



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN  
ULTRAESTRUCTURAL DE MANOSA Y  
GALACTOSA EN LA PARED CELULAR DE  
*Nocardia brasiliensis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LAURA VERÓNICA JASSO ESCUTIA

TUTORA

DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, 2009



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.

## Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno Jasso Escutia Laura Verónica 12855363 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 30109573-6
2. Datos del tutor Dra Francisca Hernández Hernández
3. Datos del sinodal 1 M en C María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso
4. Datos del sinodal 2 Dr Armando Pérez Torres
5. Datos del sinodal 3 Dr Ricardo Lascurain Ledesma
6. Datos del sinodal 4 Biól Elva Bazán Mora
7. Datos del trabajo escrito Identificación y distribución ultraestructural de manosa y galactosa en la pared celular de <i>Nocardia brasiliensis</i> 48 pp 2009

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Jefe del laboratorio Dr. Rubén López Martínez.

Instituciones que colaboraron:

Laboratorio de Inmunología Comparada de Piel y Mucosas del Departamento de Biología celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

Departamento de Bioquímica, Unidad de Investigación, INER.

Unidad de investigación Médica en Dermatología y Micología del Hospital de Especialidades, Centro Médico nacional, Siglo XXI.

A mis padres, Raquel Escutia Orta y

Miguel Ángel Jasso Padilla

A mi abuelo, Carlos Escutia Ortega

A Alfredo

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo que me brindaron en el Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, especialmente al Dr. Rubén López Martínez por permitirme trabajar en su laboratorio. A mi asesora de tesis la Dra. Francisca Hernández Hernández por apoyarme en todo momento, por sus consejos, por motivarme tanto, por hacerme tener interés en la investigación y sobre todo por ser tan buena persona conmigo, muchas gracias.

Al Dr. Armando Pérez Torres por ser un apoyo indispensable para la realización de este trabajo, gracias por tus consejos, por la paciencia y por el conocimiento que me otorgaste al haber trabajado contigo. Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma por su aportación en este trabajo, por los consejos siempre acertados y por revisar mi tesis.

A la Dra. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso por estar siempre al pendiente de este trabajo y por revisarlo.

A la Biól. Elva Bazán Mora y la Biól. Blanca Edith Millán Chiu por tener el interés, la paciencia y las ganas de ayudarme para que me titule, muchas gracias. Al Dr. Luis Javier Méndez Tovar por permitirme trabajar en su laboratorio.

Agradezco a mis papás Raquel y Miguel por permitirme estudiar una carrera, por apoyarme siempre monetariamente, por ser un ejemplo a seguir y por ser lo que más quiero en esta vida, los amo. A mi abuelo, que siempre me enseñó que el conocimiento no tiene fin, te quiero abue. Gracias también a mi tío Luis por el apoyo en esos momentos difíciles y a toda mi familia.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias por los momentos tan especiales que pasamos juntos, a Damaris, Eugenia, Pável, Caro, Muffin, Bere, Claudia etc.,

A todas las mujeres del laboratorio, Erika, Elva, Blanca, Rocio, Rosita y Elda por escucharme siempre, por los momentos tan chistosos que pasamos y por la buena vibra que me siempre me brindan, muchas gracias. Gracias Elda por hacerme pasar siempre ratos chistosos en el lab y por apoyarme siempre en todo lo que hago, muchas gracias amiga.

Y por último y no menos importante, quiero agradecer a Alfredo por ser parte de mi vida, por todo el cariño y amor que me das siempre, por apoyarme en todo, por ayudarme a encontrarme, por no dejarme caer, por ser tan divertido y respetuoso y principalmente por ser mi mejor amigo y mi hermano, gracias por estar en mi vida, te amo.

<b>I) INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Micetoma	3
1.2. <i>Nocardia brasiliensis</i>	4
1.2.1. Taxonomía	4
1.2.2. Características de <i>N. brasiliensis</i>	4
1.3. Pared celular bacteriana	5
1.4. Pared celular en los Actinomicetos	7
1.5. Lectinas	11
<b>II) ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
2.1. Conocimiento actual de la composición y estructura de la pared celular de algunos actinomicetos de importancia médica.	12
<b>III) JUSTIFICACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>IV) HIPOTESIS</b>	<b>14</b>
<b>V) OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
<b>VI) METODOLOGÍA</b>	<b>14</b>
6.1. Cepas de Actinomicetos	14
6.2. Tipificación morfológica y bioquímica del aislado clínico FM825.	15
6.3. Curva de crecimiento	16
6.4. Selección de lectinas biotiniladas útiles para el marcaje de azúcares en <i>N. brasiliensis</i> .	17
6.5. Preparación de muestras para cortes de <i>N. brasiliensis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	18
6.5.1. Recolección de cultivo bacteriano en diferentes fases de crecimiento	18
6.5.2. Fijación de muestras	18
6.5.3. Inclusión en resina LR-White	18
6.6. Técnica de histoquímica con lectinas biotiniladas con estreptavidina-oro para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de <i>N. brasiliensis</i>	19
6.7. Bloqueo de la biotina en cortes de <i>N. brasiliensis</i> y <i>M. tuberculosis</i> .	19
6.8. Control para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de <i>N. brasiliensis</i> .	20
6.9. Análisis estadísticos	21
<b>VII) RESULTADOS</b>	<b>22</b>
7.1. Tipificación morfológica y bioquímica del aislado clínico FM825.	22
7.2. Curva de crecimiento	24
7.3. Selección de lectinas biotiniladas útiles para el marcaje de azúcares en <i>N. brasiliensis</i> .	24
7.4. Bloqueo de la biotina en cortes de <i>N. brasiliensis</i> y <i>M. tuberculosis</i> .	26
7.5. Aspecto ultraestructural de <i>M. tuberculosis</i> .	26
7.6. Control positivo y negativo de manosa y galactosa por medio de la saturación de sitios receptivos con D-manosa y D-galactosa.	27
7.7. Técnica de histoquímica con lectinas biotiniladas con estreptavidina-oro para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de <i>N. brasiliensis</i> .	30
7.7.1. Aspecto ultraestructural de <i>N. brasiliensis</i>	30
7.7.2. Localización ultraestructural de manosa y galactosa en la pared celular de <i>N. brasiliensis</i> .	33
7.8. Análisis estadísticos	37
<b>VIII) DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>IX) CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>X) PERSPECTIVAS</b>	<b>44</b>

**XI) REFERENCIAS**

## I) INTRODUCCIÓN

### 1.1. Micetoma

El micetoma es una infección subcutánea que depende de la inoculación traumática exógena de hongos (Eumicetoma) o actinomicetos aerobios (Actinomicetoma) cuyos agentes causales se introducen al tejido del hospedero principalmente en miembros inferiores aunque también puede presentarse en cualquier región del cuerpo. <sup>(2)</sup> Además de este evento existen otros factores que favorecen la enfermedad, como el estado nutricional deficiente, la incapacidad del hospedero para generar una respuesta inmune adecuada y la exposición continua al microorganismo. <sup>(33)</sup> Clínicamente se manifiesta por el aumento de volumen relativamente indoloro de la región afectada, acompañado de fístulas que drenan un material purulento o hemato-purulento, el cual contiene granos constituidos por microcolonias del agente etiológico. <sup>(33)</sup> Este padecimiento afecta a personas en edades que van desde los 3 hasta los 80 años; con mayor frecuencia se presenta en hombres que en mujeres con una relación de 3:1 respectivamente. Los campesinos son el grupo ocupacional que más está expuesto a contraer la enfermedad ya que se encuentran en contacto directo con la tierra de donde las bacterias u hongos causales pueden ser aislados con facilidad. <sup>(42)</sup>

Existen estudios que sitúan geográficamente al micetoma en el cinturón intertropical del planeta que abarca regiones templadas (entre los paralelos 14 y 32), principalmente en India, Sudán, Senegal, Somalia, México, Venezuela y Brasil. <sup>(52)</sup> México es uno de los países en los que existe un mayor número de casos de actinomicetoma (98%), <sup>(26,52)</sup> en dónde prácticamente se han descrito casos en todos los estados, predominando en Jalisco, Nuevo León, Morelos, San Luis Potosí, Guerrero, entre otros. <sup>(39)</sup>

*Nocardia brasiliensis* es el principal agente responsable del actinomicetoma en México (87%). <sup>(42)</sup>

## 1.2. *Nocardia brasiliensis*

### 1.2.1. Taxonomía

El mundo de los organismos vivos está compuesto por tres grandes dominios: Archaea, Eukarya y Bacteria. Taxonómicamente *N. brasiliensis* pertenece al dominio Bacteria, orden Actinomycetales y familia Nocardiaceae.<sup>(34)</sup>

La primera descripción del género *Nocardia* fue descrita por Edmon Nocard en 1888 a partir de un caso de linfadenitis bovino. Un año después, Trevisan describió y nombró a *N. farcinica*, la cual fue considerada como la especie tipo del género. Años más tarde Gordon y Mihm encontraron que la cepa inicialmente descubierta por Nocard era idéntica fenotípicamente a *N. asteroides*, por lo que *N. farcinica* se consideró posteriormente como una sinonimia de *N. asteroides*.<sup>(14)</sup>

La especie *N. brasiliensis* fue descrita por Lindenberg en 1909 como *Discomyces brasiliensis*. A principios del siglo pasado la literatura incluía varios sinónimos para esta especie, algunos de ellos fueron *Streptothrix brasiliensis*, *Oospora brasiliensis*, *Actinomyces brasiliensis* y *A. violaceus* subsp. *brasiliensis*.<sup>(14)</sup>

### 1.2.2. Características de *N. brasiliensis*

El orden al cual pertenece *N. brasiliensis* es un grupo muy grande de bacterias que vive en múltiples hábitats naturales y en tierras de cultivo donde juegan un papel importante en el reciclaje de nutrientes.<sup>(29)</sup> Muchos de estos organismos son saprófitos y algunos forman asociaciones parasitarias o mutualistas con algunas plantas y animales. Los actinomicetos se caracterizan por formar filamentos ramificados y algunos son responsables de causar enfermedades graves como la tuberculosis, lepra, nocardiosis y micetoma.<sup>(52)</sup>

Macroscópicamente *N. brasiliensis* forma colonias de aspecto céreo, superficie plegada, con tendencia a formar micelio aéreo, mientras la colonia envejece. Presenta

coloraciones que van desde los tonos blancos hasta los tonos anaranjados. Es una bacteria aerobia, parcialmente ácido alcohol resistente, Gram positiva, que se caracteriza por formar estructuras microscópicas bacilares, filamentos únicos o ramificados de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, además de estructuras cocoides irregulares. <sup>(52)</sup> Es una bacteria intracelular facultativa que puede vivir y multiplicarse dentro de los macrófagos del huésped infectado pero de igual manera crece extracelularmente en medio de cultivo. <sup>(51)</sup>

Para la identificación de la especie se realizan diversas pruebas fisiológicas en las que *N. brasiliensis* es positiva en el crecimiento en gelatina, hidrólisis de gelatina, descomposición de caseína, tirosina e hipoxantina, y negativa en la descomposición de xantina (Cuadro 1). <sup>(11)</sup> Sus rangos de temperatura de crecimiento se encuentran entre los 10 y 45°C, con un pH entre 6.0 y 9.0, además de crecer bien en cloruro de sodio al 5%. <sup>(52)</sup>

Actinomiceto	Crecimiento en gelatina	Hidrólisis de la gelatina	Descomposición de			
			Caseína	Xantina	Tirosina	Hipoxantina
<i>N. brasiliensis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>N. asteroides</i>	-	-	-	-	-	-
<i>N. caviae</i>	-	-	-	+	-	+
<i>Actinomadura madurae</i>	NU	+	+	-	+	+
<i>A. pelletieri</i>	NU	+	+	-	+	+
<i>Streptomyces somaliensis</i>	NU	+	+	-	+	-

**Cuadro 1.** Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de la cepa FM825. NU. No utilizado. Modificado de Arenas, 2005. <sup>(2)</sup>

### 1.3. Pared celular bacteriana

De acuerdo a la composición de la pared celular, las bacterias se clasifican en Gram positivas y Gram negativas. En 1884 Christian Gram desarrolló la técnica de tinción que lleva su nombre la cual consiste en el tratamiento de las bacterias con cristales de violeta seguido de lugol, con el cual se forma un complejo insoluble. Para decolorar las células bacterianas se utilizan solventes orgánicos como alcohol-acetona. Finalmente, las bacterias son tratadas con

un colorante de contraste llamado safranina. La capacidad de las bacterias para resistir la decoloración se debe a las cadenas de azúcares que forman el peptidoglucano. Por esta razón, en las bacterias Gram negativas que poseen una capa delgada de peptidoglucano y una doble bicapa lipídica, el alcohol-acetona solubiliza la membrana externa y por lo tanto no retiene los cristales de violeta, dando como resultado una coloración rojiza por efecto de la safranina. Por otro lado, las bacterias Gram positivas poseen una bicapa lipídica, además de una gruesa capa de peptidoglucano, por lo que no son susceptibles a la acción del alcohol acetona, la cual deshidrata y cierra los poros de la pared celular, lo que impide que escape el complejo cristal violeta-lugol, dando como resultado una coloración violeta. <sup>(43)</sup>

El peptidoglucano es una cadena de azúcares de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$  1-4. Anclado al ácido N-acetilmurámico se encuentra el tetrapéptido del glucano que está formado por aminoácidos suplementarios como L-alanina, D-glutámico, D-alanina y lisina, formando un entramado que les confiere cierta rigidez a las bacterias. <sup>(43)</sup>

El ácido teicoico de las bacterias Gram positivas está compuesto por unidades de glicerol y ribitol unidos por grupos fosfato. Por otro lado, los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, que intervienen en el reconocimiento celular son glucolípidos anfipáticos complejos, divididos de acuerdo a su estructura en tres dominios: i) el lípido A, ii) el núcleo oligosacárido y iii) el antígeno O. El lípido A está constituido de un disacárido al que están unidos ácidos grasos, los cuales anclan las moléculas de lipopolisacáridos a la membrana externa. Una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A constituye el núcleo oligosacárido. Por último, el antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos repetidos muy variables. <sup>(45)</sup>

Algunas bacterias como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia* contienen cadenas de lípidos, polisacáridos y proteínas que le confieren cierta impermeabilidad a la pared celular.

<sup>(20)</sup> Debido a estos compuestos lipídicos, en algunas ocasiones la tinción de Gram no es útil para la determinación bacteriana, por lo que se utiliza la tinción de ácido alcohol resistencia desarrollada por Paul Ehrlich en 1882. Esta tinción consiste en la coloración primaria con una mezcla de fucsina y fenol; éste favorece la penetración de la fucsina en los lípidos de la pared celular de las bacterias ácido-alcohol resistentes. Posteriormente, las bacterias son decoloradas con una mezcla de ácido-alcohol. Por último se tiñen con azul de metileno para contrastar el resultado de la tinción. El fundamento de esta prueba está basado en la presencia de ácidos micólicos en la superficie celular de las bacterias, los cuales reaccionan con la fucsina por medio de su grupo carboxilo. Debido a esta característica las bacterias no pueden ser decoloradas con ácido alcohol. Por lo tanto, las bacterias ácido-alcohol resistentes permanecen magenta debido a la coloración primaria, y las bacterias que no son ácido-alcohol resistentes se tiñen de azul debido al colorante de contraste. <sup>(43)</sup>

#### **1.4. Pared celular en los Actinomicetos**

Experimentalmente se ha demostrado que la composición de la paredes celulares de los actinomicetos están altamente relacionadas. <sup>(57)</sup> Existen siete diferentes tipos de pared celular de acuerdo a los aminoácidos diaminados, los tipos azúcares y de peptidoglucano. Los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* presentan una pared de tipo IV con ácido diaminopimélico,  $\alpha$ -L-lisina,  $\beta$ -L-ornitina, arabinosa y galactosa. <sup>(38)</sup>

La inmunogenicidad de la pared celular de los actinomicetos es un factor determinante para su supervivencia dentro del hospedero. <sup>(57)</sup> La pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, *N. asteroides* y otros actinomicetos ha sido estudiada ampliamente; sin embargo, no existen estudios específicos acerca de la composición de la pared celular de *N. brasiliensis*.

La pared celular de los actinomicetos es muy compleja ya que contienen una serie de moléculas que le dan a la bacteria cierta protección ante el ataque de su hospedero. Los compuestos principales de la pared celular de los actinomicetos son: <sup>(10,12)</sup>

- i) Peptidoglucano
- ii) Arabinogalactana
- iii) Ácidos Micólicos
- iv) Azúcares de superficie celular

i) El peptidoglucano rodea a la membrana plasmática y le confiere rigidez a la pared celular. Este compuesto por varias cadenas de los azúcares ácido N-glicolilmurámico y N-acetilglucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4. En el ácido N-glicolilmurámico se encuentra anclado el tetrapéptido del glucano, formado por los aminoácidos suplementarios L-alanina, ácido D-glutámico, D-alanina y ácido diaminopimélico. El peptidoglucano es el componente que está en menor contacto con el exterior. <sup>(4)</sup>

ii) En 1973 Azuma y colaboradores <sup>(5)</sup> describieron a la arabinogalactana como un polisacárido ramificado formado por subunidades  $\beta$  1-4 galactopiranosas y  $\alpha$  1-5 arabinofuranosas. Aproximadamente un residuo de cada 10 arabinosas está esterificado a un ácido micólico por medio del hidroxilo 5' de la arabinosa terminal.

iii) Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$  ramificados,  $\beta$ -hidroxilados, cuya cadena principal acíclica posee de 0 a 6 enlaces dobles, según sea la especie de Actinomiceto y 44 a 60 átomos de carbono. Los ácidos micólicos polinsaturados (con dos dobles ligaduras), con cadenas hidrocarbonadas largas se encuentran con mayor frecuencia en la fase logarítmica de crecimiento de *Nocardia*. Durante la fase estacionaria se encuentran ácidos micólicos saturados y de cadena más corta. El ácido micólico de 54 carbonos y tres dobles enlaces, está asociado a la virulencia de *N. asteroides* y posiblemente esté relacionado con la especie *N. brasiliensis*. <sup>(4)</sup>

iv) Los carbohidratos son compuestos orgánicos que contienen moléculas de carbono, hidrógeno y oxígeno. <sup>(43)</sup> Se pueden clasificar en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos son azúcares simples formados por carbono, hidrógeno y oxígeno. <sup>(35)</sup> Existen diversos tipos de monosacáridos como la glucosa, manosa, fucosa, galactosa, fructosa, etc. <sup>(44,35)</sup>

Los disacáridos están formados por dos monosacáridos unidos por un enlace glicosídico. Dentro de estos se encuentra la sucrosa, la lactosa y la trehalosa. Los polisacáridos son polímeros de azúcares unidos por enlaces glicosídicos; ejemplos de estos tipos de azúcares son la celulosa, glucógeno y el almidón. <sup>(35)</sup>

En los microorganismos los carbohidratos son importantes en su interacción con las células del sistema inmune de su hospedero. Se ha demostrado que existen receptores glicosídicos que les confiere a los microorganismos resistencia a agentes microbicidas, como la protección de lisis por complemento. <sup>(23)</sup>

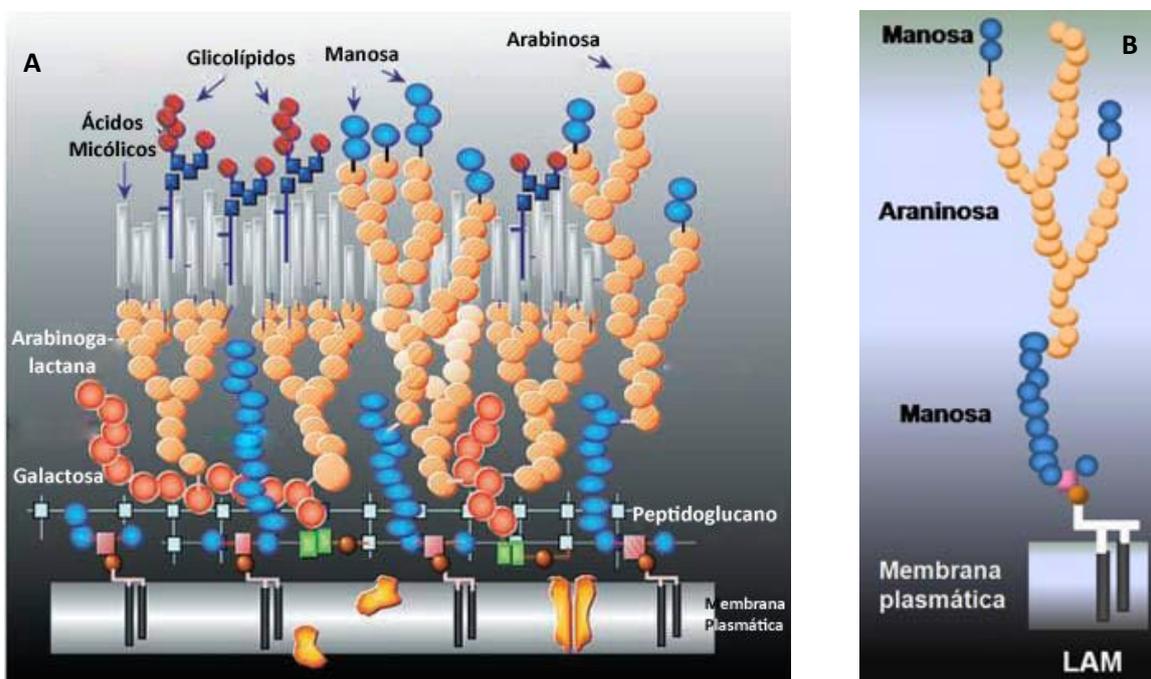
En *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* se ha reportado la presencia del factor cuerda ó 6, 6' dimicolato de trehalosa, formado por peptidoglucano, arabinogalactana y ácidos micólicos. <sup>(30,57)</sup> La presencia de la trehalosa en la pared celular de estos microorganismos es una característica clave para la supervivencia en las células del hospedero, ya que esta molécula inhibe la fusión inducida por calcio en vesículas fosfolipídicas, permitiendo al bacilo alojarse en el macrófago y reproducirse. <sup>(57)</sup>

Otro componente glicosídico importante en la pared celular de las micobacterias es la lipoarabinomanana (LAM), la cual consta de ramificaciones de arabinosa y manosa que se extienden desde la membrana plasmática de la bacteria hasta la superficie celular de ésta (Fig. 1 B). <sup>(12)</sup> LAM está constituido por un núcleo sacárido central común para todas las especies de *Mycobacterium* compuesto por unidades repetidas de D-manana y D-arabinana; este núcleo sacárido se encuentra unido a una molécula de fosfatidil mio-inositol. Algunos residuos del

núcleo sacárido están ramificados formando dominios terminales conocidos como “capping motif” que se asocian con la virulencia de esta bacteria. <sup>(60)</sup>

Existen dos tipos de LAM, una de ellas con residuos de manosa llamada ManLAM que está asociada a especies de micobacterias patógenas, ya que puede estimular o no la fagocitosis por la interacción con el receptor de las células del hospedero, y por lo tanto sobrevivir dentro del macrófago. El segundo es AraLAM, el cual consta de una molécula de fosfatidil inositol (PI) y de arabinosa, asociada a micobacterias no patógenas. Esta estructura evoca a un gran número de mecanismos microbicidas en los macrófagos como citocinas, TNF e interleucinas 1a, 1b, 6 y 10. <sup>(12,30)</sup>

De manera general los compuestos principales de la pared celular de los actinomicetos se esquematizan en la Fig. 1.



**Fig. 1. A.** Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. **B.** Lipoarabinomanana. Modificado de Chatterjee & Khoo, 2001. <sup>(16)</sup>

## 1.5. Lectinas

El estudio de las interacciones carbohidrato-proteína ha originado la creación de nuevas disciplinas como la glicobiología, que se encarga del estudio de la estructura y función de los carbohidratos. <sup>(28)</sup> El estudio de los carbohidratos en las superficies celulares es una herramienta muy útil para la comprensión de las interacciones entre las células del sistema inmune del hospedero y las células de los agentes infecciosos que atacan al humano.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que se encuentran ampliamente distribuidas en diversos organismos como plantas, animales, bacterias, virus y hongos. <sup>(28)</sup> Reconocen específicamente a carbohidratos de superficie celular o en suspensión; aglutinan células y precipitan glicoconjugados. Las lectinas poseen por lo menos dos sitios de unión a carbohidratos: el primero de ellos propicia una unión específica y el segundo induce una unión a un glicoconjugado. Estas glicoproteínas no poseen actividad enzimática. Existen cinco tipos de lectinas que se clasifican de acuerdo al monosacárido para el cual presentan mayor afinidad: i) lectinas con afinidad a manosa; ii) lectinas con afinidad a galactosa o N-acetilgalactosamina; iii) lectinas con afinidad a N-acetilglucosamina; iv) lectinas con afinidad a fucosa y v) lectinas con afinidad al ácido N-acetilneuramínico. <sup>(55)</sup>

Los dominios de reconocimiento en las lectinas se dividen en dos grupos: i) sitio en donde se une la lectina a un monosacárido y ii) sitio extendido en donde se une la lectina a un oligosacárido más complejo. Por ejemplo, la lectina Concanavalina A (Con-A) reconoce un monosacárido central de manosa en una conformación, mientras que la lectina Lens culinaris (LCA) reconoce un monosacárido central de manosa pero como un oligosacárido complejo en diferente conformación. La importancia de las lectinas en muchas investigaciones radica en su contribución al conocimiento de algunos procesos de la respuesta inmune y fenómenos asociados como la inmunosupresión. <sup>(31)</sup>

## II) ANTECEDENTES

### 2.1. Conocimiento actual de la composición y estructura de la pared celular de algunos actinomicetos de importancia médica.

La pared celular parece ser el tema principal en el estudio de estos organismos debido a su diferente composición respecto a otras bacterias y en consecuencia a su contribución en la fisiopatología de las enfermedades que producen, particularmente en los humanos. Además, el conocimiento de estos componentes es esencial en el ámbito farmacéutico para el diseño de nuevos fármacos que contribuyan a reducir la incidencia de las enfermedades asociadas a estas bacterias. Los siguientes datos (Cuadro 2) son un resumen de algunas de las contribuciones más relevantes al estudio de la pared celular en organismos relacionados con *N. brasiliensis*.

**Cuadro 2.** Contribuciones relevantes al estudio de la pared celular en organismos relacionados con *N. brasiliensis*

Referencia	Especie estudiada	Contribuciones
(62)	<i>N. asteroides</i> <i>N. brasiliensis</i>	Describen galactosa, manosa y arabinosa en extractos celulares
(37)	Actinomicetales	La pared celular de <i>Nocardia</i> esta constituida por 70 % de carbohidratos como galactosa, ácido murámico, glucosa, glucosamina, arabinosa y rhamnosa.
(5)	<i>Mycobacterium lepraemurium</i>	5 unidades de pared celular: Arabinosa-micolato, ácidos micólicos, arabinogalactana (arabinosa y galactosa), disacáridos y tetrapéptidos.
(6)	<i>N. asteroides</i>	La arabinosa aumenta, mientras que la galactosa decrece durante el crecimiento
(9)	<i>N. asteroides</i>	Ácidos micólicos responsables de la virulencia. La fase logarítmica contiene largas cadenas de ácidos micólicos mientras que la fase estacionaria contiene cadenas más cortas.
(39)	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Los antígenos de superficie "glucolípidos" han sido estudiados con el propósito de identificar spp y sub spp.
(10,36,57)	<i>N. asteroides</i> <i>Nocardia</i> <i>M. tuberculosis</i>	La inhibición de la formación del fagolisosoma fue atribuida al factor cuerda ( $\alpha,\alpha$ - trehalosa 6,6'-dimicolato) en <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> y <i>Corynebacterium</i> .

(1,15,30,60,61)	<i>M. tuberculosis</i>	LAM aislado de cepas virulentas y no virulentas difiere en la capacidad de inducir la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF).
(12,53,60)	<i>Mycobacteria</i>	AraLAM evoca un gran número de citocinas asociadas con los macrófagos, como el (TNF), interleucinas 1a, 1b, 6 y 10, sin embargo ManLAM, puede estimular la fagocitosis por la interacción con los receptores del hospedero sobreviviendo dentro del macrófago del hospedero sin que lo opsonice.
(3,13,23,24,25,53,58,61)	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> se une directamente al macrófago por medio de los receptores del complemento y por receptores de manosa. La fagocitosis por macrófagos puede ser sustancialmente inhibida por manana soluble, manosa-albumina y anticuerpos anti-receptores de manosa.
(23)	<i>M. tuberculosis</i>	No hay evidencia de que los polisacáridos estén covalentemente ligados a la superficie celular. Además de LAM, la arabinomanana no acilada y el fosfatidil inositol manosidasa se pueden unir al receptor de manosa en las células del hospedero.
(24)	<i>M. tuberculosis</i>	LAM esta presente de manera abundante en la zona periférica de las mycobacterias. La expresión del receptor de manosa esta regulada por Interferón Gamma (IFN- $\gamma$ ) y puede mediar la liberación de LAM a compartimientos endocíticos que contienen CD1b, por medio del cual facilitan la presentación de ácidos micólicos y lipoglicanos a células T.
(3,30)	<i>M. tuberculosis</i>	En los macrófagos derivados de monocitos el receptor de manosa esta involucrado en una fagocitosis no opsonizadora de cepas virulentas de <i>M. tuberculosis</i> pero no de las no virulentas. El receptor de manosa tiene varias funciones bactericidas como la secreción de enzimas lisosomales, producción de O <sub>2</sub> y citocinas.
(13,30)	<i>M. tuberculosis</i>	El PIM (fosfatidil inositol manosidasa) esta formado por PI (fosfatidil inositol) y unido a este puede estar anclada 1 o hasta 6 manosas. Los PIMs con 2 manosas son los más comunes en <i>M. tuberculosis</i> . Además de unirse al receptor de manosa LAM de <i>M. tuberculosis</i> se une a los receptores Toll y puede físicamente insertarse en las membranas induciendo todo tipo de eventos de señalización importantes en la respuesta del hospedero contra la tuberculosis.
(18)	<i>M. tuberculosis</i>	La pared celular de <i>M. tuberculosis</i> esta compuesta al menos por 4 capas con diferentes propiedades: PM. Membrana plasmática interna (bicapa de 4 a 4.5 nm). EDL. Capa electrodensa (probablemente contiene el peptidoglucano). ETZ. Zona electrotrasparente ( de 9 a 10 nm hidrofóbica, compuesta de ácidos micólicos). OL. Otra capa electrodensa (varia en grosor, electrodensidad y apariencia entre spp así como en condiciones de crecimiento. Contiene lípidos, proteínas, glucanos, mananas, arabinomananas y se cree que LAM)
(27)	<i>M. tuberculosis</i>	Se demostró que los azúcares de superficie son el principal factor de patogenicidad de la tuberculosis. La LAM y la arabinomanana como responsables de la unión y la entrada de la Mycobacteria al hospedero, además de inducir la respuesta inmune por células T.
(30)	<i>M. tuberculosis</i>	En las Mycobacterias la LAM son llevadas a los endosomas y pueden ser presentados asociándose a moléculas de MHC para la presentación de antígeno proteico hacia linfocitos T.
(18,19)	<i>M. tuberculosis</i>	La Arabinogalactana es necesaria para la formación del peptidoglucano en la pared celular

### III) JUSTIFICACIÓN

*Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal del actinomicetoma en México; sin embargo, no se conocen estudios específicos sobre la composición y estructura de su pared celular, la cual representa el primer contacto con las células del hospedero y por lo tanto es crucial en la fisiopatogenia del micetoma y en la respuesta inmune del hospedero.

### IV) HIPOTESIS

La estrecha relación filogenética que existe entre el género *Mycobacterium* y el género *Nocardia* permite suponer que haya similitudes en la presencia de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*.

### V) OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

- Confirmar la presencia de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la localización de manosa y galactosa como componentes de la pared celular de *N. brasiliensis*.
- Valorar la cantidad de manosa y galactosa en tres etapas de crecimiento de la cepa de referencia ATCC700385 y el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis*.
- Demostrar la efectividad de la técnica de inmuno-oro con lectinas para corroborar la presencia y distribución de manosa y galactosa en la pared celular.

### VI) METODOLOGÍA

#### 6.1. Cepas de Actinomicetos

Se trabajaron con cuatro cepas de actinomicetos de origen clínico:

El aislado clínico de *N. brasiliensis* FM825 de reciente aislamiento en octubre del 2007 de un caso de micetoma localizado en extremidad inferior de un paciente masculino de 54 años, originario de la ciudad de Puebla, México.

La cepa de referencia de *N. brasiliensis* ATCC700358. Aislada proporcionada por el Hospital Universitario Dr. José E. González, Monterrey Nuevo León.

La cepa de origen vacunal de *M. tuberculosis* donada por el Laboratorio de Inmunología Comparada de Piel y Mucosas, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

El aislado clínico de *N.asteroides* FM556. Utilizado como control en la prueba de crecimiento en gelatina

## **6.2. Tipificación morfológica y bioquímica del aislado clínico FM825.**

**Morfología macroscópica.** Se realizó un cultivo en agar Brain Heart Infusion (BHI) por estría de aislamiento a una temperatura de 28°C por 7 días para observar las características morfológicas de las colonias (coloración y el aspecto).

**Morfología microscópica.** Para la observación microscópica, se realizaron microcultivos a partir del crecimiento de 7 días de la colonia, se hizo una suspensión en agua destilada estéril y se sembró en placas de agar BHI por estría masiva sobre el cual se colocaron cubreobjetos estériles. Posteriormente, se incubaron por 7 días a una temperatura de 28°C para obtener filamentos en los bordes de los cubreobjetos a los cuales se realizó una tinción de Gram y una de Kinyoun (tinción de ácido alcohol resistencia).

Pruebas bioquímicas

**Hidrólisis de caseína, tirosina, xantina e hipoxantina.** Para caracterizar la cepa FM825 se realizaron medios de cultivo de agar caseína, agar tirosina, agar xantina y agar hipoxantina <sup>(41)</sup>

en placa a los cuales se les inoculó en el centro un fragmento de un cultivo previo de 7 días para observar el halo de hidrólisis.

El crecimiento en gelatina fue probado en un medio de gelatina <sup>(41)</sup> al 0.4% al cual se le inoculó un fragmento del aislado FM825. El aislado clínico FM556 de *N. asteroides* se utilizó como control negativo de esta prueba.

Los resultados de las pruebas anteriores fueron comparados con los parámetros reportados como estándares para la identificación del aislado clínico FM825. Considerando el origen y en consecuencia la confiabilidad de la cepa tipo ATCC700358, a ésta no se le realizaron pruebas. Este mismo criterio fue aplicado para la cepa de *M. tuberculosis*.

### 6.3. Curva de crecimiento

**Curva estándar de consumo de glucosa.** Se realizó una curva de crecimiento por asimilación de glucosa a partir del medio de cultivo, de acuerdo al procedimiento descrito por Dubois y colaboradores. <sup>(22)</sup>

Para la cuantificación de azúcares en el medio se preparó una solución stock de 1mg/mL de glucosa. A partir de ésta se prepararon diferentes soluciones con concentraciones que oscilaron de 0 (blanco) hasta 250 µg/mL. A cada una de estas soluciones se les adicionó 25 µl de fenol al 80% y 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las soluciones fueron mantenidas a temperatura ambiente por 15 min y en agitación constante. Finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 480 nm.

Para la determinación del consumo de glucosa en el medio de cultivo, la cepa ATCC700358 fue sembrada en agar BHI e incubada a 28°C durante 1 semana. Posteriormente, con un fragmento de la colonia se preparó una suspensión a una concentración de 1.5x10<sup>9</sup> UFC/MI, de la cual se tomaron 500 µl para inocular 25 mL de caldo BHI; este cultivo fue incubado a 28°C por un periodo de 50 días. De cada cultivo se tomó una muestra de 5 ml de

medio cada dos días hasta el día 14 y posteriormente cada 5 días hasta el día 50. El medio fue filtrado a través de una membrana de un poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . En este filtrado se determinó la concentración de glucosa de acuerdo al procedimiento realizado por Dubois y colaboradores.

(22)

#### 6.4. Selección de lectinas biotiniladas útiles para el marcaje de azúcares en *N. brasiliensis*.

Se realizaron ensayos preliminares para determinar las lectinas útiles en la detección de azúcares presentes en la pared celular de *N. brasiliensis*.

Se utilizaron 9 lectinas SIGMA®, las cuales se muestran en la Cuadro 3.

Origen	Lectina	Afinidad
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con-A	Manosa
<i>Lens culinaris</i>	LCA	Manosa
<i>Glycine max</i>	SBA	Galactosa
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Galactosa
<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL	Galactosa
<i>Agaricus bisporus</i>	ABA	Galactosa
<i>Ulex europeus</i>	UEA	Fucosa
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEL	N-acetil glucosamina
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	N-acetil glucosamina

**Cuadro 3.** Lectinas utilizadas para la detección de azúcares en frotis de *N. brasiliensis*. En la columna de afinidad se muestra la especificidad de las lectinas hacia los azúcares de superficie.

Para este ensayo se realizaron frotis en portaobjetos con carga Biocare Medical®, los cuales están bañados en una solución con carga positiva que adhieren las células e impiden el desprendimiento durante los lavados con las diferentes sustancias.

Los frotis se realizaron con la masa bacteriana suspendida en amortiguador de cacodilato de sodio (0.15M), obtenida en las tres diferentes fases de crecimiento. Posteriormente fueron incubados en PBS con BSA al 0.1%, lavados con PBS/Tritón X-100 al 0.001%, e incubados con la lectina biotinilada a una concentración de 1mg/mL por 15 min en cámara húmeda. Los frotis fueron lavados nuevamente con PBS/Tritón X-100 al 0.001% e

incubados con estreptavidina-peroxidasa (1:200) por 15 min. Se realizó un lavado final con Tritón X-100 al 0.001% y una incubación con diaminobencidina (DAB), PBS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3%.

El revelado de la histoquímica se realizó con observación directa al microscópio hasta observar un color marrón en las células. La reacción se detuvo con PBS/Tritón X-100 al 0.001%.

## **6.5. Preparación de muestras para cortes de *N.brasiliensis* y *M. tuberculosis***

### **6.5.1. Recolección de cultivo bacteriano en diferentes fases de crecimiento**

La cepa ATCC700358 y el aislado FM825 fueron cultivados en caldo BHI a 28°C en agitación (100 rpm). Se tomó 1 mL del caldo de cultivo los días 7, 12 y 34 correspondientes a las fases de crecimiento lag, log y estacionaria. Después de centrifugar 5 min a 10,000 rpm, se hicieron 3 lavados adicionales con solución salina recuperando el botón bacteriano por centrifugación, obteniendo así tres muestras de la cepa de referencia y tres del aislado clínico.

### **6.5.2. Fijación de muestras**

Al botón bacteriano de cada una de las muestras de las distintas fases de crecimiento se les realizó una fijación primaria que consistió en adicionar paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M (pH 7.2) hasta cubrir la muestra, durante 90 min a 4°C. Posteriormente se lavaron las muestras en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15 M por centrifugación para después deshidratarlas con etanol de gradación creciente.

### **6.5.3. Inclusión en resina LR-White**

Las muestras fijadas fueron infiltradas y polimerizadas en la resina LR-White SIGMA®. A partir de ellas se realizaron cortes ultrafinos de 80 nm con cuchilla de diamante, montados sobre rejillas de níquel.

### **6.6. Técnica de histoquímica con lectinas biotiniladas con estreptavidina-oro para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis***

Los cortes tratados con el kit para el bloqueo de biotina fueron colocados sobre una gota de PBS-BSA al 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación las muestras fueron incubadas en una gota de la lectina Biotinilada a dilución 1:50 con  $\text{CaCl}_2$  0.06 M durante 18 h a 4°C. Posteriormente, se lavaron por flotación en 5 cambios de PBS/ Tritón X-100 al 0.01% (pH 7.8-8). Luego, las rejillas fueron incubadas en una gota de 20  $\mu\text{l}$  del complejo estreptavidina-oro 1:100 manteniéndolas a temperatura ambiente durante 1 h. Los cortes fueron lavados por flotación en 5 cambios de PBS/ Tritón X-100 al 0.01% (pH 7.8-8) seguido de 3 cambios de TBS y 2 de agua desionizada.

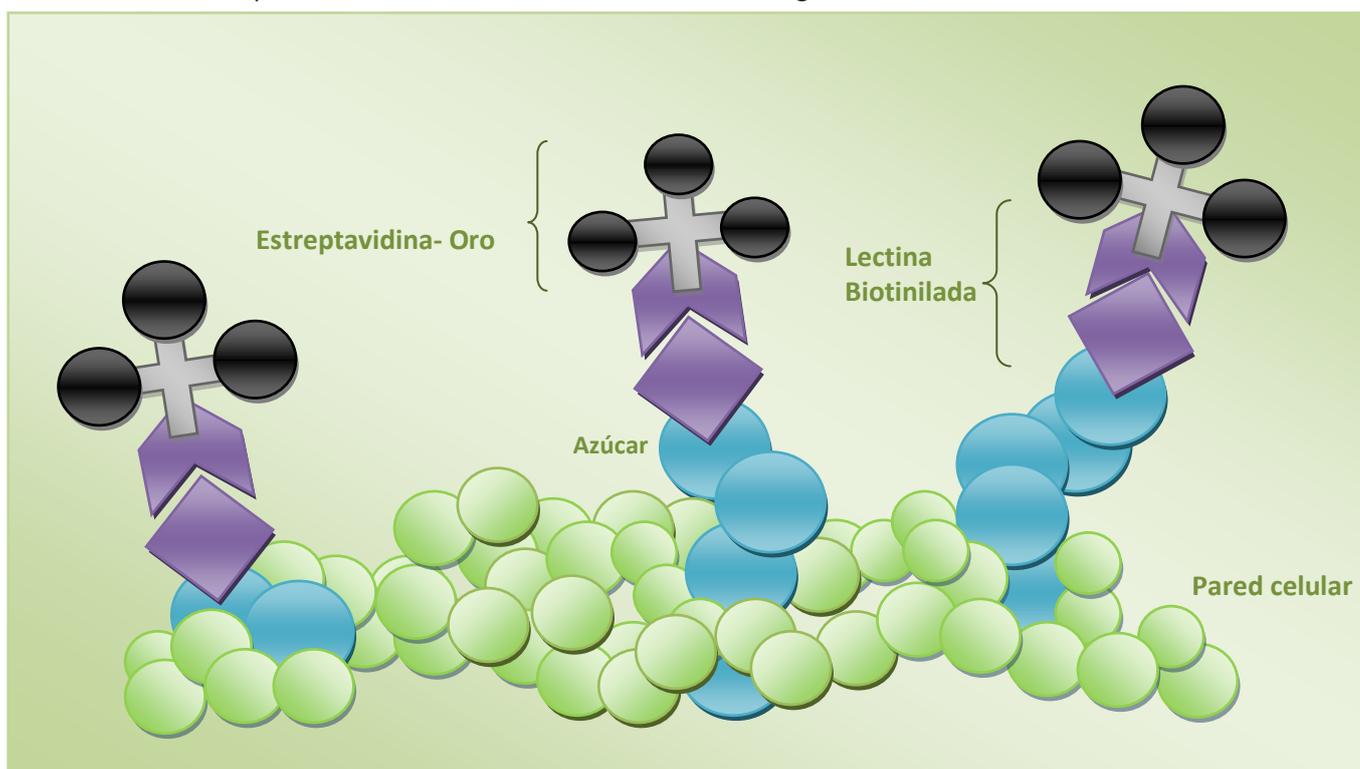
### **6.7. Bloqueo de la biotina en cortes de *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis*.**

De acuerdo a los resultados preliminares en los que se observaron esferas de oro distribuidas de forma inespecífica en los cortes de la masa bacteriana a pesar de un lavado más enérgico y prolongado, se consideró la posibilidad de que *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis* tuvieran biotina.<sup>(64)</sup> Por lo tanto, se procedió a bloquear la posible biotina libre y disminuir el marcaje de fondo con la estreptavidina-oro. Este procedimiento consistió en la hidratación de los cortes de *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis* por flotación en PBS (pH 7.8-8). Las muestras fueron bloqueadas por flotación con el Kit bloqueador de biotina Zymed® con avidina 10 min y biotina 10 min consecutivamente. Finalmente se lavaron las muestras en 5 cambios por flotación a gotas de TBS para aplicar la técnica de histoquímica con lectinas biotiniladas previamente descrita en el apartado 6.6.

### 6.8. Control para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*.

Para corroborar la identificación específica de manosa y de galactosa se realizaron cortes ultrafinos de *M. tuberculosis* ya que que esta bacteria, filogenéticamente relacionada con *N. brasiliensis*, tienen manosa y galactosa en la pared celular. Para el control positivo se realizó un marcaje de azúcares en cortes de la cepa vacunal de *M. tuberculosis* de igual manera que en *N. brasiliensis*. El marcaje para el control negativo consistió en la saturación de lectinas con D-manosa para la lectina Con-A y con D-galactosa para la lectina PNA previo al marcaje de carbohidratos, a una concentración de 200 mM. El conjugado resultante se utilizó para el marcaje en cortes de la cepa vacunal de *M. tuberculosis* esperando que no hubiera identificación de azúcares en las bacterias debido a la saturación de sitios de unión a azúcares de las dos lectinas utilizadas.

Finalmente todas los cortes fueron contrastados con uranilo y plomo a bajas concentraciones para permitir una mejor observación del complejo azúcar-lectina biotinilada-estreptavidina-oro. Este procedimiento se encuentra ilustrado en la Figura 2.



**Fig. 2.** Representación esquemática del marcaje de azúcares formando el complejo azúcar-lectina biotinilada-estreptavidina-oro.

## 6.9. Análisis estadísticos

Se obtuvo un total de 44 micrografías electrónicas de los cuatro tratamientos utilizados para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis* (ATCC700358 Con-A, ATCC700358 PNA, FM825 Con-A y FM825 PNA). Para los análisis estadísticos se escogieron dos micrografías electrónicas para cada uno de los tratamientos. Las micrografías fueron cuadrículadas a  $0.5\mu\text{m}^2$ . Posteriormente se eligieron 20 cuadros al azar de cada una de las micrografías y se realizó el conteo de las partículas de oro que indican la presencia de un azúcar en específico. Los datos fueron transformados como  $X = (x)^{1/2} + 0.5$ .<sup>(63)</sup> Para establecer si existen diferencias significativas entre los controles positivos, negativos y los controles de bloqueo de biotina para cada uno de los azúcares, se realizó una prueba de t para muestras independientes.

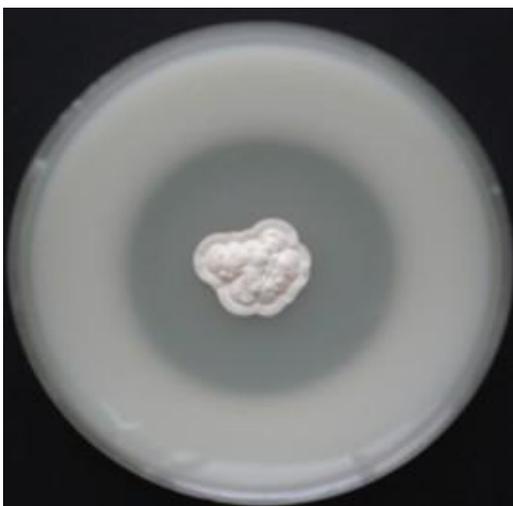
Por otro lado, para valorar la cantidad de manosa y galactosa en tres etapas de crecimiento de la cepa de referencia ATCC700358 y el aislado clínico FM825, se obtuvieron dos micrografías electrónicas por fase de crecimiento y por tratamiento para cada una de éstas, las cuales fueron cuadrículadas como se mencionó antes. Los datos fueron transformados como  $X = (x)^{1/2} + 0.5$ .<sup>(63)</sup> Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar el efecto de la fase de crecimiento y de la cepa sobre la cantidad de manosa y galactosa. Posteriormente se realizó una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para conocer específicamente las diferencias entre tratamientos.

## VII) RESULTADOS

### 7.1. Tipificación morfológica y bioquímica del aislado clínico FM825.

Los resultados de todas las pruebas bioquímicas realizadas al aislado clínico FM825 coincidieron con la literatura,<sup>(2)</sup> por lo que se llegó a la conclusión de que este pertenece a la especie *N. brasiliensis*.

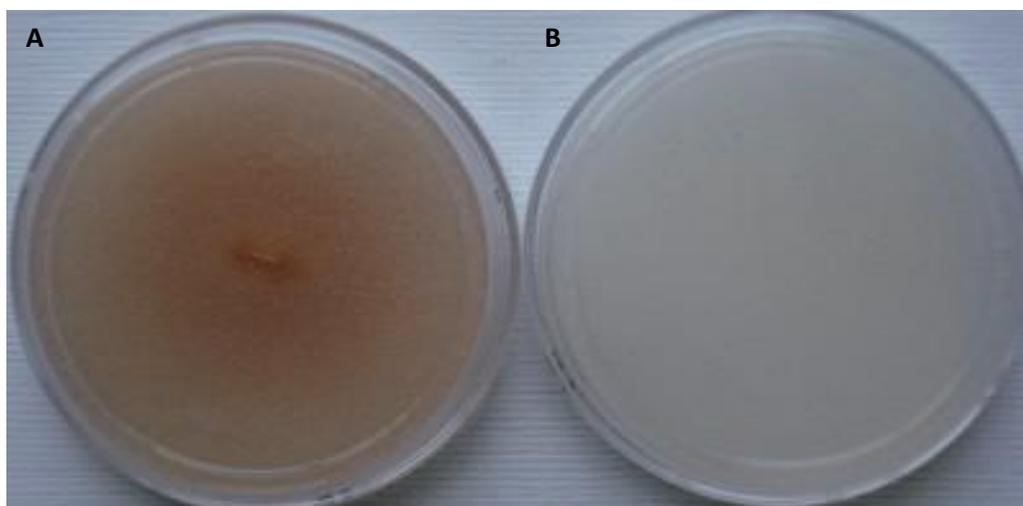
En las figuras de la 3 a la 9 se observan los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas así como los aspectos microscópicos y macroscópicos del aislado clínico tipificado.



**Fig. 3.** Caseína: Halo alrededor del aislado clínico FM825.



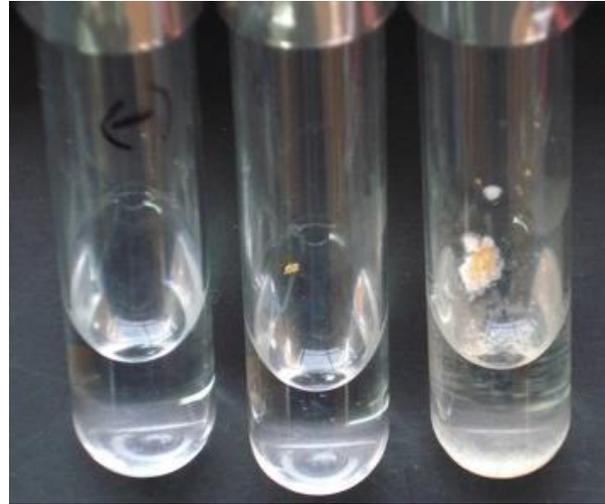
**Fig. 4.** Xantina: No evidencia de halo alrededor del aislado clínico FM825.



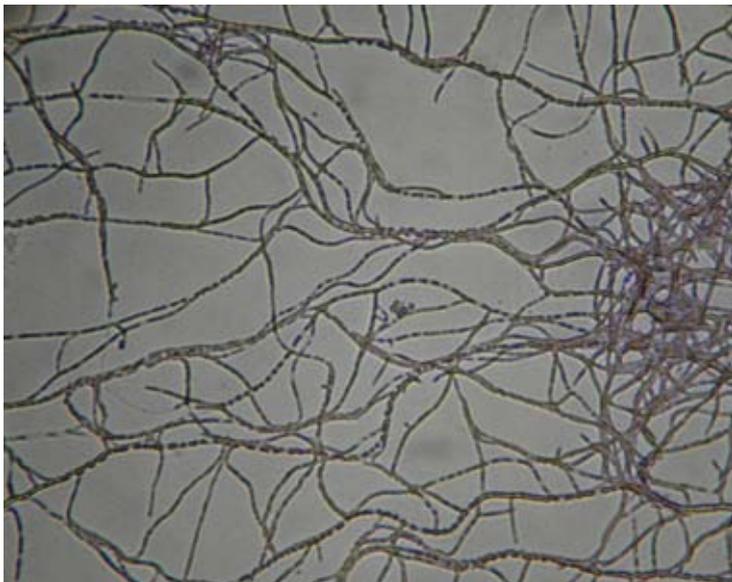
**Fig. 5.** A. Descomposición de la tirosina por el aislado clínico FM825. B. control negativo



**Fig. 6.** Hipoxantina: Halo alrededor del aislado clínico FM825.



**Fig. 7.** Crecimiento en gelatina. De izquierda a derecha: control negativo, *N. Asteroides* y aislado clínico FM825.



**Fig. 8.** Morfología microscópica. Observación de filamentos largos, cortos y ramificados del aislado clínico FM825

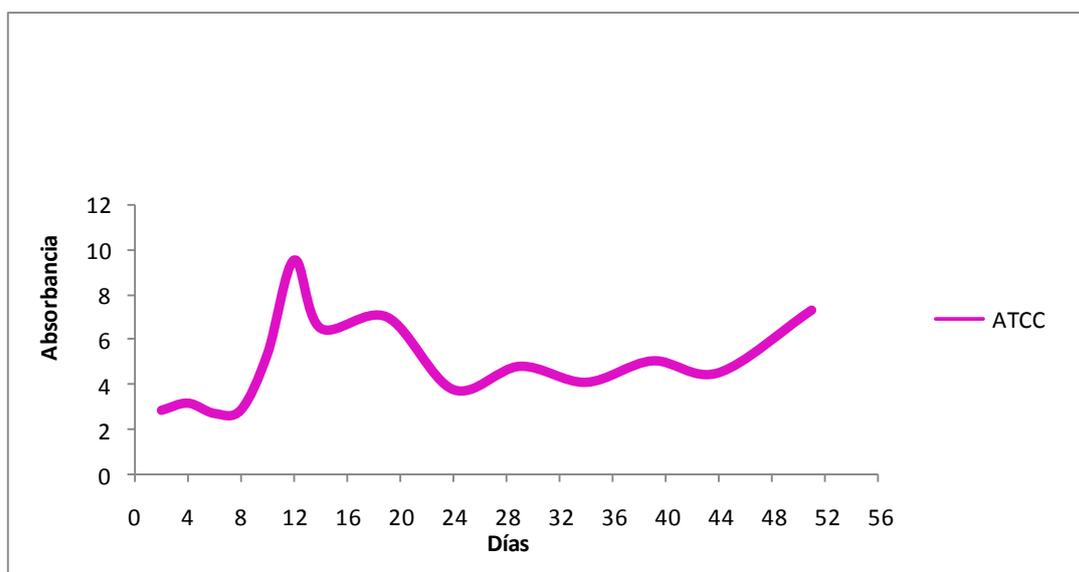


**Fig. 9.** Morfología macroscópica. Colonias de color naranja de aspecto plegado del aislado clínico FM825

## 7.2. Curva de crecimiento

Se obtuvo una curva de crecimiento por asimilación de glucosa en donde se identificaron las tres fases de crecimiento (lag, log y estacionaria) de la cepa de *N. brasiliensis* ATCC700358.

(Fig. 10).



**Fig. 10.** Curva de crecimiento por asimilación de glucosa en caldo BHI de la cepa de *N. brasiliensis* ATCC700358. Nótese las distintas fases de crecimiento. Fase lag, alrededor de los 7 días, fase log a los 12 días y fase estacionaria a los 34 días.

## 7.3. Selección de lectinas biotiniladas útiles para el marcaje de azúcares en *N. brasiliensis*.

De acuerdo al reconocimiento con diferentes lectinas sobre los frotis de *N. brasiliensis* se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 4.

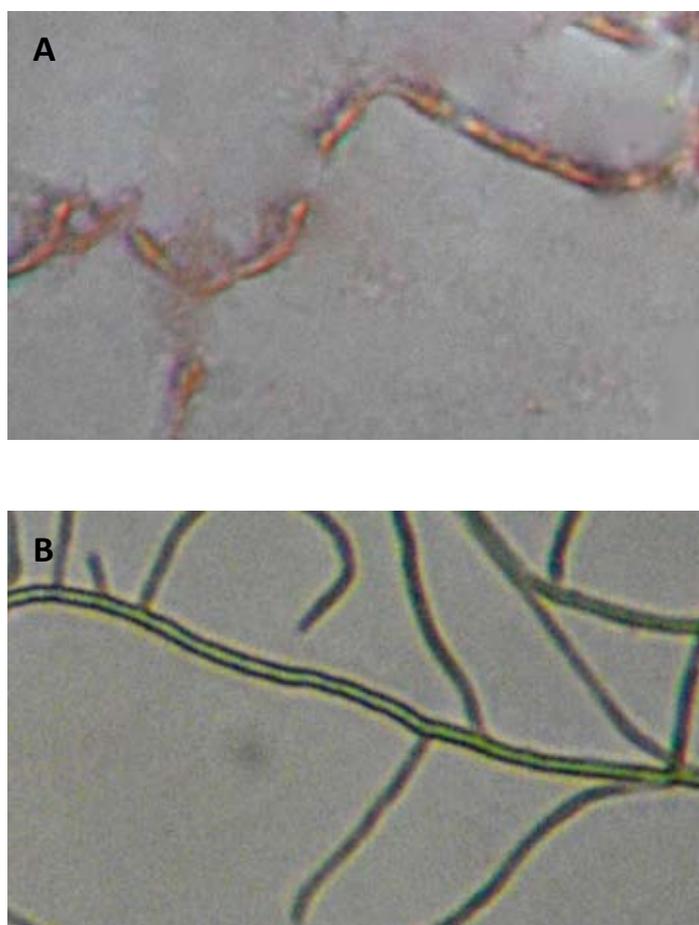
### Afinidad de Lectinas biotiniladas por pared celular de *N. brasiliensis*

Lectina	Afinidad	Cepa ATCC			Aislado FM		
		Lag	log	est	lag	log	est
Con-A	manosa	+	+	+	+	+	+
LCA	manosa		+				
SBA	galactosa		+	+	-	-	-
PNA	galactosa	---	+	-	+	+	+

<b>ABA</b>	galactosa	+	+
<b>UEA</b>	fucosa	+	+
<b>LEL</b>	N-acetil glucosamina	+	+
<b>DBA</b>	N-acetil glucosamina	-	+

**Cuadro 4.** Nótese la alta afinidad en ambos aislados (cepa ATCC700358 y aislado FM825) por las lectinas Con-A y PNA que indican la presencia de manosa y galactosa, respectivamente.

La afinidad de la lectina Con-A hacia manosa en frotis de *N. brasiliensis* se muestra en la Figura 10. Esta afinidad se manifiesta por la coloración marrón de los filamentos bacterianos a causa de la reacción oxidativa que sufre la diaminobenzidina por parte de la estreptavidina peroxidasa. Debido a la reacción de oxidación, toda la célula adquiere el color marrón, fenómeno que es posible determinar si el azúcar está presente, más no determina su localización, como se muestra en la Fig.10 A. La ausencia de lectina es indicada por la ausencia de coloración marrón (Fig.11 B).



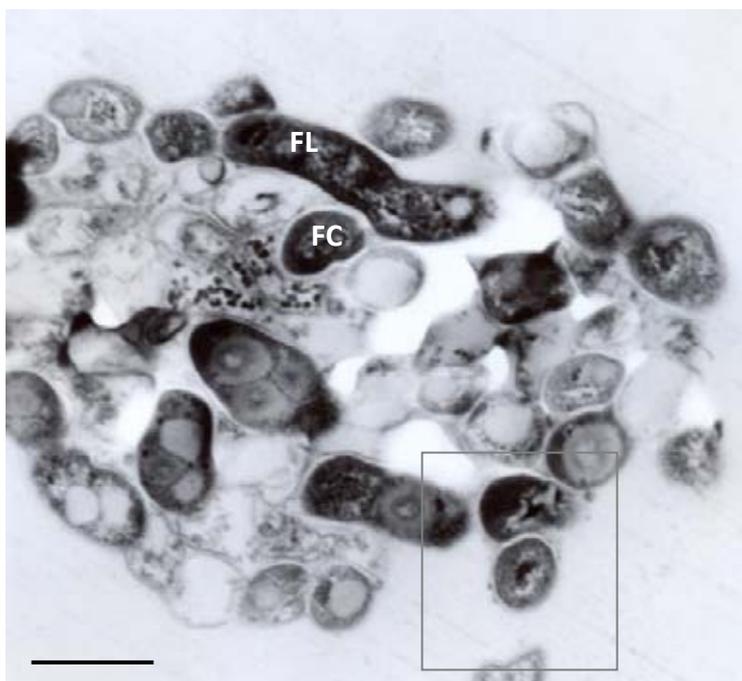
**Fig. 11.** **A.** Afinidad de la lectina Con-A hacia manosa en los filamentos bacterianos de *N. brasiliensis*. Se muestra un filamento de coloración marrón, por la reacción de oxido reducción. **B.** Se observan filamentos de coloración verdosa, por la ausencia de lectina.

#### 7.4. Bloqueo de la biotina en cortes de *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis*.

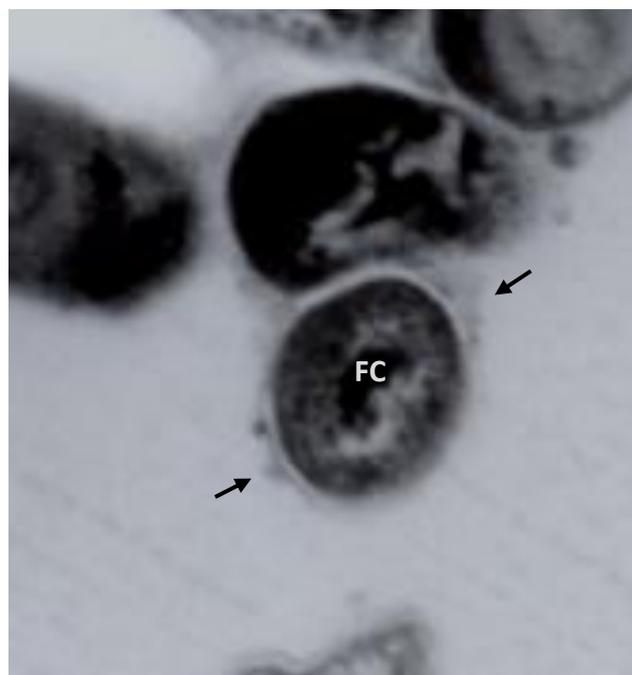
En los cortes de *N. brasiliensis* se demostró la existencia de biotina libre, ya que se obtuvieron diferencias significativas ( $t=4.89$   $p<0.001$ ) en el marcaje de las pruebas piloto, ( $\bar{x}=5.7$ ) en comparación a las muestras tratadas con el kit bloqueador de biotina ( $\bar{x}=2.8$ ).

#### 7.5. Aspecto ultraestructural de *M. tuberculosis*.

Se obtuvo una micrografía electrónica de la masa bacteriana de *M. tuberculosis* sin marcaje de azúcares (Figs. 12 y 13).



**Fig. 12.** Aspecto ultraestructural de *M. tuberculosis*. Se observan estructuras filamentosas largas (F) y filamentos cortos (FC). Aumento a 25000x. Barra. 0.5  $\mu\text{m}$ .

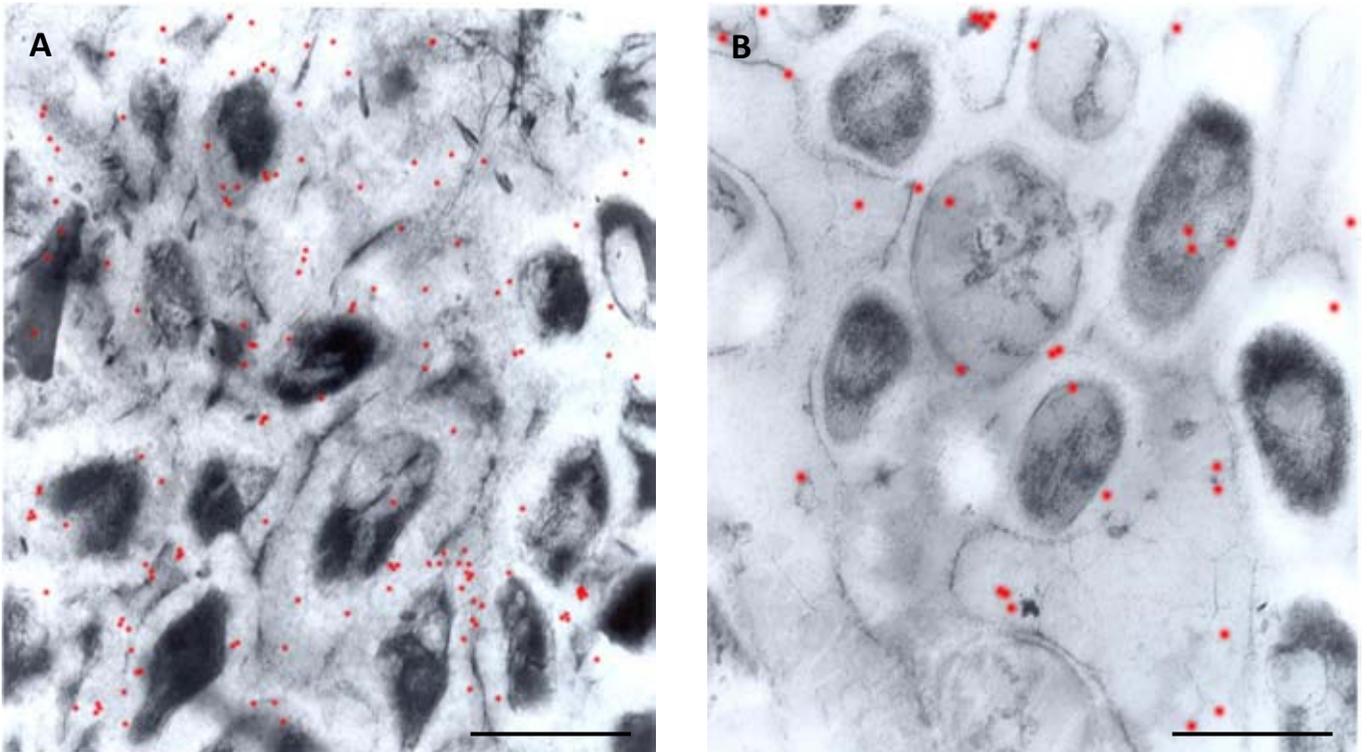


**Fig. 13.** Amplificación de una estructura filamentosas corta (FC) en donde se observa la pared celular que rodea a la bacteria. (flechas)

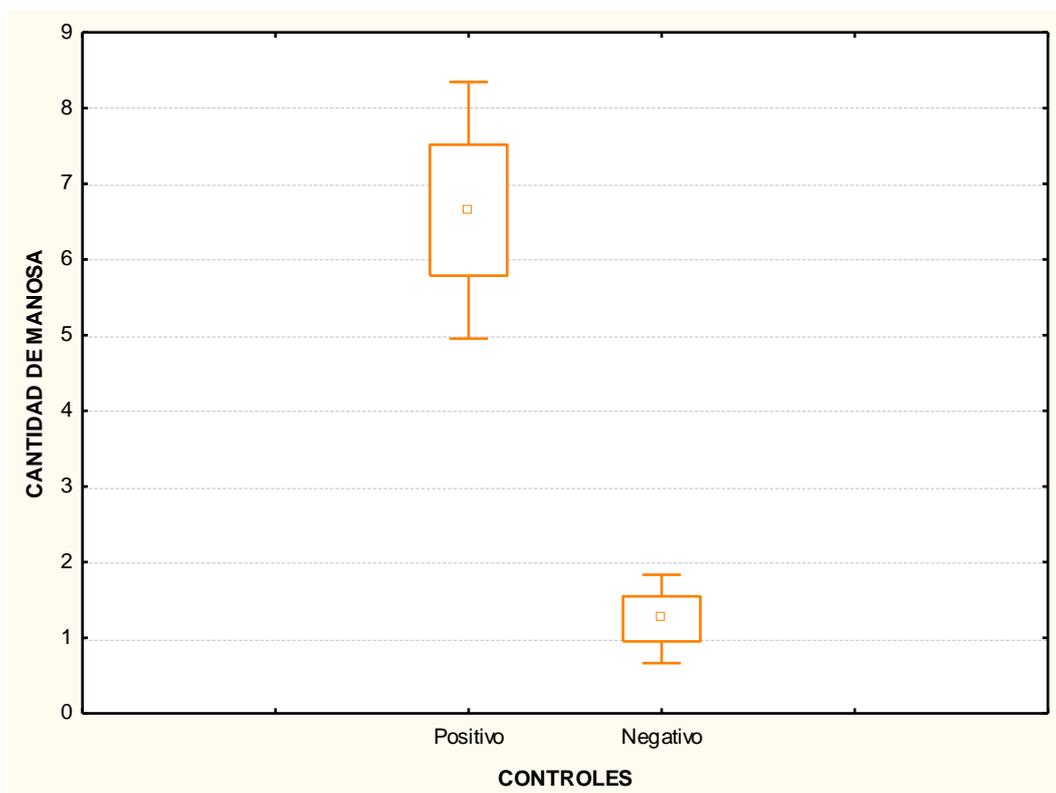
## 7.6. Control positivo y negativo de manosa y galactosa por medio de la saturación de sitios receptivos con D-manosa y D-galactosa.

El resultado de la prueba estadística aplicada en la cepa vacunal de *M. tuberculosis* demostró que existen diferencias significativas ( $t=7.11$ ,  $g.l.=38$ ,  $p<0.001$ ) entre el control positivo ( $\bar{x}=6.65$ ) y el control negativo ( $\bar{x}=1.25$ ) (Figs. 14 y 15) para el marcaje con manosa. De igual manera, se encontraron diferencias significativas ( $t=4.93$ ,  $g.l.=38$ ,  $p<0.001$ ) entre el control positivo ( $\bar{x}=15.3$ ) (Fig. 16) y el control negativo ( $\bar{x}=3.85$ ) (Fig. 17) para el marcaje con galactosa en la cepa vacunal de *M. tuberculosis*.

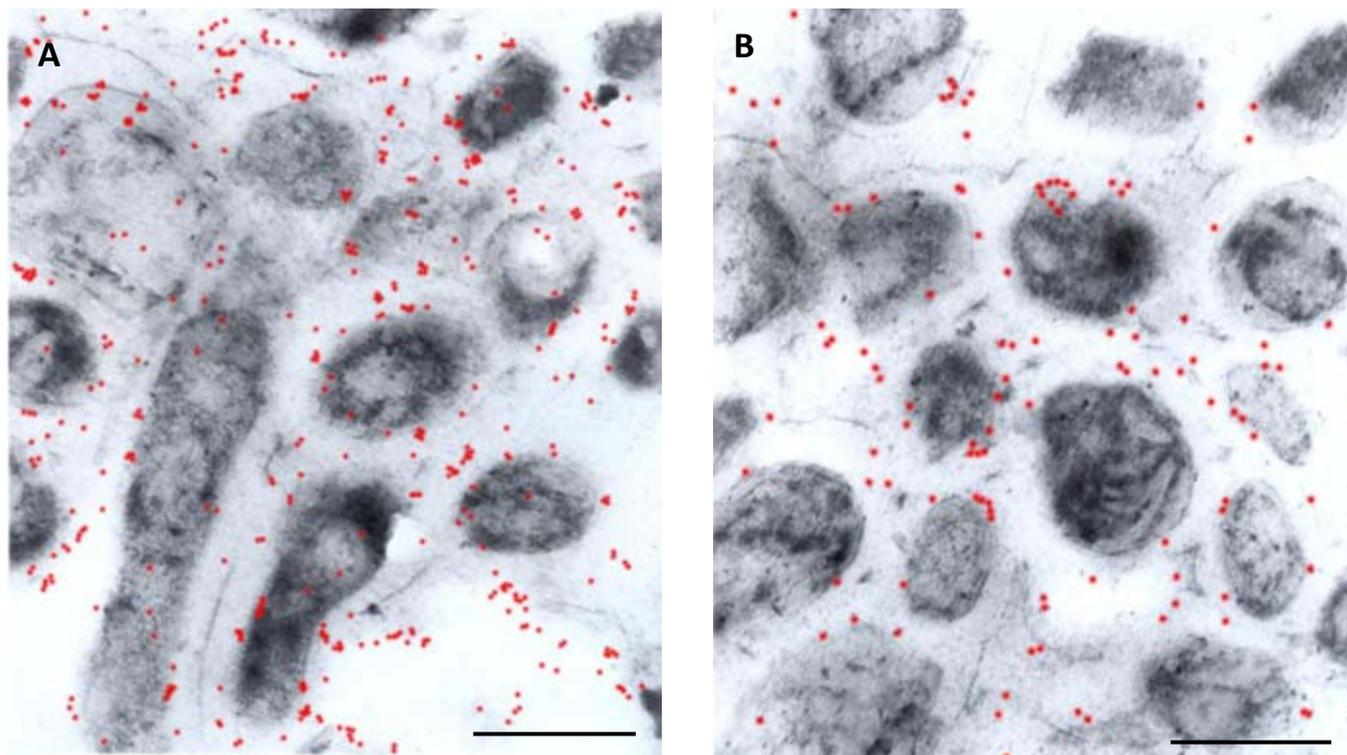
Estos resultados corroboran la presencia de manosa y galactosa en la cepa vacunal de *M. tuberculosis* y además apoyan la hipótesis de que el marcaje de manosa y galactosa por medio de lectinas es específico y por lo tanto útil para la determinación de estos azúcares en cortes de *N. brasiliensis*.



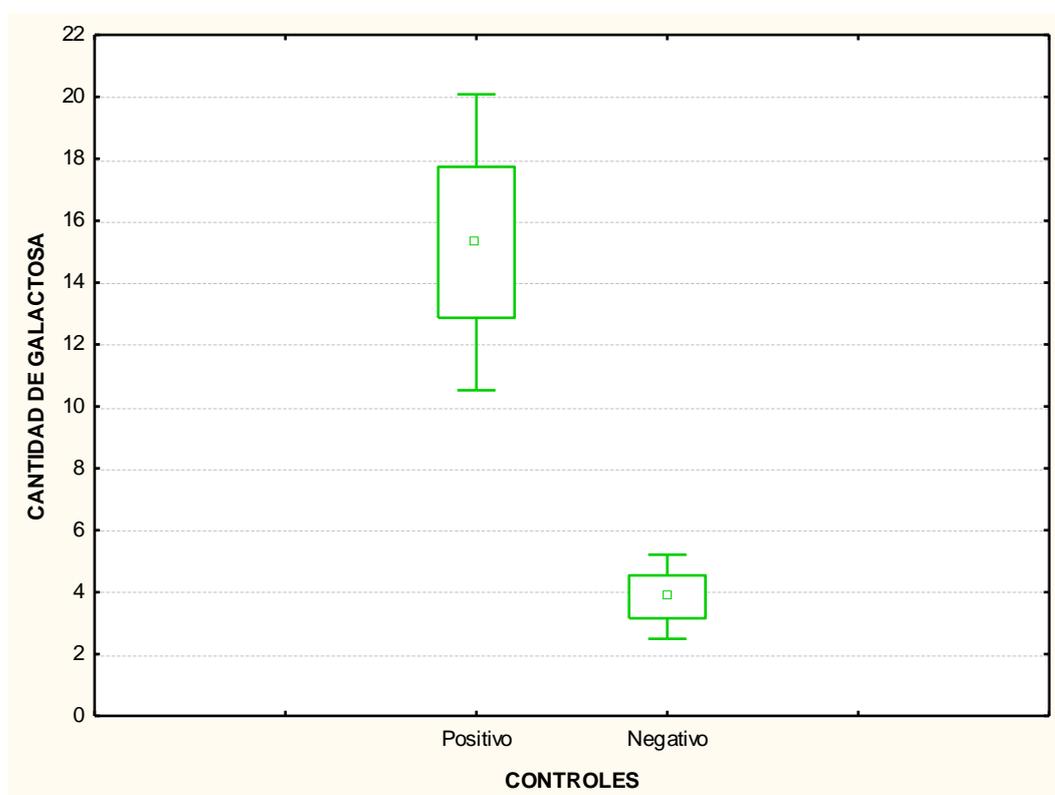
**Fig. 14.** Controles en cortes de *M. tuberculosis* para el marcaje de **manosa**. **A.** Control positivo. Marcaje ultraestructural de manosa en *M. tuberculosis* (en rojo). El reconocimiento con la lectina específica Con-A para manosa mostró una alta afinidad hacia las células de *M. tuberculosis*. **B.** Control negativo. Cortes de *M. tuberculosis* con el complejo Con-A-manosa. Nótese la disminución del marcaje en comparación con el control positivo. El marcaje observado se debe a Con-A que no fue saturada por manosa *in vitro*. Aumento a 31500x. Barra 0.5  $\mu$ m.



**Fig. 15.** Media  $\pm$  2SE del conteo de **manosa** en cortes de *M. tuberculosis*. Marcaje ultraestructural de manosa con la lectina Con-A (control positivo) y con saturación de la lectina Con-A con D- manosa (control negativo).



**Fig. 16.** Controles en cortes de *M. tuberculosis* para el marcaje de **galactosa**. **A.** Control positivo. Marcaje ultraestructural de galactosa en *M. tuberculosis* (en rojo). El marcaje con la lectina específica PNA para galactosa mostró una alta afinidad hacia las células de *M. tuberculosis*. **B.** Control negativo. Cortes de *M. tuberculosis* con el complejo PNA-galactosa. Nótese la disminución del marcaje en comparación con el control positivo. El marcaje observado se debe a PNA que no fue saturada por galactosa *in vitro*. Aumento a 31500x. Barra 0.5  $\mu$ m.

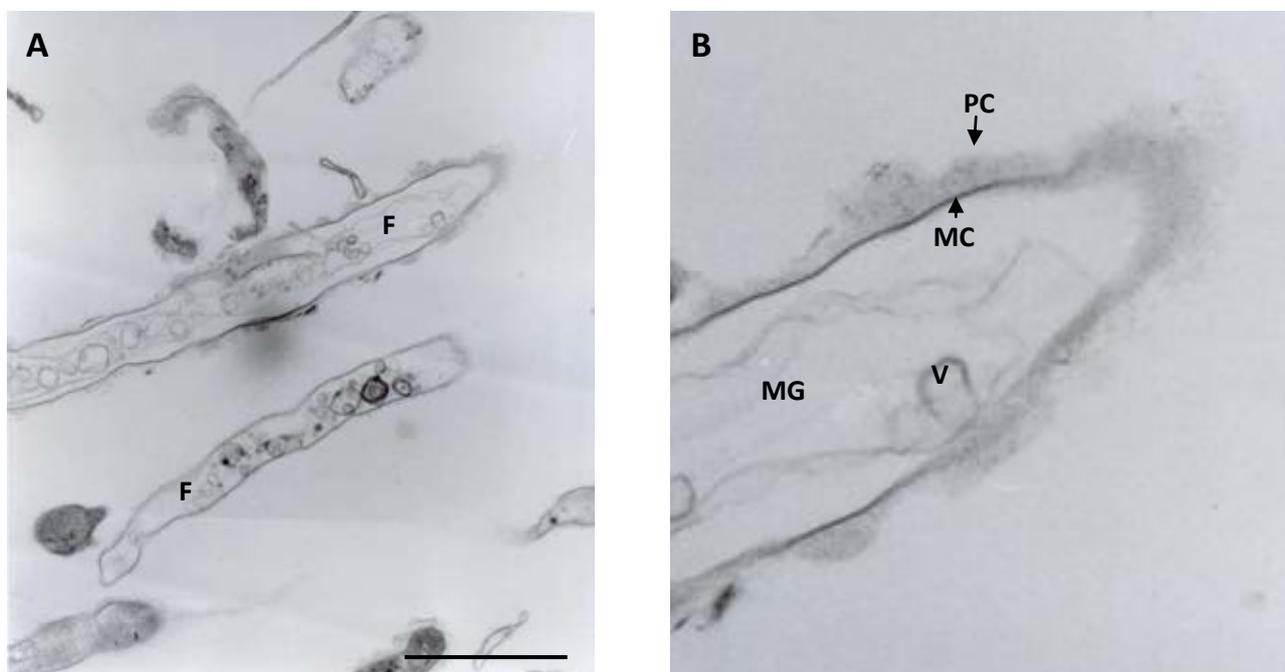


**Fig. 17.** Media  $\pm$  2SE del conteo de **galactosa** en cortes de *M. tuberculosis*. Marcaje ultraestructural de galactosa con la lectina PNA ( control positivo) y con saturación de la lectina PNA con D- galactosa (control negativo).

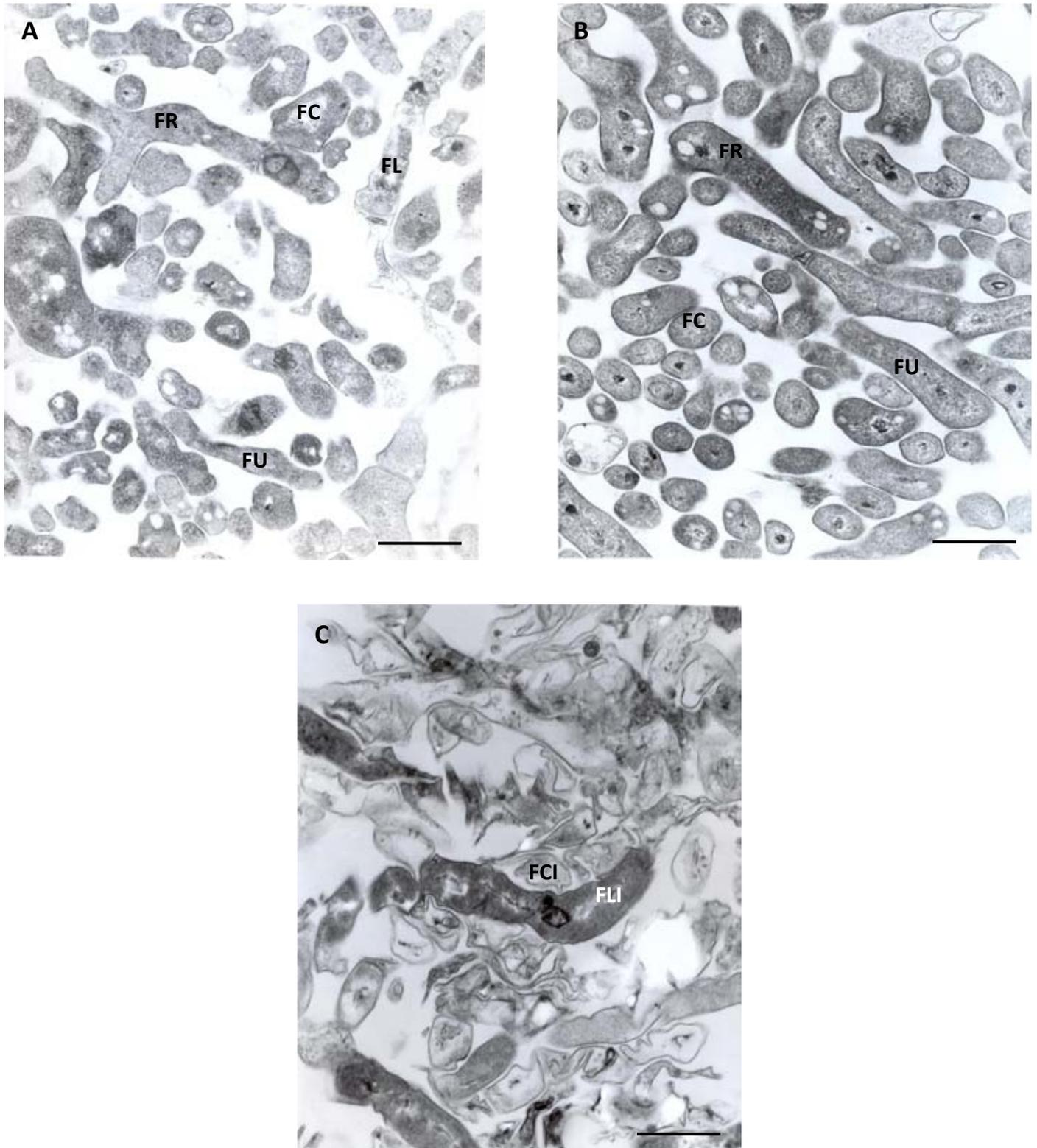
## 7.7. Técnica de histoquímica con lectinas biotiniladas con estreptavidina-oro para el marcaje de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*.

### 7.7.1. Aspecto ultraestructural de *N. brasiliensis*

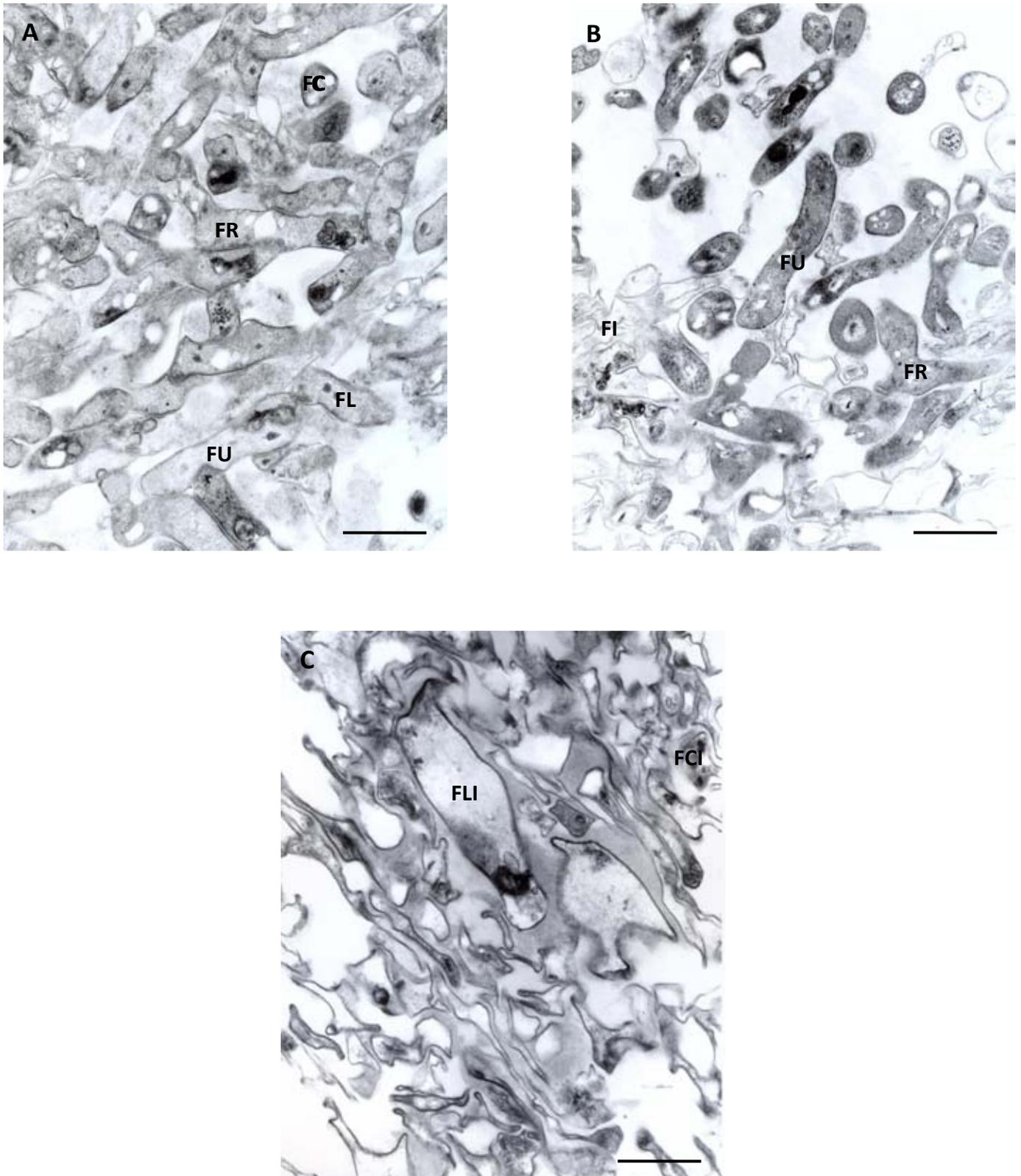
Se obtuvieron micrografías electrónicas de la masa bacteriana de *N. brasiliensis* las cuales sirvieron para identificar la pared celular y tener una mejor apreciación de la localización del marcaje de manosa y galactosa por medio de lectinas. Los resultados se muestran en la Fig. 18. En las imágenes ultraestructurales de *N. brasiliensis* ATCC700358 y FM825, en tres fases de crecimiento se observaron cambios estructurales. De manera similar en ambas cepas se evidenció el deterioro celular que sufren las bacterias durante las tres fases de crecimiento. En la fase lag (Figs. 19. A y 20. A) de adecuación al medio se aprecian estructuras filamentosas cortas, largas, únicas o ramificadas en comparación con la fase log (Figs. 19. B y 20. B) en donde predominaron los filamentos únicos y ramificados. Por último en la fase estacionaria (Figs. 19. C y 20. C) se observan filamentos cortos y largos irregulares.



**Fig. 18.** Ultraestructura de *N. brasiliensis*. **A.** Estructuras filamentosas (F) en la fase log de crecimiento. **B.** Aumento de una estructura filamentosa en A. Se observa la membrana celular (MC) seguida de la pared celular (PC) la cual es una capa no uniforme que recubre a la célula. Se observan también vacuolas (V) y algo que podría ser el material genético (MG). Aumento de A. 25000x. Barra 0.5  $\mu$ m.



**Fig. 19.** Ultraestructura de la cepa ATCC700358 de *N. brasiliensis* en tres fases de crecimiento. **A.** En la fase lag a 7 días de crecimiento se observan estructuras filamentosas cortas (FC), largas (FL), filamentos únicos (FU) y ramificados (FR). **B.** En la fase log a 12 días de crecimiento se observa el predominio de estructuras filamentosas únicas (FU) y ramificadas (FR). **C.** En la fase estacionaria a 34 días de crecimiento se observan estructuras filamentosas cortas irregulares (FCI) y filamentos largos irregulares (FLI). Aumento de A, B y C. 12000x. Barra 0.5  $\mu\text{m}$ .

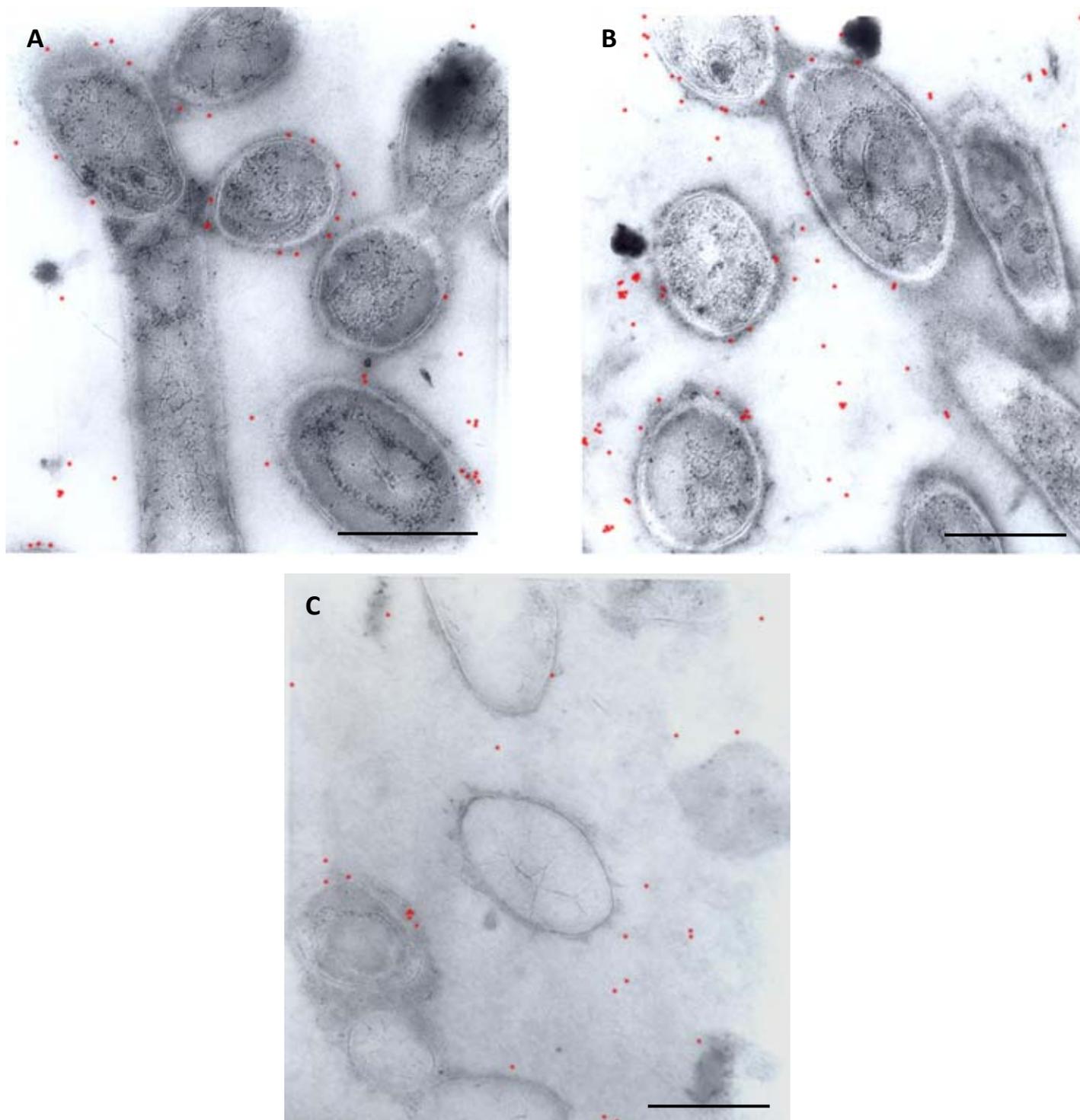


**Fig. 20.** Ultraestructura del aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis* en tres fases de crecimiento. **A.** En la fase lag a 7 días de crecimiento se observan filamentosas cortas (FC), largas (FL), filamentos únicos (FU) y ramificados (FR). **B.** En la fase log a 12 días de crecimiento se observa el predominio de estructuras filamentosas únicas (FU) y ramificadas (FR) además de filamentos irregulares (FI). **C.** En la fase estacionaria a 34 días de crecimiento se observan estructuras filamentosas cortas irregulares (FCI) y filamentos largos irregulares (FLI). Aumento de A, B y C. 12000x. Barra 0.5  $\mu$ m.

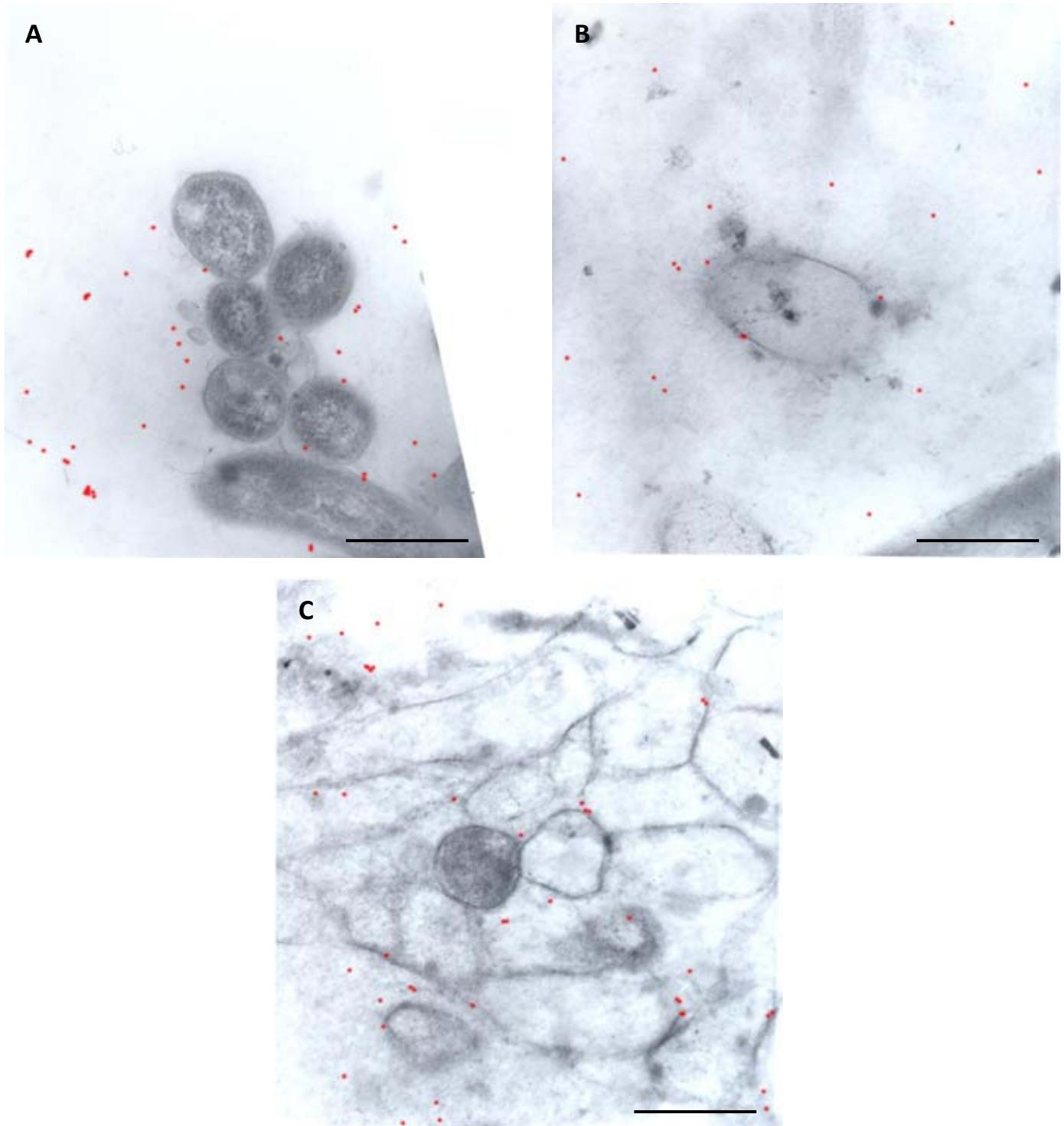
### 7.7.2. Localización ultraestructural de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*.

El marcaje ultraestructural de manosa y galactosa como componentes de la pared celular de *N. brasiliensis* se registró en imágenes que demuestran la especificidad de las lectinas biotiniladas utilizadas para identificar estos dos tipos de azúcares.

#### 7.7.2.1. Localización ultraestructural de manosa

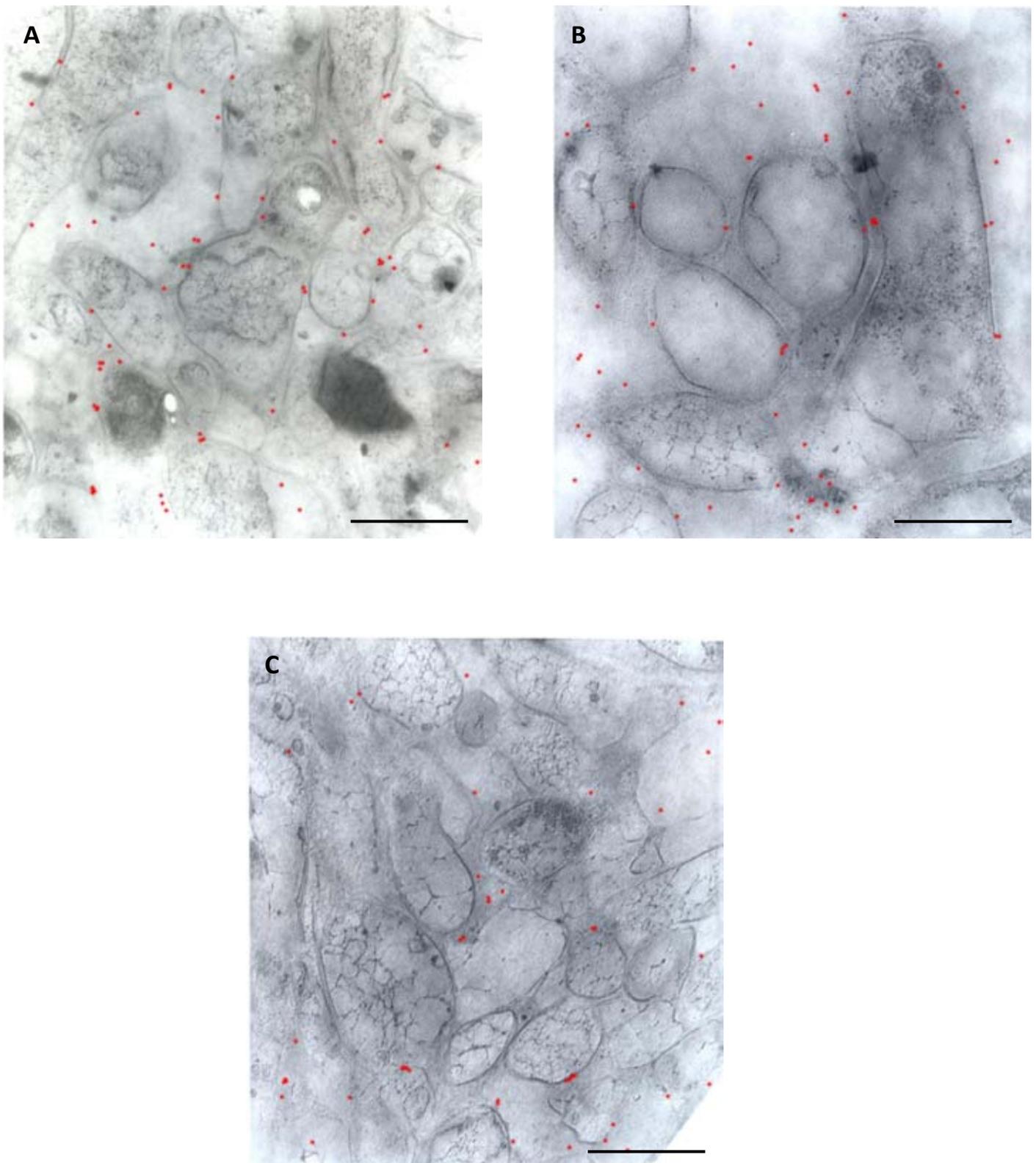


**Fig. 21.** Marcaje de **manosa** en la pared celular de la cepa ATCC700358 de *N. brasiliensis* en tres las tres fases de crecimiento. **A.** Fase lag de crecimiento. Se observa la pared celular de forma irregular en dónde se aprecia un marcaje de manosa (en rojo) en la periferia y en el exterior de las células. Aumento 25000X. Barra 0.5  $\mu$ m. **B.** Fase log de crecimiento. Se aprecia un marcaje de manosa en la periferia de la pared celular y en el exterior de las células; a diferencia de A y C se aprecia un mayor marcaje de manosa. Aumento 31500x. **C.** Fase estacionaria de crecimiento. Se observa un menor marcaje de manosa en la pared celular respecto a A y B. Se aprecia un marcaje en el exterior de las células. Aumento 31500x. Barra de B y C. 0.5 $\mu$ m.

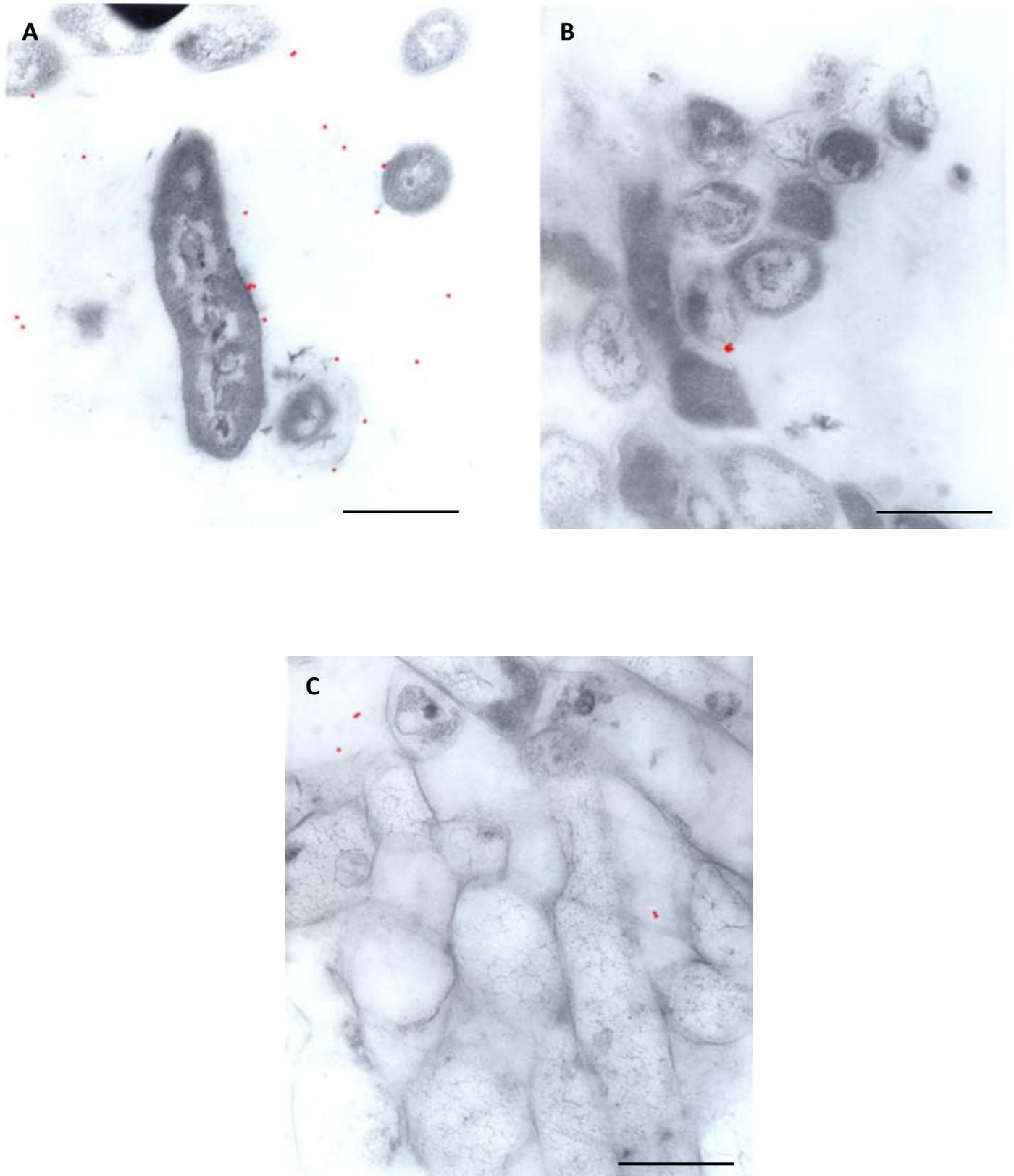


**Fig. 22.** Marcaje de **manosa** en la pared celular del aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis* en tres fases de crecimiento. **A.** Fase lag de crecimiento. Se observa un marcaje de manosa (en rojo) en su mayoría fuera de la células y en la periferia de estas. **B.** Fase log de crecimiento. Se aprecia un marcaje de manosa en la periferia de la pared celular y en el exterior de la célula, a diferencia de A y C se aprecia un menor marcaje de manosa. **C.** Fase estacionaria de crecimiento. Se observa un marcaje en el exterior de las células. Aumento 31500x. Barra 0.5 $\mu$ m.

### 7.7.2.2. Localización ultraestructural de galactosa



**Fig. 23.** Marcaje de galactosa en la pared celular de la cepa de *N. brasiliensis* ATCC700358 en las tres fases de crecimiento. **A.** Fase lag de crecimiento. Se observa un marcaje de galactosa (en rojo) de manera irregular fuera y en la periferia de las células. **B.** Fase log de crecimiento. Disminución en el marcaje de galactosa fuera y en la periferia de las células respecto a A. **C.** Fase estacionaria de crecimiento. La cantidad de marcaje es constante respecto a B tanto en la periferia como en el exterior de las células. Aumento 31500x. Barra 0.5 $\mu$ m.



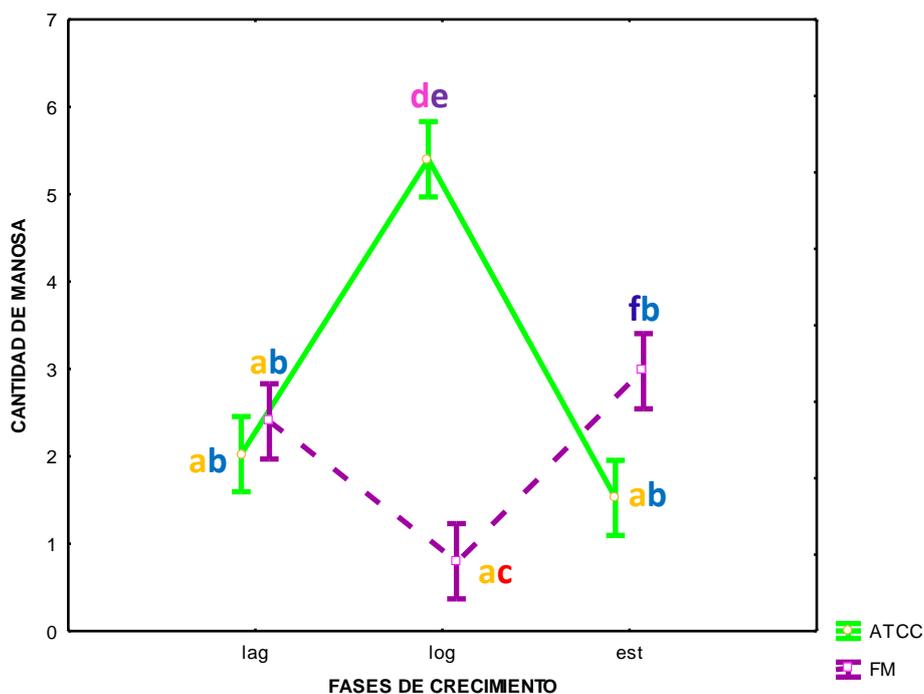
**Fig. 24.** Marcaje de **galactosa** en la pared celular del aislado de *N. brasiliensis* FM825 de en las tres fases de crecimiento. **A.** Fase lag de crecimiento. El marcaje de galactosa se observa en la periferia de las células y fuera de ellas. **B.** Fase log de crecimiento. Disminución en el marcaje de galactosa en dónde solo se observa un cúmulo de azúcares (en rojo). **C.** Fase estacionaria de crecimiento. La cantidad del marcaje es similar al de A y B. En las tres fases de crecimiento se observa una disminución en el marcaje respecto a la cepa de referencia ATCC700358, Fig. 23. Aumento 31500x. Barra 0.5 $\mu$ m.

## 7.8. Análisis estadísticos

Para la valoración de la cuantificación de manosa entre la cepa de referencia ATCC700358 y el asilado clínico FM825 de *N. brasiliensis* se realizó prueba de ANOVA de dos vías que demostró diferencias significativas ( $F=28.13$ ,  $g.l.=2,234$ ,  $p<0.001$ ). Los resultados de la prueba de Tukey para conocer las diferencias en la cantidad de manosa en las diferentes fases de crecimiento de la cepa de referencia y el aislado clínico de *N. brasiliensis* se muestran en la Fig. 25.

En la cepa de referencia ATCC700358 se demostró que existen diferencias significativas entre la fase de crecimiento log respecto a la fase lag y estacionaria, las cuales no mostraron diferencias entre si. En *N. brasiliensis* FM825 la fase lag y log no mostraron diferencias significativas, mientras que la fase estacionaria mostró diferencias entre estas dos últimas.

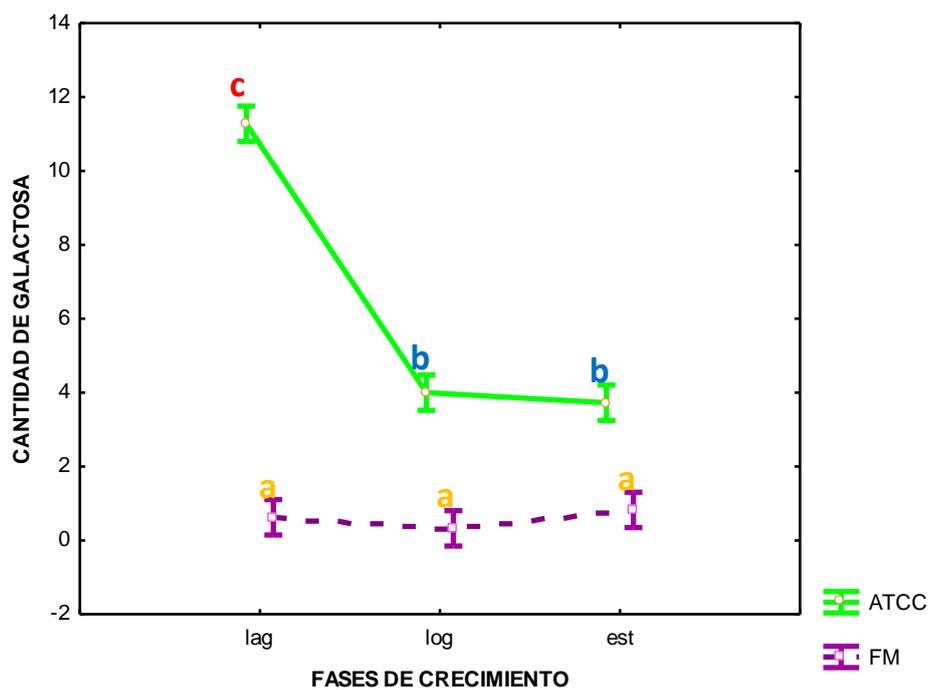
Al relacionar ambas cepas se demostró que existen diferencias significativas entre las fases de crecimiento log (cepa de referencia ATCC700358 ( $\bar{x}=5.4$ ) y aislado clínico FM824 ( $\bar{x}=0.8$ )) respecto a las fases lag y estacionaria, las cuales no mostraron diferencias entre si.



**Fig. 25.** Media  $\pm$  el error estándar del conteo de manosa en cortes de la cepa de referencia ATCC700358 y el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis*. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

Respecto a la cantidad de galactosa entre la cepa de referencia ATCC700358 y el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis* la ANOVA de dos vías demostró diferencias significativas ( $F=39.66$ ,  $g.l.=2,234$ ,  $p<0.001$ ). Los resultados de la prueba de Tukey (Fig. 26) demostraron que existen diferencias significativas en el aislado clínico ATCC700358 entre la fase de crecimiento lag respecto a las fases log y estacionaria, las cuales no mostraron diferencias entre si.

En el caso del aislado clínico FM825 no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de galactosa en las tres fases de crecimiento. Por otro lado, al comparar la cantidad de galactosa se demostró que existen diferencias significativas ya que la cepa de referencia presentó una mayor cantidad de galactosa en todas sus fases a diferencia de la cantidad de galactosa observada en las fases del aislado clínico.



**Fig. 26.** Media  $\pm$  el error estándar del conteo de galactosa en cortes de la cepa de referencia ATCC700358 y el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis*. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

## VIII) DISCUSIÓN

La tipificación del aislado clínico FM825 permitió el uso de esta cepa para identificar manosa y galactosa en su pared celular y compararla con los resultados obtenidos con la cepa de referencia ATCC700358 de *N. brasiliensis*. La obtención de una curva de crecimiento resultó ser una herramienta útil para comparar la morfología de ambas cepas.

Nuestros resultados difirieron a los descritos por Beaman en 1975 y 1987<sup>(6,9)</sup> respecto al tiempo de crecimiento y la morfología en *N. asteroides*. La curva de crecimiento descrita por Beaman<sup>(6,9)</sup> demostró que la fase lag fue a las 5 h de crecimiento; en el presente trabajo la cepa de referencia ATCC700358 de *N. brasiliensis* alcanzó la fase lag a los 7 días de crecimiento. Esta fase se caracterizó por la presencia de estructuras filamentosas cortas, largas, únicas o ramificadas a diferencia de lo descrito por Beaman para *N. asteroides*, la cual únicamente desarrolla estructuras similares a cocos y estructuras cocoides.

En la fase log, tanto *N. asteroides*<sup>(6,9)</sup> como las cepas de *N. brasiliensis* trabajadas por nosotros desarrollaron filamentos únicos y ramificados, aunque hubo diferencias en las nuestras en cuanto al tiempo requerido para alcanzar la fase log ya que en *N. asteroides* es de 16 h y en *N. brasiliensis* fue de 12 días.

En la fase estacionaria observamos filamentos cortos y largos irregulares luego de 34 días de crecimiento. Esto es diferente también a lo informado por Beaman<sup>(6,9)</sup> quien observa esta fase de crecimiento en *N. asteroides* a las 55 h de incubación y sólo describe formas cocoides.

El diámetro de las células bacilares de *N. brasiliensis* reportado por Sandoval en 1994<sup>(54)</sup> es de alrededor de 1µm mientras que Hernández en 1994<sup>(32)</sup> reporta un diámetro de 0.7-0.8µm. En el presente trabajo encontramos que el diámetro aproximado de *N. brasiliensis* fue de 0.5µm en todas las fases de crecimiento y formas celulares.

Beaman <sup>(6,7,9)</sup> reporta que todas estas diferencias se deben a que las cepas de *Nocardia* tienen diferente grado de virulencia y capacidad para inducir un actinomicetoma. Sin embargo, Conde y colaboradores en 1982 <sup>(17)</sup> demostraron que las fases de crecimiento de *Nocardia* no influían en la producción de actinomicetoma en el modelo murino por lo que Beaman y Sugar en 1983 <sup>(8)</sup> propusieron que la reproducción experimental del actinomicetoma en ratones se puede atribuir al uso de distintas cepas con diferentes velocidades de crecimiento. En las micrografías electrónicas de este trabajo observamos que en el aislado clínico FM825 se alcanza más rápido la fase log respecto a la de la cepa de referencia ATCC700385, lo cual podría ser una estrategia favorable de la FM825 para provocar más fácilmente un actinomicetoma. Esto puede deberse al tiempo de aislamiento clínico que tienen ambas cepas ya que la ATCC700385 se aisló en la década de los 90's mientras que la cepa FM825 se aisló en el 2007. <sup>(50)</sup>

En este trabajo se identificó manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*, se determinó la distribución de estos azúcares y se valoró la cantidad de estos componentes sacarídicos en las fase lag, log y estacionaria de la cepa de referencia ATCC700825 y el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis*.

En 1962, Zamora y colaboradores <sup>(62)</sup> encontraron la presencia de manosa, galactosa y arabinosa en extractos celulares de las cepas de *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. La identificación de carbohidratos por medio de histoquímica con lectinas biotiniladas es útil para estudiar la presencia, localización y distribución de azúcares o moléculas glucosidadas a nivel tisular, celular y subcelular. <sup>(21,54,56)</sup> Por medio de esta técnica pudimos confirmar la presencia de manosa y galactosa así como observar la localización irregular de estos azúcares en la pared celular de *N. brasiliensis*.

Palma y colaboradores en el 2005 y 2006 <sup>(46,47)</sup> demostraron la presencia de polisacáridos en los granos de varios actinomicetos y eumicetos, entre ellos, *N. brasiliensis*.

Además, demostraron que los polisacáridos que constituían el cemento de unión en actinomicetos eran de tipo neutro y secretados por los microorganismos. Esta evidencia podría explicar, en parte, la localización de manosa y galactosa que identificamos en el presente trabajo. La distribución irregular de estos componentes sacarídicos de la pared celular en medio de cultivo podría ser análoga al cemento de unión de granos cuando *N. brasiliensis* se aloja en el hospedero.

La importancia de la localización y distribución de los azúcares de superficie celular es que está relacionada con la patogenicidad como lo menciona Ehlers y colaboradores en 1998.

<sup>(23)</sup> En algunos agentes patógenos como *M. tuberculosis*, los azúcares juegan un papel importante en el reconocimiento celular y en la supervivencia dentro del hospedero.

<sup>(1,12,15,16,20,23-25,30,48,49,53,57-60)</sup> Adams y cols. en 1993 y Chatterjee y cols. en 1992 <sup>(1,15)</sup> demostraron que las cepas de *M. tuberculosis* virulentas y no virulentas, difieren en la capacidad de inducir la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF), el cual está implicado en la regulación de la respuesta inmune que modula la manifestación de enfermedades producidas por agentes infecciosos. Estas diferencias se deben a los azúcares que exhibe la lipoarabinomanana (LAM), ya que en cepas no virulentas la LAM está formada por regiones de arabinosa terminal que evocan una alta producción de TNF en contraste con las cepas virulentas en donde la LAM contiene regiones de manosa terminal que provoca una baja producción de dicha citocina y por lo tanto, provoca una mayor supervivencia en el hospedero. Estos autores infieren que las unidades de manosa terminal reflejan una adaptación de las Micobacterias que le han permitido sobrevivir dentro de su hospedero.

Debido a que en el presente trabajo se identificó la presencia de manosa en la pared celular de *N. brasiliensis*, se sugiere que en esta especie puede existir una molécula similar a la LAM encontrada en *M. tuberculosis* que pudiera estar involucrada en la supervivencia dentro del hospedero.

Otra función importante de los azúcares de superficie celular, fue descrita por Schlesinger y colaboradores en 1994 <sup>(53)</sup> los cuales demostraron que la fagocitosis no opsonizante de una cepa virulenta de *M. tuberculosis* esta mediada por el receptor de manosa en macrófagos. Este receptor capta unidades de manosa terminal en las Micobacterias lo que les permite introducirse en los macrófagos sin ser opsonizados y por lo tanto sobrevivir y reproducirse dentro de estas células.

En general, en este trabajo se observó que la cantidad de manosa en la cepa de referencia ATCC700358 y el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis* es mayor respecto a la cantidad de galactosa. Como lo mencionan Varcellone <sup>(60)</sup> y Brennan, <sup>(13)</sup> esto puede deberse a que existe una mayor cantidad de moléculas en las que puede estar asociada la manosa, tales como LAM, fosfatidil inositol manosidasa (PIM), lipomanana (LM) o residuos de manosa asociados a la superficie celular. Mientras tanto, la arabinogalactana ha sido descrita como la única molécula que contiene residuos de galactosa y que es necesaria para la formación de la pared celular. <sup>(18,19)</sup>

En la cepa de referencia ATCC700358 existen diferencias significativas en la cantidad de manosa en la fase log de crecimiento respecto a las fases lag y estacionaria. Esto puede deberse a que en la fase log la masa bacteriana aumenta. Por otro lado la cantidad de manosa en fase estacionaria estaría relacionada con el decremento de la población bacteriana. En cambio, en el aislado clínico FM825 no se encontraron diferencias significativas entre la fase lag y log de crecimiento, siendo la fase estacionaria diferente de estas dos últimas. Esto puede deberse a que el aislado clínico FM825 presenta una velocidad de crecimiento más rápida respecto a la observada en la cepa de referencia ATCC700825 como se menciona más adelante.

La cantidad de manosa *N. brasiliensis* ATCC700358 y *N. brasiliensis* FM825 en sus distintas fases de crecimiento, no mostró diferencias significativas entre la fase lag y

estacionaria, siendo las fases log significativamente diferentes entre cepas. Esto puede deberse a que la velocidad de crecimiento de *N. brasiliensis* FM825 es diferente a la velocidad de crecimiento de la cepa ATCC700358. Este hecho se sustenta con la morfología observada en las micrografías electrónicas del aislado clínico FM825, en donde en las dos primeras fases predominan los filamentos largos y filamentos ramificados. Debido a esto, se sugiere que la fase lag de *N. brasiliensis* FM825 es más corta respecto a la observada en la cepa de referencia ATCC700358. Por lo tanto, se sugiere que las imágenes que se observaron como fase de crecimiento lag y log deberían ser consideradas como fase log. Las diferencias en las velocidades de crecimiento entre ambas cepas pueden deberse a los cambios que han sufrido tras ser resembradas constantemente durante un largo periodo de tiempo ya que la cepa de referencia ATCC700358 se aisló en la década de los 90's y la cepa FM825 en el 2007. <sup>(50)</sup>

Respecto al marcaje con galactosa se observaron diferencias significativas en las tres fases de crecimiento de ambas cepas de *N. brasiliensis*. La cepa ATCC700358 inicia con una cantidad elevada de galactosa pero tiende a disminuir de manera constante. Esta evidencia se podría justificar por qué la galactosa es un azúcar de importancia estructural <sup>(18,19)</sup> para la formación de la pared celular y forma parte de los polisacáridos para la formación del cemento de unión a granos, <sup>(46,47)</sup> la cual no es esencial en un medio de cultivo debido a que no está implicada en la sobrevivencia. De igual manera, se sugiere que este fenómeno podría estar ocurriendo en la cepa FM825.

La especificidad del marcaje se comprobó con los controles positivo y negativo en los cortes celulares de *M. tuberculosis* ya que en esta especie, se ha confirmado la presencia de manosa y galactosa en su pared celular. <sup>(12)</sup>

## IX) CONCLUSIONES

- Cada cepa mostro una morfología diferente en las tres fases de crecimiento.
- La localización de manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis* es irregular.
- La cantidad de manosa y galactosa es diferente en las tres etapas de crecimiento de las cepas de *N. brasiliensis*.
- El marcaje utilizado en este estudio fue específico para manosa y galactosa en la pared celular de *N. brasiliensis*.

## X) PERSPECTIVAS

- Corroborar que la curva de crecimiento es característica de cada cepa.
- Determinar la cantidad de manosa y galactosa con la técnica de HPLC.
- Obtener las fracciones sacarídicas purificadas de la pared celular de *N. brasiliensis* para demostrar el reconocimiento por células fagocíticas.

## XI) REFERENCIAS

1. Adams, L.B., Y. Fukutomi & J.L Krahenbuhl. *Regulation of murine macrophage effector function by lipoarabinomannan from mycobacterial strain with different degrees of virulence.* Infect Immun. 1993, 61:4173-4181.
2. Arenas, R.G. 2008. *Micología Médica Ilustrada.* 3ª Ed. Mc Graw Hill.
3. Astaire-Dequer, C., E.N. N'Diaye, V. Le Cabec, M.G. Ritting, J. Prandi & I. Maridonneau-Parini. *The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages.* Infect Immun. 1999, 67:469-477.
4. Azuma, I., D. W. Thomas, A. Adam, J. M. Ghuyssen, R. Bonaly, J. F. Petit, & E. Lederer. *Occurrence of N-glycolylmuramic acid in bacterial cell walls. A preliminary survey.* Biochim Biophys Acta. 1970,208:444-451.
5. Azuma, I., F. Kanetsuna, Y. Tanaka, M. Mera, Y. Yanagihara, I. Mifuchi, & Y. Yamamura. *Partial chemical characterization of the cell wall of Nocardia asteroides strain 131.* J Microbiol. 1973,17:154-159.
6. Beaman, B.L. *Structural Biochemical Alterations of Nocardia asteroides cell walls during its growth cycle.* J Bacteriol. 1975, 123:3:1235-1253.
7. Beaman, B.L. & S. Maslan. *Virulence of Nocardia asteroides during its growth cycle.* Infect Immun. 1978, 20: 290-295.
8. Beaman, B.L. & A.M. Sugar. *Nocardia in naturally acquired and experimental infections in animals.* J Hyg. 1983, 91: 393-419.
9. Beaman, B.L. & S.E. Moring. *Relationship among Cell Wall composition, stage of growth and virulence of Nocardia asteroides GUH-2.* Infect Immun. 1987, 56:557-563.
10. Beaman, B.L. & L. Beaman. *Nocardia Species: Host-Parasite Relationships.* Clin Microbiol Rev. 1994, 7:2:213-264.
11. Berd, D. *Laboratory Identification of Clinically important aerobic Actinomycetes.* Appl Microbiol. 1973, 25:4:665-681.
12. Brennan, P.J. & H. Nikaido. *The envelope of Mycobacteria.* Annu Rev Biochem. 1995, 64:29-63.
13. Brennan, P.J. *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis.* Tuberculosis. 2003, 83:91-97.
14. Brown, B.A., J.M. Brown, P.S. Conville, & R. J. Wallace. *Clinical and Laboratory Features of the Nocardia spp. Based on Current Molecular Taxonomy.* Clin Microbiol Rev. 2006, 19:2:259-282.
15. Chatterjee, D., D. Roberts, K. Lowell, P.J. Brennan & I.M. Orme. *Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor.* Infect Immun. 1992, 60:3:1249-1253.
16. Chatterjee, D. & K-H Khoo. *The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties.* Cell Mol Life Sci. 2001, 58: 2018-2042.

17. Conde C., E.I. Melendro, M. Fresan, and L. Ortiz-Ortiz. *Nocardia brasiliensis micetoma induction and growth cycle*. Infect Immun. 1982, 38: 1291-1295.
18. Crick, D.C., S. Mahapatra, P.J. Brennan. *Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis*. Glycobiol. 2001, 11:107-118.
19. Crick, D.C., P.J. Brennan & M.R. Mcneil. *The cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. En: Rom, W.N. & S.M. Garay. Tuberculosis. 2a Ed. LWW. USA. 2004. 115-134.
20. Daffé, M., P. Draper. *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*. Adv Microb Physiol. 1998, 39:131-203.
21. Damjanov, I. *Biology of disease: Lectin cytochemistry and histochemistry*. Lab Invest. 1987, 57:1: 5-20.
22. Dubois, M., K. Giles, J. Hamilton, P. Rebers & F. Smith. *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal Chem. 1956, 28:3:350-356.
23. Ehlers, R.W.M. & M. Daffé. *Interactions between Mycobacterium tuberculosis and host cells: are mycobacterial sugars the key?*. Trends Microbiol. 1998, 6:8:328-335.
24. Ernst, J.D. *Macrophage Receptors for Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1998, 66:4:1277-1281.
25. Fenton, J.M. & M.W. Vermeulen. *Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes*. Infect Immun. 1996, 64:3:683-690.
26. Fuentes, A., R. Arenas, M. Reyes, R.F. Fernández y R. Zacarías. *Actinomycetoma por Nocardia sp. Informe de cinco casos tratados con imipemem solo o combinado con amikacina*. Gac Méd Méx, México. 2006, 142:3:247-252.
27. Gevorkian, G. E. Segura, G. Acero, J.P. Palma, C. Espitia, K. Manoutcharian & L.M. López-Marin. *Peptide mimotopes of Mycobacterium tuberculosis carbohydrate Immunodeterminants*. Biochem. J. 2005, 387:411-417.
28. Goldstein I J, R.C.Hughes, M. Monsigny, T. Osawa & N. Sharon. *What should be called a lectin?* Nature, 1980, 66: 285-286.
29. Goodfellow, M. *Ecology of Actinomycetes*. Annual Review f Microbiology, England, United Kindom. 1983, 37:189-216.
30. Gorocica, P., M.J. Martínez, Y. Garfias, I. Sada y R. Lascrain. *Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2005, 18:2:142-153.
31. Hernández, C.P., E.C. Pérez, M.L. Martínez, B. Ortiz y G. Martínez. *Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato*. REB. 2005, 24:1: 21-27.
32. Hernández, H.F. *Efecto de las hormonas sexuales humanas en el micetoma experimental y sobre el desarrollo "in vitro" de Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Micología Médica. Facultad de Medicina, UNAM. 1994.
33. Hernández, H.F. *Epidemiología del micetoma, etiología del eumicetoma*. En: Actualidades en Micología Médica 4a ed. VII Diplomado de Micología Médica. 2008, 155-162.
34. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. T. A. Sneath, J.T. Staley & S. T. Williams. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9a ed. Lippincott Williams and Wilkins. U. S. A. 787 pp.

35. Ingraham, J.L. & C.A. Ingraham. 2000. *Introduction to Microbiology*. 2ª ed. Brooks/Cole. Thomson Learning. U. S. A. 804 pp.
36. Keane, J., M. K. Balcewicz-Salinska, H.G. Remold, G.L. Chupp, B.B. Meek, M.J. Fenton & H. Kornfeld. *Infection by Mycobacterium tuberculosis Promotes Human Alveolar Macrophage Apoptosis*. Infect Immun. 1997, 65:1:298-304.
37. Kwapinski J.B. Antigenic structure of Actinomycetales. J Bacteriol. 1963.
38. Lechevalier H.A. & M. P. Lechevalier. *Biology of Actinomycetes*. Annu Rev Microbiol. 1967, 21:71-100.
39. López-Marin, L.M., M.A. Lanéelle, D. Promé, M. Daffé, G. Laneéelle & J.C. Promé. *Glycolipids from Mycobacterium fortuitum: A variant in the structure of C-Mycoside*. Biochem. 1991, 30:43:10536-10542.
40. López-Martínez, .R., L.J. Méndez, P. Lavalle, o. Welsh, A. Saul, E. Macotela. *Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos*. Gac Med Mex. 1992, 128:4
41. López, Martínez, R., L.J. Méndez, F. Hernández, R. Castañón. 2004. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2a Ed. Trillas.
42. López-Martínez, .R. y L.J. Méndez. *Datos epidemiológicos del micetoma en México*. Monografías de Dermatología. 2006, 19:1:5-12.
43. Madigan, M.T. & J.M. Martinko. 2006. *Brock's Biology of Microorganisms*. Prentice Hall.
44. Morrison, R.T. & R.N. Boyd. 1973. *Organic Chemistry*. 3a ed. Allyn And Bacon Inc. U. S. A. 1258 pp.
45. Ormeño, O.E. *Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis*. Rev Latinoam Microbiol. 2005, 47 (3-4): 165-175.
46. Palma, R.A., L.R. Castrillón, C.D. Padilla y F. Reyes. *Caracterización histoquímica de micetomas por Actinomadura madurae, Nocardia brasiliensis y Madurella mycetomatis*. Dermatol Rev Mex. 2005, 49: 51-58.
47. Palma, R.A., L.R. Castrillón, C.D. Padilla, L.H. Rosas y C. Marquez. *Purificación y determinación de la estructura de polisacáridos que forman el cemento de unión en granos de actinomycetomas ocasionados por Actinomadura madurae y Nocardia brasiliensis*. Dermatol Rev Mex. 2006, 50: 165-173.
48. Prigozy, T.I., A.P. Sieling, D. Clemens, P.H. Stewart, S.M. Behar, S.A. Porcelli, M.B. Brenner, R.L. Modlin & M. Kronenberg. *The mannose receptor delivers Lypoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules*. Immunity. 1997, 6:187-197.
49. Saavedra, R., E. Segura, R. Leyva, L.A. Esparza & L.M. López-Marin. *Mycobacterial Di-O-Acyl-Trehalose Inhibits Mitogen- and Antigen-Induced Proliferation of Murine T Cells In Vitro*. Clin Diagn Lab Immunol. 2001, 8:6:1081-1088.
50. Salinas-Carmona, M.C., E. Torres-Lopez, A.I. Ramos, A. Licon-Trillo y D. Gonzalez-Spencer. *Immune Response to Nocardia brasiliensis Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice*. Infect Immun. 1999, 67:5:2428-2432.

51. Salinas-Carmona, M.C. Capítulo V. *La respuesta del huésped a la infección por Nocardia brasiliensis*. En: ACTINOMICETOMA. Serrano, J.A., A.H. Sandoval & B.L. Beaman. Venezuela. 2005.
52. Sandoval, H. y J.A. Serrano. 1996. *Identificación y diagnóstico de actinomicetos patógenos*. Universidad Autónoma Metropolitana.
53. Schlesinger, L.S., S.R. Hull y T.M. Kaufman. *Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages*. J Immunol. 1994, 125:4070-4079.
54. Sharon, N., H. Lis. *Lectins as cell recognition molecules*. Science 1989, 246:277-234.
55. Sharon, N., H. Lis. *Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition*. Chem Rev. 1998, 98:2:637-674.
56. Slifkin, M. *Application of lectins in clinical bacteriology*. En: Doyle, R.J. & M. Slifkin. *Lectin-microorganism interactions*. Marcel Dekker Inc.USA. 1994. 393 pp.
57. Spargo, B.J., L.M. Crowe, T. Ionedá, B.L. Beaman & J.H. Crowe. *Cord factor ( $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles*. Proc Nat Acad. Sci. 1991, 88:737-740.
58. Sthal, P.D. & R.A. Ezekowitz. *The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense*. Curr Opin Immunol. 1998, 10:50-55.
59. Strohmeier, G.R. & J.M. Fenton. *Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 1999, 709-717.
60. Varcellone, A., J. Nigou & G. Puzo. *Relationship between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis*. Front Biosci. 1998, 3:149-163.
61. Villeneuve, C., G. Etienne, V. Abadie, H. Montrozier, C. Bordier, F. Laval, M. Daffe, I. M. Parini & C. Astarie-Dequeker. *Surface-exposed Glycopeptidolipids of Mycobacterium smegmatis Specifically Inhibit the Phagocytosis of Mycobacteria by Human Macrophages*. J Biol Chem. 2003, 278:51:51291-51300.
62. Zamora, A., L.F. Bojalil & F. Bastarrachera. *Immunologically active polisaccharides from Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis*. J Bacteriol. 1962
63. Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall.
64. <http://www.google.com.mx/patents?id=iro6AAAAEBAJ&printsec=abstract&zoom=4&dq=biotin+nocardia>