras confluentes, que abarcan hasta el 40% de la superficie y que drenan líquido hematomelicérico. La deformidad es mayor debida a edema. (Fotografía digital).

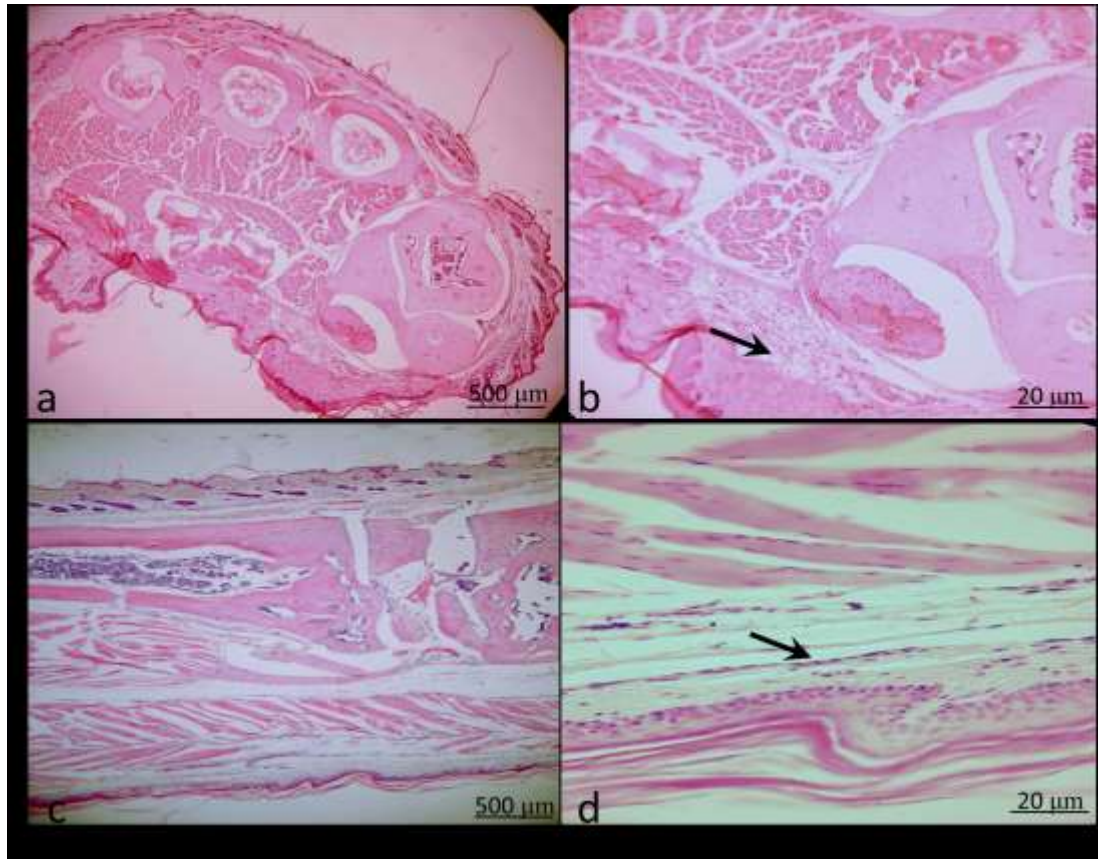


Figura 2. Aspecto histológico normal de la pata de ratón BALB/c. A y B) Corte transversal de la pata de un ratón sano, muestra de arriba a abajo: la piel delgada y folículos pilosos del dorso; escaso tejido celular subcutáneo, los huesos del metatarso y los músculos estriados compactamente delimitados por sus aponeurosis; finalmente el cojinete plantar constituido por escaso tejido celular subcutáneo y la piel gruesa de la planta. C y D) Corte longitudinal de la pata, 3 días después de inyectarle agua destilada, prácticamente sin cambios morfológicos. Las flechas señalan al cojinete plantar. (Teñido con H-E, fotomicrografía de campo claro, magnificación 200x y 1000x).

3.1.2. Anatomía Microscópica Normal de la Pata del Ratón BALB/c

El aspecto histológico normal de la pata del ratón sano se puede apreciar en la figura 2. Aquí se muestra un detalle del cojinete plantar, sitio en el que se realiza la infección.

Este sitio anatómico está conformado por la piel (epidermis y dermis) y tejido celular subcutáneo (flecha). El espacio entre el cojinete plantar y los músculos y huesos de la pata es muy escaso y está ocupado por tejido conectivo denso irregular.

La piel en esta región está diseñada para resistir traumatismos constantes. Por tal motivo presenta: una epidermis gruesa, cubierta por una capa compacta de queratina, un sistema bien desarrollado de crestas papilares para evitar el desprendimiento de la epidermis por fuerzas de fricción, ausencia de folículos pilosos, abundantes glándulas y conductos ecrinos.

La epidermis es la capa protectora que está en contacto con el ambiente externo, constituida por los queratinocitos organizados en capas y separados de los tejidos de soporte subyacentes de la dermis por una membrana basal. La capa más superficial está conformada por una gruesa cubierta de queratina muy compactada. Entre las capas de queratinocitos encontramos a las células de Langerhans, cuya función de reconocimiento y presentación de antígenos es de suma importancia para iniciar la respuesta inmune, de forma irregular, de citoplasma pálido (en tinciones de H-E), localizadas en el estrato espinoso, con núcleos pálidos ovalados o en forma de riñón, a menudo hendido y numerosas prolongaciones citoplasmáticas, estas células expresan en su superficie el marcador CD1.

La dermis es el tejido de sostén en que se apoya la epidermis, lugar donde encontramos los anexos, la irrigación, la inervación y el drenaje linfático. Está formada por: fibroblastos, fibrocitos, colágena,

elastina, matriz extracelular amorfa, vasos sanguíneos, nervios, un pequeño número de macrófagos, linfocitos y mastocitos. Se distinguen dos zonas: la de la dermis papilar y la de la dermis reticular.

El tejido celular subcutáneo constituido principalmente por tejido adiposo y tejido conectivo areolar o laxo; está dividido por tabiques fibrocolagenosos de tejido conectivo denso irregular. Aquí encontramos los nervios y vasos sanguíneos principales que alimentan y dan sensibilidad a la dermis y epidermis suprayacentes.

3.1.3. Anatomía Histopatológica de la Pata del Ratón BALB/c Infectada con *N. brasiliensis*

En el presente trabajo, el análisis morfológico del sitio de infección, efectuado desde las 24 hrs hasta los 90 días, nos permitió seguir los cambios histopatológicos inducidos por la inyección del inóculo de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar.

Estos cambios histopatológicos se aprecian en la figura 3. A las pocas horas de la infección, aparece un infiltrado de células inflamatorias en la dermis y tejido celular subcutáneo característicamente polimorfonucleares y linfocitos que se van acumulando en torno al agente infeccioso.

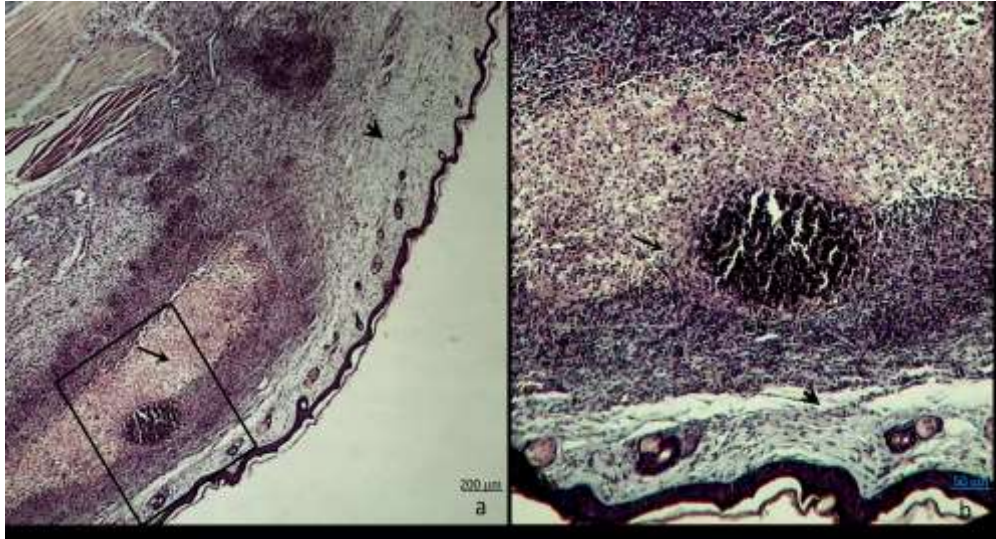


Figura 3. Piel del cojinete plantar del ratón BALB/c a los 2 días postinfección con *N. brasiliensis*. A) Se aprecia el acumulo de células inflamatorias en el sitio de inoculación y cierto grado de organización. Un grupo de células con citoplasma claro ubicadas en torno al acumulo de linfocitos que forman un nódulo. 400x. B) Las flechas señalan a las células de citoplasma claro ubicadas en torno a los linfocitos, justo por debajo de una tenue proliferación de fibroblastos y fibras de colágena. 1000x. (Tinción tricrómico de Masson, fotomicrografía de campo).

El número de células inflamatorias va aumentando conforme pasa el tiempo. Grandes huecos entre las fibras de tejido fibrocolagenoso y entre las células inflamatorias se aprecian desde este momento. En la pata sana este espacio es muy escaso y el tejido conectivo esta bien compactado entre las demás estructuras. La aparición de estos espacios hace suponer que existe una gran extravasación de líquidos que además de deformar la anatomía histológica, clínicamente es responsable del edema.

Hacia las 24 hrs postinfección la infiltración de células inflamatorias en el sitio de infección es tan abundante que se pueden observar signos de organización, aunque no se aprecia claramente un limite a este cumulo celular. Hacia la periferia de este conglomerado aparecen células ligeramente más grandes que los PMN, de

citoplasma claro, sin límites bien definidos, núcleo central y pequeño; tan abundantes como los polimorfonucleares y linfocitos. Estas células claras forman una capa de grosor considerable que rodea al acumulo de linfocitos y PMN los cuales junto con macrófagos activados comienzan a delimitar al agente infeccioso.

En los cortes de las biopsias provenientes de ratones infectados de 10 días de evolución se encontraron perfiles de células espumosas con características morfológicas que concuerdan con los reportes previos (Figura 4). Aunque un aspecto que no se había reportado con anterioridad es el hecho de que estas células a menudo muestran más de un núcleo en su citoplasma, es decir además de ser células gigantes, son multinucleadas.

El periodo de tiempo más corto en el cual logramos demostrar la presencia de células espumosas, según las características descritas arriba, fue el tercer día postinfección.

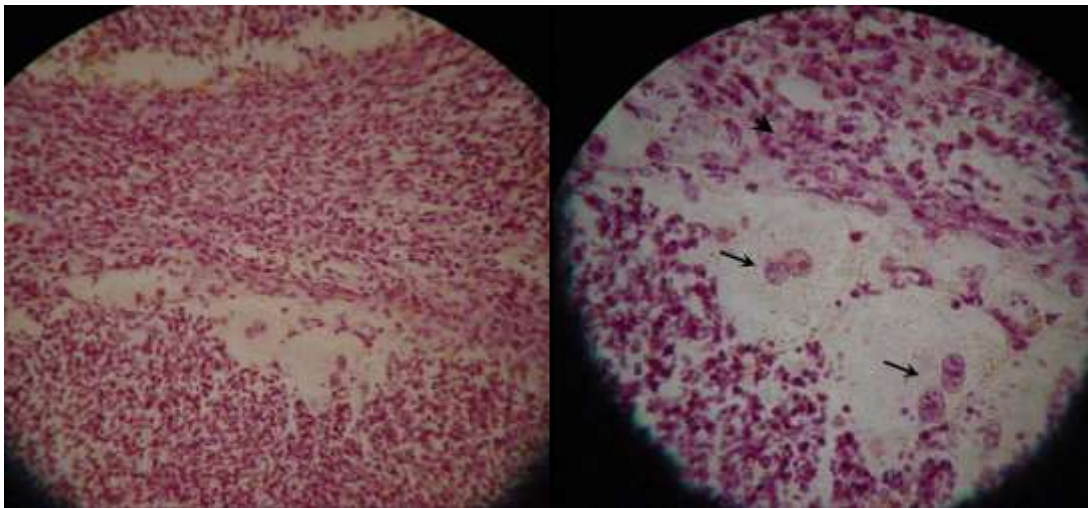


Figura 4. Piel del cojinete plantar del ratón BALB/c a los 10 días postinfección con *N. brasiliensis*. A) Muestra la periferia de un granuloma organizado y la presencia de células espumosas gigantes. B) Las flechas señalan la presencia de más de un núcleo en algunas células espumosas. (Tinción con H-E, fotomicrografía de campo claro, magnificación original 400x y 1000x).

Para este momento células gigantes de citoplasma espumoso y multinucleadas se encontraban ubicadas por debajo de una delgada cápsula fibrosa que delimitaba acúmulos organizados de células proinflamatorias y fagocíticas en torno a un centro necrótico (Figura 5).

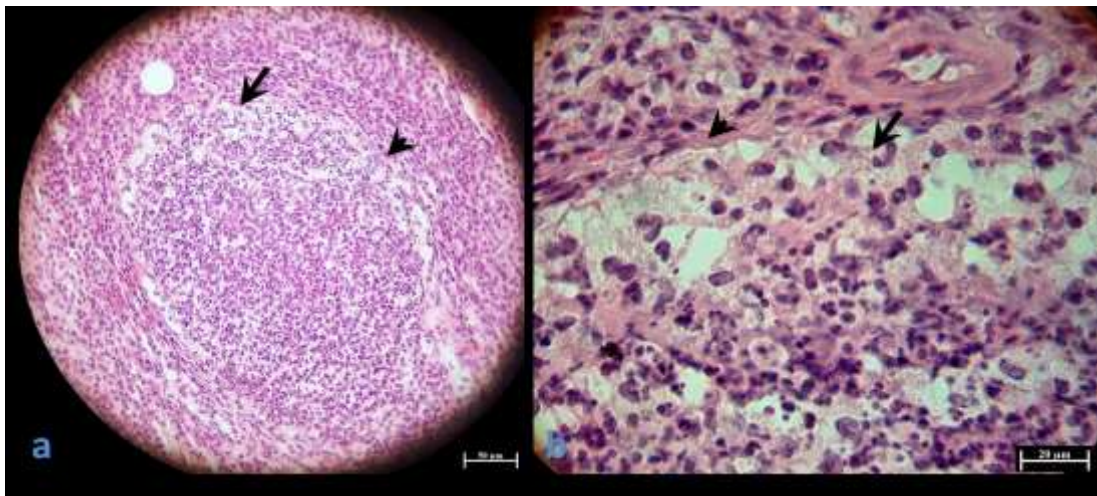


Figura 5. Biopsia de piel de la pata de ratón BALB/c a los 3 días postinfección con *N. brasiliensis*. A) Muestra un granuloma bien organizado. Las flechas indican la presencia de células gigantes, multinucleadas, con citoplasma claro, de aspecto espumoso localizadas hacia la periferia del granuloma, por debajo de la cápsula fibrosa 400x. B) Muestra claramente la morfología de la células espumosas: mayor tamaño, citoplasma claro, de aspecto espumoso, ligeramente eosinofílico, núcleo central, redondo y de gran tamaño 1000x. (Tinción H-E, fotomicrografía de campo claro).

La repetición del experimento, en dos sujetos más y la tinción de los cortes con tricrómico de Masson, nos permitió comprobar la presencia de pequeños granulomas uniloculares (Figura 6). En los cortes se aprecia gran deformidad de la pata a expensas de edema marcado, proliferación del tejido conectivo y la organización de células proinflamatorias formando dos granulomas.

El espacio ocupado por el tejido celular subcutáneo, inicialmente escaso ahora se observa más extenso, con grandes espacios “vacíos” por la técnica histológica, anteriormente ocupados por trasudados. Esto produce la gran deformidad de la pata evidenciada clínicamente por el edema.

La abundancia de fibras de colágena poco compactas y fibroblastos, infiltrados a su vez por células proinflamatorias y algunos adipocitos, se organiza en torno al proceso inflamatorio bien organizado haciendo más aparente el edema.

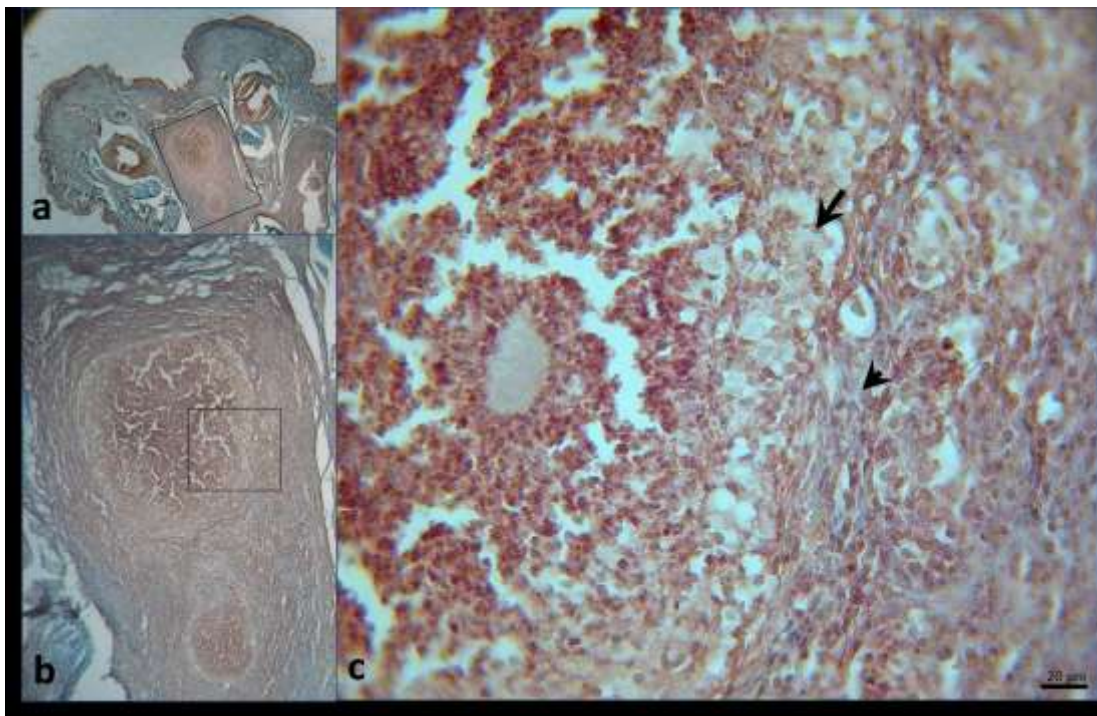


Figura 6. Biopsia de piel de la pata de ratón BALB/c a los 3 días postinfección con *N. brasiliensis*. A) El recuadro señala dos granulomas bien organizados delimitados por fibras de colágena. B) y C) Magnificación de uno de los granulomas, la flecha señalan a las células espumosas y la cabeza de flecha a las fibras de colágena. (Tinción tricrómico de Masson, fotomicrografía de campo claro).

Estos granulomas ubicados en el cojinete plantar desplazan a los músculos estriados para ubicarse en el espacio interóseo de la pata.

Los granulomas, aunque pequeños y uniloculares, resaltan por su alto grado de organización celular: delimitando al agente infeccioso un centro necrótico, compacto, rodeado por histiocitos, PMN, linfocitos y células plasmáticas. Estos se observan rodeados por un entramado de fibras de colágena. Nuevamente se identificaron a las células espumosas inmediatamente por debajo de la tenue cápsula fibrosa. De tamaño mayor en relación al resto de células inflamatorias presentes, estas células espumosas muestran citoplasma claro y de aspecto espumoso, por sus abundantes vesículas intracitoplásmicas; núcleo central, redondo y de aspecto heterocromático; algunas de estas células contienen más de un núcleo (Figura 6).

3.1.4. Cinética de Aparición de las Células Espumosas en el Granuloma

Una composición, con las fotomicrografías tomadas durante el tiempo que comprendió este estudio, documenta la presencia de las células espumosas (Figura 7) a lo largo de la evolución del micetoma. Esta cinética demuestra que las células espumosas aparecieron por primera vez el día 3° postinfección y continuaron hasta el día 90. Como se aprecia en las imágenes, en el periodo de tiempo analizado, los perfiles de células espumosas siempre mostraron características

morfológicas muy similares entre sí que además se ajustan a las características morfológicas mencionadas en los reportes previos.

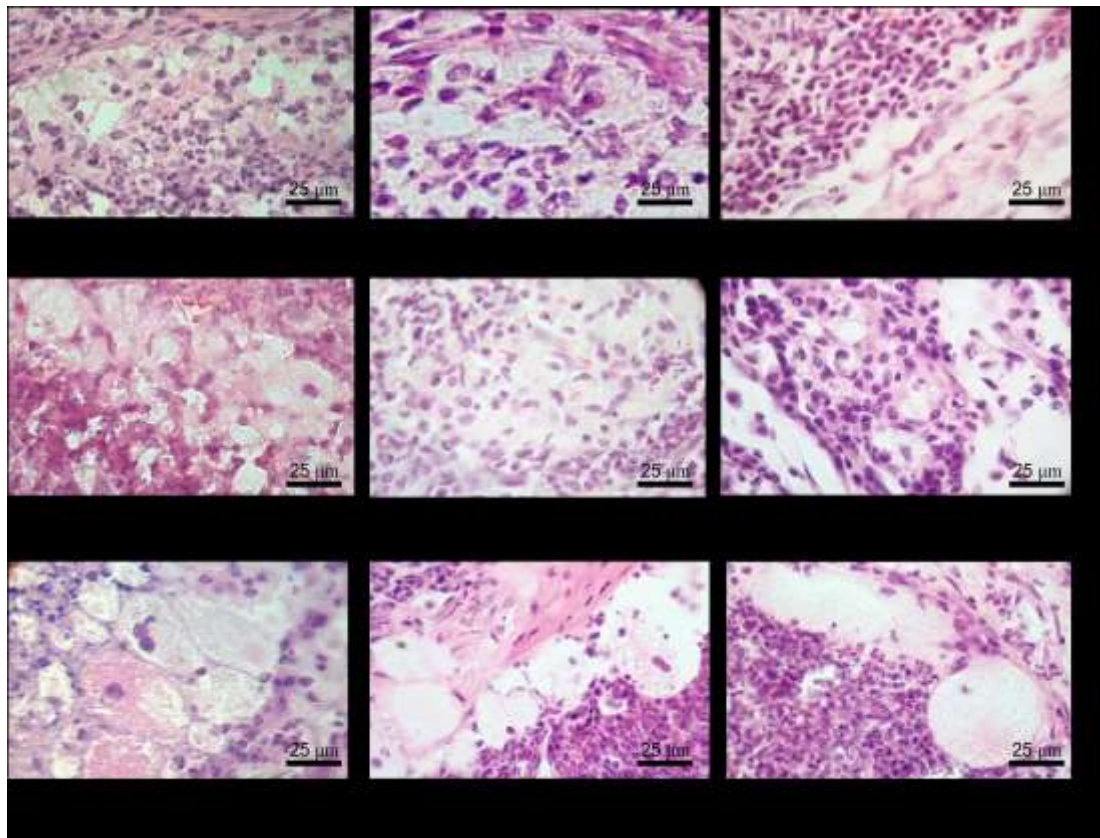


Figura 7. Biopsias de piel de la pata de ratón BALB/c a los 3, 6, 9, 12, 15, 30, 45, 60 y 90 días postinfección con *N. brasiliensis*. Muestran la cinética de aparición de las células espumosas en el granuloma. El número y tamaño de estas células aumentan a lo largo del tiempo de evolución del proceso infeccioso. (Tinción con H-E, fotomicrografías de campo claro, magnificación 1000x).

Por otro lado, también en las imágenes se puede apreciar que en los días posteriores a la aparición de las células espumosas, su número y volumen aumentan conforme pasa el tiempo de la infección.

En estas imágenes también se puede observar que las células espumosas, desde el momento de su aparición, siempre se ubican inmediatamente por debajo de la cápsula fibrosa que delimita al granuloma.

Aunque para el día 3^o está cápsula es muy delgada y muestra pocas fibras de colágena, conforme pasa el tiempo la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena por los mismos hacen que la cápsula se vuelva gruesa y compacta delimitando de manera más eficiente al granuloma.

3.1.5. Análisis Morfométrico de las Células Espumosas en el Granuloma: Diámetro Promedio, Area Promedio y Número de Células Espumosas por Día

El área del campo de visión sobre las fotomicrografías empleadas se estimó en 33000 μm^2 .

Los valores centrales: promedio y desviación estándar, del diámetro de las células espumosas a lo largo del periodo de estudio se muestra en la Figura 8. A los tres días el diámetro promedio de las células fue de 14.69 (± 4.21) μm . Este valor promedio fue aumentando a lo largo del tiempo de evolución del micetoma hasta llegar a ser de 34.48 (± 14.6) μm hacia el día 90 postinfección. En la gráfica se observa, que la desviación estándar entre los días 3^o y 15^o es muy estrecha y se torna más amplia hacia el final del estudio. Es decir los primeros días hay poca variabilidad del diámetro de las células espumosas, conforme pasa el tiempo la variabilidad va en aumento.

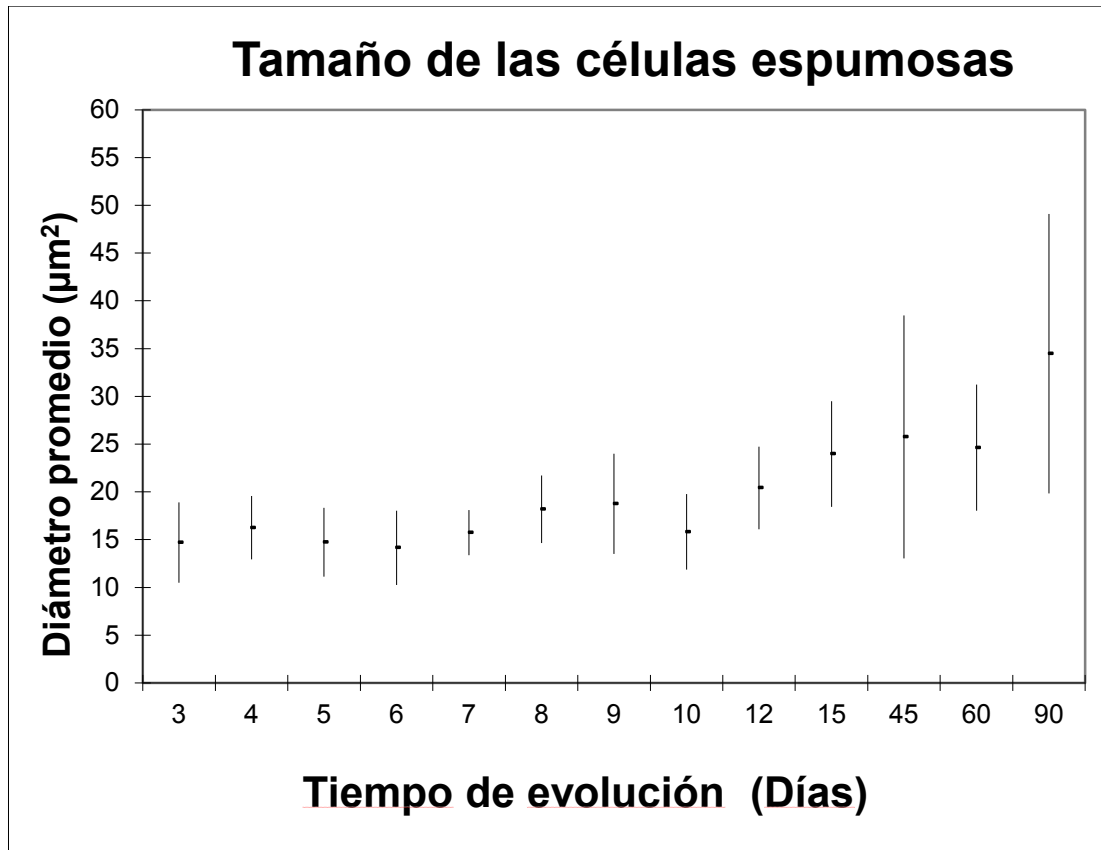


Figura 8. Diámetro de los perfiles de células espumosas encontradas en los granulomas a lo largo del estudio. Los puntos indican el valor promedio y las barras la desviación estándar.

Para el siguiente paso en el análisis morfométrico, que fue medir el área y el número de células espumosas presentes en los cortes histológicos del micetoma por día; se prepararon nuevos cortes histológicos obtenidos a intervalos de 80 μm . Sobre las fotomicrografías se midieron las áreas y los resultados de su análisis estadístico con los valores promedios y de dispersión se muestran en la figura 9.

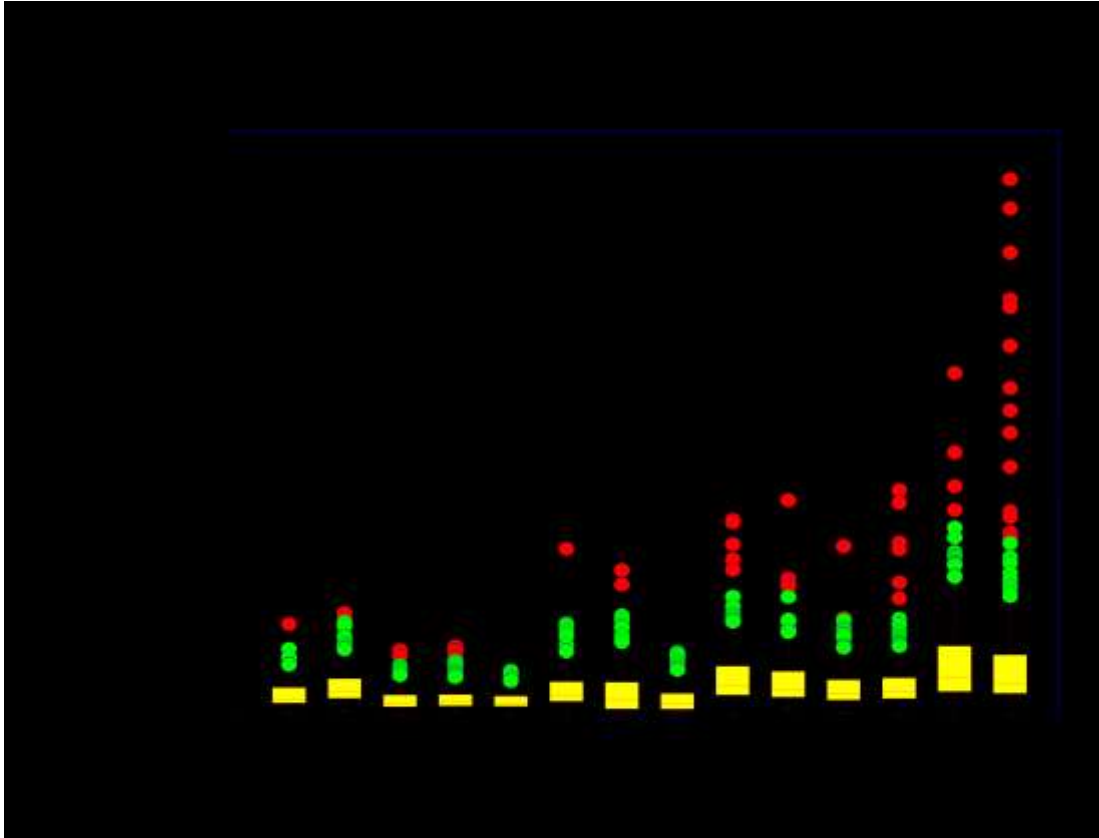


Figura 9. Área de las células espumosas encontradas en el granuloma a lo largo del estudio. Las cajas amarillas representan los valores centrales de la distribución (promedio, y error estándar), las barras indican desviación estándar. Los puntos fuera de las cajas representan aquellos valores que se dispersan tanto de los valores promedios que se representan en dos colores: verde o rojo.

El resultado de la comparación de las áreas de las células espumosas, con la prueba de ANOVA para mediciones repetidas, graficado en la figura 9, muestra en gráfica de cajas los valores promedio, error y desviación estándar. La dispersión de las áreas más allá de la desviación estándar se grafica con puntos rojos y verdes.

Lo anterior significa que en los cortes analizados y atendiendo únicamente a las áreas medidas, existen estadísticamente tres poblaciones de células espumosas: una representada por las cajas amarillas (con un valor promedio y desviación estándar propia), otra representada por los puntos verdes y otra con los puntos rojos (que

son aquellas células que por su tamaño se desvían tanto de los valores promedios que conforman otras dos poblaciones completamente distintas entre sí).

Los valores representados por las cajas amarillas se resumen en la tabla 1. El área promedio de las células espumosas en el día 3 postinfección fue de $155 \mu\text{m}^2$ (error estándar ± 12.47) y ésta fue aumentando a través del tiempo hasta llegar a ser de $488.2 \mu\text{m}^2$ (error estándar de ± 17.39) para el día 90. El análisis estadístico de estos datos, mediante la prueba de ANOVA para mediciones repetidas, demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los diámetros de las células por día, $p < 0.0000001$.

TABLA 1

AREA PROMEDIO DE LAS CELULAS
ESPUMOSAS POR DIA (μm^2)

Día	N	Promedio	Error estándar
3	210	155.0	12.47
4	94	196.6	18.64
5	142	111.7	15.17
6	183	127.4	13.36
7	124	101.5	16.23
8	112	164.4	17.08
9	101	289.0	17.99
10	227	147.6	12.00
12	184	259.4	13.32
15	73	275.7	21.16
30	174	140.0	13.70
45	179	238.9	13.51
60	123	326.1	16.30
90	108	488.2	17.39
Total	2034	202.4	

Un polígono de frecuencias empleando los valores promedio de las áreas de las células espumosas, junto con una curva y la línea de tendencia se muestra en la figura 10. En la gráfica la línea de tendencia, entre los grupos comparados, muestra una pendiente ascendente. Lo que significa que, para esta población celular, el aumento del área es directamente proporcional al tiempo de infección, es decir el área de las células espumosas aumenta conforme pasa el tiempo.

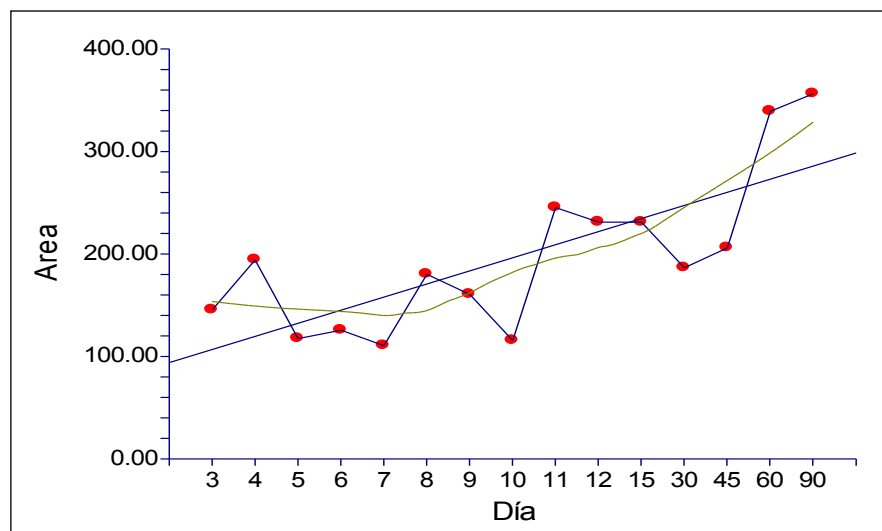


Figura 10. Área de la población más pequeña de células espumosas encontradas en el granuloma. Los puntos rojos representan los valores promedio por día, la curva café representa la transformación matemática para suavizar el polígono y la línea recta muestra la tendencia.

Un análisis de correlación lineal entre el área de las células y los días de evolución del micetoma, demuestra que existe una tendencia ascendente del área de las células conforme pasa el tiempo de evolución, como se observa en la figura 11.

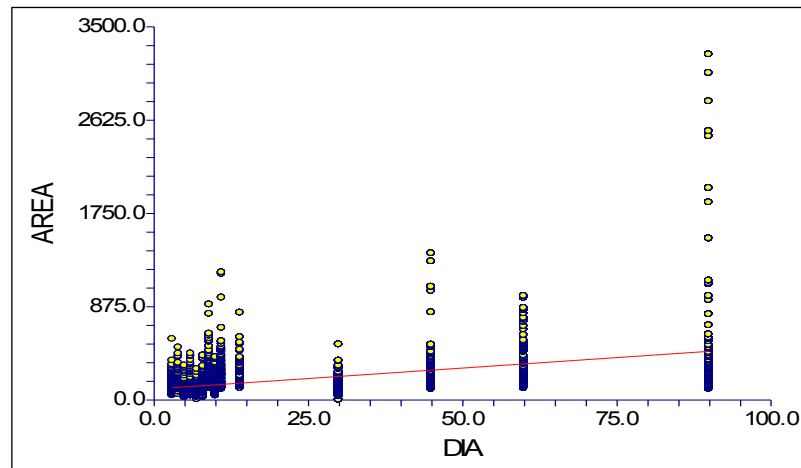


Figura 11. Relación entre área de las células espumosas y día de la medición. La línea roja representa la correlación lineal positiva entre ambas variables.

El intercepto en y de la gráfica indica el valor estimado del área de las células al día cero. La pendiente del cambio de área por día es de 3.92 con un error estándar de 0.055. El valor de la R cuadrada es de 0.1104 (proporción de la variación del área que puede ser debida a variaciones por día) y la correlación entre área y día es de 0.3323. Por lo anterior, se rechaza la hipótesis de que la pendiente es igual a cero pues el nivel de significancia de la prueba de t es de 0.0001.

El resultado de la cuenta de células espumosa presentes en los campos se muestra en la figura 12. Podemos observar que el número de células por campo muestra una tendencia a aumentar conforme pasa el tiempo. Este comportamiento se observa claramente del día 0 al 15 postinfección, momento en el cual la curva muestra un pico máximo para luego disminuir hasta el día 90.

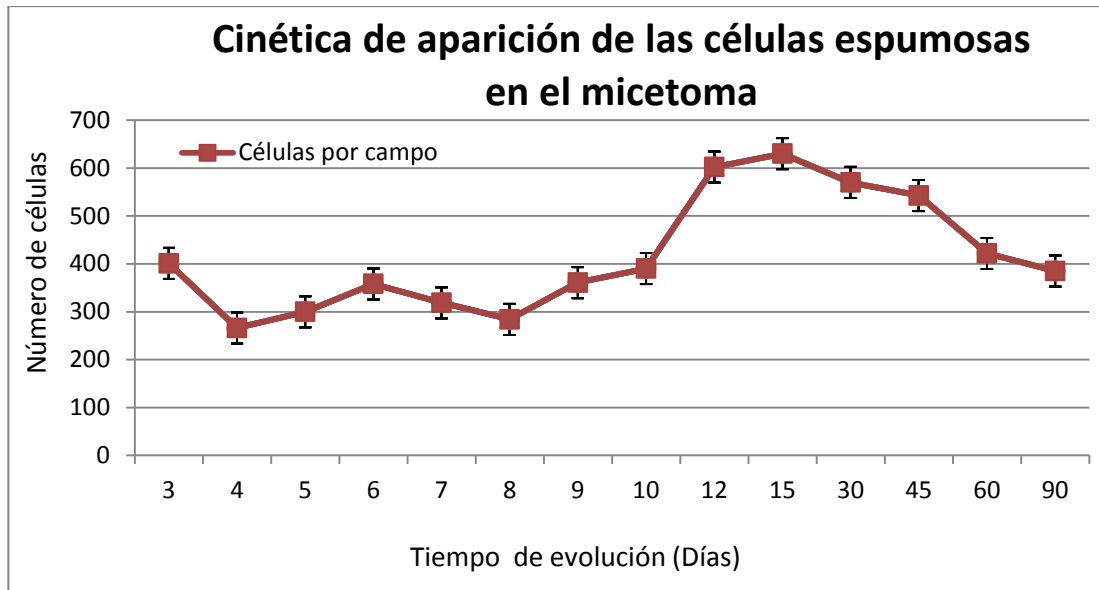


Figura 12. Número de células espumosas por campo, contabilizadas sobre las microfotografías por el método de Weibel. El polígono de frecuencias representa los valores promedio por día.

Como se establece en el método morfométrico empleado, el área de de las fotomicrografías analizadas siempre fue constante. Ya se demostró que las células espumosas aumentan su área a través del tiempo. Por lo tanto se deduce que esta disminución es relativa, pues el número de células en el área de la fotomicrografía cada vez es menor.

3.1.6. Análisis Ultraestructural de las Células Espumosas Presentes a los Tres Días Postinfección

Con el fin de comprobar la organización del granuloma e identificar sin lugar a dudas a las células espumosas mediante su

características ultraestructurales, se obtuvieron biopsias del cojinete plantar de ratones infectados con *N. brasiliensis* a los tres días postinfección. Las biopsias se fijaron en glutaraldehído, incluyeron en resinas epóxicas (SPURR) y se procesaron para microscopia de campo claro y microscopia electrónica.

Las observaciones morfológicas realizadas en cortes semifinos de 600 nm de grosor. Nuevamente muestran células gigantes, redondas, con su citoplasma ocupado por un número variable de vesículas también de tamaño variable y sin contenido aparente; uno o varios núcleos gigantes, claros, redondos, centrales o ligeramente excéntricos. En la cercanía se aprecia la presencia de fibroblastos y escasas fibras de colágena que siguen un trayecto semicircular delimitando al granuloma (Figura 13).

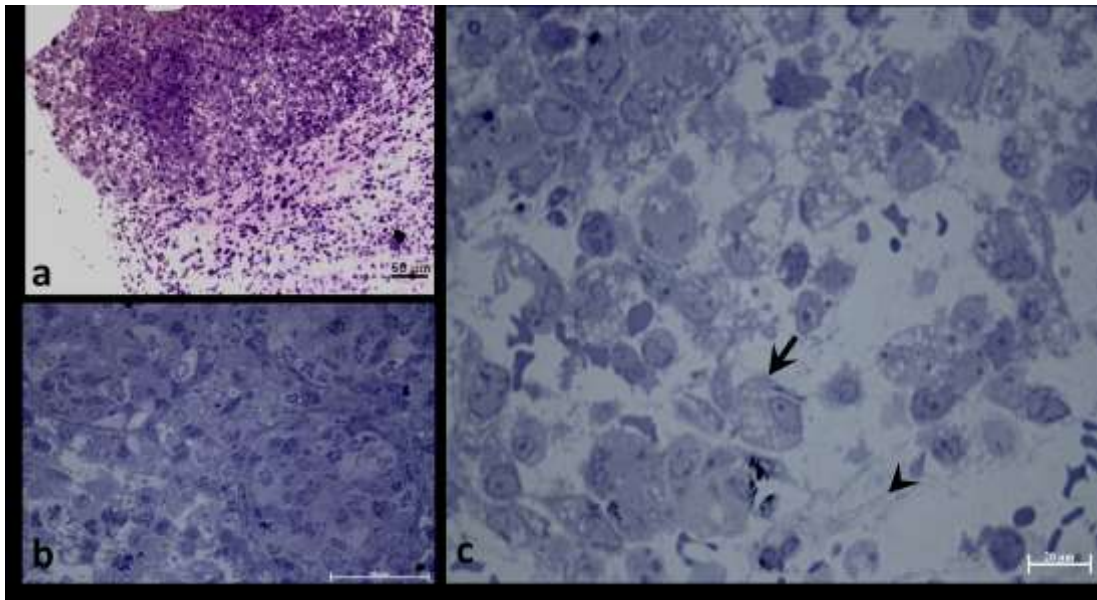


Figura 13. Biopsia de piel de la pata de ratón BALB/c a los 3 días postinfección con *N. brasiliensis*. A) Muestra un la periferia del granuloma donde se aprecian dos células epitelioides B) Un tipo de células gigantes multinucleadas con aspecto de mosaico, formadas por conglomerados de macrófagos o células epitelioides C) Células gigantes de aspecto espumoso, abundantes vesículas intracitoplásmicas, de diferentes tamaños. (Inclusión en SPURR, tinción con azul de toluidina, fotomicrografía de campo claro, magnificación 100x, 630x y 1000x).

Igualmente se observa la presencia de granulomas epitelioides, el aspecto de mosaico epitelial, circular, delimitado por células mioepiteliales conforman la estructura de células gigantes multinucleadas (Figura 13b).

La micrografías electrónicas de transmisión de estas mismas biopsias (Figuras 14 y 15), muestran células gigantes con ultraestructura característica de células espumosas: citoplasma, ocupado por vesículas electrodensidad variable: algunas claras sin contenido aparente, otras con contenido de mayor electrodensidad en su interior; de tamaño variable, algunas vesículas de tan solo 2 μm de diámetro, otras pueden ocupar todo el citoplasma de la célula. Estas células presentan uno o varios núcleos gigantes, situados en el centro, a veces ligeramente excéntricos; redondeados, con cromatina dispersa. El núcleo de las células espumosas destaca por su gran tamaño. Perfiles de células bacterianas con perfecta integridad ultraestructural se observan en el citoplasma, fuera de las vesículas, además algunas en franco proceso de división. En la cercanía se observan algunos fibroblastos activos y algunas fibras de colágena conformando la cápsula fibrosa delimitante del granuloma.

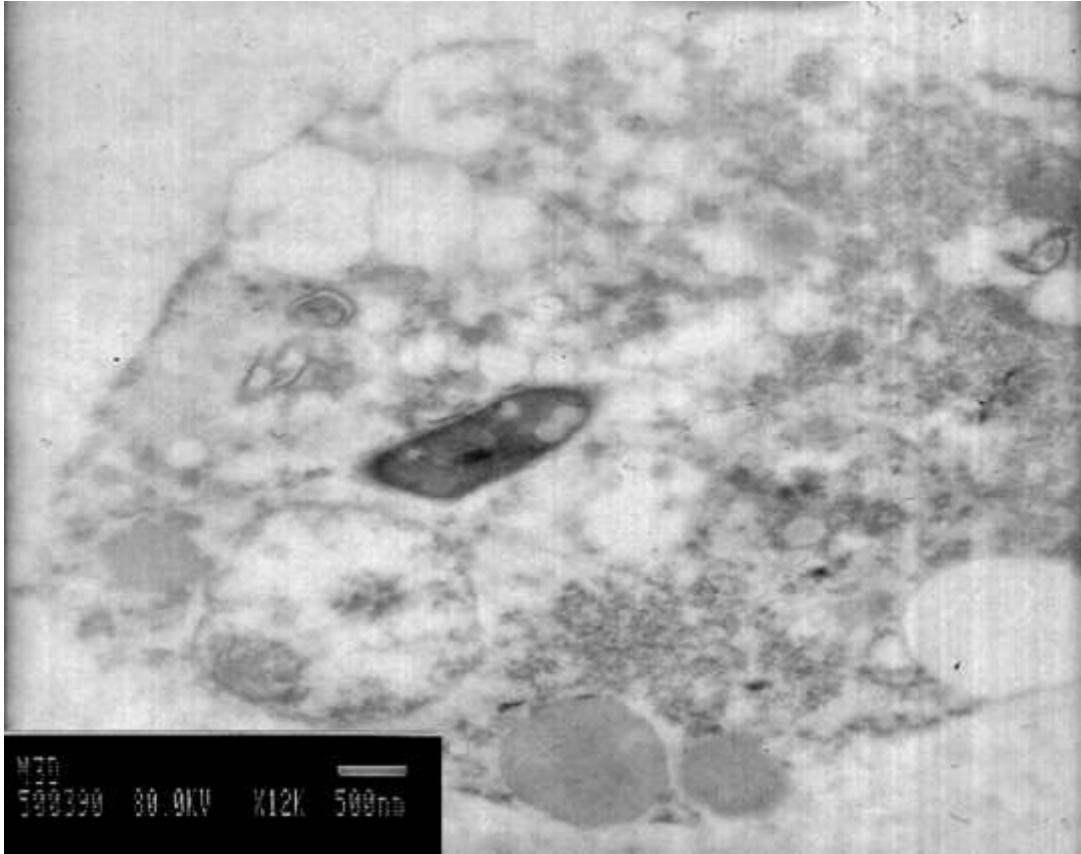


Figura 14. Células espumosas en un granuloma de 3 días de evolución. Abundantes vesículas de varios tamaños le dan aspecto vacuolado a su citoplasma. Una bacteria de *N. brasiliensis* en proceso de división se aprecia libre en el citosol. (Inclusión en SPURR, contrastación con acetato de uranilo y citrato de plomo, Micrografía electrónica de transmisión, magnificación 12000x).

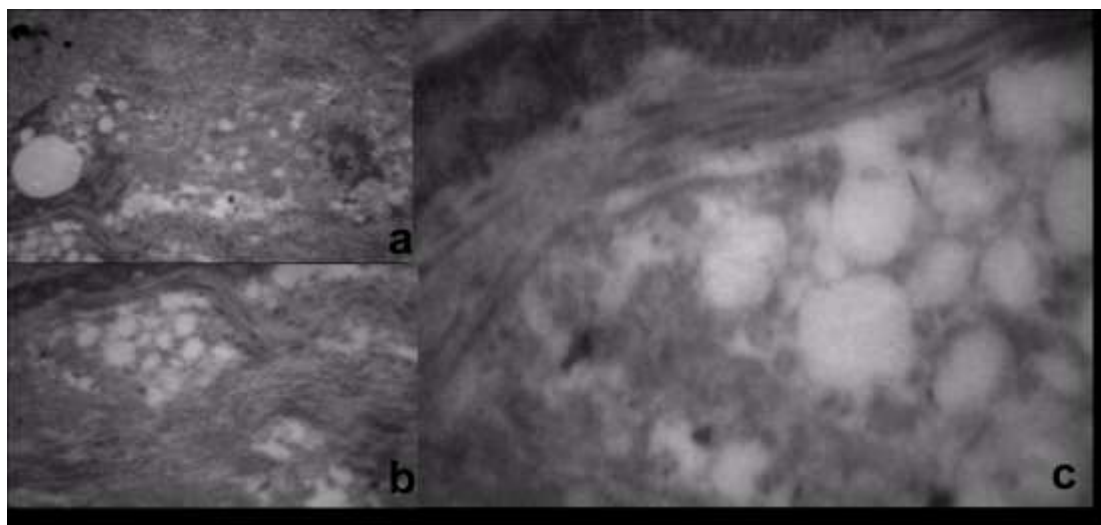


Figura 15. Biopsia de 3 días que muestra: A) periferia del granuloma. B) Célula espumosa debajo de la capsula del granuloma y C) detalle de una célula espumosa en la cercanía de fibras de colágena. (Microscopia electrónica de transmisión).

3.1.7. Expresión de CD64, CD11c, CD40, CD68 y S100 por las Células Espumosas Durante el Establecimiento y Resolución de la Infección

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica indirecta del granuloma, empleando anticuerpos dirigidos contra los marcadores CD11-c, CD40, CD64, CD68 y proteína S100, se muestran en la tabla 2. Las células espumosas positivas a la marca con diaminobenzidina (DAB) a partir del día 6 hasta el día 90 postinfección (Figura 15), se observan en aquellas inmunotinciones donde se emplearon anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie CD40, CD11c, CD64 y CD68. No se observa positividad de las células espumosas en las inmunotinciones donde se emplearon anticuerpos anti proteína S100.

TABLA 2

MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CELULAS ESPUMOSAS

	S100	CD11c	CD40	CD68	CD64
Células espumosas	-	+	+	+	+

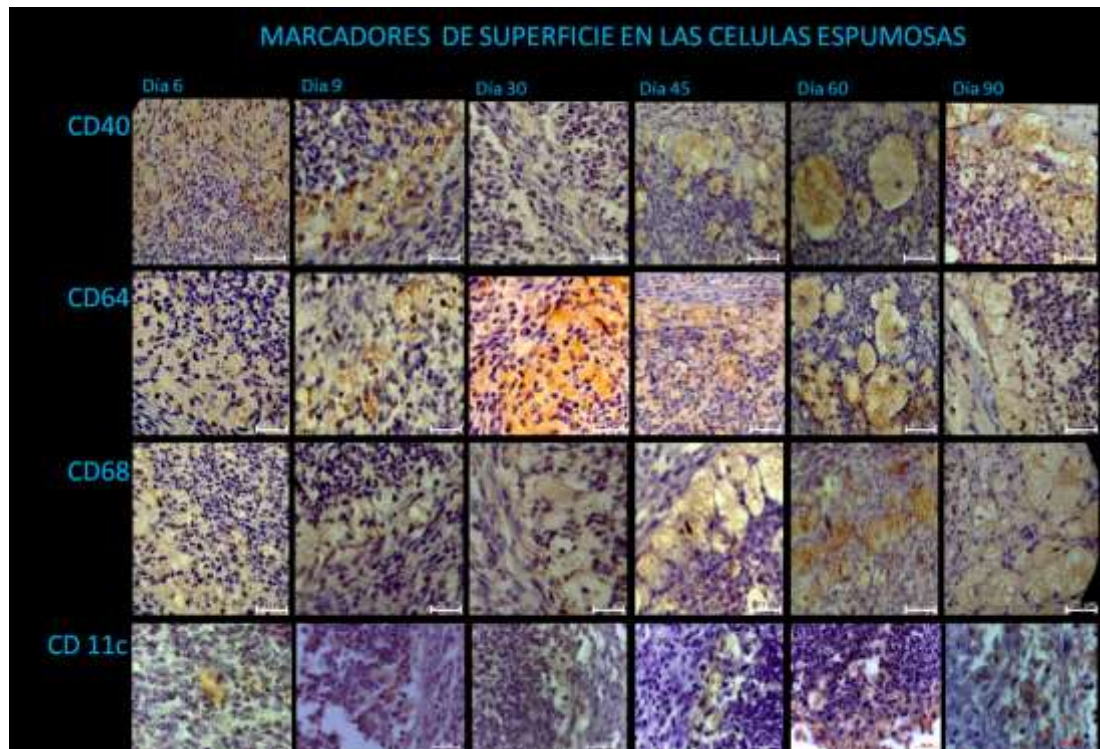


Figura 15. Granulomas en actinomicetoma de piel inducido por *Nocardia brasiliensis*. Células espumosas CD11c⁺, CD40⁺, CD64⁺, CD68⁺ y S100⁻ ubicadas debajo de la cápsula limitante del granuloma desde el día 6 hasta el 90 postinfección. (Método de peroxidasa con diaminobenzidina, magnificación original 1000x)

3.1.8. Perfil de Secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF α por las Células Espumosas en Base al Tiempo

En la tabla 3 se muestran los resultados de la tinción inmunohistoquímica indirecta del granuloma con anticuerpos anti las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ . La figura 16 muestra células espumosas positivas a la marca con DAB en aquellas inmunotinciones donde se emplearon anticuerpos dirigidos contra las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN- γ . En las inmunotinciones donde se

emplearon anticuerpos anti TNF- α no se observan células positivas a la marca con DAB.

TABLA 3

PERFIL DE PRODUCCION DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS POR LAS CELULAS ESPUMOSAS

	IL-1 β	IL-6	IL-12	TNF- α	IFN- γ
Células espumosas	+++	+	++	-	+

IL-1 β : Interleucina 1 beta, IL-6: Interleucina 6, IL-12: Interleucina 12, TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, IFN- γ : Interferón gama.

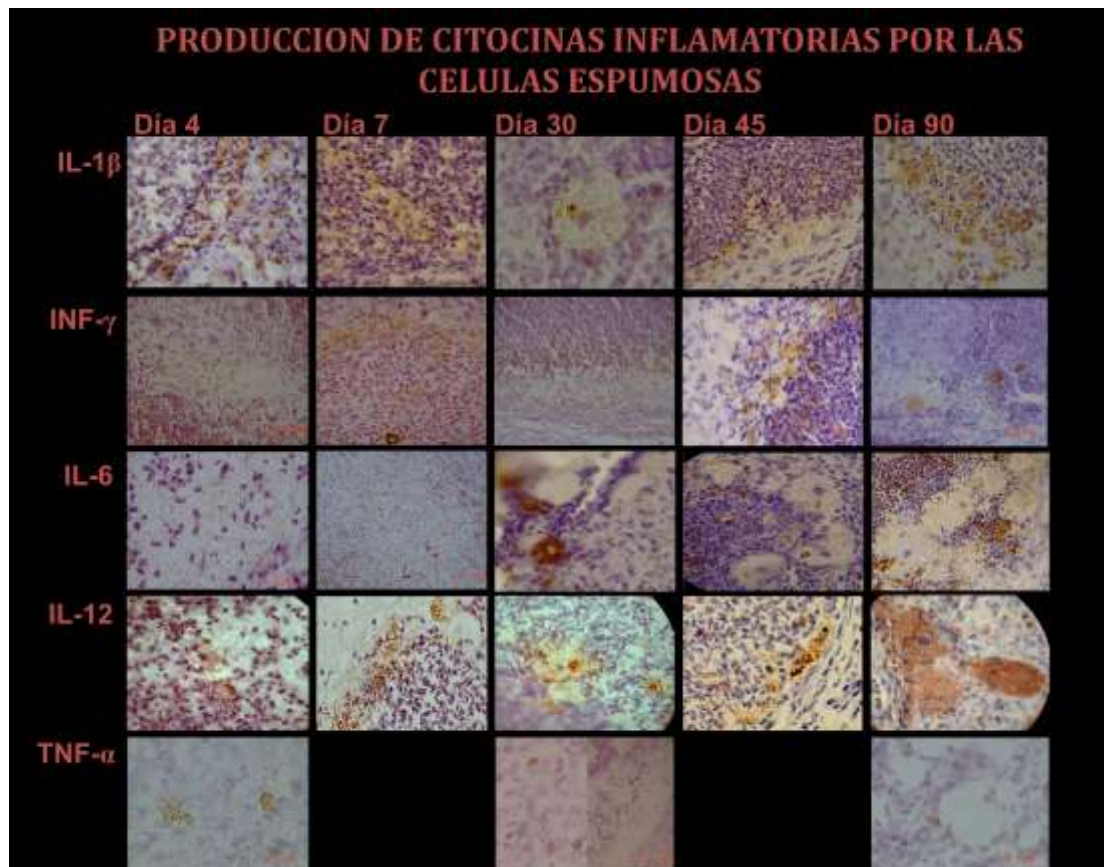


Figura 16. Granulomas en actinomicetoma de piel inducido por *Nocardia brasiliensis*. Células espumosas IL-1 β ⁺, IFN- γ ⁺, IL-6⁺, IL-12⁺ y TNF- α ⁻ ubicadas en el granuloma desde el día 4 hasta el 90 postinfección. Las células espumosas IL-6⁺ mostraron débilmente la marca los primeros días, pero aumentaron después del día 30(método de peroxidasa con diaminobenzidina, magnificación original 1000x).

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1. Discusión

Desde 1999 Salinas-Carmona y cols. describieron los cambios clínicos e histopatológicos que se presentan en el modelo experimental del actinomicetoma en ratones BALB/c (89). Observaron que el proceso inflamatorio se presenta a las 72 hrs postinyección de las células de *N. brasiliensis*. También mencionan la presencia de hiperemia y pequeños abscesos hasta el día 14.

Como es sabido, desde el punto de vista histopatológico (12), todo proceso inflamatorio (independientemente de su etiología) se presenta desde el momento en que ocurre un daño a los tejidos; pues ante el trauma ocurre la degradación del ácido araquidónico y la producción de eicosanoides que conducen a la activación de la cascada de la inflamación. Aunque estos fenómenos moleculares ocurren desde que ocurre el traumatismo tisular, los cambios clínicos que los

acompañan se presentan minutos, horas o incluso días posteriores al daño. En nuestros ratones estos signos clínicos, que acompañan a la inflamación, se presentaron entre el 2º y 3er día postinfección. Desde ese momento además de los datos clásicos de inflamación como rubor, calor y tumoración local, también pudimos observar pústulas y ulceraciones en la piel del dorso de la pata. Salvo la presencia de estas pústulas, todos los datos observados fueron consistentes con la descripción previa de Salinas-Carmona y cols. (89).

Una forma más precisa para definir al proceso inflamatorio utiliza criterios histológicos (12), de tal forma que la clasificación del proceso como agudo o crónico toma en cuenta los cambios histopatológicos que presenta el tejido dañado a través del tiempo. La inflamación aguda, de duración relativamente corta; se mantiene pocos minutos, varias horas o incluso uno o dos días. Se define mediante la presencia de exudados de líquidos y proteínas (edema) y la emigración de leucocitos, sobre todo neutrófilos. Es estereotipada, independientemente del agente causal. Por otro lado, la inflamación crónica es menos uniforme, tiene una duración más larga y se caracteriza por la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos y de tejido conectivo (12). En este trabajo pudimos observar, en los cortes histológicos a las 24 hrs postinfección, entre las fibras de colágena del tejido celular subcutáneo, grandes espacios (edema) infiltrados por células inflamatorias con predominio de PMN, concordando con lo que se

encuentra en la literatura respecto a la inflamación aguda. Estas células fueron reemplazadas paulatinamente por macrófagos activados. Podemos decir que este momento es cuando el proceso se vuelve crónico. Una forma de resolver una inflamación crónica, cuando no es posible eliminar al agente causal, es mediante la formación de granulomas.

El término granuloma se refiere a cualquier agregado organizado de células inflamatorias mononucleares o colección de macrófagos modificados, rodeados por un anillo de linfocitos y a menudo conteniendo células gigantes multinucleadas. Es una forma de respuesta inmune innata ante estímulos inflamatorios crónicos tales como infección con patógenos intracelulares (*Mycobacterium tuberculosis*, organismos intracelulares y hongos) o materiales inertes (sílice o berilio) (94). Este patrón de inflamación es iniciado y mantenido por células T CD4 sensibilizadas que exhiben un patrón de producción de citocinas tipo TH1 (IFN- γ , IL-12 y TNF) (94, 95).

Sabemos que *N. brasiliensis* es un agente intracelular que induce la formación de granulomas (87). Si los granulomas son formas de inflamación crónica, las células espumosas ubicadas debajo de la cápsula fibrosa, deberían ser consideradas como un signo de cronicidad. No obstante en nuestro modelo de estudio, desconocemos el tiempo en el que el proceso inflamatorio cambia de una inflamación aguda a crónica. En este trabajo pudimos observar la organización granulomatosa (lesión brasiliensis), descrita por Folb y Jaffe y por Salinas-Carmona. Aunque esta organización granulomatosa aparece

hacia el día 11 según la descripción de Folb y hacia el día 7 según Salinas-Carmona, en este estudio se comprobó su presencia en el 3er día. De igual forma en esta lesión brasiliensis, ellos describieron la aparición de las células espumosas entre el día 10 y 11, pero en nuestro estudio las pudimos observar también al tercer día postinfección.

Sabemos que la cápsula de fibras de colágena es la que delimita en última instancia al acumulo estratificado y organizado de linfocitos, polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas en torno al agente infeccioso. También se sabe que en el caso particular de la lesión brasiliensis, es por debajo de esta cápsula donde se ubican las células espumosas. Por tal motivo para identificar a las células espumosas, fue importante definir en primer lugar la presencia de la cápsula fibrosa para luego buscar debajo de ella a dichas células. Siguiendo este criterio, en este estudio no solo pudimos comprobar la formación de microabscesos a tiempos tan cortos como el tercer día postinfección, sino que también demostramos la presencia de las células espumosas en situación subyacente a la cápsula, primero por microscopía de campo claro, pero luego se confirmó el hallazgo mediante técnicas histoquímicas (tricrómico de Masson), cortes semifinos y finalmente microscopía electrónica de transmisión. En todas las biopsias analizadas este granuloma temprano (de tres días de evolución) se caracterizó por ser unilocular y tener una cápsula delimitante muy tenue y los perfiles celulares identificados como células espumosas mostraron

características morfológicas que se apegaron a las descripciones hechas previamente por Folb y por Salinas-Carmona.

El análisis ultraestructural de estas células espumosas, demuestra la presencia de abundantes vesículas intracitoplásmicas de varios tamaños, algunas ocupadas por contenidos sin forma definida, de electrodensidad heterogénea que parecen ser detritus de bacterias en proceso de degradación. Otras aparentemente vacías muestran un aspecto electrolúcido, homogéneo. Entre las vesículas, libres en el citoplasma, también se aprecian perfiles de bacterias cuya ultraestructura integra permite deducir que han evadido la respuesta inmune, pues además muestran datos de que se encuentran en división celular. Además de las vesículas, algunos perfiles presentan más de un núcleo y escaso retículo endoplásmico rugoso. Todas estas características se apegan a las descripciones previas sobre la ultraestructura de las células espumosas hechas por Folb y Jaffe (87).

Desde su aparición en el granuloma de tres días hasta el granuloma de 90 días, las células espumosas mantienen su ubicación cerca de la cápsula fibrosa y salvo su aumento progresivo de tamaño, su morfología no cambia. En cualquier momento analizado, en este estudio pudimos observar células espumosas de varios tamaños: unas pequeñas con área promedio de $202.4 \mu\text{m}^2$; otras de tamaño intermedio, con áreas promedio entre 202.4 y $1200 \mu\text{m}^2$ y por ultimo otras gigantes cuyas áreas promedio va entre 1200 y $3500 \mu\text{m}^2$. Esto significa que dichas células no solo aumentan de

tamaño durante el proceso infeccioso, sino que también se forman constantemente ya sea por transformación de macrófagos o de otro tipo celular. Evidencia de esta continua formación de células espumosas, es la desviación estándar tan angosta observada al medir los diámetros de estas células durante el análisis morfométrico los primeros días, la cual se torna muy amplia después del día 45.

A la fecha no se conoce el origen ontológico de las células espumosas. Pocas son las patologías donde se ha descrito la aparición de células espumosas, aunque estas patologías son diferentes entre sí, tienen en común un proceso inflamatorio y algún trastorno en el metabolismo lipídico. Entre estas patologías son menos aquellas en las que se ha abordado el estudio ultraestructural de estas células espumosas. Los escasos reportes existentes las describen como macrófagos transformados, con citoplasma de aspecto espumoso debido a la acumulación de vesículas, cuyo contenido es LDL oxidada, LDL acetilada, esteres de colesterol y otros agregados de LDL. Tal es el caso de la aterosclerosis (14, 28, 96-104), en donde el proceso inflamatorio y el microambiente hipóxico en la íntima saturada de lípidos promueven la expresión de moléculas vasculares de adhesión celular (VCAM-1) y MCP-1 por las células endoteliales. Esto atrae a los monocitos que en la íntima se diferencian en macrófagos los cuales expresan receptores carroñeros que internalizan las LDL modificadas por oxidación o glucosilación. Al acumular esteres de colesterol y LDL en su interior se van transformando en células espumosas. Estas células espumosas

expresan CD40 y citocinas proinflamatorias. El CD40 que expresan interactúa con el CD154 de los linfocitos T induciendo la secreción de citocinas proinflamatorias TH1 principalmente (FABP) (14). En este trabajo encontramos que las células espumosas expresan CD40 a partir del 4° día postinfección y se mantiene hasta el día 90.

Atendiendo únicamente a su tamaño gigante y presentar más de un núcleo, estas células espumosas pueden ser consideradas como macrófagos transformados; pues como se sabe, en la respuesta inflamatoria crónica, especialmente en aquella del tipo granulomatoso; los macrófagos tienden a formar conglomerados celulares que al fusionarse originan dos tipos de células gigantes y multinucleadas: las células gigantes tipo Langhans y los macrófagos epitelioides (12). En este trabajo además de encontrar células espumosas gigantes y multinucleadas, también se observaron macrófagos epitelioides dispersos entre las células inflamatorias del granuloma de 3 días de evolución.

No obstante lo antes expuesto, la expresión de ciertos marcadores propios de células dendríticas por las células espumosas, hacen pensar en las primeras como fuente de las células espumosas.

En este trabajo investigamos la expresión de algunos marcadores de superficie por las células espumosas. Estos marcadores fueron la proteína de 100 kDa (S100) expresada normalmente por células de Langerhans y dendríticas; el marcador CD11c, expresado por las células dendríticas y los monocitos en desarrollo; el marcador CD40, expresado por los monocitos activados, una subfamilia de células

dendríticas; el marcador CD68 expresado por monocitos activados, macrófagos y células dendríticas y finalmente el marcador CD64, expresado principalmente por monocitos activados y macrófagos. Encontramos que las células espumosas expresan en su superficie CD11c, CD40, CD68 y CD64. Estos marcadores son expresados normalmente algunos en células dendríticas y otros en macrófagos, como ya se menciona arriba. No expresan proteína S100, por lo que su ontogenia se circunscribe entre macrófagos y células dendríticas.

Actualmente se reconoce a las células dendríticas como componentes de los granulomas y se cree juegan un papel importante en la generación y regulación de estas lesiones. Su participación en la formación de granulomas consiste en tomar los antígenos bacterianos, migrar a los nódulos linfáticos regionales y presentarlos ya procesados a las células T CD4 vírgenes (105). Estos linfocitos T CD4 exhiben una respuesta TH1, al salir del nódulo linfoide y llegar al sitio de inflamación producen IFN- γ y el TNF α que por un lado activan a los macrófagos y por otro el granuloma madura bajo la influencia de las citocinas TH1 (103).

Hay evidencia suficiente, en modelos animales de inflamación granulomatosa, que sugiere que las citocinas TH1: INF- γ , IL-12 y TNF α son requeridas para la formación y mantenimiento del granuloma (106, 108).

Ya desde 1999 en este laboratorio Salinas-Carmona había determinado la producción de citocinas TH1 y TH2 en el suero durante la evolución del micetoma (89). Recientemente Solís-Soto

describió presencia y distribución de células inmunorreactivas a las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α en el micetoma por *N. brasiliensis* (91). En este trabajo pudimos demostrar que las células espumosas muestran una fuerte inmunorreactividad a los anticuerpos anti IL-1 β , IL-12, IL-6 e IFN- γ desde el 4^o día. Lo cual correlaciona con lo encontrado previamente (89, 91) por Solís-Soto quien describe en la epidermis y dermis la presencia de células dendríticas inmunorreactivas a IL-1 β , IL-6 e IL-12 a partir del 4^o día postinfección.

En otros modelos donde se estudia la inflamación granulomatosa se sabe que el IFN- γ es producido tempranamente por las células NK y luego por las células T tipo TH1. Sus funciones efectoras relevantes en la formación del granuloma incluyen activación de los mecanismos bactericidas de macrófagos, activación del endotelio para promover la adhesión de células T CD4 y promoción de la diferenciación TH1 (94).

La IL-12 es una citocina heterodimérica producida primariamente por las células presentadoras de antígenos. Además de mejorar la proliferación y citotoxicidad de las células NK y células T citolíticas, es un potente inductor de la diferenciación TH1 y por lo tanto de la producción de IFN- γ (109-111).

TNF α es otra citocina TH1 crucial para la formación del granuloma. La principal fuente de TNF α son los fagocitos mononucleares, aunque las células T también pueden producir esta citocina. Tiene un amplio rango de actividades incluyendo expresión de moléculas de adhesión

en el endotelio, activación de macrófagos e inducción a la apoptosis. (93, 112-116).

Las células dendríticas no solo tienen un papel central al iniciar la respuesta inmune adquirida contra *M. tuberculosis*, también participan en la respuesta granulomatosa y tienen un importante papel efector contra este microorganismo (113, 117). Al formar parte del granuloma, constituyen un nicho de sobrevivencia para las micobacterias por largos periodo de tiempo (118) pues tienen pobres mecanismos para eliminar este u otros patógenos intracelulares (119, 120, 121). Además la desregulación de antígenos clase I en la etapa crónica de la infección hace que pierdan su capacidad para presentar antígenos. Al expresar el factor asociado al receptor de TNF α (TRAF) evitan cualquier posibilidad de apoptosis prolongando la vida media de estas células y previniendo la diseminación subsecuente de la bacteria a otros órganos ya que finalmente las células dendríticas se acumulan en una jaula fibrosa por mecanismos aun desconocidos (122).

Aunque las células espumosas son consideradas macrófagos transformados por algunos autores (104), recientemente se ha dado importancia a las células dendríticas como sus posibles precursores, pues comparten marcadores de superficie y la producción de algunas citocinas.

Al igual que en el micetoma por *N. brasiliensis*, en otro modelo de inflamación granulomatosa inducida por *M. tuberculosis*, también se ha descrito la presencia de células espumosas delimitadas o

inmersas en una fina jaula fibrosa. Identificadas al principio como macrófagos especializados (123) se encontró que tienen un aspecto altamente vacuolado y se organizan en el granuloma formando capas de células y se mezclan con linfocitos TCD4 que lo delimitan (117, 124, 125), por lo que también los denominaron macrófagos espumosos. Estos investigadores han encontrado que estos macrófagos espumosos expresan marcadores característicos de células dendríticas: CD11c⁺, I-A (este último, es un indicador fenotípico de madurez asociado con las células dendríticas) y MHC-II. En cultivo cuando se les estimula con GM-CSF expresan pobremente F4/80, moderadamente MAC3, pero también son CD11a⁺, CD11b⁺, CD54⁺ y MHC-II⁺ (126, 123). In situ expresan DEC-205 (118, 127), CD11c^{high}, CD11b⁺, MHC-II^{high}, y CD40^{high}, aunque la expresión de MHC-II^{high}, y CD40^{high} disminuye paulatinamente conforme la enfermedad evoluciona hacia etapa de cronicidad. Así mismo estas células expresan TRAF, moléculas de resistencia a la apoptosis (117). Estudios recientes los ha llevado a descubrir que en su modelo hay una disminución progresiva del M-CSF y un aumento igualmente progresivo de GM-CSF. La restitución del M-CSF se acompaña de una disminución significativa de estas células espumosas. Al parecer estos dos factores M-CSF y GM-CSF participan en la progresión de macrófagos a células espumosas y esas citocinas son importantes en la diferenciación y regulación de la expresión de marcadores asociados con células dendríticas por los macrófagos (128).

Aunque en nuestro estudio encontramos que las células espumosas muestran características morfológicas de macrófagos tales como el tamaño y ser multinucleadas, también encontramos que expresan marcadores de células dendríticas CD11c y CD40.

No obstante son necesarios más estudios del micetoma a diferentes tiempos de evolución, en los que se estudie la expresión de otros marcadores de células dendríticas distintos a los aquí estudiados, se les cuantifique y se establezca su cinética de expresión a lo largo del tiempo. Esto nos ayudará eventualmente a identificar el origen ontológico de estas células espumosas y definir su papel en la respuesta inmune de nuestro modelo animal ante la infección por *N. brasiliensis*.

De ser las células dendríticas sus precursores y en base al conocimiento actual sobre estas y su papel como inductores, reguladores y efectores de la respuesta inmune granulomatosa, al igual que otros autores (129) podríamos considerar seriamente a los granulomas como los probables sitios donde se expresa la relación cercana entre las respuestas inmune innata y adquirida.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones

- 5.1.1. En el granuloma por *N. brasiliensis* la aparición de las células espumosas ocurre al tercer día de la infección y persisten a lo largo del proceso infeccioso.
- 5.1.2. Las células espumosas son células gigantes, multinucleadas que aumentan aún más su tamaño durante el periodo de infección.
- 5.1.3. Las células espumosas son inmunorreactivas a los anticuerpos anti IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-12.
- 5.1.4. Las células espumosas son inmunorreactivas a los anticuerpos anti CD11c, CD40, CD64 y CD68.
- 5.1.5. En el granuloma por *Nocardia brasiliensis*, las células espumosas muestran inmunoreactividad similar a la de las células dendríticas.

5.2. Perspectivas

El actinomicetoma es una enfermedad infecciosa causada por *Nocardia brasiliensis*, un microorganismo intracelular que evade la respuesta inmune y como otros intracelulares sobrevive en el huésped largos periodos de tiempo. Al igual que otros patógenos intracelulares la infección por este microorganismo despierta una respuesta inflamatoria tipo granulomatosa. Es en la respuesta inmunológica en donde encontramos a las células motivo de esta tesis: las células espumosas, las cuales también podemos encontrar en otros padecimientos de igual o aún mayor importancia.

Es importante lograr una completa caracterización de las células espumosas por sus marcadores de superficie y perfil de citocinas para conocer su papel en la respuesta del huésped ante la infección por *N. brasiliensis*. Esto nos permitirá proponer armas terapéuticas contra este patógeno y extrapolarlas a otros padecimientos causados por intracelulares o a otros padecimientos en donde también encontramos células espumosas.

Este trabajo muestra que las células espumosas son multinucleadas y que aparecen al tercer día postinfección, así mismo que estas células expresan marcadores tanto de células dendríticas

como de macrófagos y que son productoras de citocinas proinflamatorias. Basados en los resultados del presente trabajo y en los resultados que otros investigadores con modelos experimentales similares, todo indica que son las células dendríticas y no los macrófagos las precursoras de estas células espumosas, aunque por el momento no estamos en condiciones de afirmarlo, pues aun no estudiamos todos los marcadores conocidos característicos de células dendríticas.

Por el momento con este trabajo, se han resuelto las interrogantes planteadas al principio, pero como en todo proceso de investigación en donde se sigue rigurosamente el método científico, han surgido nuevas interrogantes, mayor en número que las mismas interrogantes que originaron este estudio. Entre estas interrogantes es necesario saber si:

¿Hay proliferación de células espumosas durante el proceso infeccioso?

¿Tiene que ver el agente infeccioso o algún componente biomolecular en esta transformación?

¿Tienen estas células capacidad inmunológica o la pierden en algún momento?

Estas y otras interrogantes deberán ser contestadas mediante el planteamiento de nuevas hipótesis. Serán necesarios nuevas estrategias que permitan completar el conocimiento sobre estas células espumosas, no obstante este trabajo sienta las bases para

poder explicar la función de dichas células en la respuesta inmune contra la infección de *Nocardia brasiliensis*.

LITERATURA CITADA

1. Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2003). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Saunders.
2. Fujiwara, N. and K. Kobayashi (2005). "Macrophages and inflammation. Current Drug Targets " Inflammation & Allergy. 4: 281-286.
3. Kobayashi, K. and T. Yoshida (1996). "The immunopathogenesis of granulomatous inflammation induced by Mycobacterium tuberculosis." Methods. 9: 204-214
4. Kasahara, T. and K. Matsushima (2001). "Macrophage signaling, apoptosis, lectins and leukocyte trafficking." Trends Immunol. 22(11): 593-594.
5. Firestein, G. S. (2004). In Cecil Textbook of Medicine. Philadelphia, Saunders.
6. Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu. Rev. Immunol. 20: 825.

7. Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells." *Annu. Rev. Immunol.* 22: 891.
8. Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335.
9. Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." *Annu. Rev. Immunol.* 16: 495.
10. Caamaño, J. and C. A. Hunter (2002). "NF-kappa B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions." *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 414.
11. Busslinger, M. (2004). "Transcriptional control of early B cell development." *Annu. Rev. Immunol.* 22: 55-79.
12. Collins, T. (1999). In *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, Saunders.
13. Cotran, R. S., S. L. Robbins, et al. (2005). *Patología estructural y funcional*. México, Editorial McGraw-Hill.
14. Linton, M. F. and S. Fazio (2003). "Macrophages, inflammation, and atherosclerosis." *International Journal of Obesity*. 27(supplement): 35-40
15. Téllez Mendoza, J. (2005) Adiponectina y disfunción endotelial. *Respyn*. Volume, 12 DOI:

16. Santamarina-Fojo, S., A. T. Remaley, et al. (2001). "Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter." *J Lipid Res.* 42: 1339-1345.

17. Aiello, R. J., D. Brees, et al. (2002). "Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 630-637.

18. Linton, M. F., J.B. Atkinson, et al. (1995). "Prevention of atherosclerosis in apoE deficient mice by bone marrow transplantation." *Science.* 267: 1034-1037.

19. Fazio, S., V. R. Babaev, et al. (1997). "Increased atherosclerosis in C57BL/6 mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages." *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 4647-4652.

20. Ishiguro H, Yoshida H, et al. (2001). "Retrovirus-mediated expression of apolipoprotein A-I in the macrophage protects against atherosclerosis in vivo." *J Biol Chem.* 276: 36742-36748.

21. Major, A. S., D. E. Dove, et al. (2001). "Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (ApoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in ApoAI(-/-) mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1790-1795.

22. Hasty, A. H., M. F. Linton, et al. (1999). "Retroviral gene therapy in ApoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation." *Circulation.* 99: 2571-2576.

23. Yoshida, H., A. H. Hasty, et al. (2001). "Isoform-specific effects of apolipoprotein E on atherogenesis: gene transduction studies in mice." *Circulation.* 104: 2820-2825.

24. Fazio, S., V. R. Babaev, et al. (2002). "Physiological expression of macrophage apoE in the artery wall reduces atherosclerosis in severely hyperlipidemic mice." *J Lipid Res.* 43: 1602–1609.
25. Boord, J. B., S. Fazio, et al. (2002). "Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol.* 13: 141–147.
26. Makowski, L., J. B. Boord, et al. "Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis." *Nat Med.* 7: 699–705.
27. Eligini, S., M. Brambilla, et al. (2002). "Oxidized phospholipids inhibit cyclooxygenase-2 in human macrophages via nuclear factor kappa B/I kappa B- and ERK2-dependent mechanisms." *Cardiovasc Res.* 55: 406–415.
28. Robbesyn, F., V. Garcia, et al. (2003). "HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappa B activation in smooth muscle cells." *FASEB J.* 17: 543–745.
29. Natarajan, R., M. A. Reddy, et al. (2001). "Signaling mechanisms of nuclear factor kappa b- mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroperoxy-octadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1408–1413.
30. Subbanagounder, G., N. Leitinger, et al. (2000). "Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2248–2254.

31. Subbanagounder, G., A. D. Watson, et al. (2000). "Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities." *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1751–1761.
32. Sugiyama, S., K. Kugiyama, et al. (1998). "Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor kappa B activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 568–576.
33. Kume, N., M. I. Cybulsky, et al. (1992). "Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells." *J. Clin. Investig.* 90: 1138–1144.
34. Takahara, N., A. Kashiwagi, et al. (1996). "Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells." *Metabolism.* 45: 559–564.
35. Zhu, Y., J. H. Lin, et al. (1997). "Activation of ICAM-1 promoter by lysophosphatidylcholine: possible involvement of protein tyrosine kinases." *Biochim. Biophys. Acta.* 1345: 93–98.
36. Leonarduzzi, G., M. C. Arkan, et al. (2000). "Lipid oxidation products in cell signaling." *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1370–1378.
37. Robbesyn, F., R. Salvayre, et al. (2004). "Dual Role of Oxidized LDL on the NF-Kappa B Signaling Pathway." *Free Radical Research.* 38(6): 541-551.
38. Parola, M., G. Robino, et al. (1998). "HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells." *J. Clin. Investig.* 102: 1942–1950.

39. Camandola, S., A. Scavazza, et al. (1997). "Biogenic 4-hydroxy-2-nonenal activates transcription factor AP-1 but not NF-kappa B in cells of the macrophage lineage." *Biofactors*. 6: 173–179.
40. Page, S., C. Fischer, et al. (1999). "4-Hydroxynonenal prevents NF-kappa B activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis." *J. Biol. Chem.* 274: 11611–11618.
41. Sawyer, R. G., M. D. Spengler, et al. (1991). "The peritoneal environment during infection: the effect of monomicrobial and polymicrobial bacteria on pO₂ and pH." *Ann. Surg.* 213: 253-260.
42. Faisal Khan, M. D. (2005). *Grand Rounds. Department Of Internal Medicine, Southern Illinois University.*
43. Golbert, S. V. and S. D. Pletnev (1967). "On pulmonary pseudotumors." *Neoplasma*. 14: 189 –198.
44. Cerfolio, R. J., M. S. Allein, et al. (1999). "Inflammatory pseudotumor of the lung." *Ann Thorac Surg.* 67: 933-936.
45. Singh, R. S., R. S. Dhaliwal, et al. (2001). "Inflammatory pseudotumors of the lung. Report of a case and review of literature." *Indian J Chest Dis.* 43: 231 – 237.
46. Bahadori, M. and A. Liebow (1973). "Plasma cell granuloma of the lung." *Cancer*. 31: 191-208.

47. Mandelbam, I., R. Brashear, et al. (1981). "Surgical treatment and course of pulmonary pseudotumor (plasma cell granuloma)." *J Thorac Cardiovasc Surg.* 82: 77–82.
48. Epstein, D. M. and M. F. Glickstein (1989). "Plasma cell granuloma. The Radiologic Clinics of North America." *Cardiopulmonary Imaging.* 27(1077–1084).
49. Daudi, F. A., G. M. Lees, et al. (1991). "Inflammatory pseudotumors of the lung. Two cases and a review " *C J S.* 34(461–464).
50. Ishida, T., T. Oka, et al. (1989). "Inflammatory pseudotumor of the lung in adult." *Ann Thorac Surg.* 48: 90–95.
51. Calderazzo, M., A. Gallelli, et al. (1997). "Inflammatory pseudotumor of the lung presenting as an airway obstructive syndrome." *Resp Med.* 91: 381–384.
52. Vahid, M., S. Mohsen, et al. (2005). "Inflammatory pseudotumor of the lung: report of four adult cases." *Arch Iranian med.* 8(4): 314-318.
53. Urshel, J. D., T. A. Horan, et al. (1992). "Plasma cell granuloma of the lung." *J Thorac Cardiovasc Surg.* 104: 870–875.
54. Yi-Fang., T.-I. cheng., et al. (2005). "Xanthogranulomatous appendicitis." *J Formos Med Assoc.* 104(10): 752-754.
55. Franco, V., F. Arogona, et al. (1990). "Xanthogranulomatous cholecystitis. Histopathological study and classification." *Pathol Res Pract .* 186: 383-390.

56. Antonakopoulos, G. N., C. R. Chapple, et al. (1988). "Xanthogranulomatous pyelonephritis. A reappraisal and immunohistochemical study." *Arch Pathol Lab med.* 112: 275-281.
57. Birch, P. J., I. Richmond, et al. (1993). "Xanthogranulomatous appendicitis." *Histopathology.* 22: 597-598.
58. Munichor, M., H. Kerner, et al. (2000). "Xanthogranulomatous appendicitis: an incidental finding of localized pathology." *Ultrastruct Pathol.* 24(1): 33-39.
59. McVey, R. J. and F. R. McMahon (1994). "Xanthogranulomatous appendicitis [letter]." *Histopathology.* 24: 198.
60. Rogers, S., D. N. Slater, et al. (1992). "Cutaneous xanthogranulomatous inflammation: a potential indicator of internal disease." *Br J Dermatol* 123: 290-293.
61. Cozzuto, C. and A. Carbone (1988). "The xanthogranulomatous process. Xanthogranulomatous inflammation." *Pathol Res Pract.* 183(4): 395-402.
62. Cline, M. J. (1994). "Histiocytes and Histiocytosis." *Blood.* 84(9): 2840-2853.
63. Doina, I., A. Neto, et al. (2003). "Erdheim-Chester Disease." *Arch Pathol Lab Med.* 127: e337-e339.
64. Sangüeza, O. P., J. K. Salmon, et al. (1995). "Juvenile xanthogranuloma: A clinical, histopathologic and immunohistochemical study." *Journal of Cutaneous Pathology.* 22(4): 327-335.

65. Crowson (2002). "Clear cell atypical fibroxanthoma: a clinicopathologic study." *Journal of Cutaneous Pathology*. 29: 374–381.
66. Laforga, J. B. M. (2003). "Foamy macrophages in pylorocardiac gastric carcinoma: a source of confusion with signet ring cell carcinoma." *Histopathology*. 43: 94-100.
67. Delahunt, B. and J. N. Eble (1997). "Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures." *Cancer*. 80: 987-989.
68. Masachika Fujiwara, Miwa Horiguchi, et al. (2005). "Histiocytoid Breast Carcinoma: Solid Variant Of Invasive Lobular Carcinoma With Decreased Expression Of Both E-Cadherin And CD44 Epithelial Variant." *Pathology International*. 55: 353–359.
69. Benjamin, E., S. Wells, et al. (1982). "Malignant Fibrous Histiocytomas Of Salivary Glands." *J Clin Pathol*. 35: 946-953.
70. Welsh, O., M. C. Salinas, et al. (1994). *Mycetoma. Infectious Diseases A treatise of Infectious Processes*. P. D. Hoepflich, M. C. Jordan and A. R. Ronald. Philadelphia, J.B. Lippincott Company.
71. Rippon, J. W. (1982). *The Pathogenic fungi and actinomycetes. Mycetoma Medical Mycology*. Philadelphia., The W.B. Saunders Co.
72. Hay, R. I., E. s. Mahgoub, et al. (1992). "Mycetoma." *J Med Vet Mycol*. 1: 41-49.

73. Nocard, M. E. (1988.). "Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe le nom de forcing." *Ann Inst Pasteur*.
74. Trevisan, V. (1889). "Igeneri ele specie de ile battierlancee Milano: Zanabon and Gabazzi." In *Bull Bacteriol Nomend Taxon*. 2: 13-14.
75. Blancard, R. (1896.). *Parasitis vegetoux al exdosion des bacteries. Traite de pathologie generale*. B. Bpuchard. Paris, Massan, G. 2: 811-932.
76. Yassin, A. F. and K. P. Schaal (2005). "Reclassification of *Nocardia corynebacterioides* as *Rhodococcus corynebacterioides* comb." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1345–1348.
77. Schaal, K. P. and B. L. Beaman (1983). Clinical significance of actinomycetes. *The Biology of the Actinomycetes*. M. Goodfellow, M. Mordarski and S. Williams. New York, Academic Press.
78. Sandoval-Trujillo, H. (1993). *Actinomicetos*, Universidad Autónoma Metropolitana.
79. Alshamaony, L., M. Goodfellow, et al. (1976). "Free mycolic acids as a criteria in the classification of *Nocardia* and *Rhodocroux* complex." *J Gen Microbiol*. 92: 188-199.
80. López, M. R., T. R. Méndez, et al. (1992). " Epidemiología del micetoma en México: 2105 casos." *Gaceta Médica México*. 128: 177-181.
81. Beaman, D. L., M. A. Saubolle, et al. (1995). *Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oerskovia and other aerobic*

- actinomycetes of medical importance. Manual of clinical microbiology. P. R. Murray. Washington, D.C., ASM Press.
82. Welsh, O. (1991). "Mycetoma current concepts in treatment." *Int. J. Dermatol.* 30: 387-398.
 83. Mahgoub, E. S. and I. G. Murray (1973). *Mycetoma*. London, William Hernemann.
 84. Uzcategui, M. (2004.). Aislamiento de bacterias del género *Nocardia* a partir de suelos de la región norte de Nuevo León. Monterrey, N.L., Universidad Autónoma de Nuevo León. Maestria.
 85. González-Ochoa, A. (1962). "Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*; with a note on the isolation of the causative organism from soil." *Lab. Invest.* 11: 1118-1123.
 86. Uesaka, I., K. Oiwa, et al. (1971). "Studies on the pathogenicity of *Nocardia* isolates for mice." *Jpn. J. Exp. Med.* 41: 443-457.
 87. Folb, P. I., R. Jaffe, et al. (1976). "*Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice." *Infect. Immun.* 13 (5): 1490-1496.
 88. Zlotnik, H. and H. R. Buckley (1980). "Production of actinomycetoma in BALB/c mice." *Infect. Immun.* 29: 1141-1145.
 89. Salinas-Carmona, M. C., E. Torres Lopez, et al. (1999). "Immune Response To *Nocardia brasiliensis* Antigens In An Experimental Model Of Actinomycetoma In Balb/C Mice." *Infection And Immunity.* 67(5): 2428-2432.

90. Salinas-Carmona, M. C. (2000). "Nocardia brasiliensis: from microbe to human and experimental infections." *Microbes and Infection*. 2: 1373-1381.
91. Solís-Soto, J. M., L. E. Quintanilla-Rodríguez, et al. (2008). "In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*." *Histol Histopathol*. 23: 573-581.
92. Weibel, E. R. (1979). *Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry*. London, Academic Press. Vol. 1.
93. Ravetch, J. V. (1994.). "Fc Receptors: rubor redux." *Cell*. 78: 553-560.
94. Sneller, M. C. "Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis." *Cleveland Clinic J of Medicine*. 69(Suppl. II.): 40-43.
95. Romagnani, S. (2000). "T-cell subsets (Th1 versus Th2)." *Ann Allergy Asthma Immunol*. 85: 9-18.
96. Griffin, E. E., J. C. Ullery, et al. (2006). "Aggregated LDL and lipid dispersions induce lysosomal cholesteryl ester accumulation in macrophage foam cells." *J of lipid research*. 47: 1-47.
97. Kruth, H. (2002). "Sequestration of aggregated low density lipoproteins by macrophages." *Curr Opin in Lipidol*. 13: 483-488.
98. Guyton, J. and K. Klemp (1988). "Ultrastructural discrimination of lipid droplets and vesicles in atherosclerosis: value of

- osmium-thiocarbohydrazide-osmium and tannic acid paraphenylenediamine techniques." *J Histochem Cytochem.* 36: 1319-1328.
99. Jerome, W. G. and J. C. Lewis (1985). "Early atherogenesis in White Carneau pigeons II Ultrastructural and cytochemical observations." *Am J Pathol.*(119): 210-222.
100. Jerome, W., C. Cash, et al. (1998). "Lysosomal lipid accumulation from oxidized low density lipoprotein is correlated with hypertrophy of the Golgi apparatus and trans Golgi network." *J Lipid Res.* 39: 1362-1371.
101. Sakashita, N. (2003). "(ACAT2) Is Induced in Monocyte-Derived Macrophages: In Vivo and In Vitro Studies." *Laboratory Investigation.* 83(11): 1569.
102. Akishima, Y. (2005). "Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development." *Modern Pathology.* 18: 365-373.
103. Min Wen (2002). "Renal Injury in Apolipoprotein E-Deficient Mice." *Laboratory Investigation.* 82(8): 999.
104. Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature.* 420: 19-26.
105. Saunders, B. M. and A. M. Cooper (2000). "Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections." *Immunol Cell Biol.* 78: 334-341.

106. Orme, I. M. and A. M. Cooper (1999). "Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis." *Immunol Today*. 20: 307–312.
107. Mielke, M. E., C. Peters, et al. (1997). "Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis." *Immunol Rev* 158: 79–93.
108. Yamamura, M., K. Uyemura, et al. (1991). "Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions." *Science*. 254: 277–279.
109. Cooper, A. M., J. Magram, et al. (1997). "Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *J Exp Med*. 186: 39–45.
110. Doherty, T. M. and A. Sher (1998). "IL-12 promotes drug-induced clearance of *Mycobacterium avium* infection in mice." *J Immunol* 160: 5428–5435.
111. Wakeham, J., J. Wang, et al. (1998). "Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin in IL-12-deficient mice." *J Immunol*. 160: 6101–6111.
112. Koga, T., H. Duan, et al. (2001). "Immunohistochemical localization of activated and mature CD83 dendritic cells in granulomas of sporotrichosis." *Eur J Dermatol*. 11: 527–529.
113. Iyonaga, K., K. M. McCarthy, et al. (2002). "Dendritic cells and the regulation of a granulomatous immune response in the lung." *Am J Respir Cell Mol Biol*. 26: 671–679.

114. Uehira K, A. R., Ito T, Tajima K, Naitoh S, Ozaki Y, Shimizu T, Yamaguchi K, Uemura Y, Kitajima H, Yonezu S, Fukuhara S (2002). "Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis." *Clin Immunol.* 105: 296–303.
115. Tsuchiya, T., K. Chida, et al. (2002). "Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by bacillus Calmette-Guerin in rats." *Am J Respir Crit Care Med.* 165: 1640–1646.
116. Pagliari, C. and M. N. Sotto (2003). "Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions." *Am J Dermatopathol.* 25: 107–112.
117. Ordway, D., M. Henao-Tamayo, et al. (2005). "Foamy Macrophages within Lung Granulomas of Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis* Express Molecules Characteristic of Dendritic Cells and Antiapoptotic Markers of the TNF Receptor- Associated Factor Family." *The Journal of Immunology.* 175: 3873–3881.
118. Jiao, X., R. Lo-Man, et al. (2002). "Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity." *J. Immunol.* 168: 1294–1301.
119. Bodnar, K. A., N. V. Serbina, et al. (2001). "Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells." *Infect. Immun.* 69: 800–809.
120. Tailleux, L., O. Neyrolles, et al. (2003). "Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells." *J. Immunol.* 170: 1939–1948.
121. Alaniz, R. C., S. Sandall, et al. (2004). "Increased dendritic cell numbers impair protective immunity to intracellular bacteria

- despite augmenting antigen-specific CD8_T lymphocyte responses." *J. Immunol.* 172: 3725–3735.
122. Rhoades, E., A. Frank, et al. (1997). "Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*." *Tuber. Lung Dis.* 78: 57–66.
123. Gonzalez-Juarrero, M. and I. Orme (2001). "Characterization of Murine Lung Dendritic Cells Infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun.* 69(2): 1127–1133.
124. Dannenberg, A. M. and G. S. W. Rook (1994). Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune response-dual mechanisms that control bacillary multiplication. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. A. Press. Washington, D.C., A.S.M. Press.
125. Rich, A. R. (1951). *The Pathogenesis of Tuberculosis: The Factors Responsible for the Characteristics of Tuberculous Lesions and Symptoms*. Springfield, Charles C. Thomas.
126. Gonzalez-Juarrero, M., T. S. Shim, et al. (2003). "Dynamics of Macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis." *J. Immunol.* 171: 3128-3135.
127. Jiang, W., W. J. Swiggard, et al. (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." *Nature* 375: 151–155.
128. Higgins, D. M., J. Sanchez-Campillo, et al. (2008). "Relative Levels of M-CSF and GM-CSF Influence the Specific Generation of Macrophage Populations during Infection with

Mycobacterium tuberculosis." The Journal of Immunology.
180: 4892–4900.

129. Bo-Chin, C. (2004). "The Innate Pulmonary Granuloma:
Characterization and Demonstration of Dendritic Cell
Recruitment and Function." Am J Pathol. 164: 1021–1030.

APENDICE

APENDICE

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Juan Carlos Segoviano Ramírez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología

Tesis: CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS CELULAS
ESPUMOSAS EN EL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL DE
RATONES BALB/c

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en León, Guanajuato el 28 de Noviembre
de 1969, hijo de Cecilia Ramírez Ramírez y Domingo Segoviano
Lara

Educación: Egresado de la Universidad de Guanajuato, con el grado de
Médico Cirujano en 1995.

Experiencia Profesional: Profesor de Ordinario de carrera Asociado Nivel
C de la Universidad Autonoma de Baja California desde Enero de
2000, Maestro de Asignatura de la Universidad de Monterrey desde
Enero de 2008.