



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL
PACIENTE CON ACTINOMICETOMA**

T E S I S

que presenta

LUIS JAVIER MENDEZ TOVAR

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biomédicas

Tutor académico

Dr. Francisco VEGA LÓPEZ

Comité tutorial

Dr. Francisco VEGA LÓPEZ

Dr. Rubén LÓPEZ MARTÍNEZ

Dr. Roberto KRETSCHMER SCHMID

México, 2005

m343883



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.

CONTENIDO

Contenido	ii
Índice de figuras y cuadros	vi
Reconocimientos	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi

PARTE 1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO	1
1.2. HISTORIA	3
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	6
1.3.1. Distribución geográfica	6
1.3.2. Ocupación	11
1.3.3. Edad	11
1.4. DESARROLLO DEL ACTINOMICETOMA	13
1.4.1. Mecanismo de infección	13
1.4.2. Periodo de incubación	14
1.5.3. Localización corporal de las lesiones	18
1.4.4. Aspecto de las lesiones y agentes	20
1.4.4.1. <i>Nocardia</i> spp.	20
1.4.4.2. <i>A. madurae</i>	20
1.4.4.3. <i>A. pelletieri</i>	21
1.4.4.4. <i>S. somaliensis</i>	22
1.4.4.5. Micetomas causados por hongos	22
1.5. FISIOPATOGENIA DEL MICETOMA	24
1.5.1. Factores relacionados con el hospedero	24
1.5.1.1. Hormonas y micetoma	24
1.5.1.2. Inmunidad y micetoma	26
1.5.1.2.1. Inmunidad innata	26
1.5.1.2.2. Inmunidad adaptativa	28
1.5.2. Factores del agente	30
1.5.3. Factores ambientales	32
1.6. AGENTES ETIOLÓGICOS	34
1.6.1. Bacterias	34
1.6.1.1. <i>Nocardia brasiliensis</i>	37
1.6.1.2. <i>N. asteroides</i> (complejo)	37

1.6.1.3. <i>N. otitidiscaviarum</i>	38
1.6.1.4. <i>Actinomadura madurae</i>	38
1.6.1.5. <i>A. pelletieri</i>	39
1.6.1.6. <i>Streptomyces somaliensis</i>	39
1.6.2. Hongos causantes de micetoma	41
1.6.2.1. <i>Madurella mycetomatis</i>	43
1.6.2.2. <i>M. grisea</i>	43
1.6.2.3. <i>Exophiala jeanselmei</i>	43
1.6.2.4. <i>Acremonium</i> spp.	44
1.6.2.5. <i>Leptosphaeria senegalensis</i>	44
1.6.2.6. <i>Pyrenochaeta romeroi</i>	44
1.6.2.7. <i>Scedosporium apiospermum</i>	44
1.7. DIAGNÓSTICO	46
1.7.1. Laboratorio	46
1.7.1.1. Examen directo	46
1.7.1.2. Cultivo	46
1.7.2. Histología	48
1.7.3. Radiología	53
1.8. TRATAMIENTO	54
1.8.1. Actinomicetoma	54
1.8.2. Eumicetoma	56

PARTE 2. INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	57
2.2. HIPÓTESIS	57
2.3. OBJETIVOS	58
2.3.1. General	58
2.3.2. Objetivos particulares	58
2.4. DISEÑO DEL ESTUDIO	59
2.4.1. Tipo de estudio	59
2.4.2. Estudio de la respuesta inmune celular	59
2.4.2.1. Pacientes y controles	
2.4.2.1.1. Pacientes	59
2.4.2.1.2. Controles	59
2.4.2.2. Material	
2.4.2.2.1. Antígenos	59
2.4.2.2.2. Mitógenos	59

2.4.2.3. Obtención de antígeno crudo de <i>N. brasiliensis</i> (NB)	60
2.4.2.4. Obtención de fracciones de NB	60
2.4.2.5. Intradermorreacciones	62
2.4.2.6. Ensayos de proliferación celular	62
2.4.2.7. Determinación de niveles de citocinas	63
2.4.3. Estudio de la respuesta inmune humoral	63
2.4.3.1. Pacientes y controles	63
2.4.2.2. Plasma	64
2.4.2.3. Antígenos	64
2.4.2.4. Procedimiento	66
2.4.4. Métodos estadísticos	67

PARTE 3. RESULTADOS

3.1. ANTÍGENOS	68
3.2. INTRADERMORREACCIONES	69
3.3. PROLIFERACIÓN CELULAR	70
3.4. CITOCINAS	71
3.5. INMUNOGLOBULINAS	74

PARTE 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. DISCUSIÓN	78
4.2. CONCLUSIONES	86
4.3. PERSPECTIVAS	86
BIBLIOGRAFÍA	87

PARTE 5. PUBLICACIONES GENERADAS DEL PROYECTO

- 5.1. Méndez-Tovar LJ, Mondragón-González R, Vega-López F, Dockrell HM, Hay R, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Padilla-Desgarenes C, Bonifaz A. Cytokine production and lymphocyte proliferation in *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma patients. *Mycopathologia* 2004;158:407-14 101
- 5.2. Méndez-Tovar LJ, Mondragón-González R, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Bonifaz A, Anides-Fonseca A, Araiza J, Vega-López F. Inmunoglobulinas en pacientes con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. *Rev Argent Microbiol* 2004;36:174-8 109

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS Y CUADROS

Figura 1. Actinomicetoma en pierna	2
Figura 2. Distribución geográfica del micetoma	9
Figura 3. Distribución geográfica del micetoma en México	10
Figura 4. Pseudofilamentos y granos de actinomicetoma	16
Figura 5. Corte histológico de tejido con granos de actinomicetoma	17
Figura 6. Secuelas de actinomicetoma de larga evolución	17
Figura 7. Lesiones óseas en huesos del pie	19
Figura 8. Aspecto clínico de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	21
Figura 9. Eumicetoma por <i>Madurella grisea</i>	23
Figura 10. Granos de actinomicetoma en el examen directo	47
Figura 11. Cultivo de <i>N. asteroides</i> y <i>N. brasiliensis</i>	49
Figura 12. Cultivos de agentes de eumicetoma	50
Figura 13. Aspecto histológico de granos de actinomicetoma	51
Figura 14. Aspecto histológico de granos de eumicetoma	52
Figura 15. Obtención de antígenos de <i>N. brasiliensis</i>	61
Figura 16. Equipo Rotofor®	64
Figura 17. Procesamiento de muestras de sangre de pacientes y controles	65
Figura 18. Concentración de proteínas y pH de fracciones antigénicas	68
Figura 19. Respuesta intradérmica a candidina y PPD	69
Figura 20. Proliferación celular de CMSP en pacientes y controles	70
Figura 21. Liberación de IL-10 en cultivos de CMSP	72
Figura 22. Liberación de IFN- γ en cultivos de CMSP	73
Figura 23. Liberación de TNF- α en cultivos de CMSP	73
Figura 24. Niveles de IgG1 en pacientes y controles	75
Figura 25. Niveles de IgG2 en pacientes y controles	75
Figura 26. Niveles de IgG3 en pacientes y controles	76
Figura 27. Niveles de IgG4 en pacientes y controles	76
Figura 28. Niveles de IgM en pacientes y controles	77

Cuadro 1. Relación entre edad/sexo y número de casos de micetoma en México	12
Cuadro 2. Localización del micetoma reportada por diferentes autores	18
Cuadro 3. Familias, géneros y especies de actinomicetales de importancia médica	35
Cuadro 4. Características bioquímicas de los agentes de actinomicetoma	40
Cuadro 5. Agentes principales de eumicetoma	42
Cuadro 6. Liberación de IL-4 en cultivos de CMSP de pacientes y controles	71

RECONOCIMIENTOS

*La culminación de este trabajo condensa el esfuerzo de innumerables personas. En primer lugar de **mi familia**, en donde mi madre doña María y mis hermanos, Guillermo, Miguel, María y Antonio, han sido una fuente inagotable de apoyo material y sobre todo de afecto y confianza, e incluso de sacrificios en detrimento de algunos de ellos.*

*He tenido la fortuna de conocer, aprovechar y aún de disfrutar las enseñanzas de grandes **maestros**, a quienes debo una influencia sobre mi manera de percibir la vida. Esas enseñanzas se han dado en el ámbito formal de una relación maestro-alumno, pero quizá las más valiosas se han generado por la dimensión humana de esa relación. Ocupa un lugar especial por su productividad académica y afectiva, la relación que se ha logrado construir a lo largo de más de dos décadas el Dr. Rubén López Martínez.*

Los vínculos afectivos con algunos de mis discípulos, compañeros de trabajo y vecinos, en cuya lista no podría dejar de mencionar a Patricia, Francisca, Julio, José, Alberto, Raymundo y Alfredo, han sido de gran valor porque además de compartir intereses académicos y culturales, han tenido las expresiones necesarias para ayudarme a afrontar los momentos difíciles y los contratiempos.

Gracias a todos.

Un anhelo especial de este logro académico, es que sirva de estímulo a Luis Guillermo, mi hijo, y a mis sobrinos María, Roberto, Jorge, Silvia, Sandra, Alejandro y Eric, para superarse cada día y buscar su propio bienestar.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON ACTINOMICETOMA

Resumen

El actinomicetoma es una infección subcutánea frecuente en México causada principalmente por *Nocardia brasiliensis*. La inmunología del micetoma no está suficientemente investigada. El objetivo del estudio fue comparar algunos aspectos de la inmunidad adaptativa celular y humoral entre pacientes y controles.

Pacientes y métodos. Veinticinco pacientes y 25 controles. Se realizaron los siguientes estudios: A) intradermorreacción con PPD y candidina; B) proliferación celular de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), estimuladas con antígeno de *N. brasiliensis* (NB) y cinco fracciones derivadas (NB2, NB4, NB6, NB8, NB10); C) cuantificación en los cultivos de IFN-gama, TNF-alfa, IL-4, IL-10 e IL-12; D) niveles de inmunoglobulinas séricas específicas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM).

Resultados. La induración con PPD fue de 4 mm/8.5 mm y con candidina de 14.5 mm/8.5 mm pacientes/controles respectivamente. La proliferación celular fue igual en ambos grupos. La producción de IFN-gama fue menor en pacientes, con NB6 244 pg/ml contra 814 pg/ml en controles. Se detectó IL4 sólo en cultivos de pacientes. La producción de TNF-alfa con NB fue 1274 pg/ml/661 pg/ml pacientes/controles respectivamente. La cantidad de inmunoglobulinas también fue mayor en los sueros de los pacientes; las diferencias máximas se observaron en las subclases IgG3 e IgG4.

Conclusiones. Los pacientes con actinomicetoma tienen un reconocimiento antigénico normal, pero la respuesta adaptativa celular es predominantemente de tipo Th2.

Palabras clave: micetoma, *Nocardia*, inmunología

IMMUNE RESPONSE STUDY IN ACTINOMYCETOMA PATIENTS

Abstract

Actinomycetoma is a frequent subcutaneous infection in Mexico, mainly caused by *Nocardia brasiliensis*. The immunologic features of this syndrome are scarcely researched. The aim of this work was to compare some aspects of the adaptative immune response (cell and humoral) between patients and controls.

Patients and Methods. Twenty five actinomycetoma patients and 25 controls were submitted to the next studies: A) skin test with PPD and candidin; B) cell proliferation assays in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with a crude antigen (NB) and five derivated fractions (NB2, NB4, NB6, NB8, NB10) obtained from *N. brasiliensis*; C) determination of cytokines production in PBMC cultures; and D) serum specific immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM) by the ELISA technique was performed.

Results. The induration diameter were: PPD 4 mm versus 8.5; candidin 14.2 mm versus 8.5 mm in patients and controls respectively. Statistically the cell proliferation was similar in both groups. With NB6 IFN-gamma production was higher in controls (814 pg/ml) than in patients (244 pg/ml). IL4 was produced only in patients' cultures. TNF-alpha production was higher in patients cultures (1274 pg/ml) than in controls (661 pg/ml) when cells were stimulated with NB antigen. The highest difference in immunoglobulins production was observed in IgG3 and IG4 subclasses in patients.

Conclusion. Actinomycetoma patients have a normal antigenic recognizing but the adaptative cell immune response induced by *N. brasiliensis* antigens is predominantely type Th2.

Key words: mycetoma, *Nocardia*, immunology.

ABREVIATURAS

ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
APD	Agar Papa Dextrosa
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
DDS	Diamino difenil sulfona (dapsona)
DL	Dosis letal 50
DNCB	Dinitroclorobenceno
H-E	Hematoxilina eosina
HM	Harina de maíz
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G1
IgG2	Inmunoglobulina G2
IgG3	Inmunoglobulina G3
IgG4	Inmunoglobulina G4
IgM	Inmunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6

L-J	Medio de Lowenstein-Jensen
LPS	Lipopolisacáridos
LTAs	Ácidos lipoteicoicos
NK	Natural killer (células asesinas naturales)
NPN	Neutrófilos polimorfonucleares
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PHA	FitoHEMAAGLUTININA
PM	Peso molecular
PPD	Derivado proteico purificado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
Th1	Respuesta inmune Th1 (predominantemente celular)
Th2	Respuesta inmune Th2 (predominantemente humoral)
TLRs	Receptores tipo “toll”
TMT/SMX	Trimetropim/sulfametoxazol
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Z-N	Tinción de Ziehl-Neelsen

PARTE 1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO

Etimológicamente el término “micetoma” forma prefija del gr. *Mikel*, *-etos*; hongo y *oma*. sufijo griego que indica tumor o tumefacción. ---*tumor de hongos*--- (28). Este concepto se debe diferenciar del término aspergiloma o de otras masas fúngicas formadas en cavidades preexistentes en pulmones u otros sitios como los senos nasales.

Durante el II Simposio Internacional de Micetomas realizado en la ciudad de Taxco (Estado de Guerrero, México), en 1987 se nombró un “Comité de Expertos en Micetoma” formado por los doctores: François Mariat, (Francia), Gabriel Segretain (Francia) El Sheik Mahgoub (Sudán) y Segundo Barraeta (Venezuela), quienes establecieron el siguiente concepto:

El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar los huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas a través de las cuales se elimina pus y granos constituidos por filamentos. Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o actinomicetales (actinomicetoma) (75) (figura 1).



Figura 1. Aspecto clásico del micetoma en una paciente femenina con actinomicetoma en pierna causado por *Nocardia brasiliensis* de 5 años de evolución. Se observa aumento de volumen, nódulos, fistulas y cicatrices retractiles de fistulas cerradas.

1.2. HISTORIA

El micetoma fue la primera enfermedad micótica descrita en la historia de la humanidad, misma que aparece en la India en el *Atharva-Veda*, texto religioso escrito en sánscrito entre los años 2000 y 1000 a.C., en donde se menciona una enfermedad llamada “padavalmika” (pie hormiguero) y resaltan sus diferencias con otra patología frecuente en esa época llamada “slipatham” (pie de elefante) causado por filarias. Desde luego, esa primera descripción está enfocada únicamente a los aspectos clínicos sin mencionar la posible etiología (30).

Pasaron muchos siglos hasta la siguiente mención de la enfermedad, hecha en forma vaga por Gill en 1842 (*citado por 67*), en un dispensario de Madura (isla situada en el suroeste de Indonesia). Cuatro años más tarde, Goddfrey, quien era cirujano en Madras (actualmente Chennai, importante puerto en la India), publicó cuatro casos observados entre 1844 y 1845. Eyre revisó por vez primera varias decenas de pacientes (33), describiendo las características clínicas y epidemiológicas de 40 casos de este padecimiento y mencionó la amputación como terapia efectiva.

Carter, en 1860 (21), publicó interesantes observaciones acerca de esta patología estableciendo el carácter infeccioso, describiendo los “granos negros” y los “granos pálidos”, aunque erróneamente pensó que unos eran resultado de la degeneración de otros. El trabajo donde se reunieron todas las observaciones de Carter, fue publicado en 1874 (22) en forma monográfica bajo el título “On micetoma or the fungus disease of India”; en su obra describe aspectos clínicos y etiológicos dibujando de manera precisa al hongo hoy conocido como *Madurella mycetomatis*.

Boyce y Surveyor en 1894 (18), demostraron que los diferentes agentes de micetoma se correlacionan con el tipo de granos presentes en las lesiones, incluso señalaron

que los granos blanco amarillentos en su mayoría están formados por agentes bacterianos y que solo algunos son originados por hongos. Describieron también los cambios histológicos asociados al padecimiento. La publicación se acompañó de dibujos a color constituyéndose en ese tiempo en un clásico acerca del tema.

Vincent en 1894, (110) publica una revisión sobre los agentes etiológicos del micetoma, proponiendo como agente bacteriano a *Streptothrix madurae*, a partir de esa publicación, otros investigadores describieron de manera precisa otros agentes bacterianos como causantes de micetoma. Una excelente revisión de los actinomicetales como agentes etiológicos de diversas infecciones fue publicada en la década de los cincuentas por Waksman SA, y aún en nuestros días sus descripciones son valiosas (112).

A principios del siglo XX, Brumpt (19) creó un nuevo género para los hongos obtenidos de granos negros *Madurella mycetomi*; actualmente, este es el agente que se aísla mundialmente con mayor y recibe el nombre de *M. mycetomatis*.

En México, la primera publicación del tema fue realizada por Cicero en 1911 (23); en ella el autor hizo una revisión sobre los reportes de la literatura, describe cinco casos de su casuística personal y cuatro casos más diagnosticados en diferentes hospitales de México. El mismo autor revisó la distribución geográfica y describió la morfología de los granos, haciendo notar que la forma de la estructura parasitaria observada en los tejidos está en relación con el agente.

En la década de los cincuentas, González-Ochoa *et al.*, realizaron diversas investigaciones sobre el agente y la enfermedad; éstas comprendieron estudios inmunológicos en pacientes con actinomicetoma, evolución clínica y tratamiento. Los resultados mostraron que los títulos de anticuerpos precipitantes más elevados los presentaban los enfermos con lesiones extensas y nula respuesta a la aplicación

intradérmica de antígenos polisacáridicos de *N. brasiliensis*; generalmente los pacientes con estas características presentaban lesiones extensas y mala respuesta al tratamiento de. Un resumen de estos avances fue presentado durante el XII Congreso Internacional de Dermatología en 1962 (41).

Latapí en 1946, utilizó por vez primera la diaminodifenilsulfona para el tratamiento del micetoma, medicamento que aún en la actualidad es una de las bases terapéuticas (citado por 62). Años más tarde otros médicos e investigadores como Lavallo P (53), Ortíz-Ortíz (88) , Welsh (114), López-Martínez (59), Arenas (4), Salinas-Carmona (97), Bonifaz (17), Méndez-Tovar (79) han continuado aportando conocimientos sobre aspectos clínicos, epidemiológicos, fisiopatogenia, etiología, inmunología y tratamiento.

En Estados Unidos (EE.UU), la frecuencia de micetoma es baja; sin embargo, a lo largo de varias décadas, Blaine Beaman y diversos investigadores han aportado conocimientos importantes en relación al complejo *Nocardia asteroides*, agente de algunos casos de micetoma, pero principal agente de otra patología relacionada llamada nocardiosis. Entre las investigaciones sobresalientes podemos citar purificación a partir de *N. asteroides* de una enzima llamada superóxido-dismutasa y la demostración de que los niveles de producción tienen una relación directa con la virulencia de las cepas ya que inhibe mecanismos oxidativos de destrucción de los neutrófilos polimorfonucleares (NPN); otros estudios más demuestran que la activación de macrófagos alveolares por medio de IFN- γ y TNF- α tanto en humanos como de ratón confieren las células gran capacidad para fagocitar y destruir a *N. asteroides*. Si bien sus investigaciones están enfocadas principalmente a nocardiosis, muchas de las aportaciones podrían aplicarse también a *Nocardia brasiliensis* que es el principal agente del actinomicetoma; el resumen de decenas de trabajos fue publicado en una excelente revisión hace ya algunos años (9).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

1.3.1. Distribución geográfica

Debido a que los agentes de micetoma tienen una amplia distribución mundial, desde el punto de vista teórico, la patología se puede presentar en todos los países del mundo; sin embargo, las casuísticas más numerosas provienen de países situados entre los Trópicos de Cáncer y de Capricornio, entre las latitudes 15° S y 30° N (64) (figura 2). Aunque en la India la patología tiene una elevada frecuencia, diversos trabajos demuestran que el mayor número de casos se presenta en África y particularmente en Sudán, en donde Abbott (1) refiere que sólo en 30 meses se realizaron 1231 nuevos ingresos hospitalarios por esta causa. Esta elevada incidencia fue corroborada años más tarde por Lynch (61), quien describió cientos de nuevos casos y calcula que cada año se presentan entre 300 a 400 nuevos pacientes. Mariat en 1963 (69), realizó un estudio de prevalencia a nivel mundial, aunque los datos fueron incompletos ya que no todos los centros donde se atienden pacientes con micetoma enviaron los datos requeridos; de los 854 casos recopilados el autor hizo notar que México con 206 casos, es el país de América con el mayor número de pacientes con este padecimiento, siendo *Nocardia brasiliensis* el agente aislado con mayor frecuencia. En ese reporte no fueron registrados los datos de Sudán, por lo que Senegal aparece como el país con la máxima frecuencia a nivel mundial con 214 casos, la mayoría de ellos causados por hongos; otros países con prevalencia elevada son India, Pakistán e Indonesia. Años más tarde, el mismo Mariat *et al.* (70) ampliaron la base de datos, estableciendo relaciones entre los agentes, las condiciones climáticas y las características clínicas.

En México, la primera publicación de micetoma fue hecha por Cicero en 1912 (23). Posteriormente, investigadores como Latapí (52), Lavalle (53) y González-Ochoa (39),

publicaron estudios de prevalencia en diversos hospitales nacionales que mostraron la elevada frecuencia de este síndrome. En 1992. López-Martínez *et al.* (59) basados en los datos de los principales centros dermatomicológicos de la República Mexicana, revisaron las características clínicas y epidemiológicas de 2105 casos, la gran mayoría correspondieron a actinomicetoma (97.7%). Los pacientes eran originarios principalmente de los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Jalisco, Morelos y Guerrero (figura 3).

En algunas publicaciones (43,54,67) se menciona que los actinomicetomas se presentan en regiones de clima semidesértico con precipitación pluvial entre 50 a 500 mm, mientras que, los eumicetomas son frecuentes en regiones húmedas y cálidas, con precipitación pluvial entre 500 y 2000 mm por año. Sin embargo, los estudios de frecuencia en México como los publicados por Latapí en 1963 (52) y Lavalle en 1966 (54), muestran que los micetomas causados por *Nocardia brasiliensis* se presentan en estados con condiciones climáticas muy variables; por ejemplo, Nuevo León que tiene extensas áreas con clima semidesértico ocupó el segundo lugar en frecuencia, mientras que el estado de Jalisco, con zonas ricas en vegetación e incluso costas tropicales, en el estudio de López-Martínez *et al.* (59), tuvo el mayor número de casos.

En la década de los setentas, Velasco-Castrejón y otros investigadores, ensayaron el tratamiento del micetoma administrando un lisado de leucocitos; los resultados fueron irregulares, ya que algunos pacientes respondieron favorablemente, mientras que en otros se agravó el micetoma (108).

Mención especial merecen los micetomas causados por otro Actinomycete llamado *Actinomadura madurae*; Lavalle *et al.* en el 2000 (55), refieren que de 71 pacientes, 32.4% con micetoma de esta etiología, provenían del estado de Guanajuato, seguido por los estados de Puebla (12.6%) y Oaxaca (11.24%).

Streptomyces somaliensis es una especie que se presenta con mayor frecuencia en la parte oriental de África (Somalia, Sudán, Libia, Egipto, Etiopía y Mauritania). En México sólo se han registrado algunos casos, provenientes tanto del norte como del sur de la República Mexicana (Sonora, Guanajuato, Guerrero, Jalisco y Puebla) (54).

Existen estados en la República Mexicana, como Baja California Sur, Tlaxcala y Quintana Roo, en los que hasta 1992 no se habían reportado casos de micetoma. Este hecho refleja la carencia de personal entrenado y sin material adecuado para diagnosticar esta patología, ya que los pacientes de esos estados son atendidos y registrados en las casuísticas de los estados vecinos en donde se cuenta con los recursos y el personal adecuados para el diagnóstico (59).

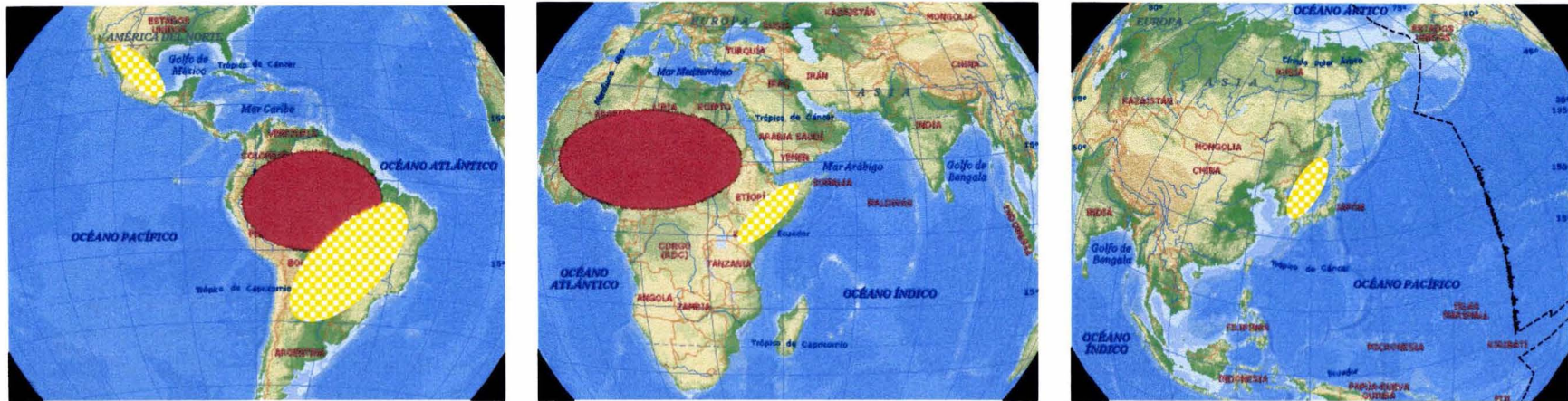
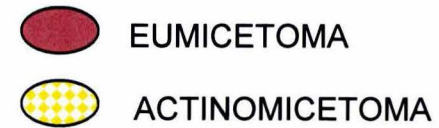
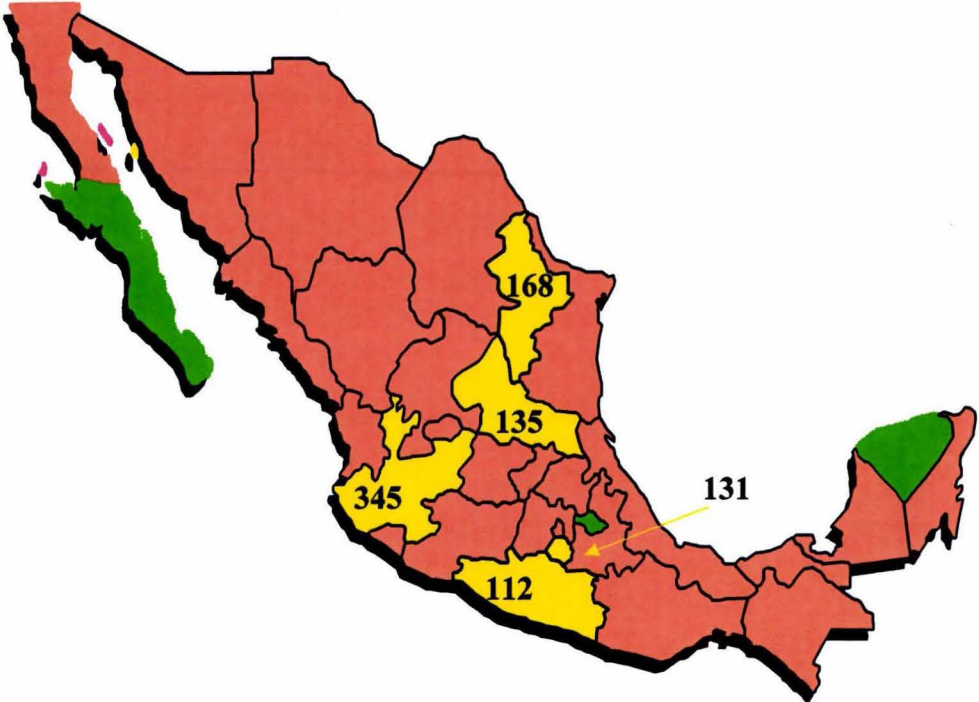


Figura 2. Distribución geográfica del micetoma. La mayor frecuencia se presenta en los países situados entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio. En África predomina el eumicetoma, en América el actinomicetoma. Japón se localiza al norte del Trópico de Cáncer y predomina los micetomas causados por *Nocardia asteroides* y *N. brasiliensis*. [Modificado de 65].

Figura 3. Estados de la República Mexicana con la mayor incidencia de micetoma (amarillo) y estados en donde no se habían reportado casos de esta enfermedad (verde)

[Modificado de (56)].



1.3.2. Ocupación

Los hongos y bacterias causantes de micetoma son organismos saprobios (viven en material vegetal en descomposición). La mayoría de los pacientes realiza labores de tipo agrícola, como lo hace notar Lavallo (53) quien entre 107 pacientes estudiados encuentra 66 campesinos. López-Martínez *et al.* (59) refieren una frecuencia similar en la casuística de 1374 pacientes: 60% eran campesinos. Otras actividades mencionadas son: ama de casa, estudiante, cargador, mecánico, etc. Al revisar el tipo de actividades, es fácil notar que la mayoría de individuos están expuestos a sufrir heridas que potencialmente se contaminan con tierra o con material vegetal. Así, las amas de casa son esposas de campesinos que durante todo el año ayudan en las actividades agrícolas; los estudiantes ayudan a sus padres antes o después de las actividades escolares; los mecánicos que se introducen debajo de los autos, muchas veces sin protección, se producen laceraciones en donde posteriormente se desarrolla el padecimiento, y finalmente los cargadores, que al transportar cargas de productos vegetales u otros materiales apoyados en la espalda o abdomen se inoculan el agente en estas regiones.

1.3.3. Edad

De acuerdo con múltiples casuísticas publicadas mundialmente, este padecimiento afecta a personas en la edad productiva; esto es, la mayoría de casos se presenta en pacientes que se encuentran entre los 20 y los 50 años de edad. Lavallo en un trabajo publicado en 1966 (53) donde revisa las características de 119 pacientes, encontró que 76% de los pacientes tenía entre 16 y 45 años. López-Martínez *et al.* (59) refieren que de 1374 pacientes, 77% tenía entre 16 y 50 años.

Es interesante hacer notar que en todas las edades es mayor el número de casos en hombres que en mujeres, pero en los extremos de la vida, la diferencia genérica es aún más evidente (cuadro 1). Como lo apoyan algunas investigaciones, esta modificación en la relación de casos hombre/mujer puede deberse a factores hormonales (76).

Cuadro 1. Relación entre edad/sexo y número de casos en 661 casos de micetoma en México.

Sexo	0 - 10*	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	> DE 80
Hombre	9	65	100	105	84	54	33	17	2
Mujer	2	30	52	42	40	18	5	2	1
Total	11	95	152	147	124	72	38	19	3
H/M	4:1	2:1	2:1	2:1	2:1	3:1	6:1	8:1	2:1

* Grupos de edad en años

[Modificado de (76)]

1.4. DESARROLLO DEL ACTINOMICETOMA

1.4.1. Mecanismo de infección

El micetoma se adquiere por inoculación traumática a través de la piel de los agentes etiológicos, mismos que son saprobios y se distribuyen de manera abundante en la naturaleza, aunque se aíslan con mayor facilidad a partir de tierras de cultivo debido a que éstas contienen gran cantidad de material orgánico en descomposición. Diversos trabajos, como el de Basset *et al.* (6), demuestran la importancia de las lesiones cutáneas con espinas como mecanismo de infección; ellos refieren que en dos casos de micetoma donde el tejido afectado contenía espinas de *Mimosaceae*, al cultivarlas obtuvieron en un caso *Pyrenochaeta romeroi* y en otro *Leptosphaeria senegalensis*. En México existe gran número de cactáceas que probablemente tengan importancia en la transmisión de la enfermedad.

Las condiciones de trabajo de los campesinos y agricultores de países subdesarrollados, quienes al carecer de recursos tecnológicos realizan gran número de actividades agrícolas con las manos o pies, juegan un papel importante en la elevada frecuencia de este padecimiento. Se debe considerar también que estas mismas personas tienen hábitos de vestimenta que brindan escasa protección contra las inoculaciones como son pantalones que terminan a la altura de la rodilla, uso de calzado abierto (guarache) o incluso ausencia de calzado. La carencia de vehículos y animales de carga, tractores y otras máquinas especiales, obliga a los campesinos a transportar productos agrícolas en la espalda o apoyados en el abdomen. En México, este hecho, explica la elevada frecuencia de micetoma en tronco, mientras que en India, muchos casos de micetoma afectan la cabeza (53,59).

1.4.2. Periodo de incubación

Debido a que los pacientes (generalmente campesinos) sufren lesiones prácticamente a lo largo de toda su vida, en el humano se desconoce el periodo de incubación. En modelos murinos, González-Ochoa (38) refiere que se forman granos entre el día 20 a 30 posterior a la inoculación con *N. brasiliensis*; también en modelos animales, Súchil, utilizando una suspensión de *N. brasiliensis* con densidad óptica de 0.9 a 1.0 a 650 nm, refiere la obtención de granos al día 60 (106). Finalmente, Salinas-Carmona *et al.* (97), observaron cambios histológicos y estructuras parasitarias características de un micetoma a los 30 días en ratones inoculados con *N. brasiliensis*.

Se desconoce la fisiopatogenia exacta del micetoma. De acuerdo con varias investigaciones (38, 57, 106), en los ratones es suficiente sólo un inóculo con la concentración adecuada para que se desarrolle la enfermedad. En el trabajo realizado por Macotella-Ruíz *et al.* (63), los autores sugieren que inoculaciones repetidas del microorganismo en baja concentración provocan una sensibilización del tejido y posterior desarrollo del micetoma.

Una vez que la bacteria o el hongo se localizan en los tejidos y sobrevive, los antígenos liberados y la permanencia del agente mismo, provocan una inflamación aguda a nivel local con llegada de NPN y activación de macrófagos. Estudios realizados por Burgois y Beaman en 1974 (20) mostraron que aunque la mayoría de bacterias son fagocitadas y destruidas, algunas logran sobrevivir hasta 16 días y pueden reproducirse. En otros estudios se demostró que la virulenta es variable entre diferentes cepas (102). Los NPN son capaces de destruir algunas cepas de *N. asteroides*, pero son ineficientes para eliminar aquellas que producen superóxido dismutasa o catalasa (10); probablemente esta

incapacidad de los leucocitos para destruir a *N. asteroides* se presente también para *N. brasiliensis*.

Los agentes no destruidos proliferan y forman colonias en el interior del tejido conocidas como “granos”; el desprendimiento de los pseudofilamentos de la periferia del grano ocasiona una inflamación continua con formación de nuevas estructuras parasitarias (figura 4) y colecciones de pus, que al fusionarse forman los trayectos fistulosos generalmente limitados por tejido fibroso; cuando las fistulas alcanzan la superficie, forman un nódulo que posteriormente se reblandece y abre liberando pus conteniendo colonias parasitarias del agente (figura 5).

El tejido conjuntivo formado alrededor de los microabscesos y de las fistulas produce una retracción que ocasiona el aspecto deprimido de las fistulas antiguas. La presencia de microabscesos, fistulas, inflamación, edema y fibrosis provoca externamente la deformidad y dureza del área afectada (figura 6) e internamente obstrucción de la circulación por compresión mecánica y por arteritis. Estos cambios histológicos influyen en la pobre respuesta terapéutica en los pacientes con evolución prolongada (37).

Aunque existe el reporte de algunos casos de micetoma con diseminación linfática o por vía sanguínea (27, 90), generalmente los agentes del micetoma invaden los tejidos por contigüidad. La aponeurosis muscular y el periostio no se afectan en los primeros años de evolución del padecimiento; posteriormente, en el tejido óseo se observa periostitis, osteítis, osteoporosis, destrucción del canal medular, formación de cavernas (geodas), destrucción de superficies articulares y finalmente anquilosis (figura 7) (64).

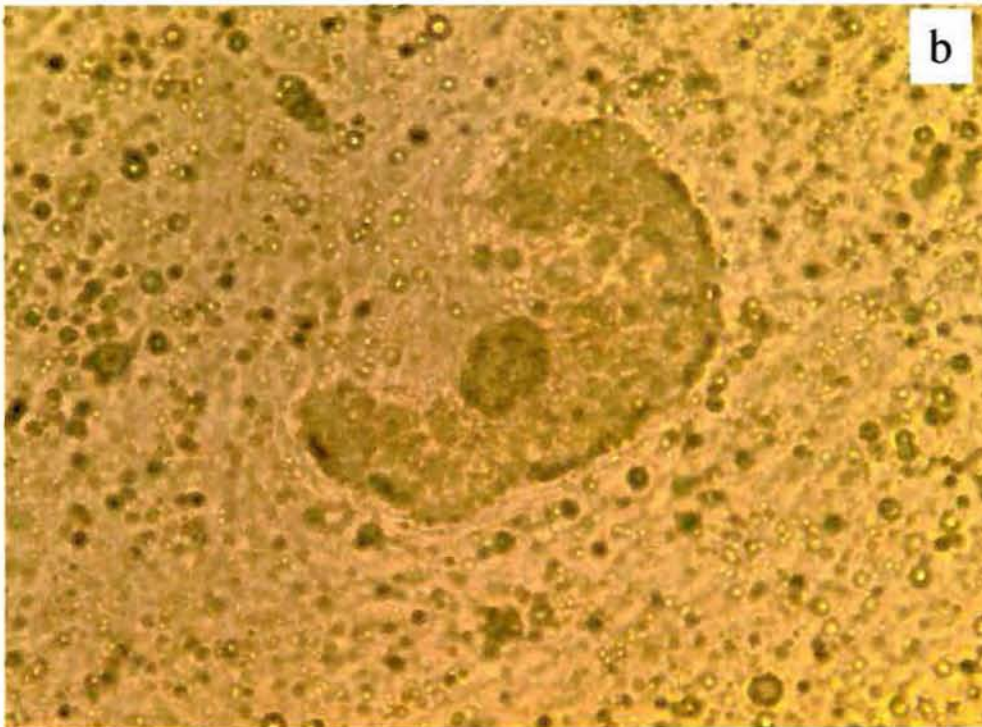
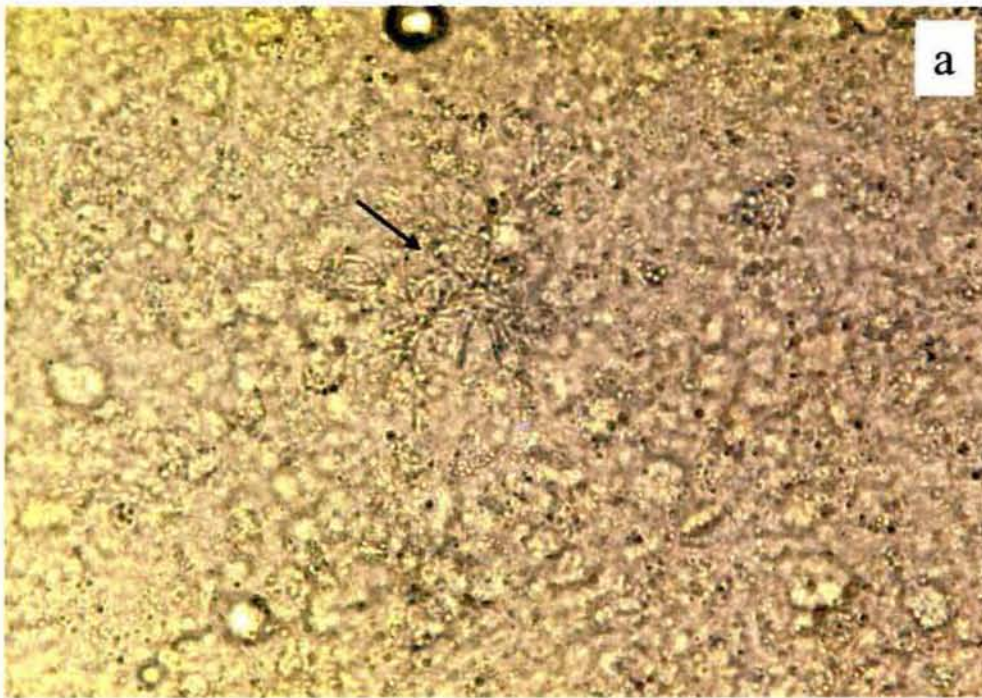


Figura 4. a) Pseudofilamentos inmersos en el material purulento. El crecimiento de estos fragmentos da origen a nuevos granos (1000x).
b) Granos de *Nocardia* sp. en examen directo (400X).

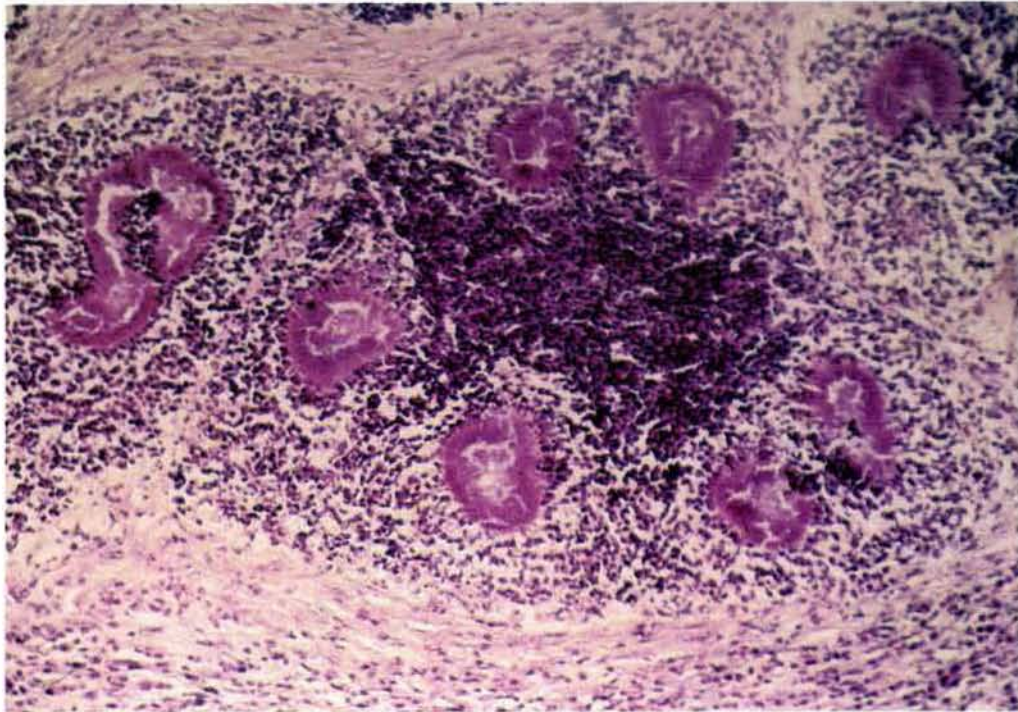


Figura 5. Corte histológico teñido con hematoxilina-eosina en donde se observan varios granos pequeños y el tejido fibroso formando un trayecto que limita el área inflamada.



Figura 6. Paciente femenina con actinomictoma de 15 años de evolución donde se observa la deformidad de la extremidad afectada.

1.4.3. Localización corporal de las lesiones

Por la naturaleza saprofita de los agentes causales de micetoma que posibilita la infección principalmente por traumatismo en pie o pierna, todas las casuística de frecuencia muestran un franco predominio de afección a extremidades inferiores, pero de acuerdo con las costumbres de trabajo o de vestido y a las condiciones socioeconómicas, los porcentajes de frecuencia presentados en cada área topográfica por diferentes autores, pueden tener alguna variación (cuadro 2).

Cuadro 2. Localización del micetoma de acuerdo a diferentes autores (%).

Sitio	Sudan (Mahgoub y Murray IG, 1971)	Senegal y África Occidental (Rey, 1961)	México (González- Ochoa, 1962)	México (López- Martínez <i>et al.</i> , 1992)
Pie	68.8	68	35	33.5
Pierna	3.2	10	28	30.6
Rodilla	4.4	4	-	
Muslo	2	3	-	
Nalgas y perineo	2	3	1	-
Mano	10.7	5	2	13.6
Brazo	3.8	3	8	
Abdomen	1	1	3	17.4
Tórax	1	1	20	
Cabeza y cuello	3.1	2	3	2.5
Dos o más regiones	-	-	-	2.4

- No reportada

(Modificado de 59, 67)



Figura 7. Daño óseo en huesos cortos del pie en un paciente con actinomicetoma de ocho años de evolución causado por *N. brasiliensis*.

De acuerdo con los datos publicados por González-Ochoa *et al.* (36) y por López-Martínez *et al.* (59), es notable que en México la frecuencia de afección torácica es muy elevada. Esto se debe a la costumbre de los campesinos mexicanos de transportar bultos sobre la espalda o apoyados en el abdomen. En África, los naturales lo hacen sobre la cabeza y sujetándolos con las manos lo que explica la frecuencia más elevada de micetomas de localización cefálica y en manos en ese continente. En México los casos de micetoma en rodilla se presentaron principalmente en mujeres de áreas rurales, ya que habitualmente lavan la ropa y cocinan apoyadas sobre sus rodillas, traumatizándolas e infectándolas con el agente.

1.4.4. Aspecto de las lesiones y agentes

En general todos los agentes provocan en el sitio afectado aumento de volumen, deformidad, nódulos y formación de fistulas a través de las cuales drena el pus, casi siempre filante, en ocasiones fétido y que contiene granos. Es importante hacer notar que las lesiones son indoloras y los pacientes buscan apoyo médico tardíamente. La mayoría de autores coincide en que es difícil establecer el agente etiológico con base en el aspecto de las lesiones, no obstante, algunos agentes etiológicos, causan lesiones orientadoras que permiten suponer el agente causal. Estos se describirán de manera sucinta a continuación.

1.4.4.1. *Nocardia* spp.

Aunque predominan en pie, se pueden presentar en cualquier parte del cuerpo. El área afectada generalmente es extensa; a la palpación está mal definida y los límites de induración no se pueden determinar con precisión. El aspecto externo de las lesiones corresponde a una zona inflamada con numerosas fistulas de las que drena material purulento en gran cantidad. La patología progresa más rápidamente que en los eumicetomas y la invasión a hueso ocurre en los dos primeros años de evolución (figura 8).

1.4.4.2. *Actinomyces madurae*

Se localiza principalmente en la parte media del pie y raramente se presentan afecciones fuera de este segmento corporal. Provoca la formación de masas prominentes e irregulares, duras con pocas fistulas lo que obliga a hacer diagnóstico diferencial con procesos tumorales de otra etiología. La relación de casos hombre/mujer es 1:1 (55).

1.4.4.3. *A. pelletieri*

Actinomiceto que tiende a afectar hueso con mucha frecuencia; las lesiones se presentan en extremidades inferiores pero la localización extrapodal es frecuente. Las lesiones son muy inflamatorias, con gran número de fistulas y de manera característica los pacientes presentan más adenopatías que en los otros agentes. La radiología generalmente muestra datos de periostitis además, con frecuencia se observan geodas en astrágalo y calcáneo (54).



Figura 8. Micetoma causado por *N. brasiliensis*. Se observan múltiples lesiones, aumento de volumen y la deformidad característica del sitio afectado sin una delimitación de las áreas afectadas y el tejido sano.

1.4.4.4. *Streptomyces somaliensis*

La lesión tiende a localizarse en extremidades inferiores, afectando el pie prácticamente en toda su extensión; a diferencia de *N. brasiliensis*, provoca un escaso número de fistulas, pero la fibrosis es más intensa por lo que la dureza del área afectada es mayor; en ocasiones se observan prominencias blandas que son fistulas en proceso de abrirse. La tendencia de este agente a afectar huesos es menor que la observada en *N. brasiliensis* (54).

1.4.4.5. Micetomas causados por hongos

La evolución tiende a ser más lenta que la del actinomicetoma; es frecuente que esta patología forme masas tumorales fibrosas, bien delimitadas, con escaso número de fistulas. En algunos agentes como *Madurella grisea*, se observan puntos marrón oscuro o negros en las fistulas que están a punto de abrirse (figura 9). Aunque de manera lenta, la destrucción del hueso es una constante también en los casos de micetoma causado por hongos. Si bien la patología tiende a ser indolora, las alteraciones en la marcha y la pérdida de estabilidad causan dolor en el paciente, y es entonces cuando acuden a solicitar atención médica, la mayoría de las veces tardíamente.



Figura 9. Eumycetoma causado por *Madurella grisea*. Se observa una masa tumoral en planta, bien definida, con puntos negros que señalan la presencia de granos

1.5. FISIOPATOGENIA DEL MICETOMA

Como toda infección, para comprender la evolución de la enfermedad es necesario estudiarla desde tres puntos de vista: 1) **características del hospedero**; 2) **características de los agentes etiológicos** y 3) **ambiente**. Investigaciones detalladas sobre los aspectos mencionados son determinantes para explicar por que una infección afecta a determinados segmentos de la población, la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

1.5.1. Factores relacionados con el hospedero

1.5.1.1. Hormonas y micetoma

Como lo hicieron notar González-Ochoa *et al* (41) hace más de medio siglo, el micetoma es más frecuente en el hombre que en la mujer, pero esta prevalencia masculina no puede explicarse únicamente sobre la base de la ocupación como mayor riesgo de infección. Lavalle en 1966 (53), corroboró esta prevalencia y cuestionó el papel del riesgo de infección como único factor. En su trabajo describe el caso de una paciente con actinomicetoma que durante el transcurso de sus tres embarazos empeoraba y después del parto mejoraba.

Desde mediados del siglo pasado se han descrito una serie de hormonas sexuales en los hongos como *Allomyces* sp. Algunos de los compuestos hormonales fúngicos, como el anteridiol y el oogoniol producidos por *Achlya* sp., tienen gran parecido estructural con las hormonas sexuales humanas (42). Basados en las descripciones de receptores micóticos, en la década de los ochentas se investigó si las hormonas sexuales modificaban el desarrollo *in vitro* de *Coccidioides immitis* cuya frecuencia es mayor en hombres que en mujeres. Se demostró que las hormonas sexuales humanas, particularmente la testosterona y la progesterona, estimulaban el desarrollo *in vitro* del agente y explicaban el predominio de

infecciones en el hombre (31). En el caso de la mujer embarazada, la elevada concentración de progesterona en suero aparentemente favorece la diseminación del agente. Este tipo de observaciones se extendió a otros hongos como *Paracoccidioides brasiliensis* en que se demostró que el estradiol inhibe la conversión de la fase micelial a la fase parasitaria disminuyendo el número de infecciones graves en las mujeres (91).

Estudios realizados por Méndez-Tovar *et al.* demostraron que las hormonas sexuales modifican la velocidad de crecimiento de *M. grisea* y *P. romeroi*, hongos causantes de micetoma. El efecto fue particularmente importante cuando al medio de cultivo se adicionó progesterona, hormona que inhibió parcialmente el desarrollo; este efecto inhibitor fue menor con testosterona mientras que, el estradiol no ejerció ningún efecto (79).

Investigaciones *in vitro* y en modelos murinos realizadas por Hernández-Hernández *et al.* (44) utilizando como inóculo a *N. brasiliensis*, demostraron que la progesterona y en menor grado la testosterona, inhiben el desarrollo colonial de este agente; el estradiol no ejerció ningún efecto sobre el desarrollo. En los modelos murinos tratados con hormonas, se observó que los ratones macho desarrollaban infecciones mucho más severas y de evolución más rápida que las hembras. Los cultivos a partir de los tejidos de animales infectados tuvieron el doble de positividad en los ratones machos a quienes se les administró testosterona que en los ratones hembra que recibieron progesterona o estradiol.

Los hallazgos en relación con las hormonas sexuales humanas en investigaciones de ambos tipos de agentes de eumicetoma, explican en parte el predominio de esta patología en personas del sexo masculino, dejando aún interrogantes ya que la respuesta no es igual en todos los hongos ni en todas las bacterias.

La gran mayoría de pacientes con micetoma presentan astenia, adinamia y en ocasiones depresión, estos datos motivaron a Fahal para investigar el funcionamiento de

otros órganos como la glándula tiroidea a través de los niveles séricos de tiroxina y triyodotironina en pacientes con eumicetoma. Los resultados mostraron que los pacientes con micetoma son eutiroideos, y los datos clínicos referidos como motivo de esta investigación se deben a la cronicidad de las lesiones, la incapacidad funcional que provoca, al tratamiento quirúrgico que en muchas ocasiones consiste en la amputación y a las pobres condiciones socioeconómicas en que vivían (34).

En un grupo de 26 pacientes con eumicetoma atendidos en Reino Unido, se diagnosticó diabetes mellitus en nueve de ellos (35%); este porcentaje es más elevado que el de la población general de varios países (por ejemplo, México tiene aproximadamente 13% de diabéticos). Sin embargo, la diabetes mellitus al parecer no es un factor predisponente para desarrollar micetoma (26,43).

1.5.1.2. Inmunidad y micetoma

1.5.1.2.1. Inmunidad innata

Es la primera en entrar en contacto con cualquier agente infeccioso y los primeros estudios inician hace más de 100 años, sin embargo, sólo en la última década esta ha sido reconocida en toda su importancia, en la actualidad sus principales componentes como son: barreras epiteliales, neutrófilos, macrófagos, linfocitos natural killer (NK) el complemento y otras proteínas se estudian con intensidad (14). En la última década una serie de estudios demuestran la importancia de la respuesta innata de dos grupos de moléculas. Unas son las llamadas *patrones moleculares asociadas a patógenos* (PAMPs) que son componentes moleculares comunes presentes en bacterias, hongos u otro tipo de parásitos, ejemplos de estos patrones son el lipopolisacárido (LPS), ácidos lipoteicoicos (LTAs), etc.; y otras moléculas presentes en las células del hospedero llamadas originalmente *receptores de*

reconocimiento de patrones (PRRs), moléculas que reconocen gérmenes por grupo, es decir, algunos PRRs reconocen las bacterias que en su pared contienen LPS aun cuando, no haya existido contacto previo. Un grupo de PRRs se conocen genéricamente como **toll-like receptors** (TLRs), estas moléculas son receptores transmembrana ricos en serina con una porción citoplasmática fosforilable. Estos TLRs están presentes en las células presentadores de antígenos, y son los encargados de realizar unirse a PAMPs y desencadenar respuestas de inmunidad innata de suma importancia para los seres vivos, incluyendo *Drosophila* (que fue donde se descubrieron por vez primera vez) y se han conservado en los mamíferos, incluyendo el hombre. Una revisión clara de estos aspectos fue publicada recientemente por Medzhitov (72). Estudios acerca de estos avances recientes aún no se han realizado en el micetoma, donde los estudios referentes a inmunidad innata son escasos, y en la mayoría de ellos se estudia de manera combinada con la inmunidad adaptativa como se verá en los siguientes ejemplos.

En un trabajo realizado por Conde *et al.* en 1983 (25), se demuestra la presencia de anticuerpos específicos para *N. brasiliensis* y fracción C3 de complemento en los tejidos de ratones infectados experimentalmente a las dos semanas de postinoculación, mientras que los anticuerpos se demostraban en el suero hasta 45 días después. Los autores sugirieron que estos anticuerpos podrían estar bloqueando sitios determinantes antigénicos del agente para de esta manera perpetuar la infección.

En 1989, Bonifaz y Fong (17) investigaron la función de células fagocíticas profesionales, particularmente de NPN, en pacientes con micetoma quienes en un grupo de 15 pacientes con actinomicetoma. Los dos parámetros evaluados fueron quimiotaxis y fagocitosis por medio de quimioluminiscencia; los investigadores no encontraron diferencias entre la capacidad de los NPN de pacientes y la del grupo control.

Blaine Beaman ha dirigido varios estudios en los que se ha estudiado la capacidad de los macrófagos y neutrófilos para fagocitar y destruir a *N. asteroides*. En resumen, se ha demostrado que la bacteria es viable hasta 16 horas después de haber sido fagocitada y que la viabilidad guarda relación directa con dos características: a) producción de superóxido-dismutasa que inhibe los mecanismos de destrucción mediados principalmente por oxígenos de los NPN; y b) capacidad de formar una segunda pared bacteriana dentro de los macrófagos (9).

1.5.1.2.2. Inmunidad adaptativa

Aunque también insuficientes, los trabajos de este aspecto de la inmunidad, son más numerosos. Entre los primeros trabajos sobre se encuentran los de González-Ochoa y sus colaboradores, quienes estaban interesados en desarrollar una prueba intradérmica para el diagnóstico de este síndrome. Los resultados iniciales mostraron que si bien los pacientes presentaban un fenómeno de hipersensibilidad a nivel cutáneo con antígenos obtenidos por filtración, esta prueba era negativa en pacientes con enfermedad muy diseminada asociada generalmente a un condición general deteriorada (40).

Años más tarde, Shibayama estudió la aplicación de precipitación en suero y aglutinación como herramientas útiles para el diagnóstico de actinomicetoma, y se trató de establecer su especificidad comparando la reacción que ocurría con antígenos de *N. brasiliensis*, *N. asteroides* y *Mycobacterium tuberculosis* (100). En trabajos realizados por González-Ochoa y sus colaboradores, se demostraron tanto en modelos murinos como en casos de pacientes con micetoma que los títulos elevados de anticuerpos fijadores de complemento contra *Nocardia* spp. se asocian con un pronóstico más grave, también acompañado por respuestas negativas a la aplicación intradérmica de antígenos como

nocardina o tuberculina. Las intradermorreacciones se tornan positivas en caso de mejoría de los pacientes (38, 41).

En la década de los setentas, varios investigadores obtuvieron antígenos citoplasmáticos y ribosomales semipurificados, unos de tipo proteico y otros ricos en carbohidratos, que mostraron mayor especificidad en las pruebas intradérmicas de hipersensibilidad; al igual que en otros trabajos, los pacientes con enfermedad grave tuvieron intradermorreacciones débiles o negativas (87, 88). En modelos murinos, Rico *et al.* en 1982 (92) demostraron que la transferencia de anticuerpos anti*Nocardia* no sólo no protegía a los animales de la infección, sino que, éstos se agravaban, mientras que la transferencia de linfocitos T de bazo mejoraban el pronóstico e incluso controlaban completamente la infección. En Sudán, donde los micetomas son causados principalmente por hongos, las investigaciones han mostrado resultados semejantes. Mahgoub *et al.* (68), reportaron que la mayoría de pacientes en quienes se valoró su capacidad de respuesta a dinitroclorobenceno (DNCB) y a tuberculina, tuvieron una respuesta negativa, mientras que la IgM e IgA estuvieron por encima de los valores del grupo control sin micetoma. Singhvi estudió la concentración de IgM, IgG e IgA en pacientes con micetoma causado por *M. mycetomatis*, *S. somaliensis* y *A. madurae*; las tres inmunoglobulinas estuvieron aumentadas en pacientes con eumicetoma, mientras que la IgG e IgM estuvieron por debajo de los límites normales en pacientes con actinomicetomas que afectaban huesos (102).

Estudios en modelos animales corroboraron las observaciones clínicas de González-Ochoa en relación con la importancia de la respuesta inmune celular para la protección de infecciones causadas por *Nocardia*. En 1978, Beaman *et al.* (11) mostraron que los ratones atímicos inoculados con *N. asteroides* desarrollaban infecciones diseminadas y mortales en

corto plazo mientras que los ratones normales y los ratones Nu/+ presentaban infecciones localizadas que curaban espontáneamente.

Vera-Cabrera *et al.* han obtenido antígenos purificados utilizados en el diagnóstico serológico de algunos casos de micetoma que no presentan las características habituales (109). Otros antígenos obtenidos con la misma finalidad han sido reportados por Boiron *et al.* (16), quienes obtuvieron un antígeno de 54 kDa que puede ser utilizado para diagnosticar además del micetoma, otras enfermedades causadas por actinomicetales como la nocardiosis. Salinas-Carmona *et al.* utilizando antígenos de 24 y 26 kDa, desarrollaron una prueba diagnóstica con la técnica de ELISA (98).

En modelos murinos, Salinas-Carmona y Pérez-Rivera en 2004 (96), demostraron que la inoculación de los antígenos purificados P61, P38 y P24 originaban dos picos de IgM, uno a los tres días y el segundo a los siete días. La IgM originada del segundo pico mostró conferir inmunidad pasiva contra la infección animales no inmunizados, aunque el mecanismo de esta protección aún es desconocido.

1.5.2. Factores del agente

Los hongos y las bacterias causantes del micetoma son saprobios abundantes en la tierra, están adaptados para tener vida libre y sólo algunos de ellos, probablemente por “accidente”, causan enfermedad en el hombre o en otros animales. Los mecanismos de protección inespecífica como la temperatura corporal, el pH de la piel y tejidos, la diferencia de tensión de CO₂ y O₂ entre el ambiente y el cuerpo, son suficientes para limitar su desarrollo. En caso de invasión tisular donde han sido rebasados los anteriores mecanismos de protección, las defensas inespecíficas (celulares y no celulares) destruyen a estos organismos.

Algunas investigaciones demuestran características diferentes entre las cepas de vida libre y las cepas aisladas de casos de enfermedad; generalmente una cepa aislada a partir de infección humana, cuando se inocula en animales de experimentación, es más patógena que las cepas aisladas del medio (cepa silvestre). En el estudio realizado por López-Martínez *et al.*, se comparó la capacidad patogénica de cepas silvestres y cepas obtenidas de micetoma, se demostró que los aislamientos de casos de infección humana causan micetoma en todos los ratones inoculados ocasionando un cuadro clínico severo (gran destrucción y elevado número de granos), mientras que un reducido número de las cepas silvestres formaron granos típicos (18.51%) y la infección en la mayoría de los ratones fue leve (57).

Se ha estudiado la producción de diversas enzimas en ambos tipos de cepas; los resultados mostraron que un porcentaje mayor de cepas silvestres producen hemolisina y lipasa mientras que mayor porcentaje de cepas de micetoma producen desoxirribonucleasa. Estudios realizados en cepas de micetoma conservadas durante varios años por resiembra en ADS no mostraron diferencia en la producción de enzimas (76).

La patogenicidad de algunas cepas de cepas de *N. asteroides* (causante principalmente de nocardiosis) tiene una relación directa con la producción de superóxido dismutasa (SOD); esta enzima con un PM aproximado de 100 000 (12), le permite evadir los mecanismos oxidativos de destrucción de las células fagocíticas. Otras investigaciones mostraron que cuando la SOD se combina con catalasa tiene un efecto protector sinérgico contra la acción de los NPN (10).

Una cepa patógena de *N. asteroides* llamada GUH-2 proveniente de la colección ATCC, ha sido utilizada en diversos trabajos; con ella se ha demostrado la capacidad que este agente tiene de inhibir la unión fagolisosoma, bloquea la acidificación del

fagolisosoma manteniendo un pH de 7 y modifica el contenido de fosfatasa ácida de los lisosomas (9).

La pared de *N. asteroides* contiene diversos componentes tóxicos para las células; entre los más estudiados se encuentran las moléculas de trealosa 6,6-dimicolato conocidas como “factor cuerda” que por sí mismas inhiben la fusión de membranas. También contiene ácido tuberculoesteárico cuya función se desconoce y, finalmente, un compuesto llamado nocobactina que es un quelante de hierro (8).

Nocardia otitidiscaviarum produce una enzima llamada HS-6, molécula del tipo de los macrólidos con un peso molecular de 776 y una dosis letal 50 (DL) en ratones de 1.25 mg/kg. Actúa promoviendo la formación de vacuolas autofágicas en el retículo endoplásmico rugoso. Los órganos que presentan daños más tempranos son estómago, hígado, intestino delgado y riñón (80). En esta misma especie y en *N. brasiliensis* se ha demostrado la producción de hemolisinas α y β , pero su papel en la patogenicidad no se ha establecido con precisión (32,76).

1.5.3. Factores ambientales

La distribución geográfica de los agentes está en estrecha relación con la humedad del ambiente. De manera general podemos decir que el rango de precipitación pluvial anual adecuado para el desarrollo de los diferentes agentes va de 50 a 2000 mm, pero el rango para cada agentes es bastante más estrecho. Por ejemplo, *Nocardia* spp. y *Scedosporium apiospermum* se desarrollan en áreas entre 1000 a 2000 mm de lluvia anual; *S. somaliensis* se desarrolla en zonas semidesérticas y su rango va de 50 a 250 mm. Finalmente, algunos hongos como *M. mycetomatis* se encuentran en el continente africano en áreas con lluvia

entre 250 a 500 mm anuales, y en Venezuela, donde la lluvia es abundante con 1000 a 2000 mm anuales (67).

La presencia de plantas espinosas, probablemente favorezca la inoculación traumática del agente y en consecuencia el mayor número de casos de micetoma. Basset *et al.*, observaron en los tejidos de pacientes con micetoma espinas de *Mimosaceae* sp. y en estos casos se aisló con mayor frecuencia a *L. senegalensis* (6).

1.6. AGENTES ETIOLÓGICOS

Los hongos y las bacterias causantes de este síndrome, son organismos saprobios, exógenos, aerobios pero con capacidad de desarrollarse en condiciones microaerofílicas como las que se presentan cuando han invadido los tejidos. Ambos tipos de agentes tienen una amplia distribución en la naturaleza (93).

1.6.1. Bacterias

Los agentes bacterianos de micetoma pertenecen al orden Actinomycetales, organismos que crecen filamentizando y ramificándose con fragmentación o esporulación. Estas bacterias originalmente fueron consideradas hongos ya que forman pseudofilamentos que en ocasiones dan un aspecto semejante al micelio aéreo característico de los hongos. Estudios de la fisiología, composición de pared y reproducción permitieron ubicarlos correctamente entre las bacterias (56). Los Actinomycetes son bacterias bacilares o cocoides que cuando infectan tejidos pueden estar aisladas o en cadenas. De acuerdo con su afinidad tintorial, pueden ser Gram positivos o ácido alcohol resistentes. La mayoría de los *Actinomycetales* son aerobios; sin embargo, algunas especies como *Actinomyces bovis*, *A. israelii* o *Arachnia propionica* son anaerobios y habitan dentro de los mamíferos en zonas de anaerobiosis como el pliegue dentoencilar, vellosidades intestinales y algunas áreas del intestino grueso.

La identificación de estos organismos se realiza con base en las características morfológicas macro y microscópicas de los cultivos, afinidad a diferentes colorantes como los empleados en las técnicas de Gram y Ziehl-Neelsen (Z-N), y pruebas bioquímicas como hidrólisis de caseína, xantina, hipoxantina, gelatina, etc. Aunque de uso limitado por su costo, se han utilizado, también con éxito, galerías comerciales (API-ZYM®) que

contienen 19 enzimas y que permiten identificar a los agentes desarrollados en los cultivos en sólo tres o cuatro horas (15,77).

Existe un gran número de especies dentro del orden Actinomycetales. Sin embargo, las especies patógenas para el hombre se agrupan en ocho familias, las características principales de cada una de éstas, se presentan de manera resumida en el cuadro 3.

Cuadro 3. Familias de los Actinomicetales de importancia médica

Superreino: **Prokariota**

Reino: **Monera**

Filum: **Schizomycota**

Clase: **Eubacter**

Orden: **Actinomycetales**

Familia	Características	Tipo de pared	Géneros y especies	Patologías
1. Actinomycetaceae	No acidorresistentes, la mayoría anaerobios estrictos o facultativos, algunos aerobios. No forman esporas, los pseudofilamentos se fragmentan fácilmente. Se encuentran en boca e intestino	VI (meso-DAP) V (lisina-ornitina)	<i>Actinomyces bovis</i> , <i>A. israeli</i> <i>Arachnia propionica</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Rothia</i> spp. <i>Øerskovia</i> sp <i>Promicomonospora</i> sp	Actinomicosis en humanos y otros mamíferos
2. Micropolysporaceae	Bacterias Gram positivas, no móviles, forman cadenas cortas de esporas	IV (meso-DAP arabinosa galactosa)	<i>Micropolyspora nomen conservadum</i> <i>M. faeni</i> <i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	Se relacionan con hipersensibilidad respiratoria
3. Dermatophilaceae	Forman pseudofilamentos que pueden dividirse longitudinal o transversalmente. Dentro de los tabiques se forman elementos cocoides, algunos de ellos móviles (<i>Dermatophilus</i> y <i>Geodermatophilus</i>)	III (meso-DAP arabinosa madurosa)	<i>Dermatophilus</i> <i>Geodermatophilus</i>	Infecciones cutáneas

4. Frankiaceae	Bacterias mutualistas que viven en las raíces de plantas dicotiledóneas y le permiten al vegetal fijar el nitrógeno		<i>Frankia</i>	No se ha reportado patología
5. Nocardiaceae	Bacterias psudofilamentosas o que viven en forma de bacilos aislados, son aerobias, algunas especies forman esporas. Son capaces de producir un gran número de enzimas inducidas. Los géneros <i>Rhodococcus</i> y <i>Nocardia</i> , pueden desarrollarse sobre productos de petróleo, alquitrán y asfalto.	IV (meso-DAP arabinosa galactosa)	<i>Rhodococcus</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Corynebacterium</i>	Nocardiosis, Actinomicetoma Tuberculosis Lepra Tricomocosis axilar Eritrasma
6. Thermomonosporaceae	Actinomicetos pseudofilamentosos o fragmentados. Esporas en el interior de vainas. Bacterias inmóviles y muy sensibles al calor.	III (meso-DAP arabinosa madurosa)	<i>Nocardopsis</i> <i>Thermomonospora</i>	Hipersensibilidad respiratoria
7. Maduromycetaceae	Organismos resistentes a altas temperaturas, forman pseudofilamentos y esporas en el interior de vainas que pueden contener de 5 a 15 elementos de resistencia	III (meso-DAP arabinosa madurosa)	<i>Actinomadura</i> <i>Microbiospora</i>	Micetoma Pericarditis Pleuritis
8. Streptomycetaceae	Actinomicetos aerobios, habitan debajo de la superficie del suelo, forman pseudofilamentos poco fragmentados. Son organismos esporulados que pueden formar cadenas de hasta 50 elementos de resistencia	I (LL-DAP-glicina)	<i>Streptomyces</i> <i>Intraesporangium</i> <i>Nocardioides</i>	Actinomicetoma

(Modificado de 13).

1.6.1.1. *N. brasiliensis*

Actinomiceto con desarrollo óptimo entre 30 y 37°C. Sobre agar dextrosa Sabouraud (ADS) se desarrolla bien en un periodo entre ocho a 10 días produciendo una colonia rugosa, blanquecina, con áreas amarillentas o anaranjadas; presenta pliegues en la superficie y en ocasiones aspecto céreo; los cultivos de más de 30 días generalmente toman un aspecto polvoriento. Al tacto es una colonia dura, difícil de desprender del medio de cultivo.

Es parcialmente ácido alcohol resistente, los frotis se pueden teñir con la técnica de Kinyoun, Fite o Gram, aunque con la última técnica los pseudofilamentos se tiñen de manera irregular.

El examen microscópico muestra pseudofilamentos de 1 μm de diámetro, ramificados y fragmentados indistinguibles de los formados por otros actinomicetos.

Esta bacteria hidroliza la caseína, tirosina y se desarrolla en medios con escasa concentración de gelatina (Cuadro 3). Es una bacteria aerobia que puede obtener carbono a partir de parafina, butirato, citrato y propionato; su desarrollo se inhibe en medios que contengan 7% de NaCl (95).

1.6.1.2. *N. asteroides* (complejo)

Actualmente algunos autores prefieren referirse a este agente como un **complejo** formado por *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*, debido a que es difícil diferenciarlos entre sí (13, 94). A continuación se describen de manera breve las principales características del agente sin mencionar las diferencias específicas entre las tres especies del complejo.

Se desarrolla bien en ADS a temperatura entre 25 y 37 °C. Las colonias son vellosas, plisadas o rugosas con zonas granuladas. Después de 10 a 15 días, los cultivos toman un color anaranjado.

Los pseudofilamentos que la forman son de 1 µm de diámetro; en cultivos de más de tres semanas tienden a fragmentarse. Se tiñen de manera irregular tanto con la tinción de Gram como con la de Z-N.

Por ser bacterias saprofitas se desarrollan sobre una gran cantidad de sustratos; además de los habituales, es notable su capacidad para crecer en sustratos ricos en parafina, asfalto o petróleo (95).

1.6.1.3. *N. otitidiscaviarum*

En medio de ADS, las colonias con desarrollo entre 7 a 10 días, macroscópicamente son semejantes a *N. brasiliensis*, pero en general son muy pulverulentas (aspecto de polvo de gis).

Microscópicamente se observan pseudofilamentos muy fragmentados que originan elementos bacilares o cocoides aislados. La tinción de Z-N es negativa excepto que los cultivos se hayan desarrollado en agar de Lowenstein-Jensen (L-J)

La temperatura óptima de desarrollo es de 30°C; tiene escaso desarrollo a 40°C y sobrevive solamente durante ocho horas a 50°C (92).

1.6.1.4. *Actinomadura madurae*

Actinomiceto que se desarrolla bien sobre ADS formando en dos o tres semanas una colonia blanco amarillenta, de superficie plisada con aspecto cerebriforme.

Los pseudofilamentos que forma son muy ramificados, Gram positivos y negativos a la tinción de Z-N. Forman esporas en número variable (5 a 15) dentro de vainas.

Este organismo es habitante del suelo y se puede aislar mediante calentamiento del material a 100 °C durante 15 minutos e inoculándolo posteriormente en medio de cultivo que contenga 5 µg de rifampicina/ml (95).

1.6.1.5. *A. pelletieri*

Sobre ADS a 37 °C se desarrolla en cuatro a siete días, formando colonias de color inicialmente rosa pálido, tornándose en dos a tres semanas en un color rojo coral, aunque la periferia permanece de color pálido; son de consistencia dura, generalmente la superficie tiene pliegues que incluso le dan un aspecto cerebriforme.

El estudio microscópico muestra pseudofilamentos ramificados de 0.5 a 1 µm de diámetro. Son bacterias Gram positivas y no se tiñen con la técnica de Z-N (95).

1.6.1.6. *Streptomyces somaliensis*

Es raro en México y muy frecuente en Somalia. Se desarrolla mejor a una temperatura de 30 °C sobre medio de L-J, aunque también es útil el medio ADS. La colonia es evidente entre cuatro a 11 días después de la inoculación. Al principio es de color blanco amarillenta y de consistencia blanda, pero al paso de las semanas se torna ocre o gris oscuro de consistencia dura. Algunas cepas presentan pigmento gris que difunde al medio.

Los pseudofilamentos miden de 0.5 a 1 µm de diámetro, presentan escasa ramificación formando cadenas celulares con aspecto de artroconidios (54).

Las características bioquímicas y fisiológicas de los principales agentes de actinomicetoma, se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características bioquímicas y fisiológicas de los principales agentes de actinomicetoma

Agentes	Caseína	Tirosina	Xantina	Hipoxantina	Urea	Gelatina 0.4%	Resistencia a lizosima	Ácido resistencia	Formación de ácido a partir de:								
									Lactosa	Xilosa	Arabinosa	Celobiosa	Eritritol	Glicerol	Manitol	Melobiosa	Sorbitol
<i>N. brasiliensis</i>	+	+	-	+	+	+	R	+	-	-	-	O	O	+	+	O	O
<i>N. asteroides</i>	-	-	-	-	+	-	R	+	-	-	-	O	O	+	O	O	O
<i>N. otitiscaviarum</i>	-	-	+	+	+	-	R	+	-	-	-	O	O	+	-	O	O
<i>A. madurae</i>	+	+	-	+	-	+	S	-	+	+	+	+	O	+	-	O	O
<i>A. pelletieri</i>	+	+	-	+	-	+	S	-	-	-	-	O	O	O	O	O	O
<i>S. somaliensis</i>	+	+	-	-	-	+	S	-	-	-	-	O	O	O	-	O	O

Claves: (+) más del 95%; (-) menos del 5%; (R) resistente; (S) sensible; (O) 0% de las cepas

De acuerdo con los datos publicados por López-Martínez *et al.* en 1992 (59), en México la frecuencia de los actinomicetales es la siguiente:

<i>Nocardia brasiliensis</i>	86.0 %
<i>Actinomadura madurae</i>	10.2 %
<i>Streptomyces somaliensis</i>	1.3%
<i>N. asteroides</i>	1.2%
<i>A. pelletieri</i>	0.5%
<i>N. otitidiscaviarum</i>	0.2%

1.6.2. Hongos causantes de micetoma

Los agentes son muy numerosos, McGinnis, en 1996 (71) recopiló 31 especies que habían sido documentadas como agentes etiológicos de eumicetoma, sin embargo, este número aumenta día con día. En el mundo, *Madurella mycetomatis* y *M. grisea* (hongos dematiaceos) son los agentes más frecuentes, pero otras especies como *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus* sp. o *Fusarium* sp. (hongos de filamento hialino), son reportados con cierta frecuencia por diversos autores (cuadro 5).

Los hongos dematiaceos forman granos negros visibles a simple vista, mientras que los de filamento hialino forman granos blancos o blanco-amarillentos. Desde un punto de vista taxonómico, los agentes de eumicetoma, se ubican en la Subdivisión Ascomycotina (hongos que cuando se reproducen sexualmente forman esporas dentro de estructuras conocidas como ascas) y están distribuidos en tres clases: Ascomycetes; Hyphomycetes y Coelomycetes.

Aunque se han hecho algunos intentos de identificar a los principales agentes de eumicetoma utilizando la detección de enzimas mediante diversas pruebas bioquímicas enzimáticas (78), actualmente la clasificación taxonómica se basa principalmente en las características macro y microscópica de los cultivos. A continuación se describen brevemente las características de los agentes más frecuentes (67, 95).

Cuadro 5. Agentes principales de eumicetoma

HONGOS HIALINOS

Acremonium falciforme
A. recifei
A. kiliense
Aspergillus flavus
A. nidulans
Corynespora cassicola
Cylindrocarpon cyanescens
C. destructans
Fusarium spp.
F. moniliforme
F. solani
F. solani var. *coeruleum*
F. solani var. *minus*
F. oxysporum
Neotestudina rosatii
Polycytella hominis
Scedosporium apiospermum
Scopulariopsis brumptii

HONGOS DEMATIACEOS

Curvularia geniculata
C. lunata
Exophiala jeanselmei
Leptosphaeria senegalensis
L. tompkinsii
Madurella mycetomatis
M. grisea
Plenodomus avramii
Phialophora verrucosa
Pseudochaetosphaeronema laense
Pyrenochaeta mackinnonii
P. romeroi
Hormonema sp.

(Modificado de 71).

1.6.2.1. *Madurella mycetomatis*

Se desarrolla mejor a 37°C; forma colonias vellosas, plegadas y planas. Al principio son de color blanquecino, pero pasadas dos o tres semanas toman un color ocre producido por un pigmento marrón oscuro que difunde al medio de cultivo.

El examen microscópico del cultivo muestra filamentos pigmentados de color verde oscuro u ocre, de 3 - 5 μm de diámetro, con algunos filamentos moniliformes que alcanzan hasta 7 μm ; también se observan vesículas que pueden alcanzar 15 a 20 μm .

En cultivos de más de dos meses se pueden observar esclerocios, conidios piriformes, aislados, originados a partir de conidióforos cortos y algunas fiálides pequeñas de las que se originan conidios de 2 - 3 μm de diámetro.

1.6.2.2. *M. grisea*

Colonias de crecimiento lento; la temperatura óptima para su desarrollo es de alrededor de 30°C. Forma colonias convexas, de superficie aterciopelada, de color verde grisáceo. En cultivos sobre medio de agar papa dextrosa (APD), generalmente sólo se observa el desarrollo de filamentos dematiaceos, sin estructuras reproductoras; algunas cepas producen picnidios en escaso número.

1.6.2.3. *Exophiala jeanselmei*

Colonias de crecimiento lento, de color negro, compactas, de superficie aterciopelada y de color negro o gris oscuro. Al microscopio se observan hifas pigmentadas de aspecto moniliforme, y forma anélices con racimos de conidios de tamaño variable (2 a 6 μm de diámetro).

1.6.2.4. *Acremonium* spp.

Colonias de crecimiento lento, de aspecto veloso; el color varía entre blanco o rosado. Producen pigmento rojo claramente visible en el reverso que difunde al medio. Las hifas son hialinas de hasta 4 μm de diámetro. A partir de los filamentos se forman conidióforos (fiálides) largos de los cuales se originan conidios que permanecen adheridos por un material mucilaginoso formando cúmulos característicos.

1.6.2.5. *Leptosphaeria senegalensis*

Colonias velosas de crecimiento rápido, generalmente de color gris oscuro en su superficie y negro en el reverso. En medio de harina de maíz (HM) los cultivos de dos a tres meses producen peritecios de 100 a 300 μm de diámetro, que contienen ascas de 10 x 30 μm conteniendo cada una ocho ascosporas

1.6.2.6. *Pyrenochaeta romeroi*

Hongo de crecimiento rápido, con una temperatura óptima de desarrollo alrededor de 30 °C. Forma colonias lanosas, de color gris oscuro o negro, con hifas pigmentadas. En pocas semanas desarrolla gran cantidad de picnidios cuyas dimensiones van de 40 a 100 μm en su eje menor, y de 50 a 130 μm en el mayor. Este agente muestra grandes semejanzas morfológicas con *Madurella grisea*.

1.6.2.7. *Scedosporium apiospermum*

Hongo de crecimiento rápido, en dos a tres días inicia su desarrollo y las colonias alcanzan 5 cm de diámetro en 10 días. Se desarrolla mejor a temperaturas de entre 26 y

37°C. Al principio las colonias son blancas, pero se tornan ligeramente grises al paso de los días; el reverso de las colonias toma un color ocre o gris.

Los filamentos son hialinos, con conidióforos de longitud variable que dan origen a conidios piriformes únicos de 3 x 5 μm de diámetro. Cuando se reproduce sexualmente produce peritecios, en cuyo caso adquiere el nombre de *Pseudallescheria boydii*.

1.7. DIAGNÓSTICO

Actualmente, en medicina existen técnicas muy complejas para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas; sin embargo, en este padecimiento la mayoría de las veces se realiza por procedimientos tradicionales simples (58,95).

1.7.1. Laboratorio

1.7.1.1. Examen directo

La observación del material purulento que drena a través de las fístulas permite identificar los granos macroscópicos en los eumicetomas y, al examen microscópico, en la mayoría de los actinomicetomas. Las características morfológicas de los granos entre las que se encuentran el tamaño, forma, diámetro de los filamentos o pseudofilamentos que los forman, color, presencia de clavos o de flecos son auxiliares muy útiles para establecer la etiología (figura 10). El estudio de estas características nos permite tener una orientación muy clara sobre la etiología fúngica o bacteriana del micetoma.

1.7.1.2. Cultivo

Cuando es posible, los granos de actinomicetales se mezclan y se lavan con solución salina isotónica (SSI), se centrifugan a 3000 rpm y posteriormente el sedimento se siembra en ADS y en ADS con antibióticos; el desarrollo de la mayoría de los agentes se presenta después de dos o tres semanas de incubación a 25°C. Otro medio adecuado para su desarrollo es el de Lowenstein-Jensen que se incuba en las mismas condiciones. Las colonias tienen bordes bien definidos e irregulares, aspecto céreo o membranoso, generalmente de superficie plegada, aunque las de *N. otitidiscaviarum* tienden a ser pulverulentas. Los cultivos de *Nocardia* spp. Son de color blanco amarillento o anaranjado

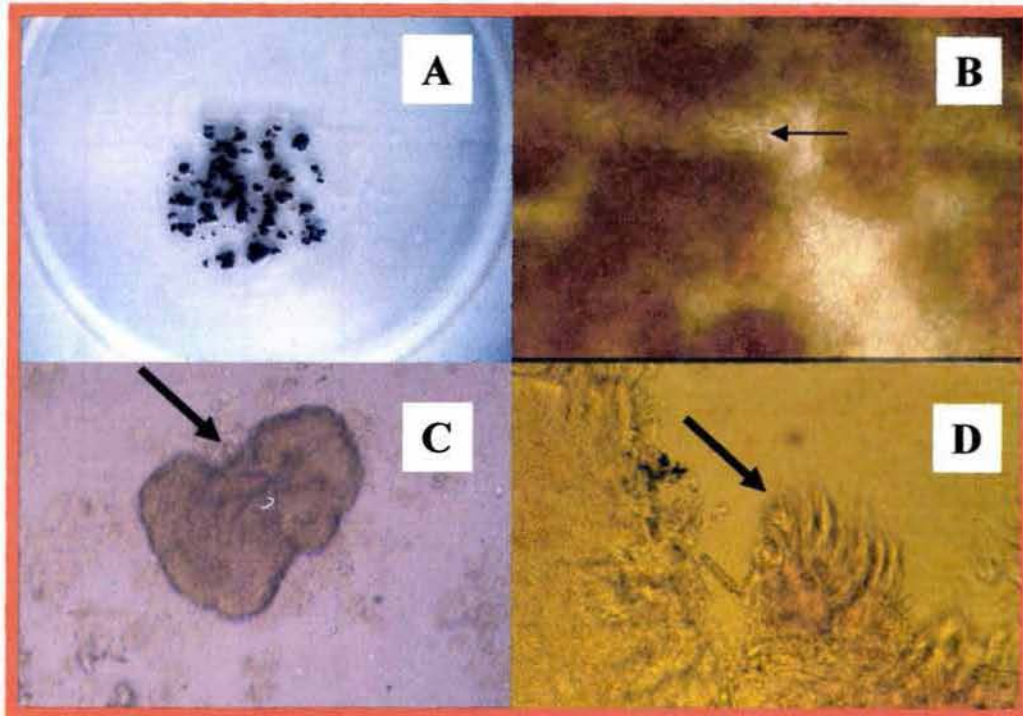


Figura 10. Aspecto de los granos en el examen directo. A) Granos macroscópicos de *M. mycetomatis*; B) Grano de *M. grisea* donde se observan los filamentos septados que lo forman; C) Grano de *N. brasiliensis* lobulado y con algunas clavav en la parte superior; D) Grano de *A. madurae* donde se observan los “flecov” característicos en su periferia.

(figura 11); las colonias de *A. madurae* son blanco amarillentas, *A. pelletieri* forma colonias rojas y *S. somaliensis* tienen color oscuro, algunas casi negras. La identificación precisa de los agentes se realiza por medio de pruebas bioquímicas (cuadro 3).

Los granos de eumicetoma se siembran en ADS y ADS con antibióticos y se incuban a 25°C. La velocidad de crecimiento es variable y depende de cada agente. Así, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp. o *Scedosporium apiospermum* se desarrollan en menos de ocho días; mientras que *Madurella* spp, *Leptosphaeria* sp y *Pyrenochaeta romeroi* son de crecimiento lento, es decir más de tres semanas. La identificación se realiza con base en sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas; se requiere de personal muy capacitado para distinguir las diferencias, muchas veces sutiles, entre los agentes (Figura 12).

1.7.2. Histología

Cuando las biopsias se toman de sitios con gran actividad parasitaria, los granos de todos los agentes se visualizan con relativa facilidad con la tinción de hematoxilina eosina (H-E). Los granos formados por bacterias generalmente miden menos de 500 µm, excepto *A. madurae* que puede medir varios milímetros. Los granos formados por hongos pueden ser oscuros, algunos casi negros como los formados por *Madurella* spp, *Leptosphaeria senegalensis*, *Pyrenochaeta romeroi* o *Curvularia* spp; mientras que *Aspergillus* spp, *Scedosporium apiospermum* o *Fusarium* spp., dan origen a granos blancos.

La morfología de la mayoría de los granos formados por actinomicetales, permite identificar cuando menos el género del agente etiológico (figura 13). Los granos formados por hongos requieren un estudio morfológico más cuidadoso y generalmente sólo dan una

aproximación en la identificación del agente por lo que se necesita el cultivo para la identificación taxonómica precisa (figura 14).

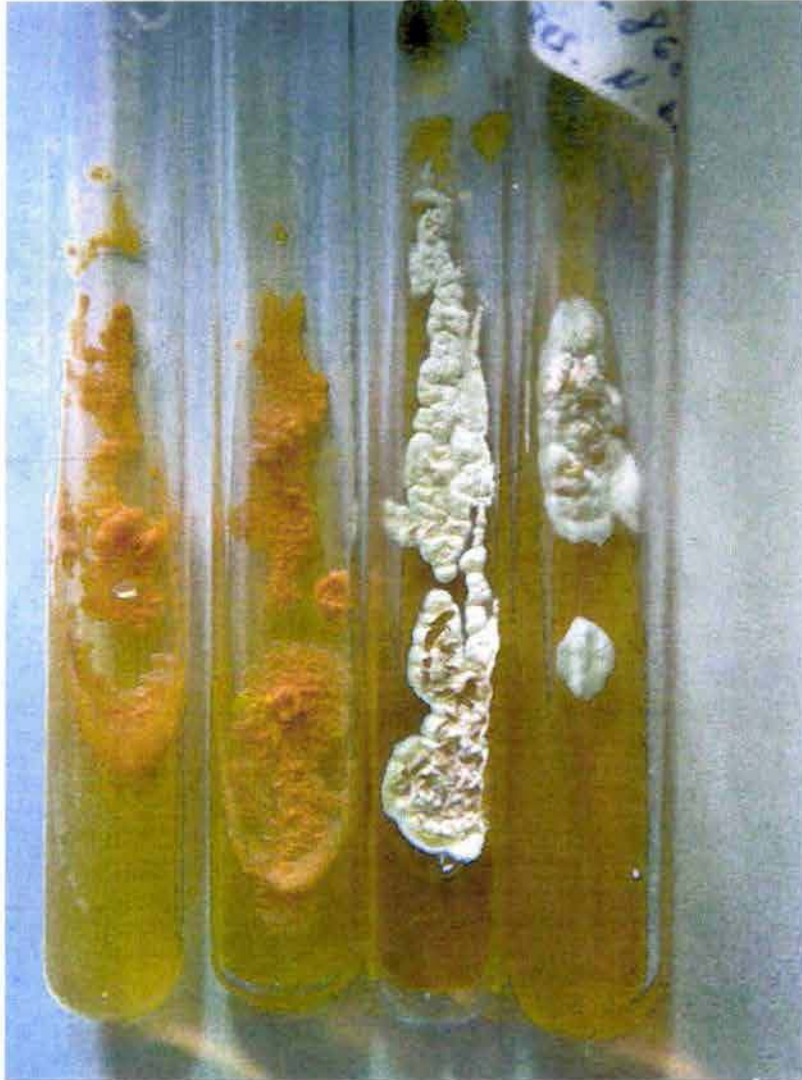


Figura 11. Aspecto macroscópico de colonias de *Nocardia asteroides* (izquierda) y *N. brasiliensis*. Ambas rugosas, de aspecto céreo y resistentes al tacto. Habitualmente *N. asteroides* es de color anaranjado mientras que *N. brasiliensis* tiende formar colonias blancas con zonas amarillentas.

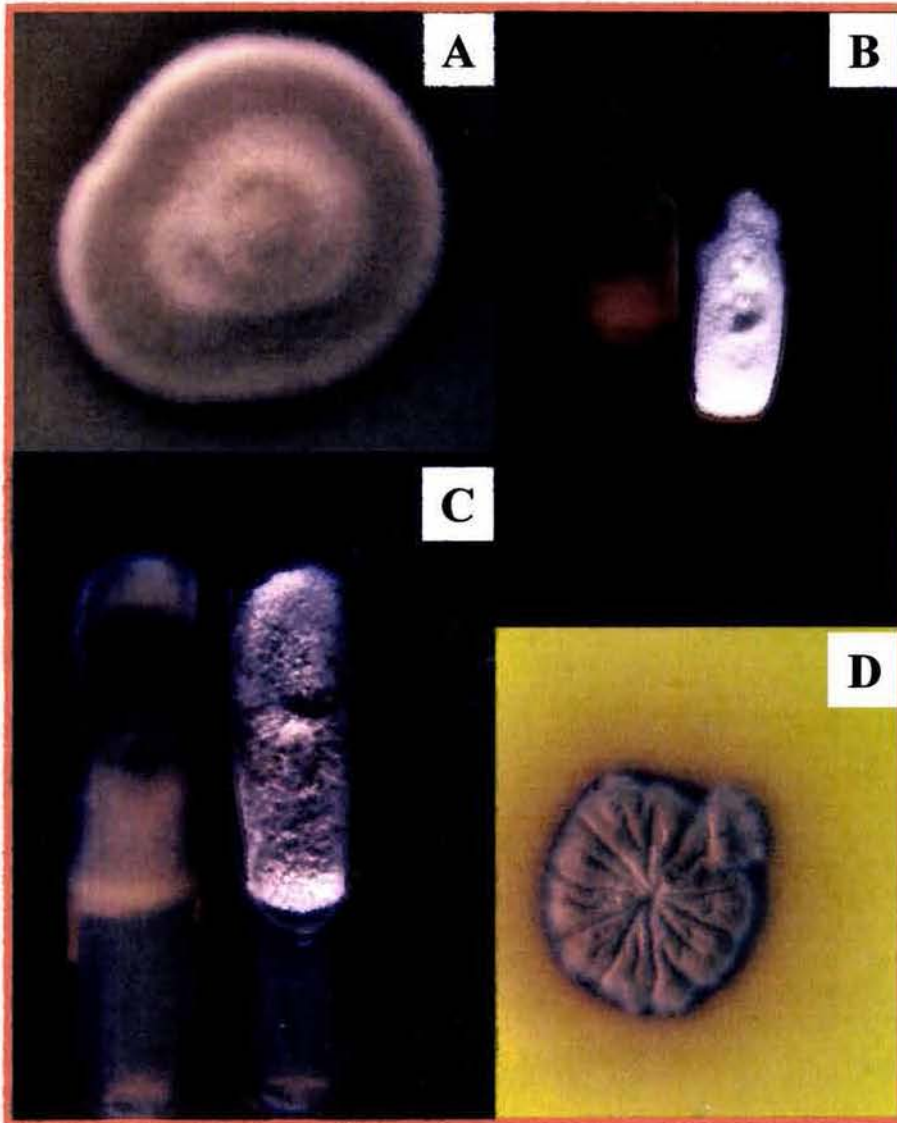


Figura 12. Aspecto macroscópico de algunos agentes de eumicetoma: A) *M. grisea*, B) *M. mycetomatis*, C) *P. romeroi*, D) *L. senegalensis*

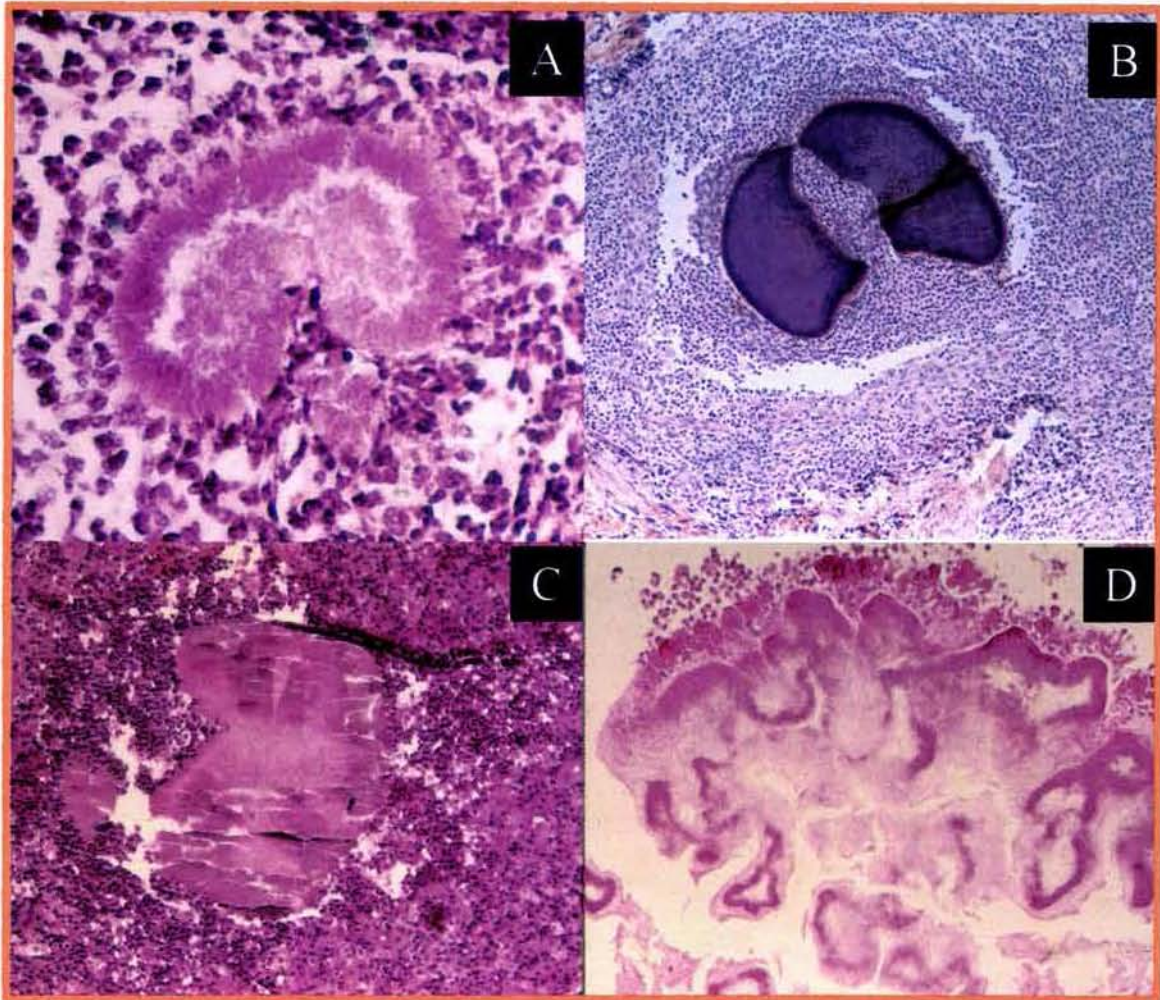


Figura 13. Granos de actinomicetoma. A) *N. brasiliensis*, generalmente de forma arriñonada. B) *A. pelletieri*, se caracterizan por ser redondeados, estar fragmentados en dos o tres partes y teñirse de manera homogénea. C) *S. somaliensis*, tienen forma ovalada y presentan estrías paralelas D) *A. madurae*, granos grandes con filamentos perpendiculares en su periferia (flecós), áreas teñidas con mayor intensidad y huecos en su interior.

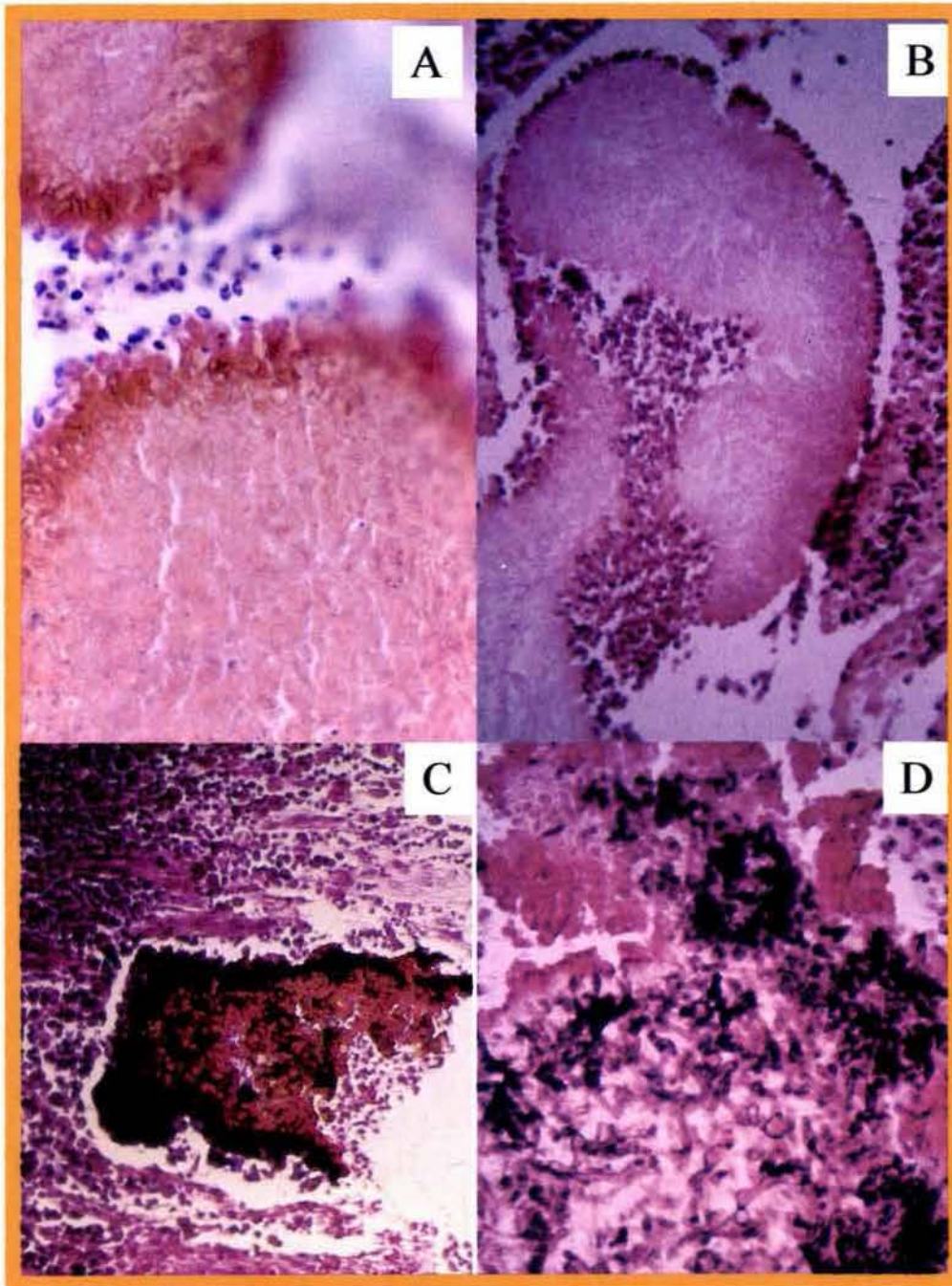


Figura 14. Granos de eumicetoma. A) *Madurella mycetomatis*, B) *Acremonium recifei*, C) *Leptosphaeria senegalensis*, D) *Aspergillus nidulans*. En todos se observan filamentos fúngicos de 3 a 5 μm .

1.7.3. Radiología

Los estudios radiológicos no permiten establecer el diagnóstico preciso de esta patología, sin embargo, son de suma importancia para determinar el grado de afección ósea además de que permiten evaluar la respuesta terapéutica y emitir un pronóstico. En algunos casos en que se considere realizar un procedimiento quirúrgico como parte del tratamiento (principalmente en los eumicetomas), ayudará a decidir la magnitud de la amputación.

Los cambios observables en estudios radiológicos simples pueden ser en los casos iniciales únicamente periostitis, o bien, destrucciones osteolíticas extensas con formación de geodas, destrucción de superficies articulares y lisis en huesos del pie que ocasionan el aspecto de “caries”, datos conocidos desde las primeras descripciones del padecimiento y que se presentan en pacientes con varios años de evolución (64, 67).

Otro estudio radiológico necesario, principalmente en los pacientes con más de cinco años de evolución del micetoma, es la arteriografía del área afectada. El aumento de volumen y la fibrosis, condicionan que algunas zonas del área afectada tengan un aporte sanguíneo deficiente, de tal manera que este procedimiento es un valioso auxiliar para el pronóstico.

1.8. TRATAMIENTO

Debido a la posibilidad de que los micetomas sean causados por hongos o por bacterias, antes de prescribir la terapéutica es indispensable conocer el tipo de agente causal (micótico o bacteriano); esto puede lograrse mediante a la observación de las características de los granos en el examen directo y en el estudio histológico.

1.8.1. Actinomicetoma

Como primera elección se debe emplear la combinación de trimetoprim con sulfametoxazol (TMP/SMX) en tabletas que contienen 800 mg y 160 mg respectivamente cada 12 horas asociada a la administración de 100 mg de diaminodifenilsulfona (DDS), cada 24 horas. La mayoría de micetomas causados por actinomicetales responden a este tratamiento y la mejoría es evidente después de dos meses de tratamiento (51).

Los pacientes deben ser valorados periódicamente debido a que estos medicamentos pueden ocasionar diversos efectos adversos, entre los que se encuentran reacciones medicamentosas graves a nivel cutáneo como es el síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica, aplasia medular, anemia, intolerancia gástrica, alteraciones hepáticas, etc.

Como segunda elección se emplea la asociación de TMP/SMX a la dosis mencionada previamente en forma continua, y agregando amikacina, aminoglucósido que se administra por vía intramuscular en ciclos de 21 días de tratamiento a dosis de 7.5 mg/kg de peso cada 12 horas. Entonces, se suspende el aminoglucósido durante ocho días (114). Además de las precauciones que se toman cuando se administran sulfas, se debe considerar ahora el posible daño renal o auditivo causado por la amikacina; por lo tanto, antes de iniciar el tratamiento y después de cada ciclo de amikacina, se debe valorar la función de

esos órganos. La curación generalmente se alcanza con tres ciclos del aminoglucósido, pero el TMP/SMX debe continuarse durante 12 a 24 meses de acuerdo con la evolución clínica (67,114).

Aunque el estudio de sensibilidad antibacteriana debería ser una práctica habitual en todas las cepas aisladas de casos de actinomicetoma, estos estudios generalmente no se realizan, dando como resultado que se utilicen tratamientos basados únicamente en la experiencia clínica. Estos esquemas de tratamiento (cuasiempíricos) generalmente mejoran el estado del paciente, pero en caso de no haber respuesta, retrasan la curación. Entre los antibióticos utilizados en estas condiciones tenemos: tetraciclina (45), amoxicilina (35), estreptomina (117) o los antifímicos como la izonizida (51).

Desde los primeros estudios inmunológicos relacionados con actinomicetoma fue evidente que algunos pacientes presentan inmunosupresión inespecífica severa, y no responden al tratamiento médico aun cuando se les administren los antibióticos adecuados (37). En estos casos es necesario valorar la respuesta inmunológica y dar los antibióticos efectivos basados en un estudio de sensibilidad acompañados de un esquema terapéutico inmunomodulador, como puede ser la administración de antígeno bacteriano y levamisol con lo que se logró la curación en sólo dos meses de un paciente con actinomicetoma causado por *N. brasiliensis* localizado en el abdomen, después de siete años de evolución sin respuesta al tratamiento tradicional (80).

Se ha reportado la utilidad de la oxigenoterapia hiperbárica en el tratamiento de un caso de micetoma sin afección ósea, causado por *N. brasiliensis*; el paciente presentó mejoría a los cinco días de tratamiento y las fistulas cicatrizaron un mes después del inicio de la terapia (113).

1.8.2. Eumicetoma

Este tipo de micetoma representa un grave problema de tratamiento, ya que no existen drogas altamente específicas. Durante muchos años la medida terapéutica empleada con mayor frecuencia fue la amputación de la extremidad afectada. Posteriormente se hicieron ensayos con griseofulvina a dosis de 500 a 1000 mg por día sin obtener curación; con base en estudios de sensibilidad *in vitro* la anfotericina B fue utilizada en el tratamiento de micetomas causados por *M. grisea* y *M. mycetomatis*. En opinión de algunos investigadores, la fibrosis característica que rodea los granos de los agentes etiológicos, impide que se alcancen las concentraciones adecuadas para la curación (66) y, en consecuencia, el tratamiento no es efectivo. El advenimiento de los compuestos azólicos proporcionó nuevas alternativas para el manejo de esta patología, se hicieron pruebas con ketoconazol solo (7) o asociado a cirugía; esta última alternativa mejoró el pronóstico de manera substancial (3). En la última década, se ha utilizado el itraconazol a dosis de 300 a 400 mg por día, reportándose algunos casos de curación y otros con mejoría (89). Algunos autores como Smith y Kutbi, mencionan que en casos de eumicetoma de corta evolución la cirugía acompañada de tratamiento antimicótico es la única posibilidad de curación definitiva (104).

PARTE 2. INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios inmunológicos en pacientes con actinomicetoma realizados desde hace varias décadas, sugieren que la respuesta de células T tiene una función relevante contra el micetoma causado por *Nocardia*. Sin embargo, en el ser humano no se han estudiado la producción de citocinas que regulan el desarrollo de la respuesta celular, en particular las citocinas que caracterizan las respuestas celulares Th1 Y Th2, así como tampoco las subclases de IgG que caracterizan esos subtipos de respuesta.

2.2. HIPÓTESIS

Los pacientes con micetoma presentan una respuesta inmune adaptativa celular tanto *in vivo* como *in vitro* predominantemente del tipo Th2, mientras que los controles no mostraran este predominio.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo general

Demostrar por medio del patrón de citocinas en cultivos de CMSP y títulos de subclases de IgG que los pacientes con actinomicetoma tienen una respuesta adaptativa celular predominantemente del tipo Th2, conocimientos que ayudarán a comprender la importancia de la respuesta inmune en la fisiopatogenia del padecimiento.

2.3.2 Objetivos particulares

- Determinar diferencias en la respuesta *in vivo* a intradermorreacciones con candidina y PPD.
- Determinar tipo de respuesta celular adaptativa predominante (Th1 o Th2) con base en el perfil de citocinas liberado en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles.
- Determinar niveles de inmunoglobulinas y establecer correlaciones con el tipo de respuesta celular adaptativa.

2.4. DISEÑO DEL ESTUDIO

2.4.1. Tipo de estudio

- Observacional
- Prospectivo
- Transversal

2.4.2. Estudio de la respuesta inmune celular

2.4.2.1. Pacientes y controles

2.4.2.1.1. *Pacientes.* Se estudiaron 25 pacientes con actinomicetoma (19 hombres y 6 mujeres) sin tratamiento previo, de edades entre 11 y 70 años (promedio 34.5 años). El diagnóstico de micetoma por *N. brasiliensis* se estableció con base en un examen directo, estudio histopatológico, cultivo y pruebas fisiológicas. Los centros de atención de estos pacientes fueron: Hospital General de México, SS; Centro Dermatológico “Ladislao de la Pascua”, SS y Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

2.4.2.1.2. *Controles.* Diez individuos aparentemente sanos (5 hombres y 5 mujeres), provenientes de las mismas zonas endémicas, de edades entre 20 y 44 años (promedio 30.8 años). Tanto pacientes como controles fueron informados del tipo de estudio que se realizaría, mismo que no ponía en riesgo su salud en ninguna forma, y posteriormente firmaron una carta de consentimiento.

2.4.2.2. Material

2.4.2.2.1. *Antígenos.* Se utilizó un antígeno citoplasmático crudo de *N. brasiliensis* (NB) y cinco antígenos purificados derivados de NB (NB2, NB4, NB6, NB8, NB10).

2.4.2.2.2. *Mitógenos.* Fitohemaglutinina [PHA] (DIFCO) y PPD (Statens Serum Institute).

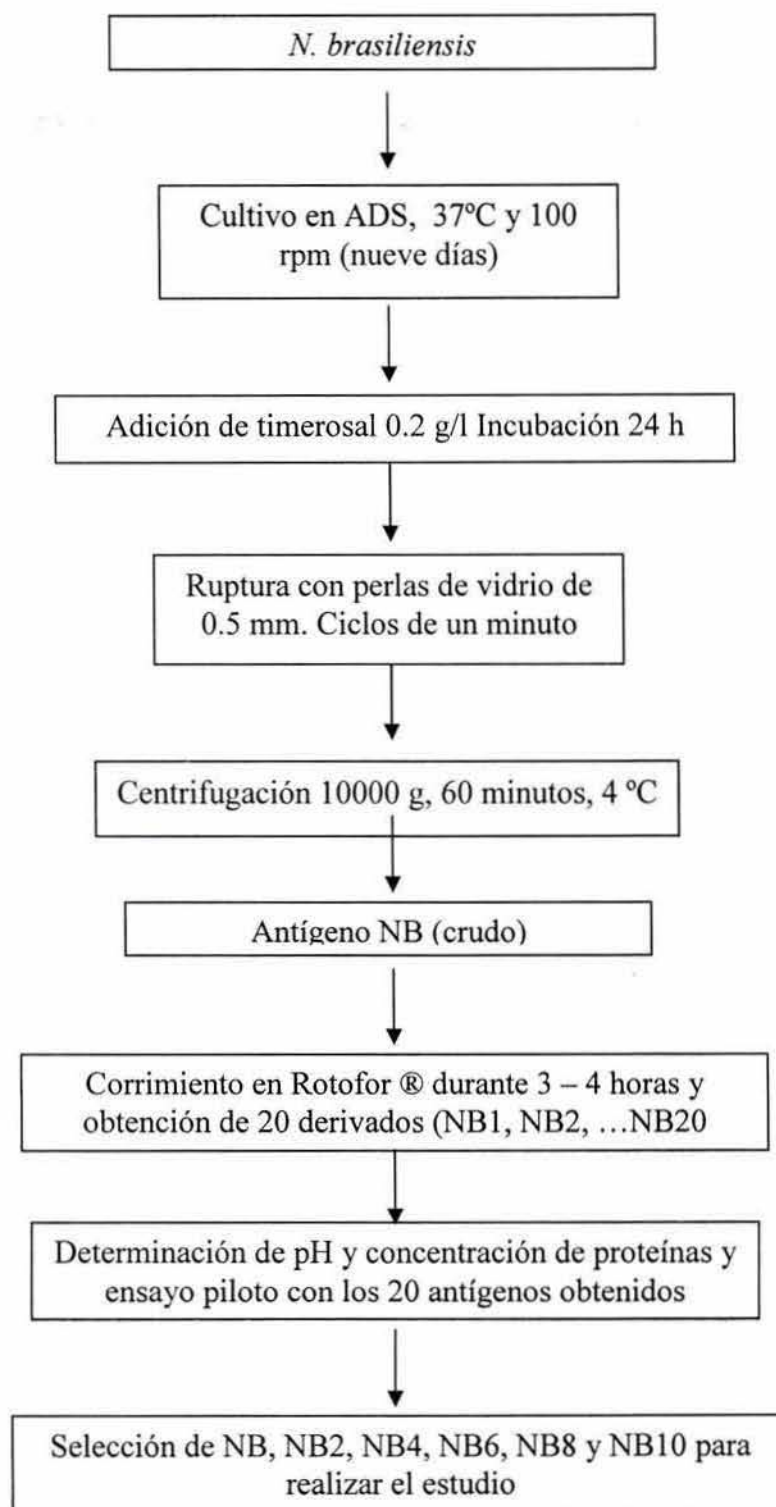
2.4.2.3. Obtención de antígeno crudo de *N. brasiliensis* (NB)

La cepa 253 MM-UNAM de un paciente con actinomicetoma y mantenida por subcultivos en agar dextrosa Sabouraud [SS] (Bioxon) fue inoculada en 4000 ml en medio líquido de SS. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en agitación (100 rpm) durante nueve días (fase log del desarrollo). Al cultivo se le adicionó 0.8 g de timerosal en solución y se incubó durante 24 horas; se cosechó la masa bacteriana por filtración en papel Whatman N°1. La masa bacteriana fue colocada en un homogenizador de tejidos (Biopsec®) y las células fueron rotas mediante 20 ciclos de un minuto cada uno, utilizando perlas de vidrio de 0.5 mm. El producto obtenido fue centrifugado a 10 000 g durante 60 minutos a 10°C. Se separó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (20) y se almacenó a 4°C.

2.4.2.4. Obtención de fracciones de NB

Antes de la separación de fracciones de NB por punto isoeléctrico, el antígeno crudo (NB) fue dializado durante 24 h contra agua destilada (se realizaron tres cambios de agua). Se tomaron alícuotas de 50 ml de NB dializado y se depositaron en la cámara cilíndrica de un equipo BioRad Rotofor System®. El equipo fue puesto en marcha y mantenido en operación hasta que el voltaje entre ánodo y cátodo mostrado en la pantalla se estabilizó (alrededor tres a cuatro horas). Por medio de los accesorios del equipo se cosechaban 20 fracciones antigénicas mismas que fueron denominadas arbitrariamente NB1, NB2, NB20. A cada fracción se le determinó la concentración de proteínas y el pH, y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso para los ensayos de proliferación (figuras 15 y 16).

Figura 15. Obtención de antígenos de *N. brasiliensis*



2.4.2.5. Intradermorreacciones

A los pacientes y a los controles se les aplicó por vía intradérmica, en el antebrazo izquierdo, 0.1 ml de candidina (Laboratorio de Micología Básica, Facultad de Medicina, UNAM lote HE-1034) y separado por al menos 10 cm se aplicó también 0.1 ml de PPD (Stantens Serum Institute, Dinamarca). La lectura se hizo a las 48 horas midiendo el diámetro de la induración

2.4.2.6. Ensayos de proliferación celular

A todos los individuos seleccionados para el estudio se les tomaron 20 ml de sangre periférica que fueron depositados en tubos conteniendo 500 U de heparina. La muestra de sangre se diluyó 1:2 con medio RPMI-1640® (GIBCO-BRL); 20 ml de esta sangre fueron colocados en tubos que contenían 15 ml de Histopaque (SIGMA) y se centrifugaron a 1300 rpm/30 minutos (Multifuge 3 LR, Heraeus®). Se separó la interfase que contenía las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y éstas se lavaron tres veces con solución balanceada de Hanks [HBSS] (GIBCO); cada lavado consistió en centrifugar durante 10 minutos a 1300 rpm, eliminar el sobrenadante y resuspender las células en un volumen de 50 ml de HBSS. Utilizando una cámara de Newbawer, se ajustó la concentración a 1.1×10^6 CMSP/ml de RPMI-1640 suplementado con 10% de plasma autólogo, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina (Gibco) y 2 mM de L-glutamina (Gibco). Con las CMSP obtenidas de cinco pacientes, se realizaron ensayos piloto de proliferación celular utilizando los 20 derivados antigénicos obtenidos previamente. Como mitógeno inespecífico se empleó en unos pozos PHA como antígeno de control PPD. En una ensayo previo, se determinó que la concentración óptima para la proliferación celular era de 10 µg/ml, todos los antígenos fueron diluidos en RPMI-1640.

Se observó que la proliferación celular era mínima cuando las CMSP se estimulaban con las fracciones antigénicas NB 10 a 20, por lo que éstas fueron descartadas para continuar el trabajo.

De cada paciente y de cada sujeto control se prepararon dos placas, una de 96 pozos conteniendo cada uno 200 μ l y otra placa de 24 pozos conteniendo cada uno 1000 μ l de suspensión de CMSP por pozo. La primera placa se utilizó para cuantificar la proliferación celular después de siete días de incubación y la segunda permitió obtener sobrenadante en cantidad suficiente (700 μ l/pozo) para la cuantificación de las interleucinas liberadas. Los cultivos se incubaron durante 6 días en ambiente de CO₂ al 5%, 37°C y humedad 100%. De cada pozo se colectaron 100 μ l de sobrenadante y se adicionaron 20 μ l de solución de ³H-timidina (Amersham) a una concentración de 1 μ Ci/ml. Las placas se incubaron durante 24 horas, se cosecharon las células en papel filtro y se midió la incorporación de ³H-timidina en un contador de centelleo (Beckman® LS6000SE).

2.4.2.7. Determinación de niveles de citocinas

Se realizaron utilizando 100 μ l del sobrenadante de cultivos de CMSP en placas de 96 pozos. Se cuantificaron IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Se emplearon equipos comerciales que utilizan la técnica de ELISA (Cytoscreen® Biosource International). (Figura 17)

2.4.3. Estudio de respuesta inmune humoral

2.4.3.1. Pacientes y controles.

Se estudió la concentración de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM en plasma de 25 pacientes con actinomicetoma y de 25 controles provenientes de zonas endémicas.

2.4.3.2. Plasma

Para la determinación de inmunoglobulinas, se utilizó el plasma diluido 1:2 en medio RPMI-1640® obtenido después de centrifugar las muestras de sangre empleadas para los ensayos de proliferación celular.

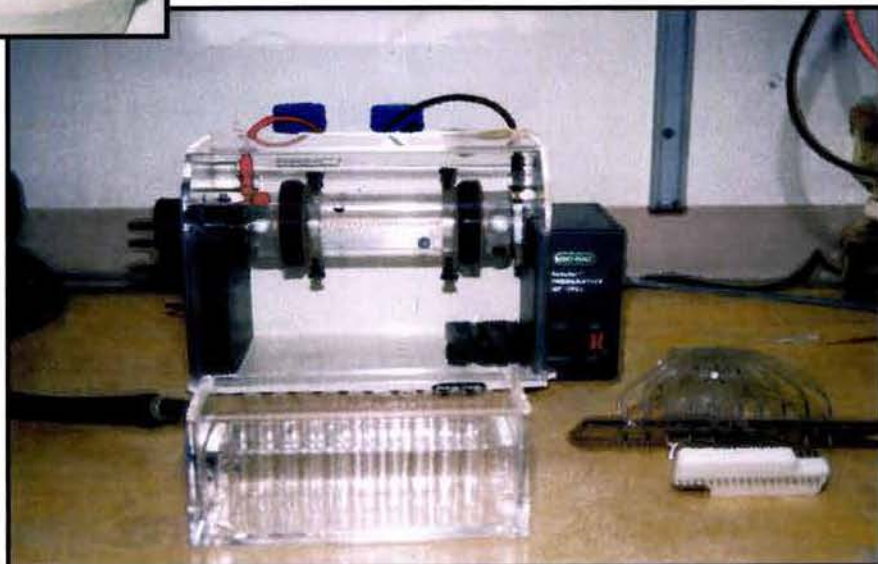
2.4.3.3. Antígenos

Se emplearon los mismos antígenos de *N. brasiliensis* utilizados para la proliferación de CMSP (NB, NB2, NB4, NB6, NB8 Y NB10); como control se utilizó PPD.

Figura 16. Equipo Rotofor® para obtener derivados del antígeno de *Nocardia brasiliensis*

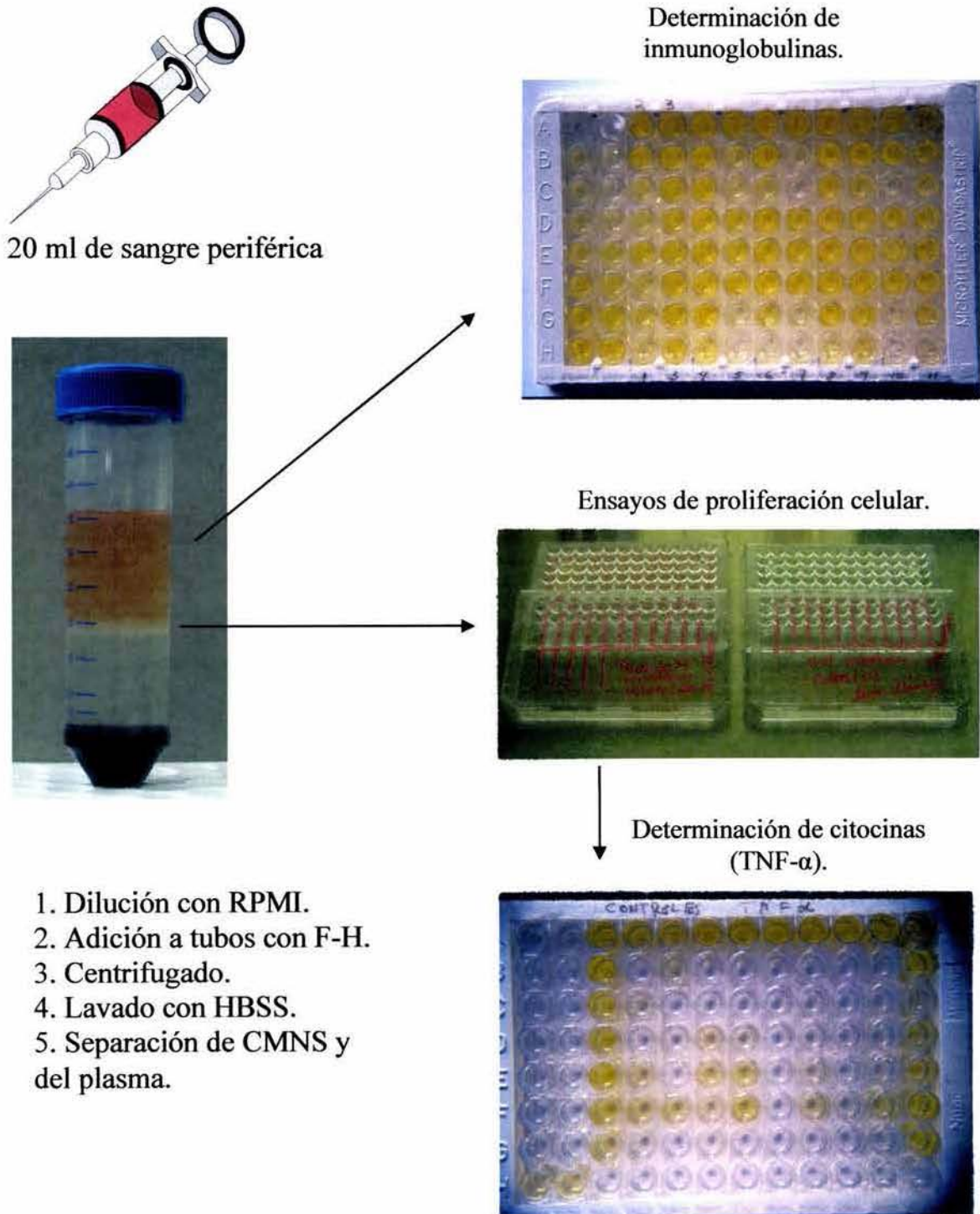


Antígeno citoplasmático
crudo en proceso de diálisis



Equipo Rotofor®

Figura 17. Procesamiento de muestras de sangre de pacientes y controles para la determinación de inmunoglobulinas, proliferación celular y determinación de citocinas



2.4.3.4. Procedimiento

La determinación de inmunoglobulinas (IgM, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) se hizo mediante la técnica de ELISA (111) y de manera sucinta la metodología fue la siguiente:

1. Ajustar la concentración de los antígenos (NB, NB2, NB4, NB6, NB8 y NB10) a 10 µg/ml en RPMI-1640.
2. Sensibilizar las placas con 100 µl de cada antígeno en *buffer* de carbonatos (0.1 M, pH 9.5) e incubar a 4°C durante toda la noche.
3. Decantar el sobrenadante y lavar las placas en tres ocasiones con PBS (150mM, pH 7.2).
3. Bloquear agregando 300 µl/pozo de una solución de suero fetal bovino (CFS) 10% disuelto en PBS-Tween 0.5%. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar durante un minuto con PBS-Tween 0.5% (cuatro lavados).
5. Agregar 100 µl/pozo de los sueros de pacientes y controles a una dilución 1:100 (determinada previamente). Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Decantar y lavar de igual forma que en paso 4.
7. Agregar 100 µl/pozo de conjugado peroxidasa (anticuerpo monoclonal murino anti IgG fracción completa humana [Zymed Lab®]), dilución 1:1000 disuelta en PBS-Tween e incubar 1 h a temperatura ambiente. Repetir paso 6.
8. Agregar 100 µl/pozo de tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma).
9. Incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
10. Frenar reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ 2.5 N.
11. Leer a una longitud de onda de 450 nm y graficar resultados.

2.4.4. Métodos estadísticos

Los resultados fueron graficados utilizando promedio, mediana, percentil 25 y percentil 75. Para determinar la significancia de las diferencias entre ambos grupos se utilizó la prueba U de MannWhitney (programa de SPSS v10®), considerando que cuando se trata de eventos biológicos de alta variabilidad, un valor $p \leq 0.05$ es estadísticamente significativo.

PARTE 3. RESULTADOS

3.1. ANTÍGENOS

El antígeno crudo (NB) tuvo una concentración de proteínas de 125 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$. Las fracciones empleadas (NB2, NB4, NB6, NB8 y NB10), presentaron pH variable (2.8 la primera y 6.9 la última). La concentración de proteínas en cada uno de estos derivados fue 30, 69, 83, 28 y 19 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ respectivamente (figura 18).

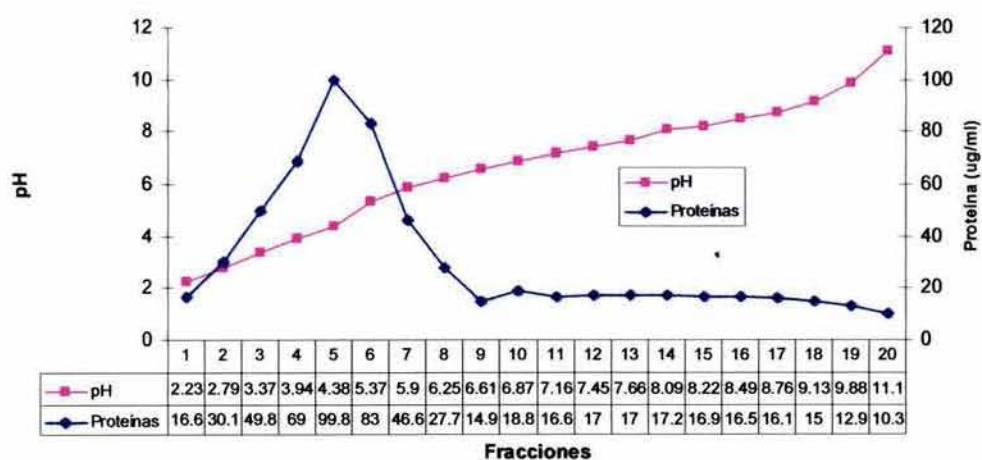
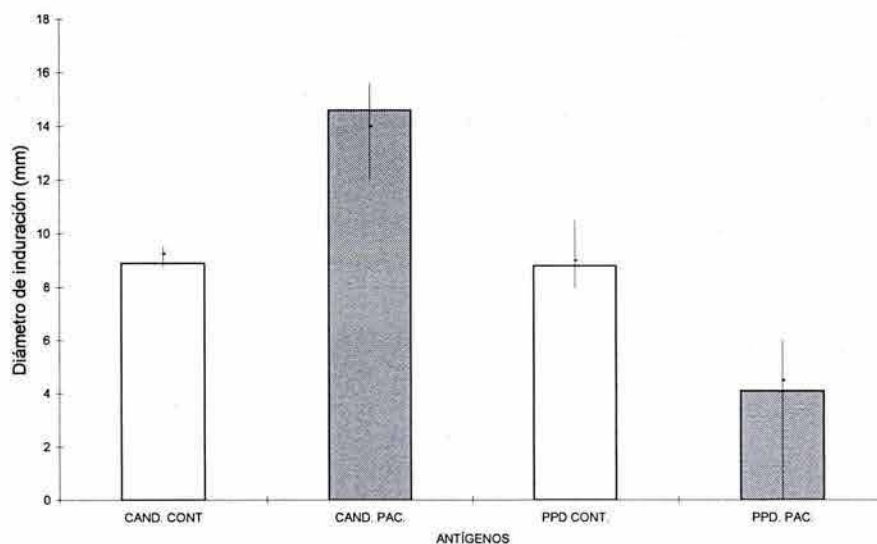


Figura 18. Concentración de proteínas y pH de las 20 fracciones antigénicas obtenidas a partir del antígeno crudo de *Nocardia brasiliensis*.

3.2. INTRADERMORREACCIONES

Los 25 sujetos control tuvieron una respuesta positiva a la aplicación del PPD; el diámetro promedio de la induración fue 8.8 mm, mientras que esta reacción fue negativa en ocho de los pacientes estudiados, cinco de ellos sin ninguna induración y tres más con áreas induradas de tres y cuatro mm. El promedio de induración inducida por PPD en los 25 pacientes con actinomicetoma fue de 4.1 mm. Por el contrario, la respuesta a la candidina fue mucho mayor en los pacientes que en los controles con una induración promedio de 14.6 mm para los primeros y 8.9 para los segundos. Los resultados de ambos antígenos presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos (figura 19).

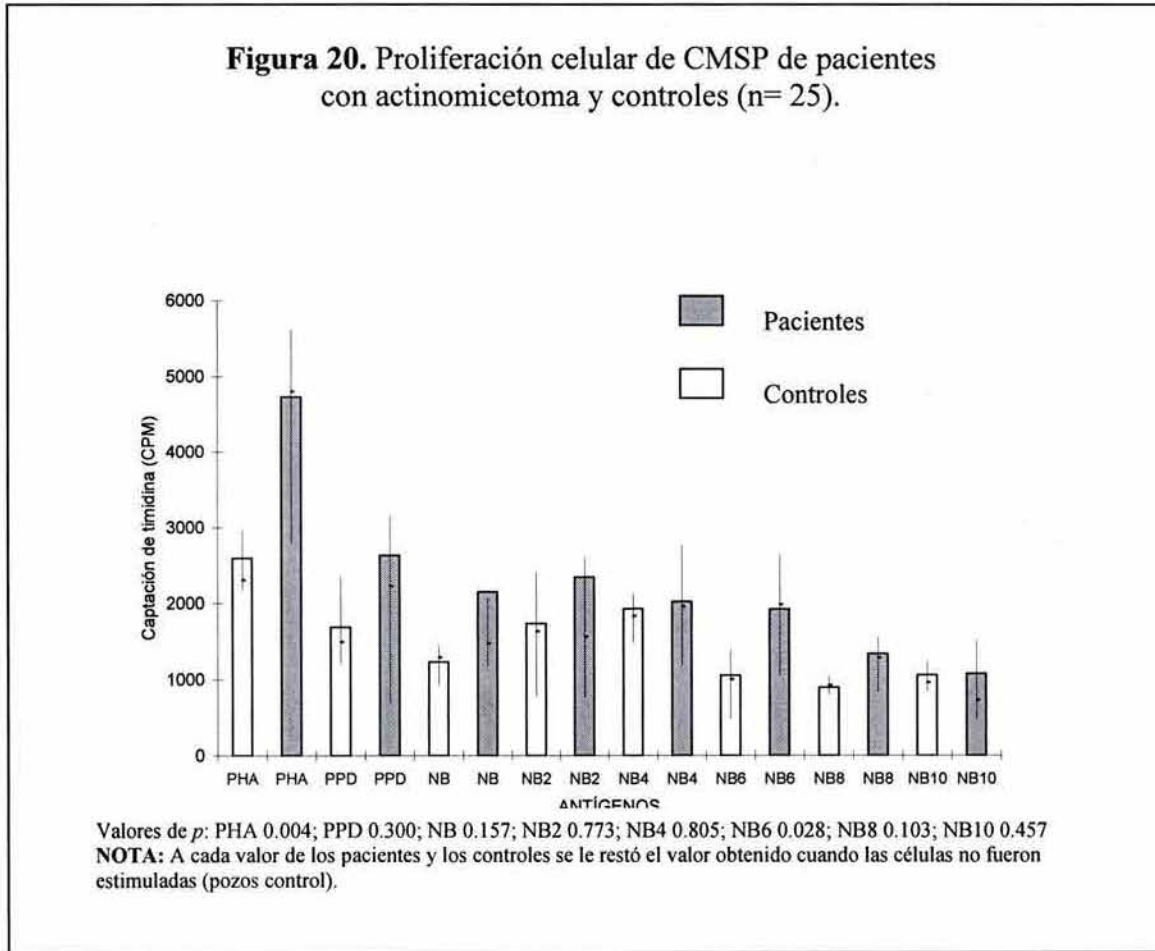
Figura 19. Respuesta intradérmica a candidina y PPD en pacientes con actinomicetoma y controles (n = 25).



Los extremos de las líneas representan el percentil 75 y 25 respectivamente; la marca transversal representa la mediana. Con los dos antígenos, la comparación entre ambos grupos dio un valor $p = 0.000$.

3.3. PROLIFERACIÓN CELULAR

Cuando se comparó el grado de proliferación celular entre pacientes y controles (figura 20) manifestada por la captación de ^3H -timidina (cpm), se observó positiva con todos los antígenos, con un ligero predominio en el grupo de pacientes. Los antígenos PHA y NB6 tuvieron un valor de $p = 0.05$ y 0.028 respectivamente. El control negativo tuvo un valor $p = 0.47$.



3.4. CITOCINAS

Los cultivos de CMSP de los sujetos control no produjeron IL-4 con ninguno de los antígenos empleados para estimular las células. En el sobrenadante de los cultivos celulares de pacientes se detectaron cantidades variables de esta citosina. Las células estimuladas con PHA tuvieron 10.14 pg/ml y 4.7 pg/ml las células estimuladas con PPD; los antígenos de *N. brasiliensis* indujeron cantidades variables entre esas dos concentraciones (cuadro 6).

Cuadro 6. Liberación de IL-4 en cultivos de CMSP de pacientes con actinomicetoma y controles sanos.

ANTÍGENO	PACIENTES (pg/ml)	CONTROLES
PHA	10.14	0.0
PPD	4.72	0.0
NB	5.80	0.0
NB2	5.58	0.0
NB4	5.93	0.0
NB6	7.37	0.0
NB8	6.86	0.0
NB10	6.14	0.0

En relación a IL-10, en las células estimuladas con PHA, la producción de esta interleucina fue de aproximadamente 400 pg/ml en ambos grupos, mientras que los antígenos crudo y semipurificados de *Nocardia*, indujeron la liberación de esta linfocina en concentraciones menores a 150 pg/ml (figura 21).

Los resultados obtenidos de IL-12 muestran que en los cultivos de pacientes y de controles no hubo producción, con un promedio de 38 pg/ml de sobrenadante de los cultivos de pacientes estimulados con NB2, mientras que, con los antígenos NB6 y NB8 la producción en los controles fue mayor; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

La producción de IFN- γ fue significativamente mayor en el sobrenadante de los cultivos del grupo control (figura 22). La diferencia fue particularmente notable cuando las células fueron estimuladas con Nb2, Nb4, Nb6 y NB8, antígenos que indujeron una concentración dos veces mayor en los cultivos de controles comparados con los pacientes con un valor de $p = 0.001, 0.011$ y 0.001 respectivamente. Por el contrario, la producción de TNF- α fue mayor en los cultivos de pacientes que en los controles con todos los antígenos de *Nocardia*. Las mayores diferencias se observaron cuando las células fueron estimuladas con NB y NB2, con un valor de $p < 0.05$ (figura 23).

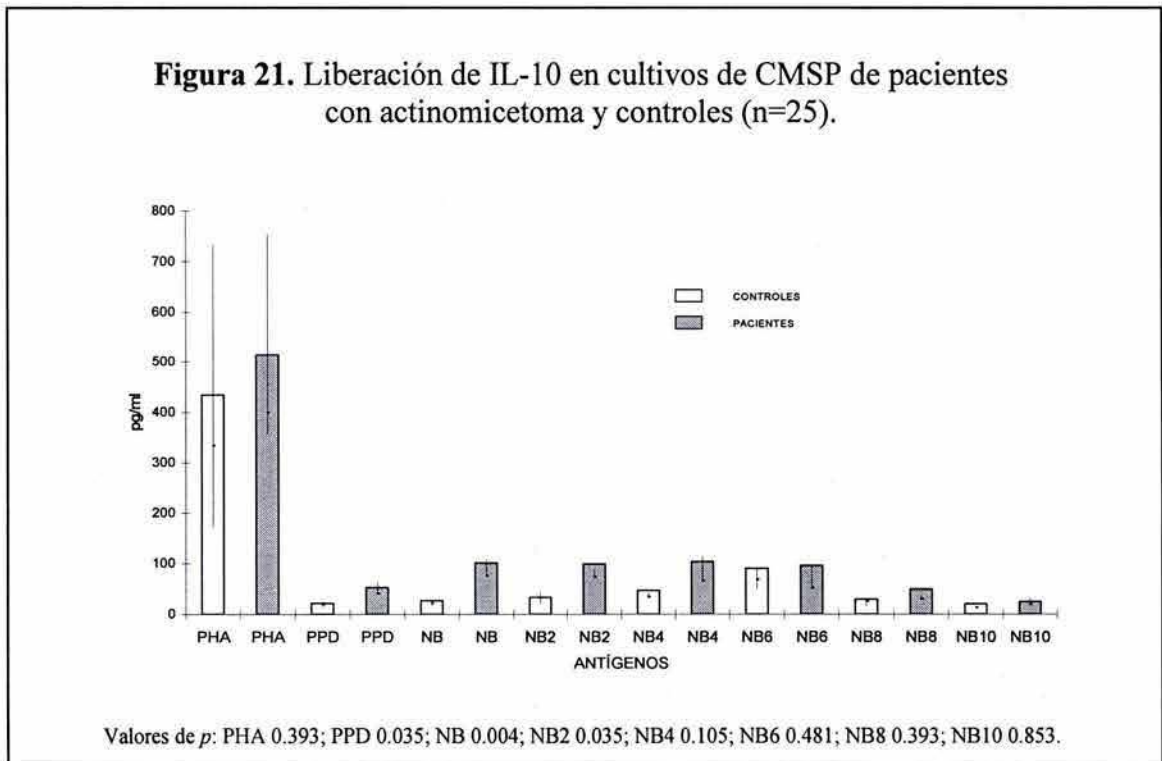
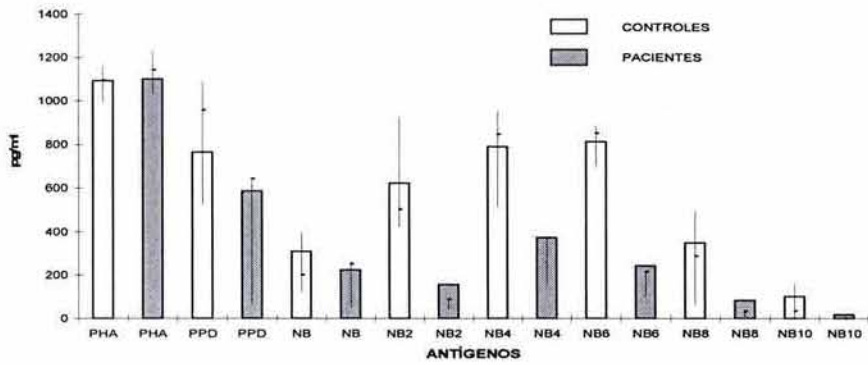
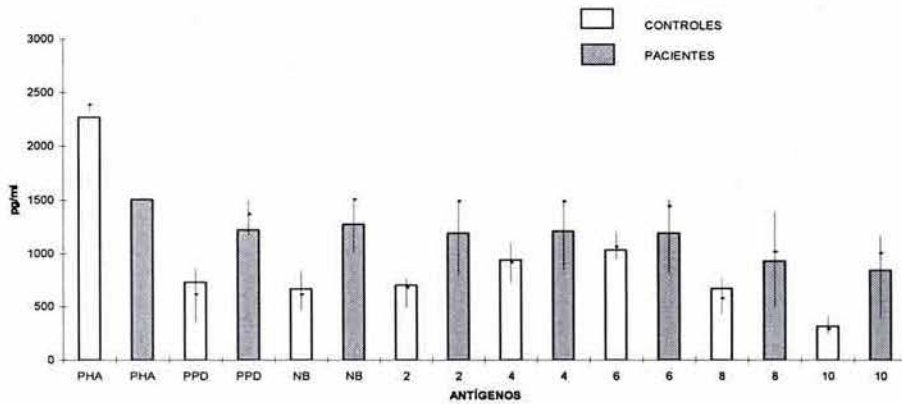


Figura 22. Liberación de IFN- γ en cultivos de CMSP de pacientes con actinomicetoma y controles.



Valores de *p*: PHA 0.684; PPD 0.481; NB 0.795; NB2 0.001; NB4 0.011; NB6 0.000; NB8 0.075; NB10 0.353.

Figura 23. Liberación de TNF- α en cultivos de CMSP de pacientes con actinomicetoma y controles.



Valores de *p*: PHA 0.000; PPD 0.035; NB 0.001; NB2 0.009; NB4 0.105; NB6 0.280; NB8 0.247; NB10 0.029.

3.5. INMUNOGLOBULINAS

Como se observa en la figura 24, todas las subclases de IgG se detectaron en mayor cantidad en el suero de los pacientes que en el suero de los controles con los seis antígenos probados. Los niveles de IgG1 fueron mayores en los sueros de los pacientes con los cinco primeros antígenos (NB, NB2, NB4, NB6 y NB8) que en los sueros de los controles. En todos estos casos, los valores de p fueron inferiores a 0.05; cuando las CMSP fueron estimuladas con NB10, los niveles de esta inmunoglobulina fueron casi idénticos sin presentar diferencia estadísticamente significativa con una $p = 0.861$ (figura 24).

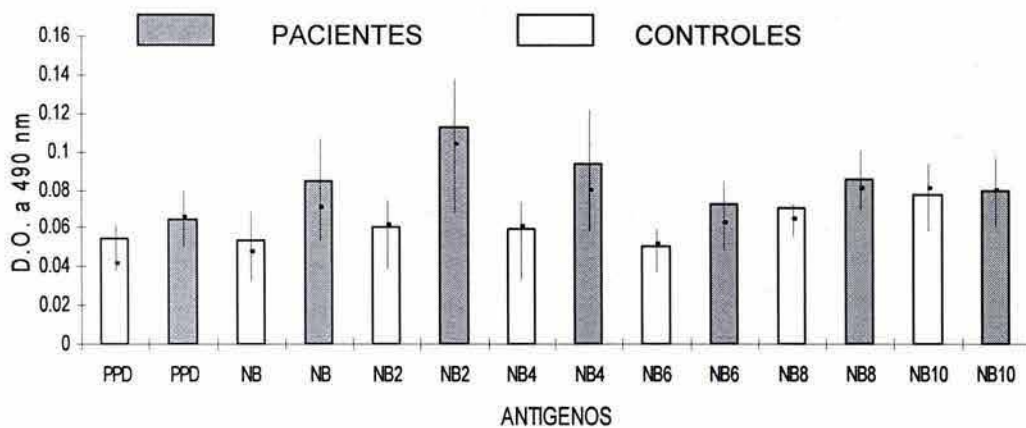
En relación con IgG2, la diferencia entre ambos grupos fue variable. Las diferencias máximas se presentaron en las células estimuladas con NB2 y NB4, en los que el valor de p 0.001 en ambos casos. Con los antígenos NB6 y NB10, no se detectó diferencia con significancia estadística, los valores fueron $p = 0.076$ y 0.781 respectivamente (figura 25).

Con excepción del antígeno NB6, los niveles de IgG3 fueron notablemente más elevados en los sueros de los pacientes comparados con los controles. La cantidad de esta inmunoglobulina fue mucho mayor en los pacientes que en los controles principalmente con NB, NB4 y NB8 con $p = 0.000$ (figura 26).

En el suero de los pacientes se observaron valores muy elevados de IgG4 en presencia de todos los antígenos cuyas lecturas fueron entre dos y cuatro veces superiores a los obtenidos en los controles. La prueba de U de MannWhitney dio un valor $p = 0.000$ con todos los antígenos probados (figura 27).

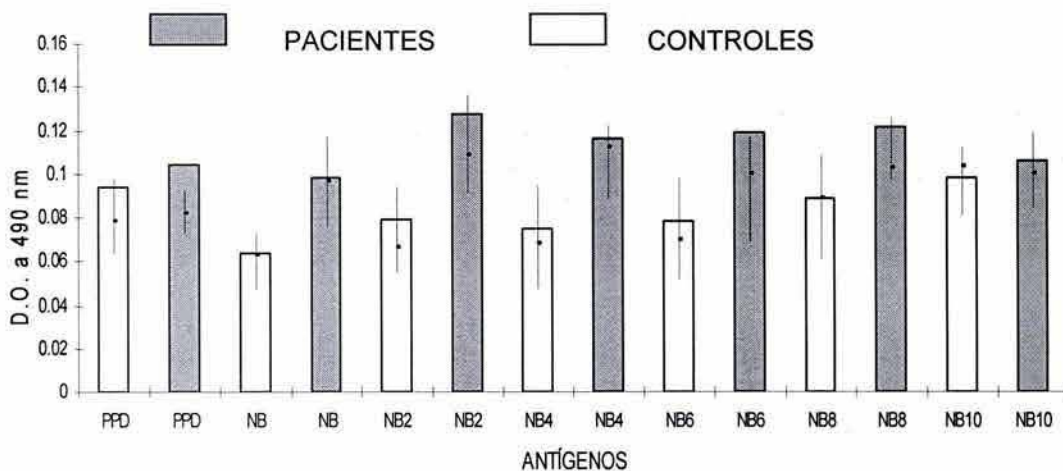
Los niveles de IgM fueron semejantes entre pacientes y controles con NB, NB2, NB4 y NB10 donde los valores de $p \geq 0.05$. La reactividad de los antígenos NB6 y NB8, mostró cantidades mayores con los sueros de los pacientes con un valor de $p = 0.008$ (figura 28).

Figura 24. Niveles de IgG1 en pacientes con actinomicetoma y controles (n=25).



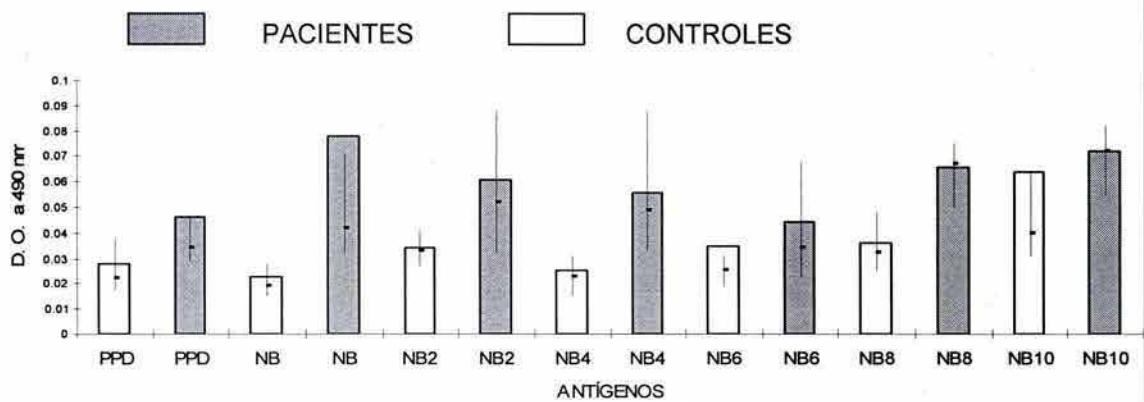
Valores de *p*: PPD 0.020; NB 0.003; NB2 0.000; NB4 0.005; NB6 0.014; NB8 0.011; NB10 0.861.

Figura 25. Niveles de IgG2 en pacientes con actinomicetoma y controles (n=25).



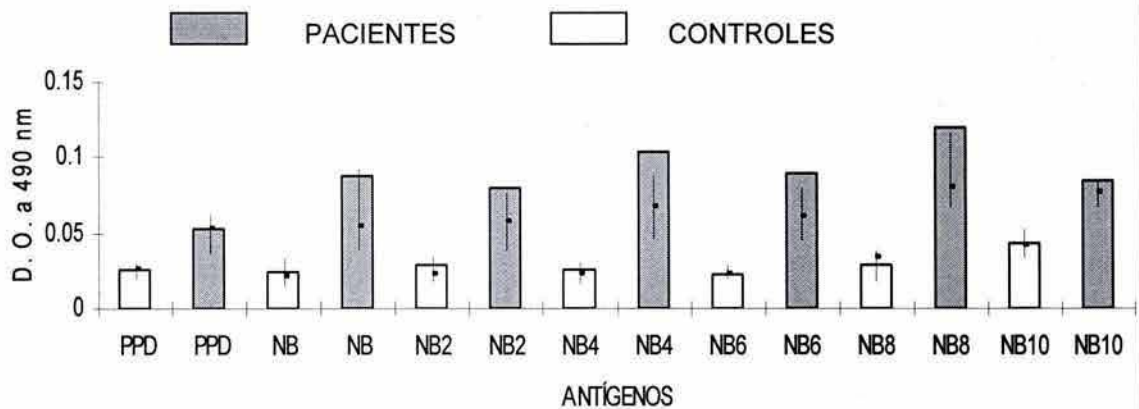
Valores de *p*: PPD 0.483; NB 0.000; NB2 0.001; NB4 0.001; NB6 0.076; NB8 0.023; NB10 0.781.

Figura 26. Niveles de IgG3 en pacientes con actinomicetoma y controles (n=25).



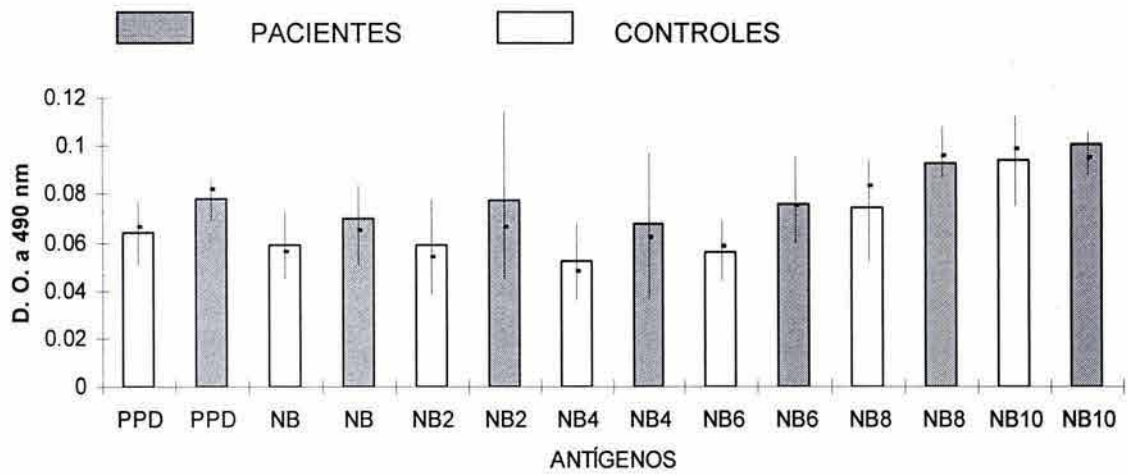
Valores de *p*: PPD 0.012; NB 0.000; NB2 0.005; NB4 0.000; NB6 0.087; NB8 0.000; NB10 0.000.

Figura 27. Niveles de IgG4 en pacientes con actinomicetoma y controles (n=25).



Valores de *p*: PPD 0.000; NB 0.000; NB2 0.000; NB4 0.000; NB6 0.000; NB8 0.000; NB10 0.000.

Figura 28. Niveles de IgM en pacientes con actinomietoma y controles (n=25).



Valores de *p*: PPD 0.010; NB 0.236; NB2 0.089; NB4 0.112; NB6 0.008; NB8 0.008; NB10 0.781.

PARTE 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. DISCUSIÓN

A pesar de que la primera descripción del micetoma fue realizada hace más de 3000 años (30), los estudios sobre la fisiopatogenia iniciaron hace apenas algunas décadas y hoy en día aún se desconocen muchos aspectos de la respuesta inmune en la evolución de este padecimiento.

Históricamente, la aplicación intradérmica de candidina y PPD ha sido de mucha utilidad para establecer el pronóstico de varios padecimientos infecciosos; los resultados obtenidos mediante la aplicación de PPD en este estudio, confirman los resultados publicados por González-Ochoa *et al.* en 1962 (41) y Ortiz-Ortiz *et al.* 1972 (87) que demuestran que los pacientes con actinomicetoma tienen una respuesta disminuida hacia los antígenos de *M. tuberculosis*, microorganismo ubicado en el mismo orden taxonómico que *N. brasiliensis*.

La induración ocasionada por la aplicación intradérmica de candidina que fue mayor en pacientes que en controles sanos podría deberse a la colonización de las fistulas por levaduras del género *Candida*, como lo refiere el Dr. Alejandro Palma [UAM Xochimilco] (*comunicación personal*), quien estudió pacientes con actinomicetoma causado por *A. madurae* y aisló frecuentemente esta levadura en los casos por él observados; sin embargo, Abadalla *et al.* en 1998 (2), refieren que en casos de eumicetoma, hay asociación frecuente con bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes* y *Proteus mirabilis*, pero no refieren levaduras del género *Candida*. Otra probable explicación es que *N. brasiliensis* y *C. albicans* compartan algunos antígenos que estén ocasionando reacción cruzada. En los cultivos de las muestras en este estudio no se desarrollaron colonias de

hongos ni de bacterias, por lo tanto, demostrar una u otra posibilidad requiere la realización de nuevas investigaciones.

La proliferación de CMSP inducida por los antígenos utilizados, fue mayor en los pacientes comparados con la proliferación en controles, resultando más evidente cuando las células fueron estimuladas con PHA. Este resultado indica que una de las primeras fases de la respuesta inmune adquirida, el “reconocimiento antigénico” por las células de los pacientes, se realiza de manera normal. En un estudio similar utilizando células obtenidas de bazo de ratones, Salinas-Carmona *et al* en 1999 (97), reportaron que la proliferación a las tres semanas postinoculación es mayor que la observada en los ratones no inoculados; después de dos meses de evolución la proliferación fue similar en ambos grupos.

En diversos estudios se ha demostrado que IL-4 está ligada a la activación de células B en respuestas tipo Th2 e inhibición de respuesta Th1 (47). En ensayos *in vitro* utilizando antígenos de *M. leprae* en cultivos de CMSP se demostró que esta citocina ejerce además un efecto inmunomodulador sobre IL-10 (101), provocando un incremento de TNF- α . Aunque en bajas concentraciones, IL-4 se detectó en los sobrenadantes de CMSP de los pacientes estimulados con todos los antígenos, mientras que estuvo ausente en los cultivos de los controles. Los pacientes con micetoma tuvieron bajos niveles de IL-10 y mayor liberación de TNF- α que los controles; estos resultados podrían indicar una inmunomodulación semejante a la ejercida por otros Actinomicetales.

Se puede asumir que la disminución de liberación de IL-10 (figura 21), se debe directamente al efecto de los antígenos de *Nocardia*, ya que la PHA utilizada como control positivo provocó una liberación importante de este mediador tanto en los pacientes como en los controles. Diversas publicaciones mencionan que IL-10 induce una disminución de

IFN- γ (29,101) y de IL-12 (84). Este efecto no se presentó en la población estudiada; los niveles de IL-10 fueron bajos en ambos grupos de estudio, pero la producción de IFN- γ fue normal en los cultivos de controles y baja en los cultivos de los pacientes con micetoma; mientras que IL-12 fue negativa en pacientes y en controles.

La inducción de IFN- γ por IL-12 ha sido demostrada en modelos experimentales por diversos autores como Trinchieri en 1995 (107) y corroborados años después por Mentink y Mosser (81). En este estudio, el IFN- γ estuvo disminuido sólo en los cultivos de pacientes, este resultado sugiere que la inducción de IFN- γ es multifactorial como lo proponen Magram *et al.* (65).

En las enfermedades infecciosas el IFN- γ , entre otras funciones, induce la proliferación de clonas de linfocitos Th1, activa macrófagos y reduce la producción de otras interleucinas de respuesta Th2 como IL-4, IL-10 (60). En los pacientes con leishmaniosis severa se ha demostrado que existen bajos niveles de esta interleucina, favoreciendo la progresión de la enfermedad (81). La producción de IFN- γ fue notablemente menor en los pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* que en los controles. Los pacientes de este estudio tenían micetomas de larga evolución; es posible que, como ocurrió en el modelo murino estudiado por Salinas-Carmona *et al.* (97) quienes detectaron un aumento de esta citocina a los cuatro días postinfección con *N. brasiliensis*, después de la infección haya un aumento importante de IFN- γ y posteriormente se presente una disminución de esta citocina.

El TNF- α es producido por macrófagos, células asesinas naturales, linfocitos B o incluso, linfocitos T e indica cronicidad de un proceso infeccioso (49). En el presente estudio, la producción de TNF- α fue mayor en los cultivos de pacientes que en los sujetos

control; este hecho fue más evidente cuando las células fueron estimuladas con PPD y con NB. En los pacientes con micetoma probablemente el aumento de TNF- α se deba a una respuesta inespecífica, dada la evolución crónica de este padecimiento y la liberación continua de antígenos a los tejidos afectados.

En relación a la concentración sérica de las inmunoglobulinas, históricamente ha sido muy útil como herramienta de diagnóstico y/o pronóstico de muchas enfermedades infecciosas micóticas o bacterianas; por ejemplo, en la histoplasmosis y coccidioidomicosis desde hace algunas décadas se sabe que el aumento constante de inmunoglobulina G se asocia con diseminación de la enfermedad (103). En 1988 Cole *et al.* (24), reportaron el aislamiento de una glucoproteína de la pared de las esférulas de *Coccidioides immitis* que estimula en pacientes la producción de concentraciones elevadas de IgG (sin mencionar subclases), lo que probablemente induce una respuesta inmune celular deficiente. En las infecciones diseminadas y crónicas causadas por bacterias como *Mycobacterium leprae* y *M. tuberculosis*, los pacientes también presentan elevados títulos de inmunoglobulinas las cuales no tienen efecto protector y un predominio de IL-4 e IL-10 (83).

En enfermedades infecciosas, como la tuberculosis o la lepra en sus formas anérgicas, se ha demostrado que el suero de pacientes aplicados sobre linfocitos o macrófagos ocasiona que estas células realicen sus funciones de manera deficiente. Estas mismas células cuando son tratadas con suero proveniente de personas normales, recuperan su capacidad de respuesta normal (74). En otros trabajos se demostró que el efecto inhibitorio que tenía el suero de los pacientes con tuberculosis y reacción intradérmica negativa a PPD era específico (73) A pesar de la demostración de esta inmunosupresión, en la mayoría de los casos no se proponía una explicación de dicho fenómeno, pero tomando

en cuenta la proximidad filogenético del agente de tuberculosis y *N. brasiliensis* es posible que este efecto inhibitor también lo ocasione esta última.

Como resultado de las investigaciones que reportaron la existencia de subclases de inmunoglobulinas (85), en algunas patologías diseminadas o crónicas, es importante documentar no sólo el aumento o la disminución de las clases de anticuerpos, sino también determinar la subclase predominante o deficiente. Así, se ha demostrado que personas que sufren infecciones frecuentes con bacterias capsuladas, generalmente presentan niveles séricos bajos de IgG2 (99).

Estudios recientes en humanos relacionan las subclases de IgG con los tipos de respuesta celular. Es un hecho ampliamente demostrado que el IFN- γ induce una respuesta celular principalmente tipo Th1, con mayor síntesis de IgG1 e IgG3, mientras que la respuesta celular tipo Th2, provoca aumento importante en IgG4, IgM e IgE (48).

En algunas parasitosis como las filariasis, Hussain R *et al.*, en 1987 (46), demostraron que la concentración de las subclases de IgG variaban de acuerdo con la evolución: IgG4 aumenta hasta 17 veces en los pacientes asintomáticos con microfilarias circulantes, comparados con los niveles correspondientes en pacientes con elefantiasis. En esta misma parasitosis, Atmadja *et al.*, en 1995, encontraron que los niveles de IgG4 disminuían después del tratamiento, lo que podría indicar que los antígenos liberados por los parásitos ejercen un efecto inmunomodulador. Resultados diferentes se observaron en pacientes con leishmaniasis visceral donde estudios de las subclases de IgG antes y después de tratamiento con antimoniales, mostraron que la IgG1 es predominante tanto antes como después del tratamiento (5).

En modelos murinos, Nussbaun *et al.* (86), estudiaron la concentración de subclases de IgG originadas como respuesta a infección experimental por *Cryptococcus neoformans*.

Los resultados mostraron que los ratones que padecían formas graves de la enfermedad producían elevadas cantidades de IgG3. Esta subclase se une al mismo sitio que IgG1, pero IgG3 no fija complemento por lo que la destrucción del hongo no se lleva a cabo de manera adecuada.

Recientemente Singhvi *et al.* estudiaron la concentración de IgM, IgG e IgA en suero de pacientes con actinomicetoma causado por *A. madurae*, *A. pelletieri* y *S. somaliensis*, y eumicetoma causado por *M. mycetomatis*. Los resultados mostraron que la concentración de inmunoglobulinas varía considerablemente de acuerdo con el agente etiológico. En los micetomas causados por *M. mycetomatis* y por *A. pelletieri* se produce un aumento estadísticamente significativo de estas inmunoglobulinas, mientras que los títulos en los pacientes afectados por *A. madurae* y *S. somaliensis* son iguales a los del grupo control (102).

El aumento en los niveles de inmunoglobulinas agrava la evolución del micetoma, hecho demostrado desde hace varios años en los trabajos publicados por Ximenez *et al.* (116), quienes administraron inmunoglobulinas por vía parenteral a grupos de animales previamente inoculados con *Nocardia*, resultando con infecciones más graves y diseminadas que los animales control.

Resultados más recientes (97) demostraron que los ratones inoculados experimentalmente con agentes de micetoma, presentan un incremento constante de inmunoglobulinas, principalmente de IgG a partir del día 14 de postinfección; este aumento de anticuerpos no ocasiona ninguna mejoría en la evolución del micetoma.

La mayoría de estudios sobre inmunoglobulinas y micetoma prestan más atención a la IgG total. Es importante mencionar el reporte de Salinas-Carmona y Pérez-Rivera (96) acerca del efecto protector que ejerce la IgM al evitar la producción de micetoma en

modelo murino. En este trabajo, la concentración de IgM específica fue mayor en los pacientes que en los controles, particularmente con los antígenos NB6 y NB8 sin que en este hecho de observación influye en la evolución de los casos.

El tratamiento actual del actinomicetoma consiste en la administración de DDS asociado a TMT/SMX (Hay, 1992). La DDS, además de su efecto antibacteriano directo por inhibición de síntesis de folatos, modifica la capacidad de fagocitosis de neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos (115). La importancia de la inmunomodulación ocasionada por la DDS durante el tratamiento del micetoma no ha sido establecida.

Un hecho fortuito, pero relevante en relación con la terapéutica e importancia de la inmunomodulación para el tratamiento del actinomicetoma, surgió durante el tiempo en que se desarrolló esta investigación. En el Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI se recibió un paciente con actinomicetoma causado por *N. brasiliensis* resistente a todos los esquemas terapéuticos recomendados. La cepa aislada fue enviada al Instituto Pasteur de París para estudio de sensibilidad; mientras tanto, al paciente se le realizaron estudios para valorar su capacidad fagocítica. Los resultados de ambos estudios fueron que la cepa aislada presentaba resistencia a gran número de antibióticos. El estudio inmunológico de capacidad fagocítica, con la técnica de nitroazul de tetrazolio, permitió detectar una disminución de 50% de la capacidad fagocítica del paciente. Con base en estos resultados, se propuso un nuevo esquema de tratamiento que consistió en la administración de cefotaxima y amikacina, como antibacterianos, y el uso combinado dos inmunomoduladores inespecíficos; el primero, levamisol (estimulante inespecífico de la fagocitosis) a dosis de 300 mg cada semana por dos meses y, el segundo, un antígeno bacteriano formado por *Staphylococcus aureus* y *S. epidermitis* muertos por calor y

posteriormente lisados. Los resultados fueron excelentes pues en sólo dos meses se logró la curación de una patología de varios años de evolución. (80).

4.2. CONCLUSIONES

La fase de reconocimiento y presentación de *Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomicetoma se realiza de manera normal como lo demuestra la proliferación celular que fue igual en ambos grupos.

La respuesta inmune celular de los pacientes con actinomicetoma es principalmente de tipo Th2, con una pobre respuesta de tipo Th1. Esta desviación es ocasionada por los antígenos de *N. brasiliensis* empleados, ya que con PHA y PPD, la respuesta es normal.

El perfil de producción de IgG, refuerza el punto anterior ya que IgG4 fue la subclase que presentó los mayores títulos séricos.

4.3. PERSPECTIVAS

- Realizar estudio comparativo longitudinal de citocinas y proliferación celular en pacientes con actinomicetoma activo y pacientes curados.
- Valorar la utilidad de los niveles de citocinas como indicadores pronósticos y/o curación del actinomicetoma.
- Valorar en estudio controlado comparativo la utilidad de incluir inmunomoduladores como parte del tratamiento del actinomicetoma.
- Estudiar la respuesta inmune innata en pacientes con actinomicetoma en donde sobresalen por su importancia y actualidad investigaciones sobre interacción de PAMPs y TLRs de macrófagos y otras células de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott P. Mycetoma in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med* 1956;50:11-30
2. Abdalla O, Ahmed A, Abugroum (El Sir) AM. Unexpected high prevalence of secondary bacterial infection in patients with micetoma. *J Clin Microbiol* 1998 ;36 :850-1.
3. Andreu JM. Traitement actuel des mycétomes fungiques: intérêt du ketoconazole associé à la chirurgie conservatrice. *Med Trop* 1986;46:293-7.
4. Arenas R, Navarrete G, Ibarra G, Ortíz G. Micetoma en niños. Estudio de 5 casos. *Dermatología Rev Mex* 1990;34:205-8.
5. Atmadja AK, Atkinson R, Sartono E, Partono F, Yazdanbakhsh M, Maizels MR. Differential decline in filaria-specific IgG1, IgG4, and IgE antibodies in *Brugia malayi*-infected patients after diethylcarbamazine chemotherapy *J Infec Dis* 1995;172:1567-72.
6. Basset A, Camain R, Baylet R, Lambert D. "Role des épines de mimosacées dans l'inoculation des mycétomes (a propos de deux observations) . *Bull Soc Path exot* 1965;52 :22-4
7. Baudraz-Rosselet F, Monod M, Borradori L, Ginalskey JM, Vion B, Boccard C, Frenk E. Mycetoma of the foot due to *Fusarium* sp. Treated with oral ketoconazole. *Dermatoloy* 1992;184:303-5.
8. Beaman BL. Structural and biochemical alterations of *Nocardia asteroides* cell walls during its growth cycle. *J Bacteriol* 1975;123:1235-53.
9. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: Host –parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:213-64.

10. Beaman B, Blake CM, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. 1985;47:135-41.
11. Beaman BL, Gershwin ME, Maslan S. Infectious agents in immunodeficient murine models: Pathogenicity of *Nocardia asteroides* in congenitally athymic (nude) and hereditary asplenic (Dh/+) mice. Infect Immun 1978;20:381-7.
12. Beaman BL, Scates SM, Moring SE, Deem R, Misra HP. Purification and properties of a unique superóxido dismutase from *Nocardia asteroides*. J Biol Chem 1983;258:91-6.
13. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol IV, Editor Williams ST. Ed. Williams & Wilkins 1989, Baltimore, USA, pp 2329-65.
14. Beutler B. Innate immunity: an overview. Mol Immunol 2004;40:845-59.
15. Boiron P, Provost F. Enzymatic characterization of *Nocardia* sp. And related bacteria by API-ZYM profile. Mycopathol 1990;110:51-6.
16. Boiron P, Stynen D, Belkacem G, Goris A, Provost F. Monoclonal antibodies to specific 54 kDa antigen of *Nocardia* spp. J Clin Microbiol 1992;30:1033-35.
17. Bonifaz A, Fong OY. Función leucocitaria de polimorfonucleares en pacientes con micetoma actinomicético. Dermatología Rev Mex 1989;32:171-4

18. Boyce R, Surveyor N. "Upon the existence of more than one fungus in Madura disease (Mycetoma). *Phylos Trans R Soc Lond* 1894;185(part I):1-14.
19. Brumpt E. "Les mycétomes" *Arch Parasit* 1906;10:489-564.
20. Burgois L, Beaman B, Beaman L. Probable L-forms of *Nocardia asteroides* induced in culture mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1974;9:576-90.
21. Carter HV. "On a new and a striking form of fungus disease, principally affecting the foot of prevailing endemically in many parts of India". *Trans Med Phys Soc Bombay* 1860;6:104-42.
22. Carter HV. "On micetoma or the fungus disease of India" J & A. Churchill, 1874, London UK.
23. Cicero RE. Los micetomas. *Gac Med Mex* 1912 ;7 :291.
24. Cole GT, Seshan KR, Franco M, Bukownik E, Sun SH, Hearn VM (1988) Isolation and morphology of an immunoreactive outer wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 56:2686-2694.
25. Conde C, Mancilla R, Fresan M, Ortiz-Ortíz L. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* 1983;40:1218-22.
26. Consejo Asesor en Epidemiología. México: Información prioritaria en Salud. Consejo Asesor en Epidemiología, 1990.

27. Dávila del Real MR, Arenas R. Micetoma diseminado por *N. brasiliensis* con afección ósea y pulmonar. *Dermatología Rev Mex* 1995;39:287-9.
28. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. 13ª Edición, Ed. Masson, 1992, Barcelona, España.
29. Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MFR, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KPWJ, Hussain R. Induction of Th1 cytokine response by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect Immun* 1996; 64: 4385-4389.
30. Drouhet E. Historical introduction: evolution of knowledge of the fungi and mycoses from Hippocrates to the twenty-first century. En: Collier L, Balows A, Sussman M. *Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections*. Vol. IV, Medical Mycology. Ed. Arnold 9ª ed. London 1998. pp:3-42.
31. Drutz DJ, Huppert M, Sun SH, McGuire WL. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 1981;32:897-907.
32. Emerueva AC. Isolation and some properties of beta-haemolysis produced by *Nocardia asteroides*. *Mycopathologia* 1986;95:29-35.
33. Eyre EW. Account of a peculiar disease "tubercular" of the foot. *Indian Ann Med Sci* 1859;6:513-20.
34. Fahal AH, Omer SM, Razig El SA, Ali ABE, Mahdi EMA, Mahgoub ES. Thyroid function in patients with mycetoma. *East Afr Med J* 1995;72:454-6.
35. Gómez A, Saúl A, Bonifaz A. Amoxicilin and clavulanic acid in the treatment of actinomycetoma. *Int J Dermatol* 1993;32:218-20.

36. González-Ochoa A. Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* with a note on the isolation of the causative organism from soil. *Lab Invest* 1962;11:1118-23.
37. González-Ochoa A. Micetomas y actinomicosis. *Mem XIII Cong Int Dermatol*, Munich, 1967:820-4.
38. González-Ochoa A. Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en el ratón. *Gac Med Mex* 1969;99:773-81.
39. González-Ochoa A. Geografía de las micosis profundas. *Rev Inv Salud Publica (México)* 1975;35:85-8
40. González-Ochoa A, Baranda F. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. *Rev Inst Sal Enf Trop.* 1953;13:189-97.
41. González-Ochoa A, Shibayama H, Félix D, Anaya M. Immunological aspects of actinomycotic micetoma and nocardiosis. *Proc XII Inter Cong Dermatol Washington DC*, 1962, USA pp:542-51.
42. Gooday GW, Adams DJ. Sex hormones and fungi. *Adv Microbial Physiol* 1993;34:69-145.
43. Hay R, Mahgoub ES, León G, Al-Sogair S, Welsh O. Micetoma *J Med Vet Mycol* 1992;30:41-9.
44. Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P. *Nocardia brasiliensis*: in vivo and in vitro growth response to steroid sex hormones. *Mycopathologia* 1995;132:79-85.

45. Hubler WR Jr, Hubler WR. Actinomycotic mycetoma treated with minocycline: case report. *Tex Md* 1976;72:79-81.
46. Hussain R, Grögl M, Ottesen EA (1987) IgG antibody subclasses in human filariasis. *J. Immunol.* 139:2794-98.
47. Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4 and IFN- γ producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells. *Cell* 1993; 75: 985-995.
48. Kolar GR, Capra DJ. Immunoglobulins: structure and function. En *Fundamental Immunology*. Paul WE. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 5^a ed. Ph. USA. 2003 Chap. 3, pp. 47-68.
49. Krakauer T, Vilcek J, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines. TNF and IL-1 families, chemokines, TGF- β , and others. In: *Fundamental immunology*, 4th ed. Philadelphia, USA: William E. Paul. Ed. Lippincott-Raven. 1999: 775-811.
50. Kurup VP, Piechura JE, Ting Y, Orłowski A. Immunochemical characterization of *Nocardia asteroides* antigens: support for a single species concept. *Can J Microbiol* 1983;29:425-32.
51. Latapí F, Lavalle P. Empleo des sulfones et de l'isoniazide dans le treatment des mycetomes. *Mem VIII Congr Bot Paris* 1954;44.
52. Latapí F, Ortiz Y. Los micetomas en México. Algunos datos nuevos, clínicos y epidemiológicos relativos a 197 casos. *Mem 1er. Cong Dermatol México*. 1963 pp 126-44.

53. Lavalle P. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. *Gac Med Mex* 1966;116:545-.
54. Lavalle P. Micetomas por *Streptomyces* en América. *Dermatol I.L.A* 1972;14:379-89.
55. Lavalle P, Padilla Desgarenes MC, Pérez GJ, Rivera I, Reynoso RS. Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2000;9:19-24.
56. Lechevalier HA. Nocardiform actinomycetes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol IV (section 26)*, Editor Williams ST. Ed. Williams & Wilkins 1989, Baltimore, USA, pp 2348-65.
57. 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 Iberoam Micol* 1993;10:36-8.
58. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares LR. *Micología Médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Ed. Trillas, 2ª edición, México, 2004.
59. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saul A, Macotela-Ruíz E. Epidemiología del micetoma en México. *Gac Med Mex* 1992;128:477-81.
60. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH. Interferon- γ differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest* 1997; 99: 336-341
61. Lynch JB. Mycetoma in the Sudan. *Ann R Coll Surg* 1964;35:319-340.

62. Macotela-Ruiz E. Historia de la micología médica en México. Ediciones Instituto Syntex, México 1990.
63. Macotela-Ruiz E, Mariat F. Sur la production des mycetomes experimentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*. Bull Soc Path Exot 1963;56:46-54.
64. Magaña-Lozano M. Los micetomas. Sus repercusiones óseas. Dermatología Rev Mex 1989;33:22-7.
65. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. Immunity 1996; 4: 471-481.
66. Mahgoub ES. Medical management of mycetoma. Bull World Health Organ 1976;54:303-10.
67. Mahgoub ES, Murray IG. Mycetoma. Ed. Willian Heinemann Medical Books, 1973, London, UK
68. Mahgoub ES, Gumaa SA, Hassan El AM. Immunological status of mycetoma patients. Bull Soc Pathol Exot 1977;70:48-53.
69. Mariat F. Sur la distribution géographique et la répartition des agents de mycétomes. Bull Soc Pathol Exot 1963 ;56 :35-45.
70. Mariat F, Destombes P, Segretain G. The mycetomas: clinical features, pathology, etiology and epidemiology. Contrib Microbiol Immunol 1977;4:1-39.
71. McGinnis MR. Mycetoma. Dermatologic Clinics. 1996;14:97-104.

72. Medzhitov R. The innate immune system. En: *Fundamental Immunology*. Paul W. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 5ª ed. 2003. Ph, USA. pp. 497-517.
73. Mejía-López H, Martínez-García LG, Zenteno E, Salazar MA, Selman M, Taylor ML. BCG specificity of an inhibitory seric factor from tuberculosis anergic patients that acts on non-adherent PPD reactive cells. *Immunol Invest* 1997;26:323-31.
74. Mejía-López H, Vaca-García O, Cristerna-Aguirre JM, Cruz-Chávez A, Selman-Lama M, Taylor ML. Tuberculous anergic sera purified protein derivates treatment induces modification in lymphocyte transformation of cells from patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:344-9.
75. *Memorias del II Simposio Internacional del Micetoma*. Taxco Guerrero, México, 1987.
76. Méndez-Tovar LJ. Estudio de factores patogénicos y epidemiológicos del micetoma en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. 1987.
77. Méndez-Tovar LJ. Utilización de la galerías API-ZYM para la identificación de Actinomicetes de importancia médica. En: *Actinomicetos*. Editado por Horacio Sandoval Trujillo. Ed. Universidad Autónoma Metropolitana. México, 1993. Pp. 185-91.
78. Méndez-Tovar LJ, de Bièvre C. Détermination du profil enzymatique de quelques agents de mycétome par la méthode API-ZYM. *Bull Soc Fr Mycol Med*. 1989 ;18:153-6

79. Méndez-Tovar LJ, de Bièvre C, López-Martínez R. Effets des hormones sexuelles humaines sur le développement *in vitro* des agents d'eumycétomes. *J Mycol Med* 1991;118 :141-3.
80. Méndez-Tovar LJ, Serrano-Jaén L, Almeida-Arvizu VM. Cefotaxima más amikacina asociadas a inmunomodulación en el tratamiento de actinomicetoma resistente a tratamiento convencional. *Gac Med Mex* 1999;135:517-21.
81. Mentink MK, Mosser DM. The role of IL-10 promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001; 166: 1141-1147.
82. Mikami Y, Yu SF, Yasakawa K, Fukushima K, Maeda A, Uno J, *et al.* A toxic substance produced by *Nocardia otitidiscaviarum* isolated from cutaneous nocardiosis. *Mycopathologia* 1990;112:113-8.
83. Modlin RL. Th1-Th2 Paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 1994;102:828-32.
84. Moore KW, O'Garra A Ed., de Waal Malefyt R, Vieira P, Mossmann TR. Interleukin 10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-190.
85. Natvig JB, Kunkel HG. Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Adv. Immunol.* 1973;16:1-59.
86. Nussbaun G, Yuan RR, Casadevall A. Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 1996;183:1505-9.

87. Ortiz-Ortíz L, Bojalil LF. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a mean of diagnosis and epidemiology study of *Nocardia* infection. *Clin exp Immunol* 1972;12:225-9.
88. Ortiz-Ortíz L, Contreras MF, Melendro EI. Cell mediated immune responses in mice infected with *Nocardia brasiliensis* *Mycoses* 1975 PAHO pp. 36-41
89. Paugam A, Tourte-Scheafer C, Keïta A, Chemla N, Chevrot A. Clinical cure of fungal madura foot with oral itraconazole. *Cutis* 1997;60:191-3.
90. Pérez R, Rey A, Bonifaz A, Cazarín J. Micetoma con diseminación linfática. *Dermatología Rev Mex* 1990;34:46-8.
91. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D Stevens D. Estrogen inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infec Immun* 1984;46:346-53.
92. Rico G, Ochoa R, Oliva A, González-Mendoza A, Walter SM, Ortiz-Ortíz L. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infección in mice depleted of antigen-specific B cells. *J Immunol* 1982;129:1688-93.
93. Rippon W. Capítulo 1. Introducción a los actinomicetos patógenos *En Tratado de Micología Médica*. 1990, 1ª edición, México pp 15-32.
94. Rippon W. Capítulo 3. Nocardiosis. *En Tratado de Micología Médica*. 1990, 1ª edición, México, pp. 61-78.
95. Rippon W. Capítulo 5. Micetoma. *En Tratado de Micología Médica*. 1990, 1ª edición, México, pp. 91-132.

96. Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis* Infect Immun 2004;72:5597-604.
97. Salinas-Carmona MC, Torres-López E, Ramos AI, Licon-Trillo A, González-Spencer D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in a experimental modelo of actinomycetoma in BALB/c mice. Infec Immun 1999;67:2428-32.
98. Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM. Enzyme-linked immonosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. J Clin Microbiol 1993;31:2901-6.
99. Scott MG, Briles DE, Nahm NH. Selective IgG subclass expression: biologic, clinical and functional aspects. En Shakib F, (Ed.) The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Oxford, Pergamon Press, 1990:161-83.
100. Shibayama H. Algunos aspectos inmunológicos de *Nocardia asteroides*. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, 1958.
101. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, *et al*. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. J Immunol 1993; 150: 5501-5510.
102. Singhvi A, Joshi KR, Sharma JC Vyas MC. Immunoglobulin profile in mycetoma. Indian J Pathol Microbiol 1996;39:203-6.

103. Smith CE, Saito MT, Simons SA (1956) Pattern of 39500 serologic tests in coccidioidomycosis. J.A.M.A. 160:546-52.
104. Smith EL, Kutbi S. Improvement of eumycetoma with itraconazole. J Am Acad Dermatol 1997;36:279-80.
105. Splino M, Merka V, Kyntera F. Phagocytosis and intracellular proliferation of *Nocardia asteroides* (strain Weipheld) in cell structures *in vitro* 1. Alveolar macrophages of guinea-pigs. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Abt Orig 1975;232:334-40.
106. Súčil P, Fromentin H, Mariat F, Ravisse P. Mycetome experimental a *Nocardia brasiliensis* chez la souri. Nouvelles observations. Bull Soc Fr Mycol Med 1984 ;13 :385-9.
107. Trinchieri G. Interleukin-12 a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. Ann Rev Immunol 1995; 13: 251-276.
108. Velasco-Castrejón O, Estrada-Parra S, Castro-Mussot M, Jiménez-Zamudio L. Aspectos inmunológicos del micetoma actinomicósico. Mem Cong Nal. Microbiol. Puebla, Pue., México, 1974.
109. Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Welsh O, Rodríguez MA. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. J Clin Microbiol 1992;30:1183-88.
110. Vincent MH. Étude sur le parasite du "Pied de Madura" Ann Inst Pasteur 1894;129-151.

111. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay. En: Rose NR, Friedman H. (2° Edition) Manual of Clinical Immunology. Washington DC, American Society of Microbiology. 1980:359-371.
112. Waksman SA. Actinomycetes as causative agents of human and animal diseases. En: The Actinomycetes, Ed. Walthman, Mass, USA. 1950. Chap XI pp 170-86.
113. Walter RM, Ashdown LR, Maguirre EJ. Beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy in *Nocardia brasiliensis* soft-tissue infection. Med J Austral 1991;155:122-3.
114. Welsh O. Treatment of actinomycetoma. Arch Med Res 1993;24:413-15.
115. Wozel G, Barth J. Current aspects of mode of action of dapsone. Int J Dermatol 1988; 27: 547-552.
116. Ximenez C, Melendro EI, González-Mendoza A, García MA, Martínez A, Ortiz-Ortíz L. Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. Mycopathologia 1980;70:117-22.
117. Ziprkowski L, Altmann G, Dalith F, Spitz U. Mycetoma pedis: four cases treated with streptomycin. Arch Dermatol 1957;75:855.

Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma

Luis J. Méndez-Tovar¹, Rafael Mondragón-González¹, Francisco Vega-López², Hazel M. Dockrell³, Roderick Hay⁴, Rubén López-Martínez⁵, Patricia Manzano-Gayosso⁵, Francisca Hernández-Hernández⁵, Carmen Padilla-Desgarenes⁶ & Alexandro Bonifaz⁷

¹Unidad de Investigación Médica en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México; ²Department of Dermatology, Middlesex Hospital, London, United Kingdom; ³Immunology Unit, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom; ⁴Department of Dermatology, Guy's Hospital, London, United Kingdom; ⁵Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Medicina, UNAM, México; ⁶Centro Dermatológico "Ladislao de la Pascua", SS, México; ⁷Laboratorio de Micología Médica, Servicio de Dermatología, Hospital General de México, SS, México

Received 4 May 2004; accepted in revised form 9 September 2004

Abstract

IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-12 concentrations in the supernatant of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures and the *in vitro* proliferation of PBMC were studied in 25 patients with actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* and in 10 healthy controls from endemic zones. Cell cultures were stimulated by a *N. brasiliensis* crude cytoplasmic antigen (NB) and five semi-purified protein fractions (NB2, NB4, NB6, NB8, and NB10) separated by isoelectric. Phytohemagglutinin (PHA) and purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* were used as control antigens. Skin tests were performed by injecting 0.1 ml of candidin and PPD intradermally (ID). Patients showed a poor response to tuberculin, while their response to candidin was more than two fold greater than that observed in the controls. Cell proliferation showed no statistically significant differences in either group. IFN- γ production was higher in the healthy controls than in the patients, whereas TNF- α secretion was slightly higher in the patients' cultures. IL-4 was detected in the patients' cultures but not in the controls. IL-10 and IL-12 were present at low concentrations in both groups. These results suggest that patients with actinomycetoma show normal antigen recognition, but with low IFN- γ production, and higher concentrations of IL-4, IL-10 and TNF- α in the patients' PBMC cultures, indicating that they probably have a Th2 type of immune response.

Key words: actinomycetoma, cytokines, lymphocyte proliferation, *Nocardia brasiliensis*

Introduction

Mycetoma is a subcutaneous and chronic infection whose etiologic agents are fungus (eumycetoma) or bacteria (actinomycetoma) [1, 2]. In America, particularly in Mexico, most of cases are actinomycetoma due to *Nocardia brasiliensis* [3].

The actinomycetoma agents are aerobic bacilli from the Actinomycetales Order and they are

included in the *Nocardia*, *Actinomadura* and *Streptomyces* genera; all of them have the tendency to form pseudofilaments. In Mexico the most frequent agents are *N. brasiliensis* and *A. madurae*; less frequently, *N. asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *A. pelletieri* and *S. somaliensis* [4] are isolated. The Actinomycetales Order also comprises *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae*, bacteria which share morphological and physiological characteristics with *Nocardia* [5].

The predisposing factors to mycetoma are not clearly known; throughout history some have been considered, such as sex, as men are more affected than women [6]; the kind of work, attacking in general peasants or people with agricultural activities [7]; nutrition, generally in different levels of deficiency [8]; endocrinopathies such as hypothyroidism [9]; environmental conditions such as tropical and subtropical climate areas located between the tropics of Cancer and Capricorn [10].

In spite of the above mentioned factors in which research has been successful and which partially explain the high incidence of such pathology in underdeveloped countries, it is interesting to point out that not all the inhabitants of the endemic zones suffer the disease, although they share work, social, economic and sex conditions. A crucial factor in establishing and developing infectious diseases, in the case of actinomycetoma is doubtlessly the kind and quality of the immune response.

For a long time many aspects of the immune response in the mycetoma patient have been explored. In 1962, González-Ochoa et al. [11] published several studies about the immune response in patients with actinomycetoma caused by *N. brasiliensis* showing by skin tests (ST) with nocardin and tuberculin that the positive reactors had the best prognosis, while high titers of complement fixing antibodies and precipitins were generally associated with more severe disease as well as to negative response to treatment. Similar results were obtained in 1977 by Mahgoub et al. [12] who studied African patients with eumycetoma and actinomycetoma.

Later Ortíz-Ortíz et al. showed that in patients, as well as in laboratory animals, the cellular hypersensitivity to *N. brasiliensis* crude or purified antigens was associated with a good prognosis in actinomycetoma evolution [13–15]. In a comparative study, Rico et al. [16] found that mice inoculated with *N. brasiliensis* and depleted of B lymphocytes had better prognosis in the development of mycetoma than the controls with normal cell numbers; this result suggests that the humoral immune response is not protective and that the presence of antibodies may aggravate the disease evolution.

In nocardiosis, caused mainly by *N. asteroides*, the pathophysiology has been extensively studied.

Beaman et al. [17] and Demm et al. [18] demonstrated that protection against the disseminated infection and death of the athymic mice is given by the T cells; injection of specific anti-*N. asteroides* antibodies causes dissemination and death in a short time.

In 1999 Salinas-Carmona et al. [19] studied cellular proliferation, immunoglobulin production, and some cytokine concentrations in mononuclear cell cultures of mice inoculated with *N. brasiliensis*; these mice had a remarkable increase in IFN- γ production and a moderate increase in IL-4, IL-6 and IL-10. The lymphocyte proliferation was detected from the seventh day after inoculation until the 60th day.

In spite of the advances in the knowledge of some immunological aspects about human and experimental actinomycetoma, studies on lymphocyte proliferation and cytokine production have not been carried out; these should identify immunological changes that would give us a better understanding of the disease pathogenesis.

The aim of this work was to compare cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with actinomycetoma caused by *N. brasiliensis* and healthy individuals.

Patients and methods

Patients. 25 patients with actinomycetoma (20 men and 5 women) without previous treatment, from 11 to 70 years old (average 34.5 years) were studied. Diagnosis of mycetoma by *N. brasiliensis* was based on direct examination, histopathology study, culture and physiological tests. The hospital centres where studies were carried out were: Hospital General de México and Centro Dermatológico "Ladislao de la Pascua" from Secretaría de Salud (SS), and Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Healthy controls: Ten healthy individuals (five men and five women) coming from endemic zones, between 20 and 44 years old (average age 30.8 years) were included. Patients and healthy persons were informed about the kind of study in which they would take part, and that it would not risk their health in any way. Afterwards they signed a letter of agreement.

Skin tests: 0.1 ml of candidin (Laboratorio de Micología Básica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, lot HE-1034) and tuberculin (Statens Serum Institute, Denmark) was injected intradermally to the patients and to the control group. The induration diameter was measured after 48 h.

Antigens and mitogens: For cellular proliferation assays, the *N. brasiliensis* crude antigen (NB) was used, as well as five antigenic fractions from NB (NB2, NB4, NB6, NB8, NB10), phytohemagglutinin [PHA] (DIFCO) and tuberculin (Statens Serum Institute).

***N. brasiliensis* crude antigen:** Strain 253 MM-UNAM – isolated from a patient with actinomycetoma and conserved by subculture in Sabouraud dextrose agar (Bioxon) – was inoculated in 400 ml of Sabouraud dextrose broth. The culture was incubated at 37 °C, with stirring (100 rpm) for 9 days (log phase of growth). After this period, 0.8 g of thimerosal (Sigma) in solution was added and incubated for 24 h; the bacterial mass was collected by filtration in Whatman N° 1 paper. The bacterial mass was put into a tissue homogenizer (Biopsec®) and the cells were broken with 0.5 mm glass beads (20 cycles of 1 min). The obtained product was centrifuged at 10,000 rpm for 60 min at 10 °C. The supernatant which constituted the crude *N. brasiliensis* antigen was, the protein concentration by the Bradford method [20], it was stored collected, and after determination of at 4 °C.

Production of NB fractions: The NB antigen was dialyzed for 3 h against distilled water before separating the protein fractions according to their isoelectric point. Aliquots of 50 ml were run in the BioRad Rotofor System® at 12 V until voltage stabilization occurred. Twenty antigenic fractions named NB1, NB2, ..., NB20 were obtained. The protein concentration and pH of each fraction were also determined, and the fractions were kept at -70 °C until use in cell proliferation assays.

Cell proliferation assays: 20 ml of peripheral blood from both patient and control groups under study were collected in tubes containing 500 U heparin; After a 1/2 dilution with RPMI-1640 medium (GIBCO-BRL), 20 ml of this mixture were deposited into tubes containing 15 ml Histopaque (Sigma); the mixture was centrifuged to 1300 rpm for 30 min (Multifuge 3 LR, Heraeus®).

The intermediate phase containing the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was separated and washed three times with Hanks' balanced salt solution [HBSS] (GIBCO); each washing was done by stirring for 10 min at 1300 rpm; the supernatant was discarded and the cells were resuspended in 1 ml of growth medium (RPMI-1640 supplemented with 10% autologous plasma [100 U/ml of penicillin, 100 mg/ml of streptomycin (GIBCO) and 2 mM L-glutamine (GIBCO)]) HBSS. Using a haemocytometer, the concentration was adjusted to 1.1×10^6 PBMC/ml of growth medium. With the PBMC obtained from five patients, cell proliferation pilot assays were carried out using the 20 NB antigenic fractions derivatives previously obtained, as well as PHA and tuberculin. In these assays the optimal cellular proliferation was observed at 10 µg protein/ml. This protein concentration was similar to another previously studied in our laboratory [21]. Cell proliferation was minimal when PBMC were stimulated with the antigenic fractions NB 10 to 20; which were therefore discarded for subsequent experiments.

Two plates (96 and 24 wells) from each member of patient and control groups were prepared by depositing 200 or 1000 µl of PBMC suspension per well, respectively. The first micro plate was used to quantify the cellular proliferation after 7 days of incubation and the second one, to quantify the cytokine production. The cultures were incubated for 6 days in 5% CO₂, 37 °C at constant humidity; 100 µl supernatant were collected from each well and 20 µl of ³H-Thymidine (1 µCi/ml Amersham) were added. Cultures were harvested 24 h later using a cell harvester (Tomtec®) and counting was performed with a scintillation counter (Beckman LS6000SE).

Cytokine quantification: 100 µl of supernatant from the PBMC culture were used to quantify IL-4, IL-10, IL-12, TNF-α and IFN-γ by ELISA technique (Cytoscreen® Biosource International).

Statistical analysis: The U Mann-Whitney test was used; the *p* value for discontinuous variables was obtained. Differences were considered significant at *p* value ≤ 0.05.

Results

Characteristics of antigens obtained from *N. brasiliensis*: The protein concentrations of all tested

antigens were different: crude antigen NB had 1.25 µg/ml; fractions isoelectric focusing showed variable protein concentrations ranging between 0.1 and 1 mg/ml. The pH also was variable, 2.2 for fraction 1 and 11.1 for fraction 20. A pilot study of cell proliferation performed with all fractions allowed five semi-purified fractions (NB2, NB4, NB6, NB8, and NB10) whose protein concentrations of 0.17, 0.5, 1, 0.47 and 0.19 mg/ml, respectively to be selected for subsequent study since they induced the highest responses.

Intradermal reaction of patients and control group: All control subjects except one had a positive response to tuberculin (93%) and the average induration diameter was 9.8 mm, while this reaction was positive in 8 out of 15 patients (53%) with an average induration diameter of 6.9 mm. In contrast, the response to candidin was positive in both groups, but the average induration was greater in the patients group (14.5 mm *versus* 8.9 mm in diameter). This difference was statistically significant.

Antigen recognition: All the antigens were processed and induced cellular proliferation in both groups with predominance in patients (Table 1). The PHA mitogen and NB6 antigen fraction induced a higher response from the patients' cells with *p* values of 0.05 and 0.028, respectively.

Cytokine profiles: The PBMC from the control group did not produce IL-4 when stimulated by any tested antigen; while the patients' PBMC produced variable but low quantities of this cytokine; the average quantities were 10.14 pg/ml with PHA,

and 4.7 pg/ml with tuberculin; the other antigens induced concentrations between these two values.

When the cells were stimulated by PHA, the IL-10 production was approximately 400 pg/ml in both groups, while the *Nocardia* crude and semi-purified antigens induced the liberation of this lymphokine in concentrations close to 150 pg/ml (Figure 1).

IL-12 production was poor in both groups with; a mean of 38 pg/ml in patients' culture supernatant when stimulated by NB2, whereas it was higher in the control group with the NB6 and NB8 antigens, however, the differences were not statistically significant.

IFN-γ production was significantly higher in the control group than in the patients group. This difference was particularly remarkable when the cells were stimulated with the NB2, NB4 and NB6 antigens with a twofold increase in the control group compared with those of the patients (*p* = 0.001, 0.011 and 0.001 values respectively) (Figure 2). In contrast, the TNF-α production was higher in the patients than in the control group with all the *Nocardia* antigens tested. The greatest differences were observed when the cells were stimulated by NB and NB2 (*p* < 0.05) (Figure 3). The main results obtained in the immune response in subjects with and without mycetoma are summarized in Table 2.

Discussion

Although mycetoma was first described more than 3,000 years ago [22], the studies on physiopathology began only some decades ago and even nowadays many aspects about the immune response on the evolution of disease are unknown.

Our results of skin test are in agreement with data published by González-Ochoa et al. [11] and Ortiz-Ortiz and Bojalil [13] showing that patients with actinomycetoma have a poor response to PPD, an antigen obtained from *M. tuberculosis* which is closely related with *N. brasiliensis*. However, it was surprising to observe that the candidin induced a higher response in the patients than in the control group in spite of both groups being positive to the skin test. An explanation could be the colonization of sinus tracts by yeasts of *Candida* genus producing in patients a immunological reinforcement, as observed by Palma A (personal

Table 1. Cell proliferation assay in PBMC of actinomycetoma patients and control group

Antigen	Controls (n = 10)	Patients (n = 25)
PHA	2588 ± 676	4725 ± 2330
PPD	1685 ± 660	2629 ± 2533
NB	1230 ± 531	2145 ± 2376
NB2	1733 ± 1043	2343 ± 2899
NB4	1924 ± 918	2021 ± 1154
NB6	1053 ± 674	1921 ± 1001
NB8	891 ± 359	1336 ± 776
NB10	1056 ± 551	1075 ± 812

Cell proliferation in actinomycetoma patients compared with healthy controls. Only cells stimulated with PHA and NB6 gave a significant statistically results: PHA, *p* = 0.05; NB6, *p* = 0.02 values was similar. The cellular proliferation is given in counts per minute (cpm).

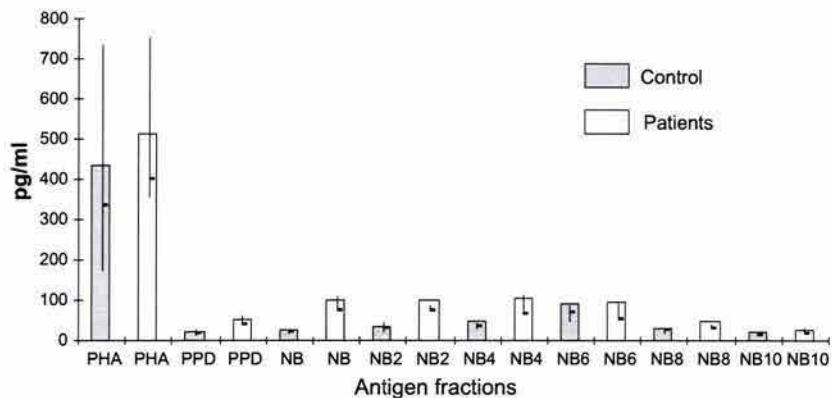


Figure 1. IL-10 production by PBMC from actinomycetoma patients and healthy controls. Low levels of IL-10 in both groups are observed probably induced by *N. brasiliensis* antigens. With PPD, NB and NB2, the differences were statistically significant ($p = 0.034$; 0.005 and 0.034 respectively). The highest point on the line represents the 75% percentile, the lowest point the 25% percentile, the transversal line the median, and the height of the bar is the mean of each group.

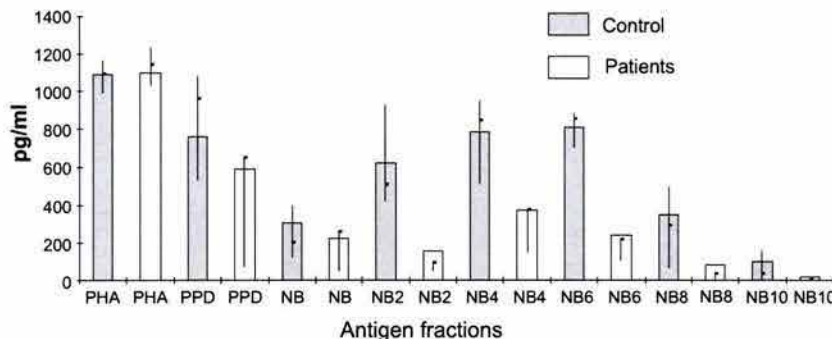


Figure 2. IFN- γ production by PBMC from actinomycetoma patients and healthy controls. In patients there was a remarkable decrease of IFN- γ production mainly when cells were stimulated by NB2, NB4 and NB6 antigen fractions ($p = 0.001$, 0.013 and 0.001 respectively). The highest point on the line represents the percentile 75%, the lowest point the percentile 25%, the transversal line the median, and the height of the bar, is the mean.

communication) who studied patients with actinomycetoma caused by *A. madurae* and isolated this yeast from lesions. Another probable explanation is that *N. brasiliensis* and *C. albicans* share some antigens responsible for cross reactions. However, additional experiments are required to confirm these hypothesis.

The PBMC proliferation induced by the stimuli was higher in patients compared with the control group, particularly when cells were stimulated by PHA. This observation indicates that the patients' cells are capable of proliferating normally. In a similar study using cells obtained from the spleen of mice, Salinas-Carmona et al. [19] reported that 3 weeks post-inoculation, proliferation was higher

than that observed in non-inoculated mice; after 2 months of evolution, the proliferation results were similar in both groups.

Several studies have shown that IL-4 is linked to B cell activation with induction of Th2 type responses and, inhibition of Th1 type responses [23]. When *M. leprae* antigens were used in PBMC culture 'this cytokine was demonstrated to have an immunoregulatory effect on IL-10 [24] and to induce TNF- α secretion. Even in low concentrations IL-4 was detected in the patients' PBMC supernatants stimulated by all the antigens and by PHA, while it was absent in the control group cultures. Patients with mycetoma had low levels of IL-10 and higher levels of TNF- α than the control

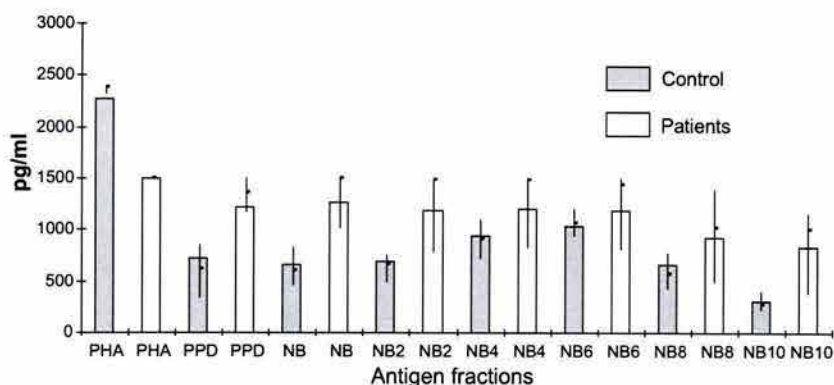


Figure 3. TNF- α production by PBMC from actinomycetoma patients and healthy controls. PHA induced decreased TNF- α production by patients' cells; by contrast, a moderate increase is observed in the production of this cytokine by the cells of patients when cells were stimulated by most of the other antigens. These results were statistically significant (PHA, $p = 0.000$; PPD, $p = 0.034$; NB, $p = 0.01$; NB2, $p = 0.01$ and NB10, $p = 0.028$). The highest point on the line represents the percentile 75%, the lowest point the percentile 25%, the transversal line the median, and the height of the bar, is the average.

Table 2. Results of skin reaction and cytokine production in actinomycetoma patients and healthy control group

Variable	Control	Patients
Candidin	++	+++
Tuberculin	++	±
PBMC proliferation	++	+++
IFN- γ	+++	±
TNF- α	++	+++
IL-4	-	±
IL-10	±	±

(-) Negative; (±) Weak response; (++) Moderate response; (+++) Strong response.

group; these results could indicate an immunoregulation similar to that induced by other Actinomycetales [25].

It can be assumed that the lowering of IL-10 is due directly to the effect of the *Nocardia* and *M. tuberculosis* antigens since the mitogen PHA, used as a positive control, produced good secretion of this mediator in patients as well as in the control group. Some studies indicate that IL-10 induces a decrease in both IFN- γ [24, 26] and IL-12 [27]. This effect was not present in our population: IL-10 levels were low in culture supernatants from both groups, but IFN- γ production was normal in controls and low in patients, while IL-12 production was not detectable in both patients and controls. Induction of IFN- γ by IL-12 has been demonstrated by several authors in experimental

models [28, 29]. In this study, IFN- γ was lower only in the patients suggesting that induction of this cytokine is multifactorial as proposed by Magram et al. [30].

In infectious diseases IFN- γ , among other functions, induces Th1 lymphocyte proliferation, activates macrophages and reduces the production of other interleukins of the Th2 response such as IL-4, and IL-10 [31]. Low levels of this interleukin may favor the disease progression as it has been demonstrated in patients with severe leishmaniasis [27]. The IFN- γ production was remarkably lower in patients with *N. brasiliensis* mycetoma than in the controls. Patients in this study had a long evolution of mycetoma; it seems likely that, as it occurred happened in the murine model studied by Salinas-Carmona et al. [19], there is an increase in IFN- γ at the beginning of the human infection followed by a decrease in the production of this cytokine with the progression of the disease.

TNF- α is produced by macrophages, natural killer cells, B lymphocytes and T lymphocytes, and it indicates a chronic infection process [32]. In this study the TNF- α production was higher in the patients than in the control group; this fact was more evident when the cells were stimulated by tuberculin and NB. In mycetoma patients the TNF- α increase could be due to an unspecific response as a result of chronic disease with continuous liberation of antigens.

Considering the levels of IFN- γ , IL-4 and TNF- α and the poor response to tuberculin, it can

be concluded that patients with active actinomycetoma have a deficient Th1 response and an efficient Th2 response (Table 2). However, further studies are needed actinomycetoma and to determine the production of other cytokines.

Currently, the drugs of choice in actinomycetoma treatment are diaminediphenyl sulphone (DDS) in combination with trimetoprim sulfamethoxazole (TMZ) [33]. It is known that DDS, in addition to its direct antibacterial effect by inhibition of folate synthesis, modulates the immune response modifying phagocytosis and the cellular destruction of polymorphonuclear neutrophils and macrophages [34]. The importance of immunomodulation during mycetoma treatment has not been established; however, it is possible that it may be useful as demonstrated in one case where a patient with a 7 year history of actinomycetoma was resistant to multiple treatments. Because the patient showed poor phagocytosis, a bacterial antigen and levamisol were supplied in addition to amikacin and cefotaxime combined, achieving a cure in 2 months without relapse in the following 4 years [35]. Additional research on the immune responses of actinomycetoma patient will establish the basis on which specific immunoregulators should be included as part of these patients treatment.

Acknowledgements

The authors are grateful to Flora García-Formenti (CELE, UNAM) for the correction of the English manuscript.

References

- Rippon JW. Mycetoma. Medical Mycology. 3rd edn. Philadelphia, USA: WB Saunders Company, 1988: 80-118.
- Hay RJ. Agents of eumycotic mycetomas. In: Leslie Colier, Albert Balows, Max Sussman, eds. Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. 9th ed., Vol. 4. London, UK: Arnold, 1998: 487-496.
- Mariat F. Sur distribution géographique et répartition des agents de mycétomes. Bull Soc Path Exot 1963; 56: 35-45.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saul A, Macotela-Ruiz E. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gac Med Mex 1992; 128: 477-481.
- Beaman B. Actualización del conocimiento de las infecciones causadas por Actinomicetos en: Actinomicetos. México: Sandoval Trujillo, Universidad Autónoma Metropolitana, 1993: 125-142.
- Mariat F, Destombes P, Segretain G. The mycetomas: Clinical features, pathology, etiology and epidemiology. Contrib Microbiol Immunol 1977; 4: 1-39.
- Lavalle P. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gac Med Mex 1966; 96: 545-555.
- Fahal AH. Mycetoma updates <http://www.mycetoma.org/pages/MUupdates.htm>.
- Fahal AH, Omer SM, El Razig SA, Ali, AB, Mahdi EM, Mahgoub ES. Thyroid function in patients with mycetoma. East Afr Med J 1995; 72: 454-456.
- Mahgoub ES, Murray IG. Mycetoma. London, UK: William Heinemann Medical Books, Ltd, 1973.
- González-Ochoa A, Shibayama H, Félix D, et al. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Proceedings of XII International Congress Dermatology of Washington, DC, 1962: 542-551.
- Mahgoub ES, Gumma SA, El Hassan AM. Immunological status of mycetoma patients. Bull Soc Pathol Exot 1977; 70: 48-53.
- Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infections. Clin Exp Immunol 1972; 12: 225-229.
- Ortiz-Ortiz L, Contreras MF, Melendro EI. Cell-mediated immune responses in mice infected with *Nocardia brasiliensis*. Mycoses 1975; PHAO: 36-41.
- Melendro EI, Contreras MF, Ximénez C, García-Maynez AM, Ortiz-Ortiz L. Changes in host resistance caused by *Nocardia brasiliensis* in mice: cross-protection against *Listeria monocytogenes*. Int Archs Allergy appl Immun 1978; 57: 74-81.
- Rico G, Ochoa R, Oliva A, González-Mendoza A, Walter SM, Ortiz-Ortiz L. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. J Immunol 1982; 129: 1688-1693.
- Beaman BL, Gershwin ME, Ahmed A, Scates SM, Deem R. Response of CBA/N X DBA/F₁ mice to *Nocardia asteroides*. Infect Immun 1982; 35: 111-116.
- Demm RL, Doughty FA, Beaman BL. Immunologically specific direct T lymphocyte mediated killing of *Nocardia asteroides*. J Immunol 1983; 130: 2401-2416.
- Salinas-Carmona MC, Torres-López E, Ramos E, Ramos AI, Licon-Trillo A, González-Spencer D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. Infect Immun 1999; 67: 2428-2432.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt Biochem 1976; 72: 248-254.
- Solis y Quintal W. Estudio preliminar de la respuesta inmune celular en pacientes con actinomicetoma. Tesis de Especialidad en Dermatología. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
- Drouhet E. Historical introduction: Evolution of knowledge of the fungi and mycoses from Hippocrates to the twenty-first century. In: Leslie Colier, Albert Balows, Max Sussman, eds. Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. 9th ed., Vol. 4. London, UK: Arnold, Ed. 1998: 3-42.

23. Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4 and IFN- γ producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells. *Cell* 1993; 75: 985-995.
24. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *J Immunol* 1993; 150: 5501-5510.
25. Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MFR, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KPWJ, Hussain R. Induction of Th1 cytokine response by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect Immun* 1996; 64: 4385-4389.
26. Moore KW, O'Garra A Ed., de Waal Malefyt R, Vieira P, Mossmann TR. Interleukin 10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-190.
27. Mentink MK, Mosser DM. The role of IL-10 promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001; 166: 1141-1147.
28. Trinchieri G. Interleukin-12 a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 251-276.
29. Leonard JW. Type I Cytokines and interferons and their receptors. In: *Fundamental Immunology*. 4th edn. Philadelphia, USA: Paul W. Ed. Lippincott-Raven, 1999: 741-774.
30. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996; 4: 471-481.
31. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH. Interferon- γ differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest* 1997; 99: 336-341.
32. Krakauer T, Vilecek J, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines. TNF and IL-1 families, chemokines, TGF- β , and others. In: *Fundamental immunology*. 4th edn. Philadelphia, USA: William E. Paul. Ed. Lippincott-Raven, 1999: 775-811.
33. Hay RH, Mahgoub ES, Leon G, Al-Sogair Welsh O. Mycetoma. *J Med Vet Mycol* 1992; 30(suppl 1): 41-49.
34. Wozel G, Barth J. Current aspects of mode of action of dapsone. *Int J Dermatol* 1988; 27: 547-552.
35. Méndez-Tovar LJ, Serrano-Jaén L, Almeida-Arvizu VM. Cefotaxima más amikacina asociadas a inmunomodulación en el tratamiento de actinomicetoma resistente a tratamiento convencional. *Gac Med Mex* 1999; 135: 517-521.

Address for correspondence: Luis J. Méndez Tovar, Apartado Postal A-032, C.S.P.I. Coahuila, CP 06703, México, D. F. Phone: 00 + 52-5627-6900 ext. 21480
E-mail: ljmt@servidor.unam.mx

Inmunoglobulinas en pacientes con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

L. J. MÉNDEZ-TOVAR¹, R. MONDRAGÓN-GONZÁLEZ¹, P. MANZANO-GAYOSSO², R. LÓPEZ-MARTÍNEZ², F. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ², A. BONIFAZ,³ A. ANIDES FONSECA⁴, J. ARAIZA³, F. VEGA-LÓPEZ⁵.

¹ Unidad de Investigación Médica en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, ² Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, ³ Laboratorio de Micología Médica, Servicio de Dermatología, Hospital General de México, SS, ⁴ Servicio de Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, ⁵ Dermatology Unit, Middlesex Hospital, London, UK.

*Correspondencia: E-mail: ljmt@servidor.unam.mx

RESUMEN

Considerando que algunos autores han reportado un aumento en la cantidad de algunas inmunoglobulinas en los pacientes con actinomicetoma, en este trabajo nos propusimos determinar diferencias en la producción de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM en 25 pacientes con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* y 25 personas sanas provenientes de una zona endémica de micetoma. La determinación de inmunoglobulinas se realizó por medio de la técnica de ELISA. Para sensibilizar las placas se emplearon 6 antígenos de *N. brasiliensis*: un antígeno crudo denominado NB y cinco derivados del mismo (NB2, NB4, NB6, NB8 y NB10) separados por punto isoeléctrico. Los niveles de las cuatro subclases de IgG fueron mayores en los sueros de los pacientes que en el suero de los controles, con una diferencia máxima en IgG3 e IgG4; para esta última subclase, los seis antígenos fueron altamente reactivos. La concentración de IgM fue igual en ambos grupos. Es probable que como ocurre en otras infecciones, en la fisiopatología del actinomicetoma influya no sólo el aumento o deficiencia de una clase de inmunoglobulina, sino la relación que existe entre las diferentes subclases.

Palabras clave: actinomicetoma, *Nocardia brasiliensis*, inmunoglobulinas.

SUMMARY

Immunoglobulins in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. Considering that some authors have reported an increasing of some immunoglobulins in actinomycetoma patients, in this study we propose to determine differential production of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgGM in 25 patients with actinomycetoma and 25 healthy individuals from a mycetoma endemic area. Immunoglobulins were determined by ELISA technique. To sensitize the plates, six *Nocardia brasiliensis* antigens were used: a crude antigen denominated NB and five derivatives (NB2, NB4, NB6, NB8 and NB10) obtained by their isoelectric point. Results showed that all IgG subclasses were higher in the patients' sera than in control sera, with a maximal difference to IgG3 and IgG4. To the latter subclass, six antigens were highly reactivos. IgM levels were similar in both groups. As it occurs in other infections, in the actinomycetoma pathogenesis probably participate the increase or deficiency of a determined immunoglobulin class, as well as the relationship between different subclasses.

Key words: actinomycetoma, *Nocardia brasiliensis*, immunoglobulins.

INTRODUCCIÓN

De manera general se acepta que la respuesta inmunológica es de suma importancia en la fisiopatología del micetoma; sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no son suficientes para definir los mecanismos de defensa y su participación en el desarrollo de la enfermedad. Los agentes etiológicos del micetoma pueden ser hongos o bacterias y las especies de cada grupo son numerosas: seis de Actinomicetales (1) y aproximadamente 31 especies de hongos (2). Debido al gran número de agentes y la variabilidad antigénica que existe entre ellos, los resultados de los estudios inmunoló-

gicos *in vitro* o *in vivo* realizados con uno o varios de los agentes no necesariamente son aplicables en todos ellos.

A nivel mundial, México es el país que tiene el mayor número de casos de actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis* (3, 4). Las primeras investigaciones de la inmunidad en pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis*, fueron realizadas por González-Ochoa *et al.* (5), quienes utilizaron la prueba de fijación de complemento y encontraron que los pacientes con títulos de anticuerpos elevados tenían mal pronóstico, mientras que los pacientes con respuesta positiva a antígenos aplicados por vía intradérmica y títulos bajos de anticuerpos presentaban una rápida curación.

En 1977 Mahgoub *et al.* (6) estudiaron la concentración sérica de IgG, IgM e IgA en un grupo de 22 pacientes con micetoma y 20 controles; encontraron mayor concentración de IgG en el suero de los controles que en el de los pacientes, mientras que en la IgM y en la IgA tuvieron concentraciones más elevadas en los pacientes. A pesar de tener altas concentraciones de IgM, esta inmunoglobulina parecía no tener un efecto protector en los pacientes, ya que éstos presentaban una progresión constante de la enfermedad. Los mismos autores publicaron que los títulos de anticuerpos fijadores de complemento y los anticuerpos precipitantes están elevados durante el micetoma activo y desaparecen con la curación (7).

En la década de los 70s, Natvig y Kunkel (8) publicaron una revisión sobre los isotipos de inmunoglobulinas y las subclases de cada una de ellas. Estos autores describieron la existencia de dos subclases de IgA (IgA α 1 e IgA α 2) y cuatro subclases de inmunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). La mayor parte de IgM se encuentra en forma de molécula pentamérica, aunque se pueden encontrar monómeros los cuales no se consideran subclases de la misma. En esa revisión, aunque los autores suponen que la existencia de subclases indicaba diversidad en la función de cada isotipo de inmunoglobulina, no describen asociaciones directas entre infecciones y subclases de estas moléculas.

Como resultado de las investigaciones que reportaron la existencia de subclases de inmunoglobulinas, en algunas patologías diseminadas o crónicas, es importante documentar el aumento o la disminución de las clases de anticuerpo y también determinar la subclase predominante o deficiente; así, personas que sufren infecciones frecuentes con bacterias capsuladas, generalmente presentan niveles séricos bajos de IgG2 (16). En la filarisis, Hussain R *et al.* (7) demostraron que la concentración de las subclases de IgG variaban de acuerdo a la evolución: IgG4 aumenta hasta 17 veces en los pacientes asintomáticos con microfilarias circulantes, comparados con los niveles correspondientes en pacientes con elefantiasis. En esta misma parasitosis, Atmadia *et al.* (1) encontraron que los niveles de IgG4 disminuían después del tratamiento, lo que podría indicar que los antígenos liberados por los parásitos ejercen un efecto inmunomodulador.

Los estudios en humanos demuestran que las subclases de IgG se producen en cantidades diferentes dependiendo del antígeno que induce la respuesta inmune; por ejemplo, antígenos polisacáridicos inducen preferentemente la síntesis de IgG1 e IgG2, mientras que los antígenos virales inducen IgG3 e IgG4 (9). En 1996 Nussbaum *et al.* (10) demostraron, en un modelo murino, que los anticuerpos de la subclase IgG3 originados contra un antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans* para el cual no son eficientes, impiden la unión al mismo epítipo de los anticuerpos de la subclase IgG1 que son

protectores contra la infección por este agente, estableciendo así una inhibición competitiva.

Hasta el momento, los estudios de las inmunoglobulinas en el micetoma se han enfocado a determinar la concentración total de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas por medio de técnicas de inmunoprecipitación utilizando antígenos crudos. Sin embargo, en el caso del actinomicetoma por *N. brasiliensis*, es probable que alguno o varios de los antígenos producidos por este actinomiceto induzcan la producción específica de alguna subclase de IgG que impida montar una respuesta protectora adecuada.

El objetivo de este estudio fue determinar los niveles séricos de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM en un grupo de pacientes con actinomicetoma causado por *N. brasiliensis* utilizando antígenos semipurificados y compararlos con los niveles de las mismas inmunoglobulinas de un grupo de individuos sanos procedentes de la misma zona endémica de micetoma que los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles

Se estudiaron 25 pacientes (6 mujeres y 19 hombres) con actinomicetoma sin tratamiento previo, en quienes por medio de examen directo, estudio histológico, cultivo y pruebas fisiológicas de las colonias desarrolladas, se determinó que el agente causal era *N. brasiliensis*; como grupo control, se estudiaron 25 personas adultas, aparentemente sanas, sin antecedentes de micetoma. Tanto los pacientes como los controles eran originarios del estado de Morelos, México.

Antígenos

El antígeno crudo de *N. brasiliensis* fue obtenido de la cepa 253 MM-UNAM, crecida en caldo dextrosa Sabouraud a 25 °C en agitación, durante 9 días (fase log). La masa bacteriana fue cosechada por filtración y sometida a 20 ciclos de agitación con perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro, de un minuto cada uno, en un homogenizador de tejidos (Biopsec®). El producto obtenido fue colocado en tubos de 50 ml y centrifugado a 10,000 g durante 60 minutos a 10 °C. El sobrenadante fue dializado contra agua destilada estéril durante 8 h; se determinó la concen-

Tabla 1. Concentración de proteínas y pH de los antígenos de *Nocardia brasiliensis** empleados

Antígeno	Proteína (μ g /100ml)	pH
NB	125	ND
NB2	30,1	2,79
NB4	68,95	3,94
NB6	83,00	5,37
NB8	27,70	6,25
NB10	18,80	6,87

* Los antígenos se obtuvieron de cultivos de 6 días de incubación (fase log de crecimiento), en caldo dextrosa Sabouraud, en agitación (80 rpm), a 20 °C
ND = no determinado

tración de proteínas por el método de Bradford (11) y se almacenó a 4 °C. De este material denominado antígeno crudo (NB), se obtuvieron 20 fracciones separadas de acuerdo a su punto isoeléctrico mediante un equipo Rotofor[®]. A cada una de ellas, se le determinó la concentración de proteínas. Se realizó un estudio preliminar (12) de proliferación *in vitro* utilizando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con actinomietoma empleando las 20 fracciones antigénicas. Los resultados mostraron que la proliferación celular fue mayor con las primeras diez fracciones, las mismas que mostraron la concentración de proteínas más elevada; al no encontrar diferencias significativas entre las fracciones pares e impares, para los estudios de inmunoglobulinas se eligieron las primeras y se denominaron NB2, NB4, NB6, NB8 y NB10 (Cuadro 1).

De cada sujeto de ambos grupos, se obtuvieron 5 ml de sangre periférica, se separó el suero y se determinaron los niveles de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM por la técnica de ELISA (13). Inicialmente se realizó una cinética para determinar la concentración óptima de los antígenos y la dilución de los sueros; el resultado de este estudio fue 10 µg/ml de antígeno y una dilución de 1:100 de suero. Las placas fueron sensibilizadas con los antígenos correspondientes y mantenidas a 4 °C durante toda la noche; se adicionó el suero y se incubó durante 1 h a 37 °C; posteriormente se agregó el conjugado (anticuerpo monoclonal murino Zymed Lab[™]) a una dilución de 1:1000. Las placas fueron reveladas con tetrametilbenzidina (Sigma) y se leyeron a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados fueron graficados utilizando promedio, mediana, percentil 25 y percentil 75. Para determinar la significancia de las diferencias entre ambos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (programa de SPSS v10[™]), considerando que cuando se trata de eventos biológicos de alta variabilidad, un valor $p \leq 0,05$ es estadísticamente significativo.

RESULTADOS

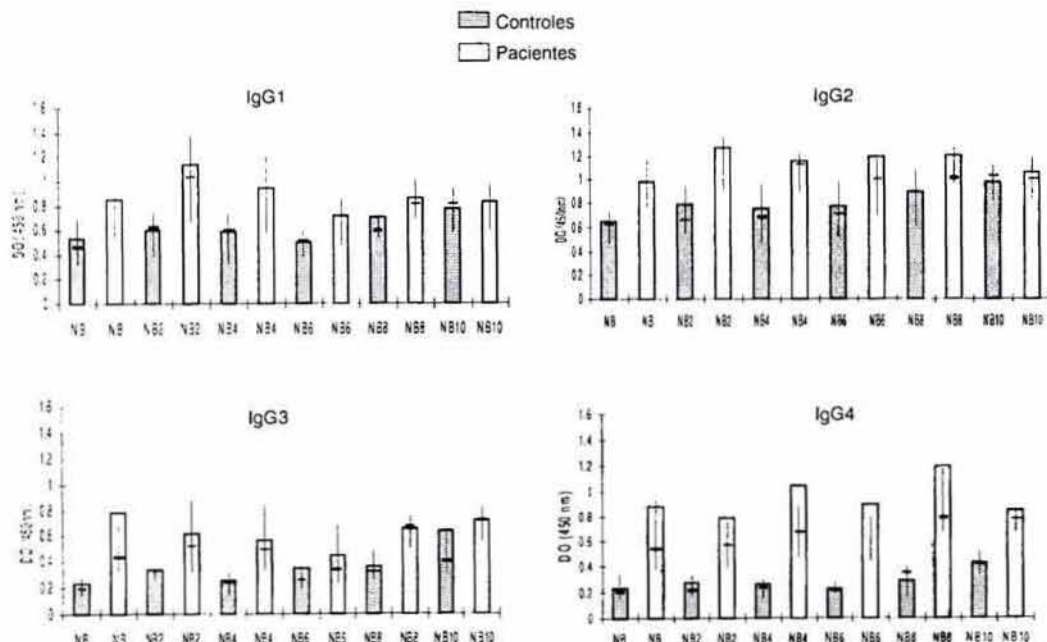
Como se observa en la Figura 1, todas las subclases de IgG se detectaron en mayor cantidad en el suero de los pacientes que en el suero de los controles con los seis antígenos probados.

Los niveles de IgG1 fueron mayores en los sueros de los pacientes con los cinco primeros antígenos (NB, NB2, NB4, NB6 y NB8) que en los sueros de los controles; con el antígeno NB10, no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p=0,861$).

En relación a IgG2, la diferencia entre ambos grupos fue variable. Las lecturas de inmunoglobulina contra NB2 fueron 60% más elevadas en suero de los pacientes que en los sueros de los controles. Con los antígenos NB6 y NB10, no se detectaron diferencias con significancia estadística ($p=0,076$ y $0,781$ respectivamente).

Excepto con NB6, los niveles de IgG3 fueron notablemente más elevados en los sueros de los pacientes comparados con los controles, sobre todo con NB y NB4 que tuvieron niveles superiores tres y dos veces respectivamente.

En el suero de los pacientes se observaron valores muy elevados de IgG4 en presencia de todos los antígenos cuyas lecturas fueron entre dos y cuatro veces superiores a los obtenidos en los controles. La prue-



• Nota: La barras corresponden al promedio de las muestras analizadas por triplicado; los extremos de las líneas verticales representan los percentiles 25 y 75, y las líneas horizontales indican la mediana.

Figura 1. Niveles de subclases de IgG en 25 pacientes con actinomietoma causado por *Nocardia brasiliensis* y 25 controles sanos

ba de U de Mann-Whitney dio un valor p de cero con todos los antígenos probados lo que indica una gran diferencia en ambos grupos.

Los niveles de IgM fueron semejantes entre pacientes y controles con la mayoría de antígenos: NB, NB2, NB4, NB10 cuyos valores de p , fueron mayores a 0,05; mientras que únicamente los antígenos NB6 y NB8 mostraron diferencias significativas entre pacientes y controles con un valor $p = 0,008$ en ambos casos.

DISCUSIÓN

La determinación de títulos o concentración sérica de las inmunoglobulinas históricamente ha sido muy útil como herramienta de diagnóstico y/o pronóstico de muchas enfermedades infecciosas micóticas o bacterianas; por ejemplo, en la histoplasmosis y coccidioidomicosis desde hace algunas décadas se sabe que el aumento constante de inmunoglobulina G se asocia con diseminación de la enfermedad (14). Cole *et al.* en 1988 (15), reportaron el aislamiento de una glucoproteína de la pared de las esférulas de *Coccidioides immitis* que estimula la respuesta de tipo Th2, con elevadas concentraciones de inmunoglobulinas en pacientes, induciendo así una respuesta inmune celular deficiente. En las infecciones diseminadas y crónicas causadas por bacterias como *Mycobacterium leprae*, y *M. tuberculosis*, los pacientes también presentan una respuesta tipo Th2 con predominio de IL-4, IL-10 (16) con elevados títulos de inmunoglobulinas las cuales no tienen efecto protector.

Como resultado de las investigaciones que reportaron la existencia de subclases de inmunoglobulinas, en algunas patologías diseminadas o crónicas, es importante documentar el aumento o la disminución de las clases de anticuerpo y también determinar la subclase predominante o deficiente; así, personas que sufren infecciones frecuentes con bacterias capsuladas, generalmente presentan niveles séricos bajos de IgG2 (17). En la filarisis, Hussain R *et al.* (18) demostraron que la concentración de las subclases de IgG variaban de acuerdo a la evolución: IgG4 aumenta hasta 17 veces en los pacientes asintomáticos con microfilarias circulantes, comparados con los niveles correspondientes en pacientes con elefantiasis. En esta misma parasitosis, Armadja *et al.* [19] encontraron que los niveles de IgG4 disminuían después del tratamiento, lo que podría indicar que los antígenos liberados por los parásitos ejercen un efecto inmunomodulador.

Recientemente Singhvi *et al.* (20) estudiaron la concentración de IgM, IgG e IgA en suero de pacientes con actinomicetoma causado por *Actinomyces madurae*, *A. pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*, y eumicetoma causado por *Madurella mycetomatis*. En los micetomas causados por *M. mycetomatis* y por *A. pelletieri* se produce un aumento estadísticamente significativo de estas

inmunoglobulinas, mientras que los títulos en los pacientes afectados por *A. madurae* y *S. somaliensis* son iguales a los del grupo control.

El aumento en los niveles de inmunoglobulinas agrava la evolución del micetoma, hecho demostrado por Ximenez *et al.* (21), en animales de experimentación, al administrarles inmunoglobulinas por vía parenteral. Salinas-Carmona *et al.* (22), demostraron que los ratones inoculados experimentalmente con agentes de micetoma, presentan un incremento constante de inmunoglobulinas, principalmente de IgG a partir del día 14 post infección, sin que se presentara una mejoría de la patología asociada a ese incremento.

En este estudio, se demuestra que todas las subclases de inmunoglobulina G están aumentadas en los pacientes con actinomicetoma. Aunque se buscaba encontrar diferencias de respuesta utilizando diferentes antígenos citoplasmáticos semipurificados o antígeno crudo con concentraciones variables de proteínas, no se documentaron diferencias constantes atribuibles especialmente a alguno de ellos.

Es un hecho referido por varios autores que el micetoma es más grave en aquellos pacientes con aumento de inmunoglobulinas, el presente estudio muestra que las diferencias son principalmente en relación a IgG ya que la IgM dio valores sin diferencia significativa en ambos grupos.

Los resultados muestran que como ocurre en otras patologías, no solamente es importante conocer los títulos de isotipos de las inmunoglobulinas de manera general, sino que, el exceso de algunas subclases como IgG3 o IgG4 demostradas en el presente estudio pudiera interferir con la unión de las fracciones del complemento e impedir la destrucción de los agentes en los tejidos favoreciendo la progresión de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boiron P, Locci R, Goodfellow M, Gumaa SA, Isik K, Kim B, McNeil MM, Salinas-Carmona MC, Shojaei H (1998) *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma. *Med. Mycol.* 36 (suppl 1): 26-37.
2. McGinnis MR (1996) Mycetoma. *Dermatol. Clin.* 14: 97-104.
3. Buot G, Lavalley P, Mariat F, Suchil P (1987) Étude épidémiologique des mycétomes au Mexique. A propos de 502 cas. *Bull. Soc. Path. Exot.* 80: 329-335.
4. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavalley P, Welsh O, Saúl A, Macotela-Ruiz E (1992) Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gac. Med. Mex.* 128: 477-481.
5. González-Ochoa A, Shibayama H, Félix D, Anaya M (1962) Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Proceedings of XII International Congress of Dermatology*, p. 542-551, Washington D.C. USA.
6. Mahgoub ES, Gumma SA, El Hassan AM (1977) Immunological status of mycetoma patients. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 70: 48-53.
7. Mahgoub ES (1975) Serological diagnosis of mycetoma. *Mycoses: Pan Am Health Organization*, Washington DC. 304: 154-161.

8. Natvig JB, Kunkel HG (1973) Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Adv. Immunol.* 16: 1-59.
9. Papadea C, Check IJ (1989) Human IgG and IgG subclasses: biochemical, genetic and clinical aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 27: 27-58.
10. Nussbaum G, Yuan R, Cassadevall A, Scharff MI (1996) Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 183: 1905-1909.
11. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
12. Solís y Quintal W. Estudio preliminar de la respuesta inmune celular en pacientes con actinomicetoma. Tesis de Especialidad en Dermatología, UNAM, México. 1998.
13. Voller A, Bidwell D, Bartlett A (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay. En: Rose NR, Friedman H (2^o Edition), *Manual of Clinical Immunology*, Washington DC, p. 359-371.
14. Smith CE, Saito MT, Simons SA (1956) Pattern of 39500 serologic tests in coccidioidomycosis. *J.A.M.A.* 160: 546-552.
15. Cole GT, Seshan KR, Franco M, Bukownik E, Sun SH, Hearn VM (1988) Isolation and morphology of an immunoreactive outer wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 56: 2686-2694.
16. Modlin RL (1994) Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol.* 102: 828-832.
17. Scott MG, Briles DE, Nahm NH (1990) Selective IgG subclass expression: biologic, clinical and functional aspects. En Shakib F (Ed), *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Oxford, Pergamon Press, p. 161-183.
18. Hussain R, Grögl M, Ottesen EA (1987) IgG antibody subclasses in human filariasis. *J. Immunol.* 139: 2794-2798.
19. Atmadja AK, Atkinson R, Sartono E, Partono F, Yazdankhsh M, Maizels MR (1995) Differential decline in filaria-specific IgG1, IgG4, and IgE antibodies in *Brugia malayi*-infected patients after diethylcarbamazine chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 172: 1567-1572.
20. Singhvi A, Joshi KR, Sharma JC, Vyas MC (1996) Immunoglobulin profile in mycetoma. *Indian. J. Pathol. Microbiol.* 39: 203-206.
21. Ximenez C, Melendro EI, González-Mendoza A, García MA, Martínez A, Ortiz-Ortiz L (1980) Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathologia* 70: 117-122.
22. Salinas-Carmona M, Torres-López E, Ramos AI, Licon-Trillo A, González-Spencer D (1999) Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 67: 2428-2432.

Recibido 4/2/2004 -- Aceptado 22/11/2004