

11212



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

31

FACULTAD DE MEDICINA

2 es.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SERVICIO DE DERMATOLOGIA Y MICOLOGIA MEDICA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. BERNARDO SEPULVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SERVICIO DE MICOLOGIA
CENTRO DERMATOLOGICO
"DR. LADISLAO DE LA PASCUA" S.S.

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA RESPUESTA INMUNE
CELULAR EN PACIENTES CON ACTINOMICETOMA

TESIS DE POSGRADO

QUE PRESENTA
WILFRIDO SOLIS Y QUINTAL
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS JAVIER MENDEZ TOVAR



IMSS

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

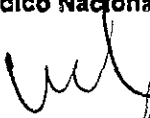
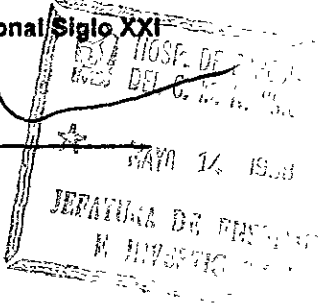
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

DR. NIELS WACHER RODARTE

Jefe de Enseñanza e Investigación

Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"

Centro Médico Nacional Siglo XXI

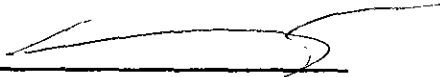



DRA. ADRIANA ELIZABETH ANIDES FONSECA

Profesora Titular del Curso de Postgrado en Dermatología

Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"

Centro Médico Nacional Siglo XXI

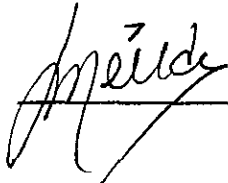


DR. LUIS JAVIER MENDEZ TOVAR

Director de Tesis

Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"

Centro Médico Nacional Siglo XXI



COLABORADORES DE TESIS

DR. FRANCISCO VEGA LOPEZ

**Investigador Asociado
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

DRA. MARIA DEL C. PADILLA DESGARENNES

**Jefa del Servicio de Micología Médica
del Centro Dermatológico de la SSA
"Dr. Ladislao de la Pascua"**

BIOL. RAFAEL MONDRAGON GONZALEZ

**Estudiante de Maestría
Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda"
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

CONTENIDO

RUBRICAS.....	I
COLABORADORES.....	II
CONTENIDO.....	III
INDICE GENERAL.....	IV
RESUMEN.....	VII
LISTA DE TABLAS, GRAFICAS, FIGURAS Y NEXOS.	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
AGRADECIMIENTOS	X

INDICE GENERAL

CAPITULO 1

1.	Generalidades.....	1
1.1.	Definición.....	1
1.2.	Antecedentes históricos.....	1
1.3.	Epidemiología.....	4
1.3.1.	Etiología.....	4
1.3.2.	Fuente de infección.....	6
1.3.3.	Distribución geográfica.....	6
1.3.4.	Frecuencia.....	8
1.3.5.	Ocupación.....	10
1.3.6.	Sexo.....	11
1.3.7.	Edad.....	12
1.3.8.	Vía de entrada.....	12
1.3.9.	Período de incubación.....	13
1.4.	Fisiopatogenia.....	13
1.5.	Cuadro clínico.....	16
1.5.1.	Topografía.....	16
1.5.2.	Morfología.....	17
1.5.3.	Evolución.....	18
1.6.	Diagnóstico.....	19
1.6.1.	Estudios de laboratorio.....	20
1.6.2.	Estudios histológicos.....	22
1.6.3.	Imagenología.....	23
1.6.4.	Inoculación en animales.....	24
1.6.5.	Diagnóstico inmunológico.....	25

1.7.	Pronóstico.....	25
1.8.	Tratamiento del actinomicetoma	26
1.8.1	Tratamiento médico.....	26
1.8.2.	Tratamiento quirúrgico.....	31
1.9.	Eumicetos.....	31
1.10.	Actinomicetos.....	33
1.10.1.	Clasificación.....	33
1.10.2.	Microscopía electrónica.....	38
1.11.	Respuesta inmune en el actinomicetoma.....	40
1.11.1.	Inmunidad celular.....	40
1.11.2.	<i>Inmunidad humoral</i>	44
1.12.	Estudios en pacientes.....	50

CAPITULO 2

2.	Desarrollo de la investigación	
2.1.	Planteamiento del problema.....	52
2.2.	Hipótesis.....	53
2.3.	Objetivos.....	54
2.3.1.	Objetivo general.....	54
2.3.2.	Objetivos específicos.....	54
2.4.	Material y Métodos.....	55
2.4.1.	Diseño del estudio.....	55
2.4.2.	Donadores.....	55
2.4.3.	Pacientes.....	56
2.4.4.	Controles	56
2.4.5.	Antígenos y mitógenos.....	57
2.5.	Ensayo de proliferación celular.....	57
2.6.	Aplicación intradérmica de antígenos.....	62
2.7.	Métodos estadísticos.....	62

CAPITULO 3

3.	Resultados.....	63
3.1.	Edad y sexo.....	63
3.2.	Procedencia y ocupación.....	64
3.3.	Comportamiento clínico y tratamiento.....	65
3.4.	Resultados de las intradermorreacciones.....	68
3.5.	Resultados de proliferación celular.....	73

CAPITULO 4

4.	Discusión y conclusiones.....	75
4.1.	Discusión.....	75
4.2.	Conclusiones.....	81

Anexo 1	83
---------------	----

Anexo 2	84
---------------	----

Bibliografía.....	86
-------------------	----

RESUMEN

El micetoma es un proceso subcutáneo, inflamatorio crónico e infeccioso, producido por hongos o bacterias. En México donde es endémico, el principal agente es *Nocardia brasiliensis*, a pesar de que la población expuesta es grande sólo algunos individuos desarrollan la enfermedad.

En diferentes estudios tanto en animales como en humanos ha quedado demostrado que la respuesta inmune más importante para la protección del micetoma es la respuesta inmune celular.

En este estudio se describe la respuesta inmune celular en pacientes con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* comparados con un grupo de controles endémicos sanos, utilizando ensayos de proliferación celular *in vitro* e intradermoreacciones *in vivo*.

El objetivo de este estudio fue demostrar que los pacientes con actinomicetoma presentan una respuesta inmune celular deficiente al momento de realizar las pruebas de intradermoreacción y proliferación celular.

En los resultados se obtuvo menor intensidad de la respuesta inmune celular ante el estímulo con tuberculina en los pacientes tanto en las pruebas *in vitro* de proliferación celular como en las intradermoreacciones, estos resultados fueron estadísticamente significativos y sugieren una respuesta celular menor que la del grupo control.

Se concluyó que se requiere profundizar el estudio de la inmunidad incluyendo otros indicadores como interleucinas, cuantificación de CD4+ y CD8+, factor de necrosis tumoral, e interferón gamma entre otros, así como ampliar el tamaño de la muestra. También es necesario hacer un estudio longitudinal en cada paciente en diferentes fases de evolución de su padecimiento.

LISTA DE TABLAS, GRAFICAS, IMAGENES Y ANEXOS

Tabla 1.	Agentes del eumicetoma.....	5
Tabla 2.	Agentes del actinomicetoma.....	5
Tabla 3.	Distribución geográfica de los agentes del micetoma.....	8
Tabla 4.	Agentes etiológicos del actinomicetoma en México.....	9
Tabla 5.	Agentes etiológicos del eumicetoma en México.....	10
Tabla 6.	Lesiones anatómicas en el micetoma.....	18
Tabla 7.	Características de los agentes del actinomicetoma.....	21
Tabla 8.	Histología de los granos del actinomicetoma.....	23
Tabla 9.	Clasificación biológica de los actinomicetos.....	34
Tabla 10.	División por familias y metabolismo	35
Tabla 11.	Distribución por edad y sexo de los pacientes estudiados.....	63
Tabla 12.	Distribución por edad y sexo de los controles sanos.....	64
Tabla 13.	Distribución geográfica y ocupación de los pacientes.....	65
Tabla 14.	Evolución clínica del actinomicetoma.....	68
Tabla 15.	Lectura de las intradermorreacciones en pacientes.....	65
Tabla 16.	Lectura de las intradermorreacciones en controles sanos.....	65
Gráfica 1.	Lectura de las intradermorreacciones por candidina.....	70
Gráfica 2.	Lectura de las intradermorreacciones por tuberculina.....	71
Gráfica 3.	<i>Curva de proliferación celular con antígeno Nb-1</i>	73
Gráfica 4.	Proliferación celular con tuberculina.....	74
Figura 1.	Esquema de las placas de proliferación celular.....	61
Figura 2.	Actinomicetoma del pie.....	67
Figura 3.	Actinomicetoma del tórax.....	67
Figura 4.	Intradermorreacción en sujeto sano del grupo control.....	72
Figura 5.	Intradermorreacción en un paciente con actinomicetoma.....	72
Anexo 1.	Hoja de registro de paciente.....	83
Anexo 2.	Hoja de consentimiento informado.....	84

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
LCR	Líquido cefalorraquídeo
SBH	Solución balanceada de Hanks
PHA	Phytohaemagglutinin (Fitohemagglutinina)
Mison	<i>Mycobacterium leprae</i> sonic (Antígeno sonicado de <i>M. leprae</i>)
Con A	Concanavalina A
BCG	Bacilo Calmette-Guérin (Vacuna)
PPD	Derivado proteico purificado (Tuberculina)
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas
Nb-1	<i>Nocardia brasiliensis</i> (Antígeno-1)
PMN	Polimorfonucleares
CMSP	Células de sangre periférica
CPM	Cuentas por minuto
TH0	T helper 0 (Linfocitos T cooperador-0)
Th1	T helper 1 (Linfocitos T cooperador-1)
Th2	T helper 2 (Linfocitos T cooperador-0)
FNT	Factor de necrosis tumoral
IL-2	Interleucina-2
CD4+	Cluster of differentiation 4+(Grupos de diferenciación 4+)
CD8+	Cluster of differentiation 8+(Grupos de diferenciación 8+)
DDS	Diaminodifenilsulfona
TMP-SMZ	Trimetoprim-Sulfametoxazol
AMK	Amikacina
CFT	Cefotaxima

AGRADECIMIENTOS

Al Dios Creador,
por su amor y bondad
porque con cada latido del corazón
renueva nuestra esperanza de vida cada día.

A mi familia
por brindarme con su amor y cariño,
un apoyo sin igual.

A mis grandes amigos
de todos los tiempos pasados y futuros
motivo de alegría y apoyo en la tristeza.

A los maestros
por mostrarme el camino
con paciencia y compartir su sabiduría.

A mi Asesor de Tesis
por ser más que un maestro un gran amigo.

A los pacientes
con todo respeto y cariño
por permitirme ser su amigo y aprender.

A todos aquellos
que no aparecen en esta lista, pero que
contribuyeron en esta etapa de mi vida,
les agradezco de todo corazón sus buenos sentimientos y nobles
acciones.

A todos ustedes como siempre
¡ Muchísimas Gracias !

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. DEFINICION

El micetoma es un síndrome clínico de evolución crónica, debido a la infección de la piel, tejido subcutáneo, aponeurosis, músculo, huesos, y ocasionalmente vísceras. Es causado por una amplia variedad de agentes etiológicos exógenos que pueden ser bacterias aerobias del orden de los actinomicetales (actinomicetoma) ó por hongos (eumicetoma) (1).

El síndrome está constituido por la tríada siguiente: 1) aumento de volumen de la topografía afectada; 2) fistulas a través de las cuales drenan pus; y la presencia de "granos" característicos constituidos por colonias de los agentes causales.

La tríada es utilizada para definir en sentido estricto el micetoma y la presencia de esos criterios establecen el diagnóstico de este padecimiento (2).

1.2. ANTECEDENTES HISTORICOS

La historia del micetoma se inició en India, país en el que se hicieron las primeras observaciones clínicas acerca de este padecimiento. Fue desde este lugar en 1842, cuando Mac Gill lo llamó "tumor de pie". Aunque tuvo varios

nombres autóctonos; fue en el distrito de Madura donde tomó apellido como "pie de Madura", nombre impuesto a esta entidad por Colebrook en 1846.

El origen micótico fue demostrado en 1860 por el trabajo de Van Dike Carter, quien creó el término de "micetoma" cuyo significado es tumor de hongos, nombre mal aplicado ya que no se trata realmente de un tumor y no siempre es causado por hongos.

En 1862 Bidie realizó un mapa sobre la distribución geográfica más frecuente; y Holmsted al extraer una espina vegetal de un paciente, sospechando las posibilidades, estableció el mecanismo de inoculación (3).

En el año 1900, Cicero diagnosticó el primer caso mexicano de micetoma en un campesino del estado de Morelos, 11 años más tarde lo presentó ante la Academia Nacional de Medicina junto con otros cuatro casos más (4).

En 1905, Brumpt sugirió la etiología eumicótica pues afirmó que muchos hongos son capaces de causar el mismo síndrome clínico, más tarde Langeron aplicó el término de micetoma a los casos de etiología por *Actinomyces* y *Nocardia* como si se tratara de especies y hongos filamentosos.

El agente etiológico más frecuente del actinomictoma es *Nocardia brasiliensis*, este microorganismo fue aislado en 1909 por Lindenberg quien lo denominó *Actinomyces brasiliensis*. En 1913, Pinoy realizó la clasificación etiológica y subdividió los agentes etiológicos del micetoma en bacterianos y

micóticos. En el año 1916 las estructuras parasitarias que se eliminan a través de las fistulas fueron llamadas "granos" por Chalmers (5).

González-Ochoa publicó en 1942 "El micetoma por *Actinomyces mexicanus*" en este trabajo demostró que por sus características, este agente era idéntico a *Nocardia brasiliensis* (6). En 1943, la nueva clasificación de Waksman-Henrici denominó a *Actinomyces brasiliensis* como *Nocardia brasiliensis*.

En la primera estadística internacional realizada por Mariat del Instituto Pasteur, informó de 804 casos. En esa casuística estableció también que en Africa predominaban las infecciones causadas por hongos, mientras que en América son más frecuentes los micetomas causados por bacterias (7).

El tratamiento del actinomicetoma hasta 1946, era quirúrgico, con exploración y drenaje de trayectos fistulosos, desbridamiento del tejido enfermo y no en pocas ocasiones amputaciones de las extremidades. Actualmente no se realizan las mutilaciones, estas prácticas han sido abandonadas porque favorecen la diseminación hematogena de la infección. Corresponde a los médicos mexicanos el mérito de haber iniciado el manejo con sulfonas (80). En especial se menciona al Dr. Latapí quien en 1947, trató con sulfonas a un paciente que padecía lepra lepromatosa nodular y micetoma, él observó notable mejoría de ambos padecimientos. Este hallazgo le permitió concluir que debido a que había cierto parentesco entre los actinomicetos y micobacterias era conveniente iniciar el manejo con sulfonas. Primero utilizó promín por vía

intravenosa y diasono por vía bucal. A partir de 1948 con el advenimiento de la diaminodifenilsulfona (DDS), reemplazó los anteriores medicamentos con dosis de 100 a 200 mg de DDS por día, por tiempo prolongado. El éxito se obtuvo sobre todo en los casos por *N. brasiliensis*; posteriormente Latapí y Lavalle utilizaron un esquema con isoniacida y sulfona, los resultados fueron variables y se publicaron en 1954 (20, 8).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

1.3.1 ETIOLOGIA

El síndrome llamado micetoma es un proceso inflamatorio y crónico, producido por diferentes agentes causales los cuales pueden variar según las áreas geográficas. La etiología se debe a dos grupos de agentes: hongos y bacterias aerobias. Entre las treinta y dos especies relacionadas con este padecimiento, veintitrés son hongos (Tabla. 1), y sólo nueve son actinomicetos (Tabla. 2). En México las bacterias o actinomicetos, constituyen 98% de las causas, y los eumicetos sólo 2% (5, 9, 10).

TABLA 1.
AGENTES DEL MICETOMA (5).

I. HONGOS
<ul style="list-style-type: none">• <i>Acremonium kiliense</i>• <i>A. falciforme</i>• <i>A. recifei</i>• <i>Aspergillus nidulans</i>• <i>Curvularia geniculata</i>• <i>C. lunata</i>• <i>Cochliobolus spicifer</i>• <i>Corynespora cassicola</i>• <i>Exophiala jeanselmei</i>• <i>Exserohilum rostrata</i>• <i>Fusarium oxysporum</i>• <i>F. moniliforme</i>• <i>F. solani</i>• <i>Leptosphaeria senegalensis</i>• <i>L. tompkinsii</i>• <i>Madurella grisea</i>• <i>M. mycetomatis</i>• <i>Noeotestudina rosati</i>• <i>Plenodomus avramii</i>• <i>Pyrenochaeta romeroi</i>• <i>P. mackinnonii</i>• <i>Pseudallescheria boydii</i>• <i>Pseudochaetosphaeronema larense</i>

TABLA 2.
AGENTES DEL MICETOMA (6).

II. BACTERIAS
<ul style="list-style-type: none">• <i>Actinomadura pelletieri</i>• <i>A. madurae</i>• <i>Nocardia asteroides</i>• <i>N. brasiliensis</i>• <i>N. caviae</i>• <i>N. dassonvillei</i>• <i>N. farcinica</i>• <i>N. transvalensis</i>• <i>Streptomyces somaliensis</i>

1.3.2. FUENTE DE INFECCION

Las especies de microorganismos productores de micetoma se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente por influencia de factores ecológicos como clima, precipitación pluvial, relieve del suelo y sobre todo por la riqueza de detritus vegetales contenidos en tierras de cultivo.

Casi todos los agentes son saprobios del suelo y tienen como reservorio primario detritus vegetales. Pueden encontrarse como parásitos de las plantas y animales. Han sido identificadas en espinas de las acacias y otros desechos, ocasionalmente también se han aislado de agua dulce o salada.

Las especies patógenas que parasitan al ser humano no se transmiten de hombre a hombre, la fuente de infección son el reservorio primario antes mencionado (10,11,12,)

1.3.3. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Los agentes del micetoma tienen una distribución cosmopolita, pero el padecimiento es endémico en los países tropicales y subtropicales como Senegal, Somalia, Sudán, India, México, Brasil y Venezuela, todos ellos situados entre las latitudes 15°S y 30°N. Las áreas geográficas de estos países se encuentran comprendidas en una banda transversal entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio. Este cinturón geográfico mundial presenta dos tipos de climas: subtropical y tropical senegalés.

El clima y las características del suelo probablemente influyen en la distribución de los diferentes agentes etiológicos. Por ejemplo en nuestro país, que está comprendido en el clima subtropical con un rango de temperatura entre los 10 y 25°C, predominan actinomicetos. En cambio en países asiáticos como India son predominantemente eumicetos por el clima tropical y la temperatura mayor de 25°C; ambas zonas geográficas se caracterizan por presentar condiciones ecológicas semejantes con una estación lluviosa de 6 meses y precipitación pluvial promedio de 150-1000 mm, y humedad relativa de 60 a 80%.

Los países europeos y de América del norte no se encuentran afectados de manera significativa (Tabla. 3), presentan sólo casos aislados, en cambio Sudán es el país africano con mayor prevalencia en el mundo debido a que se han referido hasta 400 casos por año. México ocupa el segundo lugar mundial en endemidad de acuerdo con Lavalle. Cada año se diagnostican 70 nuevos casos, los cuales probablemente no reflejan la realidad, la cifra puede ser mayor si consideramos que la población más afectada pertenece a las clases con nivel sociocultural mas bajo y por lo tanto no acuden hasta etapas tardías o avanzadas de la enfermedad (5,8,11,12,13).

TABLA 3.
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL MICETOMA
Modificada de Carrada T(9).

Región o País	*Actinomicetos	**Eumicetos	No clasificados	Total
África Tropical	196 III, II, I, IV	249 A, E, F, G, H, C, D, J	19	464
México	2058 I, II, III, VI, IV, VIII	47 A, B, C, D, E, I	0	2105
India	65 II, I, IV	32 A, C, E	3	100
Paquistán	14 I	31 A, B, C, H	5	50
Sudamérica	49 I, II, IV, VII	58 B, A, C	1	108
Estados Unidos de América.	31 V	32 C, E, A, B, D	5	68
Nueva Zelanda	2	0	4	6
Arabia Saudita	6 III	6 A	0	12
Europa	3 II	11 C, A	0	14
Antillas	1	3 C	0	4
Japón	10 VI, I	0	0	10

* I) *Nocardia brasiliensis*; II) *Actinomadura madurae*; III) *Streptomyces somaliensis*; IV) *A. pelletieri*; V) *N. dassouvillei*; VI) *N. asteroides*; VII) *S. paraguayensis*; VIII) *N. caviae*.

**A) *Madurella mycetomatis*; B) *M. grisea*; C) *Scedosporium apiospermum*; D) *Acremonium* sp, E) *L. senegalensis*; F) *N. rosatii*; G) *P. romeroi*; H) *Aspergillus nidulans*; I) *E. jeanselmii*; J) *L. tompkinsii*.

1.3.4. FRECUENCIA

En México el micetoma es el más frecuente de los síndromes subcutáneos infecciosos que se diagnostican en la consulta dermatológica; el valor porcentual que representa es 65% (13). En cuanto a la distribución en este país el estudio con mayor casuística (de 2,105 casos) reveló que los

estados con mayor frecuencia son: Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Morelos, y Guerrero (14). La entidad se extiende en todo el territorio nacional, pero existe cierto predominio en el centro, norte y noroeste de la República (8).

Los agentes etiológicos predominantes son los actinomicetales en 97.8%, y en este grupo, la mayor cantidad de casos se debió a *Nocardia brasiliensis* en 86.6 % y *Actinomadura madurae* en 10.2% (Tabla. 4). Las otras especies de actinomicetales se presentaron con una frecuencia muy inferior.

Los eumicetomas se presentaron solo en 2.2% de los casos (Tabla 5) y los agentes principales fueron *Madurella grisea* y *M. mycetomatis* (14).

TABLA. 4.
AGENTES ETIOLOGICOS DEL ACTINOMICETOMA EN MEXICO
 Tomada de López y cols.(14)

AGENTES	NÚMERO	%
<i>Nocardia brasiliensis</i>	1351	86.6
<i>N. asteroides</i>	18	1.2
<i>N. caviae</i>	4	0.2
<i>A. madurae</i>	159	10.2
<i>A. pelletieri</i>	8	0.5
<i>S. somaliensis</i>	20	1.3
TOTAL	1 560	100.0

TABLA 5.
AGENTES ETIOLOGICOS DEL EUMICETOMA EN MEXICO

AGENTE	NÚMERO	%
<i>Madurella grisea</i>	15	32.0
<i>M. mycetomatis</i>	13	27.6
<i>Scedosporium apiospermum</i>	5	10.6
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	1	2.1
<i>Madurella spp</i>	1	2.1
<i>Fusarium spp</i>	2	4.3
<i>Acremonium spp</i>	2	4.3
Agente eumicótico	8	17.0
TOTAL	47	100.0

1.3.5. OCUPACION

El micetoma se presenta típicamente en personas dedicadas a labores de campo como los agricultores, leñadores y aquellos que de manera directa se exponen a los agentes saprobios contenidos en el material orgánico de la tierra. Entre este grupo eventualmente se mencionan albañiles, mecánicos, cargadores y estudiantes en áreas rurales.

El riesgo es directamente proporcional a la exposición, de manera que la falta de calzado adecuado y ropa segura que evite microtraumatismos aumenta las posibilidades de contraer el padecimiento (5,8,14,15).

1.3.6. SEXO

Los trabajos publicados acerca del micetoma por distintos autores, indican su predominio en el sexo masculino; La relación de acuerdo a diferentes autores va de 3:1 hombre/mujer hasta 6:1 y probablemente la edad influya de manera importante. El sexo masculino parece ser más vulnerable excepto cuando el agente causal es *A. madurae* que se presenta más en las mujeres en una relación de 2:3 (15,16,17,81).

Esta observación ha dado pie a dos diferentes hipótesis: La primera intenta explicar que ésto se debe sólo a la probabilidad de exposición laboral, pero cabe mencionar que en países como India y México, la mujer campesina participa a menudo con igual frecuencia de actividades agrícolas que el hombre, por lo tanto el grado de exposición y riesgo de inoculación es el mismo que existe para hombres y mujeres.

La segunda hipótesis intenta explicar este predominio en base a diferencias hormonales existentes; para apoyar este postulado se han realizado estudios *in vitro* en los que el medio de cultivo fue enriquecido con andrógenos y se obtuvo mayor desarrollo de las colonias de *N. brasiliensis*; en cambio, cuando se les agregaron progestágenos al medio el desarrollo fue menor.

Además durante la pubertad para ambos sexos empeora la expresión clínica del padecimiento. El embarazo implica empeoramiento del padecimiento

el cual se hace más florido en sus manifestaciones y en ambos casos hay gran actividad y cambios bioquímicos hormonales importantes (8,18,19).

1.3.7. EDAD

El micetoma puede encontrarse en diferentes grupos etarios, y la morbilidad es mayor en personas de la segunda a la tercera década de la vida (35%). La edad promedio de presentación es entre los 16 y los 45 años. Los extremos de la vida presentan menor frecuencia. Los ancianos mayores de 60 años constituyen 8.3% de los casos, mientras que los niños tienen la frecuencia más baja. Antes de los quince años de edad la predisposición en ambos sexos es igual, y varía de 3.7 a 11.5%. (14, 18, 19).

1.3.8. VIA DE ENTRADA

La infección inicia cuando los microorganismos penetran el tejido subcutáneo a través de una solución de continuidad, debido a que el hábitat de los agentes es el suelo, el padecimiento es más frecuente en trabajadores del campo expuestos a materiales contaminados como tierra, espinas y otros detritus vegetales (5, 8, 9, 10).

La herida puede ser imperceptible en algunos casos, como consecuencia de microtraumatismos y el paciente no puede identificar el mecanismo y tampoco lo refiere, pero en otros casos ha sido relacionada

directamente con lesiones por clavos, machetes y hasta mordidas de animales salvajes y domésticos (11, 42).

1.3.9. PERIODO DE INCUBACION

Se desconoce el período de incubación. Después de la penetración del agente causal, la sintomatología puede aparecer algunos meses o años más tarde, y depende de la cantidad del inóculo, la virulencia de la cepa y desde luego el estado inmunitario del hospedero (20, 21, 42).

1.4. FISIOPATOGENIA

La capacidad de un microorganismo para producir daño y por lo tanto enfermedad, depende de múltiples y variados mecanismos de agresión. La virulencia es el grado de patogenicidad que determina en gran parte la evolución benigna o gravedad de las infecciones. El mecanismo de patogenicidad pueden ser directo por toxinas (exotoxinas y endotoxinas), por reacciones de hipersensibilidad (anafiláctica, celular, citotóxica, o por complejos), por daño físico, y particularmente químico enzimático (22).

Nocardia brasiliensis es un parásito intracelular facultativo. Una vez que ha sido fagocitado puede permanecer viable y replicarse dentro de las células, los antígenos de *N. brasiliensis* pueden estimular la respuesta inmune celular y

humoral (23). La actividad patógena de *N. brasiliensis* se debe a su capacidad de penetración, establecimiento, multiplicación, invasión, infección, y virulencia.

Las fases principales que se usan para describir la patogenia del micetoma son tres: 1) fase de adaptación del germen a los tejidos, 2) fase de proliferación local y 3) fase de invasión.

La fase de adaptación inicia con la introducción del microorganismo a la piel del hospedero, los parásitos intracelulares facultativos son fácilmente fagocitados, pero a veces son resistentes a la muerte intracelular, la mayoría de microorganismos de esta categoría infectan células reticuloendoteliales y provocan la formación de granulomas, entonces se desarrolla el proceso patológico.

Las primeras reacciones inflamatorias se presentan alrededor de la semana sexta y octava, puede haber dolor y una sensación local profunda y desagradable de predominio nocturno. Después de varios días aparece un nódulo, seguidamente aumento de volumen de la región afectada y aparecen fistulas por las que se expulsan granos y se organizan nuevos nódulos, la zona edematosa se hace fibroesclerosa con la cronicidad del padecimiento.

Se ha demostrado que las cepas de *N. brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma presentan mayor patogenicidad y virulencia que las cepas aisladas del medio ambiente cuando se inoculan en animales de experimentación, estos cambios sin embargo no se sabe exactamente a qué se deban (24).

Las enzimas bacterianas pueden favorecer la invasión tisular y se ha demostrado en *Nocardia brasiliensis* la producción de hemolisinas, colagenasas, lipasas y desoxirribonucleasas, sin embargo, la intervención de estos compuestos en la fisiopatogenia del micetoma no se ha podido establecer, ya que los estudios cualitativos comparativos entre producción enzimática de hemolisinas, lipasas, desoxirribonucleasas y coagulasas realizadas entre cepas aisladas de pacientes y cepas aisladas del medio ambiente no mostraron diferencia. Además el nivel de producción de las enzimas tampoco mostró diferencia entre cepas antiguas mantenidas por varios años por resiembra en medios de Sabouraud simple y cepas de aislamiento reciente (26,27,28,29).

La fase de proliferación ocurre cuando el parásito se establece y reproduce activamente en los tejidos. La mayoría de autores han observado que la vía nerviosa y los tendones son muy resistentes a la infección o invasión por *Actinomadura* y *Nocardia*, en algunos casos por *N. brasiliensis* la infección puede ascender deslizándose sobre las vainas musculares, pero es difícil valorar su avance solo por clínica y radiología.

La fase de invasión se caracteriza por la diseminación de la infección a la hipodermis, los músculos, el esqueleto, y las articulaciones. Las bacterias pueden difundirse por contigüidad, o utilizando las vías linfática, hemática o nerviosa. Cuando se daña la vasculatura se presentan arteritis y flebitis las cuales pueden complicarse con trombosis.

La afección por contigüidad al tejido óseo depende del agente causal, se ha corroborado que *A. pelleteri* es el más osteofílico seguida en orden decreciente por *Nocardia* sp, *S. somaliensis*, *A. madurae* (30). Aunque las vías linfáticas y hemática ofrecen pocas posibilidades de propagación a distancia en los casos por *Nocardia* (31), la diseminación linfática puede ocurrir en 4% de los actinomicetomas y es más rara la propagación hematogena. Se ha publicado 13 casos de diseminación linfática, 11 de ellos causados por *S. somaliensis* y 2 por *M. mycetomatis* (32, 33).

1.5 CUADRO CLINICO

1.5.1. TOPOGRAFIA

El micetoma puede afectar cualquier sitio del cuerpo, habitualmente permanece localizado, y solo en pocos casos se disemina a otro sitio de la piel y raramente a otro órgano (Tabla. 6). En México, afecta principalmente las extremidades inferiores y en particular los pies (33.5%), aunque puede observarse en orden decreciente de frecuencia en cualquier otra localización como; piernas y muslos (30.6%), tronco (17.4%), extremidades superiores (13.6%), cabeza y cuello (2.5%) y en pocos casos se encuentran afectadas dos o más regiones (2.4%)(14). Cuando se presenta en la pared torácica puede invadir el pulmón por contigüidad o por vía hematogena, esta condición es grave y de pronóstico reservado (34). Los casos que afectan pulmones, hígado,

bazo, médula ósea o cerebro han sido letales (35,36). La afección ósea es muy frecuente hasta 95% de los casos y puede presentarse periostitis, destrucción articular, anquilosis, osteítis, osteofibrosis, geodas, osteopenia, y osteoporosis del sitio afectado por falta de uso y atrofia (31).

1.5.2. MORFOLOGIA

El síndrome anatomoclínico se caracteriza por aumento de volumen, deformación de la región y presencia de numerosos orificios fistulosos por donde drena líquido filante, ocasionalmente seropurulento. En el líquido exudado se encuentran las estructuras llamadas “granos”, los cuales son un agrupamiento de bacterias pseudofilamentosas en el caso del actinomicetoma.

El orificio de la fistula presenta a menudo un rodete mamelonado, nodular (8, 13, 76).

TABLA. 6.
LESIONES ANATOMICAS EN EL MICETOMA

Tomado y modificado de Magaña M.(37).

• Piel y tejido celular subcutáneo	Fístulas, microabscesos, zonas de fibrosis con cambios de coloración
• Músculos	Miositis y degeneración
• Tendones	Cambios mínimos, son resistentes
• Nervios periféricos	Hipertrofia o esclerosis
• Vasos linfáticos	Inflamación y embolización bacteriana
• Vasos sanguíneos	Arteritis, flebitis, y trombosis
• Ganglios linfáticos	Hiperplasia y rara vez invasión
• Huesos	Periostitis, osteólisis, cavidades, osteofibrosis.

1.5.3 EVOLUCION

El micetoma es un proceso inflamatorio crónico. En la mayoría de los individuos afectados el comportamiento clínico es similar sin importar el agente causal. Algunas veces cuando el agente es *N. brasiliensis*, o *A. pelleteri* el proceso es mas inflamatorio, osteofílico, y polifistulizado; en cambio en aquellos casos producidos por *A. madurae* o *S. somaliensis* son de consistencia leñosa debido a la fibrosis y presentan menor cantidad de fistulas, pero son igual de osteofílicos.

Las formas clínicas atípicas, conocidas como los minimicetomas tienen pocas fistulas y escaso aumento de volumen, casi nunca lesionan hueso, y se presentan en niños o adolescentes, otras veces no forman fistulas o tienen presentación intraósea. Los síntomas son escasos, y al inicio es indoloro, rara

vez se presenta prurito, principalmente al abrirse la fístula. Puede presentarse dolor cuando se complica con lesiones osteolíticas o se agregan otros agentes infecciosos bacterianos. La infección agregada puede ser importante en algunos casos y se distingue por la aparición de fiebre, malestar general y adenopatías (9, 42).

1.6 DIAGNOSTICO

En general el diagnóstico clínico de micetoma es fácil, pero algunos casos atípicos pueden confundirse con otros síndromes de localización subcutánea, por lo tanto el diagnóstico diferencial se debe hacer con los procesos que afectan huesos como osteomielitis, así como otros padecimientos infecciosos como la tuberculosis colicuativa, esporotricosis, actinomicosis, coccidioidomicosis, hidrosadenitis y furunculosis.

El diagnóstico etiológico se establece por el aislamiento del agente causal y para la identificación de *N. brasiliensis* se utilizan pruebas fisiológicas especiales entre las que tenemos hidrólisis de caseína, xantina, hipoxantina y crecimiento en gelatina al 0.4%. Otro estudio es el crecimiento a diferentes temperaturas (20,30,32,38).

1.6.1 ESTUDIOS DE LABORATORIO

OBTENCION DE MUESTRA

El material que se obtiene para el estudio directo y siembra puede ser cualquiera de los siguientes: 1) exudado filante de las fístulas; 2) biopsia de tejido afectado cuando no hay exudado o fístulas activas; y 3) expectoración o lavado bronquial si hay afección pulmonar (21, 39).

EXAMEN DIRECTO

Para el examen directo, se coloca el material en el portaobjetos, se aplica una gota de lugol, solución salina, o hidróxido de potasio al 20% y se aplica el cubreobjetos. La observación de los granos establece el diagnóstico, los de *N. brasiliensis* son microscópicos en cambio los *A. madurae* y eumicetos son macroscópicos y visibles hasta sin microscopio (Tabla. 7).

Cuando se trata de un grano por *Nocardia* su aspecto es microsinfonado y mide 50-150 μm de tamaño, su color es blanco, o amarillento, multilobulado, con aspecto arriñonado o feto, puede presentar numerosas clavav periféricas que miden a veces más de la mitad del grano. A pesar de que por clínica y epidemiología se establece el diagnóstico de presunción, el diagnóstico etiológico final sólo se realiza con la obtención y la identificación del agente, en los casos por actinomicetos la identificación de la especie solamente se logra con las reacciones metabólicas (38).

CULTIVO

Después de obtener los granos del exudado de las fistulas, éstos se lavan con solución salina isotónica en varias ocasiones hasta limpiarlos, en cambio si el material se obtiene de una biopsia no es necesario lavarlos; posteriormente se puede realizar la siembra en agar sangre, infusión cerebro corazón, medio de Löwestein-Jensen y Sabouraud simple con extracto de levadura y se incuban en aerobiosis a temperatura ambiente de 25 y 37°C. El desarrollo de la colonia de actinomicetos ocurre entre 8 a 15 días (38, 39). Las principales características se describen en la tabla 7.

TABLA 7.
AGENTES DEL ACTINOMICETOMA
 Tomada y modificada de López-Martínez et al.(39).

AGENTE	EXAMEN DIRECTO	CULTIVO
<i>Nocardia</i> sp	Granos lobulados de color amarillento que miden de 150 a 500 μ m, son de consistencia blanda, y ocasionalmente con clavazas periféricas.	Colonias rugosas, de aspecto y consistencia cerea de color blanco amarillento o anaranjado, se desarrollan en dos a tres semanas.
<i>Actinomadura madurae</i>	Granos lobulados de color blanco, con 1 a 5 mm de diámetro, de color amarillento o rosado y de consistencia blanda	Colonias de aspecto membranosa o cerebriforme, de color beige o ligeramente rosa, crecen moderadamente rápido.
<i>Actinomadura pelletieri</i>	Granos redondos u ovalados, de color rojo coral, de 200 a 500 μ m de diámetro, y de consistencia dura.	Colonias de aspecto granuloso, de color blanco al inicio, después rosa y por último rojo cereza, su crecimiento es muy lento.
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Granos redondos o multilobulados, de color amarillo marrón, con tamaño variable de 250 μ m a 2 mm, y de consistencia dura.	Colonias de aspecto ceráceo, de color beige con manchas oscuras en su superficie, el crecimiento es moderado rápido. Aparecen 10 a 15 días después de la inoculación.

1.6.2. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

El estudio de la biopsia de piel revela cambios en la epidermis con acantosis irregular, e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. La dermis superficial y profunda presenta infiltrado granulomatoso, microabscesos con polimorfonucleares, macrófagos, plasmocitos y linfocitos. Algunas veces pueden haber granulomas tuberculoides aunque ésto es raro. Las fístulas formadas por la confluencia de los microabscesos se encuentran rodeadas por fibras de colágeno fibroso.

El estudio de los cortes cutáneos teñidos por hematoxilina y eosina permite distinguir los diferentes agentes patógenos teniendo en cuenta su tamaño, forma, y afinidades tintoreales. Los granos pueden encontrarse en el centro de los microabscesos con sus características morfológicas y tintoreales y ayudan a la resolución del diagnóstico en 90% de los casos. Las principales características de los granos según el agente causal se resumen en la tabla 8.

En el caso de *Nocardia* sp el grano es multilobulado y se tiñe poco en la periferia con hematoxilina y toma color lila; en cambio en su centro toma color rosa con eosina (40).

TABLA 8.
HISTOLOGIA DE LOS GRANOS DE ACTINOMICETOMA
 Tomada de López-Martínez R et al (39).

Agente	Color	Tamaño	Forma	Consistencia
<i>Nocardia</i> sp	Amarillo o blanco	25-150 μ m	Redondeado, lobulado arriñonada, con bordes pectinados. Se tiñe de azul pálido y puede tener masas	Blanda
<i>Actinomadura madurae</i>	Blanco o rosado	0,5-5 mm	Cartográfico, irregular con una red densa de filamentos periféricos, y con masas eosinofílicas grandes.	Blanda
<i>Actinomadura pelletieri</i>	Rojo	0,3-0,5 mm	Curvilíneo, de bordes lisos, finamente denticulados, coloración homogénea por hematoxilina, sin masas.	Firme o blanda
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Amarillo	0,5-2 mm	Redondo u oval de bordes lisos, con una matriz eosinofílica y estriada sin masas.	Duro

1.6.3. IMAGENOLOGIA

Los estudios radiológicos son necesarios en todos los casos de micetoma, aun cuando su aspecto sea moderado o intrascendente y sobre todo si la evolución es crónica. Sirven para determinar grado de afección ósea, y el pronóstico de la enfermedad, ya que si el hueso permanece indemne, la curación clínica y definitiva es factible; por el contrario, si ya ha sido invadido la respuesta al tratamiento médico es menor. Por medio de la radiografía simple se pueden valorar los daños óseos como zonas radiolúcidas grandes en los casos producidos por hongos, mientras que en aquellos relacionados con bacterias las áreas radiolúcidas son pequeñas y dispersas.

La osteítis se detecta como irregularidad en la superficie cortical y mayor densidad ósea; la osteofibrosis se aprecia como una lesión periósea con disminución de la densidad, las geodas equivalen a cavidades óseas, se advierten en los estudios radiológicos como espacios oscuros.

También puede ser útil en lesiones más pequeñas los estudios de tomografía computarizada y resonancia magnética, sobre todo para aquellos casos graves de afección visceral. Los casos crónicos que afectan las extremidades pueden complicarse con zonas de fibrosis y obstrucción de los vasos, en estas situaciones el daño de los paquetes vasculares se manifiesta clínicamente como arteritis o flebitis, y puede presentarse trombosis, en tales casos están indicados los estudios de angiografía selectiva (31, 41,82).

1.6.4 INOCULACION EN ANIMALES

La inoculación en animales se debe realizar cuando se requiera conocer la virulencia del microorganismo. Los animales utilizados para modelo experimental son: ratones, hámsters o cobayos. Una vez que se ha elegido el animal, se aplica el inóculo por vía subcutánea y posteriormente, se sacrifica y estudia histológicamente, también se recomienda hacer cultivos del material histológico (39).

1.6.5. DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

El diagnóstico serológico del micetoma en general es difícil debido principalmente a la reactividad cruzada que presentan los antígenos empleados. Recientemente Salinas Carmona y colaboradores publicaron la obtención de un antígeno proteico de 26 kD y otro de 24 kD. los cuales son útiles para el diagnóstico utilizando la prueba de ELISA (42, 43).

En cuanto a la utilidad de la aplicación intradérmica de antígenos para fines diagnósticos ha tenido hasta la fecha escaso valor, ya que como se demuestra en el trabajo de Ortiz-Ortiz, las intradermorreacciones, son positivas en pacientes y en personas sanas que viven en zonas endémicas (66).

1.7. PRONOSTICO

El pronóstico del micetoma al igual que en otros padecimientos infecciosos, se relaciona directamente con cuatro condiciones: 1) agente ; 2) topografía clínica; 3) gravedad dada por extensión y profundidad. y 4) estado inmunológico del paciente. Por ejemplo los actinomicetomas causados por *N. brasiliensis* localizados en pie, sin lesión perióstica tienen mejor pronóstico (13,17,20,23).

1.8 TRATAMIENTO

1.8.1. MEDICO

El tratamiento del actinomicetoma por *N. brasiliensis* a base de sulfas ha demostrado un índice de efectividad en 95% de los casos desde su introducción como medida terapéutica en 1947. Actualmente el esquema más usado es: Diaminodifenilsulfona (100 a 200 mg/día) más trimetoprim-sulfametoxazol (80/400 mg/día) o Sulfametoxipiridazina 500 mg por día sola o combinada con trimetoprim-sulfametoxazol. Aunque la mejoría clínica en caso de buena respuesta es notable a partir del cuarto o sexto mes de tratamiento, la eficacia se valora a largo plazo dos o tres años después. Otros esquemas terapéuticos incluyen la combinación de sulfonamidas con: estreptomina, rifampicina, isoniacida, amikacina, o clofazimina (44). A continuación se mencionan las características más importantes para estos fármacos.

La estreptomina es un aminoglucósido del grupo de las estreptidinas, no se absorbe por vía bucal. La sal con menos efectos colaterales es el sulfato de estreptomina y su administración es intramuscular. La eliminación se realiza por filtración glomerular.

La dosis habitual se calcula a razón de 14 mg por kg. por día (1 g por día) por un mes, y posteriormente cada tercer día. Su principal efecto adverso es la ototoxicidad vestibular (45).

La rifampicina es un derivado semisintético de rifamicina B. Actúa bloqueando la síntesis proteica por inhibición de la enzima DNA-RNA polimerasa de las bacterias susceptibles. Se absorbe bien por vía bucal y alcanza buenas concentraciones en ayuno.

La dosis del adulto es 600 mg día, por varios meses y puede combinarse con isoniacida. El principal efecto adverso es la hepatotoxicidad, por ésto es necesario mantener la vigilancia de las pruebas funcionales hepáticas (46,47,48).

La isoniacida es un antibiótico bactericida antifímico, inhibe la síntesis de los ácidos micólicos constituyentes de la pared bacteriana, se absorbe bien por el tracto digestivo, debe ser administrada una hora antes o dos después de los alimentos o antiácidos. Se distribuye bien y alcanza el LCR. Se metaboliza en hígado por acetilación de la enzima N-acetiltransferasa, produciendo acetilisoniacida, que posteriormente se hidroliza y libera ácido isonicotínico y acetilhidracina; ambos son derivados activos y sus metabolitos son eliminados en la orina. La dosis es de 5 mg por kg. hasta un máximo de 300 mg por día durante más de seis meses. Entre los fenómenos colaterales que produce se han informado: irritación gastrointestinal, reacción de hipersensibilidad, neurotoxicidad, neuritis periférica y hepatotoxicidad. Se ha utilizado para actinomicetoma por *N. brasiliensis* sin afección ósea, obteniéndose con ella la

curación en 2 de 5 pacientes. Se necesita vigilar la función hepática y se recomienda aplicar piridoxina (vitamina B6) para prevención de la neuritis periférica (48)

La amikacina pertenece al grupo de los aminoglucósidos semisintéticos obtenido a partir de kanamicina A, lo cual le confiere mayor espectro. Es un antibiótico bactericida, actúa inhibiendo la síntesis proteica a nivel ribosomal. Su efecto contra *Nocardia brasiliensis* se ha demostrado *in vivo* y también *in vitro*.

En el tratamiento del actinomicetoma se indica por ciclos, cada uno está constituido por 21 días, durante los cuales se aplica 15 mg por Kg. por día dividido en dos aplicaciones por vía intramuscular: Se combina con trimetoprim-sulfametoxazol (7 y 35 mg por kg. por día respectivamente) durante cinco semanas y se intercalan descansos de 15 días. Se recomienda aplicar tres ciclos, sobre todo en los casos que no responden al manejo convencional o cuando la vida está en peligro.

La cantidad de ciclos necesarios para la curación del padecimiento según la literatura médica varía de uno a tres, y al concluir se aconseja administrar diaminodifenilsulfona. Una vez que se logra la curación de los pacientes la vigilancia se mantiene cada 6 meses por un período de 7 años.

Según Welsh la combinación de estreptomina con DDS o con trimetoprim-sulfametoxazol y amikacina con trimetoprim-sulfametoxazol son los

mejores regímenes de tratamiento para actinomicetomas resistentes y extensos.

Los efectos adversos gastrointestinales son mínimos, pueden presentarse además hipoacusia neurosensorial. Es importante vigilar la función auditiva y renal ya que la amikacina puede ser nefrotóxica. Se recomienda dar suplementos de calcio a estos pacientes, pero no vitamina D (49).

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal. Dos compuestos han sido usados para el tratamiento del actinomicetoma: 1) tetraciclinas de primera generación y acción corta como oxitetraciclinas, las cuales se administran a dosis de 1.5 a 2 g por día por un período de uno a dos años; 2) las tetraciclinas de segunda generación y acción prolongada como minociclina a dosis de 200 mg por día por uno o dos años.

Las tetraciclinas se absorben fácilmente en el duodeno, hay que tomar en cuenta la administración de alimentos, leche y cationes divalentes o trivalentes cuando se usan las de primera generación porque disminuyen su absorción; en cambio las tetraciclinas de segunda generación se absorben bien a pesar de los alimentos.

Entre los efectos adversos pueden presentarse náusea, vómito, vértigo, y pigmentación residual. Están contraindicadas en menores de 12 años, mujeres lactando o embarazadas (50).

Se han sugerido otros esquemas terapéuticos como : Amoxicilina y ácido clavulánico. La amoxicilina es un antibiótico beta lactámico semisintético

derivado de las penicilinas. El ácido clavulánico es capaz de inhibir las enzimas betalactamasas que hacen resistentes a las bacterias, y se obtiene de *Streptomyces clavuligerus* (51). Se ha visto que los casos resistentes por *N. brasiliensis* con afección ósea o visceral pueden responder a este régimen de tratamiento a dosis de 500 mg y 125 mg respectivamente cada 8 h por vía bucal por 5 meses; la mejoría se observó a las 6 semanas, y la remisión completa a las 18 semanas. No se observaron recidivas 6 meses posteriores al tratamiento (52).

Después de aplicar cualquiera de los esquemas mencionados, se debe continuar con diaminodifenilsulfona, y realizar vigilancia clínica y hematológica con citometrías hemáticas porque la sulfona puede ocasionar anemia hemolítica.

1.8.2. TRATAMIENTO QUIRURGICO

El diagnóstico temprano es esencial en el eumicetoma antes de que la destrucción de los tejidos sea demasiado extensa, incluso así es necesaria la combinación del tratamiento médico y quirúrgico para lograr curación completa.

En el manejo quirúrgico se procede a explorar trayectos fistulosos para proporcionar drenaje adecuado y se extirpa el tejido enfermo. Las recidivas son frecuentes, pero la amputación de una extremidad sólo se realiza cuando han fracasado las instancias médicas. El tratamiento con cirugía es completo en algunos casos tempranos, pero en la mayoría de las veces es paliativo, las recidivas son comunes hasta en el 100% de los pacientes que han sido manejados con esta modalidad (82).

Actualmente el tratamiento quirúrgico para el actinomicetoma muy rara vez se indica, debido a la excelente respuesta terapéutica con antibióticos combinados. La cirugía no es de primera elección y está contraindicada debido a que ésta puede favorecer el desarrollo de cuadros diseminados. En la República Mexicana esta práctica ya no se realiza (5,13,21).

1.9. EUMICETOS

El número de hongos que se ha relacionado con el micetoma es veintidós, pero los principales agentes etiológicos son: *Madurella mycetomatis*,

M. grisea, *Pyrenochaeta romeroi*, *Scedosporium apiospermum*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Acremonium kiliense*, *A. recifei* y *A. falciforme* (5,52).

Los eumicetomas son más frecuentes en Asia y África en cambio en América predominan los actinomicetomas. En México el eumicetoma representa el 2.2% de los casos y predominan los hongos negros *M. grisea* y *M. mycetomatis*, otras especies son poco frecuentes (14).

Los granos pueden verse en el exudado con la ayuda de una lupa y pueden ser de color negro (por hongos dematiáceos), o de color blanco (por hongos blancos o hialinos) (21).

Sin importar el agente tanto el eumicetoma como el actinomicetoma comparten aspectos epidemiológicos y clínicos similares como: cronicidad, fuente de infección, vía de entrada, predominio en el sexo masculino, afección principalmente en extremidades, y relación con actividades agrícolas. El diagnóstico etiológico se fundamenta en la morfología microscópica y macroscópica de las colonias, y el estudio histopatológico de los granos. La identificación del agente es indispensable para indicar un tratamiento racional.

El tratamiento quirúrgico con extirpación completa es efectiva cuando es posible, en cambio el tratamiento médico es muy difícil, para ello se utilizan derivados imidazólicos como ketoconazol e itraconazol y el derivado poliénico anfotericina B.

1.10 ACTINOMICETOS

ETIMOLOGIA

Etimológicamente el término actinomiceto es una palabra compuesta que procede del idioma griego. El prefijo *actino* significa, rayos de luz, sol, o emanaciones, y *mykes*, significa hongo. Por lo tanto actinomiceto literalmente significa "hongo en forma de sol o radiado".

1.10.1 CLASIFICACION

Los actinomicetos son un grupo heterogéneo de bacterias relacionadas filogénicamente con micobacterias, fueron considerados al principio como hongos debido a la estructura pseudofilamentosa de algunas de las especies de este grupo, sin embargo, actualmente se ha establecido que por sus características morfológicas y bioquímicas no pertenecen al reino de los hongos, algunas especies son de interés médico porque son patógenas para el hombre y animales, ésto es particularmente notable en el género *Nocardia* y *Streptomyces* los cuales son capaces de producir en el hombre: micetoma, nocardiosis, estreptotricosis, neumonía alérgica y actinomicosis entre otras enfermedades (23,20). Los actinomicetos patógenos y el grupo coreniforme son conocidos como bacterias superiores, pertenecen al reino Monera y se clasifican como lo señala la tabla 9.

TABLA 9.
CLASIFICACION DE ACTINOMICETOS
 Tomada de Arenas (20).

• Superreino	Procariota
• Reino	Monera
• División	Schizomycota
• Clase	Eubacter
• Orden	Actinomicetales

DIVISION POR FAMILIAS

Los actinomicetos se dividen en grupos por familias y de acuerdo a sus capacidades metabólicas tienen la facultad para degradar o utilizar los restos de materia orgánica, pueden ser oxidativas como las geofílicas que se encuentran en los suelos, o fermentativas como las parasitarias que conforman la biota de las cavidades de los animales y el hombre (Tabla 10).

El ciclo de desarrollo de los actinomicetos incluye: la formación de cocos, inducción bacilar, formación de pseudomicelios, esporulación, formación de pseudomicelio secundario, esporulación de pseudomicelio secundario y fragmentación con formas cocoides o bacilares (54).

Las colonias de estas familias tienen en común que crecen lentamente, el olor es semejante al que desprende la tierra húmeda, y su aspecto es ceroso.

Se tiñen bien con tinción de Gram y de Kinyoun, esta última es especialmente útil en el caso de los actinomicetales del género *Nocardia*, debido a que son poco ácido-alcohol-resistentes y se decoloran en exceso

cuando se aplica la técnica habitual de Ziehl-Nielsen. La identificación precisa de una especie particular, se hace con técnicas de análisis que toman en cuenta características morfológicas de las colonias (tanto macroscópicas como microscópicas) y propiedades bioquímicas de la pared celular (39,55).

**TABLA 10.
FAMILIAS DE ACTINOMICETOS**

DIVISION SEGUN SU METABOLISMO (22)	
I. FERMENTADORES (parásitos)	II. OXIDATIVOS (geofílicos)
I. <i>Actinomycetacea</i>	II. <i>Mycobacteriaceae</i> III. <i>Frankiaceae</i> IV. <i>Actinoplanaceae</i> V. <i>Dermatophilaceae</i> VI. <i>Nocardiaceae</i> VII. <i>Streptomycetaceae</i> VIII. <i>Micromonosporaceae</i>

I. Familia *Actinomycetaceae*

Comprende las formas parasitarias de cavidades mucosas de animales y el ser humano, algunas son aerobias y otras anerobias; generalmente son microaerofílicos, tienen ocasionalmente un pseudomicelio transitorio o ligeramente unido, carecen de esporas y formas celulares móviles.

En general son Gram positivas y se desarrollan en los medios de cultivo de manera más lenta que otras bacterias, un ciclo de división puede durar 2 a

15 horas en cambio otras bacterias como *E. coli* sólo requieren 20 minutos (11). *Actinomadura madurae* se cultiva en Sabouraud y su desarrollo como colonia tarda 30 a 60 días a temperatura de 30°C y la óptima de 37°C. Las características macroscópicas muestran: colonias de aspecto plegado y poco elevadas, matizadas en color blanco, salmón o rojo; microscópicamente se encuentran pseudofilamentos cortos con diámetro de 0.5 μm , las hifas dispersas presentan cadenas de esporas (25).

Actinomadura pelletieri: Crece a temperatura óptima de 37°C en 4 a 7 días. Las características macroscópicas que presenta son su aspecto plano, cerebriforme o radiado, con un pico central de color rojo y con un halo pálido; entre las características microscópicas destacan pseudofilamentos cortos de 0.5 μm de diámetro no fragmentadas, se tiñen con Gram pero no son ácido alcohol resistentes.

II. Familia *Micobacteriaceae*

Rara vez tienen pseudomicelio, ramifican de manera limitada, sus pseudofilamentos cortos tienen tendencia a fragmentarse en formas bacilares, no forman esporas, conidias ni hifas aéreas. Son Gram positivas y ácido alcohol resistentes, éste último es debido a la cantidad de ceras que posee su pared celular y sólo se encuentra en especies relacionadas como algunas Nocardias.

La mayoría son saprobias y su hábitat es el suelo en donde realizan la descomposición de materia orgánica (56, 57).

VI. Familia *Nocardiaceae*

Presentan pseudofilamentación abundante en forma aérea, la fragmentación del pseudomicelio produce formas cocoides y bacilares. Las pseudohifas miden 0.5 a 1 μm de diámetro. Se comportan como aerobios obligados, carecen de movilidad; como se mencionó anteriormente son Gram positivos y ligeramente ácido alcohol resistentes. Sus colonias son semejantes macroscópicamente a las *Mycobacterias* pero se distinguen de estas porque presentan pseudomicelio aéreo. Para obtener colonias de *Nocardia* sp. se utiliza el medio de gelosa glucosada de Sabouraud y se desarrollan en un período de 8 a 15 días a la temperatura ambiente.

La morfología de la colonia es convexa, plegada semejante a costras, el color puede variar desde blanco pasando por el tono beige, rosa, naranja o marrón, la superficie tiene aspecto yesoso blanco cuando se forma la pseudohifa aérea. En el caso de *N. brasiliensis* la superficie presenta un aspecto plegado y su consistencia es acartonada de color blanco o amarillento, mientras la periferia se reviste de color naranja ocre. Microscópicamente se caracteriza por pseudofilamentos ramificados delicados que se fragmentan en

formas bacilares o cocoides, carece de conidias. Los pseudofilamentos son muy finos miden de 0.5 a 0.9 μm (57).

VII. Familia *Streptomycetaceae*

El género *Streptomyces* tiene pseudomicelios aéreos, no fragmentados, abundantes, muy largos, y ramificados. Las pseudohifas son vegetativas y aéreas, producen esporas, la pared contiene ácido L-L-diaminopimélico unido a glicina. Muchas especies de este género producen antibióticos. *Streptomyces somaliensis* crece a temperatura óptima de 37°C en medio de Sabouraud o agar nutritivo. El medio de cultivo más adecuado es el de Löwenstein-Jensen, el crecimiento de la colonia es lento; y el aspecto macroscópico que la distingue es el de una colonia pequeña, plegada, membranosa, con aspecto cerebriforme de color amarillo con sus sombras en tonos marrón o gris, a veces puede tomar color azul muy oscuro. Microscópicamente presenta pseudofilamentos microsinfonados con ramificaciones perpendiculares. El pseudomicelio es rudimentario y las esporas difíciles de observar.

1.10.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se han realizado diversos estudios de microscopía electrónica tanto de los granos de micetoma como de los cultivos de *N. brasiliensis*. Entre los más

sobresalientes tenemos el estudio realizado por el Dr. Macotela y cols., quienes observaron que la membrana celular es una estructura laminar triple en contacto con el medio interno en su cara interior citoplásmica, y en su cara externa muestra un material mucoide similar al de otras bacterias. El cuerpo de *N. brasiliensis* presenta una intensa densidad debido a la gran riqueza en ribosomas, en su centro se observa el núcleo como una zona de claridad electrónica, y posee los filamentos de ácido desoxirribonucleico (DNA). Cada filamento mide entre 0.5 a 0.8 μm de espesor (58).

Folb y cols. realizaron el estudio con microscopía electrónica de lesiones por *N. asteroides* y *N. brasiliensis* en ratones, éste reveló que cada germen produce lesiones distintas: las de tipo *asteroide* son abscesos agudos y las tipo *brasiliensis* son granulomas con gran número de macrófagos vacuolados y gran cantidad de bacilos en su citoplasma (59). Este tipo de macrófagos se observan también en el estudio histopatológico de lepra lepromatosa así como infecciones diseminadas por *M. bovis* y cuando ocurre esto se debe a inmunosupresión, por tanto se sugiere que *N. brasiliensis* produce algún tipo de depresión de la inmunidad celular, que modifica la respuesta local del hospedero a *N. brasiliensis* (60). Cuando se observaron lesiones por *N. brasiliensis* en ratón atímico los microorganismos se encontraron libres o fagocitados rodeadas por una membrana única del fagosoma de los macrófagos. Su pared no es tan gruesa como la de *N. asteroides* y cuando

degenera la pared aumenta el grosor para resistir el ataque de los lisosomas (59).

1.11. RESPUESTA INMUNE EN EL ACTINOMICETOMA

Nocardia brasiliensis es un parásito intracelular facultativo, una vez que ha sido fagocitada puede ocurrir una de dos posibilidades: 1) ser atacada y digerida; o 2) resistir dentro de la célula fagocítica en su forma modificada-L.

Los antígenos bacterianos de *Nocardia brasiliensis* son capaces de estimular en el hospedero el inicio de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Cuando la infección es causada por una bacteria intracelular facultativa, generalmente destaca la respuesta inmune celular y confiere la protección necesaria (23).

1.11.1. INMUNIDAD CELULAR

ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES

La mayor parte del conocimiento actual acerca de la respuesta inmune en el actinomicetoma procede de estudios en animales como veremos a continuación.

La actividad microbicida de los macrófagos de ratones que han sido infectados previamente con *Nocardia* mejora ante una nueva infección con bacterias de multiplicación intracelular por fenómeno de resistencia cruzada.

La hipersensibilidad para antígenos de *Nocardia* se incrementa y es directamente proporcional al aumento de resistencia del ratón ante otras bacterias como *Listeria monocytogenes*. Tanto la resistencia a la infección como la hipersensibilidad son expresión del mismo fenómeno inmunológico (60,61).

La respuesta de hipersensibilidad retardada, y la capacidad microbicida de los macrófagos activados en la respuesta inmune celular en ratones, tienen un comportamiento paralelo. Cuando se estudia la capacidad microbicida del macrófago del ratón infectado por *N. brasiliensis* se observa que aumenta inicialmente, y después de cierto tiempo disminuye de igual forma que la respuesta de hipersensibilidad retardada, el hecho coincide con mayor proliferación de *N. brasiliensis*. Esto puede correlacionarse con lo observado en pacientes (60,62).

En otros experimentos con ratones Ximénez y cols., encontraron que la resistencia a *N. brasiliensis* aumenta después de recibir por inoculación dosis no letales de cepas de este microorganismo vivas o muertas, y el grado de resistencia en nuevas exposiciones se correlaciona con la respuesta de hipersensibilidad retardada, en cambio la resistencia provocada por otras bacterias y BCG producen menor resistencia y baja reactividad de la hipersensibilidad retardada. La cuantificación de anticuerpos antinocardia de los animales previamente expuestos y la de anticuerpos anti-BCG previamente inmunizados, fueron niveles semejantes aun cuando el grado de resistencia a

la infección fuera diferente, por ello los investigadores concluyeron que la producción de anticuerpos no tiene ninguna acción para la resistencia a la infección por *N. brasiliensis* (63).

Los estudios de inmunidad celular realizados, han demostrado un estado de hipersensibilidad retardada específica para los antígenos de *Nocardia*, lo cual indica que existe activación de macrófagos con capacidad de fagocitosis bacteriana aumentada (60).

Cuando González-Ochoa y colaboradores realizaron pruebas de intradermorreacción usando un polisacárido de *N. brasiliensis*, observaron como un grupo de pacientes que habían presentado una respuesta de hipersensibilidad retardada tipo tuberculínico, tuvieron buena evolución y en cambio aquellos pacientes sin reacción evolucionaron mal; por otro lado algunos casos con respuesta positiva inicialmente perdían su reactividad al deteriorarse las condiciones generales igual que en los estudios de Mahgoub (64). Estas observaciones permitieron concluir que la intradermorreacción positiva era signo de buen pronóstico, mientras que la negatividad era de mal pronóstico (62).

La hipersensibilidad retardada que se desarrolla ante el estímulo de antígenos de *N. brasiliensis* se ha obtenido experimentalmente en animales, en pacientes e individuos sanos que viven en zonas endémicas donde *N. brasiliensis* ha sido aislada del suelo (65,66).

LINFOCITOS T Y MACROFAGOS

Los ratones libres de gérmenes desde el nacimiento presentan resistencia menor a las infecciones por *Nocardia* que los ratones normales, porque la biota residente normal del hospedero confiere protección y la exposición a diferentes microorganismos exógenos estimula el desarrollo del sistema inmune, que se expresa por una mayor resistencia a la infección por *Nocardia*. La activación de macrófagos y el desarrollo de la inmunidad mediada por células son importantes en la resistencia del hospedero contra la infección por *Nocardia* (67).

En los modelos murinos: Cuando la bacteria *Nocardia* penetra los tejidos, los neutrófilos rodean el agente y se acumulan en el sitio de invasión, fagocitan al invasor e inhiben su crecimiento. Sólo los macrófagos activados pueden inhibir el crecimiento, y aunque se encuentren en el sitio se ha demostrado *in vitro* que no pueden inhibir el crecimiento si no están activados (68)

Los neutrófilos humanos obtenidos de sangre periférica no tienen capacidad para destruir *Nocardia* sp, únicamente inhiben el crecimiento.

Se han utilizado modelos murinos genéticamente inmunodeficientes en los distintos estudios sobre la respuesta inmune. El ratón desnudo atímico y con deficiencias severas de linfocitos T resultó un modelo por excelencia para el estudio de la importancia que tienen los linfocitos T en la resistencia del hospedero ante *Nocardia*, y por lo tanto de la respuesta inmune celular; este tipo de ratón no desarrolló la típica lesión del micetoma cuando se infectó con

N. brasiliensis, por el contrario predominaron los abscesos grandes y una enfermedad agresiva letal meses antes de lo observado en los ratones controles. Por tanto la enfermedad infecciosa clínicamente se manifestó según el estado inmunológico del hospedero. De aquí la importancia de los linfocitos T en la respuesta del hospedero ante infecciones sistémicas y crónicas por *Nocardia*. El ratón deficiente de linfocitos T es también más susceptible a la infección con *N. brasiliensis* que los normales (69).

1.11.2. LA INMUNIDAD HUMORAL.

Las pruebas serológicas de fijación de complemento en pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis* desarrolladas en 1962 por González Ochoa y cols., mostraron títulos elevados de anticuerpos en aquellos pacientes con lesiones extensas y condiciones generales precarias, mientras que en aquellos que presentaban lesiones muy localizadas los resultados fueron negativos (62).

Para estudiar el papel de la respuesta inmune humoral y su intervención en la protección contra el actinomicetoma, se han utilizado como modelos ratones esplénico-deficientes o aquellos con herencia B-deficiente, estos animales tienen disminuida la producción de inmunoglobulinas y con la edad sufren deficiencia progresiva de linfocitos T. Este modelo de ratón es más susceptible que el atímico para desarrollar infección aguda, y sistémica por

Nocardia brasiliensis, la muerte por nocardiosis sistémica ocurre antes de que se presente el cuadro clínico típico del actinomicetoma (70, 61, 69).

En animales con deficiencia-B ligada al cromosoma X, se encontró que después de ser inmunizados tanto hembras como machos, ambos grupos mostraron mejor capacidad de respuesta de hipersensibilidad retardada similar para los antígenos de *Nocardia*, y con resistencia semejante a la infección, por tanto no es crítica la formación de linfocitos B y anticuerpos en el desarrollo de la respuesta del hospedero ante *Nocardia*. Además cuando se transfieren pasivamente anticuerpos a los ratones receptores con deficiencia de linfocitos T, sufren una infección más grave por *Nocardia* que los que no recibieron anticuerpos, esto es paradójico, pues pareciera que los anticuerpos facilitan el crecimiento de los microorganismos en lugar de destruirlos (61, 71).

Por otra parte cuando los ratones son irradiados pierden también la capacidad para formar anticuerpos contra *Nocardia*, pero al recibir por transferencia células de bazo sin linfocitos B y recubiertos con receptores para *Nocardia*, estos animales desarrollarán una respuesta de hipersensibilidad retardada y controlarán la infección por *Nocardia*.

La transferencia de las células de bazo sin linfocitos B recubiertos con receptores para extractos citoplásmicos de *Nocardia*, confirió al ratón receptor mayor resistencia ante exposiciones posteriores a *Nocardia*, por lo que presentó lesiones menos graves y una menor detección de anticuerpos hemaglutinantes, cuando se transfirieron células del bazo sin eliminar estos

linfocitos B, presentaron entonces títulos altos de hemaglutininas. Ambos grupos presentaron reactores de hipersensibilidad retardada positivos al extracto citoplásmico de *Nocardia* y por lo tanto, no afectaron la expresión de la inmunidad celular (65).

ANTICUERPOS EN LA RESPUESTA HUMORAL

El papel de los anticuerpos en el actinomicetoma se ha estudiado con la inoculación de células de *N. brasiliensis* en la pata del ratón; dos semanas después de la aplicación de los microorganismos se desarrollaron lesiones típicas de micetoma. Los estudios histológicos mostraron: depósitos de inmunoglobulina antinocardia así como complemento C3 en el grano actinomicótico y áreas circundantes inflamatorias. Las pruebas inmunoenzimáticas en suero permitieron también la identificación anticuerpos antinocardia a los 45 días de la infección. Por lo tanto la presencia de C3 puede indicar formación de complejos inmunes que pueden contribuir en la patogenia del padecimiento, interfiriendo con la función de los linfocitos T. La presencia de C3 y anticuerpos probablemente bloquean los determinantes antigénicos del microorganismo, ésto evitaría a su vez que sean reconocidos por las células sensibilizadas, y de este modo impide el desarrollo de la inmunidad mediada por células e interfiere con la regulación de la respuesta inmune, pues como se ha comprobado la respuesta de hipersensibilidad retardada en animales

infectados con *N. brasiliensis* a los cuales se les administró anticuerpos, se retrasó.

Al principio de la enfermedad no se identificaron anticuerpos en suero, la ausencia probablemente, se debe a células supresoras en los ratones infectados con *N. brasiliensis*, o porque los anticuerpos sintetizados se absorben en el sitio de infección. Esto explica el fracaso de las reacciones serológicas para el diagnóstico temprano del micetoma en estadio inicial ya que los anticuerpos se absorben *in situ* y los niveles detectables se encontrarán sólo en estadios crónicos de la enfermedad (71).

Intrigan los títulos bajos de anticuerpos antinocardia, porque sabemos que *Nocardia* funciona como un activador policlonal de linfocitos B con acción mitógena. Las células esplénicas del ratón infectado con *N. brasiliensis* muestran incremento en la tasa de utilización de timidina tritiada en las pruebas de proliferación (65). Los extractos de *Nocardia* no patogénica y extractos de *N. brasiliensis* patogénica tienen acción mitogénica en los linfocitos B murinos (66).

La actividad mitogénica sin embargo no requirió la presencia de linfocitos T (65). La activación con extracto de *N. brasiliensis* patogénica estimuló los linfocitos B promoviendo su división celular y por tanto producción de células formadoras de anticuerpos que tenían reacción cruzada con diferentes antígenos. *In vivo* la infección por *N. brasiliensis* induce la activación policlonal

de los linfocitos B, la cual puede valorarse tres días después de la infección (76).

Nocardia o sus productos inducen *in vivo* la expansión policlonal de los linfocitos B, y cuando el antígeno se administra, se produce gran cantidad de anticuerpos antinocardia. Pero cuando los ratones se infectan con *N. brasiliensis* muestran disminución de la respuesta a los mitógenos concanavalina A o lipopolisacárido (60,65). Esto indica que la infección por *N. brasiliensis* tienen efectos supresores sobre la actividad del linfocito B y T. La respuesta linfoblástica de las células esplénicas de animales infectados ante el lipolisacárido se suprimió a los 6 días, mientras que la respuesta a la concanavalina hasta los 50 días. En un inicio la infección por *Nocardia* posiblemente actúa sobre los linfocitos B suprimiendo su actividad. Células supresoras se han descrito en infecciones en las que se han encontrado actividad supresora de linfocitos T y macrófagos (65).

In vitro se ha demostrado que la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* muerta en cultivos de células linfoides disminuye la respuesta linfoblástica ante el estímulo de los mitógenos; un factor sintetizado por los macrófagos estimulados por un componente lípido de la pared de *Mycobacterium*, es el responsable de activar las células supresoras T, esto puede ser lo que también ocurra en infecciones por *Nocardia* (65).

El perfil de inmunoglobulinas en pacientes con micetoma fue estudiado por Singhvi y cols. Para ello utilizaron métodos de inmunodifusión. Ellos

1.12. ESTUDIOS EN PACIENTES

Los estudios en pacientes con micetoma y enfermedades concomitantes que comprometen la inmunidad celular como diabetes mellitus, son muy escasos, por lo que se desconoce el comportamiento y evolución del actinomicetoma en estos casos (70).

México es uno de los países donde se han desarrollado muchos estudios acerca del micetoma causado por actinomicetos, pero la gran mayoría pertenece a estudios de epidemiología, diagnóstico y tratamiento, y aunque se han realizado trabajos de investigación acerca de los procesos inmunológicos la mayoría han sido para buscar pruebas diagnósticas y diferenciar especies como *N. brasiliensis* y *N. asteroides*, entre estos trabajos, merece mencionarse de manera especial aquellos realizados por Carmona, Salinas, Welch y otros respecto a la obtención de dos antígenos uno de 24 kDa y otro de 26 kDa, mismos que mostraron ser útiles para la obtención de anticuerpos monoclonales, estos anticuerpos se utilizaron con éxito en el diagnóstico utilizando la técnica de ELISA (43).

El Dr. Saúl también realizó un estudio sobre la inmunidad celular en pacientes con micetoma por *Nocardia brasiliensis*, a cada paciente se le realizó pruebas cutáneas de intradermorreacción con antígenos (que no incluyeron derivados de *Nocardia*), sensibilización a dinitroclorobenceno y se analizó la capacidad fagocitaria hacia *M. leprae* mediante el estudio histológico del sitio

de aplicación de lepromina, los resultados mostraron que los pacientes y controles fueron igual de sensibles a las intradermorreacciones. En ambos grupos, no se encontró deterioro de la *inmunidad celular*, sin embargo no se realizaron estudios de transformación blastoide o proliferación celular (74).

Bonifaz y Fong realizaron un estudio en pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis* y *A. madurae*, en cual se valoró la función leucocitaria de los polimorfonucleares, mediante pruebas de quimiotaxis y quimioluminiscencia. Ellos encontraron resultados semejantes al compararlos con un grupo control, y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para la migración celular. No se demostró incremento de la migración (75).

CAPITULO 2

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1.1 Una de las fases mas importantes para montar una respuesta inmunológica efectiva es la proliferación celular. En los pacientes con actinomicetoma se desconoce si la proliferación de las células mononucleares periféricas es adecuada y suficiente para desencadenar una respuesta inmune eficiente

2.2.1 Es necesario estudiar *in vivo* la respuesta inmune celular en pacientes con actinomicetoma por medio de pruebas de aplicación intradérmica de diversos antígenos y correlacionar los resultados con los obtenidos en los ensayos de proliferación.

2.2. HIPOTESIS.

2.2.1. Es probable que el estado del paciente con micetoma por *N. brasiliensis* presente algún defecto de inmunodeficiencia celular detectable *in vitro* o *in vivo* que favorezcan el desarrollo y diseminación del actinomicetoma.

2.2.2. Las personas sanas provenientes de las mismas comunidades de origen de los pacientes, no presentan alteración en la respuesta inmune celular.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. GENERAL

Demostrar que los pacientes con actinomicetoma presentan una respuesta inmune celular deficiente, lo que predispone a la enfermedad.

2.3.2. ESPECIFICOS

2.3.2.1. Cuantificar la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), en pacientes con actinomicetoma y compararlo con los resultados obtenidos de personas sin micetoma.

2.3.2.2. Valorar la respuesta inmune celular por medio de la aplicación intradérmica de diversos antígenos en un grupo de pacientes con actinomicetoma y comparar los resultados por la reactividad presentada por personas sin este padecimiento.

2.4. MATERIAL PACIENTES Y METODOS

2.4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio prospectivo, transversal, comparativo y experimental.

2.4.2. DONADORES

Las muestras de sangre periférica utilizadas en este trabajo de investigación se obtuvieron de pacientes ambulatorios con diagnóstico de micetoma por *Nocardia brasiliensis* y controles sanos de zonas endémicas, captados durante el mes de enero a febrero de 1998.

La evaluación de la inmunidad celular se llevó a cabo por medio de dos estudios. A cada individuo participante en este trabajo se le realizó lo siguiente: A) Ensayo de proliferación celular *in vitro* y B) Aplicación intradérmica de antígenos *in vivo*.

La toma de la muestra de sangre fue practicada por venopunción del antebrazo con jeringas estériles por personal del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" del C.M.N. S. XXI y del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" y se procesaron de acuerdo a técnicas de biología celular y molecular ya estandarizadas en el laboratorio de Dermatología y Micología Médica de este hospital.

La invitación para participar en el estudio, así como la aceptación, se hizo por escrito para todos los individuos sujetos a investigación y con estricto

rigor de acuerdo a los estándares de ética médica. Una vez obtenida la aceptación del participante por escrito se procedió a llenar los datos en una hoja de registro para cada uno de los pacientes

2.4.3. PACIENTES

Los pacientes estudiados son atendidos en el Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" de la SSA y en el Servicio de Dermatología y Micología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional S. XXI. del IMMS. Ambos centros se localizan en la Ciudad de México, Distrito Federal.

Sólo se incluyeron en el estudio pacientes con diagnóstico de micetoma por *Nocardia brasiliensis* corroborado por estudios de laboratorio como: examen directo de los granos, cultivo, prueba de hidrólisis de caseína, y estudio histopatológico de las lesiones. Ninguno tenía antecedentes de alguna enfermedad o inmunodeficiencia y/o tratamiento concomitante. El diagnóstico fue hecho por médicos especialistas dermatólogos, en pacientes de uno u otro sexo con un rango de edad comprendido entre de 15 a 60 años.

2.4.4. CONTROLES ENDEMICOS SANOS

Sólo se incluyeron sujetos que radicaban en zonas endémicas de la enfermedad estudiada, familiares y/o amigos de los pacientes de uno u otro sexo, con edades comprendidas entre los mismos rangos.

2.4.5. ANTIGENOS

Todos los antígenos usados: recombinante de *M. leprae* (de 45 kDa), sonicado de *M. leprae* (Mison), tuberculina (PPD) y la fracción antigénica de *Nocardia brasiliensis* (Nb) así como el mitógeno fitohemaglutinina (PHA), fueron adquiridos a través de un financiamiento de la Unión Europea incluyendo reactivos procedentes de la Escuela de Medicina Tropical e Higiene de Londres.

2.5. ENSAYOS DE PROLIFERACION CELULAR

Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PCMSP). A todos los pacientes e individuos controles se les tomó sangre venosa por punción de antebrazo y la separación del paquete celular se realizó en un gabinete de seguridad de la siguiente manera:

2.5.1.1. Se tomó de 22 a 25 ml de sangre y se mezcló con 500µl de heparina contenida dentro de tubos cónicos Falcon estériles de 50 ml, se agregó un volumen igual de medio RPMI-1640 a una temperatura de 37°C y se mezcló.

- 2.5.1.2. Se dividió en dos la mezcla sangre-RPMI-1640 y se agregó cuidadosamente por los bordes en otros tubos Falcon que contenían cada uno 15 ml de Ficoll-Histopaque.
- 2.5.1.3. Se centrifugó a 1,300 r.p.m. (400g) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2.5.1.4. Se tomó 9-11 ml de la mezcla plasma-RPMI-1640 (1:2), se almacenó en tubos universales de 20 ml a -75°C hasta su empleo.
- 2.5.1.5. Se recolectaron los mononucleares que se encontraron en el botón de color blanco con una pipeta de plástico estéril, y se agregaron en otro tubo Falcon.
- 2.5.1.6. Se adicionó solución salina balanceada de Hanks (SBH) hasta la marca de 50 ml y se centrifugó a 1,300 r.p.m. (400g) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 2.5.1.7. Se resuspendió del botón y se lavó dos veces más con SBH.
- 2.5.1.8. Se preparó en un tubo universal estéril el volumen adecuado de medio de cultivo que consistió de RPMI-1640 con 10% de plasma

autólogo, 1% de L-glutamina y 1% de antibióticos (estreptomicina-penicilina) y se filtró con acrodisco de 0.2 μm para jeringa.

2.5.1.9. Se resuspendió el botón en 0.5 ml de medio de cultivo y se hizo una dilución 1:10 con azul de tripano para contar en un hemocitómetro la viabilidad celular.

2.5.1.10. Se ajustó a 200,000 cél/pozo y se agregó en 180 μl de medio de cultivo RPMI-1640 con plasma autólogo al 10%, en placas estériles de 96 pozas con fondo en U.

2.5.1.11. Se adicionó la concentración adecuada de antígeno de *Nocardia* y del control positivo diluidos en 20 μl de cultivo.

2.5.1.12. Se agregaron 200 μl de SBH en las pozas circundantes para evitar la deshidratación de las células en proliferación y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ y humedad durante 6 días.

2.5.1.13. Se pulsaron al séptimo día con 1 μCi /pozo en 20 μl de RPMI-1640 con plasma autólogo al 10% y se incubaron 24 horas a 37°C 5% de CO₂ y humedad.

2.5.1.14. Se cosecharon y secaron los círculos cortados de papel filtro.

2.5.1.15. Se realizaron las lecturas con un contador de centelleo b y se registraron los resultados como CPM.

Para la estimulación celular se usaron las siguientes fracciones antigénicas: Nb-1 de: *N. brasiliensis*, antígeno recombinante de *M. leprae* de 45 kDa; antígeno crudo de *M. leprae* sonicado (Mlson); y el antígeno purificado de *M. bovis* (PPD). También se usó como control positivo fitohemaglutinina (PHA). Para cada uno de ellos se señalan las concentraciones en cada posa de las placas. Esto se realizó para cada paciente y para cada caso control tal como se muestra en el esquema de la figura 1.

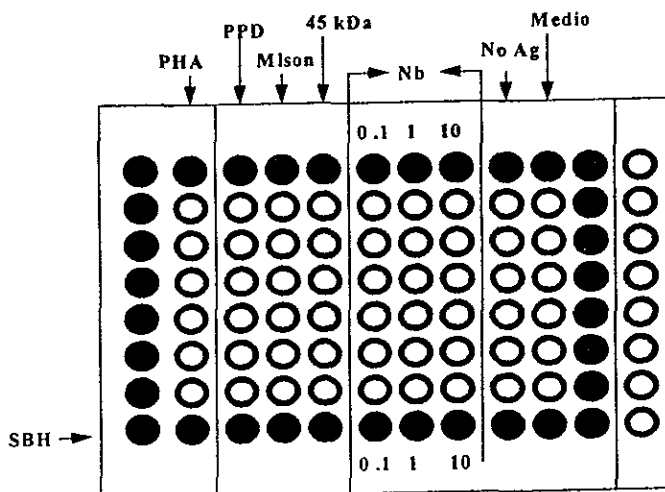


FIGURA 1. Muestra la distribución de las diferentes concentraciones para cada uno de los estímulos utilizados en este estudio:
 [N. b 0.1]=0.1 µg/ml; [N. b 1.0]= 1.0 µg/ml; [N. b 10]=10 µg/ml
 [P P D]=10 µg/ml; [Mlson]=10 µg / ml; [45 kDa]=10 µg/ ml
 [PHA]=10 µg/ml.

2.6. APLICACION INTRADERMICA DE ANTIGENOS

A cada paciente se le aplicó por vía intradérmica 0.1 ml de la solución de cada uno de los siguientes antígenos: 1) Nocardina, 2) PPD y 3) Candidina, en cambio a los controles sólo los dos últimos.

Los antígenos se aplicaron en la cara anterior del antebrazo izquierdo con una separación entre ellos de 7 cm.

Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 h en los casos para Nocardina y Candidina, en cambio para el PPD se leyeron a las 48 y 72 h. Cada lectura consistió en la palpación de la zona indurada, medición en mm sobre dos de sus ejes, y cálculo de la superficie en mm². Se consideraron positivas cuando el diámetro midió 5 mm o más.

La interpretación de la lectura de estos valores fueron considerados de acuerdo a lo establecido actualmente por los conocimientos de Inmunología (86,87,90).

2.7. METODOS ESTADISTICOS

El análisis estadístico se realizó sobre la varianza de los 17 casos (9 pacientes y 8 controles) y se aplicó para cada variable de manera comparativa la prueba estadística U de Mann-Whitney. Se consideró significativa la probabilidad (p) cuando sus valores fueron menores de 0.05.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. EDAD Y SEXO

Debido al tipo de padecimiento, la mayoría de pacientes fueron adultos, el más joven tenía 15 años y el mayor de ellos contaba con 60 años. En cuanto al sexo, como era de esperarse la mayoría fueron masculinos, hecho ya ampliamente conocido por resultados en casuísticas epidemiológicas (Tablas 11 y 12).

**TABLA 11.
DISTRIBUCION DE PACIENTES CON ACTINOMICETOMA**

PACIENTE	EDAD EN AÑOS	SEXO
1	21	Masculino
2	21	Masculino
3	34	Masculino
4	22	Masculino
5	60	Masculino
6	15	Masculino
7	25	Masculino
8	20	Masculino
9	43	Femenino

Los sujetos utilizados como control fueron principalmente estudiantes de posgrado provenientes de zonas endémicas, por este motivo, la mayoría fueron adultos jóvenes de uno u otro sexo (Tabla 12).

**TABLA 12.
DISTRIBUCION DE CONTROLES SANOS**

CONTROLES	EDAD EN AÑOS	SEXO
1	33	Femenino
2	23	Masculino
3	26	Femenino
4	26	Masculino
5	27	Masculino
6	26	Femenino
7	28	Masculino
8	21	Femenino

3.2. PROCEDENCIA Y OCUPACION.

En la tabla 14 se muestra la distribución geográfica de los casos y las actividades a las que se dedican en sus ocupaciones.

Los pacientes estudiados son originarios de ocho estados mexicanos considerados como endémicos y localizados al sur del trópico de Cáncer. De éstos 2 son del estado de Morelos, 2 de Michoacán, y el resto de Veracruz (1), Puebla (1), Oaxaca (1), Hidalgo (1), y San Luis Potosí (1).

La tabla 14 señala las actividades que desarrollaba cada paciente durante el período de tiempo cuando se enfermaron. La mayoría de los casos (78%) se relacionaron con traumatismos corporales favorecidos por la falta de protección adecuada en el sitio afectado. Los huaraches por ejemplo no cubren bien los pies; por otra parte los hombros, tórax y abdomen se usan frecuentemente como apoyo para cargar objetos contaminados sin ninguna protección extra.

**TABLA 13.
DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y OCUPACION**

CASO	ESTADO	ACTIVIDAD
1	San Luis Potosí	Cultivo de frijol con zapatos inadecuados
2	Morelos	Cultivo de maíz con zapatos inadecuados
3	Oaxaca	Carga de cajas apoyándose en abdomen
4	Veracruz	Cultivo de frijol y maíz sin ropa adecuada
5	Michoacán	Cultivo de frijol y uso de zapatos inadecuados
6	Puebla	Cultivo de maíz y con zapatos inadecuados
7	Morelos	Albañilería, cargar galones con hombros
8	Hidalgo	Cargar sacos de frijol y maíz con hombros
9	Michoacán	Cargar leña con hombros

3.3. COMPORTAMIENTO CLINICO Y TRATAMIENTO.

El comportamiento clínico del padecimiento se caracteriza por tener una evolución crónica. 89% de los pacientes tenían más de seis meses con el padecimiento cuando fueron vistos por primera vez. Sólo 22% presentaba actividad clínica en el momento del estudio (Tabla 14).

La topografía más afectada fue: extremidades en 67% de los enfermos, un tercio de localización podálica, y otro tercio en miembros superiores. Otros sitios menos frecuentes fueron tórax y abdomen. Todos los casos fueron de localización unilateral. Ninguno presentó complicaciones graves.

Todos los pacientes presentaron lesiones dermatológicas precedidas por aumento de volumen y deformación de la región afectada. Los nódulos subcutáneos aparecieron de manera simultánea y posteriormente se abrieron en la superficie a través de fistulas. Los orificios de las fistulas presentaron un anillo mamelonado con salida de líquido filante seropurulento. La mayoría de

los pacientes permanecieron asintomáticos y sólo dos refirieron dolor de la zona afectada. Los casos ya curados (78%) presentaron como lesiones residuales cicatrices y placas fibrosas con manchas hiperocrómica.

El tratamiento recibido por la mayoría de los pacientes siguió los esquemas terapéuticos en los cuales se combinó diaminodifenilsulfona con trimetoprim que mostró ser efectivo en 56% de los casos. Se observó resistencia en 33% de los casos por lo que se les prescribió una combinación de trimetoprim-sulfametoxazol con amikacina a las dosis convencionales y sólo dos respondieron de manera satisfactoria. Un paciente con actinomicetoma de localización en abdomen (Caso 3) presentó mala respuesta a los esquemas mencionados así como a la combinación de amoxicilina-ácido clavulánico con trimetoprim-sulfametoxazol, cuando se realizó el antibiograma se aplicó la combinación de amikacina con cefotaxima con la cual se obtuvo buena respuesta.



FIGURA 2. Actinomicetoma del pie causado por *Nocardia brasiliensis*.

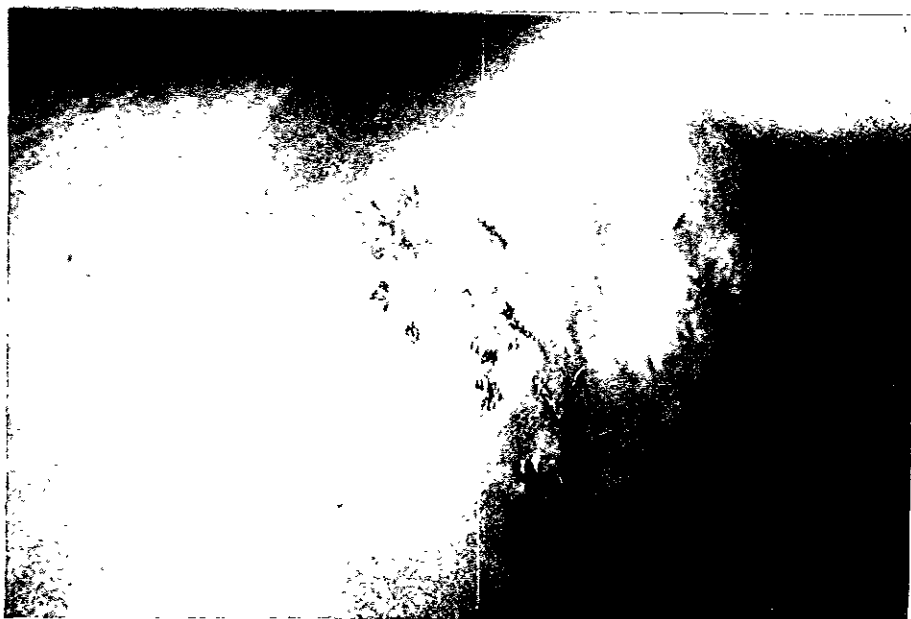


FIGURA 3. Actinomicetoma del tórax causado por *Nocardia brasiliensis*.

**TABLA 14.
PACIENTES CON ACTINOMICETOMA**

EVOLUCION CLINICA					
No	EDAD/ AÑOS	TIEMPO/ MESES	TOPOGRAFIA	MORFOLOGIA	TRATAMIENTO
1	21	48	Pie derecho	Cicatrices	TMP +SMZ +AMK
2	21	96	Pie derecho	Fistulas activas	TMP +SMZ +AMK
3	34	96	Abdomen	Cicatrices	AMK + CFT
4	22	48	Hombro	Placa fibrosa	TMP + SMZ +DDS
5	60	36	Codo derecho	Cicatrices	TMP +SMZ +DDS
6	15	2	Pie izquierdo	Fistulas activas	TMP +SMZ +DDS
7	25	24	Hombro	Cicatrices	TMP +SMZ +DDS
8	20	36	Tórax	Placa fibrosa	TMP +SMZ +DDS
9	43	84	Tórax	Cicatrices	TMP +SMZ +DDS

TMP = Trimetoprim; SMZ = Sulfametoxazol; AMK=Amikacina;
CFT =Cefotaxima;DDS=Diaminodifenilsulfona.

3.4. RESULTADOS DE LAS INTRADERMORREACCIONES

Las intradermorreacciones medidas sobre dos de sus ejes fueron positivas para nocardina y candidina en todos los pacientes en cambio para la tuberculina 3 pacientes fueron negativos, mientras que en el grupo control todos fueron positivos al PPD y a la candidina (Tablas 15 y 16).

Las figuras 4 y 5, son fotografías que corresponden a un paciente y a un sujeto sano del grupo control en orden respectivo. Estas iconográficas ponen de manifiesto las diferencias clinicas de las intradermorreacciones ante un mismo antígeno (tuberculina).

**TABLA 15.
PACIENTES CON ACTINOMICETOMA**

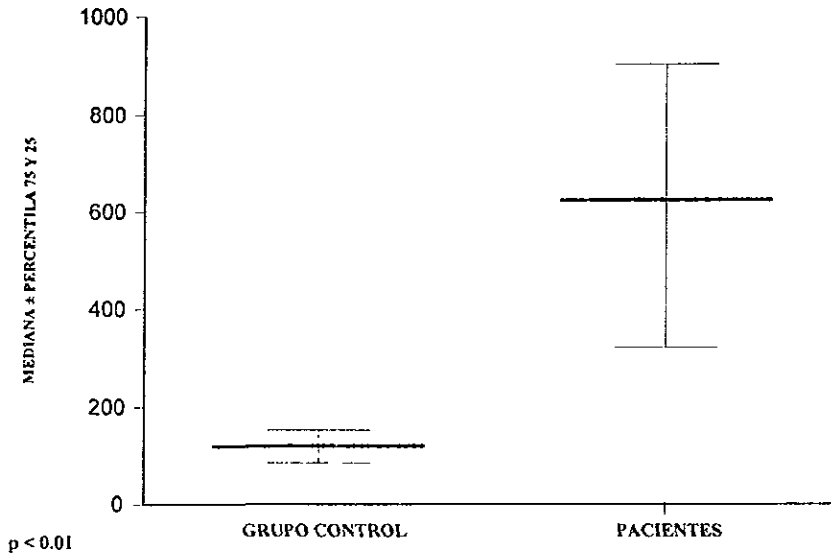
LECTURAS DE LAS INTRADERMORREACCIONES						
No.	NOCARDINA		PPD		CANDIDINA	
1	(+)	28 x 35 mm	(+)	7 x 7 mm	(+)	20 x 22 mm
2	(+)	15 x 26 mm	(+)	8 x 7 mm	(+)	25 x 35 mm
3	(+)	6 x 6 mm	(-)	2 x 2 mm	(+)	40 x 40 mm
4	(+)	35 x 28 mm	(+)	4 x 5 mm	(+)	23 x 27 mm
5	(+)	6 x 6 mm	(+)	8 x 6 mm	(+)	30 x 30 mm
6	(+)	15 x 15 mm	(-)		(+)	16 x 20 mm
7	(+)	25 x 45 mm	(-)		(+)	45 x 25 mm
8	(+)	8 x 10 mm	(+)	8 x 10 mm	(+)	8 x 10 mm
9	(+)	15 x 10 mm	(+)	8 x 8 mm	(+)	15 x 10 mm

**TABLA 16.
CONTROLES SANOS**

LECTURAS DE LAS INTRADERMORREACCIONES					
No.		PPD		CANDIDINA	
1	(+)	20 x 20 mm	(+)	10 x 15 mm	
2	(+)	5 x 5 mm	(+)	10 x 10 mm	
3	(+)	5 x 5 mm	(+)	7 x 8 mm	
4	(+)	7 x 10 mm	(+)	12 x 13 mm	
5	(+)	15 x 25 mm	(+)	10 x 14 mm	
6	(+)	10 x 7 mm	(+)	7 x 10 mm	
7	(+)	20 x 20 mm	(+)	10 x 10 mm	
8	(+)	10 x 15 mm	(+)	13 x 12 mm	

La intensidad de las intradermorreacciones para la candidina en pacientes con actinomicetoma fue significativamente mayor que en el grupo control. El análisis estadístico con la prueba U de Mann-Whitney nos permite apreciar esta diferencia (Gráfica 1).

LECTURA DE LAS INTRADERMOREACCIONES CON CANDIDINA

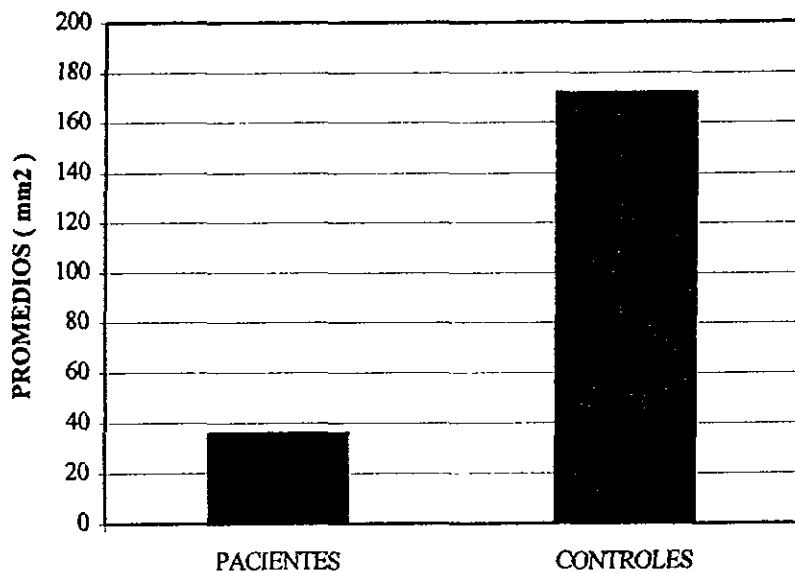


GRAFICA 1. Comparación de la intensidad de las intradermoreacciones con el antígeno de candidina entre pacientes y controles. La aplicación de candidina, mostró una respuesta aumentada en pacientes con actinomicetoma, comparada con la induración obtenida en los sujetos del grupo control.

La lectura de las intradermoreacciones a la tuberculina, mostró notable diferencia entre la reactividad al PPD en los pacientes con una media de 30 mm² en comparación con los controles cuya media fue de 172 mm², incluso dos pacientes (casos 6 y 7) no presentaron induración y uno fue menor de 5 mm² (caso 3). En los controles se presentaron dos casos en los cuales la zona

de induración midió 20 x 20 mm y ninguno de los demás controles tuvo induración menor de 5 x 5 mm. Aunque en este caso el análisis estadístico con la prueba U de Mann Whitney dio un valor para $p=0.06$ la diferencia clínica es evidente entre los grupos de estudio (Gráfica 2).

LECTURA DE LAS INTRADERMOREACCIONES CON TUBERCULINA (PPD)



GRAFICA 2. En esta gráfica de barras, se muestra de manera comparativa el promedio de superficie de las intradermoreacciones a la tuberculina expresada en mm². La diferencia clínica de la intensidad de la respuesta es evidente entre ambos grupos.



FIGURA 4. Intradermorreacción a tuberculina en un individuo sano.

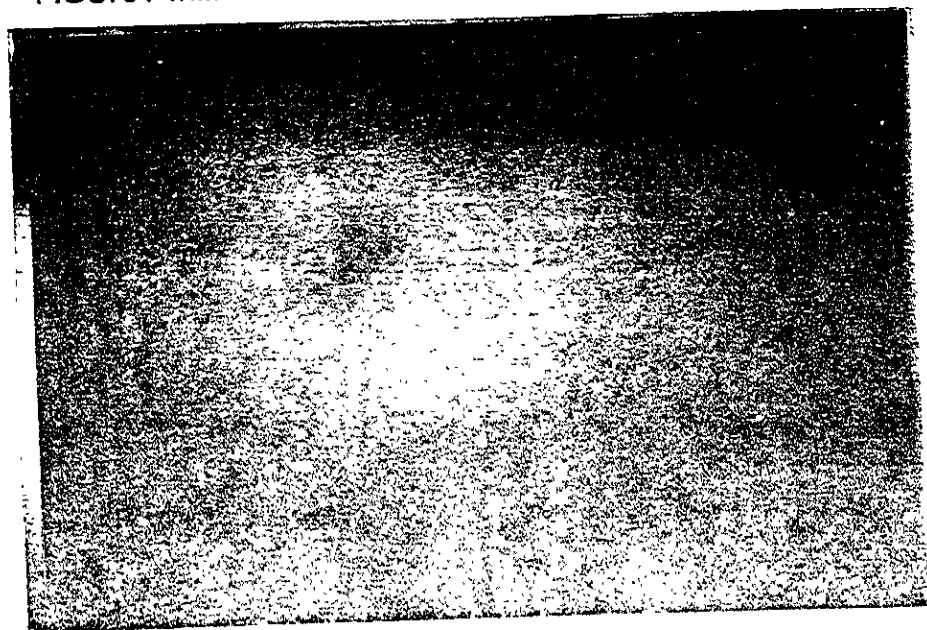
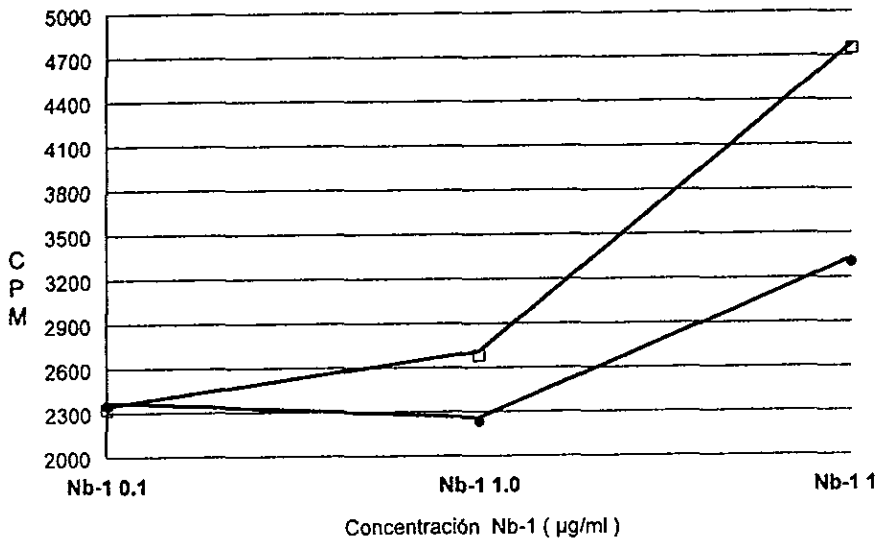


Figura 5. Intradermorreacción en un paciente con micetoma.

3.5. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE PROLIFERACION

Se realizó una cinética de dosis respuesta para Nb-1 donde se manejan tres concentraciones diferentes para ambos grupos. Los resultados mostraron que la respuesta es mayor para la concentración de 10.0 µg/ml como puede observarse en la gráfica 3.

PROLIFERACION CELULAR CON *Nocardia brasiliensis*
A DIFERENTES CONCENTRACIONES



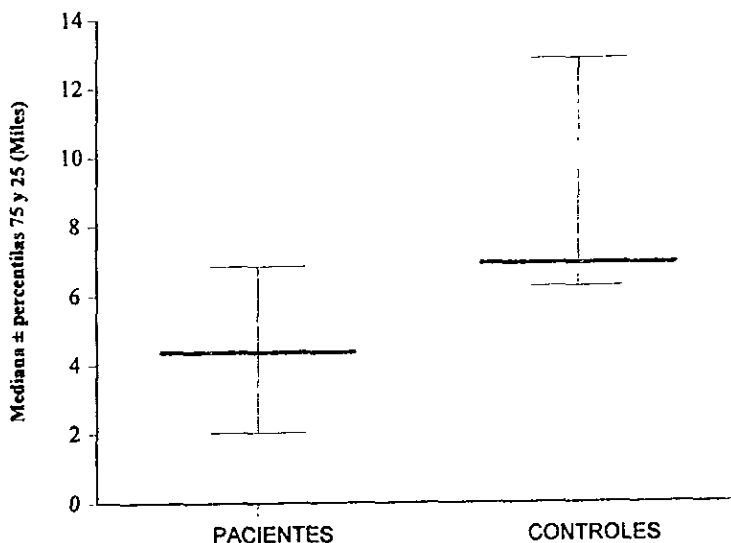
● PACIENTES □ CONTROLES

GRAFICA 3. Ilustra la curva de proliferación celular para pacientes y controles con diferentes concentraciones de antígeno de *Nocardia* (Nb-1). Ambos grupos mostraron mayor respuesta a las concentraciones de 10 µg / ml. Una mayor respuesta fue observada para los controles sanos, pero la diferencia estadística no fue significativa.

Los ensayos de proliferación celular fueron cuantificados en ambos grupos por el número de cpm; los resultados únicamente mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cuando se estimularon los cultivos con el PPD, en cambio con los otros antígenos probados la respuesta no fue significativa (Gráfica 4).

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA RESPUESTA INMUNE CELUL EN PACIENTES CON ACTINOMICETOMA

PROLIFERACION CELULAR CON PPD



$p = 0.03$

PACIENTES Y CONTROLES DEL HE CMN S XXI y CENTRO DERMATOLOGICO PASCUA

GRAFICA 4. Proliferación celular con 10µg/ml de PPD. Se consideraron las cuentas por minuto de la incorporación de timidina tritiada que se determinaron por espectrofotometría de líquido de centelleo con un cosechador y se graficaron como la mediana de 17 determinaciones individuales ± el rango. Se aplicó la prueba estadística de Mann-Whitney debido al tamaño pequeño de la muestra estudiada.

CAPITULO 4

4.1. DISCUSION

Entre los estudios necesarios para comprender la fisiopatogenia de cualquier padecimiento tenemos las investigaciones acerca del estado inmunológico de los pacientes (86,87).

En base a diferentes estudios tanto en animales como en humanos ha quedado demostrado que la respuesta inmune más importante para la protección del micetoma es la respuesta inmune celular (62, 63, 64).

Entre los métodos de laboratorio para la evaluación de inmunidad celular actualmente se cuenta con varias técnicas, además de las intradermorreacciones. Existen otras pruebas *in vitro* como la de proliferación celular.

Una técnica de gran importancia en la actualidad es la de proliferación de células mononucleares de sangre periférica en la cual en pequeños pozos se agregan células y antígenos con el fin de provocar una reacción *in vitro* controlable y evaluable por la captación de timidina, la prueba nos permite apreciar de manera objetiva la velocidad de síntesis de DNA, la cual se determina por la cuenta de centelleos por minuto que presentan las células en una suspensión. En general, los sujetos normales muestran congruencia entre los resultados de las pruebas cutáneas y la activación de los linfocitos inducida

por antígenos, sin embargo en muchas condiciones, la técnica *in vitro* es al parecer, un índice más sensible para la hipersensibilidad celular mediada por un antígeno específico (82).

Los resultados de proliferación celular en este estudio mostraron diferencia significativa entre el grupo de pacientes y controles, siendo menor para los pacientes que para los controles y más notable en el caso particular del PPD (Gráficas 3 y 4).

Se ha sugerido en otros padecimientos causados por microorganismos intracelulares como la lepra lepromatosa, que la susceptibilidad individual por la falta de macrófagos eficientes o células T reactivas, llevan a la multiplicación bacilar y al progreso de la enfermedad (90), probablemente ésto también se presente en los pacientes con micetoma, donde disminución de células T reactivas como muestran los resultados de los ensayos de proliferación celular (gráficas 3 y 4). También puede ser que el micetoma active preferencialmente la respuesta celular Th2 y consecuentemente evite la activación de la respuesta Th1 como ocurre en la lepra.

Se ha demostrado que la incubación de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos con *M. leprae* (91), o sus productos como glucolípidos fenólicos-I (92), arabinomanana (93) o lepromina (94), incapacitan a las células T para responder ante varios estímulos, incluyendo lectinas como concanavalina A y fitohemaglutinina. Las CMSP de pacientes con padecimiento de larga duración o sin tratamiento también son incapaces de proliferar *in vitro*

en respuesta a Con A y otros estimulantes incluyendo lepromina y *M. leprae* (95). Suponiendo que la respuesta inmunológica del actinomicetoma sea semejante, los pacientes con micetoma de larga evolución y aquellos sin tratamiento tendrían disminución de la respuesta inmune celular debido a que las células T reactivas son bloqueadas por el contacto directo con *N. brasiliensis* o sus productos, evitando de este modo la activación subsecuente por antígenos como ocurre en la lepra. Por lo tanto se tendrían que estudiar las características de la pared de *N. brasiliensis* y sus derivados antigénicos.

En relación a las intradermorreacciones, la lectura de las pruebas intradérmicas para candidina, mostraron mayor reactividad en los pacientes que en controles, ésto permite el planteamiento de dos posibilidades: La primera es considerar que debido a que el micetoma es un proceso crónico infeccioso en el que se usa antibióticos por largos períodos de tiempo se favorece la presencia de cuadros infecciosos subclínicos por *Candida* spp ya que se ha demostrado que los antibióticos de amplio espectro pueden eliminar los bacilos gramnegativos y los anaerobios de la biota intestinal y se asocian con infecciones por *Candida* spp (84).

Otra posibilidad podría ser que *Candida* spp y *Nocardia* compartan antígenos, y no sean los antibióticos la única explicación de este fenómeno, ya que en un estudio similar los pacientes también recibieron antibióticos y sólo un tercio del total fueron positivos a la candidina, en el resto la respuesta fue negativa (82), cabe mencionar que en esos pacientes los agentes causales

eran distintos a *N. brasiliensis*, no sabemos como hubiera sido la respuesta a la candidina si hubieran sido causados por *N. brasiliensis*, pero en el supuesto que compartiese antígenos con *Candida* spp entonces también se esperarían resultados semejantes a los obtenidos en nuestro estudio.

Estudios sobre factores de virulencia de *Candida* spp han demostrado que puede presentar cambios de fenotipo y antigenicidad con la radiación ultravioleta (85), sería interesante estudiar si estos cambios antigénicos le permiten compatir fracciones semejantes a las de *Nocardia* y estimular reacciones cruzadas.

Las intradermorreacciones con tuberculina fueron positivas en mayor número de individuos sanos (9) que en los pacientes (5). Fueron más intensas en el grupo control que en el de pacientes y aún cuando por el tamaño de la muestra no parezcan estadísticamente significativas, existen diferencias de expresividad clínica en la inmunidad. La calidad de la respuesta inmune fue tan diferente en los sujetos sanos en comparación con los pacientes, que sería interesante conocer si la diferencia de calidad de respuesta es debida a la cantidad de antígenos circulantes liberados por *Nocardia* como se ha demostrado en otras infecciones experimentales por otros microorganismos intracelulares como nocardiosis o causadas por *M. leprae* (87,88).

Es importante recordar que la reacción inmunitaria celular depende de una red de interacción entre las células participantes a través de las sustancias conocidas como citocinas. Las citocinas son productos derivados

de los linfocitos T, entre éstas, el Interferón gamma tiene la capacidad de activar macrófagos, las bacterias intracelulares como *N. brasiliensis* sólo pueden ser eliminadas cuando son fagocitadas por macrófagos activados o por la lisis de las células infectadas por linfocitos T citotóxicos (CD8+).

Como resultado de la estimulación con antígenos bacterianos, las células TH0 se activan y pueden diferenciarse en uno o dos tipos auxiliares de células CD4+ (Th1 y Th2). Las células CD4 Th1 producen interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (INF- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α). El interferón gamma activa los macrófagos para que destruyan las bacteria fagocitadas, si se aplican inhibidores de interferón o de factor de necrosis tumoral el resultado de las infecciones es peor. Por otra parte cuando una bacteria intracelular sobrevive dentro de la célula libera sus antígenos al citoplasma, y estimula a los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos citotóxicos producen también interferón gamma y son capaces de lisar la células infectadas. Es importante determinar la presencia de interferón gamma en el sobrenadante que se obtiene de los cultivos celulares porque en caso que existiera un déficit de intertferón gamma, ésto significaría la expresión de una inmunidad débil. Las diferencias individuales en el patrón de respuesta inmunitaria frente a microorganismos intracelulares condicionan la progresión de la enfermedad y su resultado clínico (85). En caso de que así fuera la aplicación intradérmica de interferón gamma en las lesiones rebeldes al tratamiento terapéutico quizás podrían mejorar como en los casos de lepra lepromatosa.

Los resultados de los estudios de inmunidad celular en pacientes con actinomicetoma son pocos y contradictorios. Algunas de esas investigaciones no encontraron alteraciones de la respuesta celular (64, 74, 75), mientras que en otros la evaluación por medio de intradermorreacciones y la estimulación de la proliferación celular con PHA, mostró en algunos individuos defecto en la respuesta mediada por células T; siendo mayor en estos pacientes la extensión de las lesiones o la falta de respuesta al tratamiento (64).

4.2 CONCLUSIONES

- El análisis de los resultados en este estudio preliminar, permiten suponer que existen alteraciones de la inmunidad celular en pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis* ya que se presentaron diferencias clínicas en la intensidad de las intradermorreacciones entre ambos grupos con un menor número de pacientes positivos a la tuberculina en comparación a los controles sanos y una menor intensidad de la respuesta a la intradermorreacción con tuberculina en los pacientes, ésto fue congruente con lo que se observó en los ensayos de proliferación celular con PPD.
- Los mejores resultados de estimulación celular en los ensayos de proliferación tanto para pacientes como para el grupo control en las que se utilizó la fracción de antígeno de *Nocardia* Nb-1 se obtuvieron a la concentración de 10 µg / ml. Por lo tanto en los futuros ensayos se deberá trabajar con esta concentración.
- Los resultados aquí obtenidos demuestran la importancia de estudiar con mayor profundidad la respuesta inmune, valorando además de lo aquí estudiado otros indicadores como son interleucinas, cuantificación de CD4+ y CD8+, gammainterferón, y factor de necrosis tumoral entre los más

importantes. Otro aspecto interesante en ese trabajo será incluir grupos de pacientes con micetoma sin tratamiento, con tratamiento y curados.

ANEXO No.1

HOJA DE REGISTRO DE PACIENTES

Nombre _____

Edad _____

Lugar de origen _____

Ocupación _____

Cultivo _____

Histopatología _____

Evolución y duración de la enfermedad:

Tratamiento recibido y duración del mismo:

Otros padecimientos crónicos y tratamientos:

ANEXO No. 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de Investigación titulado "Estudio preliminar de la respuesta inmune celular en pacientes con actinomicetoma". Registrado ante el Comité Local de Investigación del HE CMN S. XXI con el No. 193/97.

El objetivo es conocer cómo se encuentra mi respuesta inmune celular. De acuerdo a lo que se me ha explicado mi participación consistirá en un examen médico, donar 25 ml de sangre venosa obtenida por venopunción y la aplicación de tres antígenos por vía intradérmica a dosis de 0.1 ml cada uno. Los antígenos serán: 1) Nocardina, 2) PPD y 3) Candidina. La lectura se hará a las 24 y 48 h. Además se tomarán fotografías clínicas en caso de ser necesario.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en este estudio que son los siguientes:

De la venopunción leve dolor urente local o formación de algún pequeño hematoma.

De las intradermorreacciones prurito localizado, induración local y rara vez febrícula.

El beneficio que me traerá es una evaluación de mi inmunidad celular.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaron a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Entendiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones y publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente:

Nombre, matrícula y firma del investigador principal:

Testigo _____

Testigo _____

BIBLIOGRAFIA

1. Mahgoub ES, Mariat F, Segretain G, Barrueta S. Descripción del término micetoma. Men II Simposio Internacional del micetoma Taxco Guerrero, México 1978.
2. Muñoz-Estrada F, García-Rodríguez MI, Mayorga-Rodríguez J, Barba-Rubio J. Micetomas Estudio Epidemiológico de 13 años en el occidente de México (1981-1993) *Dermatol Rev Mex.* 1995;199;39 (1): 13-17.
3. Mahgoub ES, Murray IG. The History of Mycetoma London: W. Heineman Medical books, 1973;1-5.
4. Cicero R. El micetoma. *Gaceta Médica de México.* 1912; 7 (6): 292-301.
5. Rippon JW. Mycetoma. The pathogenic Fungi and the pathogenic *Actinomycetes*. Medical Mycology, 3a ed. Philadelphia, WB Saunders, 1982; 723-737.
6. González Ochoa A. El micetoma por *Actinomyces*. Boyd y Crutchfield, 1921 en México. *Rev Inst Salub Enf Trop.* 1942; 3: 303-317.
7. Mariat F. Sur la distribution géographique et la repartition des agentes des mycetomes. *Bull Soc Path Exot.* 1963; 56: 35- 45.
8. Latapi F. Micetoma. *Micología Médica para Graduados.* México D.F. Pub de la Soc Mex Dermatol y Janssen Res Council. 1983; 3-9.
9. Carrada T. Avances en el conocimiento de las micosis subcutáneas y actinomicetomas (I). Agentes etiológicos y aspectos clínico-epidemiológicos. *Piel.* 1995; 10: 64-76.
10. González-Ochoa A: Mycetoma. Cañizarez O. *Clinic Tropical. Dermatology Oxford, Blacwell Scientific.* 1975: 24-29.
11. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A. Actinomadura. *Rev del Centro Dermatológico Pascua.* 1997; 6 (1): 27-39.
12. Lavalle P. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma. *Gac Med Méx.* 1966; 96: 545-569.

13. Magaña-Lozano M. Los micetomas. Rev Med Hosp Gral. 1985; 47: 527-541.
14. López-Martínez R, Méndez -Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saúl A, Macotela E. Epidemiología del micetoma en México Estudio de 2,105 casos. Gac Med Mex. 1992; 128: 477-81.
15. Bout G, Lavalle P, Mariat F, Suchil P. Etude Epidémiologique des Mycetomes au Mexique. A Propos de 502 cas. Bull Soc Path Ex. 1987; 80: 329-339.
16. Lavalle P, Padilla C, Reynoso S. Study of 705 cases of Mycetoma in México. Etiological, clinical & epidemiological correlations. Memories of the 13th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Salsomaggiore Terme, Parma, Italy, June 8-13. 1997.
17. Dávila MR, Arenas R. Micetoma diseminado por *N brasiliensis* con afección ósea y pulmonar. Dermatol Rev Mex. 1995; 39 (5): 287-9.
18. Méndez-Tovar LJ, Biévere C, López-Martínez R. Effets des hormones sexuelles humaines sur le développement *in vitro* des agents d'eumycétomes. J Mycol Med. 1991;1: 141-43.
19. Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Manzano Gayosso P. *Nocardia brasiliensis*: *in vitro* growth response to steroid sex hormones. Mycopathologia. 1995; 132: 79-85.
20. Arenas R. Micología médica ilustrada. México D.F. Interamericana. 1993; 133-43.
21. Bonifaz A. Micología Médica Básica. Edit Fco. Cervantes, México, D.F. 1990: 135-165.
22. Moreno J. Respuesta Inmune mecanismos de autoinmunidad. México D.F. Edit Noriega;. 1996; 33-54.
23. Beaman BL. Possible mechanism of nocardial pathogenesis. The Biology of the *Nocardiae* (MM. Goodfellow, Brownell & Serrano JA, eds) Academic Press. New York. 1976; 386-417.

24. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Castañón Olivares LR, Camargo Aguirre ME. Patogenicidad de *Nocardia* spp. Estudio comparativo de cepas aisladas de suelos y micetomas. Rev Iberoamer Micol. 1993; 10: 36-38.
25. Gottlieb D. *Actinomycetales*: Buchanan Rey Gibbons Eds Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins Co. 1974; 657-881.
26. Méndez-Tovar LJ. Estudio de factores patogénicos y epidemiológicos del micetoma en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México 1987.
27. Emerueva AC. Isolation and some properties of beta-hemolysis produced by *Nocardia asteroides*. Mycopathología. 1986; 95: 29-35.
28. Ripon JW. Extracellular collagenase produced by *Streptomyces madurae*. Biochemica et Biophysica Acta. 1984; 159: 147-152.
29. Wallace RJ, Vance P, Weissfeld A, Marín RR. beta-lactamase production and resistance to beta-lactam antibiotics in *Nocardia*. Antimicrob Agents Chemother. 1978; 14: 704-709.
30. Buot Genevieve. Aspectos Epidemiológicos del micetoma. Tesis de posgrado. Dermatología:Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua. 1985.
31. Magaña-Lozano M. Los micetomas. Sus repercusiones óseas. Dermatol. Rev Mex Segunda Epoca. 1989; 33 (1): 22-26.
32. Mahgoub ES. Mycetoma Semin Dermatol. 1985; 4: 230-245.
33. Mahgoub ES, Murray IG. Mycetoma. Londres. William Heineman Medical Book, 1993.
34. Welsh-Lozano O, López-López JR. Micetomas con diseminación pulmonar. Med Cut I.L.A. 1985; 13: 517-23.
35. Causey WA, Sieger B. Systemic nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis*. Am Rev Resp Dis. 1974; 109: 134-137.
36. Karassik SL. Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection. Arch Dermatol. 1976; 112: 370-372.

37. Magaña-Lozano M. Mycetoma Int J Dermatol. 1984; 23: 221-236.
38. Segretain G, Drouhet E, Mariat F. Mycétomes en diagnostic de laboratorie en Mycologie Medicale. Paris: Maloine SA, 1987: 90-102.
39. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares R. Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio; México DF. Edit. Trillas. 1995: 59-67.
40. Novales J. Histopatología de las micosis profundas. Dermatol Rev Mex. 1983; 27:128-55.
41. Arredondo HG, Ceballos LJ. Unusual localization of Mycetoma. Radiology. 1962; 78: 72-76.
42. Macotela-Ruíz E. Los micetomas. Desarrollo y estado actual de la Micología Médica en México; ed Ins Syntex, México DF 1979; 41-53.
43. Carmona-Salinas M, Welsh O, Casillas SM. Enzyme-linked Immunoabsorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* an clinical correlation with mycetoma infections. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31(11): 2901-906.
44. Welsh O. Mycetoma current concepts in treatment. Review. Int J Dermatol. 1991; (30): 387-98.
45. Ziprkowski L, Altmann G, Dalith F. Mycetoma pedis four cases treated with streptomycin. Arch Dermatol. 1957; 75: 855-63.
46. Wherle W. Rifampin mechanisms of action and resistance. Rev Infect Dis 1983; 3 (suppl): 407-411.
47. Girling DF, Jitxe AL. Adverse reactions to rifampicin. Bull WHO. 1979; 57: 45 - 49.
48. Mandell GL, Sande MA. Antimicrobial agents: Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis and Leprosy. In Goodman LS, Gilman A, eds. The Pharmacological basis of therapeutics 7th de New York. Macmillan, 1995: 1199-1218.

49. Welsh O, Saucedo E, González J, Ocampo J. Amikacin alone and in combination with trimetoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J Am Acad Dermatol.* 1987; 17: 443-448.
50. Hubler WR Jr, Hubler WR. Actinomycotic mycetoma treated with minocycline. Case report. *Tex Med.* 1976; 72: 79-83.
51. Readin C, Cole M. Clavulanic acid. A b-lactamase inhibiting beta lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977; 11: 852.
52. Gómez A, Saúl A, Bonifaz A, López M. Pharmacology and therapeutics. Amoxicillin and clavulanic acid in the treatment of actinomycetoma. *Int J Dermatol.* 1993; 32(3): 218-220.
53. Findlay GH, Vismer HF. Black grain mycetoma. *Br J Dermatol.* 1974; 91: 297-302.
54. Molina Morejón H; Figueredo-Rodríguez R. Absceso cerebral por *Nocardia*. Presentación de un caso. *Rev Cub Cir.* 1980; 19: 427-433.
55. Locci R. *Actinomycetes* as models of bacterial Morphogenesis: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of *Actinomycetes*. Academic Press 1984.
56. Koneman EW, Roberts GD. Practical laboratory Mycology, 3a ed. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 1985.
57. Bradley SC. *Mycobacteria* and *Nocardiae*. *Adv Apl Microbiol.* 1974; 16: 134-189.
58. Macotela-Ruiz E, González-Angulo A. Electron microscopic studies on granules of *Nocardia brasiliensis* in man Sabouraudia. 1966; 5: 92-98.
59. Folb PI, Jaffe R. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice. *Infect Immun* 1976; 13 (5): 1490-96.
60. Melendro EI, Contreras MF, Ximenez C. Changes in Host resistance caused by *Nocardia brasiliensis* in mice: Cross-protection against *Listeria monocytogenes*. *Int Arch Allergy appl Immun.* 1978; 57: 74-81.

61. Beaman B. Mechanisms of pathogenesis and host resistance to *Nocardia*. Biological, Biochemical and Biomedical aspects of *actinomycetes*. Academic press inc 1984; 73-85.
62. Gonzalez-Ochoa A, Shibayama H, Félix D. Immunological aspect of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Proceedings of XII International Congress of Dermatology; Sept 1962; 542-51.
63. Ximénez C, Melendro EI, González A. Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathologia*; 1980; 70 (2): 117-22.
64. Mahgoub ES, Gumaa SA, Hassan AM. Immunological Status of mycetoma patients. *Bull Soc Path Exot* 1977; 70 (1): 48-53.
65. Ortiz-Ortiz L, Melendro E, Conde C. Host- parasite relationships in infections due to *Nocardia brasiliensis*. Biological, and Biomedical aspect of *Actinomycetes*. Academic press 1984.
66. Ortiz-Ortiz L, Contreras MF, Bojalil LF. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal proteins from *Nocardia*. *Sabouraudia*, 1972 (10): 147-51.
67. Beaman BL, Maslan S, Scates S. Effect of route of inoculation on host resistance to *Nocardia*. *Infect Immun* 1980; 28 (1): 185-189.
68. Ekisterian. SM, Brand, Filhos SI. Studies on The pathogenesis of actinomycotic micetoma in animals injected with fractions isolated from *Nocardia brasiliensis*. *Br J Exp Pathol*. 1987; 68 (1): 115-23.
69. Folb PL, Timme A. *Nocardia* infections in congenitally athymic (Nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect Immun* 1977; 18 (2): 459-66.
70. Beaman B, Scates S. Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun* 1981; 33 (3): 893-907.
71. Conde C, Mancilla R. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* 1983; (40): 1218-22.

72. Ortiz-Ortiz L, Contreras MF, Bojalil LF. Cytoplasmic antigens from *Nocardia* eliciting a specifying delayed hypersensitivity. *Infect Immun* 1972; 5: 879-882.
73. Hay RJ, Mahgoub ES, León G, Al-Sogair S, Welsh O, Mycetoma. *J Med Vet Mycol* 1992; (2 supl) 1:41-49.
74. Saúl A. Fernández D. Investigación de la inmunidad celular en 10 casos de micetoma por *Nocardia brasiliensis*. *Memorias del IV Congreso Mexicano de Dermatología, Puebla Puebla* 1971; 67-9.
75. Bonifaz A, Fong Y. Función leucocitaria de polimorfonucleares en pacientes con micetoma actinomicético. *Dermatol Rev Mex Segunda Epoca* 1989; 33 (3): 171-74.
76. Magaña M, Magaña-García M. Mycetoma. *Systemic Mycoses and Parasitic Diseases. Dermatologic Clinics*. 1989; 7 (2): 203-17.
77. Schaal KP, Beaman BL. Clinical significance of actinomycetales: The biology of the actinomycetes. London Academic Press. Goodfellow M Mordaski and ST Willams eds. 1984; 389-424
78. Shulman ST, Phair JP. Interacciones huésped-bacteria en: *Infectología Clínica*; 4a. ed. Interamericana, McGraw-Hill. 1993.
79. Zamora A, Bojalil LF, Bastarrachea F. Immunologically active polysaccharides from *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *J Bacteriol*. 1963; (85): 549-55.
80. Macotela-Ruiz E. *Historia de la Micología Médica en México*. 1990; Edit. Inst Syntex. México DF.
81. Dávila MR, Arenas R, Salazar J et al. Micetomas en el estado de Guanajuato. *Dermatol Rev Mex*. 1996; 40 (6) 408-411.
82. Bendl BJ, Mackey D, Al -Saati F, et al. Mycetoma in Saudi Arabia. *J of Tropic Med and Hygiene*. 1987; 90:51-59.
83. Singhvi A, Joshi KR, Sharma JC et al. Immunoglobulin profile in mycetoma. *Indian J Pathol Microbiol* 1996; 39 (3): 203-6.
84. Sifuentes-Osornio J. Condiciones del hospedero y factores externos en las micosis nosocomiales. *Gac Méd Mex*. 1996; Vol 132 (1): 56-59.

85. Toriello-Nájera C. Factores de virulencia en hongos patógenos para el hombre. *Gac Méd Méx.* 1996; Vol 132 (1) 49-51.
86. Sties DP. Métodos de laboratorio clínico para detección de la inmunidad celular. Capítulo 19 en: *Inmunología Básica y Clínica.*; 7ª ed. México DF. Manual moderno. 1993.
87. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunidad frente a los microorganismos. Capítulo 16 en: *Inmunología celular y molecular* 2ª ed. Madrid España. Mc Graw-Hill Interamericana. 1995.
88. Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. Stigma variations: observations on supreso T cells and leprosy. *Ann Rev of Immunol.* 1992; 10: 453-88.
89. Splitter LE. Delayed hypersensitivity skin testing In: *Manual of Clinical Immunology.* de N Ross & H friedman. American Society of Microbiology, Washington. 1980.
90. Rojas-Espinosa O. Active humoral immunity in the absence of cell-mediated immunity in murine leprosy: lastly an explanation. *Int J Lepr* 1994; 62: 143-147.
91. Touw J, Stoner GL, Belehu A. Effect of *Mycobacterium leprae* on lymphocyte proliferation: suppression of mitogen and antigen responses of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 1980; 41: 397-405.
92. Krishna P, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalina A responses unrelated to leprosy type. *J Exp Med.* 1987; 165: 239-244.
93. Ellner JJ, Daniel TM. Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. 1979; *Clin Exp Immunol.* 1979; 35: 250-257.
94. Mehra V, Mason LH, Fields JP, Blomm BR. Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy. *J Immunol.* 1987; 123: 1813-1817.
95. Nath L, Curtis J, Sharma AK, Talwar GP. Circulating T-cell numbers and their mitogenic potential in leprosy-correlation with mycobacterial load. *Clin Exp Immunol.* 1977; 29: 393-400.