

11261
2
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES HUMANAS EN EL
MICETOMA EXPERIMENTAL Y SOBRE EL DESARROLLO
"IN VITRO" DE *Nocardia brasiliensis*

Trabajo realizado por

Francisca HERNANDEZ HERNANDEZ

en el laboratorio de Micología Médica

bajo la asesoría del **Dr. Rubén LOPEZ MARTINEZ**

para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

(MICOLOGIA MEDICA)

México, 1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes siempre me han manifestado su cariño y comprensión durante el desarrollo de mis actividades académicas.

A mis hermanos y sus esposas, quienes me han expresado todo su apoyo a las decisiones que he emprendido.

Especialmente a mis sobrinos, a quienes deseo logren el pleno desarrollo de sus capacidades intelectuales para el beneficio de sí mismos, de su familia y de nuestro país, y que en el futuro superen con mucho este humilde trabajo que hoy presento.

México, 1994.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén LOPEZ MARTINEZ:

Por haberme dado la oportunidad de continuar mi desarrollo académico y docente en su laboratorio.

Por sus consejos siempre coronados de sabiduría y encaminados al buen desarrollo de este trabajo.

Por la amistad que me ha brindado, siempre inmersa en sentimientos nobles, y que ha enriquecido esta etapa de mi vida en la Universidad.

A mis compañeros y amigos:

Elva, Claudia, Rafael, Paty, Javier, Rocío, por su valiosa colaboración en algunas etapas de este trabajo y la amistad que me han expresado durante mi estancia en el laboratorio.

A Gloria Bazan y Gaby:

Por su apoyo y contribución en la realización del análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A mis sinodales:

Dr. M. A. CERBON, Dra. Teresa F. MIER, Dr. Rubén ALVAREZ y Dr. L. J. MENDEZ-TOVAR, por la revisión del manuscrito original de este trabajo y sus invaluable y acertadas observaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT):

Por la beca-crédito que me otorgó durante mis estudios e hizo posible la culminación de este trabajo.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. Generalidades sobre el micetoma	1
1.1.1. Antecedentes históricos	1
1.1.2. Concepto	2
1.1.3. Etiología	2
1.1.4. Topografía	5
1.1.5. Distribución geográfica	5
1.1.6. Distribución por edad, sexo y ocupación	6
1.1.7. Fisiopatogenia u manifestaciones clínicas	7
1.1.8. Diagnóstico	8
1.2. Generalidades sobre <i>Nocardia brasiliensis</i>	9
1.3. Generalidades sobre hormonas en mamíferos	13
1.4. Conceptos generales sobre tres hormonas sexuales humanas: estradiol, progesterona y testosterona	16
1.4.1. Estradiol	16
1.4.2. Progesterona	16
1.4.3. Testosterona	17
1.5. Algunos estudios sobre hormonas en diferentes hongos	17
2. ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4. HIPOTESIS	24
5. OBJETIVOS	25

6.	MATERIAL	26
6.1.	Cepas	26
6.2.	Animales	26
6.3.	Hormonas	26
6.4.	Material de laboratorio	26
6.5.	Medios de cultivo	27
6.6.	Reactivos	27
6.7.	Equipo	27
7.	METODOLOGIA	28
7.1.	Selección de las cepas de <i>N. brasiliensis</i>	29
7.2.	Preparación del inóculo de <i>N. brasiliensis</i>	29
7.3.	Experimentos "in vitro"	30
7.3.1.	Crecimiento radial de la colonia de <i>N. brasiliensis</i> en presencia de hormonas sexuales	30
7.3.1.1.	Preparación de las soluciones de hormonas	30
7.3.1.2.	Preparación del agar Sabouraud adicionado de las diferentes hormonas	30
7.3.1.3.	Depósito del inóculo en el agar Sabouraud	31
7.3.1.4.	Medición del crecimiento radial de la colonia de <i>N. brasiliensis</i>	31
7.3.2.	Consumo de glucosa de <i>N. brasiliensis</i> en presencia de hormonas sexuales	32
7.3.2.1.	Preparación del medio líquido Sabouraud adicionado de hormonas	32
7.3.2.2.	Medición del consumo de glucosa	33
7.4.	Experimentos "in vivo"	33

7.4.1.	Preparación de las soluciones de hormonas	33
7.4.2.	Producción del micetoma y aplicación de hormonas	34
7.4.3.	Estudio histopatológico	36
7.4.4.	Retrocultivo	36
8.	RESULTADOS	41
8.1.	Experimentos "in vitro"	41
8.1.1.	Observaciones generales	41
8.1.2.	Crecimiento radial de la colonia de <i>N. brasiliensis</i> en presencia de hormonas sexuales	43
8.1.3.	Consumo de glucosa de <i>N. brasiliensis</i> en presencia de hormonas sexuales	49
8.2.	Experimentos "in vivo"	53
8.2.1.	Producción del micetoma y medición del diámetro de la almohadilla plantar	53
8.2.2.	Estudio histopatológico	55
8.2.3.	Retrocultivo	56
9.	DISCUSION	62
10.	CONCLUSIONES	68
11.	PERSPECTIVAS	69
12.	BIBLIOGRAFIA	70

EFECTO DE HORMONAS SEXUALES HUMANAS EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL Y SOBRE EL DESARROLLO "IN VITRO" DE *Nocardia brasiliensis*

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades sobre el micetoma

1.1.1 Antecedentes históricos

El micetoma es un padecimiento cuyos primeras observaciones provienen de la India, y fué en ese país donde Gill, en 1842, lo describió por primera vez como entidad clínica (citado por 65).

Colebrook, en 1846, confirmó la existencia del padecimiento y lo denominó "pie de Madura" (citado en 51).

En 1860, Van Dyke Carter utilizó por primera vez el término "micetoma", una vez identificada la etiología fúngica de la enfermedad. Este mismo autor en 1874 (16) publicó una amplia monografía del micetoma, revisando los primeros casos observados en la India.

Posteriormente Kantjack en 1892 (34), y Vincent en 1894, hicieron descripciones adicionales del padecimiento, incluyendo datos sobre la existencia de muchos colores y tipos de granos, mencionando que diversos "mohos" eran capaces de producir la enfermedad.

Fué Vincent en 1894 (79) quien por primera vez aisló un actinomycete de un caso de micetoma y al cual denominó *Streptothrix madurae*.

En 1893, Boccardo (8) hizo una revisión de 100 casos de micetoma en la India.

Los trabajos de Brumpt (12), Laveran (42) y Pinoy (61) contribuyeron

al conocimiento sobre los agentes etiológicos.

El primer estudio de micetoma realizado en América del Norte se debe a M'Questin en 1874 (citado en 10), con tres pacientes del estado de Sonora, México. Posteriormente, en 1912, Cicero (17), presentó los primeros casos de micetoma ante la Academia Nacional de Medicina. Ocaranza en 1914, publicó un trabajo cuyo título fué "Micetoma en Sonora" (57).

En las últimas décadas, diversos médicos y microbiólogos han hecho aportaciones notables al conocimiento del micetoma: González Ochoa (28); Abbot (1, 2); Destombes y cols. (21, 22); Segretain y Mariat (71); Baylet y cols. (7); Rey (65); Latapí (40); Lavalle (41); Vanbreuseghem (77); Avram (5), Destombes (19, 20); Mahgoub y Murray (49).

1.1.2 Concepto

Recientemente, los doctores E. S. Mahgoub, F. Mariat, G. Segretain y S. Berrueto, describieron el micetoma con los siguientes términos:

"El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fistulas a través de las cuales se elimina pus y granos constituidos por filamentos. Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o actinomicetales (actinomicetoma)" (72).

1.1.3 Etiología

En la actualidad se han descrito aproximadamente 33 especies causantes de micetoma, integradas por 23 especies de hongos y 9 especies de actinomycetes (bacterias). El micetoma es uno de los pocos procesos

infecciosos que presentan una gran diversidad etiológica; esta diversidad resalta la importancia de este padecimiento en el grupo de individuos expuestos y susceptibles, ya que la mayoría de los agentes involucrados tienen un extenso hábitat y una distribución cosmopolita. La diversidad etiológica se manifiesta en la lista siguiente (Tomada y modificada de 66).

Agentes causales de actinomicetoma:

Nocardia brasiliensis

Nocardia otitidis cavium (*caviae*)

Nocardia asteroides

Nocardia farcinica

Nocardia transvalensis

Nocardiosis dasonvillei

Actinomadura madurae

Actinomadura pelletieri

Streptomyces somaliensis

Agentes causales de eumicetoma:

Madurella mycetomatis

Madurella grisea

Leptosphaeria senegalensis

Leptosphaeria tompkinsii

Scedosporium apiospermum

Cephalosporium sp
Pyrenochaeta romeroi
Pyrenochaeta mackinnonii
Cephalosporium falciforme
Fusarium oxisporum
Fusarium moniliforme
Fusarium solani
Neotestudina rosatii
Acremonium killiense
Acremonium recifei
Phaeoannellomyces jeanselmei
Curvularia geniculata
Curvularia lunata
Cochliobolus spicifer
Aspergillus nidulans
Corynespora cassicola
Plenodomus avramii
Pseudochaetosphaeronema larense
Exserohilum (Dreschlera) rostrata

Todas estas especies habitan en el suelo, son saprófitas o patógenas de plantas, o colonizan vegetales en descomposición y son abundantes en estos materiales. En consecuencia, la gente que labora o manipula estos materiales, en asociación con traumatismos o microtraumatismos que causen ruptura de la piel, tiene mayor predisposición a albergar cualquiera de estos microorganismos y estará en posibilidad de desarrollar un micetoma.

La distribución de estos microorganismos es cosmopolita; sin embargo, cuando se encuentran como agentes de micetoma, algunos de ellos predominan en regiones específicas. Así, los cuatro agentes mas frecuentes causantes de actinomictoma son *A. madurae*, *N. brasiliensis*, *A. pelletieri* y *S. somaliensis*. Los principales agentes de eumictoma son *M. mycetomatis*, *M. grisea*, *Sc. apiospermum*, *L. senegalensis*, *Acremonium* sp y *P. romeroi*.

En México, como en muchos otros países latinoamericanos, la mayoría de casos de micetoma son producidos por Actinomyces, de los cuales el principal agente etiológico es *N. brasiliensis*, seguido de *A. madurae*, *S. somaliensis* y *A. pelletieri*. De los casos de eumictoma, los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *M. grisea*, *M. mycetomatis* y *Sc. apiospermum* (14, 47).

1.1.4 Topografía

La gran mayoría de casos de micetoma se localiza en las regiones corporales descubiertas, sobre todo en las extremidades inferiores, específicamente el pie y la pierna; le siguen en frecuencia las localizaciones en tronco, cabeza, cuello y mano. (33). En menor número, se han publicado casos localizados en otras regiones corporales como cara y glándula mamaria (55, 58, 60), e incluso casos diseminados (37, 38, 74, 80) en pacientes que presentan algún factor de inmunosupresión. En el area rural, la localización en pie se atribuye a la falta de uso de calzado del campesino y al traumatismo repetitivo con material contaminado con los agentes causales implicados.

1.1.5 Distribución geográfica

La distribución de casos de micetoma en el mundo está muy relacionada

con diversas condiciones, como son el clima (latitud, temperatura, humedad y precipitación pluvial), la vegetación prevalente (árboles espinosos, malezas) y las características de la población susceptible (edad, sexo y ocupación). Los principales países endémicos son África del Norte, India y Pakistán, Indonesia, México, algunas partes de América Central y del Sur. Sudán es el país que tiene el mayor número de micetomas a nivel mundial (2); México le sigue en frecuencia. De acuerdo a un trabajo presentado por Lavalle (72), estas regiones altamente endémicas, Sudán y México, comparten características geográficas y climáticas interesantes: se encuentran localizadas entre los 14 y 33 grados de latitud norte; están atravesados por el trópico de cáncer; tienen una época lluviosa de julio a octubre, una época seca y fría de octubre a marzo, y una época seca y caliente de marzo a junio. La precipitación pluvial oscila entre 50 y 500 mm. Los dos agentes etiológicos predominantes reportados en ambas regiones son *N. brasiliensis* y *A. madurae* (14, 47, 66).

En México, los estados con mayor frecuencia del padecimiento son Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Morelos, Guerrero y Veracruz (47).

1.1.6 Distribución por edad, sexo y ocupación

La gran mayoría de los individuos que presentan micetoma se encuentra entre los 16 y 50 años, es decir, individuos que se encuentran en plena productividad laboral. Existen casos de este padecimiento en personas que se encuentran en los extremos de la vida.

Todos los estudios realizados sobre la epidemiología del micetoma coinciden en que el hombre es más frecuentemente afectado que la mujer (14, 22, 33, 39, 40, 41, 47, 48, 51, 59, 76). Algunos han atribuido esta diferencia a la mayor actividad del hombre en las labores del campo, y que por lo tanto

se expone con mayor frecuencia a los traumatismos con objetos o material contaminado con los microorganismos causales. Sin embargo, otros autores fundamentan con sus observaciones el criterio de que en muchas regiones endémicas la mujer participa igualmente en las labores del campo sin modificar significativamente la frecuencia de micetoma entre hombre y mujer. Esta participación activa de la mujer campesina es común en el campo mexicano.

Igualmente, los autores de estudios epidemiológicos coinciden en que el sector campesino es el más afectado; le siguen las esposas de campesinos, u otras mujeres que viven en el area rural, obreros y estudiantes.

1.1.7 Fisiopatogenia y manifestaciones clínicas

En 1967, González-Ochoa (29) describió la fisiopatogenia y cuadro clínico del micetoma de la manera siguiente:

"Una vez que el agente etiológico del micetoma actinomicético por aerobios o del maduromicósico penetra en los tejidos, a través de una solución de continuidad de la piel o vehiculizado por algún cuerpo extraño, ocasiona una lesión mínima que perdura quiescente por un tiempo mas o menos prolongado. Los filamentos del hongo, alojados en este medio hostil que son los tejidos, lentamente se multiplican y desarrollan, emitiendo más y más ramificaciones. El micelio se ve constreñido por las células tisulares, obligándole a apelonarse y formar los granos, en un principio sin mazas o clavaz; posteriormente, alrededor de los filamentos de la periferia se depositan sustancias proteínicas que constituyen las mazas. A medida que el micelio continúa multiplicándose, sensibiliza los tejidos y esto hace que pierdan poder defensivo contra el hongo, y en consecuencia, permitan su multiplicación y extensión; este fenómeno

parece realizarse en forma geométrica, de manera que a mayor número de lesiones mayor sensibilización, y mientras más se sensibiliza el tejido, mayor facilidad para el desarrollo de nuevos focos.

Los infiltrados granulomatosos que están alrededor de los granos terminan en microabscesos, y los cortos trechos de micelio que no pudieron ser destruidos dan origen a nuevos granos. Los microabscesos forman túneles que se comunican entre sí y se extienden radialmente; cuando estos túneles llegan a la superficie, forman los nódulos que se abren por múltiples orificios, los que al fusionarse forman el orificio de la fistula y las ulceraciones. Los trayectos fistulosos se rodean de tejido conjuntivo que, al esclerosarse, producen un acortamiento que trae por consecuencia que los elementos del micetoma: el nódulo, el orificio fistuloso, la ulceración y la costra o cicatriz aparezcan en el centro de una depresión. La misma formación de tejido conjuntivo que rodea los microabscesos y fistulas va constituyendo la tumoración y la dureza características. Esta fibrosis ocasiona un marcado compromiso circulatorio, lo que dificulta el aporte de los fármacos en el tratamiento.

En el hueso se origina una periostitis que produce caries con osteolisis y osteoformación, y al penetrar forma cavidades de hiperostosis, de mayor o menor tamaño que asemeja un panal.

Esta situación patogénica conforma el cuadro del micetoma aunque existen, como en cualquier otro padecimiento, modalidades hasta cierto punto en función de la especie causante, pero manteniendo un cuadro tan monomorfo como no se observa en otras micosis".

1.1.8. Diagnóstico

Zaias y cols. (82) hacen énfasis en la necesidad de la presencia de

tumefacción, fistulas y granos para hacer el diagnóstico de micetoma. El exámen macro y microscópico de los granos solo permite hacer la diferenciación entre actinomicetoma y eucicetoma. Este diagnóstico temprano será de utilidad para iniciar un tratamiento oportuno y adecuado, el cual depende de la etiología bacteriana o fúngica del padecimiento. Para establecer el diagnóstico etiológico de certeza, siempre es necesario realizar cultivos del material biológico en medio Sabouraud, con y sin antibióticos; en ellos se observará el crecimiento de colonias de Actinomycetes o de hongos. Los procedimientos diagnósticos se complementan con un estudio histopatológico para la búsqueda de granos en el tejido infectado; los granos varían en consistencia, color y tamaño, dependiendo del agente etiológico. El estudio radiológico del área afectada será útil para determinar si existe afección ósea.

1.2 Generalidades sobre *Nocardia brasiliensis*

Nocardia brasiliensis es una especie, con mucho la mas frecuentemente aislada de los padecimientos en que el género *Nocardia* está involucrado, específicamente de micetomas y algunos casos de nocardiosis. El género *Nocardia* es el mejor conocido de la familia Nocardiaceae, del orden Actynomicetales. Este género comprende un grupo de bacterias aerobias no móviles. La especie tipo es *N. farcinica*. El género incluye aproximadamente 30 especies, de las cuales las más importantes, desde el punto de vista médico, son *N. brasiliensis*, *N. otitidis-caviarum* y *N. asteroides*.

Microscópicamente el género *Nocardia* se caracteriza por presentar filamentos finos, muy ramificados, con un diámetro de 0.7-0.8 μm . En los cultivos viejos, los filamentos se fragmentan y se observan predominantemente bastoncillos, formas cocoides, esporas y formas degenerativas. Estos

microorganismos son Gram-positivos y débilmente ácido-alcohol resistentes. En medio de cultivo fresco, las formas cocoides se transforman en micelio. En medio de cultivo sólido, se desarrollan colonias de superficie lisa, plegada o rugosa, con una fina cubierta de filamentos aéreos cortos; tienen una consistencia pastosa y un aspecto ceráceo o pulverulento; son de color amarillo, naranja, o blanquecino. La temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 30°C.

La reproducción se lleva a cabo por fisión, y rara vez por formación de esporas especiales. El ciclo total de desarrollo dura desde un día hasta tres o más semanas, dependiendo de la especie.

Los Actinomicetales se encuentran en abundancia en el suelo, en aguas dulces, en residuos de plantas, en productos alimenticios o en materia orgánica en descomposición. En el **Cuadro I** están representados los géneros de Actinomycetes que con mayor frecuencia producen patologías en el humano.

La diferenciación de las especies patógenas de *Nocardia* se lleva a cabo por medio de pruebas bioquímicas especiales a partir de los aislamientos de fuentes naturales o de cultivos de especímenes de una lesión. Las pruebas más empleadas son: hidrólisis de la caseína; degradación de la hipoxantina, de la tirosina y de la xantina; utilización de carbohidratos; degradación y crecimiento en gelatina. *N. brasiliensis* se diferencia de las otras especies porque degrada la caseína, la tirosina y la xantina, y crece en gelatina diluída (9).

Las pruebas de diferenciación de especies actualmente se basa en la determinación de los componentes polisacarídicos de la pared celular. De acuerdo a la composición química de la pared celular, los actinomicetos se han clasificado en seis tipos. El género *Nocardia* corresponde al Tipo IV, caracterizado por la presencia de meso-DAP (ácido diaminopimélico), arabinosa y galactosa. (Tomado y modificado de 69)

CUADRO I.
CLASIFICACION TAXONOMICA DE LOS ACTINOMYCETES MAS
FRECIENTES PATOGENOS PARA EL HOMBRE

Super-Reino: Procariota

Reino: Monera

Phylum: Schizomycota

Clase: Eubacter

Orden: Actinomycetales

Familias:

Aerobios

Micropolysporaceae

Dermatophilaceae

Frankiaceae

Nocardiaceae

Géneros:

Micropolyspora

Saccharopolyspora

Dermatophilus

Frankia

Causerina

Alnus

Myrica

Nocardia

Rhodococcus

Mycobacterium

Corynebacterium

Thermomonosporaceae *Nocardiosis*
 Thermomonospora
 Saccharomonospora

Maduromycetaceae *Actinomadura*
 Microbispora
 Microtetraspora

Streptomycetaceae *Streptomyces*
 Nocardioides

Anaerobios

Actinomycetaceae *Actinomyces*
 Rothia
 Arachmia
 Oerskovia
 Bifidobacterium

Tomado y modificado de: **Goodfellow M.**, (1989). Supragenetic classification of actinomycetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, Williams S T, Sharpe, M E & Holt, J G, pp2333-2339. Baltimore; Williams & Wilkins.

1.3 Generalidades sobre hormonas en mamíferos

Una hormona es un mediador químico secretado por células endócrinas especializadas, de donde será liberada a la corriente sanguínea, para ser transportada hasta las células en las cuales ejercerá múltiples efectos. Las células endócrinas, junto con las células nerviosas, coordinan diversas las diversas actividades celulares en los organismos superiores. Ambos tipos de células están especializadas para diferentes tipos de señalización química intercelular (4).

La función hormonal incluye cuatro grandes dominios: reproducción, crecimiento y desarrollo, conservación del ambiente interno, y producción, utilización y almacenamiento de energía.

Desde el punto de vista químico, las hormonas se clasifican en dos grandes categorías: péptidos o derivados de aminoácidos (como la hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica) y esteroides, derivados del colesterol, que son de dos tipos: aquellos que conservan el núcleo esteroideo intacto (como los esteroides suprarrenales y los esteroides gonadales) y aquellos en que el anillo B del esteroide ha sido roto (como la vitamina D y sus diversos metabolitos).

Sin importar la estructura química, todas las hormonas comparten varias características: primero, todas tienen un tejido blanco; segundo, están presentes en la circulación en bajas concentraciones; tercero, debido a que están presentes en bajas concentraciones, deben dirigirse a los sitios de acción por mecanismos específicos (por ejemplo, por intermediación de receptores, por distribución directa en una circulación restringida, por difusión directa a sitios adyacentes,

o por formación local de hormonas en un tejido a partir de precursores circulantes).

Las hormonas peptídicas se sintetizan por las mismas vías bioquímicas que otras proteínas, y posteriormente son procesadas por fragmentación y/o modificación química para formar las moléculas activas. Las hormonas esteroideas se sintetizan por modificación de la molécula madre, el colesterol, a través de la ruptura secuencial de enlaces carbono-carbono e hidroxilación.

La cantidad de hormona liberada está determinada por la cantidad sintetizada, y ambas están en función de la concentración tisular y/o sanguínea. La regla general es la síntesis continua y el recambio constante de hormona. Por lo tanto, la característica distintiva de los sistemas endócrinos es el control de la producción hormonal por retroalimentación.

Las hormonas solubles en agua son transportadas en solución en el plasma, y no requieren de mecanismos de transporte específicos. Las hormonas insolubles en agua requieren de mecanismos acarreadores, principalmente proteínas de transporte. Estas son de dos tipos: moléculas de transporte general (albúmina y pro-albúmina) y moléculas de transporte específico (globulinas).

Aún no se conoce el mecanismo exacto de transporte de las hormonas a través de las membranas celulares. En el caso de las hormonas peptídicas que se unen a receptores de superficie celular, el complejo hormona-receptor puede internalizarse por endocitosis. Este mecanismo es activo en sentido estricto, ya que requiere de energía, pero como no se ha demostrado que ocurra en contra de un gradiente de concentración, no se considera transporte activo en el sentido clásico. En el caso de las hormonas con receptores citosólicos, se ha sugerido que las hormonas unidas a proteínas de transporte pueden transportarse

selectivamente a través de las membranas de algunas células, pero la mayor parte de evidencias sugiere que la hormona libre difunde pasivamente a través de las membranas. La presencia de proteínas intracelulares que fijan hormonas tienden a mantener la concentración baja intracelular de hormona libre y por lo tanto favorecen el proceso de difusión.

En las células blanco (células sensibles a la hormona), el esteroide se fija a macromoléculas llamadas receptores. Estos son moléculas proteicas relativamente grandes que tienen sitios de fijación específicos para la hormona y se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula. La fijación del esteroide a su receptor da como resultado la formación de un complejo receptor-esteroide "activado o transformado" que tiene una afinidad por diversos sitios de fijación nuclear. Se cree que esta fijación nuclear altera la expresión genética. Presumiblemente, estos sitios aceptores están localizados o cercanos a secuencias de DNA cuya transcripción está inducida por la hormona, aunque también son posibles efectos en cascada a partir de segundos sitios. Los eventos biosintéticos que resultan de las interacciones receptor-esteroide incluyen la transcripción, procesamiento y traducción del precursor de mRNA en proteínas específicas que alteran la función, el crecimiento o diferenciación celular.

Una vez que el complejo receptor-esteroide ha interactuado con sitios aceptores, sufre reacciones que resultan en el reestablecimiento de receptores no ocupados (reciclaje) y la eliminación del esteroide de la célula. El esteroide puede ser metabolizado a un derivado que no puede unirse estrechamente al receptor y por lo tanto difunde fuera de la célula. (81)

1.4 Conceptos generales sobre tres hormonas sexuales de mamíferos: estradiol, progesterona y testosterona.

1.4.1 Estradiol

Los tres estrógenos principales de la especie humana son el 17 beta-estradiol, la estrona y el estriol. Los principales sitios productores son el ovario y, durante el embarazo, la placenta. Se cree que la testosterona y probablemente la androstenediona son los precursores inmediatos. Son los agentes mas importantes para determinar los cambios físicos y fisiológicos que ocurren en la pubertad de las niñas y dan todas sus características femeninas.

Una cantidad de estrógenos que llega al hígado se excreta con la bilis, para ser reabsorbida en el intestino y llevada nuevamente al hígado por la vena porta. En el hígado se degradan a estrógenos menos activos, se oxidan a sustancias no estrogénicas o se conjugan con los ácidos sulfúrico o glucorónico. Otra cantidad se excreta por la orina en forma de glucorónidos y sulfatos de estradiol, estrona y estriol. (31)

1.4.2 Progesterona

Los principales sitios productores son las células de la granulosa y posteriormente, en abundancia, en el cuerpo lúteo del ovario y la placenta. Sus principales efectos biológicos son a nivel de útero (conversión del endometrio de proliferativo a secretor y disminución de la actividad miometrial) y de glándula mamaria (crecimiento lobuloalveolar); también actúa como antagonista de la aldosterona a nivel de túbulo renal.

El producto metabólico es el pregnano-3 alfa, 20 alfadíol, que se excreta en orina conjugado con ácido glucorónico. (31)

1.4.3 Testosterona

Los sitios mas importantes de producción en el hombre son las células de Leydig en el testículo y corteza suprarrenal, aunque en la mujer también se producen pequeñas cantidades en el cuerpo lúteo del ovario y en la corteza suprarrenal. Se sintetizan a partir de estructuras químicas simples como el acetato o a partir de estructuras esteroideas. En general los andrógenos son los responsables de los cambios físicos y fisiológicos que sufre el niño para convertirse en hombre adulto. El hígado es el principal sitio de degradación dando como productos metabólicos la androsterona débilmente andrógena y la etiololanolona que se excretan en la orina en gran parte como sulfatos y glucorónidos. (31)

1.5 Algunos estudios sobre hormonas en diferentes hongos

Hay evidencias de que los elementos bioquímicos que habitualmente se asocian con la acción hormonal (como receptores y vías efectoras) en los organismos superiores, también se encuentran en organismos unicelulares a pesar de la ausencia de unidades anatómicas que asocien un sistema endócrino o un sistema neuroendócrino, como glándulas, nervios, sistema circulatorio y células blanco bien diferenciadas.

Ejemplo de lo anterior es el anteridiol, un esteroide secretado por las cepas femeninas de *Achlia bisexualis* y *A. ambisexualis* (hongos acuáticos de la clase Plasmodiophoromycetes, subdivisión Haplomastigomycotina). Esta hormona actúa sobre las cepas masculinas de *A. ambisexualis* para iniciar la formación de ramas anteridiales y de éstas se desencadena una respuesta quimiotrópica. Solamente las ramas anteridiales pueden producir anteridios y solamente el anteridiol puede iniciar las ramas anteridiales. También estimula a la cepa

masculina para secretar la hormona que induce la formación de órganos sexuales en la cepa femenina. (6, 30)

Los ácidos trispóricos B y C son ácidos carboxílicos C18 secretados por *Blakeslea trispora* (hongo acuático con gametos móviles, perteneciente a la clase de los Zygomycetes, subdivision Zygomycotina). Cada uno estimula la síntesis de caroteno en la hifa de la cepa *minor* (femenina) y cada uno induce la formación de progametangios en las cepas *major* (masculina) y *minor* de *Mucor mucedo*. (6, 30)

La sirenina es un sesquiterpeno secretado por los gametos femeninos de *Allomyces* (perteneciente a la clase Chytridiomycetes, Subdivisión Haplomastigomycotina) y actúa atrayendo los gametos masculinos. (6, 30)

En *Neurospora crassa* y *Aspergillus fumigatus* se han encontrado sustancias inmunológica y biológicamente similares a la insulina (43).

En *Fusarium* sp se ha demostrado la producción de moléculas semejantes a las estrogénicas que tienen la capacidad de unirse a un receptor estrogénico de mamífero (35).

En *Candida albicans* se ha demostrado una proteína que fija la corticosterona y la progesterona (44, 45), y en *Saccharomyces cerevisiae* se ha puesto en evidencia una proteína que se une selectivamente a estrógenos (27).

Dentro del grupo de hongos altamente patógenos para el hombre se han hecho algunos estudios y se ha observado que las hormonas sexuales humanas juegan un papel importante en el ciclo biológico de estos parásitos, y por lo tanto, en el curso clínico de la enfermedad que desencadenan. En *Coccidioides immitis* se encontró que la progesterona y la testosterona estimulan su crecimiento, y que el estradiol estimula fuertemente la maduración de

artroconidios (fase infectante) y de endosporas (estructuras contenidas y liberadas por las esférulas que representan la fase parasitaria). Estos fenómenos probablemente expliquen en parte la elevada tendencia de las mujeres embarazadas y de los hombres a sufrir la diseminación de la infección (24, 62).

En el caso de *Paracoccidioides brasiliensis*, se demostró que este hongo contiene una proteína que fija estrógenos, y que ésta unión inhibe la transformación de la fase micelial (conidio) a la fase parasitaria (levadura), hecho que explicaría la resistencia de las mujeres a la infección. (64, 68).

Se han realizado estudios interesantes acerca del efecto hormonal en otros microorganismos como los agentes de eumicetoma, en donde se encontró que la progesterona reduce el desarrollo de *M. mycetomatus* y de *P. romeroi* (54); en *C. neoformans*, cuyos resultados demuestran que el estradiol inhibe el crecimiento "in vitro" de esta levadura (56). En las dermatofitosis no hay una relación notable entre su incidencia y el dimorfismo sexual humano; sin embargo, también se han hecho importantes estudios sobre el efecto hormonal en dermatofitos (11, 18).

Además de los estudios relacionados con hormonas en microorganismos eucariotes, también existen algunos que han sido realizados en procariotes. Por ejemplo, en *Streptomyces hydrogenans* se ha purificado y caracterizado una proteína que tiene la capacidad de fijar la progesterona (25).

Aunque son diversos los estudios dirigidos a la búsqueda de receptores hormonales en microorganismos eucariotes o procariotes, en muchos no se ha podido determinar el papel exacto que juegan en la célula. Sin embargo, aparentemente la presencia de sistemas hormona-receptor apareció en etapas muy tempranas de la escala evolutiva y se han conservado en los organismos superiores (43, 67).

Los diversos estudios clínicos o epidemiológicos en que están involucrados algunos de los hongos patógenos, manifiestan el predominio del padecimiento en el hombre y su explicación podría fundamentarse en los estudios antes mencionados (13, 36).

2. ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO

En todos los estudios epidemiológicos publicados sobre el actinomicetoma, es notoria la gran diferencia de incidencia del padecimiento entre los dos sexos, predominando en el hombre (14, 23, 33, 39, 40, 41, 47, 48, 51, 59, 66, 76, 82).

En el trabajo publicado por Orio y cols. en 1963 (59), sobre "Los micetomas en la costa francesa de Somalia...", los autores plantean la posibilidad de que exista una resistencia natural, que pudiera ser de tipo hormonal, que explique la desigual repartición de micetomas entre hombres y mujeres, y en la cual no influyen ni el modo de vida ni las restricciones sociales o religiosas.

Lavalle (41) hace énfasis en la diferente incidencia del actinomicetoma relacionada con el dimorfismo sexual, y pese al concepto casi general de que la ocupación laboral influye de manera definitiva en esta diferencia, él considera que existe un "factor de resistencia antimicetoma ligado al sexo" y también plantea la posibilidad de que estos factores sean de naturaleza hormonal. Lavalle en ese mismo trabajo hace notar las características clínicas y la diferencia en la incidencia del padecimiento entre hombres y mujeres: menciona un primer caso de una "joven de 21 años, que durante tres años había presentado una sola lesión pequeña y que no se desarrolló sino en ocasión de su primer embarazo; Después del parto fué tratada con griseofulvina y la mejoría fué espectacular, pero sobrevino un segundo embarazo y con él una recaída del micetoma....."

Otro caso que refiere el mismo autor es el de "una mujer joven, muy prolífica, la que acudía a consulta siempre en ocasión de estar embarazada por el empeoramiento que tal situación le acarrea en su micetoma..."

Un tercer caso citado por el autor: una paciente presentó un micetoma a los dos años de edad, el cual se resolvió sin necesidad de medicamento, ".....pero a la edad de la pubertad se presenta un nuevo micetoma que crece con rapidez....."

Es importante mencionar que de todos los casos clínicos arriba mencionados se aisló *N. brasiliensis*.

Finalmente, Mohr y Muchmore citan el caso de una mujer que presentaba un micetoma por *Sc. apiospermum* (anteriormente conocido como *A. boydii*) y quien presentaba períodos de remisión durante sus embarazos (citado en 70).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- El actinomicetoma es una enfermedad infecciosa, crónica, de origen bacteriano, de localización cutánea y subcutánea, con alto índice de frecuencia en México.

- En este padecimiento existe un predominio en el hombre respecto a la mujer. Este predominio se ha atribuido sobre todo a que el hombre labora más en el campo que la mujer, y que por lo tanto se expone más a traumatismos y al contacto con los agentes causales de micetoma. Sin embargo, esta explicación no es totalmente válida para muchas comunidades rurales, ya que en éstas la mujer trabaja significativamente igual que el hombre.

- Los estudios realizados sobre este tema no explican el mecanismo de este predominio en el hombre.

- Existen otras dos hipótesis respecto a la causa de este predominio masculino: la exposición repetida al agente o agentes etiológicos durante las actividades laborales en el campo, y la influencia de los factores hormonales en la instalación y la evolución del micetoma.

4. HIPOTESIS

Si en diversos microorganismos eucariotes, procariotes y virus, se ha encontrado un efecto biológico hormonal "in vitro", fundamentando parcial o totalmente la diferencia por sexos en la incidencia de ciertas enfermedades, es posible que en *Nocardia brasiliensis*, agente principal de actinomicetoma en México, también pueda encontrarse ese efecto. De existir tal efecto, encontraremos que:

- El estradiol inhibirá el crecimiento in vitro de *N. brasiliensis* y limitará la evolución grave del micetoma experimental.

- La progesterona y la testosterona estimularán el crecimiento "in vitro" de *N. brasiliensis* y propiciarán la gravedad del micetoma experimental.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Iniciar el estudio del papel que juegan los factores hormonales en la patogenia del actinomicetoma.

Objetivos particulares:

- Determinar el efecto que tienen las hormonas sexuales humanas (estradiol, progesterona y testosterona) sobre el crecimiento "in vitro" de *Nocardia brasiliensis*.

- Determinar el efecto que tienen las hormonas sexuales (estradiol, progesterona y testosterona) en la evolución del actinomicetoma experimental.

6. MATERIAL

6.1 Cepas

- Cinco aislamientos clínicos de *Nocardia brasiliensis*

(Cepas HE-120.86, HE-140.89, HE-101, HE-92.89 y HE-26.88), obtenidas de pacientes con micetoma activo, provenientes del Servicio de Dermatología del Hospital General de México (Secretaría de Salud).

6.2 Animales

- 84 ratones de la cepa Taconic (54 hembras y 30 machos), de 25 a 30 g de peso, proporcionadas por la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

6.3 Hormonas

- 17 Beta-estradiol (E-7879, Sigma, P.M. 314.4)
- Progesterona (P-0130, Sigma, P.M. 314.5)
- Testosterona (T-6147, Sigma, P. M. 288.4)

6.4 Material de laboratorio

- Cajas de Petri (Pyrex 92 X 20)
- Tubos de ensayo (Pyrex 145 X 18)
- Tubos de ensayo (Pyrex 110 X 18)
- Matraces Erlenmeyer (Pyrex 250 y 1 000 ml)
- Probetas (Pyrex 100 y 500 ml)
- Vasos de precipitado (Pyrex 500 ml)

- Pipetas graduadas (Pyrex 0.1, 1, 2, 5, 10 y 25 ml)
- Pipetas Pasteur
- Morteros
- Material diverso de laboratorio

6.5 Medios de cultivo

- Agar dextrosa Sabouraud (Bioxon 107-1)
- Caldo dextrosa Sabouraud (Bioxon 135-1)
- Agar papa dextrosa (Bioxon 119-1)

6.6 Reactivos

- Fenol en cristales (J. T. Baker 2858)
- Acido sulfúrico puro (J. T. Baker 9681-62)
- Glucosa (Merck 8342)
- Buffer formolado

6.7 Equipo

- Balanza granataria (Ohaus)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Espectrofotómetro (Pye Unicam, sp8-100 ultraviolet spectrophotometer)
- Microscopio óptico

7. METODOLOGIA

Al final de esta sección 7, se encuentran los diagramas que resumen la Metodología empleada en el presente trabajo.

El presente estudio se dividió en dos fases:

- Experimentos "in vitro", cuya finalidad fué determinar el efecto de las hormonas sexuales sobre el crecimiento de *N. brasiliensis*.

- Experimentos "in vivo", cuyo objetivo fué determinar el efecto de las hormonas sexuales sobre la evolución del micetoma experimental

Para obtener una mejor correlación entre la presencia de hormonas y el crecimiento de *N. brasiliensis*, los experimentos "in vitro" se realizaron en dos modalidades:

- Medición del crecimiento radial de la colonia de *N. brasiliensis* crecida en medio agar Sabouraud conteniendo, por separado, tres concentraciones diferentes de hormonas sexuales.

- Determinación del consumo de glucosa de *N. brasiliensis* crecida en medio Sabouraud líquido conteniendo, por separado, solamente una concentración de cada una de las hormonas a estudiar.

Los experimentos "in vivo" consistieron en producir actinomietoma experimental en la almohadilla plantar de ratones, seguido de la aplicación periódica de hormonas sexuales para evaluar su actividad a través de cuatro parámetros:

- Frecuencia de ratones con micetoma experimental
- Diámetro de la almohadilla plantar inoculada.

- Presencia y número de granos en cortes histológicos, para determinar el índice de invasividad.

- Recuperación en retrocultivo de *N. brasiliensis* a partir de la almohadilla plantar inoculada.

7.1 Selección de las cepas de *N. brasiliensis*

Se solicitaron al servicio de Dermatología del Hospital General de México de la Secretaría de Salud, varias cepas de *N. brasiliensis* recientemente aisladas de pacientes con actinomicetoma.

A cada una de las cepas se les realizaron las pruebas de hidrólisis de caseína, crecimiento en gelatina y licuefacción de gelatina para corroborar la especie. Una vez reclasificadas por medio de la positividad a estas pruebas, se seleccionaron cinco de ellas de acuerdo al aspecto fenotípico que nos pareció mas característico de la especie y se mantuvieron en medio agar papa dextrosa a 4°C hasta su utilización.

7.2 Preparación del inóculo de *N. brasiliensis*

Cada cepa fué resembrada en medio de Agar Papa Dextrosa e incubada a 25°C durante 21 días.

Después de este tiempo, se tomaron fragmentos de cada una de las cinco cepas y se disgregaron en un mortero estéril, agregando solución salina estéril al 0.85%. La suspensión se agitó en vortex y la turbidez de la misma se ajustó con el tubo No. 5 del nefelómetro de McFarland, que equivale a una concentración de 15×10^8 células/ml. Este procedimiento se realizó justo antes de cada experimento "in vitro" e "in vivo" y la suspensión así obtenida se consideró como inóculo estándar.

7.3 Experimentos "in vitro"

7.3.1 Crecimiento radial de la colonia de *N. brasiliensis* en presencia de hormonas sexuales

7.3.1.1 Preparación de las soluciones de hormonas

Se prepararon dos soluciones madre, una de estradiol y otra de progesterona, a una concentración 318^{-4} M, disueltos en etanol puro.

Se preparó otra solución madre de testosterona, a una concentración de 693^{-4} M, igualmente disuelta en etanol puro.

Las soluciones de hormonas se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore de $0.22 \mu\text{m}$ y se conservaron en refrigeración a 0°C hasta y después de su uso en cada experimento.

7.3.1.2 Preparación del agar Sabouraud adicionado de las diferentes hormonas

- Se prepararon 10 matraces conteniendo 300 ml de agar dextrosa Sabouraud cada uno. Los matraces fueron numerados del 1 al 10 y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

- Una vez que la temperatura de los matraces descendió a 60°C , a los matraces 1, 2 y 3 se les adicionó la cantidad necesaria de la solución madre de estradiol, para obtener concentraciones equivalentes a 715^{-9} , 715^{-8} y 715^{-7} M.

- A los matraces 4, 5 y 6 se les adicionó progesterona a una concentración final de 127^{-7} , 127^{-6} y 127^{-5} M respectivamente.

- Los matraces 7, 8 y 9 se llevaron a una concentración final de testosterona de 107^{-7} , 107^{-6} y 107^{-5} M respectivamente.

Las concentraciones señaladas para cada hormona equivalen a 10, 100 y 1 000 veces la concentración sérica humana normal (CSHN) de estradiol y progesterona reportada en mujeres normales adultas no embarazadas y de testosterona en hombres normales adultos (50). Las concentraciones séricas normales consideradas son:

Estradiol (mujer).....	225 pg/ml
Progesterona (mujer)....	4 ng/ml
Testosterona (hombre)...	3 ng/ml

- Al matraz número 10 no se le adicionó hormona y fué utilizado como control.

- El contenido homogenizado de cada matraz fué distribuido en 10 cajas de Petri previamente rotuladas y éstas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la solidificación del medio.

7.3.1.3 Depósito del inóculo en el agar Sabouraud

- Una vez solidificado el medio con hormonas, se realizó una perforación de 5 mm de diámetro en el centro del agar.

- En cada perforación del agar se depositaron 20 μ l de la suspensión de *N. brasiliensis*.

- Las cajas se incubaron a 25°C durante 45 días.

7.3.1.4 Medición del crecimiento radial de la colonia de *N. brasiliensis*

- Cada semana, hasta los 45 días, se midió el diámetro de la colonia en crecimiento de *N. brasiliensis*, elaborando una curva de crecimiento diametral para cada concentración de hormonas. La medición del día 0 corresponde al día

en que se depositó el inóculo y el diámetro inicial corresponde al diámetro de la perforación (5 mm).

- Se tomaron en cuenta dos diámetros transversales por cada medición y se anotó el promedio.

- El procedimiento anterior se realizó con cada una de las cinco cepas y por duplicado.

7.3.2 Consumo de glucosa de *N. brasiliensis* en presencia de hormonas sexuales

7.3.2.1 Preparación del medio líquido Sabouraud con hormonas

- Se prepararon 16 matraces con 150 ml de caldo dextrosa Sabouraud cada uno y se rotularon del número 1 al 16.

- Se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

- Pasados tres días de preparado el medio, como una prueba de esterilidad del mismo, se determinó la concentración de glucosa en cuatro de los 16 matraces, elegidos al azar, y se anotó así la lectura del día 0.

- A los matraces 1 a 4 se les adicionó la cantidad de estradiol necesaria para obtener una concentración final de 715^{-7} M.

- Los matraces 5 a 8 se llevaron a una concentración final de progesterona de 127^{-5} M.

- A los matraces 9 a 12 se les agregó la cantidad necesaria de testosterona para obtener una concentración de 107^{-5} M.

Estas concentraciones de hormonas son equivalentes a 1 000 veces la CSHN.

- A los matraces 13 a 16 no se les adicionó hormona y se emplearon

como control.

- Finalmente a cada uno de los 16 matraces se les adicionó 0.5 ml de la suspensión de *N. brasiliensis*.

- Los matraces fueron incubados a 25°C durante 45 días.

7.3.2.2 Medición del consumo de glucosa

- Cada semana, durante 45 días, se midió la concentración de glucosa en cada uno de los matraces descritos previamente.

- Para determinar la concentración de glucosa en el medio se empleó el método colorimétrico de fenol-acido sulfúrico (26).

Los procedimientos anteriores se realizaron para cada una de las cinco cepas.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza basado en el diseño completamente aleatorio (53).

7.4 Experimentos "in vivo"

7.4.1 Preparación de las soluciones de hormonas

- Se preparó una solución madre de estradiol, disuelto inicialmente en etanol puro y posteriormente en agua destilada estéril, a una concentración de 66^{-8} M.

- Se preparó otra solución de progesterona a una concentración de 66^{-7} M.

- Finalmente se preparó otra solución de testosterona a una concentración de 66^{-7} M.

-Las soluciones hormonales se esterilizaron por filtración en membranas

Millipore de 0.22 μm .

7.4.2 Producción del micetoma y aplicación de hormonas

- Para esta fase del experimento se usaron 84 ratones (54 hembras y 30 machos) adultos, de 25 a 30 gramos, de la cepa Taconic.

- En este experimento se utilizó la cepa HE-101 de *N. brasiliensis*.

- Las concentraciones hormonales aplicadas a los ratones se basaron en la concentración sérica normal en el ratón adulto (CSNR) reportada en la literatura (15). Estas concentraciones fueron:

Estradiol (hembra)..... 150 pg/ml

Progesterona (hembra)..... 3 ng/ml

Testosterona (macho) 2 ng/ml

- Los ratones fueron divididos en lotes de seis (todos hembras o todos machos) para la aplicación de cada hormona y cada concentración.

- Una vez rotuladas las jaulas, y estando distribuidos los lotes de seis ratones hembras o machos de acuerdo a cada hormona y concentración, se midió el diámetro de la almohadilla plantar (pata posterior izquierda) de todos los ratones. Esta medida representó la lectura del día 0.

- Todos los ratones fueron inoculados con 0.2 ml de la suspensión de *N. brasiliensis* por vía almohadilla plantar.

- Para el estudio de estradiol y progesterona se utilizaron los ratones hembras, y para el estudio de testosterona se utilizaron los ratones macho.

- Al lote correspondiente se le aplicaron 30, 160 o 330 μl de la solución madre de estradiol; 70, 350 o 700 μl de la solución de progesterona y 45, 225 o 450 μl de la solución de testosterona, por vía intraperitoneal. Estas cantidades

de hormona llevaron a una concentración hormonal sérica en el ratón equivalente a 10, 50 y 100 veces la CSNR respectivamente.

- Como grupo control (testigo) en la evaluación del estradiol y la progesterona se utilizó un lote de seis ratones hembra, y como grupo control (testigo) en la evaluación de la testosterona se utilizó un lote de seis ratones macho.

- A los ratones control (testigo) solamente se les aplicó agua destilada estéril cada cinco días por vía intraperitoneal, en un volumen equivalente al aplicado con las hormonas correspondientes en los otros lotes de ratones.

- Junto con el lote de ratones al que se le aplicó la cantidad de hormona necesaria para obtener 50 veces la CSNR, se empleó otro grupo de ratones con una modificación: se aplicó el inóculo de *N. brasiliensis* junto con la hormona, y a este grupo se le denominó N.b.50. El objetivo fué ver si el contacto directo de la hormona con el actinomicetal desencadenaba un efecto diferente en el curso del actinomicetoma. Por lo tanto, para fines de tabulación de datos se consideraron cuatro grupos de ratones por cada hormona.

- Las hormonas se aplicaron en las dosis respectivas cada cinco días, por vía intraperitoneal. La aplicación se inició el día de la inoculación de *N. brasiliensis*, hasta completar 45 días.

- A todos los ratones se les midió la almohadilla plantar cada semana hasta 7 semanas.

- Al término de los 49 días, se sacrificaron los ratones y se les seccionó la pata inoculada.

- Cada pata se dividió en dos partes: una para el estudio histopatológico y la otra para retrocultivo.

7.4.3 Estudio histopatológico

- La parte destinada para estudio histopatológico se colocó en un frasco conteniendo una solución de formol al 10%. Reunidos todos los fragmentos en sendos frascos adecuadamente rotulados, se enviaron al Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Fueron hechos tres cortes de cada fragmento enviado, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina. La revisión de las preparaciones y la anotación de los hallazgos histopatológicos fueron hechos en el laboratorio de Micología Médica.

7.4.4 Retrocultivo

- La parte de almohadilla plantar destinada para retrocultivo se maceró en un mortero estéril y se hizo una suspensión con solución salina estéril, en una proporción de una parte de tejido, en cuatro partes de solución salina estéril. Con esta suspensión se sembró 0.5 ml en cada uno de cuatro tubos (dos de agar Sabouraud simple y dos de agar Sabouraud con antibiótico).

- Los retrocultivos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 21 días.

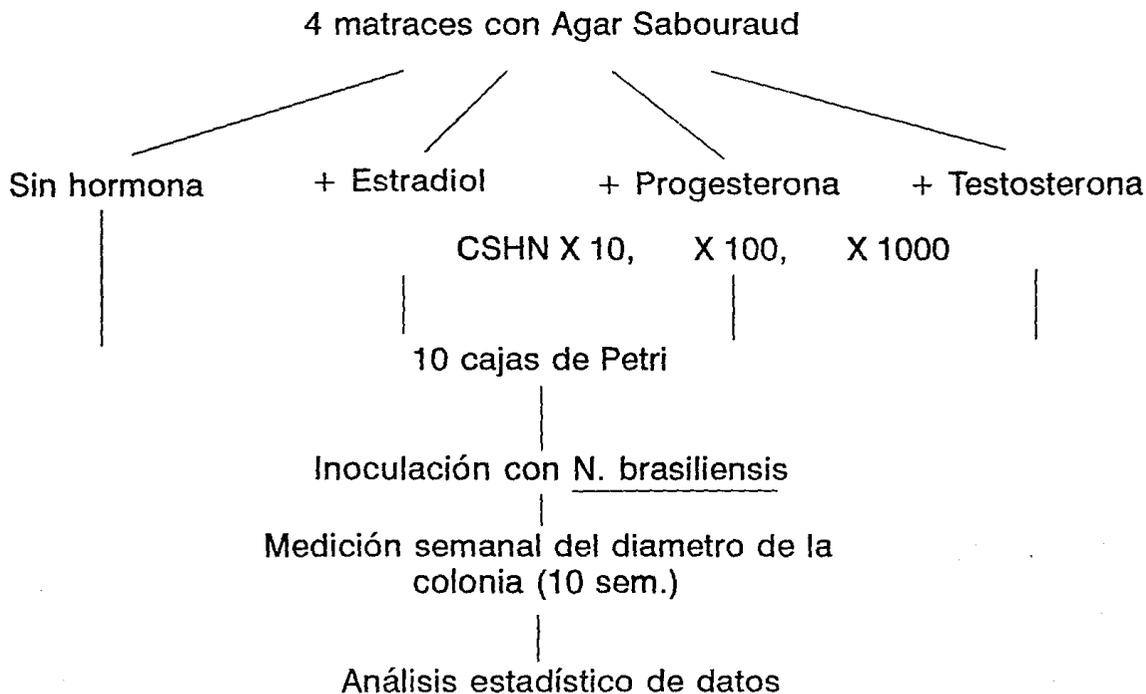
EFFECTO DE HORMONAS SEXUALES HUMANAS
EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL Y SOBRE
EL DESARROLLO "IN VITRO" DE
Nocardia brasiliensis

METODOLOGIA GENERAL

- I. ESTUDIOS "IN VITRO"
- Crecimiento de N. brasiliensis en medio adicionado de hormonas.
 - * Crecimiento radial de la colonia
 - * Consumo de glucosa
- II. ESTUDIOS "IN VIVO"
- Producción de actinomicetoma; aplicación periódica de hormonas
 - * Diámetro de almohadilla plantar
 - * Histopatología: índice de invasividad
 - * Retrocultivo

METODOLOGIA I

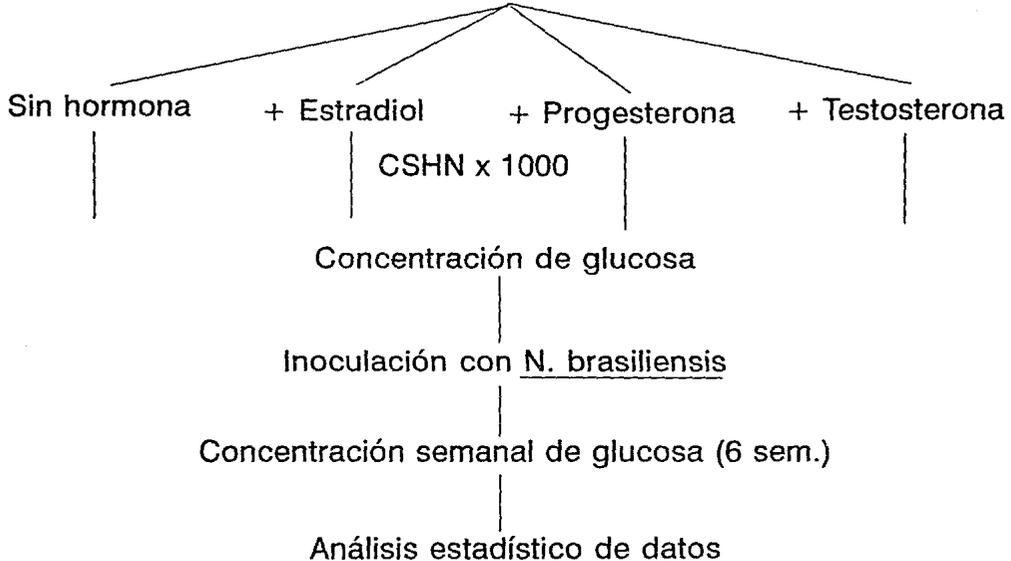
CRECIMIENTO RADIAL DE LA COLONIA



MEDODOLOGIA II

CONSUMO DE GLUCOSA

4 matraces con Caldo Sabouraud



ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL

4 Lotes H. 4 Lotes H. 4 Lotes M. 1 Lote H 1 Lote M

Medición almohadilla plantar izquierda (API)

Inoculación en API, con N. brasiliensis

Admón I.P. (cada 5 días)

EST.	PROG.	TEST.	CONT. H	CONT. M.
10 CSNR				
50				
Nb 50				
100				

Medición semanal de API (7 sem.)

Sacrificio de ratones

Histopatología

INDICE DE
INVASIVIDAD

RETROCULTIVO

DIAMETRO DE
ALMOHADILLA
PLANTAR

8. RESULTADOS

8.1 Experimentos "in vitro"

8.1.1 Observaciones generales

Durante esta primera fase del trabajo se observaron algunos aspectos macroscópicos generales que llamaron la atención y que se comentan a continuación.

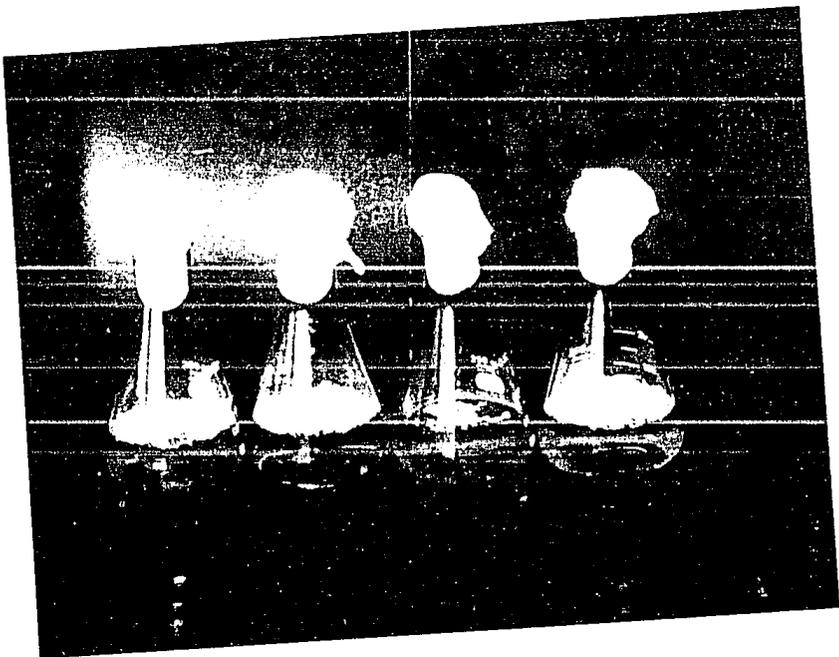
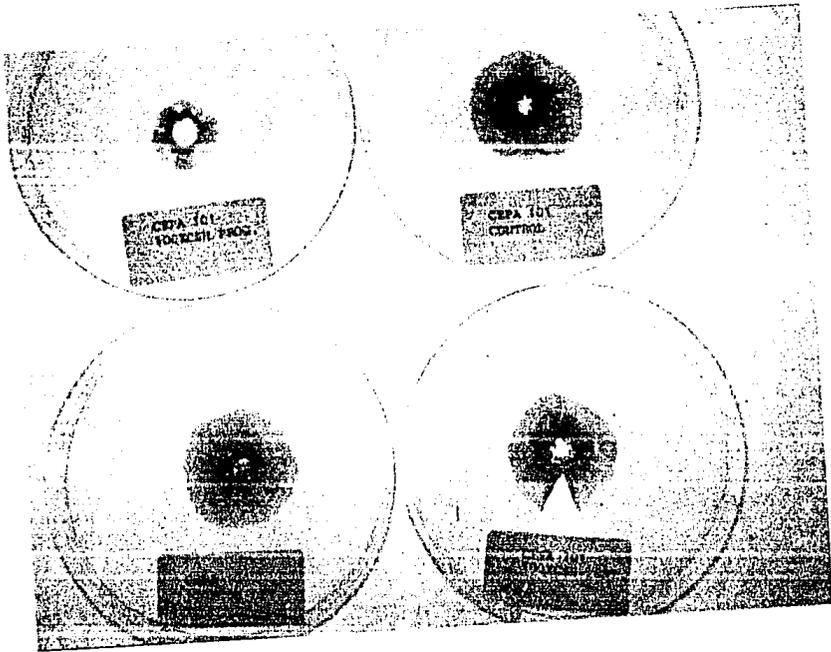
- Durante el crecimiento de las cepas HE-101 y HE-140-89 en agar dextrosa Sabouraud (tercer resiembra), las colonias presentaron un pigmento marrón oscuro que no difundió al medio, ya fuera en presencia o no de hormonas. **Figura 1.** (Al recibir las cepas recién aisladas de pacientes, ninguna presentaba pigmento, aunque estaban sembradas en el mismo medio). Durante su crecimiento en medio líquido Sabouraud, el pigmento de esta cepa difundió totalmente en el medio.

En las cepas HE-140-89 y HE-120-86, los matraces que contenían estradiol y aquellos que no contenían hormona (control), la masa bacteriana de estas cepas aparecía muy dispersa en el medio dando el aspecto de contener bacterias sueltas. En los matraces con progesterona y testosterona, la masa fúngica se presentó en forma muy compacta, formando una capa en la superficie del medio.

- En los matraces que contenían progesterona y testosterona, el crecimiento de todas las cepas de *N. brasiliensis* fué más lento que en los matraces que contenían estradiol y aquellos sin hormona. En presencia de testosterona y progesterona, a la primera semana el crecimiento era nulo,

FIGURA 1. Aspecto macroscópico de la cepa HE-101 de *N. brasiliensis*, crecida en agar Sabouraud adicionado de hormonas. Es notable el pigmento marrón no difusible al medio.

FIGURA 2. Aspecto de la cepa HE-26-88, crecida en medio líquido Sabouraud adicionado de hormonas. De izquierda a derecha se encuentran los matraces Control, adicionado de Estradiol, adicionado de Testosterona y adicionado de Progesterona. Se observa un crecimiento desigual, notablemente disminuído en presencia de Testosterona.



mientras que en los grupos de estradiol y control el crecimiento era bastante visible en el mismo período. **Figura 2.**

Respecto a la cepa HE-120.86, en medio líquido con progesterona y testosterona, la colonia era de color amarillo pálido, mientras que en medio con estradiol y control, la colonia se tornó de color anaranjado intenso.

8.1.2 Crecimiento radial de la colonia de *N. brasiliensis* en presencia de hormonas sexuales

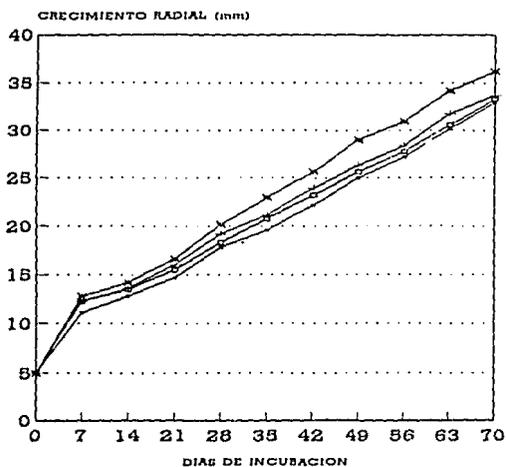
- En dos de las cinco cepas de *Nocardia* (HE-120-86 y HE-140-89) se observó una curva de crecimiento radial semejante para todas las hormonas a las tres concentraciones diferentes; así mismo, fué semejante al crecimiento de las cajas control (sin hormona). Estos resultados se muestran en las **Gráficas 1 A, B, C y 2 A, B, C.**

- La cepa HE-101 manifestó inhibición de su crecimiento en presencia de progesterona a la concentración 127^{-6} M, es decir, 100 veces la CSHN. Esta diferencia fué estadísticamente significativa, con un valor de alfa de 0.05. La misma cepa frente al estradiol y la testosterona a las tres concentraciones, no manifestó ninguna diferencia significativa en su crecimiento frente al control. **Gráfica 3 A, B, C.**

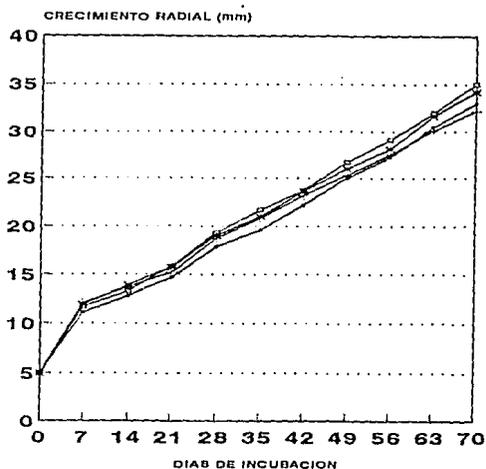
- La cepa HE-92-89 manifestó una ligera tendencia a crecer en un mayor diámetro que el control en presencia de estradiol a la concentración 715^{-8} M (CSHN X 100). Sin embargo, esta tendencia no tuvo ningún significado estadístico. **Gráfica 4 A, B, C.**

- Finalmente en la cepa HE-26-88 se observó una inhibición del crecimiento radial en presencia de progesterona 127^{-5} M (CSHN X 1000) y en

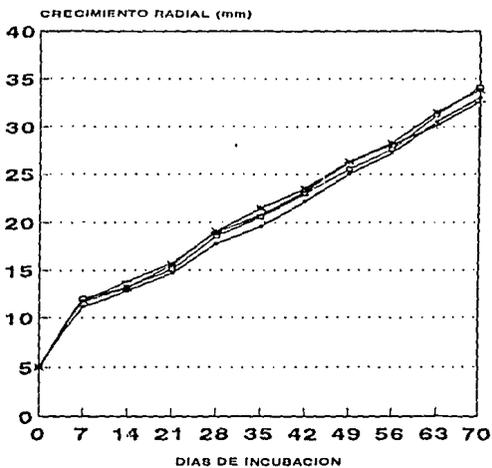
GRAFICA 1.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CRECIMIENTO RADIAL
Nocardia brasiliensis CEPA HE-120-86



A) C.S.H. X 10



B) C.S.H. X 100

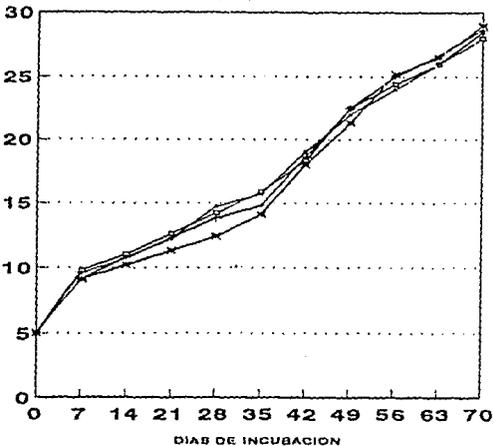


C) C.S.H. X 1000

— CONT.
 —+— ESTR.
 —+— PROG.
 —+— TEST.

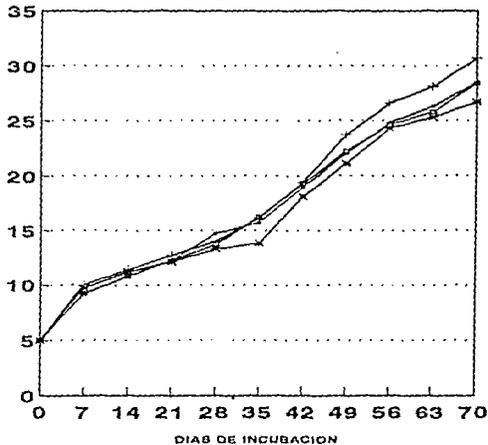
GRAFICA 2.
EFECTO HORMONAL SOBRE CRECIMIENTO RADIAL
Nocardia brasiliensis CEPA HE-140-89

CRECIMIENTO RADIAL (mm)



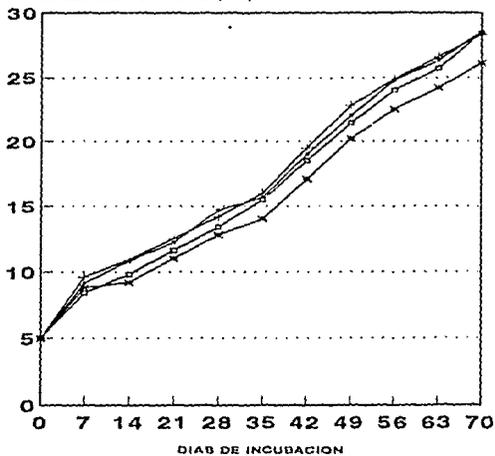
A) C.S.H. X 10

CRECIMIENTO RADIAL (mm)



B) C.S.H. X 100

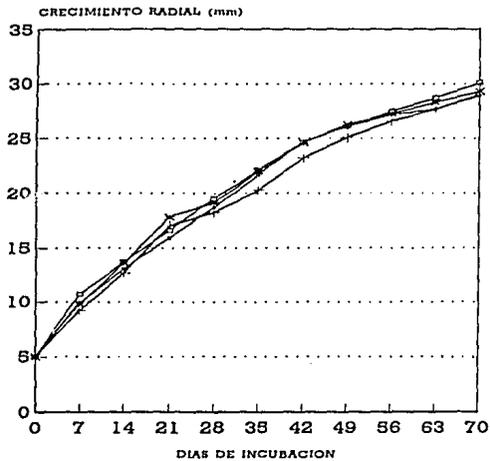
CRECIMIENTO RADIAL (mm)



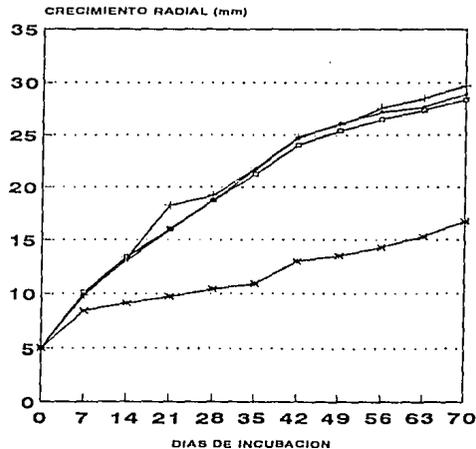
C) C.S.H. X 1000

— CONT.
— ESTR.
— PROG.
— TEST.

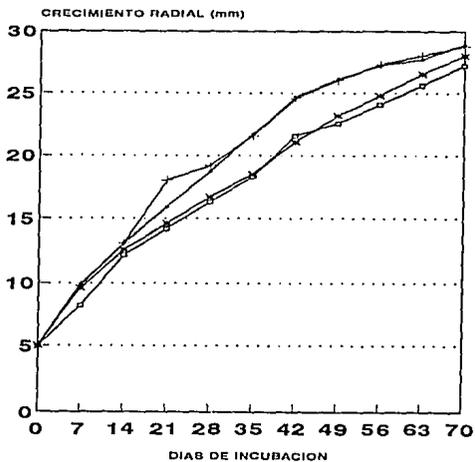
GRAFICA 3.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CRECIMIENTO RADIAL
Nocardia brasiliensis CEPA HE-101



A) C.S.H. X 10



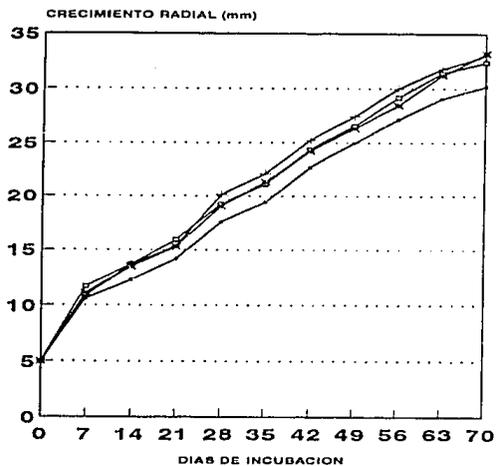
B) C.S.H. X 100



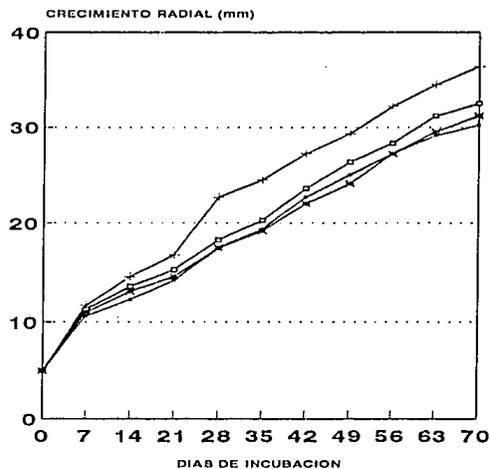
C) C.S.H. X 1 000

— CONT.
 + ESTR.
 * PROG.
 ◻ TEST.

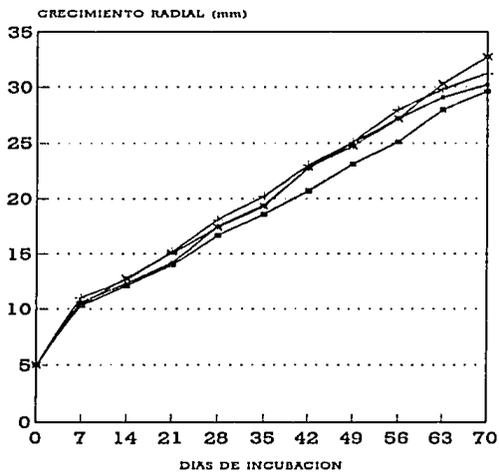
GRAFICA 4.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CRECIMIENTO RADIAL
Nocardia brasiliensis CEPÄ HE-92-89



A) C.S.H. X 10



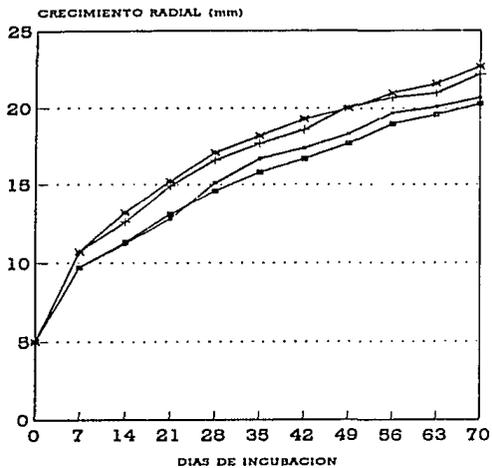
B) C.S.H. X 100



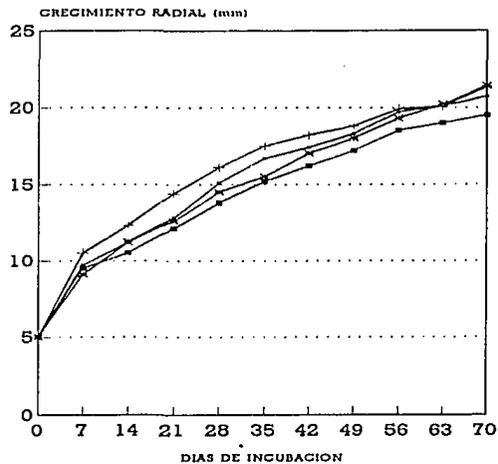
C) C.S.H. X 1000

— CONT.
 — ESTR.
 — PROG.
 — TEST.

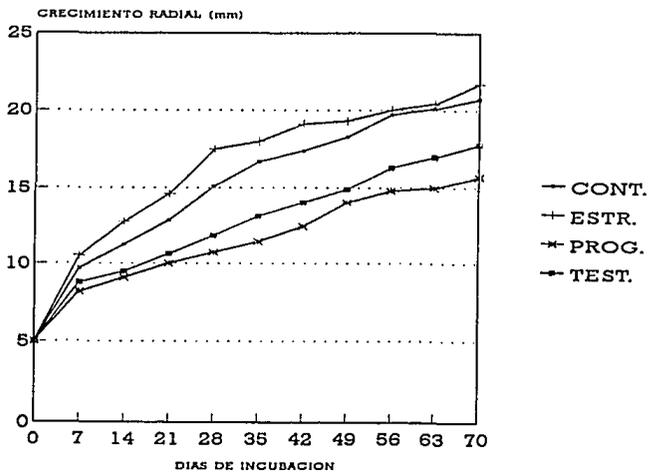
GRAFICA 5.
EFECTO HORMONAL SOBRE CRECIMIENTO RADIAL
Nocardia brasiliensis CEPA HE-26-88



A) C.S.H. X 10



B) C.S.H. X 100



C) C.S.H. X 1000

menor grado con testosterona $105^{-5}M$ (CSHN X 1000). Solo el efecto de la progesterona fué estadísticamente significativo con respecto al control. Con las otras hormonas y concentraciones no se observó diferencia significativa. **Gráfica 5 A, B, C.**

8.1.3 Consumo de glucosa de *N. brasiliensis* en presencia de hormonas sexuales

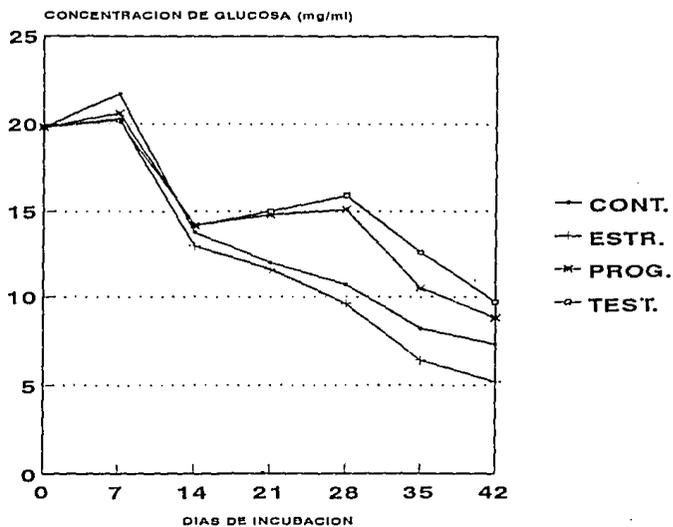
En esta prueba hecha en matraces con Sabouraud líquido conteniendo las hormonas a la única concentración de 1000 veces la CSHN, se obtuvieron los siguientes resultados:

- En la cepa HE-120.86 el estradiol produjo un ligero efecto estimulante reflejado por un aumento en el consumo de glucosa. Contrariamente, la progesterona y la testosterona produjeron un ligero efecto inhibitor al final del experimento. Este comportamiento fué más marcado y estadísticamente diferente respecto al control a la cuarta semana del estudio. **Gráfica 6.**

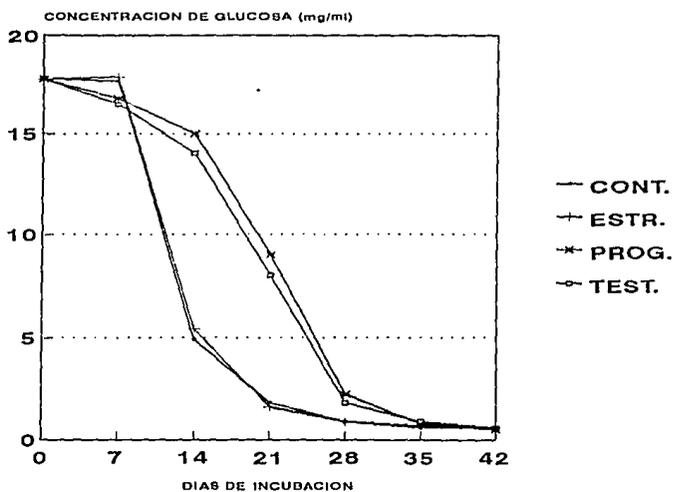
- En las **Gráficas 7 y 8** se observa que en las cepas HE-140-89 y HE-101 respectivamente ninguna de las hormonas causó efecto significativo en el consumo de glucosa al final de la sexta semana. Sin embargo, sobre todo en la cepa HE-140-89 (**Gráfica 7**), se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los días 14 y 21. En ese período la progesterona y testosterona propiciaron una inhibición del consumo de glucosa. Al final del experimento las concentraciones de glucosa fueron similares.

- En la primera semana del estudio, la cepa HE-92-89 presentó un efecto inhibidor sobre el consumo de glucosa propiciado por la progesterona y la testosterona. **Gráfica 9.**

FIGURA 6
EFFECTO HORMONAL SOBRE CONSUMO DE GLUCOSA
Nocardia brasiliensis CEPA HE-120-86

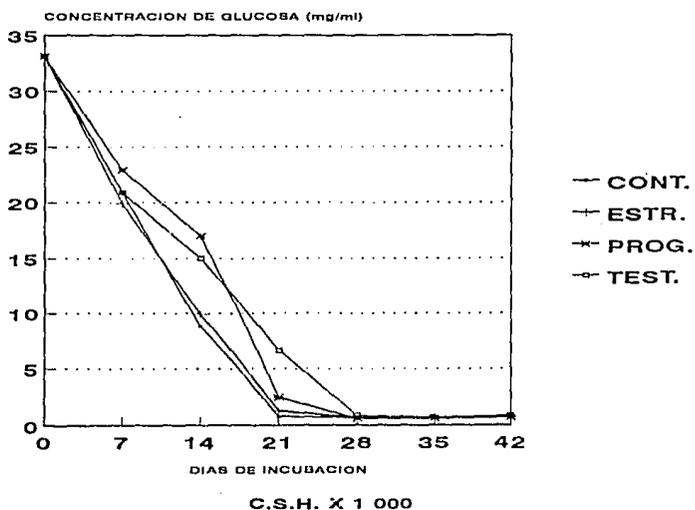


GRAFICA 7.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CONSUMO DE GLUCOSA
Nocardia brasiliensis CEPA HE-140-89

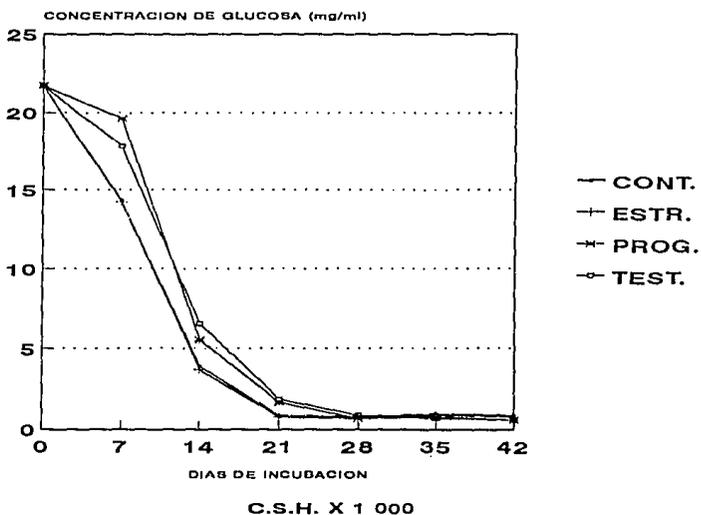


C.S.H. X 1 000

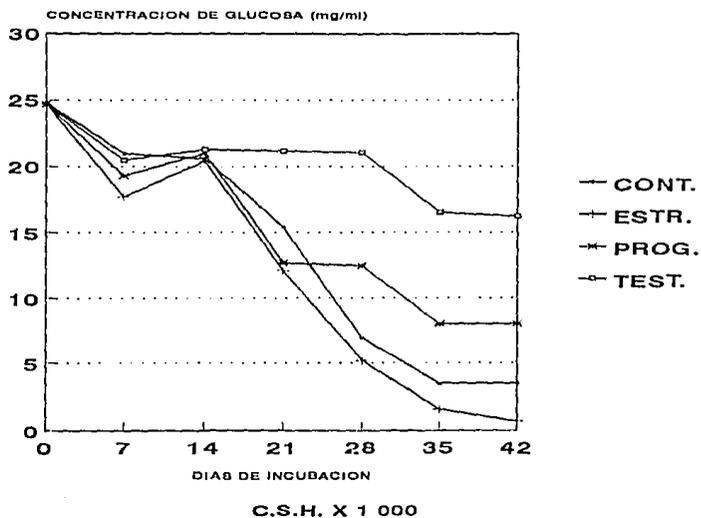
GRAFICA 8.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CONSUMO DE GLUCOSA
Nocardia brasiliensis CEPA HE-101



GRAFICA 9.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CONSUMO DE GLUCOSA
Nocardia brasiliensis CEPA HE-92-89



GRAFICA 10.
EFFECTO HORMONAL SOBRE CONSUMO DE GLUCOSA
Nocardia brasiliensis CEPA HE-26-88



- En la **Gráfica 10** se observa que la cepa HE-26-88 manifestó una inhibición del consumo de glucosa, a partir de la tercera semana y hasta el final del experimento, en presencia de progesterona y en mayor intensidad con la testosterona. Este efecto fué estadísticamente significativo. En presencia de estradiol se observó una ligera estimulación en el consumo de glucosa, sin ser significativa.

8.2 Experimentos "in vivo"

8.2.1 Producción del micetoma y medición del diámetro de la almohadilla plantar

El diámetro de la almohadilla plantar del ratón fué medido con un compás de precisión (Vernier). En cada ocasión se midieron dos diámetros (uno en sentido antero-posterior y otro en sentido lateral) y se anotó el promedio. Al inicio del experimento, previo a la inoculación con *N. brasiliensis*, el diámetro promedio de todos los ratones fué de 4 mm. Después de la inoculación, el aumento de volúmen local fué notorio desde la primera semana post-inoculación en todos los lotes tratados con y sin hormona. Los resultados de la medición del diámetro de la almohadilla plantar se muestran en el **Tabla I**. La **Figura 3** muestra un ejemplo del actinomicetoma experimental.

La evolución del diámetro durante el curso de la infección fué muy irregular entre cada uno de los grupos tratados con las diferentes concentraciones hormonales, notablemente aquellos tratados con progesterona y testosterona. Por lo tanto, los resultados serán presentados considerando cada grupo (conjunto de lotes) en forma global, sin hacer énfasis en cada uno de los lotes tratados con cada una de las concentraciones.

TABLA I
DIAMETRO DE ALMOHADILLA PLANTAR (mm) EN RATONES
CON MICETOMA EXPERIMENTAL Y TRATADOS CON HORMONAS

HORMONA	CONCENTRACION	DIAS							
		0	7	14	21	28	35	42	49
Estradiol	10	4.00	4.75	4.75	4.25	4.26	4.40	4.30	4.10
	50	4.00	4.91	4.66	4.33	4.16	4.16	4.00	4.00
	N. b. 50	4.00	4.50	4.00	4.50	4.50	4.30	4.00	4.00
	100	4.00	4.75	4.33	4.08	4.80	4.16	4.00	4.00
Progesterona	10	4.00	4.75	4.25	4.00	4.41	4.50	4.33	4.33
	50	4.00	4.41	4.58	4.33	4.41	4.41	4.46	4.58
	N. b. 50	4.00	4.58	4.66	4.16	4.16	4.16	4.20	4.20
	100	4.00	5.00	4.33	4.41	4.16	4.25	4.33	4.33
Control hembras		4.00	4.50	4.41	4.50	4.50	4.16	4.33	4.41
Testosterona	10	4.00	4.80	4.62	4.37	4.87	4.87	4.82	4.75
	50	4.00	5.00	4.41	4.41	4.58	4.66	4.83	4.91
	N. b. 50	4.00	4.91	4.25	4.33	4.50	4.50	4.50	4.41
	100	4.00	4.50	4.16	4.41	4.25	4.08	4.08	4.16
Control machos		4.00	4.91	4.58	4.58	4.83	4.83	4.50	4.33

En negritas están marcados los valores inicial (día 0), final (día 49) y aquellos que alcanzaron el 12.5% o más del valor inicial del diámetro de la almohadilla plantar inicial durante la evolución clínica del actinomicetoma (días 7 a 42).

- A la primera semana post-inoculación, el grupo control machos (no tratados con hormonas) presentó el mayor diámetro plantar de todos los grupos. De forma decreciente le siguieron los grupos tratados con testosterona, estradiol, progesterona y control hembras (sin tratamiento hormonal).

- La evolución del grupo tratado con estradiol (concentraciones 10, 50, N.b. 50 y 100) fué la más regular de todos, ya que los aumentos de volúmen registrados fueron muy similares entre sí. A la sexta semana, practicamente los cuatro lotes habían recuperado el diámetro plantar que presentaban al inicio del tratamiento.

- El grupo tratado con progesterona presentó una evolución muy irregular en el curso de la infección, incluso dentro de los mismos lotes, es decir, aquellos ratones inoculados con la misma concentración de hormona. La tendencia a la recuperación del diámetro normal de la almohadilla plantar fué menor en estos grupos que en los grupos tratados con estradiol.

- Los grupos tratados con testosterona presentaron los diámetros mayores de todos, especialmente a partir de la cuarta semana post-inoculación. En los cuatro lotes, la involución en el diámetro de la pata fué menor, particularmente en los lotes tratados con 10 y 50 veces la CSNR, que prácticamente se mantuvieron con el máximo diámetro. Estos aumentos de volúmen de la pata infectada fueron mayores que en los ratones tratados con progesterona y con estradiol.

8.2.2 Estudio histopatológico

Los granos observados en los cortes presentaron en forma constante las siguiente caracterísiticas: pequeños (40 a 70 μm de diámetro), redondos, ovals o irregulares; las estructuras en forma de clavasy el depósito eosinofilico

periféricos no se observaron. La reacción tisular mostró una área de supuración central dentro de la cual se localizaba el grano parásito. Se presentaban una gran cantidad de células gigantes multinucleadas y epitelioides, además de macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y eosinófilos. No se observó tejido fibrótico importante. Un ejemplo de estos granos se muestra en la **Figura 4**.

Fueron estudiados tres cortes por cada fragmento de pata inoculada y se hizo una búsqueda exhaustiva de granos actinomicéticos en cada uno de ellos.

De los resultados mostrados en la **Tabla II**, se observa que los cortes histológicos de ratones tratados con testosterona presentan el mayor número de granos; 33 granos en 66 cortes, lo que dió un índice de invasión de 0.5 (33/66). Le siguen en frecuencia los cortes de ratones tratados con progesterona, los cuales dieron un índice de 0.27. El menor número de granos lo presentan los cortes de tejido de ratones tratados con estradiol, donde se observó un índice de 0.23. Cabe aclarar que de los 15 granos encontrados en los cortes de tejido de ratón tratado con estradiol, 12 fueron encontrados en los cortes que correspondían al fragmento de pata de un solo ratón. La distribución de los granos en los cortes de tejidos tratados con testosterona y progesterona fué mas uniforme.

En los cortes de lotes control, tanto hembras como machos, se observaron zonas inflamatorias con abundantes acúmulos bacterianos sin constituir verdaderos granos. Por lo tanto, en los grupos control el índice de invasividad fué considerado 0.

8.2.3 Retrocultivo

Los resultados que muestran la recuperación de *N. brasiliensis* a partir

FIGURA 3. Aspecto del cojinete plantar murino en el cual se produjo el actinomicetoma.

FIGURA 4. Aspecto histológico del tejido de cojinete plantar inoculado con *N.brasiliensis*, correspondiente a un ratón tratado con Testosterona. Se observan granos pequeños, múltiples, rodeados de células inflamatorias, e inmersos en un gran absceso. (40X)

FIGURA 5. Retrocultivo obtenido del tejido plantar de un ratón inoculado con *N.brasiliensis* y tratado con Testosterona.

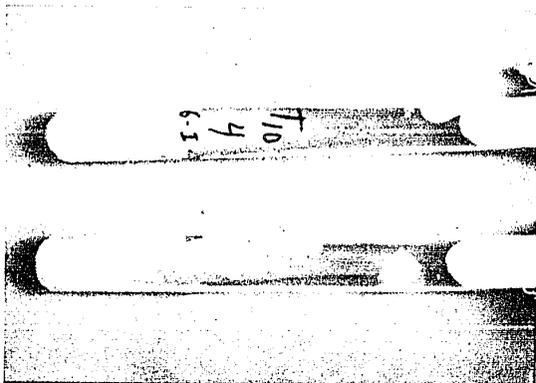


TABLA II

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO EN RATONES CON MICETOMA
EXPERIMENTAL Y TRATADOS CON HORMONAS

HORMONA DE TRATAMIENTO	No. DE RATONES	No. DE CORTES	No. DE GRANOS	INDICE DE INVASIVIDAD (No.GRANOS/No.DE CORTES)
ESTRADIOL	21	63	15	0.23
PROGESTERONA	23	69	19	0.27
TESTOSTERONA	22	66	33	0.50
CONTROL HEMBRAS	6	18	0	0
CONTROL MACHOS	6	18	0	0

TABLA III
RECUPERACION DE *N. brasiliensis* A PARTIR
DEL RATONES CON MICETOMA EXPERIMENTAL

HORMONA	CONCENTRACION (X CSNR)	No. DE RETROCULTIVOS/ TOTAL DE RATONES
Estradiol	10	1/5
	50	0/6
	N. b. 50	0/4
	100	0/6
Total		1/21 (4.7 %)
Progesterona	10	0/6
	50	4/6
	N. b. 50	2/5
	100	1/6
Total		7/23 (30.4 %)
Testosterona	10	3/4
	50	5/6
	N. b. 50	3/6
	100	2/6
Total		13/22 (59 %)
Control hembras		1/6
Control machos		0/6

N. b. 50 = La hormona (CSNR X 50) se administró localmente junto con el inóculo de *N. brasiliensis*.

de los ratones con micetoma experimental aparecen en el **Tabla III**. De los 21 ratones a los que se les realizó retrocultivo y que fueron tratados con estradiol, solamente uno resultó positivo (4.7%), tanto en medio Sabouraud simple como en Sabouraud con antibiótico. Este ratón pertenecía al grupo tratado con la CSNR X 10.

De los 23 ratones tratados con progesterona, siete presentaron retrocultivo positivo (30%). La mayoría pertenecía al grupo de ratones tratados con la CSNR X 50.

El mayor número de retrocultivos positivos se encontró a partir de los ratones tratados con testosterona; 13 de 22, correspondiendo al 59%, cuya mayoría correspondía al grupo tratado con la CSNR X 50.

Respecto a los grupos de ratones control (no tratados con hormonas), uno de los seis ratones hembra presentó un retrocultivo positivo (16%). En el grupo control macho el retrocultivo fué negativo. El aspecto macroscópico de estos retrocultivos se encuentra en la **Figura 5**.

Finalmente en la **Tabla IV** se resumen los resultados obtenidos en el presente trabajo. En los estudios "in vitro", la tendencia general del estradiol, en las cepas que presentaron efecto, fué de producir una estimulación del crecimiento de *N. brasiliensis*, contrariamente al efecto de la progesterona y testosterona, que indujeron un efecto inhibitor. Estos fenómenos observados "in vitro", fueron opuestos a los resultados obtenidos en los experimentos "in vivo", en donde el estradiol manifiesta un efecto inhibitor expresado por un menor diámetro de la pata en los ratones inoculados con *N. brasiliensis*, un menor índice de invasividad y un menor número de retrocultivos. Estos parámetros son más elevados en los ratones tratados con progesterona y testosterona.

TABLA IV.
RESUMEN DE RESULTADOS.
EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE
Nocardia brasiliensis.

HORMONA	"IN VITRO"		"IN VIVO"		
	CRECIMIENTO RADIAL *	CONSUMO DE GLUCOSA *	DIAMETRO PLANTAR **	INVASIVIDAD ***	RETRO-CULTIVO ****
ESTRADIOL	E (20%)	E (40%)	0.5%	0.23	4.7%
PROGESTERONA	I (40%)	I (100%)	9.0%	0.27	30.4%
TESTOSTERONA	I (20%)	I (100%)	13.7%	0.50	59%
CONT. HEMB.	-	-	10%	0	16%
CONT. MACH.	-	-	8%	0	0%

* E = Estimulante; I = Inhibidor.

() Porcentaje de cepas que presentaron el efecto.

** Porcentaje de aumento de diámetro por arriba del inicial (4 mm)

*** Indice de invasividad: No de granos / No de cortes.

**** Porcentaje de retrocultivos en el total de ratones.

9. DISCUSION

La patogenicidad y la virulencia de los microorganismos está determinada por la presencia o ausencia de numerosos factores que concurren en un momento dado sobre los tres determinantes de la infección: parásito, huésped y ambiente.

En términos generales se acepta que un organismo patógeno es más o menos virulento de acuerdo a la presencia de factores de agresión como enzimas, toxinas, compuestos hipersensibilizantes, etc. No obstante, en la actualidad se ha marcado un interés por conocer y determinar con mayor precisión la participación de los factores del huésped, como la temperatura, el pH, la flora normal, el substrato orgánico, el tipo de población celular inmunológica, el estado inmunológico general, el tipo de hormonas circulantes, etc., los cuales influyen notoriamente en la patogenia de la infección, estableciéndose así una compleja interacción hospederoparásito.

Recientemente, gracias al avance en los conocimientos fisiológicos, bioquímicos, genéticos y de biología molecular, entre otros, se ha determinado con mayor exactitud la esencia de algunos mecanismos de patogenicidad de ciertos organismos.

A través del presente trabajo se propone explicar la relación que hay entre el sexo del individuo (hombre o mujer), la incidencia del actinomicetoma y el comportamiento de *N. brasiliensis* frente a tres hormonas sexuales humanas (estradiol, progesterona y testosterona).

Observaciones clínicas remotas ya habían evocado la posibilidad de que los niveles de hormonas pudieran jugar un importante papel en la instalación

y evolución de la coccidioidomicosis en la mujer embarazada (75), estado que favorecía la transmisión de la infección al recién nacido (73). Asimismo, diversos trabajos ponen en evidencia la diferencia de frecuencia entre sexos que tienen muchos padecimientos infecciosos como la candidosis, la tuberculosis en la pubertad, la poliomielitis del adulto, de predominio femenino (3); o la sífilis, la tifoidea, la leishmaniosis o la blastomicosis (3, 13, 36, 66). En algunos microorganismos se han encontrado proteínas que interactúan con las hormonas esteroideas de mamíferos, haciendo el papel de receptores, desencadenando algún efecto sobre los microorganismos (27, 44-46). Esta interacción esteroide-receptor ha sido considerada como un mecanismo de patogenicidad (78).

Este trabajo pone en evidencia que las hormonas sexuales estudiadas sí tienen un efecto biológico sobre *N. brasiliensis*.

Los resultados que aquí se presentan indican que a pesar de haber iniciado nuestros experimentos con cepas al parecer iguales, ya que todas correspondieron a *N. brasiliensis*, tienen comportamientos diferentes, aun cuando se enfrentan a condiciones iguales. Cuando cada una de las cepas se puso a crecer en presencia de la misma hormona y a la misma concentración, cada una presentó alguna diferencia, manifestando ya sea la liberación de pigmento al medio, una coloración diferente de la colonia o bien una modificación de la "adhesividad" bacteriana. Esto podría sugerir por un lado, la posibilidad de la existencia de variedades de especie, y por otro, un efecto biológico inducido por las hormonas.

En presencia de estradiol, la masa bacteriana de dos cepas crecidas en medio líquido, presentaron un aspecto de dispersión y no en forma de una capa superficial compacta como sucede habitualmente. Este fenómeno ya había sido observado por Gugnani (32) en el tejido de ratones inoculados con *N.*

transvalensis y tratados con cortisona, en donde esta especie creció en forma de filamentos dispersos con elementos cocobacilares. En el micetoma, un comportamiento característico del agente causal es su agrupación compacta dando lugar a la formación de "granos". Si por algún medio pudiera impedirse esa agrupación, podríamos suponer que para un hospedero sería más fácil eliminar al microorganismo aislado que a una masa considerable de microorganismos (granos). Esto es un planteamiento en favor de que los estrógenos podrían evitar indirectamente la instalación de algunas cepas de *N. brasiliensis* en el hospedero.

Respecto al diámetro de las colonias de *N. brasiliensis*, también se encontraron resultados no idénticos para todas las cepas. La cepa HE-101 presentó el resultado mas notable en cuanto a inhibición del crecimiento, propiciado por la progesterona a una C.S.H. X 100. La cepa HE 26-88 también mostró un efecto inhibitorio frente a la progesterona pero a una C.S.H. de 1000. En estos casos la inhibición del crecimiento propiciado por la progesterona es contradictorio al resultado que se esperaba; es decir, esperábamos una estimulación del crecimiento sobre todo con concentraciones elevadas de progesterona y los resultados muestran un efecto inhibidor. Ante esto podríamos argumentar que es posible que no hayamos encontrado la concentración hormonal adecuada para imitar el efecto que producen "in vivo". Sabemos por otros trabajos y por un estudio piloto previo al presente, que cuando se trabaja experimentalmente con concentraciones similares a las normales no se observa ningún efecto. Otra posible explicación a estos resultados contradictorios, es que para que se produzca un efecto sobre crecimiento del microorganismo, éste utilice algún precursor o metabolito de las hormonas esteroideas y no necesariamente la hormona sola como tal.

Respecto al estudio de la concentración de glucosa, la cepa HE-26-88 mostró inhibición del consumo, y por tanto del crecimiento, en presencia de progesterona y de testosterona a la C.S.H. de 1 000. Nuevamente estos datos resultan incongruentes con los fenómenos que tratamos de explicar. Sin embargo, seguramente el comportamiento de un microorganismo en el interior de un hospedero no está modulado por un factor aislado, sino por la interacción con otros factores y sustancias entre las cuales se encuentran las hormonas esteroideas. Tampoco descartamos la posibilidad de que las hormonas en el medio de cultivo pudieran modificarse y por lo tanto ya no ser capaces de generar el mensaje esperado en los microorganismos en estudio.

Los estudios "in vivo", en la parte que se refiere a la medición del diámetro de la almohadilla plantar, demuestran que el estradiol produce un efecto limitante de la enfermedad, manifestado por una regresión del aumento de volumen de la zona inoculada. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado por otros autores, y en sus trabajos manifiestan que la reactividad inmune es mayor en el sexo femenino que en el masculino (3). Esta evolución regresiva del actinomictoma fué menos manifiesta en los grupos de ratones tratados con progesterona y testosterona.

Estas observaciones sugieren que el estradiol favorece la limitación de la enfermedad y posiblemente su curación, mientras que la progesterona, y sobre todo la testosterona, producen agravación del mictoma.

Estos hechos asociados con los resultados obtenidos en el retrocultivo son muy congruentes: los ratones inoculados con estradiol presentaron el menor porcentaje de retrocultivos positivos (4%), mientras que aquellos inoculados con progesterona y testosterona presentaron un alto porcentaje de recuperación de *N. brasiliensis* a partir de la almohadilla plantar inoculada (30% y 59%

respectivamente). Estos hechos confirman el efecto limitante del estradiol sobre *N. brasiliensis*.

El estudio histopatológico demostró compatibilidad con los resultados anteriores, ya que la mayoría de granos fué observada en los tejidos de ratones inoculados con progesterona y testosterona.

De acuerdo a los estudios sobre diámetro de la almohadilla plantar, el estudio histopatológico y el retrocultivo, se confirma la hipótesis de que el estradiol tiene un efecto inhibitor sobre el desarrollo de *N. brasiliensis* y sobre la evolución del actinomicetoma.

En el presente trabajo se utilizaron dosis elevadas de hormonas, en relación a las fisiológicas en los organismos humano o murino. Cabe aclarar que en un estudio piloto previo en nuestro laboratorio, se manejaron las dosis fisiológicas humanas y no obtuvimos ningún efecto diferencial en el crecimiento "in vitro" de *N. brasiliensis* respecto al control que no tenía hormonas. Es muy probable que no se hayan aun encontrado las dosis adecuadas que desencadenan un efecto similar en todas las cepas de este Actinomycete, y no se descarta la posibilidad de que alguno de los efectos hormonales encontrados, sobre todo en los experimentos "in vitro", se deba a un efecto de tipo "intoxicación", mas que a un efecto fisiológico.

Desde 1949 en que Smale y Birsner (75) publicaron cuatro casos fatales de coccidioidomicosis diseminada asociada a embarazo, numerosos estudios se han realizado para explicar el porqué del predominio de ciertas enfermedades infecciosas en uno u otro sexo, o en alguna etapa fisiológica determinada. Algunos autores han confirmado un efecto hormonal directo sobre algunos microorganismos; otros más han identificado y caracterizado la molécula intermediaria de este efecto, o bien han encontrado resultados contradictorios

a lo que esperaban, pero todos ellos han contribuido a la comprensión de la relación hospedero-parásito en presencia de una variable hormonal.

10. CONCLUSIONES

- Las hormonas sexuales sí tienen un efecto en el comportamiento biológico de *N. brasiliensis*.
- La progesterona y testosterona inhiben el crecimiento radial y el consumo de glucosa de algunas cepas de *N. brasiliensis*.
- El estradiol limita el proceso infeccioso producido por *N. brasiliensis* durante el micetoma experimental.
- La progesterona y testosterona favorecen una evolución más grave y prolongada del micetoma experimental por *N. brasiliensis*.

11. PERSPECTIVAS

Es indudable que los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan otras alternativas de estudio e impulsan a determinar con mayor profundidad el papel que juegan las hormonas en la relación hospedero-*N. brasiliensis*.

Considero que algunos de los estudios a continuar estarán encaminados a determinar:

1. Si existe la "adhesividad" bacteriana en *N. brasiliensis* y si se modifica bajo la influencia hormonal.

2. Si existe una concentración "estándar" de hormonas que produzca el mismo efecto "in vitro" en todas, o la mayoría de cepas de *N. brasiliensis* que se sometan a estudio. Si es así, ¿Cuál es ésta concentración? Una posibilidad será buscarla entre las concentraciones estudiadas en este trabajo.

- El efecto inhibitor o estimulante de las hormonas sobre el metabolismo de *N. brasiliensis*.

- Si *N. brasiliensis* tiene receptores hormonales. Si es así, buscar su localización ya sea en la pared bacteriana, en la membrana citoplásmica, en el citoplasma, en las membranas intracelulares, etc. La purificación y caracterización de receptores será un gran avance a lograr en el futuro.

12. BIBLIOGRAFIA

1. **Abbott P H.** 1954. Mycetoma: a clinical and epidemiological study. Medical Thesis. Cambridge.
2. **Abbott P H.** 1956. Mycetoma in the Sudan. Trans Roy Soc Trop Med Hyg **50**: 11-24.
3. **Ahmed S A, W J Penhale, N Talal.** 1985. Sex Hormones, Immune Responses, and Autoimmune Diseases. Mechanisms of Sex Hormone Action. Amm J Pathol **121**: 531-551.
4. **Alberts B, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, J D Watson.** Cell Signaling. In Molecular Biology of the Cell. 2nd Ed. Garland Publishing, Inc. 1989: 681-726.
5. **Avram A.** Micetoamele in Romania. Editura Acad R S Romania. 1969.
6. **Barksdale A W.** 1969. Sexual Hormones of *Achlya* and Other Fungi. Science **166**: 831-837.
7. **Baylet R, R Camain, G Segretain.** 1959. Identification des agents des maduromycoses du Sénégal et de la Mauritanie. Description d'une espèce nouvelle. Bull Soc Path Exot **52**: 448-477.
8. **Boccaro J E.** 1893. An analysis of of 100 cases of mycetoma. Lancet **2**: 797.
9. **Bojalil L F.** Taxonomia, fisiología e inmunología de Nocardia. IV Congreso Nacional de Microbiología. 3-7 de diciembre, 1962, Monterrey N. L.

10. **Boyd M, E Crutchfield.** 1921. A contribution to the study of Mycetoma in North America. *Amer J Trop Med* **I**: 215-289.
11. **Brasch J, D Gottkehaskamp.** 1992. The effect of selected human steroid hormones upon the growth of dermatophytes with different adaptation to man. *Mycopathologia* **120**: 87-92.
12. **Brumpt E.** 1906. Les Mycétomes. *Arch Parasitol* **10**: 489-572.
13. **Brygoo E R, P Destombes.** 1976. Epidémiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bull Inst Pasteur* **74**: 219-243.
14. **Buot G, P Lavalle, F Mariat, P Suchil.** 1987. Etude épidémiologique des mycétomes au Mexique. A propos de 502 cas. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **80**: 329-39.
15. **Bronson F H, C Desjardins.** 1974. Circulating concentrations of FSH, LH, Estradiol and Progesterone Associated with Acute, Male-Induced Puberty in Female Mice. *Endocrinology* **4**: 1658-1668.
16. **Carter H V.** On mycetoma or the fungus disease of India. Churchill, London. 1874.
17. **Cicero R.** 1912. El micetoma. *Gac Méd Méx* **7**: 291-301.
18. **Chattaway F W, J D Townsley, A J E Barlow.** 1959. Effect of Steroids and Related Compounds on the Growth of Dermatophytes. *Nature* **184**: 1731-1732.
19. **Destombes P.** 1972 (a). Histopatologie des mycétomes. *Ann Soc Belge Med Trop* **52**: 261-276.
20. **Destombes P.** 1972 (b). Mycoses osseuses. *Encyclopedie Medico chirurgicale*.
21. **Destombes P, R Camain, O Nazimoff.** 1958 (a). Anatomie

- pathologique des mycétomes et du pied de Madura en particulier. Bull Soc Path Exot **51**: 863-875.
22. **Destombes P, J Dutour, J Marguet, F Mariat, G Segretain.** 1958 (b). Les mycétomes en Côte Française des Somalis. Bull Soc Path Exot **51**: 575-581.
 23. **Develoux M, J Audoin, J Treguer, J M Vetter, A Warter, A Cenac.** 1988. Mycetoma in the Republic of Niger: Clinical Features and Epidemiology. Am J Trop Med Hyg **38**: 386-390.
 24. **Drutz D J, M Huppert, S. H. Sun, W L McGuire.** 1981. Human Sex Hormones Stimulate the Growth and Maturation of *Coccidioides immitis*. Infect Immun **32**: 897-907.
 25. **Duchmann H, L Träger.** 1979. Progesterone-binding Protein from *Streptomyces hydrogenans*. J Steroid Biochem **10**: 277-283.
 26. **Dubois M, K A Gilles, J K Hamilton, P A Rebers, F Smith.** 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem **28**: 350-356.
 27. **Feldman D, Yung Do, A Burshell, P Stathis, D S Loose.** 1982. An estrogen-binding protein and Endogenous Ligand in *Saccharomyces cerevisiae*: Possible Hormone Receptor System. Science **218**: 297-298.
 28. **González-Ochoa A.** 1942. El micetoma por *Actinomyces mexicanus* Boyd y Crutchfield, 1921, en México. Rev Inst Salub Enf Trop **III** (4): 303-322.
 29. **González-Ochoa A.** 1967. Micetomas y Actinomycosis. Mem XIII Cong Inter Derm München. 819-824.
 30. **Gooday G W.** 1974. Fungal Sex Hormones. Ann Rev Biochem

43: 35-49.

31. **Goodman L S, A Gilman** (Dirs.). Bases Farmacológicas de la Terapéutica. En E B Astwood. Estrógenos y Progestinas. Andrógenos y Esteroides Anabólicos. Págs. 1281-1315.
32. **Gugnani H C, I C Iboko, S E Ikerionwu**. 1986. Pathogenicity of *Nocardia transvalensis* for laboratory mice. Mycopathologia **96**: 79-86.
33. **Hay R J, E S Mahgoub, G Leon, S Al-sogair, O Welsh**. 1992. Mycetoma. J Med Vet Mycol **30** (Suppl 1): 41-49.
34. **Kantjack A A**. 1893. Madura disease (mycetoma) and actinomycetes. J Pathol **1**: 140-162.
35. **Katzenellenbogen B S, J A Katzenellenbogen, D Mordecai**. 1979. Zearalenones: Characterization of the Estrogenic Potencies and Receptor Interactions of a Series of Fungal Beta-Resorcylic Acid Lactones. Endocrinology **105**: 33-40.
36. **Kernbaum S, L Tazi, D Champagne**. 1976. Sexe et susceptibilité aux maladies infectieuses. Bull Inst Pasteur **74**: 359-382.
37. **Klein-Gitelman M S, I S Szer**. 1991. Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection: an unusual complication of immunosuppressive treatment for childhood dermatomyositis. J Rheumatol **18**: 1243-1246.
38. **Koll B S, A E Brown, T E Kiehn, D Armstrong**. 1992. Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection with septic arthritis. Clin Infect Dis **15**: 469-472.
39. **Kwon-Chung K J, Bennett J E**. Mycetoma. En Medical

- Mycology. Lea & Febiger. Malvern, Pennsylvania; 1992: 560-592.
40. **Latapi F, Y Ortiz.** 1963. Los micetomas en México: Algunos datos epidemiológicos relativos a 197 casos. Mem 1er Cong Mex Dermat: 126-144.
 41. **Lavalle P.** 1966. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gac Med Mex **96**: 545-569.
 42. **Laveran A.** 1902. Au sujet d'un cas de mycétome à grains noirs. Bull Acad Med **47**: 773.
 43. **Le Roith D, J Shiloach, J Roth, M A Lesniak.** 1980. Evolutionary origins of vertebrate hormones: Substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA **77**: 6184-6188.
 44. **Loose D S, D J Schurman, D Feldman.** 1981. A corticosteroid binding protein and endogenous ligand in *C. albicans* indicating a possible steroid-receptor system. Nature **293**: 477-479.
 45. **Loose D S, D Feldman.** 1982. Characterization of a Unique corticosterone-binding Protein in *Candida albicans*. J Biol Chem **257**: 4925-4930.
 46. **Loose D S, E P Stover, A Restrepo, D A Stevens, D Feldman.** Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Proc Natl Acad Sci USA **80**: 7659-7663.
 47. **López Martínez R, L J Méndez Tovar, P Lavalle., O Welsh, A Saúl, E Macotela Ruiz.** 1992. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gac Med Mex **128**: 477-481.
 48. **Macotela-Ruiz E, R López-Martínez.** The Epidemiology of

- Mycetoma. In The Epidemiology of Human Mycotic Diseases. Yousef Al-Doory, Charles C. Thomas Pub. Springfield. Illinois. U. S. A. 1975.
49. **Mahgoub E S, I G Murray.** Mycetoma (William Heinemann Medical Books, London, 1973).
 50. **Malacara, G Viveros, C Valverde.** Fundamentos de Endocrinología clínica. 3a ed. La Prensa Médica Mexicana. México. 1979.
 51. **Mariat F.** 1963. Sur la distribution géographique et la répartition des agents de mycétomes. Bull Soc Path Exot **56**: 33-55.
 52. **Mariat F, P Destombes, G Segretain.** 1977. The Mycetomas: Clinical Features, Pathology, Etiology and Epidemiology. Contr Microbiol Immunol **4**: 1-39.
 53. **Márquez de Cantú M J.** Análisis de varianza. En Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. 1a. edición, UNAM, 1988: 361-424.
 54. **Méndez-Tovar L J, C De Bièvre, R López-Martínez.** 1991. Effets des hormones sexuelles humaines sur le développement in vitro des agents d'eumycétomes. J Mycol Méd **118**: 141-143.
 55. **Moeller C A, C S Burton.** 1986. Primary lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection. Arch Dermatol **122**: 1180-1182.
 56. **Mohr J A, H Long, B A McKown, H G Muchmore.** 1972. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to steroids. Sabouraudia **10**: 171-172.
 57. **Ocaranza F.** 1914. El micetoma en Sonora. Bol ciencias Médicas **4**: 433-437.

58. **Orellano Ocampo F, A Arellano Huacuja, C Leon Valle.** 1989. Tratamiento quirúrgico de micetoma localizado en cara. *Med Cutan Ibero Lat Am* **17**: 9-12.
59. **Orio J, P. Destombes, F Mariat, G. Segretain.** 1963. Les mycétomes en côte française des somalis. Revue de 50 cas observés entre 1956 et 1962. *Bull Soc Path Exot* **56**: 161-173.
60. **Peñaloza J A.** 1977. Micetoma de la mama por *Nocardia brasiliensis*. *Rev Mex Dermatol* **21**: 232-233.
61. **Pinoy E.** 1913. Actinomycoze et mycétomes. *Bull Inst Pasteur* **II**: 929-938.
62. **Powell B L, D J Drutz, M. Huppert, S H Sun.** 1983. Relationship of Progesterone- and Estradiol-Binding Proteins in *Coccidioides immitis* to Coccidioidal Dissemination in Pregnancy. *Infect Immun* **40**: 478-485.
63. **Restrepo A, M Robledo, F Gutiérrez, M Sanclemente, E Castañeda, G Calle.** 1970. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis). A study of 39 cases Observed in Medellin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* **19**: 68-76.
64. **Restrepo A, M E Salazar, L E Cano, E P Stover, D Feldman, D A Stevens.** 1984. Estrogens Inhibit Mycelium-to-Yeast Transformation in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for Resistance of Females to Paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* **46**: 346-353.
65. **Rey M.** Les mycétomes dans l'ouest Africain. Medical Thesis. Foulon, Paris, 1961.
66. **Rippon J W.** Mycetoma. In *Medical Mycology. The Pathogenic*

- Fungi and The Pathogenic Actinomycetes. 2th ed., W. B. Saunders Company, 1982: 79-114.
67. **Roth J, D LeRoith, J Shiloach, J L Rosenzweig, M A Lesniak, J Havrankova.** 1982. The Evolutionary Origins of Hormones, Neurotransmitters, and other Extracellular Chemical Messengers. *N Engl J Med* **306**: 523-527.
 68. **Salazar M E, A Restrepo, D A Stevens.** 1988. Inhibition by Estrogens of Conidium-to-Yeast Conversion in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* **56**: 711-713.
 69. **Sandoval Trujillo H (Ed).** Actinomicetos. Microorganismos de la luz. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. 1993.
 70. **Segretain G.** 1972. Epidémiologie des mycétomes. *Ann Soc belge Méd. Trop* **52**: 277-286.
 71. **Segretain G, F Mariat.** 1958. Contribution à l'étude de la mycologie et de la bactériologie des mycétomes du Tchad et de la Côte des Somalis. *Bull Soc Path Exot* **61**: 194-202.
 72. **II Simposio Internacional de Micetomas.** Taxco, Gro., México. Del 16 de 20 de octubre de 1987.
 73. **Shafai R,** 1978. Neonatal Coccidioidomycosis in Premature Twins. *Am J Dis Child (Clinical Memoranda)* **132**: 634.
 74. **Sieratzki H J.** 1992. *Nocardia brasiliensis* infection in patients with AIDS (letter). *Clin Infect Dis* **14**: 977-978.
 75. **Smale L E, J W Birsner.** 1949. Maternal deaths from coccidioidomycosis. *J A M A* **140** (14): 1152-1154.
 76. **Talwar P, S C Sehgal.** 1979. Mycetomas in North India.

Sabouraudia **17**: 287-291.

77. **Vanbreuseghem R.** 1967. Early diagnosis, treatment and epidemiology of mycetoma. *Rev Med Vet Mycol* **6**: 49-60.
78. **Vartivarian S E.** 1992. Overview of Fungal Infections. Virulence Properties and Nonimmune Pathogenetic Mechanisms of Fungi. *Clin Infect Dis* **14** (Suppl 1): S30-6.
79. **Vincent H.** 1894. Etude sur le parasite du pied de Madura. *Ann Institut Pasteur* **8**: 129-151.
80. **Welsh Lozano O, J R López López.** 1985. Micetomas con diseminación pulmonar. *Med Cutan Ibero Lat Am* **13**: 517-523.
81. **Wilson J D, D W Foster.** Textbook of Endocrinology, 7th ed, W B Saunders Company, 1985: 1-75.
82. **Zaias N., D Taplin, G Rebell.** 1969. Mycetoma. *Arch Derm Chicago* **99**: 215-225