



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

DINÁMICA DE TLR2, TLR4 Y LAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ ,  
IFN- $\gamma$ , IL-1 E IL-10, DURANTE EL PROCESO  
INFLAMATORIO CRÓNICO PRESENTE EN EL  
ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL MURINO POR  
*Nocardia brasiliensis*.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

BLANCA EDITH MILLÁN CHIU

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Francisca Hernández Hernández

COMITÉ TUTOR: Dra. Luz María López Marín  
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MILLÁN CHIU BLANCA EDITH** con número de cuenta **95310167** con la tesis titulada: **"DINÁMICA DE TLR2, TLR4 Y LA CITOCINAS TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, e IL-10 DURANTE EL PROCESO INFLAMATORIO CRÓNICO PRESENTE EN EL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL MURINO POR *Nocardia brasiliensis*"** realizada bajo la dirección de : **DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

Presidente: DR. LUIS SERVIN GONZÁLEZ  
Vocal: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN  
Secretario: DR. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL  
Suplente: DRA. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ  
Suplente: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de agosto de 2011

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## Agradecimientos

- Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM), por haberme dado la oportunidad de ingresar y continuar con mis estudios.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico que se me otorgó durante la realización de mis estudios de posgrado.
- Al **CONACyT** por el apoyo financiero brindado para el proyecto de investigación número 84272 titulado “Regulación de la inflamación crónica presente en el micetoma por *Nocardia brasiliensis* a través de TLR2 y/o TLR4”, fundamental para la obtención de equipo y material.
- Al **Comité Tutorial**: Dra. Luz María López Marín, Dr. Ricardo Lascurain Ledesma y Dra. Francisca Hernández Hernández, por sus valiosas aportaciones y enseñanza.
- A los Doctores **Luis Servin González, María del Carmen Maldonado Bernal y Alejandro Escobar Gutiérrez** por su participación como miembros del jurado de evaluación y por sus valiosos comentarios que permitieron mejorar este trabajo.

## Agradecimientos

A la ***Dra. Francisca Hernández Hernández***, Jefa del Laboratorio de Micología Molecular y mi asesora principal durante la realización de este proyecto. Gracias Doctora Francisca, ya que es a usted la persona a la que debo gran parte de mi formación académica. Gracias también por todo el apoyo, enseñanzas y consejos durante mi larga estancia en el laboratorio, por confiar en mí y en mi capacidad. Y sobre todo le agradezco el haber sido mi amiga y soporte.

Al ***Dr. Rubén López Martínez***, Jefe del Laboratorio de Micología Médica, por permitirme desarrollar parte de este proyecto en el laboratorio y por todos los consejos y apoyo que me ha brindado durante todos estos años.

A La ***Dra. Patricia Manzano Gayosso***, quien también ha contribuido grandemente con mi formación académica. Gracias por ser una buena amiga y un gran soporte durante tanto tiempo.

A la ***Dra. Rosio Castañón Olivares***, por su apoyo y amistad.

A la ***Bióloga Elva Bazan Mora***, quien me asesoró en el área técnica y académica en el área de la micología médica en incontables ocasiones. Gracias por todo, ya que más que una amiga, has sido parte importante de la familia que encontré en el laboratorio de Micología.

A la ***QFB. Erika Córdova Martínez***, por su asesoría, apoyo y enseñanza en el área molecular. Gracias por ser como mi hermana, eres una gran amiga, te quiero.

Al ***Dr. Armando Pérez Torres***, parte fundamental en mi aprendizaje durante el posgrado, gracias por sus consejos y enseñanza en el área de histopatología. Gracias también por la bella amistad que me ha otorgado.

Al ***Dr. Luis Javier Méndez Tovar***, gracias por animarme a superarme, por todos sus consejos y enseñanza académica, pero sobre todo, gracias por confiar en mí y por brindarme su amistad.

## Agradecimientos

A *Ivonne Grisel Sánchez Cervantes* e *Irma Elena López Martínez*, por su apoyo técnico en inmunohistoquímica y por su bella amistad.

A *Verónica Rodríguez Mata* y al laboratorio de Técnicas Histológicas por su apoyo en la realización de cortes histológicos y tinciones requeridas para este estudio. Gracias también por ser tan buena amiga.

A *Edith Fernández Figueroa*, por el apoyo técnico y académico que me ha dado. Gracias por ser una amiga incondicional y por todo lo que me has ayudado. Te quiero.

Al **Bioterio de la Facultad de Medicina** por proporcionar los ratones empleados para el desarrollo del modelo experimental.

Al **Departamento de Audiovisuales** de la Facultad de Medicina y del Posgrado en Ciencias Biológicas, por su apoyo para la realización de exámenes a través de videoconferencia.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

A mi esposo, novio, amigo y tantas cosas más... *Sergio H. Torres Martínez*, gracias por todo tu apoyo y por el amor que me has dado. **Te amo.**

A las personas que han estado en el laboratorio, *Rosita, José Luis, Sandra, Karina*, y a todos los que no enlisto gracias por haberme brindado su valiosa amistad. Y a los que siguen ahí: *Vero, Elda, Viviana, Ana, Sol*, a mis niñas *Mariana y Pao* y mi niño *Kevin*; a todos gracias por seguir aguantándome y apoyándome.

A *Jamie Zabicky*, gracias por ser una gran amiga, por estar siempre ahí. Gracias por organizar ese excelente viaje, en el que aprendimos, nos reímos, nos enojamos etc., etc. Con mucho cariño te agradezco todo.

## Agradecimientos

A *Edith Sánchez Paredes*, por su consejo académico y por su amistad.

A *Amelia, Hortensia, Miguel, Jorge, Dra. Conchita* y todas las personas de los laboratorios cercanos que me han ayudado y escuchado siempre, gracias por su magnífica amistad.

Al personal de la Unidad Administrativa de la Facultad de Medicina, UNAM. A *Heriberto, Ricardo, Ernesto, Blanca y Margarita*, por su apoyo en la parte administrativa y por recibirme siempre tan alegremente.

A *Elia Salazar Bernal*, una de mis mejores amigas y hermana, gracias por seguir al pie del cañón siempre en la mejor disposición de ayudarme y escucharme. Gracias también por ese premio que en parte fue debido a tu ayuda. Te quiero mucho.

A *Samanta Saucedo Gutiérrez*, porque aunque no estés por acá me has hecho saber que puedo contar contigo. Siempre serás como mi hermana, te quiero mucho.

A *Karina Díaz*, a pesar de nuestro reciente reencuentro, me has demostrado que sigues ahí siempre dispuesta a apoyarme.

A mi queridísima *Yobeneth Moreno*, mi amiga y cómplice, te quiero.

A mis hermanos *Julia, Abel y Gerardo*, y mis sobrinos *Rebeca, Jesús y Ángela*, lo que más quiero en este mundo después de mis padres *Gerardo Millán* y *Gloria Chiu*. A toda mi familia le agradezco todo su amor y apoyo.

A mi familia adoptiva, *María Elena y Enriqueta Gutiérrez* y a *Alinka Virchez*, gracias por escucharme y ayudarme a desetresarme casi todos los viernes, gracias mis queridas UVAs. Las quiero mucho.

## Agradecimientos

A mi queridísima amiga **Brenda a Clem** y a **Sofía**, saben que los quiero, y que en algún momento iré a donde quiera que estén.

A **Marce**, por ser tan querida amiga y a **Samuel**, gracias por ser tan buen amigo, y también gracias por todas las veces que me has ayudado, los quiero.

A **Efren Morales**, por la gran cantidad de veces que me has ayudado en muchos aspectos, gracias por estar ahí, por ser un gran apoyo, te quiero.

A mis queridísimos amigos de UNIVESUM, **José Luis, Alberto, Siyuly, Roberto, Carolina, Teresa, Angel**, y a los amigos que derivaron de ahí, **Orlando y Nestor**; porque aún después de tantos años y a pesar de tener tantas ocupaciones seguimos juntos.

A mi mejor amigo y cómplice **Jacob Villavicencio**, y su excelente y hermosa compañera de vida **Karla**, los quiero.

A todas las personas que en algún momento he conocido y que me han aportado enseñanza académica y personal, pero también por las anécdotas o vivencias que me han permitido compartir con ustedes.



## *Dedicatoria*

*A mis padres que me dieron la vida y la educación  
necesaria.*

*Les dedico esta obra ya que es gracias al esfuerzo  
que han hecho siempre y al apoyo que me dan con  
tanto cariño.*

*A mí querido esposo Sergio, que siempre está a mi  
lado ofreciendo su apoyo y amor.*

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>18</b>
<hr/>	
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>19</b>
INMUNIDAD	19
INFLAMACIÓN	21
Receptores tipo Toll (TLRs)	24
Toll-like Receptor 2 (TLR2)	27
Toll-like Receptor 4 (TLR4)	29
Vía de señalización de TLRs	30
CITOCINAS	32
Quimiocinas	32
Otras Citocinas	33
Inmunidad Adaptativa, balance Th1-Th2	36
Tipos de Inflamación	37
MICETOMA	39
Epidemiología	39
Fisiopatogenia	41
<i>NOCARDIA BRASILIENSIS</i>	42
Clasificación taxonómica	42
Morfología macroscópica	45
Morfología microscópica	45
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>46</b>
RESPUESTA INMUNE DURANTE EL MICETOMA	46
PAPEL DE TLR2 Y TLR4 EN LA INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM	48
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>51</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>52</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
GENERAL	53
PARTICULARES	53
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>54</b>
INDUCCIÓN DEL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL	54
PREPARACIÓN DEL INOCULO BACTERIANO	54
RATONES	55
ESTUDIO HISTOLÓGICO	55
DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TLR2, TLR4 Y CITOCINAS	56
Extracción de RNA	56
RT-PCR	56

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO	60
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TLR2 Y DE TLR4 POR INMUNOHISTOQUÍMICA	60

## **CAPÍTULO 2** **62**

---

<b>RESULTADOS</b>	<b>63</b>
INDUCCIÓN DEL ACTINOMICETOMA	63
DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA	64
EXPRESIÓN DE TLR2 Y TLR4 DETECTADA POR RT-PCR	71
Expresión de TLR2 determinada por densitometría	73
Expresión de TLR4 determinada por densitometría	73
EXPRESIÓN <i>IN SITU</i> DE TLR2 DETECTADA POR INMUNOHISTOQUÍMICA	75
EXPRESIÓN <i>IN SITU</i> DE TLR4 DETECTADA POR INMUNOHISTOQUÍMICA	75
EXPRESIÓN DE CITOCINAS DETECTADA POR RT-PCR	79
Expresión de IL-1 $\beta$	81
Expresión de IL-2	81
Expresión de IL-6	81
Expresión de IL-10	81
Expresión de IL-12	82
Expresión de TNF- $\alpha$	82
Expresión de IFN- $\gamma$	82
Expresión de TGF- $\beta$	82

## **CAPÍTULO 3** **90**

---

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
POBLACIONES CELULARES IDENTIFICADAS POR SU MORFOLOGÍA	91
EXPRESIÓN DE TLRs	93
EXPRESIÓN DE CITOCINAS	95
CORRELACIÓN DE TLRs Y CITOCINAS	98
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>101</b>

## **CAPÍTULO 4** **102**

---

<b>REFERENCIAS</b>	<b>103</b>
--------------------	------------

## **CAPÍTULO 5** **119**

---

<b>PRODUCCIÓN EN INVESTIGACIÓN</b>	<b>119</b>
------------------------------------	------------

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dimerización de TLRs transmembranales, conformación en homodímero (TLR2:TLR2) o heterodímero (TLR2:TLR1; TLR2:TLR6).	25
Figura 2. Moléculas triaciladas y diaciladas que interactúan con TLR2 (tomado de Jin et al., 2008).	28
Figura 3. Heterodímero TLR2:TLR1, interactuando con moléculas triaciladas de pared celular de bacterias Gram (+) (Tomado de Jin et al., 2007).	28
Figura 4. Estructura del lípido A del Lipopolisacárido de E. coli (Tomado de Jin et al., 2008).	29
Figura 5. Interacción de TLR4 con una de las dos moléculas accesorias (MD-2), la cual se une al lípido A del lipopolisacárido. Interacción de eritoran (molécula similar al lípido A) con MD-2 (Tomado de Jin et al., 2008).	30
Figura 6. Clasificación propuesta por Chun y Goodfellow en 1995, con base en la secuencia del gen 16S rRNA. Se muestran algunas especies de Nocardia reportadas como patógenas de animales y humanos, además de otros actinomicetos taxonómicamente relacionados como Mycobacterium.	43
Figura 7. Morfología macroscópica y microscópica de N. brasiliensis en Agar BHI y tinción de Kinyoun.	45
Figura 8. Condiciones de temperatura para las diferentes PCRs.	58
Figura 9. Desarrollo del proceso inflamatorio en la pata de los ratones a diferentes tiempos posteriores a la inoculación A) recién inoculado. B) 8 horas PI. C) 20 días PI. D) 50 días PI. E y F) 6 meses PI. La flecha indica una úlcera con tejido necrótico.	63
Figura 10. Cortes teñidos con hematoxilina-eosina. A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 4 horas PI, D) 8 horas PI, E) 48 horas PI, F) 10 días PI, G) 20 días PI, H) 50 días PI, I) 6 meses PI. Escala = 20µm	67
Figura 11. Cortes teñidos con azul de toluidina. A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 8 horas PI, D) 48 horas PI, E) 10 días PI, FE) 20 días PI, G-F) 50 días PI. Escala = 20 µm	68
Figura 12. Cortes teñidos con Gram, A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 8 horas PI, D) 10 días PI, E) 20 días PI, F) 6 meses PI. Escala = 20 µm	69
Figura 13. Cortes teñidos con Giemsa, A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 8 horas PI, D) 10 días PI, E) 20 días PI, F) 6 meses PI. Escala = 20 µm	70
Figura 14. Gel de desnaturalización de RNA total. Carriles: 1) Marcador de peso molecular para RNA; 2) RNA de tejido sano; 3) RNA 2h PI; 4) RNA 10 días PI; 5) RNA 50 días PI; 6) RNA 6 meses PI.	71
Figura 15. Productos obtenidos por RT-PCR usando los oligonucleótidos específicos para los genes de β-actina, TLR2 y TLR4 a diferentes tiempos. Carriles: 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2) ratones sanos (T0); de 3 a 10) ratones infectados; 11) control negativo de PCR.	72
Figura 16. Resultado del análisis densitométrico de los productos obtenidos por RT-PCR. Se muestra la media y desviación estándar de la expresión de TLR2 y TLR4 en los diferentes tiempos de estudio. (*) Valores con diferencia significativa respecto al valor basal (T0).	74

Figura 17. Localización celular de TLR2 en células inflamatorias durante el desarrollo del actinomicetoma. A) tejido sano con expresión constitutiva en queratinocitos. B) 2 horas PI, C) 4 horas PI, D) 8 horas PI, E) 48 horas PI, F) 10 días PI, G) 20 días PI, H) 50 días PI, I) 6 meses PI, J) control negativo. Escala = 20µm	77
Figura 18. Expresión de TLR4 en diversos cortes de tejido. A) Tejido sano con expresión en queratinocitos. B) 2 horas PI, C) 4 horas PI, D) 8 horas PI, E) 10 días PI, F) 20 días PI, G) control negativo. Escala = 20µm	78
Figura 19. A) Gel desnaturalizante con el RNA total de <i>N. brasiliensis</i> . En B), gel de agarosa al 1.5%. Carriles, 1: marcador de peso molecular (100pb); 2: PCR para TLR2; 3 y 4: RT-PCR para TLR2; 6: PCR para TLR4; 7 y 8: RT-PCR para TLR4; 10: PCR para $\beta$ -actina, 11 y 12: RT-PCR para $\beta$ -actina específica para tejido murino, 5, 9 y 13: controles negativos de PCR.	79
Figura 20. Expresión de citocinas detectadas por RT-PCR en el tejido murino durante el actinomicetoma experimental. Se muestran 3 carriles correspondientes a 3 ratones para cada tiempo ( $T_0$ = individuos sanos; C- = control negativo de PCR).	80
Figura 21. Expresión de mRNA de citocinas determinada por densitometría, durante el establecimiento y evolución del actinomicetoma, en el modelo murino. Se representa la cantidad de nanogramos (ng) de citocinas en 10 µl de producto de PCR. A ) IL- $\beta$ 1, B) IL-2, C) IL-6, D )IL-10, E) IL-12, F) TNF- $\alpha$ , G) IFN- $\gamma$ , H) TGF- $\beta$ , valores significativamente diferentes *.	83
Figura 21 continuación.	84
Figura 22. Correlación de la expresión entre TLRs y las diferentes citocinas estudiadas durante el proceso inflamatorio desarrollado en el actinomicetoma. Solamente se muestran las gráficas de TLRs y/o citocinas que presentaron correlación más alta.	87
Figura 22. Continuación 1.	88
Figura 22. Continuación 2.	89

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución celular de TLRs, PAMPs y moléculas de dimerización y/o accesorias (Lien et al., 1999; Frasnelli et al., 2005; Hasebe et al., 2007; O'Mahony DS, et al., 2008; Ospelt 2010). Distribución reportada como: *proteína, ** mRNA, ***ambos.	26
Cuadro 2. Características generales de las citocinas implicadas en el presente trabajo, lugar de síntesis, acción que ejercen en la inflamación y tipo de inmunidad adaptativa que inducen. (Angus, 1998; Booth, 2010; Malek, 2010; Parameswaran, 2010).	34
Cuadro 3. Lista de oligonucleótidos usados para la amplificación TLRs y citocinas durante la realización del presente estudio.	57
Cuadro 4. Valores de R y R <sup>2</sup> obtenidos en el análisis de correlación, del más alto al más pequeño.	86

## RESUMEN

**Introducción.** El actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* es una infección que se caracteriza por presentar un proceso inflamatorio crónico localizado en el sitio de inoculación traumática. Aunque afecta principalmente las extremidades inferiores, las lesiones cercanas a órganos vitales como pulmones y cerebro generalmente se asocian con resultados letales. Los Toll-like receptors (TLRs) son proteínas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) induciendo la producción de mediadores pro-inflamatorios, principalmente citocinas. *Nocardia* es una bacteria Gram positiva que expresa moléculas de superficie que podrían ser reconocidos por los TLRs, estimulando la producción de mediadores que regulen el desarrollo de un proceso inflamatorio. Se desconoce el papel de los TLRs así como la dinámica de producción de citocinas pro y anti- inflamatorias durante la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*.

**Objetivos.** Los propósitos del presente estudio fueron: 1) Identificar morfológicamente los tipos celulares presentes en el sitio de infección. 2) Localizar y cuantificar la expresión de mRNA TLR2 y TLR4 en células del sitio de inoculación; 3) Cuantificar la expresión del mRNA de las citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ ) en el sitio de infección. 4) Relacionar la expresión de TLR2 y TLR4 con la expresión de citocinas pro y anti- inflamatorias durante la evolución de la inflamación crónica en el actinomicetoma experimental murino por *N. brasiliensis*.

**Material y Métodos.** Se utilizaron 21 lotes de 4 ratones cada uno de la cepa silvestre Taconic, machos de 30 g y la cepa FM-825 de *Nocardia brasiliensis*, obtenida recientemente de un paciente con micetoma. La infección se realizó inyectando una suspensión bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> en el

cojinete plantar. Un lote fue usado como control sano ( $T_0$ ), cinco lotes fueron inoculados con solución salina isotónica; siete lotes fueron inoculados con carragenina como control de inflamación; ocho lotes fueron infectados con *N. brasiliensis*. Cada lote fue sacrificado a diferentes tiempos (2, 4, 8, 48 horas, 10, 20, 50 días y hasta 6 meses después de la infección). A partir de tres de los cuatro ratones se obtuvo el tejido del cojinete plantar para la extracción de RNA total. Por RT-PCR se obtuvieron amplificadores para los TLRs y para las citocinas. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa con bromuro de etidio, y los fragmentos obtenidos fueron cuantificados por densitometría a través del sistema EDAS 290 Kodak, los resultados fueron analizados por medio de las pruebas estadísticas One simple “t” test y análisis de correlación. Del ratón restante se obtuvo la pata completa y se procesó el tejido para inclusión en parafina y cortes histológicos, éstos fueron teñidos con hematoxilina-eosina, azul de toluidina, Gram y Giemsa. Cuatro cortes a diferentes niveles de cada muestra, fueron utilizados para evidenciar la localización de TLR2 y TLR4 en el sitio de infección por inmunohistoquímica.

**Resultados.** El estudio histológico mostró que los neutrófilos polimorfonucleares son las principales células de respuesta en la etapa aguda de la infección, mientras que durante la transición a etapa crónica predominan los macrófagos. A los 20 días se apreció gran número de fibroblastos y células espumosas. A los 50 días se encontraron numerosos granos rodeados de un notable proceso inflamatorio. Por PCR se mostró que la expresión del mRNA TLR2 se incrementó en todos los tiempos de estudio, mientras que el mRNA de TLR4 mostró una expresión descendente. Por inmunohistoquímica se localizó la expresión de ambos receptores en diferentes poblaciones celulares: en etapa aguda TLR2 se expresó en neutrófilos y macrófagos en contacto con el inóculo, mientras que TLR4 se observó en células cebadas. En etapa crónica TLR2 se expresó también en células espumosas y fibroblastos; TLR4 disminuyó notablemente su expresión. A través del análisis densitométrico se observó incremento en la expresión

del mRNA de las citocinas con efecto pro-inflamatorio (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) desde las primeras horas posteriores a la infección. También se observó incremento en el mRNA de las citocinas reguladoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ).

A través del análisis de correlación se determinó una relación inversa entre TLR2 y TLR4 ( $r = -0.388$ ). Se encontró una relación directa aunque débil, de TLR2 con el incremento en IL-1 $\beta$  ( $r^2 = 0.123$ ), IL-2 ( $r^2 = 0.151$ ), IL-12 ( $r^2 = 0.056$ ), TNF- $\alpha$  ( $r^2 = 0.088$ ) y TGF- $\beta$  ( $r^2 = 0.08$ ). Se observó una relación inversa entre TLR4 y la expresión de estas citocinas, por otro lado, se obtuvo una relación directa y débil de este receptor con la expresión del mRNA de IL-6 ( $r^2 = 0.09$ ) e IL-10 ( $r^2 = 0.21$ ).

**Conclusiones:** Se mostró que los neutrófilos polimorfonucleares son las principales células de respuesta en la etapa aguda de infección; mientras que, durante la transición a etapa crónica fueron los macrófagos. Este es el primer reporte de la participación *in situ* de TLRs durante el proceso inflamatorio crónico presente en el actinomicetoma por *N. brasiliensis*; se mostró que TLR2 participa en el reconocimiento de este actinomiceto. Se mostró la expresión diferencial de citocinas pro- y anti-inflamatorias en las diferentes etapas del proceso inflamatorio la cual se relacionó con los cambios morfológicos observados durante el mismo. Se mostró la participación parcial de TLR2 en la inducción de citocinas como moléculas de respuesta contra *N. brasiliensis*.



## ABSTRACT

**Introduction.** Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* is an infection that is characterized by a chronic inflammatory process located at the site of traumatic inoculation. Although it affects mainly the lower extremities, the lesions close to vital organs, like lungs and brain, are generally associated with lethal outcome. Toll-like receptors (TLRs) are proteins that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which induce production of pro-inflammatory mediators, mainly cytokines. *Nocardia* is a Gram positive bacterium that expresses surface molecules that could be recognized by TLRs, stimulating the production of mediators that regulate the development of an inflammatory process. It is ignored which is the role of the TLRs and cytokine dynamic in the immune response against *N. brasiliensis*.

**Aims.** The aims of this study were: 1) To identify morphologically the cell types present at the site of infection; 2) to locate and quantify TLR2 and TLR4 mRNA expression in cells from the inoculation site; 3) to quantify cytokine mRNA expression of (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ ) at the infection site; 4) to relate the TLR2 and TLR4 expression with the pro- and anti-inflammatory cytokine expression during the course of chronic inflammation in murine experimental actinomycetoma caused by *N. brasiliensis*.

**Material and Methods.** Eighty four male mice (30g) of the wild Taconic strain and the FM-825 *Nocardia brasiliensis* strain, recently obtained from a mycetoma patient, were used. The mice were grouped in 21 lots of 4 mice each one: one lot was used as healthy control (T<sub>0</sub>); five lots were inoculated with an isotonic saline solution; seven lots were inoculated with carrageenan as an inflammation control;

and eight lots were infected with *N. brasiliensis*. The infection was induced by injecting a  $1.5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> bacterial suspension in the footpad. Each lot was sacrificed at different times (at 2, 4, 8, 48 hours; 10, 20, 50 days and 6 months after infection). From three mice of each lot, the footpad tissue was obtained for total RNA extraction. TLRs and cytokine amplicons were obtained by RT-PCR. The PCR products were analyzed on an agarose gel stained with ethidium bromide, and the obtained fragments were quantified by densitometry with an EDAS 290 Kodak system. The results were analyzed using a One-sample "t" test and by correlation analysis. From the remaining mice from each experimental group an entire paw was obtained and the tissue was processed for paraffin embedding and histological sectioning; these samples were treated with hematoxylin-eosin, toluidine blue, Gram and Giemsa stains. Four sections at various levels of each sample were used to show TLR2 and TLR4 localization at the infection site by immunohistochemistry.

**Results.** Histological examination showed that polymorphonuclear neutrophils are the main response cells during the acute stage of infection, whereas during the transition to the chronic phase macrophages predominate. At 20 days after infection a great number of fibroblasts and foam cells were observed. After 50 days, numerous grains surrounded by a noticeable inflammatory process were found. It was shown by PCR that TLR2 mRNA expression increased at all times during the study, whereas TLR4 mRNA expression showed a decline. The expression of both receptors was localized by immunohistochemistry in different cell populations: during the acute stage TLR2 was expressed in neutrophils and macrophages in contact with the inoculum, while TLR4 was observed in mast cells. During the chronic stage TLR2 was also expressed in foam cells and fibroblasts, while TLR4 expression declined significantly. The densitometric analysis showed an increase in mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and IFN- $\gamma$ ) since the first hours after infection; an mRNA increase

of regulatory cytokines was also observed (IL-10 and TGF- $\beta$ ).

Through the correlation analysis an inverse relationship between TLR2 and TLR4 ( $r = -0.388$ ) was determined. A direct, but weak, relation between increase of TLR2 and IL-1 $\beta$  ( $r^2 = 0.123$ ), IL-2 ( $r^2 = 0.151$ ), IL-12 ( $r^2 = 0.056$ ), TNF- $\alpha$  ( $r^2 = 0.088$ ) and TGF- $\beta$  ( $r^2 = 0.08$ ) was found. There was an inverse relationship between TLR4 and the expression of these cytokines; on the other hand, a direct, although weak, relation between this receptor and IL-6 ( $r^2 = 0.09$ ), and IL-10 ( $r^2 = 0.21$ ) expression was obtained.

**Conclusions.** This is the first report of *in situ* involvement of TLRs during the chronic inflammatory process present in *N. brasiliensis* actinomycetoma. The involvement of TLR2 in the recognition of this actinomycete was showed. It was shown that polymorphonuclear neutrophils are the main response cells during the acute infection stage, while macrophages predominate during the transition to the chronic stage. This study also showed a differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines during the different stages of the inflammatory process, which was associated with the morphological changes observed during the process. The partial participation of TLR2 during the induction of cytokines as response molecules against *N. brasiliensis* was made evident.

# Capítulo 1

# MARCO TEÓRICO

## **Inmunidad**

En el contexto médico, inmunidad significa protección contra la enfermedad, y más específicamente protección contra moléculas, microorganismos y otras sustancias que pueden ocasionar daño a un organismo hospedero. El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas que tienen la capacidad de discriminar moléculas propias de extrañas, con la finalidad de eliminar antígenos externos, entre ellos algunos constituyentes de organismos patógenos (Abbas *et al*, 2010).

Por razones prácticas de estudio de la respuesta inmune ha sido clasificada en innata y adaptativa; sin embargo, en la actualidad existe la tendencia de considerarla como una red de interacciones entre ambos sistemas.

La inmunidad innata, también conocida como natural, está constituida por células y moléculas preparadas para responder con rapidez ante una agresión. Existen células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) y linfocitos (natural killer o NK) encargados de detectar y eliminar cualquier sustancia o célula extraña. En la sangre se encuentran diversas proteínas con función protectora entre ellas los diversos componentes del sistema de complemento y proteínas de unión a lectinas (MBL). Finalmente las citocinas forman parte de este tipo de inmunidad; son proteínas que coordinan y regulan las diversas funciones de las células inmunitarias. En un contexto evolutivo los mecanismos de inmunidad innata se consideran filogenéticamente conservados; éstos se encuentran presentes en organismos multicelulares que incluyen desde los más simples como las esponjas hasta los más complejos como los vertebrados.

Este sistema inmune innato responde de manera inmediata ante los daños o invasión por microorganismos, actúa como la primera línea de defensa y sus mecanismos son específicos ante estructuras comunes en grupos de microorganismos relacionados (Cinel & Opal, 2009; Abbas *et al*, 2010).

La inflamación es un mecanismo de inmunidad innata, que puede ser reforzado por la inmunidad adaptativa; involucra diversos tipos celulares como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células cebadas, neutrófilos, eosinófilos, células NK, etc. La respuesta se inicia posterior a un estímulo, generalmente desencadenado por el reconocimiento a través de receptores codificados en línea germinal que, una vez activados, dan lugar a diversas cascadas moleculares con diferentes funciones como la producción y liberación de citocinas a las que se atribuye la activación de otras células como las de la inmunidad adaptativa (Cinel & Opal, 2009).

La inmunidad adaptativa característicamente está constituida por células y moléculas con alto grado de especialización y especificidad hacia distintas moléculas, de aparición más reciente en la evolución, y que se encuentra sólo en vertebrados superiores. Los principales componentes de este tipo de inmunidad son los linfocitos y sus productos; estos productos desencadenan respuestas contra agentes externos, a través de la activación de linfocitos B productores de anticuerpos; o por medio de la generación y activación de linfocitos T citotóxicos o de linfocitos T cooperadores (Th). Este tipo de inmunidad genera células de memoria inmunológica, lo que les permite responder con mayor intensidad ante la exposición repetida de una misma sustancia o microorganismo (Abbas *et al*, 2010).

## **Inflamación**

Los primeros registros de los conceptos de inflamación y enfermedad fueron realizados por sacerdotes de antiguas civilizaciones, quienes relacionaban los padecimientos inflamatorios con magia o castigos divinos. En la Mesopotamia (2500 ó 3000 años a.C), se asociaba al proceso inflamatorio con aumento de temperatura del área afectada (tablillas cuneiformes de Koyungik: *UMMU* que quiere decir *en fuego, inflamado*). En Egipto (2000 a. C.) el proceso inflamatorio se describía con las palabras *SEREF*, *SHEMEMET* que significaban *en llamas, caliente, relacionados con inflamación* (Lozada, 1998; Vasconcelos, 2000, Crónica de historia, 2003). En la India, en el Ayur Veda (II a.C), se hace la descripción de enfermedades como: FIEBRE, tumores, diabetes, tuberculosis, epilepsia, etc., utilizando los términos *Rosayana* y *Vajikarana* para referirse a “*enfermedades como fiebre*” (Satyavaty, 2003). En Grecia, se creía que el cuerpo humano tenía medios propios para luchar en contra del padecimiento de la fiebre. Términos que hacían alusión a la inflamación fueron: *PHLEGMONÉ (Φλεγμονη)* que significa “*algo caliente*”, *inflamado*; *ERISPELA* que se refiere a *inflamación cutánea*; *OIDEMA* que quiere decir “*hinchado*” (Vasconcelos, 2000).

En Roma se utilizaban los términos *inflamare, inflammatio, inflammationis* (*poner en el fuego, incendiar*). Galeno en el siglo III a.C. fue el primero en describir lo que se conoce como quinto signo de la inflamación (hoy conocido como “*pérdida de la función*”); él propuso que la inflamación, específicamente aquella con pus, era parte de una respuesta benéfica para el paciente, (Lozada, 1998).

Cornelio Celso en el siglo I d.C., fue el primero en hacer una descripción documentada de los 4 signos de inflamación (rubor, tumor, calor y dolor), usada hasta la fecha y que es conocida como “**descripción clásica de la inflamación**”. En ese tiempo la inflamación fue sólo definida por sus signos y síntomas clínicos pero no por su fisiopatogenia (Scott, 2004). Hunter (1793) propuso que la inflamación era un proceso saludable, de naturaleza protectora en respuesta a un daño (Lozada, 1998).

Los avances tecnológicos en áreas como la microscopía y la biología celular (s. XIX), permitieron establecer las bases celulares de la inflamación; para finales de siglo se sabía que la inflamación era producto de cambios en la proliferación celular local y sanguínea. Esta visión persistió hasta que Virchow en 1871, aceptó el quinto signo cardinal “pérdida de la función” con una visión patológica. Leadbetter, describió distintas fases de inflamación: la activación de plaquetas y endotelio, el reclutamiento y activación de leucocitos, proliferación de fibroblastos y reparación del endotelio. Julius Conheim en 1873, observó vasodilatación inicial y cambio en el flujo sanguíneo, edema, permeabilidad vascular y migración leucocitaria. Tomas Lewis, en 1924, estableció lo que se conoce como la triple respuesta de Lewis: a) dilatación primaria de vasos, b) dilatación coincidente de arteriolas terminales y, c) áreas vecinas de eritema; sugirió la liberación de histamina o una sustancia semejante a la sustancia H en tejidos capaz de producir alteraciones vasculares. En 1958 Fahracus, describió el proceso de marginación leucocitaria, demostrando que los eritrocitos forman agrupaciones a lo largo de la pared de los vasos cercanos al sitio de daño, a las que llamo “pilas de monedas” que desplazan a los leucocitos a la periferia (en Scott, 2004).

Los seres vivos se encuentran expuestos constantemente a estímulos internos y externos; algunos de ellos desencadenan señales de daño. Entre los estímulos internos se encuentran la liberación de proteínas y metabolitos normalmente secuestrados dentro de la célula. Entre los estímulos externos se encuentran los agentes potencialmente dañinos, como los microorganismos que amenazan la integridad del hospedero (Baccala, *et al.*, 2009; Schroder, 2010). Cuando las señales son detectadas por el sistema inmune, una respuesta compleja es movilizad para eliminar la fuente de daño y eventualmente restituir la homeostasis del organismo (Medzhitov, 2008).

Con el desarrollo de técnicas en biología molecular y celular, se ha hecho una descripción más compleja de factores, moléculas y células que participan en la respuesta inmune. De manera general, dicha



respuesta recibe el nombre de **inflamación**, cuyas funciones principales son la delimitación del daño en los tejidos, la eliminación del agente dañino y la recuperación de la integridad del tejido.

La inflamación puede tener origen físico, químico o biológico. A continuación se describen algunos mecanismos celulares y moleculares involucrados durante el proceso inflamatorio infeccioso que se inicia con el daño a la integridad de algún tejido, lo que permite la entrada de microorganismos potencialmente patógenos.

El reconocimiento de moléculas propias denominadas Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs), así como de estructuras moleculares altamente conservadas en los microorganismos patógenos, conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) promueve la activación de la respuesta innata (Janeway, 2002; Medzhitov, 2003). Este reconocimiento se lleva a cabo a través de receptores presentes en las células del hospedero llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), que se encuentran organizados en dos clases funcionales: 1) PRRs de no señalización que son secretados y activan la vía del complemento, participan en la opsonización, funcionan como proteínas accesorias para reconocimiento de PAMPs como las proteínas de fase aguda, proteína C-reactiva y lectinas. 2) PRRs de señalización, de los cuales se conocen dos tipos: transmembranales y citosólicos; ambos activan vías de señalización pro-inflamatorias, inducen activación de genes cuyos productos son antimicrobianos, citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas que dirigen la activación de la respuesta inmune adaptativa. Los receptores de tipo transmembranal más estudiados son los **Receptores tipo Toll (TLRs)**; entre los PRRs citosólicos descritos se encuentran los receptores tipo NOD1 y NOD2 (NRL), y los receptores tipo RIG (RLR). Se cree que los receptores transmembranales y citosólicos desencadenan respuestas redundantes a través del reconocimiento de diversos PAMPs. (Medzhitov,

2003; Athman, 2004; Kaisho, 2006).

### **Receptores tipo Toll (TLRs)**

El receptor Toll, se describió por primera vez en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en cuyo organismo juega un papel importante durante la embriogénesis, mientras que en la etapa adulta es parte de su protección contra la infección por hongos (Andreson, 1985; Lemaitre *et al.*, 1996). Receptores homólogos a Toll, se han encontrado en otros organismos, incluso vertebrados, por lo que se consideran evolutivamente conservados (Ras *et al.*, 2006). En mamíferos se han identificado 13 receptores homólogos a Toll y se denominan Toll-like Receptors (TLRs). Estos receptores tienen expresión y función diferencial, en cada especie animal y tisular en que se localizan (Albiger *et al.*, 2007).

Los TLRs pertenecen a una familia de proteínas tipo I. Estas proteínas presentan una estructura modular conservada, caracterizada por la presencia de tres dominios (**Figura 1**): extracelular, transmembranal y citoplásmico. El dominio extracelular (ectodominio) está constituido de bloques de repeticiones ricas en leucina (LRR), con patrones conservados de residuos hidrofóbicos doblados de tal manera que forman una estructura tipo solenoide curvo, dando lugar a un corazón hidrofóbico involucrado en el reconocimiento y transducción de señales. Usualmente estas proteínas cuentan con una cubierta en el amino y carboxilo terminal rica en cisteína. La cubierta del carboxilo terminal se encuentra en contacto con una  $\alpha$ -hélice que atraviesa la membrana (dominio transmembranal), y ésta se encuentra conectada al dominio citoplasmático conocido como receptor de interleucina 1/Toll (IL-1/Tol) o dominio TIR (Toll/IL-1 Receptor Homologous). Esta es una región de identidad a la cual se acoplan moléculas adaptadoras que promueven la señalización en cascada hacia el núcleo (Gay *et al.*, 2006; Kubarenko *et al.*, 2007), iniciada por dimerización de TLRs; generalmente los dímeros adquieren una conformación

con forma de “m”, donde las regiones C-terminal de ambas moléculas convergen por el centro (Jin *et al.*, 2008).

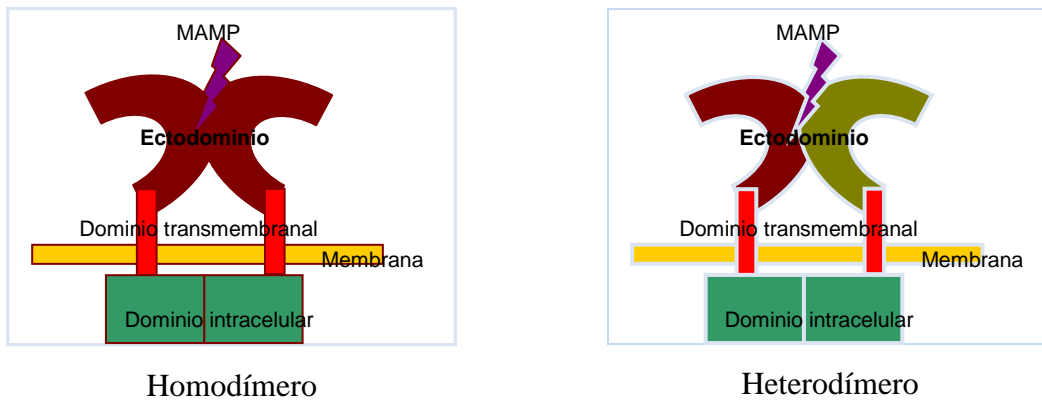


Figura 1. Dimerización de TLRs transmembranales, conformación en homodímero (TLR2:TLR2) o heterodímero (TLR2:TLR1; TLR2:TLR6).

TLR	Localización celular	PAMP que reconocen	Moléculas accesorias	Células en que se expresan
TLR-1	Membrana	Peptidoglucano, lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias Gram+, lipopéptidos de micoplasmas, zimosan de hongos		Neutrófilos**, eosinófilos*, células cebadas***, monocitos***, células dendríticas plasmacitoides (pDC)***, células dendríticas mieloides (mDC)***
TLR-2	Membrana	Peptidoglucano, lipopéptidos y lipoproteínas de Gram+, lipopéptidos de micoplasmas, zimosan de hongos	CD14	Neutrófilos, células cebadas, monocitos, mDC, queratinocitos*, fibroblastos*
TLR-3	Intracelular (endosomas)	RNA viral de doble cadena (dsRNA)		pDC, mDC
TLR-4	Membrana	Lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram (-)	MD-2 CD14	Neutrófilos, eosinófilos, células cebadas, monocitos, queratinocitos
TLR-5	Membrana	Flagelina		Neutrófilos, monocitos, mDC
TLR-6	Membrana	Peptidoglucano, lipopéptidos y lipoproteínas de Gram+, lipopéptidos de micoplasmas, zimosan de hongos		Neutrófilos, células cebadas, monocitos, pDC, mDC
TLR-7	Intracelular (endosomas)	Moléculas sintéticas parecidas a imidazoquinolinas, análogos de guanosina, RNA de cadena sencilla (ssRNA) derivados de virus y pequeños RNA de interferencia		Neutrófilos, eosinófilos, monocitos, pDC, mDC
TLR-8	Intracelular (endosomas)	Imidazoquinolinas y ssRNA, DNA con poli-G		Neutrófilos, monocitos, mDC
TLR-9	Intracelular (endosomas)	Motivos CpG en DNA de bacterias, virus y moléculas como la hemozoina de <i>Plasmodium</i>		Neutrófilos, eosinófilos, pDC

Cuadro 1. Distribución celular de TLRs, PAMPs y moléculas de dimerización y/o accesorias (Lien et al., 1999; Frasnelli et al., 2005; Hasebe et al., 2007; O'Mahony DS, et al., 2008; Ospelt 2010). Distribución reportada como: \*proteína, \*\* mRNA, \*\*\*ambos.

También se ha asociado a los TLRs con el reconocimiento de DAMPs; los primeros interactúan con las moléculas liberadas en el sitio de daño, sin importar si tienen identidad propia o no, y la finalidad es la eliminación o reparación del daño (Piccinini, 2010).

### Toll-like Receptor 2 (TLR2)

TLR2 en asociación con TLR1 o TLR6, es un receptor esencial en las células del hospedero para el reconocimiento de lipoproteínas y lipopéptidos de la pared, los cuales generalmente se anclan a la membrana celular bacteriana a través de cadenas lipídicas triaciladas, compuestas por una molécula diacilgliceril y una cadena acil unidas a la cisteína de la región N-terminal, por un enlace tioéter y por un grupo amida (**Figura 2**). En las células del hospedero, la unión de TLR1:TLR2 induce una conformación de bolsa en TLR2, sitio de interacción en el que se insertan dos de las tres cadenas lipídicas de las moléculas triaciladas del microorganismo, mientras que la cadena restante interactúa con TLR1; los grupos palmitoil, son las cadenas triaciladas más comunes de las bacterias Gram+ (**Figura 3**) (Jin *et al.*, 2007).

El TLR2 se ha asociado también con el reconocimiento de DAMPs derivados de células necróticas como son las proteínas de choque térmico, 60 y 70,  $\beta$ -defensina-3, proteínas surfactantes A y D, neurotoxina derivada de eosinófilos, moléculas de matriz extracelular como oligosacáridos de ácido hialurónico y heparan-sulfatos. Estas moléculas inducen la producción de citocinas proinflamatorias, la maduración de células dendríticas, la expresión de quimiocinas, moléculas de adhesión, molécula coestimuladoras y factores de crecimiento (Piccinini, 2010).

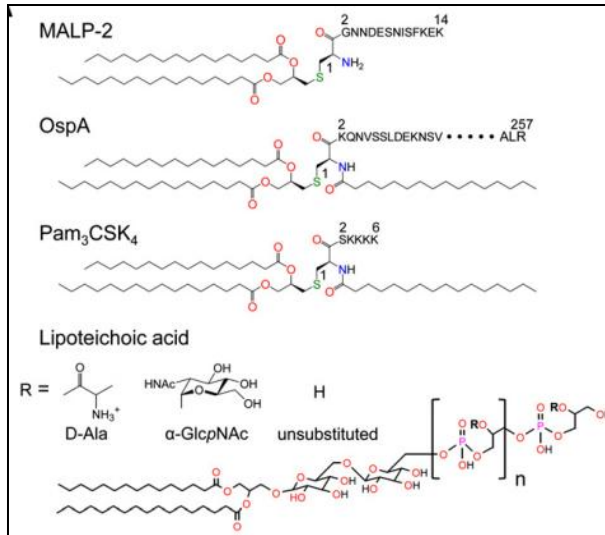


Figura 2. Moléculas triaciladas y diaciladas que interactúan con TLR2 (tomado de Jin et al., 2008).

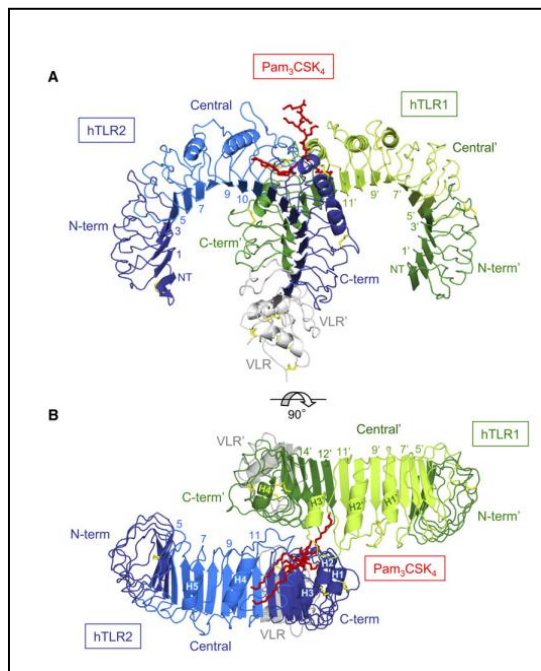


Figura 3. Heterodímero TLR2:TLR1, interactuando con moléculas triaciladas de pared celular de bacterias Gram (+) (Tomado de Jin et al., 2007).

## Toll-like Receptor 4 (TLR4)

Este receptor actúa en compañía de sus correceptores CD14 y MD-2, específicos en el reconocimiento de lipopolisacáridos (LPS) y otros ligandos. Los LPS son glucolípidos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas; están formados de un componente A hidrofóbico y un componente polisacárido hidrofílico (**Figura 4**). La porción A está constituida por glucosamina fosforilada y de cuatro a siete cadenas acil. MD2 es el encargado directo del reconocimiento de las cadenas del lípido A. MD2 adopta la forma de una taza, con dos cadenas  $\beta$  en antiparalelo, con los residuos hidrofóbicos expuestos para su unión con el ligando. La interacción de MD2 con TLR4 está mediada principalmente por interacciones iónicas y puentes de hidrógeno en dos diferentes regiones con cargas opuestas en cada molécula (**Figura 5**) (Kim *et al.*, 2005).

Este receptor, al igual que TLR2, también se ha asociado con el reconocimiento de DAMPs, entre los que se encuentran fibronectina, fibrinógeno, proteínas surfactantes A y D, proteínas de choque térmico y lactoferrina, desencadenando la activación de una respuesta inflamatoria (Piccinini, 2010).

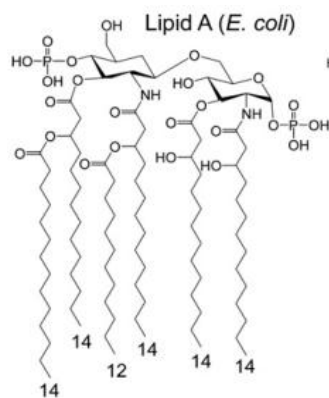


Figura 4. Estructura del lípido A del Lipopolisacárido de *E. coli* (Tomado de Jin *et al.*, 2008).

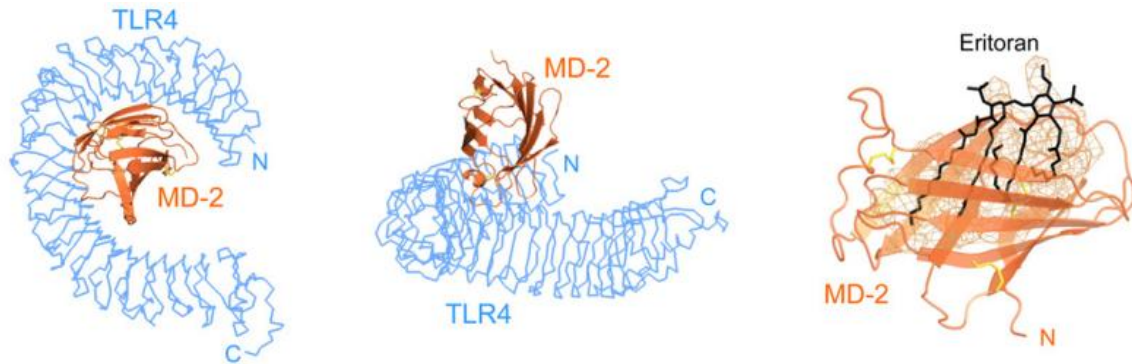


Figura 5. Interacción de TLR4 con una de las dos moléculas accesorias (MD-2), la cual se une al lípido A del lipopolisacárido. Interacción de eritoran (molécula similar al lípido A) con MD-2 (Tomado de Jin et al., 2008).

### Vía de señalización de TLRs

Se conocen cuatro moléculas adaptadoras participantes en la señalización desencadenada por TLRs: 1) factor de diferenciación mieloide 88 (Myeloid differentiation factor 88 o MyD88); 2) molécula adaptadora como MyD88/ Molécula adaptadora que contiene un dominio de receptor de Toll tipo interleucina 1 (MyD88-adaptor-like/Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein o MAL/TIRAP); 3) molécula adaptadora 2 del receptor tipo Toll (Toll-like receptor adaptor molecule 2 o TRAM); y 4) dominio TIR con adaptador para inducción de interferon- $\beta$  (TIR domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  o TRIF). Con excepción de TLR3, todos los TLRs utilizan como principal molécula adaptadora a MyD88; esta molécula cuenta con un dominio TIR que interactúa con el dominio TIR del TLR; el módulo C-terminal de MyD88 interactúa con el dominio del receptor, mientras que la porción N-terminal contiene dominios de muerte, los cuales interactúan, reclutan y activan la cascada de una familia de enzimas cinasas asociadas al receptor de IL-1 denominadas IL-1R-associated kinase o



IRAK 1, 2 y 4, donde IRAK 4 es la primera en unirse al complejo y al activarse fosforila a IRAK1; estas cinasas interactúan con MyD88 a través de dominios de muerte comunes en ambas proteínas, las cuales subsecuentemente conducen a la activación del factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (Tumor-Necrosis Factor Receptor-Associated Factor o TRAF6). Posteriormente se activan otras enzimas incluyendo las cinasas de I $\kappa$ B (llamadas IKK), inhibidor del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Estas enzimas traen como resultado la liberación de NF- $\kappa$ B y su traslocación al núcleo para mediar un incremento en la expresión génica de citocinas inflamatorias; esta vía lleva también a la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase o MAPK), como son p38 y JNK. Una vía similar a MyD88 utiliza las moléculas adaptadoras MAL y TRAM.

TLR3 utiliza solo la proteína adaptadora y activadora de IFN- $\beta$  asociada al receptor Toll (TRIF, conocida también como TICAM-1), para inducir la síntesis de Interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) y la activación de NF- $\kappa$ B a través del factor 3 regulador de IFN (IRF3). Esta vía se conoce como vía independiente de MyD88 y es crucial en la inmunidad antiviral. TLR4 puede también activar la señalización de IRF3 en un proceso que requiere de las moléculas adaptadoras TRIF y TRAM. (Beutler2004; O'Neil, 2005; Liew, 2005; Kaisho 2006; Oda, 2006).

Los TLRs promueven la maduración programada y la diferenciación de células dendríticas y de células B; estimulan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y las moléculas co-estimuladoras; inician la señalización para la producción de citocinas proinflamatorias y sustancias antimicrobianas; inducen cambios en la expresión de receptores para quimiocinas e incremento en la presentación de antígenos. Los TLRs son únicos en su capacidad para dirigir respuestas Th1 y CD8+, a partir de su expresión en macrófagos, células epiteliales y otros leucocitos (O'Mahony *et al.*, 2008).

La activación de factores de transcripción como el factor de activación nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) promueve la

producción de moléculas que regulan y coordinan las actividades celulares, como las quimiocinas y citocinas que tienen efecto quimiotáctico sobre sus células blanco.

## **CITOCINAS**

Las citocinas son proteínas pequeñas (8-80 kdal) que actúan de forma autócrina o parácrina y son de producción transitoria y regulada. Estas moléculas se unen a receptores específicos de la membrana celular, desencadenando cascadas de respuestas implicadas en la inducción, ampliación o inhibición de una serie de genes regulados por citocinas de nivel nuclear. Estas actúan formando una red compleja de señalización, es decir, la producción de una citocina modifica la producción o la respuesta ante otras. Se tienen diferentes nomenclaturas para las citocinas, lo cual refleja en parte la primera función descrita de las mismas y también el orden de su descubrimiento. Se conocen aproximadamente 150 citocinas, que están clasificadas como interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento (GF), factores estimuladores de colonias (CSF) y quimiocinas (Roitt, 2001).

### **Quimiocinas**

Son proteínas quimiotácticas (su nombre es una contracción de citocina quimiotáctica) que dirigen el movimiento de los leucocitos circulantes en sangre hacia los sitios de inflamación o daño. La unión de quimiocinas a sus respectivos receptores de superficie activa vías de señalización en cascada que culminan con el re-arreglo, cambio de forma y movimiento de la actina celular. Se han identificado aproximadamente 50 y se agrupan en 4 subfamilias en base al número de residuos de cisteína (C) en el extremo N-terminal, así como a la función que desempeñan (Abbas et al, 2010; Charo, 2006):

- Subfamilia CC. Se producen en leucocitos, células endoteliales y fibroblastos. Atraen células

mononucleares, linfocitos y eosinófilos a los sitios de inflamación: CCL-1 a CCL-28, como ejemplo se encuentran la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2), CCL5 o RANTES, y CCL8; las quimiocinas se unen a sus receptores en las células, y se denominan CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, etc.

- Subfamilia CXC. Al igual que las citocinas CC, se producen en leucocitos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos; la IL-8 (CXCL8), actúa como quimioatrayente de polimorfonucleares a los sitios de inflamación por unión con sus receptores CXCR1 y CXCR2. Las quimiocinas también pueden favorecer la formación de tejido de granulación por atracción de fibroblastos y angiogénesis.
- Subfamilia CX<sub>3</sub>C. El único miembro es la fractalcina (CX3CL1); es capaz de arrestar células en condiciones fisiológicas de fluido.
- Subfamilia XCL. El único miembro es la linfotaxina (XCL1 y XCL2), que favorece la atracción de linfocitos hacia el timo.

#### Otras Citocinas

La síntesis de citocinas, responsables de la comunicación entre inmunidad innata y adaptativa, constituye una de las principales respuestas celulares al reconocimiento antigénico, dado que los diferentes microorganismos contienen antígenos que estimulan a las células de la inmunidad innata. Las citocinas de la inmunidad innata inducen la diferenciación de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en distintas poblaciones efectoras como las sub-poblaciones **Th** las cuales presentan perfiles distintos de producción que determinan el tipo de respuesta básica (Th1, Th2, Th17, Th22, Treg, entre otras). Entre las citocinas típicas de Th1 destacan IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  e IL2. Th1 está implicado en las reacciones inflamatorias mediadas por células. Varias citocinas de Th1 activan reacciones citotóxicas, inflamatorias

y de hipersensibilidad retardada. Por el contrario las células Th2 producen IL4 e IL5 de forma característica, produciendo además con frecuencia IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y estimulan la producción de anticuerpos, sobre todo IgE. Las citocinas de Th2 se asocian con la regulación de las respuestas alérgicas y de anticuerpos de gran magnitud. Las citocinas de Th1 inhiben las acciones de Th2 y viceversa, por lo que la respuesta inmune suele ser predominantemente de tipo Th1 o Th2 (Wynn, 2008; Abbas *et al*, 2010).

Cuadro 2. Características generales de las citocinas implicadas en el presente trabajo, lugar de síntesis, acción que ejercen en la inflamación y tipo de inmunidad adaptativa que inducen. (Angus, 1998; Booth, 2010; Malek, 2010; Parameswaran, 2010).

<b>Citocina</b>	<b>Células de síntesis</b>	<b>Actividad</b>	<b>Tipo de Respuesta adaptativa</b>
IL-1 $\beta$	Fagocitos mononucleares, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales	Mediador de inflamación	Th1
IL-2	Células T activadas y en menor cantidad por células B activadas	Crecimiento y diferenciación de células T, B, NK, monocitos y macrófagos. Producción de IFN- $\gamma$ e IL-4. Expansión de células citotóxicas. Previene autoinmunidad y mantiene la homeostasis del sistema inmune.	Th1
IL-4	Linfocitos Th2, células cebadas	Desarrollo de la sub-población Th2 de manera autócrina, antagoniza con IFN- $\gamma$ e inhibe reacciones inmunitarias.	Th2
IL-6	Fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos T activados	Inmunidad innata: síntesis de proteínas de fase aguda, efectos sistémicos de inflamación, producción y respuesta de neutrófilos. Inmunidad adaptativa: biosíntesis y	Th1/ Th2

		secreción de inmunoglobulinas.	
IL-10	Macrófagos activados y Ln T	Inhibe síntesis de IFN- $\gamma$ e IL-12 y expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas CPH clase II en macrófagos y células dendríticas.	Th2
IL-12	Fagocitos mononucleares, células dendríticas	Diferenciación de Ln T CD4+ en Ln Th1 productores de IFN- $\gamma$ , potencia la función citolítica de Ln NK y T citotóxicos activados.	Th1
TNF- $\alpha$	Fagocitos mononucleares, Linfocitos T, Linfocitos NK, Células cebadas	Estimula moléculas de adhesión y atracción de neutrófilos y monocitos a zonas de infección.	Th1
IFN- $\gamma$	Ln NK, Th1 CD4+ y TCD8+	Potencia a TNF- $\alpha$ . Favorece la diferenciación de Ln hacia Th1. Refuerza función microbicida de macrófagos, estimula la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno y óxido nítrico. Activa neutrófilos, promueve actividad citolítica de Ln NK. Favorece reacciones inflamatorias ricas en macrófagos. Estimula la producción de moléculas CPH clase I y II y de LMP-2 y LMP-7 del proteasoma. Actúa sobre Ln B, favoreciendo ciertas clases de IgG y opsonización de microorganismos.	Th1
TGF- $\beta$		Inhibe la proliferación, diferenciación y activación de Ln T, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales. Estimula la síntesis de IgA.	

Las citocinas libres actúan sobre endotelios cercanos al sitio de infección, modifican la expresión de moléculas de superficie como E-selectina, L-selectina e integrinas, involucradas en los mecanismos de rodamiento y adhesión de leucocitos permitiendo su avance hacia los sitios de inflamación (diapédesis); promueven un incremento en la permeabilidad vascular, en la celularidad, en el paso de líquido constituido de proteínas séricas (proteínas de complemento, anticuerpos, proteínas de fase aguda, MBL, etc.) y agua; al resultado de este proceso se denomina **edema**. Las citocinas actúan activando a las células fagocíticas para hacerlas más eficientes. Además de sus efectos locales, las citocinas actúan en el hígado promoviendo la producción de proteínas de fase aguda. Estas moléculas son el lenguaje químico que permite el funcionamiento integral del sistema inmune.

### **Inmunidad Adaptativa, balance Th1-Th2**

La inmunidad adaptativa tiene un papel fundamental durante el proceso inflamatorio para la eliminación de agentes externos. El sistema inmune adaptativo responde de manera dicotómica ante los estímulos: por un lado, la respuesta de tipo humoral es la vía de producción y liberación de anticuerpos a través de células B; por otro lado, incluye la respuesta celular mediada por células o linfocitos T. Los linfocitos T están diferenciados en varias sub-poblaciones: los linfocitos T cooperadores  $CD4^+$  (Th1 o Th2) productores de citocinas; los linfocitos T citotóxicos (Ln Tc)  $CD8^+$ ; y los linfocitos T reguladores (Treg). La respuesta de los linfocitos T cooperadores contra diversos microorganismos se polariza hacia Ln-Th1, productores de citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , e IL-2), o Ln-Th2 productores de citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-5 e IL-10), ambos con acción antagónica. La respuesta se termina con la eliminación del estímulo que la desencadenó.

Durante el proceso inflamatorio también se activan los mecanismos de reparación en el sitio de

infección y daño. Los macrófagos eliminan restos celulares del microorganismo y del tejido del hospedero, las células mesenquimáticas son estimuladas para reproducirse y sintetizar componentes extracelulares, formando tejido cicatricial, es decir tejido conectivo denso de colágeno y células generalmente activadas por citocinas del tipo TGF- $\beta$  e IL-10. En los tejidos que no tienen capacidad regenerativa importante, las células mesenquimáticas perivasculares llenan el sitio de daño con tejido conectivo fibroso (Geneser, 1990).

### **Tipos de Inflamación**

Debido a ciertos parámetros como la duración del proceso inflamatorio, las células presentes y el tipo de moléculas que se expresan, la inflamación se clasifica en aguda y crónica.

**La inflamación aguda** es una respuesta inicial inmediata relativamente breve; se produce en minutos y su duración es desde varias horas hasta algunos días; esta respuesta es necesaria para que se lleve a cabo el suministro de células y mediadores químicos al sitio de daño. Está comprendida por diferentes etapas: 1) incremento en el flujo circulatorio y en la permeabilidad vascular, producción y movimiento de exudado acompañado de agua (edema); 2) infiltración del tejido por neutrófilos; 3) fagocitosis y muerte microbiana; 4) resolución, organización o cronicidad. Este tipo de respuesta es causado principalmente por hipersensibilidad, agentes físicos o químicos, necrosis de tejido por infarto o por agentes biológicos patógenos. De manera ideal la inflamación aguda generalmente culmina con la resolución y cicatrización mediante la formación de fibrosis y tejido cicatricial (Rubin, *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010).

**La inflamación crónica** es el resultado de una evolución prolongada y sostenida de la respuesta inflamatoria aguda; generalmente ocurre cuando el agente dañino no es eliminado. Al inicio presenta características de una inflamación aguda, pero cuando es persistente dichas características se modifican; se presentan principalmente células mononucleares: macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y células gigantes. La constante liberación de factores quimiotácticos, la interacción entre linfocitos y macrófagos, y la gama de mediadores que son secretados, son la base de la cronicidad de la respuesta. En este tipo de inflamación existe destrucción tisular provocada en gran medida por las células inflamatorias, aunque también existen intentos de reparación por lo que se observa angiogénesis (construcción de nuevos vasos sanguíneos) y fibrosis (proliferación de fibroblastos). **La inflamación granulomatosa** se considera una variedad de la inflamación crónica y se caracteriza por la presencia de agregados de macrófagos modificados, linfocitos y células gigantes multinucleadas (granulomas); este tipo de inflamación representa la presencia de una respuesta constante ante agentes externos infecciosos o no infecciosos (Rubin *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010).



## **Micetoma**

Esta enfermedad es ocasionada por agentes de origen exógeno y de acuerdo con su etiología puede clasificarse como actinomicetoma o eumicetoma. El actinomicetoma es causado por actinomicetos cuyas especies más frecuentes son: *Nocardia brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*; *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri*; y *Streptomyces somaliensis*. El eumicetoma es causado por hongos y las especies aisladas más frecuentemente son: *Madurella* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Leptosphaeria* spp., *Scedosporium* sp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. (Dávila, 1995; Carrada, 1995; McGuinnis, 1996).

Es un padecimiento que se desarrolla a partir de la inoculación traumática de los agentes etiológicos a través de la piel. Cursa con lesiones de aspecto tumoral, localizadas en el tejido afectado, con inflamación crónica granulomatosa; se caracteriza por aumento de volumen del área afectada, con presencia de fístulas que drenan material seropurulento o hematurulento hacia la superficie, conteniendo microcolonias del agente causal conocidas como “granos”. Generalmente afecta la piel, el tejido subcutáneo, el músculo y frecuentemente el hueso (Dávila, 1995; Maslin, 2001).

## **Epidemiología**

Las casuísticas más numerosas provienen de países situados entre los Trópicos de Cáncer y de Capricornio (latitudes 16° S y 30° N), siendo India, Sudán y México los países más afectados mundialmente. En América los actinomicetomas se presentan con mayor frecuencia que eumicetomas. En México como hizo notar Mariat en 1963, es el país con mayor número de casos reportados. Por otro lado, África es el continente con mayor número de casos de eumicetoma, en el mundo particularmente

en Sudán (Abbott, 1956; Lynch, 1964).

**En México** se presentan aproximadamente 70 casos de micetoma por año, el 98% son actinomicetomas, de los cuales el 86% son causados por *N. brasiliensis*. Los casos son provenientes en su mayoría de los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Jalisco, Morelos y Guerrero; en menor número en estados situados al norte del país, aunque de manera probable existen casos en toda la República Mexicana (López-Martínez *et al.*, 1992, López-Martínez, *et al.*, 2006).

El padecimiento se reporta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres en una proporción de **4:1**. Se ha relacionado con la ocupación, principalmente con las labores del campo, debido a que los agentes causales son organismos saprobios de suelos con abundante materia vegetal en descomposición; grupos laborales menos afectados, aunque igualmente importantes, son las amas de casa y estudiantes (generalmente esposas e hijos de campesinos que apoyan en las labores agrícolas), cargadores, mecánicos, etc., ocupaciones en que frecuentemente existe contacto traumático con los agentes causales. Es importante señalar que las condiciones de trabajo en países subdesarrollados como México son deficientes, por lo que las personas realizan estas actividades con sus manos y pies descubiertos ya que no cuentan con vestimentas que les brinden protección contra las probables lesiones que puedan favorecer la inoculación de diversos patógenos; esto explica el mayor número de casos de micetoma que afecta las extremidades inferiores y superiores. Por otro lado, las personas afectadas tampoco cuentan con vehículos de carga para el transporte de sus productos, por lo que se valen de sus propios cuerpos incrementando la posibilidad de traumatismos y en consecuencia la aparición de micetomas en otras regiones corporales. Después de las extremidades, el tronco, abdomen y cabeza que son las más partes anatómicas más afectadas. El micetoma se reporta con mayor frecuencia entre los 20 y 50 años de vida

periodo de mayor productividad, aunque se puede presentar a cualquier edad.

### Fisiopatogenia

González-Ochoa describió la fisiopatogenia del actinomicetoma con el siguiente texto -“Inicia con la entrada del agente etiológico a través de traumatismos con pérdida de continuidad de la piel. La lesión transcurre de manera asintomática por tiempo prolongado, durante el cual el microorganismo se desarrolla y multiplica emitiendo ramificaciones en el tejido, dichas ramificaciones son constreñidas por las células del hospedero, obligando al microorganismo a apilonarse y a formar micro-colonias, conocidas como granos. Conforme el microorganismo continúa multiplicándose, debilita el poder defensivo tisular, permitiendo su extensión y el desarrollo de nuevos focos, formando micro abscesos que al paso de los meses ocasiona en los tejidos un infiltrado inflamatorio crónico con formación de granulomas, fibrosis y papilomatosis. Los microabscesos se extienden por contigüidad, están intercomunicados por la formación de fístulas y a través de la piel drenan material hematopurulento y los granos ya referidos. Los microabscesos y fístulas están rodeados por tejido conjuntivo que, al esclerosarse, constituyen la tumoración y dureza características. La fibrosis ocasiona un marcado compromiso circulatorio, lo que dificulta la llegada de los medicamentos utilizados para el tratamiento y consecuentemente retarda o impide la curación”- (González-Ochoa, 1968).

A pesar de que esta descripción es válida y usada hasta nuestros días, quedan muchos aspectos por resolver acerca de la fisiopatogenia de este padecimiento. Entre ellos el tamaño del inóculo necesario para que la enfermedad se desarrolle. Aunque algunos estudios en modelos animales se utilizan suspensiones bacterianas relativamente concentradas ( $1 \times 10^7$  células/mililitro) (Salinas-Carmona et al,

1999), seguramente éstas están muy lejos de parecerse a la inoculación inicial en un humano. En 1963, Macotella-Ruiz sugirió que el proceso puede desencadenarse por inoculaciones repetidas del microorganismo en baja concentración, provocando sensibilización del tejido y posterior desarrollo del micetoma.

Por otro lado, tampoco se conoce el periodo de incubación de la infección, desde que el microorganismo entra y sobrevive en el tejido, hasta el desarrollo característico del micetoma. En los humanos la infección es muy crónica; la mayoría de los casos tiene más de cinco años y algunos han sido reportados de 20 años de evolución.

### *Nocardia brasiliensis*

#### **Clasificación taxonómica (Holt, et al. 2000).**

Dominio Bacteria  
Reino *Protista*  
Phylum Actinobacteria  
Clase Actinobacteria  
Orden Actinomycetales  
Suborden Corynebacterinae  
Familia Nocardiaceae  
Género *Nocardia*  
Especie *Nocardia brasiliensis*

La taxonomía en los actinomicetales se ha definido a través del análisis molecular basado en la estructura de genes como el 16S rRNA y el gyrB (**Figura 6**). Dentro del dominio Bacteria se encuentra el phylum *Actinobacteria* en el que se incluyen 48 familias con 219 géneros. El género *Nocardia* taxonómicamente pertenece al orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, y familia

*Nocardiaceae* (Takeda *et al.*, 2010; Zhi *et al.*, 2009; Chun, 1995). A nivel de orden, el género *Nocardia* se encuentra relacionado con otros microorganismos de gran relevancia médica como *Mycobacterium* (*M. tuberculosis* y *M. leprae*) *Rhodococcus* y *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, causante de la difteria). Dentro del género *Nocardia* se han descrito aproximadamente 50 especies, de las cuales 30 son causantes de patologías en humanos y animales, cuya principal localización es pulmonar, cutánea y en sistema nervioso central.

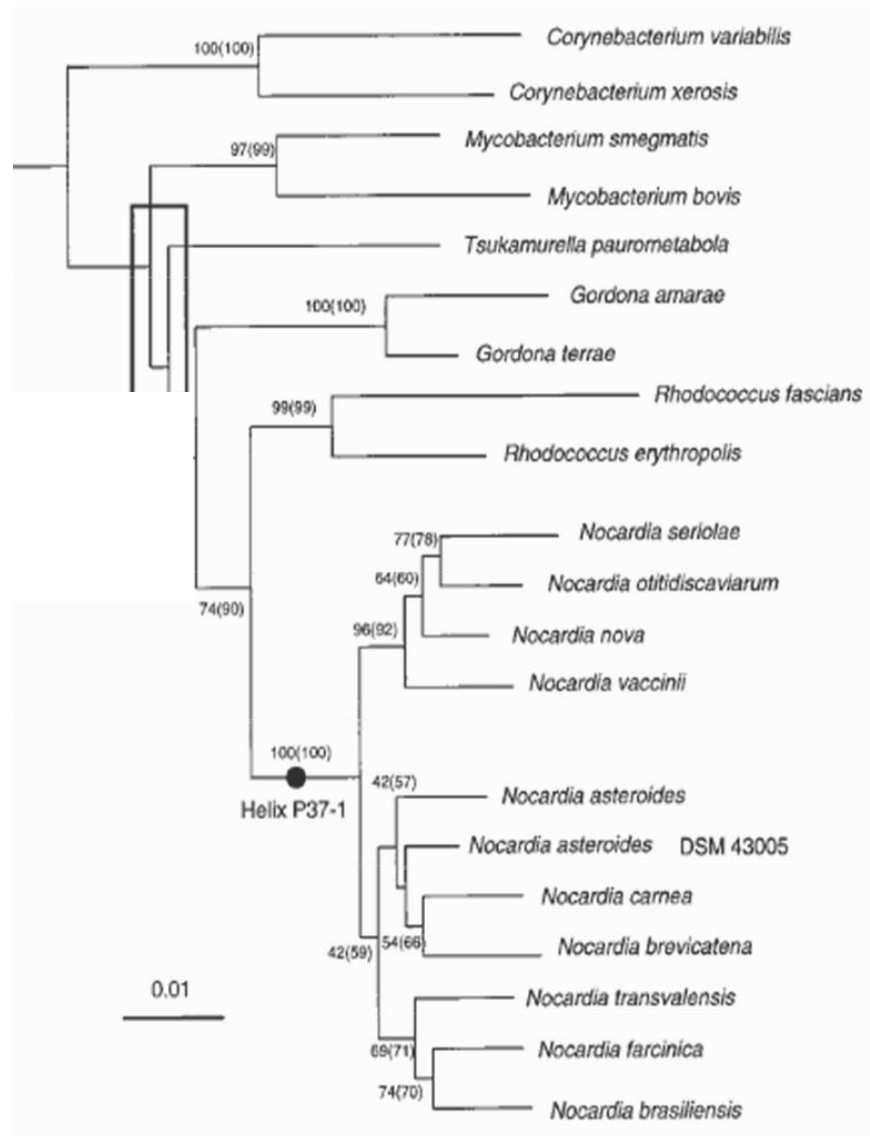


Figura 6. Clasificación propuesta por Chun y Goodfellow en 1995, con base en la secuencia del gen 16S rRNA. Se muestran algunas especies de *Nocardia* reportadas como patógenas de animales y humanos, además de otros actinomicetos taxonómicamente relacionados como *Mycobacterium*.

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, con altos contenidos de guanina y citosina (G+C) en su DNA, que de acuerdo al género y especie varía entre el 50 y 70 %. Estos microorganismos presentan gran variedad de morfologías; entre ellas se encuentran las bacterias filamentosas como *Nocardia* spp. y *Streptomyces* spp. Se han encontrado en gran variedad de sustratos terrestres y acuáticos, sobre todo en suelos con rangos de pH entre 5 y 9 (Leiva, *et al.*, 2004). Producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares, que les permiten degradar la materia orgánica. Pueden usar fuentes de carbono simples o complejas y compuestos moleculares orgánicos (ácidos, polisacáridos, lípidos, proteínas, hidrocarburos alifáticos, amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y gran variedad de proteínas (Ezziyyani *et al.*, 2004; Leveau, 2000).

La pared celular de estos microorganismos es compleja y se utiliza en ocasiones para la identificación del género. En su composición se encuentran moléculas como peptidoglucano, ácido meso-diaminopimelico, arabinogalactana, carbohidratos de superficie como arabinosa y galactosa. En algunas especies de *Nocardia* se ha reportado la presencia del factor cuerda (6, 6'-dimicolato de trealosa), compuesto por peptidoglucano, arabinogalactana y ácidos micólicos (varían según la etapa de crecimiento bacteriano y especie). No se conoce si están presentes moléculas como el fosfatidil inositol manósido (PIM), pero sí, se han descrito fosfatidil inositol (PI), fosfatidil etanol amina (PE) en cantidades variables y difosfatidil glicerol. Se ha propuesto que en la pared de *Nocardia* se encuentran ácidos grasos no hidroxilados, entre ellos ácido palmítico, palmitoteico, esteárico, oléico, tuberculoesteárico y nocardiólico. Dependiendo de la especie se presentan diversas cantidades de lipoproteínas y lipopéptidos asociadas a la membrana y pared celular. Otras moléculas asociadas son menaquinonas y fosfatidiletanolaminas (Lechevalier, 1967; Sandoval, 1996; Beaman, 1993; Beaman, 1994; Chun, 1995; Yamamura, 2004).

### Morfología macroscópica

En cultivo las colonias tienen su desarrollo óptimo entre 30 y 37 °C, en diferentes medios bacteriológicos y micológicos como el agar infusión cerebro-corazón (BHI), agar Czapeck, agar dextrosa Sabouraud, el agar gelosa chocolate y agar Lowenstein-Jensen. Su fase lag de crecimiento es entre los 7 y los 10 días. Las colonias son de aspecto céreo, con pliegues cerebriformes, y presentan tonalidades que van del blanco al anaranjado, con filamentos aéreos (**Figura 7A**).

### Morfología microscópica

El estudio microscópico muestra que las bacterias de *N. brasiliensis* forman pseudo-filamentos ramificados, con presencia de elementos cocoides y/o bacilares, Gram + y parcialmente ácido-alcohol resistentes con la tinción de Kinyoun (**Figura 7B**).

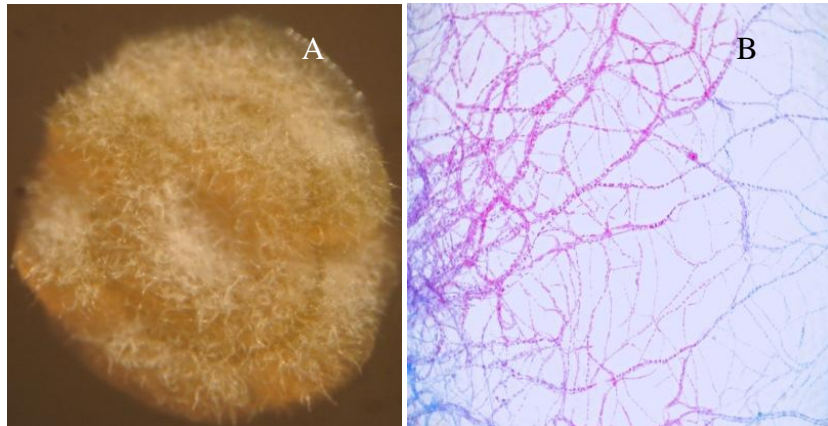


Figura 7. Morfología macroscópica y microscópica de *N. brasiliensis* en Agar BHI y tinción de Kinyoun.

## ANTECEDENTES

### Respuesta inmune durante el Micetoma

Se han realizado pocos estudios con el propósito de entender la interacción que se lleva a cabo entre el hospedero y *N. brasiliensis*, durante el establecimiento de la enfermedad.

Debido a que se presenta de manera más frecuente en hombres que en mujeres, Hernández-Hernández *et al.*, 1995, realizaron estudios enfocados a explorar la respuesta a diferentes hormonas esteroides. En este estudio se demostró *in vitro* e *in vivo* que la progesterona y la testosterona tienden a inducir una evolución más grave en los ratones a los cuales se les indujo el actinomicetoma con *N. brasiliensis*; por el contrario los ratones tratados con estradiol presentaron tendencia a la curación en menor tiempo que los tratados con las otras hormonas.

Respecto a la respuesta inmune celular en el micetoma, en 1977 Sundararaj *et al.*, trabajando con cobayos, observaron que esta respuesta es protectora en este padecimiento. Estos autores también describieron que existe una inhibición de la migración de macrófagos hacia el sitio de infección y que su actividad esta retardada. En 1983 Conde *et al.*, describieron la presencia de granulocitos, histiocitos y células plasmáticas, células epiteliales y linfocitos durante el micetoma murino.

En humanos, Guimarães *et al.* (2003) reportaron características celulares semejantes a las observadas en ratones: granos rodeados de neutrófilos polimorfonucleares y presencia de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos de tipo CD8<sup>+</sup>, además de capas de fibrina. Palma-Ramos *et al.* (2003)



confirmaron que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son la subpoblación principal de linfocitos presentes en el micetoma causado por *Acinomadura madurae*. En 1985 Beaman observó que el retardo en la respuesta celular está relacionado con la capacidad de la bacteria para producir la enzima superóxido dismutasa inhibiendo el estallido respiratorio.

En 2009 Salinas-Carmona, *et al.*, han estudiado ampliamente los niveles de citocinas presentes en suero en un modelo murino; los autores encontraron incrementados los niveles de IL-10 e IFN- $\gamma$  durante la primera semana de infección; también observaron incremento en los niveles de IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  a las 24 h posteriores a la infección, sin encontrar variación en IL-1 $\beta$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ . En 2004, mostraron que la inmunización con sueros de donadores previamente infectados no previene la infección. Méndez-Tovar *et al.* (2004) encontraron diferencias en la producción de citocinas a partir de células mononucleares obtenidas de pacientes y de individuos sanos retadas con fracciones celulares de *N. brasiliensis*, observaron que el TNF- $\alpha$  e IL-4 fueron mayores en los cultivos celulares de pacientes, mientras que el IFN- $\gamma$  estuvo elevado en los cultivos de individuos sanos; IL-10 e IL-12 no presentaron diferencias entre los dos grupos; concluyendo que probablemente exista una respuesta inmune de tipo Th2 durante la infección con micetoma.

En cuanto a las inmunoglobulinas, en 1962 González-Ochoa *et al.* observaron que tanto en pacientes como en el modelo murino, los títulos elevados de anticuerpos se asocian a un pronóstico grave. Rico *et al.* (1982) observaron que cuando transferían anticuerpos de ratones infectados con *Nocardia* hacía ratones sanos infectados posteriormente, estos últimos no sólo no se encontraban inmunológicamente protegidos contra la infección, sino que además estos ratones receptores de suero presentaban infecciones mas graves. En 1999 Salinas-Carmona *et al.* en un modelo murino mostraron la presencia de

IgM en los primeros 7 días PI, y la IgG apareció hasta los 45 días PI. Por otro lado, Mendez-Tovar, *et al.*, 2004, demostraron que en células mononucleares de sangre periférica tanto de pacientes como de individuos sanos retadas con antígeno crudo de *N. brasiliensis*, los subtipos de IgG estaban elevados a expensas de IgG3 e IgG4, sin diferencia en la producción de IgM.

Si las especies del género *Mycobacterium* se encuentran taxonómicamente relacionadas con el género *Nocardia*, es posible que ambos presenten una composición de PAMPs relativamente similar. Diversos grupos se han enfocado al estudio de distintos componentes de la respuesta inmune innata contra micobacterias, entre ellos la respuesta inducida por TLRs y su papel en la producción y liberación de citocinas pro y anti-inflamatorias. Algunos de estos estudios se tomaron como referencia para la realización de este trabajo.

### **Papel de TLR2 y TLR4 en la infección por *Mycobacterium***

Varios estudios han tratado de establecer el papel de los TLRs en el reconocimiento e inducción de la respuesta inmune contra actinomicetos, principalmente *M. tuberculosis* y *M. leprae* y *M. bovis*.

Autores como Means *et al.* (1999) y Jones *et al.* (2001) describieron el papel de los TLRs en el reconocimiento y respuesta contra diferentes PAMPs (LPS y LAM, entre otras.).

Otros autores como Abel *et al.* (2002) han descrito que en animales deficientes de TLR4 presentan deficiencias en la respuesta y regulación inmune, desarrollan neumonía crónica con infiltración incrementada de neutrófilos y disminución en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-12p40 y MCP-1.

Suwagara *et al.* (en 2003) observaron que ratones knock-out para TLR2 y TLR6 desarrollan lesiones

granulomas más grandes que los ratones silvestres, con gran cantidad de infiltración de neutrófilos y menor producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-12, así como mayor producción de IL-4 e IL-6.

Por otro lado, Krutzik *et al.* (2003) reportaron que el dímero de TLR2-TLR1 estaba fuertemente expresado en lesiones localizadas de lepra tuberculoides, fenómeno que estuvo asociado al incremento en la producción de IL-12, IFN- $\gamma$  y GM-CSF; por el contrario, en la forma diseminada (lepra lepromatosa) observaron disminución en la expresión del dímero e incremento en IL-4 e IL-10.

En el 2004, otros autores como Pai *et al.* y Nicolle *et al.*, describieron que los TLRs son responsables de la señalización en la respuesta contra infecciones provocadas por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, así como de la expresión de los genes que codifican para distintos TLR.

Rocha-Ramírez *et al.* (2008) en estudios *in vitro* observaron que las fracciones lipídicas obtenidas de cepas hipervirulentas disminuyeron la expresión de TLR2, TLR4 y MHC de clase II y aumentaron la producción de TNF- $\alpha$  e IL-10. Las fracciones de cepas menos virulentas incrementaron la expresión de TLR2, TLR4 y MHC de clase II y disminuyeron la producción de TNF- $\alpha$  e IL-10.

Bochud *et al.* (2009) mostraron que algunos polimorfismos en TLR4 estaban asociados con la susceptibilidad a desarrollar lepra y que *M. leprae* inducía disminución de TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12p40 en monocitos.

Como se describe en diversos trabajos, los TLRs se han asociado con el tipo de respuesta inmunitaria contra los actinomicetos del género *Mycobacterium*; se ha observado que los TLRs más importantes son

TLR2 y TLR4, éstos a su vez están asociados con los tipos de citocinas producidas durante la respuesta inmune.

En el actinomicetoma se han determinado algunas citocinas durante el proceso inflamatorio crónico. Sin embargo, no se ha descrito si los TLRs tienen participación en el reconocimiento de *N. brasiliensis*, y por lo tanto en la inducción de las citocinas reportadas durante la infección.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso inflamatorio está regulado por una extensa red de mecanismos en los que participan mediadores químicos y celulares, además de múltiples factores como los nutricionales, hormonales y genéticos. En la actualidad se intenta describir los mecanismos que participan durante las diferentes etapas en el proceso inflamatorio agudo o crónico.

El micetoma es un padecimiento en el que se presentan las diferentes fases del proceso inflamatorio tanto aguda como crónica. Se desconoce si los TLRs, particularmente TLR2 y TLR4, participan en el reconocimiento y regulación de la respuesta contra *N. brasiliensis*, como se ha reportado para micobacterias, y si la modulación por parte de estos receptores impide la resolución temprana de la infección, lo que en consecuencia induciría la evolución y permanencia de una inflamación crónica.

## **HIPÓTESIS**

El reconocimiento de PAMPs de *N. brasiliensis* a través de TLR2 y/o TLR4, modificará su expresión e inducirá la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) o de citocinas anti-inflmatorias (IL-10) en el sitio de infección.

# OBJETIVOS

## General

Determinar que la expresión de TLR2 y/o TLR4 en células presentes en el sitio de infección, regula la producción y liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) durante el establecimiento y evolución del proceso inflamatorio crónico en el actinomicetoma murino causado por *Nocardia brasiliensis*.

## Particulares

1. Identificar morfológicamente los tipos celulares presentes en el sitio de infección durante la evolución del proceso inflamatorio crónico en el actinomicetoma experimental murino por *N. brasiliensis*.
2. Cuantificar los niveles de expresión del mRNA TLR2 y TLR4 en células del sitio de inoculación.
3. Cuantificar la expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  y la anti-inflamatoria IL-10 durante el proceso inflamatorio crónico.
4. Relacionar la expresión del mRNA TLR2 y TLR4 con la expresión del mRNA de citocinas pro y anti-inflamatorias durante la evolución de la inflamación crónica en el actinomicetoma.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Inducción del actinomicetoma experimental

Para la inducción del actinomicetoma experimental murino se realizaron diversas pruebas con dos cepas de *N. brasiliensis*: la primera con número de referencia ATCC 700358, fue donada por los Dres. Mario Cesar Salinas-Carmona y Oliverio Welsh, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL, Monterrey, México); la segunda fue un aislado reciente a partir de un paciente con micetoma en extremidad inferior originario del estado de Puebla. Este aislado fue tipificado en el laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM. También se utilizaron diferentes cepas de ratón: Balb/c, CD1 y la silvestre Taconic, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. El modelo experimental (ratones Taconic) y la cepa de *N. brasiliensis* (FM 825) que indujo el actinomicetoma más típico en el mayor número de ratones fueron seleccionados para el estudio inmunológico propuesto en este trabajo.

## Preparación del inóculo bacteriano

Se utilizó la cepa de *N. brasiliensis* FM-825, obtenida recientemente de un paciente con micetoma, tipificada por procedimientos morfológicos, bioquímicos y moleculares (Brown-Elliott et al., 2006; Betrán et al., 2009). La cepa fue crecida en caldo BHI (BD BIOXON, México) a 37° C por 4 días. Con ayuda de un macerador de vidrio, se disgregaron las colonias suavemente para obtener una suspensión conteniendo  $1.5 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> en solución salina isotónica 0.1M (SSI), libre de pirógenos endógenos.



## **Ratones**

Se utilizaron 84 ratones macho de 30 g de la cepa silvestre Taconic (Hernández-Hernández *et al.*, 1995), divididos en 21 lotes de 4 ratones cada uno. **Un lote** de ratones sanos fue sacrificado al inicio del experimento ( $T_0$ ) y fue utilizado para localizar y medir los niveles basales de expresión de TLR-2 y TLR-4. **Cinco lotes** fueron inoculados con 0.1 ml de SSI y utilizados como grupo control; estos fueron sacrificados 2, 4, 8, 48 horas y 10 días posteriores a la inoculación (PI). **Siete lotes** fueron inoculados 0.1 ml de una solución de carragenina lambda IV (SIGMA) al 2% (polisacárido polisulfatado de alto peso molecular extraído de algas rojas, utilizado para inducir inflamación estéril, (Dalmarco, *et al*, 2008) y fueron sacrificados a las 2, 4, 8, 48 horas, 10, 20 y 50 días PI. Finalmente a **ocho lotes** se les inoculó 0.1 ml de la suspensión de *N. brasiliensis* en la almohadilla plantar derecha y un lote fue sacrificado por cada tiempo posterior a la inoculación (PI): 2, 4, 8, 48 horas, 10, 20 y 50 días y 6 meses. Las inoculaciones se aplicaron en el cojinete plantar de la pata derecha. El protocolo de experimentación en animales fue sometido y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM y fue realizado de acuerdo a las normas de Regulación Nacionales (NOM-062-ZOO-1999).

## **Estudio histológico**

Las muestras de tejido de cada grupo fueron embebidas en parafina y longitudinalmente cortadas con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron tratados con diferentes métodos de tinción: hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT), Giemsa y Gram, para realizar la observación microscópica de las morfologías celulares localizadas en el sitio de infección. Se realizaron registros fotográficos de por lo menos tres cortes de cada tinción a diferentes magnitudes (10X, 40X y 100X).

## Detección de la expresión de TLR2, TLR4 y citocinas

### Extracción de RNA

El tejido plantar total obtenido a partir de tres de los 4 ratones de los diferentes lotes fue lavado con solución salina estéril (preparada con agua tratada con dietil-pirocarbonato, DEPC), secado y en presencia de nitrógeno líquido fue pulverizado. El polvo tisular fue homogenizado en un mililitro de QUIAzol™ Lysis Reagent (QUIAGEN Sciences; Maryland, USA). Los siguientes pasos del procedimiento de extracción de RNA total fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### RT-PCR

Para la reacción de retrotranscripción (RT) se utilizaron 1.3 µg de RNA (máxima obtenida del tejido de cada individuo procesado). La mezcla de reacción contenía además como concentraciones finales 1X Buffer RT, DTT 10 mM, dNTP's 5 mM, Oligo DT 10 ng y M-MLV Reverse Transcriptase 400 U (Invitrogen, California, USA), en un volumen final de 10 µl. La mezcla fue incubada 10 minutos a 30° C y 60 minutos a 38°C.

La técnica de PCR incluyó los oligonucleótidos para TLR2, TLR4 y β-actina (usado como gen control), reportados por Jin *et al.* (2007) mientras que para las citocinas se usaron los oligonucleótidos reportados por Sugawara *et al.* en el 2003 (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, IFN-γ Y TGF-β), y para IL-1 se usaron los oligonucleótidos reportados por Zhong, *et al.* (2009) (**Cuadro 3**).

La mezcla de reacción para la PCR contenía 10 µl del producto de RT y las siguientes concentraciones finales: Buffer PCR 1X, MgCl 0.72 mM, dNTP's 0.2 mM, oligonucleótidos sentido y antisentido 0.34 µM de cada uno, enzima Taq polimerasa 2.5 U, agua ultrapura 25.9 µl, en un volumen final de 50 µl.

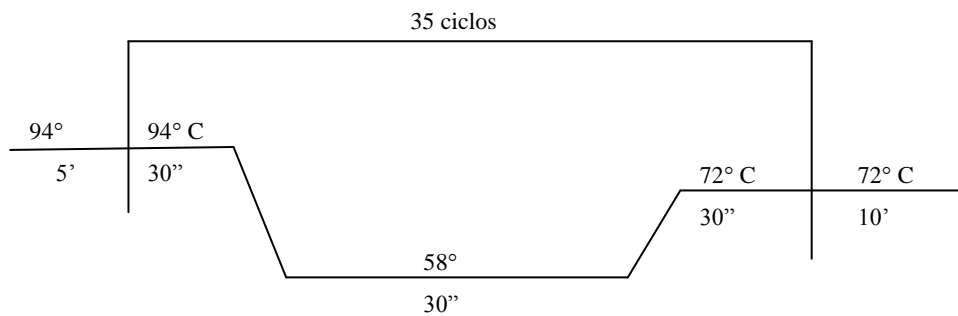
Dada la importancia de otras citocinas durante la respuesta ante una infección, durante el desarrollo del trabajo se incluyeron pruebas adicionales para conocer la participación de citocinas como IFN-γ, IL-2, IL-12 y TGF-β, a pesar de no estar contempladas inicialmente en los objetivos.

Cuadro 3. Lista de oligonucleótidos usados para la amplificación TLRs y citocinas durante la realización del presente estudio.

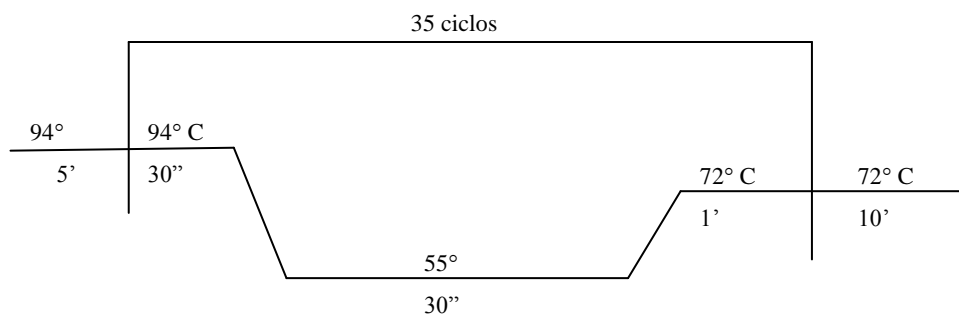
	Sentido 5' - 3'	Antisentido 5' - 3'	Amplicon (pb)
TLR2	TTTGCTCCTGCGAACTCCTA	GCTTTCTTGGGCTTCCTCTT	295
TLR4	GGGTCAAGGAACAGAAGCA	TGAAGGCAGAGGTGAAAGC	349
B-actina	GCTACAGCTTCACCACCACAG	GGTCTTTACGGATTGCAACGTC	288
IL-1β	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	AGGCCACAGGTATTTTGTCG	230
IL-2	CTTCAAGCTCCACTTCAAGCT	CCATCTCCTCAGAAAGTCCAC	400
IL-6	CATCCAGTTGCCTTCTGGGA	CATTGGGAAATTGGGGTAGGAAG	463
IL-10	CCAGTTTTACCTGGTAGAAGT GAT	TGTCTAGGTCCTGGAGTCCAG CAG	324
IL-12	ATCTCCTGGTTTGCCATCGTT TTG	TCCCTTTGGTCCAGTGTGACCTTC	527
TNF-α	ATGAGCACAGAAAGCATGATC	TACAGGCTTGTCACCTCGAATT	276
IFN-γ	TACTGCCACGGCACAGTCATT GAA	GCAGCGACTCCTTTTCCGCCT TCC T	405
TGF-β	CGGGGCGACCTGGGCACCATC CATGAC	CTGCTCCACCTTGGGCTTGCGACC CAC	410

Figura 8. Condiciones de temperatura para las diferentes PCRs.

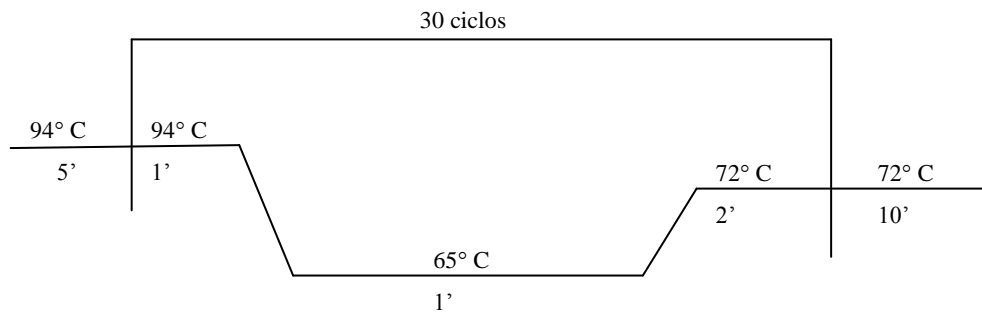
TLR2, TLR4 y  $\beta$ -actina, estandarizadas en el laboratorio de Micología Médica.



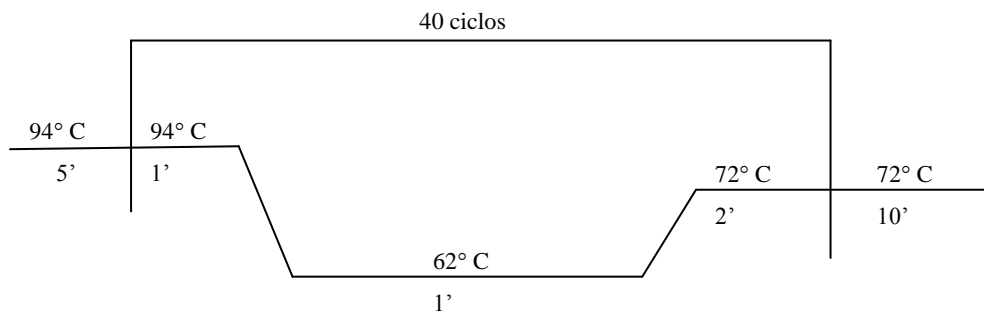
IL-1 $\beta$ , como reportan Zhong, *et al*, 2009.



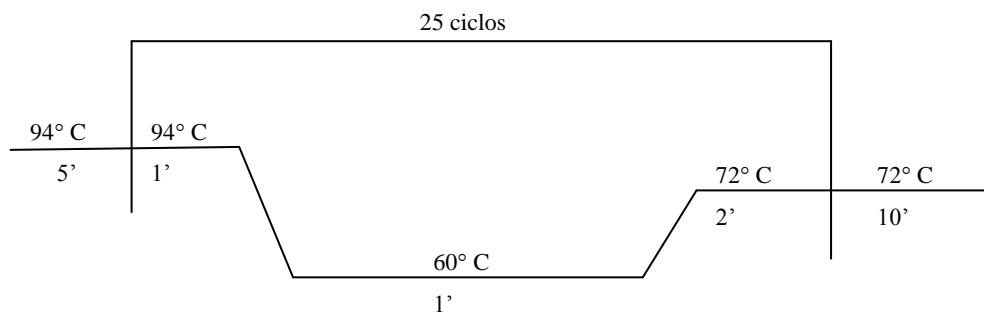
IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , como reportan Sugawara *et al*, 2003



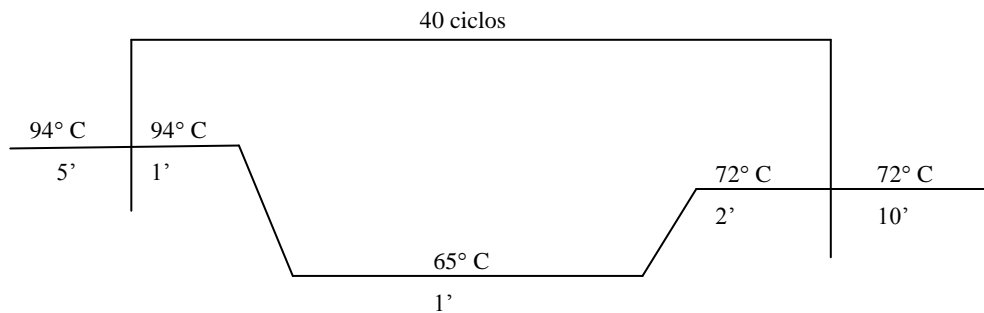
IL-2 e IL-6 como reportan Sugawara *et al*, 2003.



TGF- $\beta$  como reportan Sugawara *et al*, 2003.



IL-10 como reportan Sugawara *et al*, 2003.



### **Análisis densitométrico**

Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 5 µg/ml y visualizados en un transiluminador UV. Las imágenes fueron capturadas y analizadas con el sistema EDAS 290 Kodak System (Rochester, NY). La cuantificación se realizó midiendo la densidad de bandas expresada en pixeles. De acuerdo al manual de Kodak, el valor de densidad integrada (IDV) se determina de acuerdo al número de pixeles registrados en la banda menos el fondo: representado por la siguiente fórmula  $IDV = \Sigma$  (cada valor de pixel menos el fondo).

Para la obtención de los valores en nanogramos (ng), los resultados del IDV de las bandas fueron comparados con los valores del marcador de peso molecular GeneRuler™ (Express DNA Ladder, USA) tomado como estándar.

### **Análisis estadístico**

Para comparar los valores obtenidos de los diferentes grupos de estudio contra los valores basales, se realizó la prueba One sample t test. Por otro lado se realizó una prueba de correlación entre los valores obtenidos de TLRs y los de citocinas. Se utilizó el programa STATISTICA 8 (2007) para Windows, con un nivel de significancia de 0.05.

### **Detección de la expresión de TLR2 y de TLR4 por inmunohistoquímica**

Los fragmentos de tejido murino de los diferentes lotes de ratones fueron seccionados y fijados en una solución amortiguadora de fosfatos con formol al 10% por 24 horas; posteriormente fueron lavados con

amortiguador Tris-HCl (0.1 M, pH 7.2) y sumergidos en solución de EDTA al 10% por 15 días, con cambios cada 48 h. El tejido fue incluido en parafina y cortes de 5  $\mu$ m fueron hidratados y reactivados antigénicamente en amortiguador de citratos (ácido cítrico 0.01M, citrato de sodio 0.01M) de acuerdo al método de Pérez-Torres et al., 2009. La peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3%. El tejido fue bloqueado con albúmina sérica bovina fracción V (disuelta en Tris-HCl al 4% más tritón 0.01%) por 20 minutos a temperatura ambiente; el suero de bloqueo fue decantado y se agregó el anticuerpo primario para TLR2 o TLR4 (anticuerpos policlonales anti-mouse Santa Cruz Biotechnology, INC, California), en una dilución 1:50. Después de incubar toda la noche a 4° C, se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo para TLR2 (Match 4 de Biocare-Medical) o anti-cabra para TLR4 (Goat HRP-Polymer Kit, Biocare Medical); el tejido fue incubado 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente; se agregó el polímero complementario (MRH2P) para el anticuerpo secundario y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado se agregó diaminobenzidina (DAB<sub>500</sub> Chromogen System, Biocare Medical); la contra-tinción fue realizada con hematoxilina de Mayer. Finalmente el tejido fue deshidratado y montado en resina (Ecomount Mounting Medium Biocare Medical) para su observación con microscopía de luz.

# Capítulo 2



## RESULTADOS

### Inducción del actinomicetoma

A diferencia de las otras cepas de ratones y de *Nocardia*, el actinomicetoma se estableció de manera exitosa en la cepa de ratón Taconic, con 100  $\mu$ l de suspensión bacteriana de la cepa FM825. En la **Figura 9**, se muestran la evolución del micetoma a diferentes tiempos representativos del proceso inflamatorio. A: Pata recién inoculada, mostrando un ligero aumento de volumen debido al inóculo; B: 8 horas PI, ligero aumento de volumen; C: 20 días PI, la inflamación fue muy notoria; D: 50 días PI, el aumento de volumen fue muy evidente, de aproximadamente el doble de una pata recién inoculada. Por último, en E y F se muestra una pata de frente y de perfil a los 6 meses PI; el aumento de volumen debido al proceso inflamatorio fue muy aparatoso; en este tiempo se observaron fístulas, úlceras y tejido necrótico en el orificio de las fístulas.

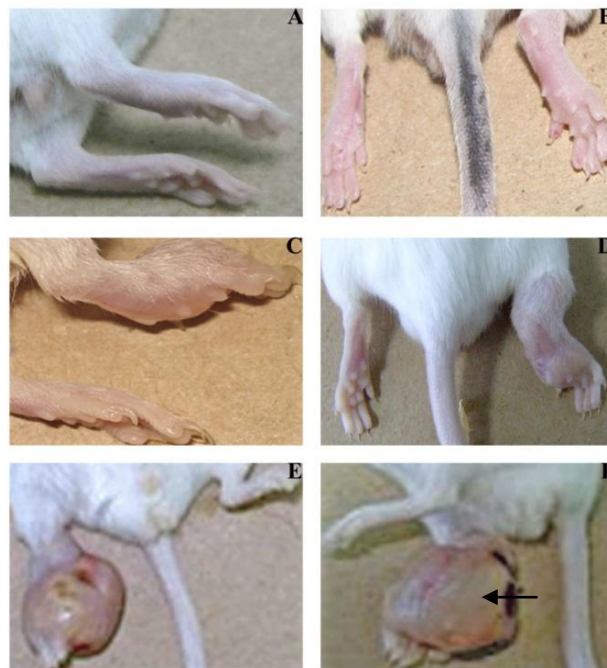


Figura 9. Desarrollo del proceso inflamatorio en la pata de los ratones a diferentes tiempos posteriores a la inoculación A) recién inoculado. B) 8 horas PI. C) 20 días PI. D) 50 días PI. E y F) 6 meses PI. La flecha indica una úlcera con tejido necrótico.

## Descripción histológica

En la **Figura 10** son mostrados los cortes teñidos con la técnica para hematoxilina-eosina (HE). A continuación se describen a continuación los diversos cambios en la morfología celular durante el desarrollo del actinomicetoma.

Tejido sano. En la **Figura 10 A** se muestran las diferentes capas de tejido de un ratón sin traumatismo por inoculación al tiempo inicial ( $T_0$ ). De la superficie a la profundidad se observan epidermis (estratos basal, espinoso, granuloso y córneo), dermis, tejido conectivo y tejido muscular.

Tejido inoculado con *Nocardia*. A las dos horas PI (**Figura 10 B**), se observó el inoculo depositado en el tejido; hubo migración de neutrófilos y algunos macrófagos hacia la zona de infección principalmente. Cerca del inoculo se observaron además fibroblastos activos y gran cantidad de vénulas dilatadas y migración celular o diapédesis. A las ocho horas PI (**Figura 10 C**), se observó un importante infiltrado de células inflamatorias dentro del inoculo, principalmente de neutrófilos. Se evidenció degradación de tejido conectivo, infiltración en el tejido muscular e indicios de neo-formación de la matriz extracelular por fibroblastos activos en la zona de infección. A las cuarenta y ocho horas PI (**Figura 10 D**), había una mayor cantidad de células inflamatorias, en su mayoría neutrófilos, el inóculo muy disminuido y el tejido conectivo muy dañado, además de nueva formación de fibras de colágeno entre el infiltrado.

Diez días PI (**Figura 10 E**), se encontró infiltrado constituido principalmente de macrófagos; en este tiempo se desarrolló fibrosis importante en la zona de inflamación y formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). También se observó lo que parecía ser “fusión celular” y formación de células espumosas. En el día veinte PI (**Figura 10 F**), no hubo grandes cambios respecto a las

poblaciones celulares observadas en el décimo día: gran cantidad de células inflamatorias, en su mayoría macrófagos, fibrosis importante y células espumosas más definidas cercanas a los sitios de fibrosis. En el día cincuenta PI (**Figura 10 G**), se observaron granos rodeados de un importante infiltrado de neutrófilos, los cuales se encontraban en contacto directo con la colonia bacteriana, algunos macrófagos y heterófilos localizados alrededor de los neutrófilos; hacia la periferia se observó gran cantidad de células espumosas rodeadas de tejido fibrótico. En este tiempo se observaron bien definidas las características de un granuloma.

A los seis meses PI (**Figura 10 H**) hubo proliferación bacteriana, por lo que se presentó mayor número de microcolonias con la consecuente formación de un mayor número de granulomas. Cada colonia estaba rodeada de neutrófilos, algunos macrófagos hacia la periferia y células espumosas rodeadas de tejido fibrótico. Se observó fragmentación de los granos probablemente por efecto de las células inflamatorias infiltradas en ellos, lo que podría estar contribuyendo a la expansión de la patología.

Con la tinción de azul de toluidina (AT) se observó que las células cebadas se encuentran activas en las primeras 48 horas PI (**Figura 11**). Durante estos tiempos las células cebadas se encontraron situadas cercanas al inóculo bacteriano, con aumento en tamaño y degranulación hacia el inóculo (**Figuras 11 A - C**). A los 10 y 20 días (**Figuras 11 D y E**) aún se observó gran cantidad de células cebadas situadas en las regiones fibróticas, particularmente cercanas a los capilares y notablemente disminuidas en tamaño en comparación con las primeras horas PI. En piel sana ( $T_0$ ) éstas células estaban formando parte del tejido conectivo, íntegras con sus gránulos cercanos al núcleo celular (**Figura 11 A**). A los 50 días PI (**Figura 11 F**) prácticamente no se observó actividad de estas células, ya que se encontraban muy reducidas y ubicadas hacia la periferia de la zona fibrótica y en tejido subcutáneo.

Con la tinción de Gram (**Figura 12**) observamos que en tejido sano (**Figura 12 A**) se tiñen los núcleos celulares, pero no las fibras de colágeno en el tejido subcutáneo. En el tejido infectado, 2 h después de la inoculación (**Figura 12 B**), se observaron algunas bacterias fagocitadas. A las 8 h PI (**Figura 12 C**) aún se observó la presencia del inóculo bacteriano, así como gran cantidad de núcleos celulares muy cercanos entre sí. A los 10 y 20 días PI (**Figuras 12 D y E**) también se encontraron algunas células bacterianas dentro de fagocitos, morfológicamente compatibles con macrófagos (círculo y flecha), estas presentaron la coloración característica de bacterias Gram positivas teñidas en color violeta. A los 6 meses PI (**Figura 12 F**), se observó el grano rodeado de células inflamatorias.

En la **Figura 13** se muestran algunas imágenes teñidas con Giemsa. En el tejido sano (**Figura 13 A**) se observan los núcleos celulares en color azul, el citoplasma celular y fibras de colágeno en color rosado. En las **Figuras 13 B – G** se muestran los diferentes tiempos, en donde el inóculo bacteriano presenta también una coloración azul.

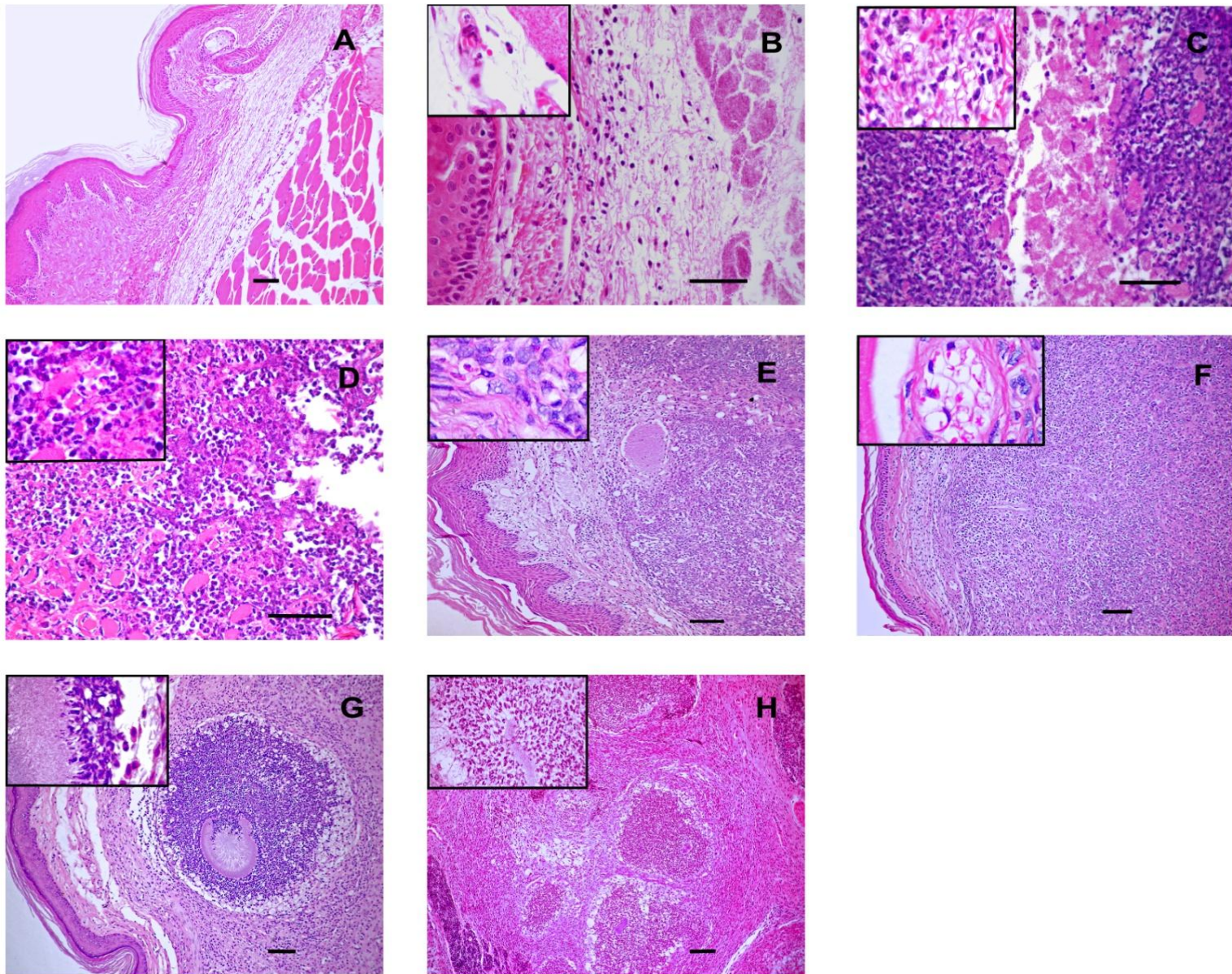


Figura 10. Cortes teñidos con hematoxilina-eosina. A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 4 horas PI, D) 8 horas PI, E) 48 horas PI, F) 10 días PI,

G) 20 días PI, H) 50 días PI, I) 6 meses PI. Escala = 20µm

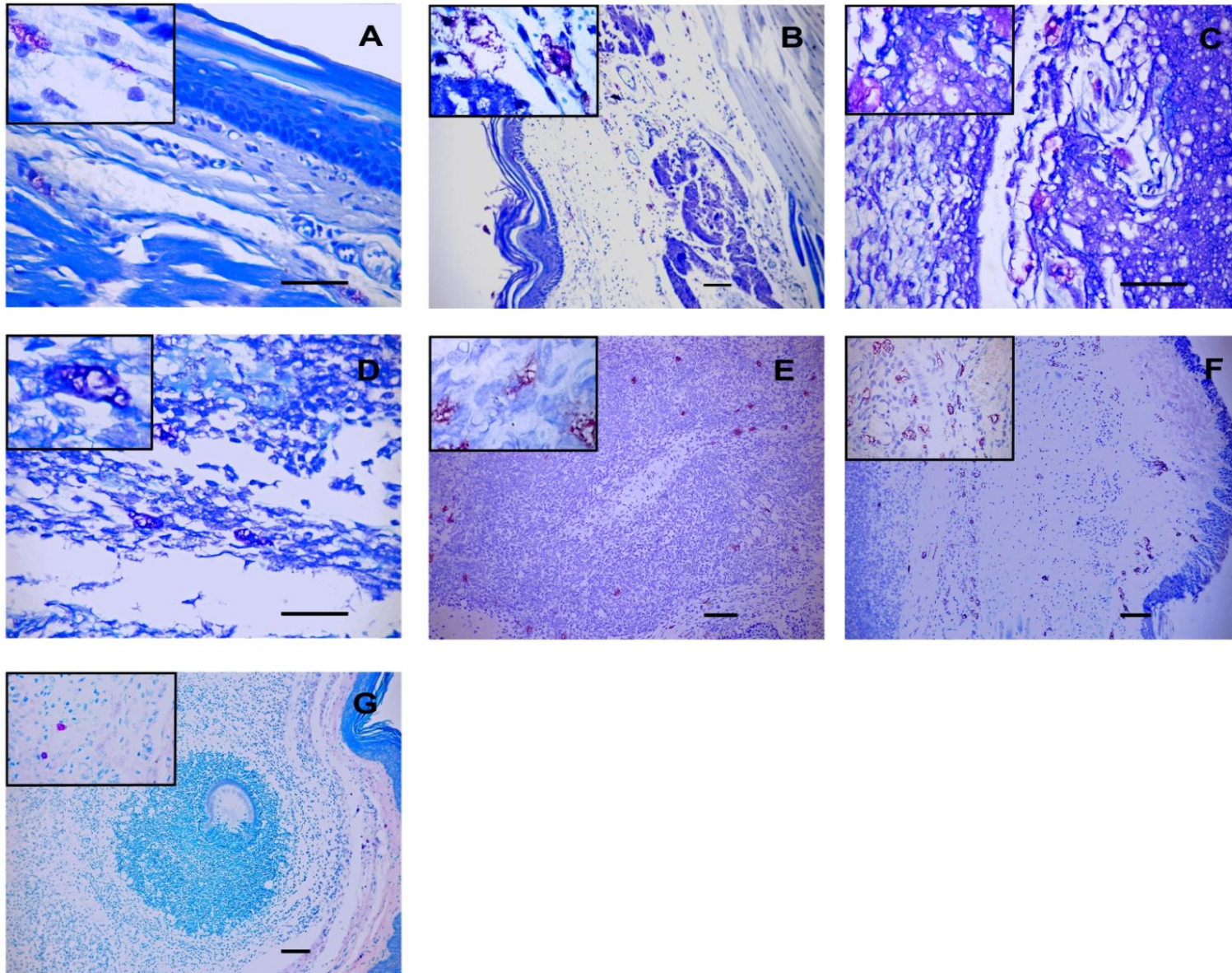


Figura 11. Cortes teñidos con azul de toluidina. A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 8 horas PI, D) 48 horas PI, E) 10 días PI, F) 20 días PI, G-F) 50 días PI. Escala = 20 µm

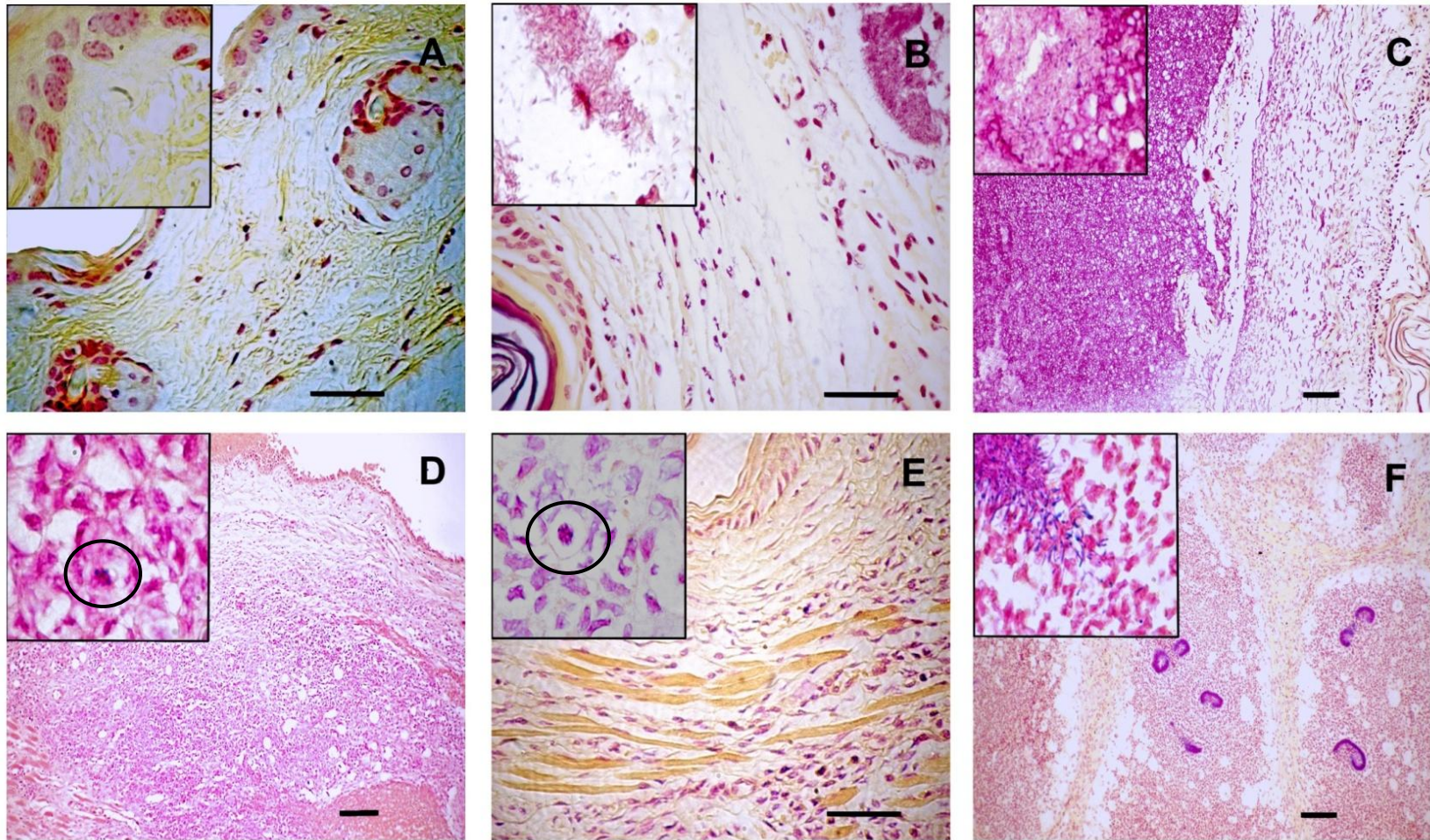


Figura 12. Cortes teñidos con Gram, A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 8 horas PI, D) 10 días PI, E) 20 días PI, F) 6 meses PI. Escala = 20  $\mu\text{m}$

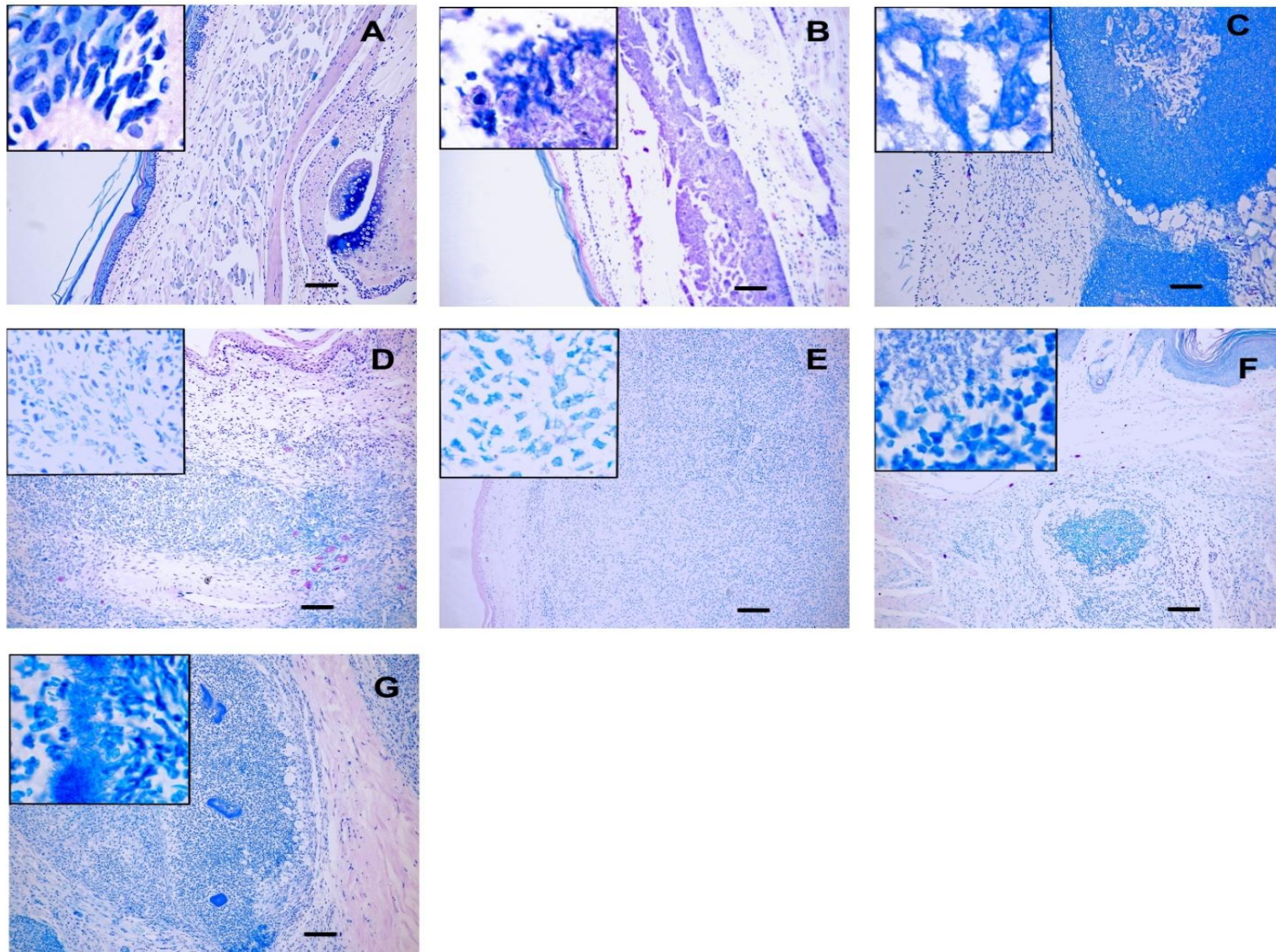


Figura 13. Cortes teñidos con Giemsa, A) tejido sano (T0), B) 2 horas PI, C) 8 horas PI, D) 10 días PI, E) 20 días PI, F) 6 meses PI. Escala = 20  $\mu$ m



En la **Figura 14**, se muestra el RNA total extraído a partir del cojinete plantar de cada lote de ratones en los diferentes tiempos PI así como de los diversos ratones controles.

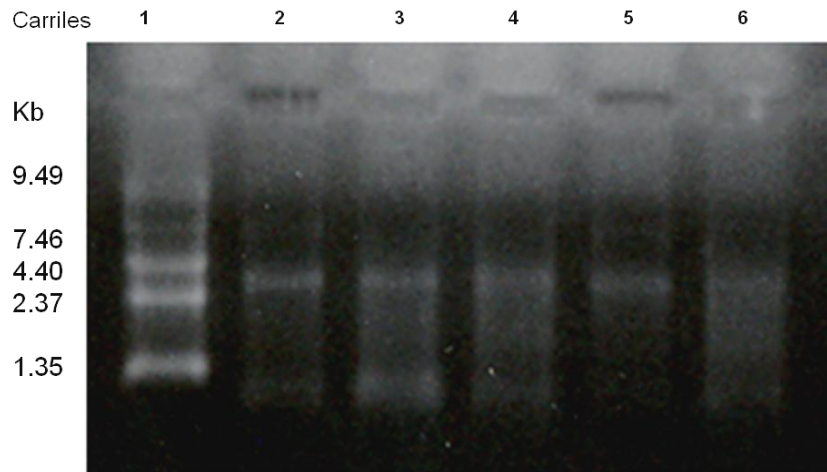


Figura 14. Gel de desnaturalización de RNA total. Carriles: 1) Marcador de peso molecular para RNA; 2) RNA de tejido sano; 3) RNA 2h PI; 4) RNA 10 días PI; 5) RNA 50 días PI; 6) RNA 6 meses PI.

### Expresión de TLR2 y TLR4 detectada por RT-PCR

A partir del RNA obtenido de los diferentes individuos, se realizó la técnica de RT-PCR para los diferentes tiempos y tratamientos de estudio.

En la **Figura 15** se muestran los geles representativos de los fragmentos amplificados de  $\beta$ -actina (288pb), TLR2 (295 pb), TLR4 (349 pb) para cada tiempo de muestreo del proceso inflamatorio durante el desarrollo del actinomicetoma.

En el gel correspondiente a  $\beta$ -actina, se observan los fragmentos con el mismo grado de amplificación en todos los tiempos. Para TLR2 se observó incremento progresivo en la

amplificación comparada con el basal, mientras que para TLR4 se observó disminución progresiva.

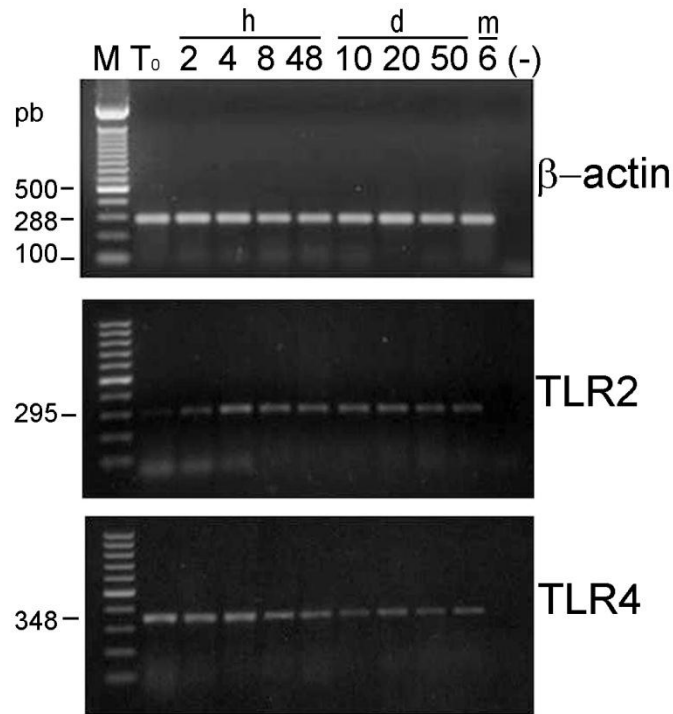


Figura 15. Productos obtenidos por RT-PCR usando los oligonucleótidos específicos para los genes de  $\beta$ -actina, TLR2 y TLR4 a diferentes tiempos. Carriles: 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2) ratones sanos (T0); de 3 a 10) ratones infectados; 11) control negativo de PCR.

La intensidad de los productos de PCR de cada grupo, tiempo y tratamiento, fue sometida a un análisis densitométrico (IDV), para obtener los valores equivalentes a nanogramos. Con los valores obtenidos se realizó un análisis estadístico comparativo para determinar las diferencias en expresión de los diversos fragmentos obtenidos.

### **Expresión de TLR2 determinada por densitometría**

En la **Figura 16 (A)** se muestra la expresión de TLR2 en el grupo inoculado con la suspensión de *N. brasiliensis*, en relación con los valores obtenidos en el tiempo basal ( $T_0$ ). Se observó un incremento significativo desde las primeras 2 horas PI. A pesar de que el comportamiento presenta altibajos, la diferencia entre los tiempos posteriores al inóculo (desde las 2 y hasta los 6 meses) no resultó significativa.

En el grupo control inoculado con solución salina isotónica (**Figura 16 B**), se observó una disminución significativa en la expresión del receptor dos horas posteriores a la inoculación; a partir de las 4 h los valores alcanzaron niveles similares al basal, sin diferencia significativa entre los tiempos.

En el grupo control inoculado con carragenina (**Figura 16 C**), la expresión de TLR2 disminuyó significativamente a las 2, 4 y 8 horas con respecto a los individuos sanos; en los siguientes tiempos se observó tendencia a recuperar los valores basales.

### **Expresión de TLR4 determinada por densitometría**

El grupo inoculado con la suspensión bacteriana presentó un comportamiento descendente gradual PI (**Figura 16 D**), comparado con los niveles basales ( $93.49 \pm 20.7$  ng). Los valores de expresión disminuyeron significativamente a partir de las 8 horas PI.

En el grupo control inoculado con solución salina isotónica (**Figura 16 E**), a pesar de presentar

disminución, los valores no fueron significativamente diferentes a los del nivel basal, con tendencia a recuperar los valores iniciales.

En el grupo inoculado con carragenina (**Figura 16 F**), la expresión bajó en las primeras 2, 4 y 8 horas; posteriormente los valores mostraron tendencia a alcanzar los valores basales.

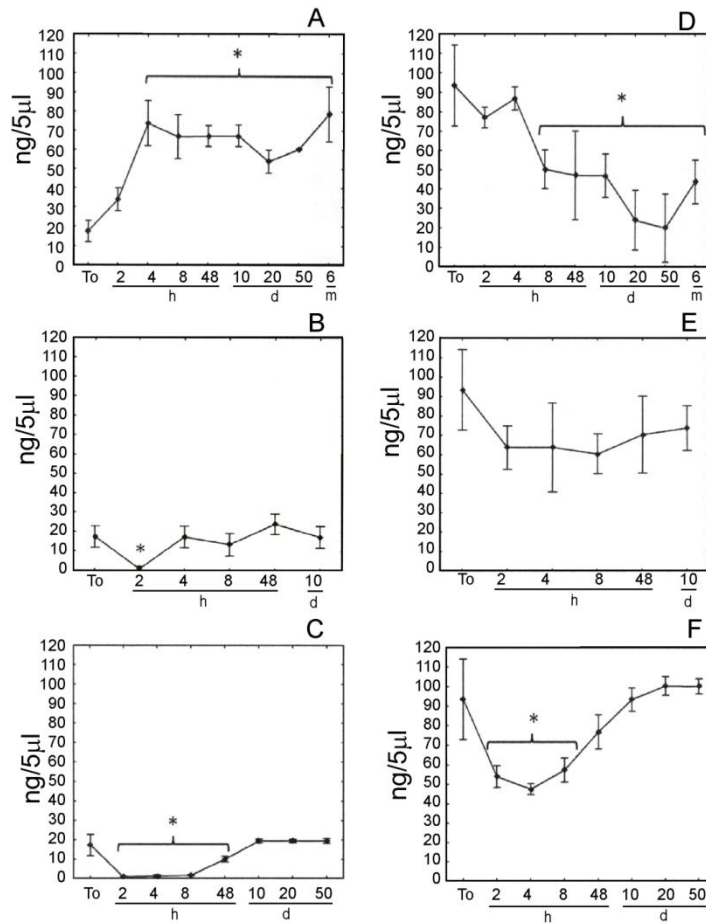


Figura 16. Resultado del análisis densitométrico de los productos obtenidos por RT-PCR. Se muestra la media y desviación estándar de la expresión de TLR2 y TLR4 en los diferentes tiempos de estudio. (\*) Valores con diferencia significativa respecto al valor basal (T0).

### **Expresión *in situ* de TLR2 detectada por inmunohistoquímica**

Con el fin de localizar la expresión de TLR2 (**Figura 17**) y TLR4 (**Figura 18**) a nivel celular durante el proceso inflamatorio en el actinomicetoma, se realizó la técnica de inmunohistoquímica. En el tejido sano se observó la expresión constitutiva de TLR2 en queratinocitos (**Figura 17 A**). Dos horas posteriores a la inoculación (**Figura 17 B**), la presencia de TLR2 en queratinocitos y células cercanas al inóculo era evidente; en este tiempo se presentó también marca en el inóculo bacteriano. Durante las 4, 8 y 48 horas posteriores a la infección (**Figuras 17 C - E**) se observó marca más localizada en las células que se encontraban inmersas en el inóculo y cercanas a éste; de acuerdo con la tinción de H-E, estas células presentaron morfología compatible principalmente con neutrófilos.

A los 10 y 20 días PI (**Figuras 17 F y G**) se observó marca en las células inflamatorias morfológicamente compatibles con macrófagos y fibroblastos en el sitio de infección, además de la marca constitutiva en queratinocitos.

A los 50 días y 6 meses PI (**Figuras 17 H e I**), la expresión se observó en las primeras líneas de neutrófilos cercanos a las colonias bacterianas; no se observó marca en aquellos que se encontraban más alejados. La marca también se observó en células espumosas, algunos macrófagos y en la capa interna de fibroblastos. En este tiempo se presentó marca en las bacterias sobre todo en la periferia de los granos, zona de crecimiento bacteriano.

### **Expresión *in situ* de TLR4 detectada por inmunohistoquímica**

Se observó expresión constitutiva de TLR4 en queratinocitos (**Figura 18 A**). Desde las 2 y hasta las 48 horas PI (**Figuras 18 B - D**), se observó marca en algunas células morfológicamente compatibles con células cebadas, cercanas al inóculo bacteriano. A los 10 y 20 días (**Figuras 18**

**E y F)** sólo se observó expresión en queratinocitos; fue notable que el marcaje en estos tiempos estaba muy disminuido comparado con el observado en las primeras horas PI. A los cincuenta días y seis meses PI, no se observó marca; en estos tiempos la expresión de TLR4 en queratinocitos estuvo muy disminuida en comparación con las observaciones en el tejido sano.

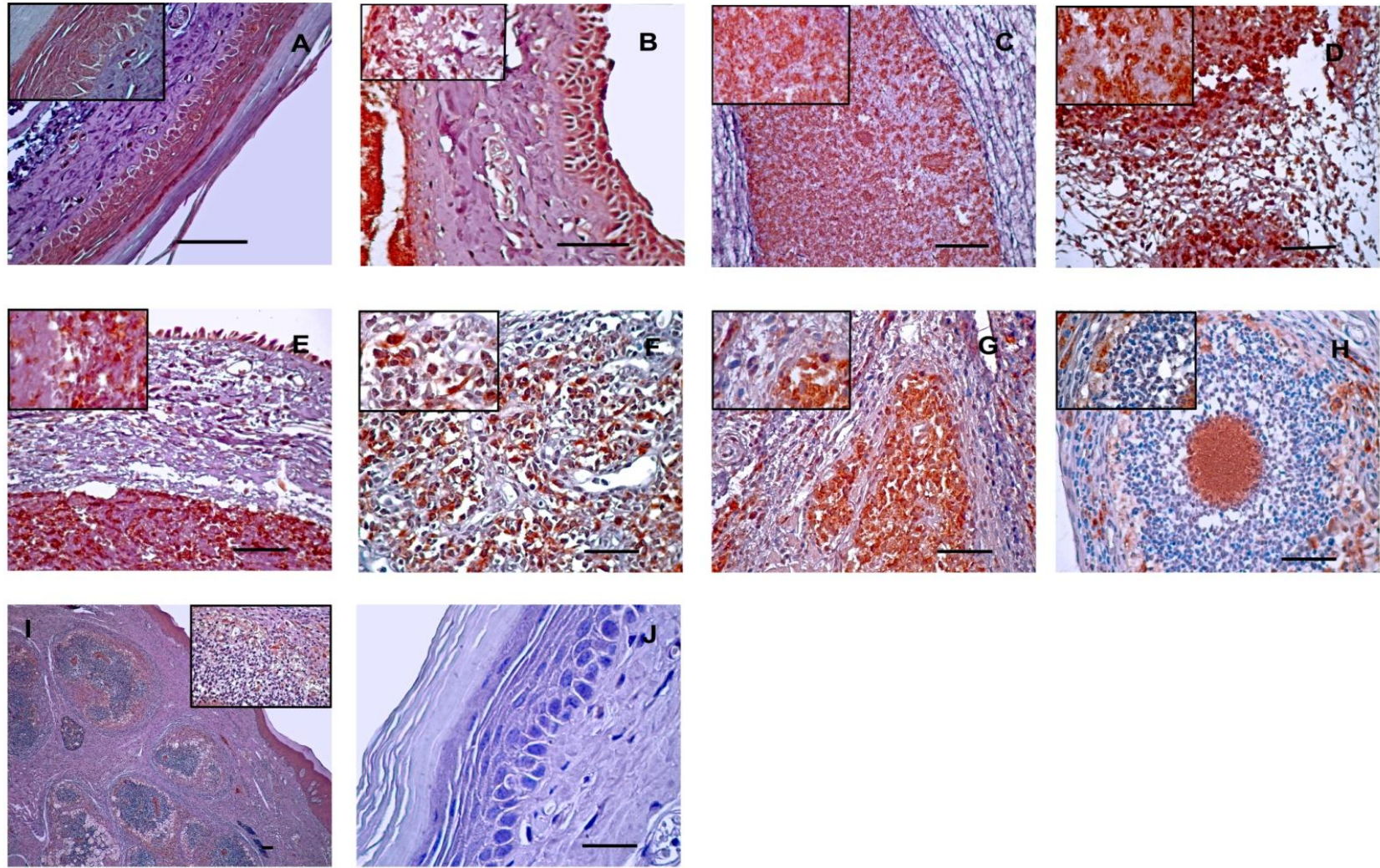


Figura 17. Localización celular de TLR2 en células inflamatorias durante el desarrollo del actinomicetoma. A) tejido sano con expresión constitutiva en queratinocitos. B) 2 horas PI, C) 4 horas PI, D) 8 horas PI, E) 48 horas PI, F) 10 días PI, G) 20 días PI, H) 50 días PI, I) 6 meses PI, J) control negativo. Escala = 20 $\mu$ m

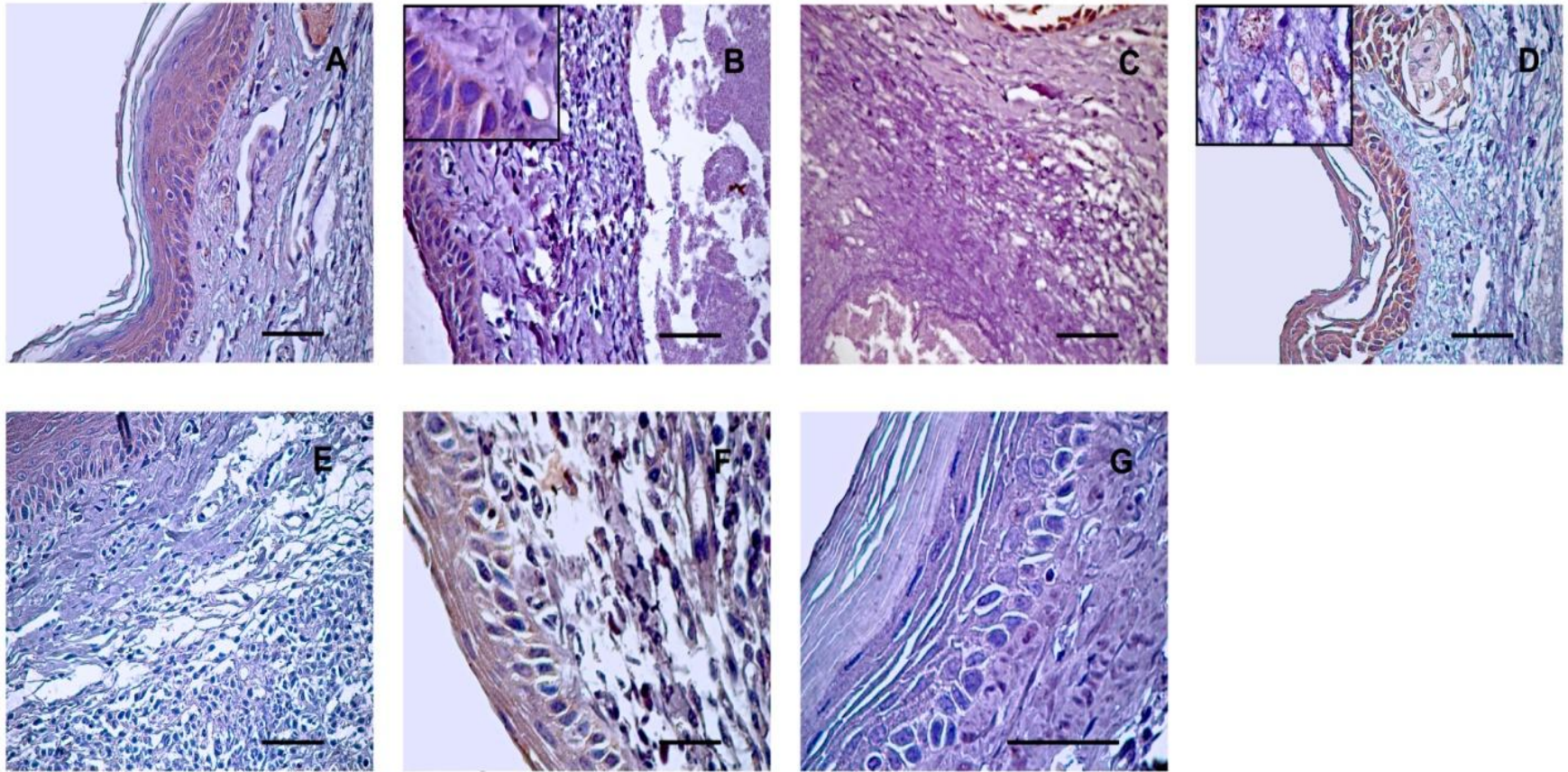


Figura 18. Expresión de TLR4 en diversos cortes de tejido. A) Tejido sano con expresión en queratinocitos. B) 2 horas PI, C) 4 horas PI, D) 8 horas PI, E) 10 días PI, F) 20 días PI, G) control negativo. Escala = 20 $\mu$ m



Debido a que con la técnica de inmunohistoquímica se observó inmuno-reactividad en el inóculo bacteriano a las 2 horas, en el grano a los 50 días y en la periferia del grano a los 6 mese PI, se realizaron pruebas adicionales de RT-PCR a partir del RNA y PCR a partir de DNA obtenidos de un cultivo puro de *N. brasiliensis*, de 4 días de incubación a 37° C, para descartar la posibilidad de que la bacteria expresara genes similares a TLR2 y TLR4. En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos. Con la amplificación dirigida a TLR2, TLR4 y  $\beta$ -actina, se observó que no hubo producto que pudiera explicar la inmunoreactividad observada en los cortes de tejido.

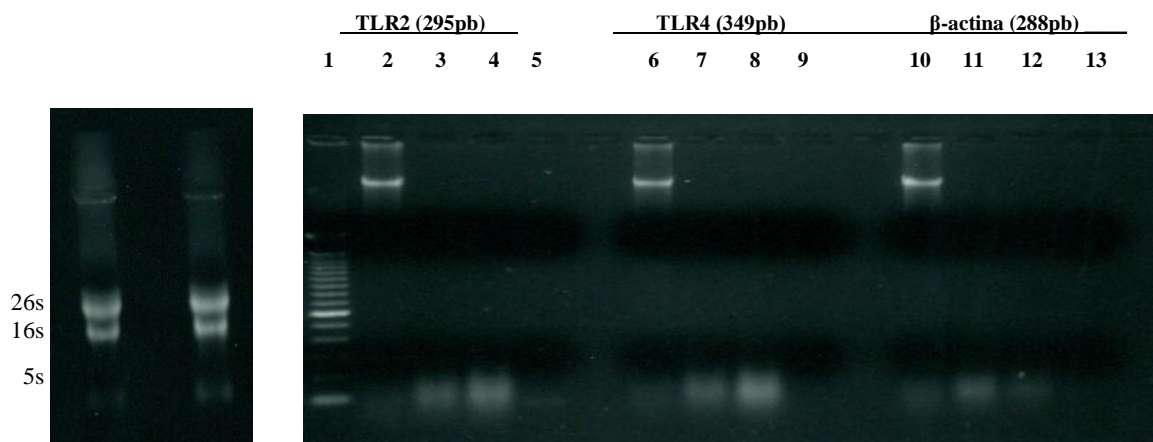


Figura 19. A) Gel desnaturalizante con el RNA total de *N. brasiliensis*. En B), gel de agarosa al 1.5%. Carriles, 1: marcador de peso molecular (100pb); 2: PCR para TLR2; 3 y 4: RT-PCR para TLR2; 6: PCR para TLR4; 7 y 8: RT-PCR para TLR4; 10: PCR para  $\beta$ -actina, 11 y 12: RT-PCR para  $\beta$ -actina específica para tejido murino, 5, 9 y 13: controles negativos de PCR.

### Expresión de citocinas detectada por RT-PCR

En la **Figura 20**, se muestran los productos amplificados de las siguientes citocinas: A) IL-1 $\beta$ , B) IL-2, C) IL-6, D) IL-10, E) IL-12, F) TNF- $\alpha$ , G) IFN- $\gamma$ , H) TGF- $\beta$ . Para cada tiempo corresponden tres carriles, uno por ratón. A partir de estos fragmentos se obtuvieron los valores de IDV.

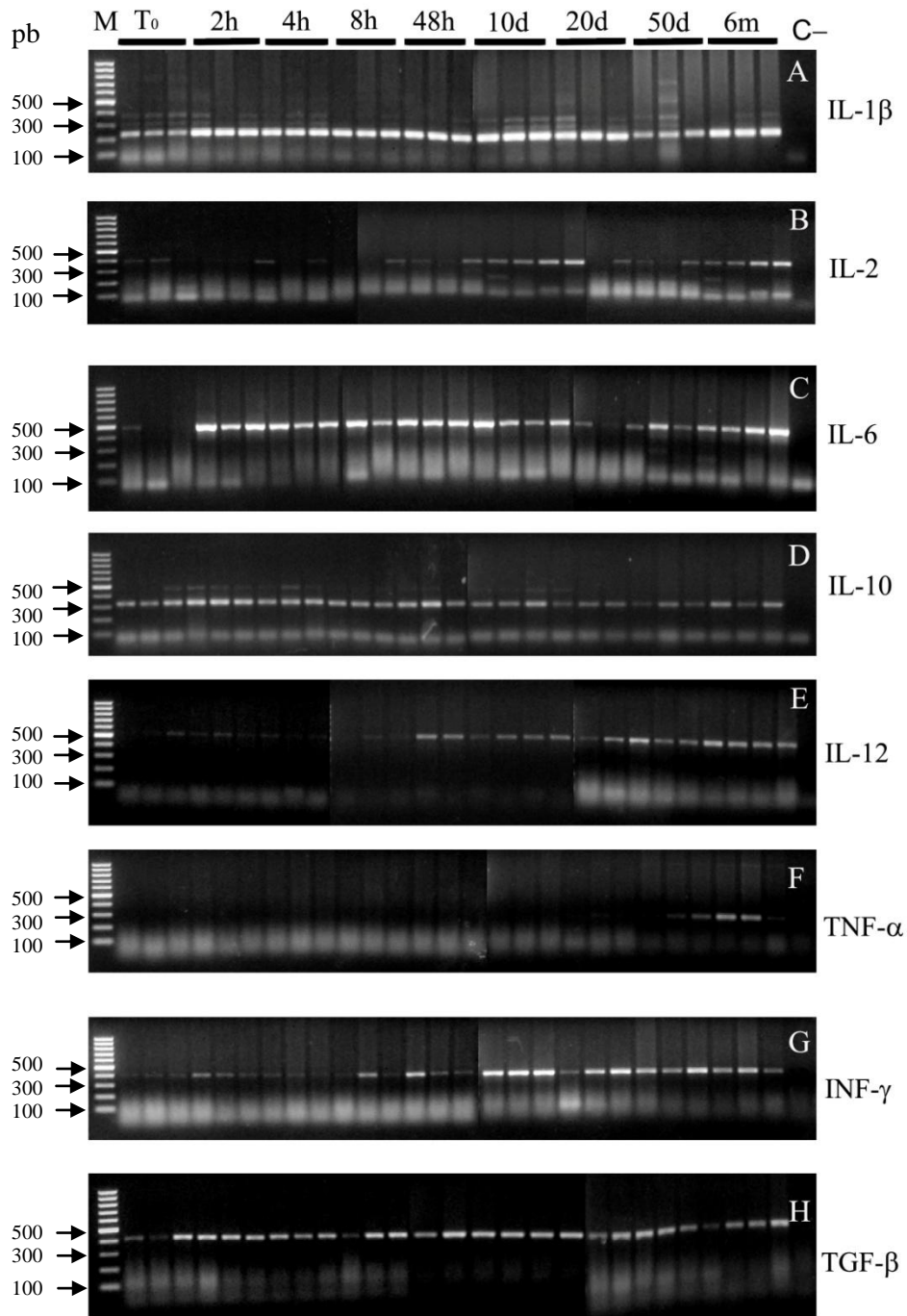


Figura 20. Expresión de citocinas detectadas por RT-PCR en el tejido murino durante el actinomycetoma experimental. Se muestran 3 carriles correspondientes a 3 ratones para cada tiempo (T<sub>0</sub> = individuos sanos; C- = control negativo de PCR).

Durante el análisis densitométrico de citocinas se observó:

### **Expresión de IL-1 $\beta$**

Los resultados mostraron un incremento significativo en la expresión de esta citocina desde las primeras 2 horas, el cual se mantuvo alto durante los primeros 10 días PI. A los 20 días se observó disminución, a los 50 días PI los valores se aproximaron mucho a los valores basales, a los seis meses se observa una ligera reactivación de la expresión (**Figura 21 A**).

### **Expresión de IL-2**

Los resultados mostraron un ligero incremento significativamente diferente al valor basal solo a los 10 días y 6 meses PI (**Figura 21 B**).

### **Expresión de IL-6**

Se observó incremento significativamente diferente al valor basal durante las primeras 48 horas PI; se presentó una expresión máxima a las 2 horas PI, con tendencia a disminuir. A partir de los 10 días PI y hasta los 6 meses, la expresión de esta citocina fue muy similar a la observada en los ratones sanos (**Figura 21 C**).

### **Expresión de IL-10**

Esta citocina se incrementó en las primeras 2 horas PI; sin embargo disminuyó gradualmente alcanzando los niveles basales a las 8 horas PI y así se mantuvo durante la evolución de la enfermedad (**Figura 21 D**).

### **Expresión de IL-12**

Esta citocina se mantuvo en niveles cercanos a los basales durante los 20 días posteriores a la infección; después se presentó un ligero pero significativo aumento a partir de los 50 días PI con respecto a los tiempos anteriores (**Figura 21 E**).

### **Expresión de TNF- $\alpha$**

Sus niveles se mantuvieron en cero durante los primeros 10 días PI; después se observó una tendencia ascendente significativa que se mantuvo hasta los seis meses PI (**Figura 21 F**).

### **Expresión de IFN- $\gamma$**

Esta citocina mostró valores similares al basal durante las primeras 48 horas PI; en el día 10 se observó el pico máximo de expresión y posteriormente los niveles de expresión mostraron un comportamiento descendente alcanzando niveles por debajo del valor basal (**Figura 21 G**).

### **Expresión de TGF- $\beta$**

El incremento en los valores de esta citocina, estadísticamente solo fue significativo a las 48 horas y 10 días PI (**Figura 21 H**).

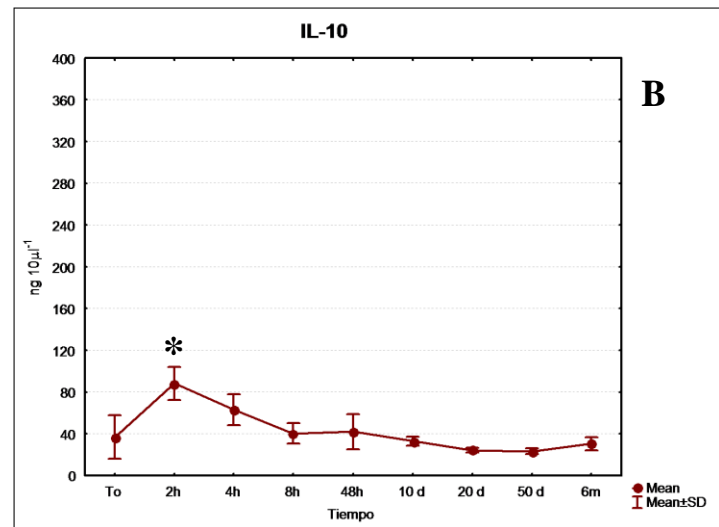
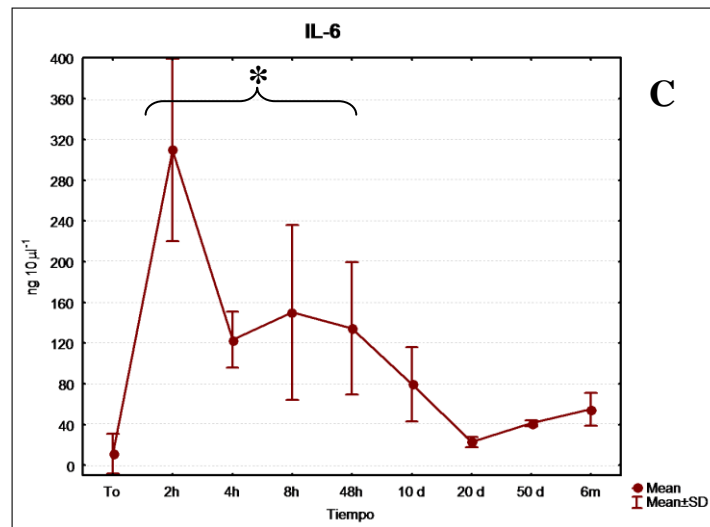
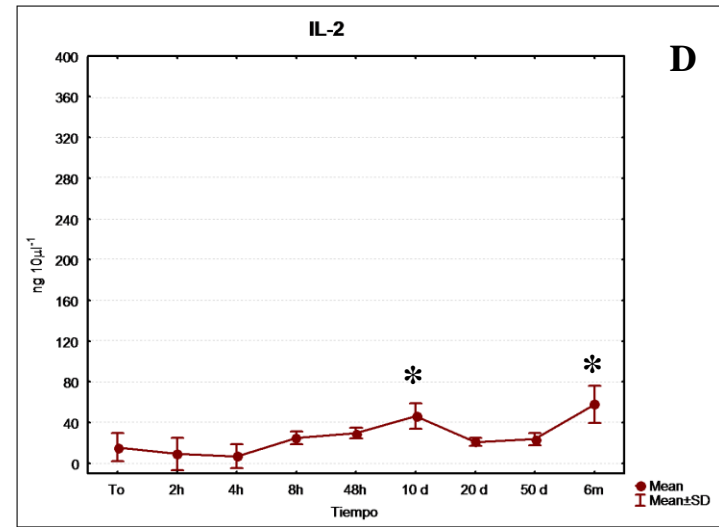
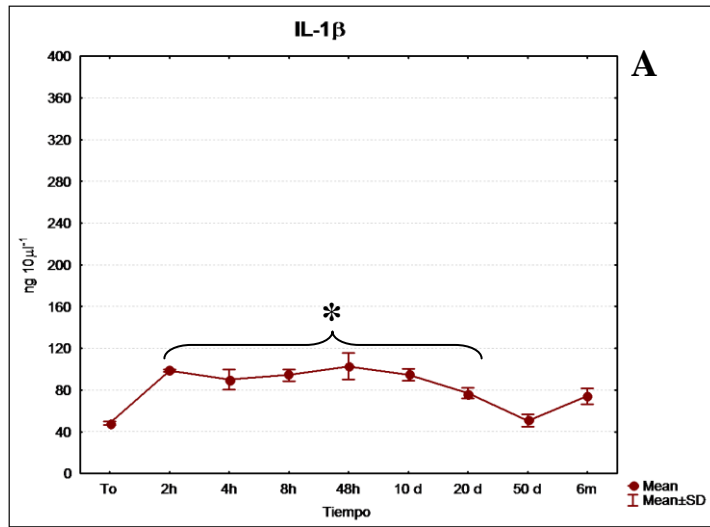


Figura 21. Expresión de mRNA de citocinas determinada por densitometría, durante el establecimiento y evolución del actinomictoma, en el modelo murino. Se representa la cantidad de nanogramos (ng) de citocinas en 10  $\mu$ l de producto de PCR. A ) IL- $\beta$ 1, B) IL-2, C) IL-6, D )IL-10, E) IL-12, F) TNF- $\alpha$ , G) IFN- $\gamma$ , H) TGF- $\beta$ , valores significativamente diferentes \*.

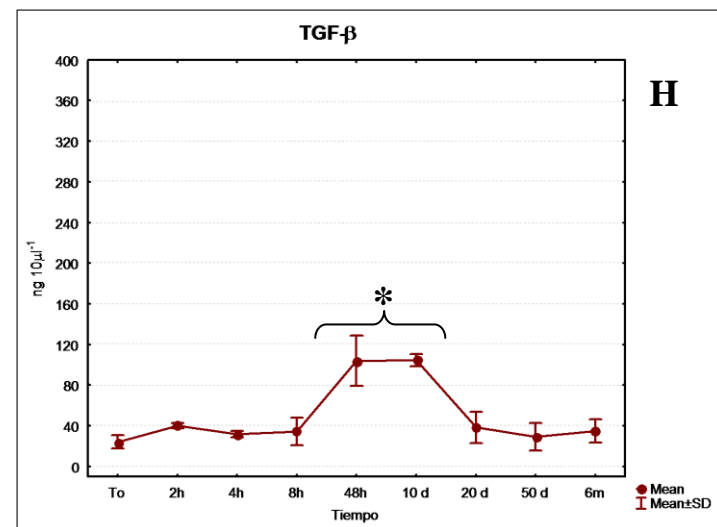
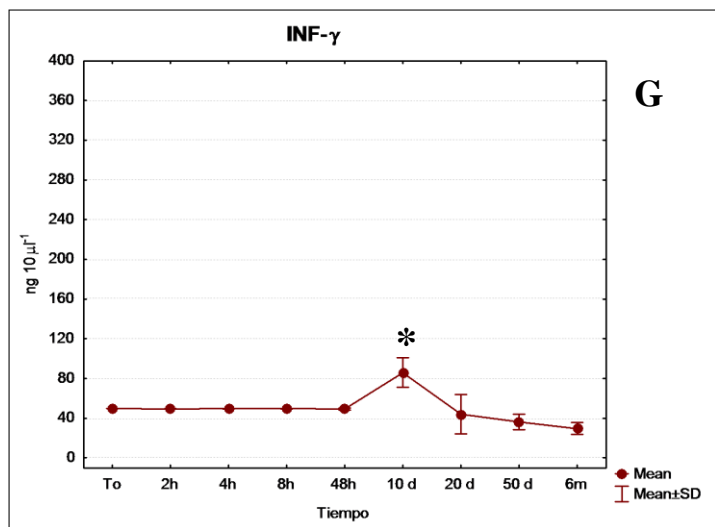
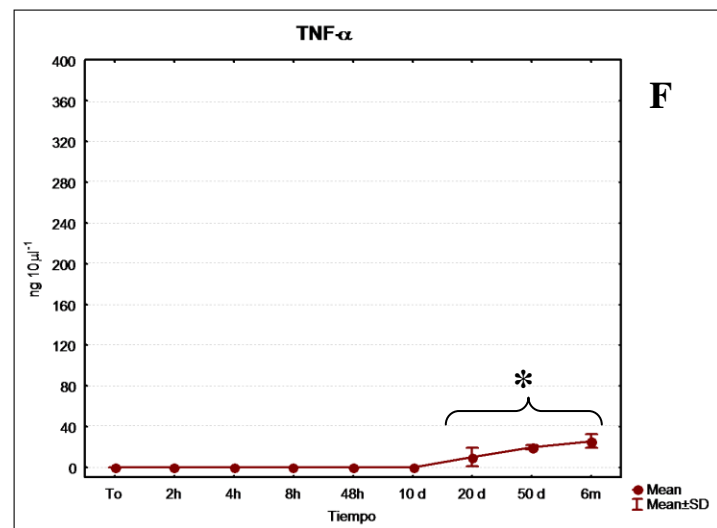
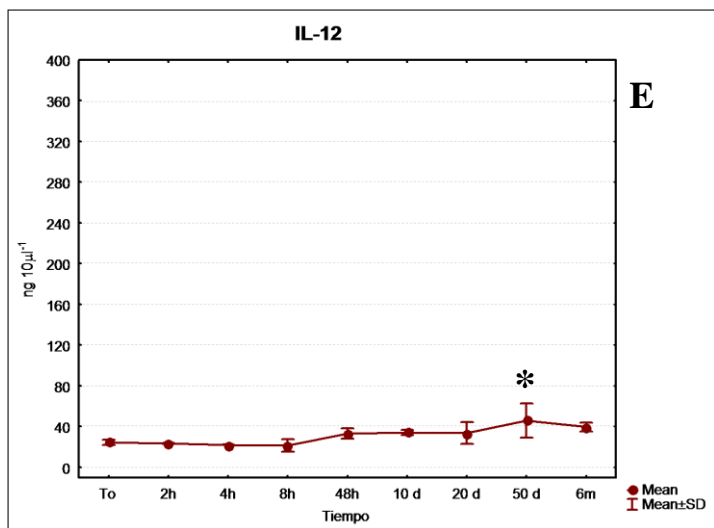


Figura 21 continuación.

Para determinar si las diferencias en expresión de TLR2 y TLR4 se encontraban relacionadas con la expresión de las diversas citocinas estudiadas, se realizó un análisis de correlación, los valores obtenidos se muestran en el **Cuadro 4**. Se presenta el sentido de la variación entre ambas variables **R positivos**, indican que los valores en ambas variables tienen relación directa, es decir, el aumento de uno, tiene relación con el aumento del otro; por otro lado, **R negativos**, indican una relación inversa, es decir, mientras los valores en una variable aumentan en la otra disminuyen, si los valores se encuentran cercanos a  $\pm 1$ , se observa que la relación es casi de manera lineal, mientras que los valores cercanos a 0 representan dispersión no relacionada entre ambas variables. Se representa también la fuerza de la relación ( $R^2$ ), la relación es más fuerte entre más cercanos estén los valores a 1.

En el cuadro se observa que la expresión entre TLR2 y TLR4 durante el establecimiento del actinomicetoma fue inversa (valores de R negativos), es decir con el incremento en TLR2, disminuyó TLR4.

Con respecto a la expresión de TLR2 contra la expresión de citocinas, se observó que la relación es débil (valores de  $R^2$ ) pero directa con IL-1 $\beta$  e IL-2, presentando una relación aún más débil con el incremento en la expresión de IL-12, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ .

TLR4, estuvo inversamente correlacionado con la expresión de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , mientras que se presentó una relación directa y no muy débil entre la expresión de éste receptor con IL-10 y TNF- $\alpha$ .

Al observar la influencia entre las diversas citocinas, encontramos que existió correlación directa entre

IL-1 $\beta$  con IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$ . Se observó que la expresión de IL-2, se encuentra directamente relacionada con la expresión de IL-12, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , mientras prácticamente no se encuentra relacionada o presenta correlación inversa con la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6. Por otro lado, IL-6 se encontró directamente correlacionada con IL-10 ésta a su vez presentó valores de correlación inversa con IL-12 y TNF- $\alpha$ . IL-12 se correlacionó de manera directa con IL-2 y TNF- $\alpha$ . Mientras que IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , presentaron correlación directa y relativamente fuerte.

Par de variables	Valores de R	Valores de R <sup>2</sup>	Par de variables	Valores de R	Valores de R <sup>2</sup>
TLR4/IL-12	-0.685969	0.4705	IL-1 $\beta$ /IL-12	-0.359514	0.1292
IL-12/TNF- $\alpha$	0.660016	0.4356	TLR2/IL-1 $\beta$	0.351119	0.1232
IL-1 $\beta$ /IL-6	0.614055	0.3770	TLR4/IL-6	0.306572	0.0939
IL-6/IL-10	0.609921	0.3720	TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$	-0.302766	0.0916
IFN- $\gamma$ /TGF- $\beta$	0.588853	0.3467	TLR2/TNF- $\alpha$	0.297313	0.0883
IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$	0.558161	0.3115	TLR2/TGF- $\beta$	0.286515	0.0820
TLR4/TNF- $\alpha$	-0.532506	0.2835	TLR2/IL-10	-0.257699	0.0664
IL-2/IL-10	-0.479331	0.2297	TLR2/IL-12	0.237938	0.0566
TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$	-0.478813	0.2292	IL-2/IL-6	-0.216002	0.0466
IL-2/IL-12	0.472664	0.2234	IL-12/TGF- $\beta$	0.170644	0.0291
TLR4/IL-10	0.467086	0.2181	TLR4/TGF- $\beta$	-0.155176	0.0240
IL-1 $\beta$ /IL-10	0.456566	0.2084	TLR4/IFN- $\gamma$	0.138135	0.0190
IL-10/IL-12	-0.437844	0.1917	TLR4/IL-1 $\beta$	0.127121	0.0161
IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$	-0.437242	0.1911	IL-6/TGF- $\beta$	0.087060	0.0075
IL-10/TNF- $\alpha$	-0.432696	0.1872	IL-6/IFN- $\gamma$	0.066202	0.0043
IL-2/TNF- $\alpha$	0.405374	0.164	TLR2/IL-6	-0.065239	0.0042
IL-6/IL-12	-0.396707	0.1573	IL-12/IFN- $\gamma$	-0.060835	0.0037
TLR2/IL-2	0.389720	0.1518	IL-10/IFN- $\gamma$	0.060035	0.0036
TLR2/TLR4	-0.388025	0.1505	TLR2/IFN- $\gamma$	-0.051394	0.0026
IL-6/TNF- $\alpha$	-0.385768	0.1488	IL-2/IFN- $\gamma$	0.049779	0.0024
IL-1 $\beta$ /IFN- $\gamma$	0.365339	0.1334	IL-10/TGF- $\beta$	-0.036654	0.0013
IL-2/TGF- $\beta$	0.363913	0.1324	IL-1 $\beta$ /IL-2	0.017431	0.0003
TLR4/IL-2	-0.363540	0.1321			

Cuadro 4. Valores de R y R<sup>2</sup> obtenidos en el análisis de correlación, del más alto al más pequeño.

La representación gráfica de este análisis de correlación se muestra en la **Figura 22**.



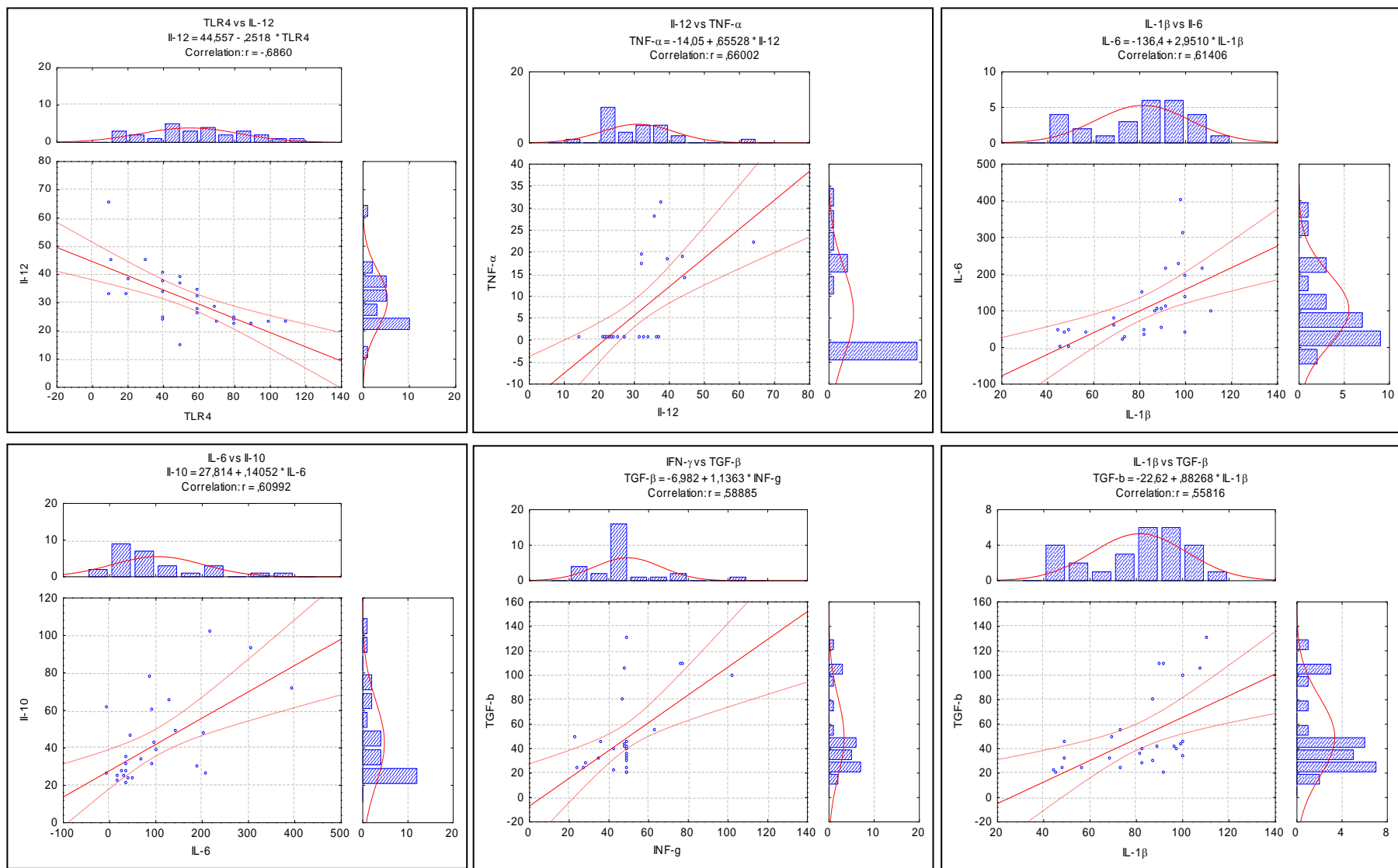


Figura 22. Correlación de la expresión entre TLRs y las diferentes citocinas estudiadas durante el proceso inflamatorio desarrollado en el actinomictoma. Solamente se muestran las gráficas de TLRs y/o citocinas que presentaron correlación más alta.

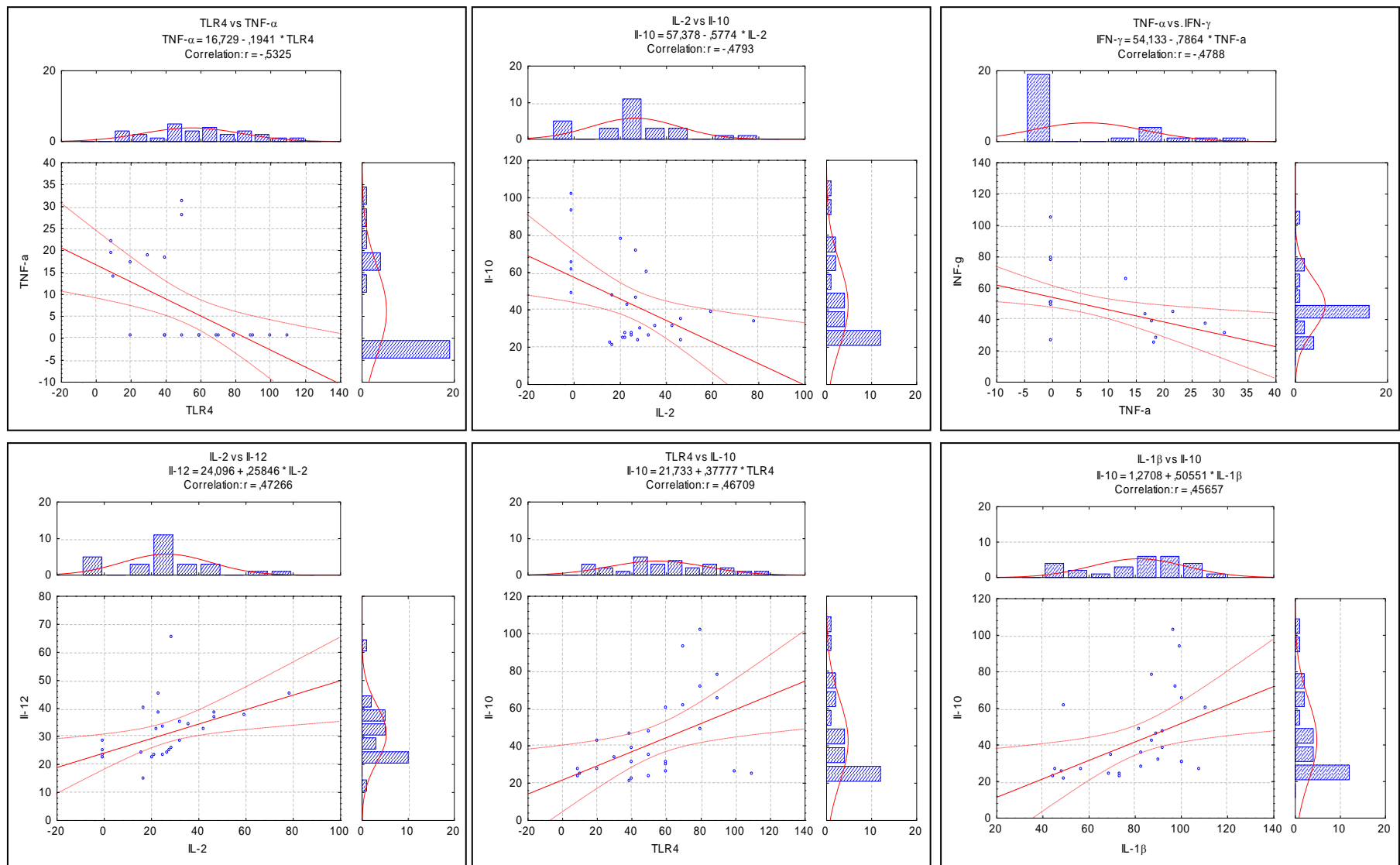


Figura 22. Continuación 1.

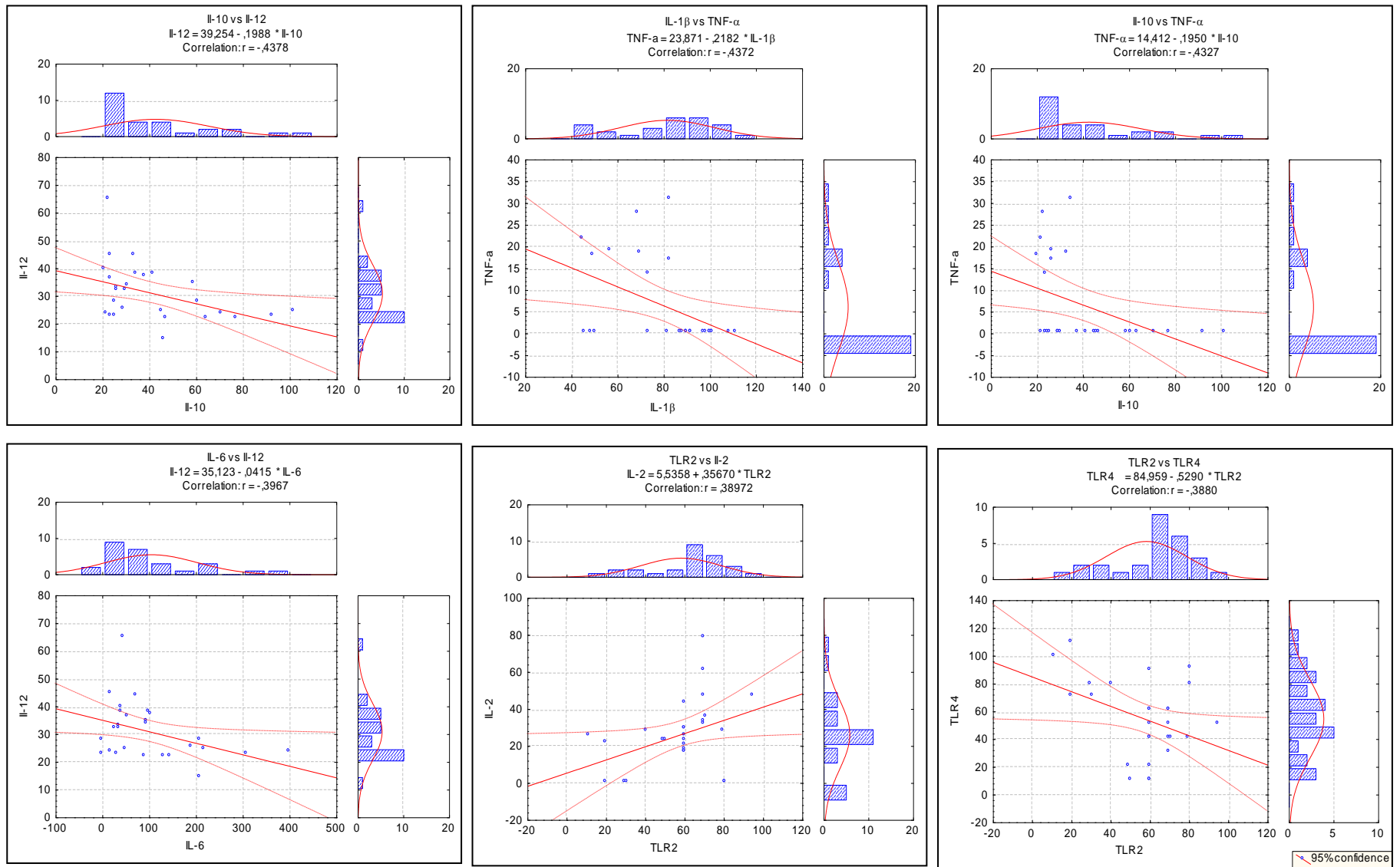


Figura 22. Continuación 2.

# Capítulo 3

## DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la dinámica de poblaciones celulares y de algunas moléculas de respuesta (citocinas) *in situ* a la infección inducida por *N. brasiliensis* (actinomicetoma) en diferentes tiempos en un modelo experimental murino.

### **Poblaciones celulares identificadas por su morfología**

Se observaron morfologías microscópicas consistentes con un proceso inflamatorio infeccioso agudo en la etapa temprana de la infección por *N. brasiliensis*. Desde las 2 hasta las 48 h PI se observó la participación principalmente de neutrófilos y macrófagos en el sitio de inoculación, particularmente infiltrados entre el inóculo, lo que sugiere que estas células están asociadas al proceso de fagocitosis para la eliminación del agente externo. Durante esta etapa se evidenció también la presencia de células cebadas en degranulación en el inóculo bacteriano; es posible que estas células jueguen un papel fundamental en la atracción de neutrófilos al sitio de infección, y en consecuencia en la eliminación del inóculo bacteriano. Egozi *et al.* (2003) y Weller *et al.* (2006), quienes en un estudio de reparación celular observaron un menor reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios de traumatismo en ratones deficientes en la producción de células cebadas, ellos atribuyen parte de la infiltración de neutrófilos y macrófagos a la acción de estas células. Durante la etapa temprana de infección se observó que las células cebadas estuvieron incrementadas en tamaño y con gran cantidad de gránulos expulsados hacia el inóculo. Es probable que la atracción inicial de células inmunitarias hacia el sitio del inóculo, en parte estuviese mediada por la acción de las estas células.

Durante los 10 y 20 días PI, el inóculo bacteriano había sido aparentemente eliminado casi en su

totalidad; sin embargo, se observó infiltrado importante constituido principalmente por macrófagos, lo que fue un indicador de la presencia del estímulo que seguía induciendo inflamación persistente; con la tinción de Gram se evidenciaron bacterias intracelulares en células morfológicamente compatibles con macrófagos. Durante estos tiempos observamos modificaciones en la morfología celular, donde los macrófagos se evidenciaron más frecuentemente en el sitio de infección. De acuerdo a lo anterior suponemos que es durante este tiempo que se inicia la transición a la etapa crónica del padecimiento. Desde del día 10 PI se observó la formación de células espumosas, las cuales de acuerdo a diversos trabajos, se desarrollan a partir de la fusión de macrófagos con abundantes cuerpos lipídicos; éste tipo de células se ha asociado con la persistencia crónica de estímulos proinflamatorios, ya sea en enfermedades de tipo autoinmune o en infecciones crónicas como las ocasionadas por *M. tuberculosis* (D'Ávila et al., 2006), *Chlamydia* (Cao, 2007) y *Toxoplasma* (Nishikawa, 2005). Se ha demostrado que los bacilos intracelulares de *M. tuberculosis* incrementan la producción y exocitosis de lípidos hacia el medio. El tipo principal de lípidos secretados por las micobacterias son: dimicolato de trehalosa (TDM) y lipomananas, los cuales inducen características semejantes a las observadas durante la formación de granulomas provocados por el bacilo completo como neovascularización, formación de células gigantes, macrófagos epiteloideos, macrófagos espumosos y fibrosis (D'Ávila et al., 2006) se ha reportado que *N. brasiliensis* presenta TDM y lipomananas (Lechevalier, 1967; Sandoval, 1996; Beaman, 1993; Beaman, 1994; Chun, 1995; Yamamura, 2004). Es altamente probable que las bacterias de *Nocardia* presentes en el sitio de infección utilicen estos mismos mecanismos incrementando su producción de lípidos a partir de los 10 días PI, estimulando la formación de las células espumosas observadas.

En la etapa tardía de la infección (después de 50 días), observamos la conformación de los granulomas típicos descritos en el actinomicetoma, constituidos por una microcolonia del agente causal rodeada por

neutrófilos y macrófagos, además de una capa de macrófagos y linfocitos envueltos por una capa de células fibróticas hacia la periferia (Conde, *et al.*, en 1983; Guimarães *et al.*, 2003). Solo queda resaltar que observamos células infiltradas en los granos, dando como resultado algunas formas clásicas descritas para estas estructuras: arriñonadas y vermiformes. Sugerimos que esta distribución bacteriana en el grano propicia la fragmentación de la colonia y en consecuencia un nuevo foco de crecimiento bacteriano contribuyendo a la patología.

### **Expresión de TLRs**

El reconocimiento de agentes externos a través de diversos receptores de las células de respuesta inmune del hospedero tiene un papel esencial en la respuesta contra la infección. Se ha descrito que los TLRs se encargan de reconocer moléculas del agente infeccioso, activando una o más vías de señalización dirigiendo así la respuesta inmune. En éste trabajo se observó y cuantificó la expresión del mRNA de TLR2 y TLR4 implicados en el reconocimiento bacteriano.

Se mostró que los neutrófilos y macrófagos cercanos a *N. brasiliensis* incrementaron la expresión de TLR2 durante las primeras horas PI, hallazgo que sugiere que algunos componentes celulares de *N. brasiliensis* actúan como ligandos para este receptor, estimulando su expresión y desencadenando señales intracelulares que promueven una respuesta inflamatoria en el sitio del inóculo. Consistente con esta aseveración, algunos trabajos han descrito que la interacción de TLR2 y *Mycobacterium tuberculosis* mediado a través del reconocimiento de ligandos como LpqH (Brightbill, *et al.*, 2009), LprA (Pecora *et al.*, 2006), LprG (Gehring *et al.*, 2004) y otras moléculas, inicia la activación celular en respuesta a la infección. Consideramos que moléculas similares en *N. brasiliensis* podrían interactuar con TLR2, jugando un papel similar al observado en *M. tuberculosis*.

La deficiencia de TLR2 se ha asociado con la infección progresiva y con alta carga bacteriana en la tuberculosis y la lepra lepromatosa, algunas veces con desenlace fatal. Estudios *in vitro* han demostrado que los macrófagos deficientes de TLR2 son incapaces de responder a la estimulación por cualquier producto micobacteriano probado, aunque producen pequeñas cantidades de citocinas pro-inflamatorias y una baja respuesta del óxido nítrico (Nicolle *et al.*, 2004). Por el contrario, en la lepra tuberculoide se sugiere que un fuerte incremento en TLR2 podría tener un papel fundamental en el control de la infección por *M. leprae* (Krutzik *et al.*, 2003; Modlin 2010).

Estudios de diversos autores sugieren que TLR2 podría modular negativamente algunas funciones celulares, por ejemplo, se ha descrito que la interacción de TLR2 con los ligandos de *M. tuberculosis* inhibe la presentación de antígenos por MHC de clase II en macrófagos (Noss *et al.*, 2001) y disminuye la respuesta de los macrófagos al IFN- $\gamma$  (Fortune *et al.*, 2004; Banaiee *et al.*, 2006). Además se ha reportado que en ausencia de TLR2 funcional durante la infección experimental por *M. tuberculosis*, las bacterias crecieron de forma controlada, y que la formación del granuloma, el reclutamiento de células T y de macrófagos, así como su activación y expresión de óxido nítrico sintasa fue normal (Nicolle *et al.*, 2004). Así, existe la posibilidad de que TLR2 tuviera un efecto negativo en el actinomicetoma, contribuyendo a su evolución clínica y patológica, modificando la respuesta celular permitiendo su supervivencia y por tanto favoreciendo la cronicidad de la infección.

Durante los estados tardíos del actinomicetoma, TLR2 se expresó en células espumosas y en fibroblastos localizados en la periferia del granuloma. Estas observaciones sugieren que TLR2 podría participar en el confinamiento local del microorganismo (como se ha propuesto para *M. tuberculosis* por Sugawara, *et al.*, 2003; Tjärnlund *et al.*, 2006) pero no en su eliminación, ya que de acuerdo con las observaciones clínicas la enfermedad progresa por tiempo indefinido (al menos 6 meses en la infección experimental y



por varios años en el humano).

La expresión de TLR4 fue observada sólo en células cebadas activas durante las primeras 48 horas PI. Más tarde la inmunoreactividad para este receptor desapareció. A pesar de que se ha propuesto que TLR4 juega un papel fundamental en el reconocimiento y lucha contra micobacterias, no se ha logrado un consenso en este tema. Algunos estudios reportan que TLR4 juega un papel protector en la tuberculosis pulmonar murina experimental, donde se ha descrito un incremento en la susceptibilidad, mortalidad y carga bacteriana en ratones con TLR4 no funcional (Abel *et al.*, 2002; Branger *et al.*, 2004). En el caso de *N. brasiliensis*, esta bacteria podría estar regulando negativamente la expresión de TLR4 en estados tardíos del micetoma, induciendo un desequilibrio entre la respuesta inmune del hospedero y la carga bacteriana presente en el sitio de infección favoreciendo la cronicidad. Otros autores han encontrado que los ratones deficientes en TLR4 no difieren en su respuesta contra micobacterias, comparados con la respuesta observada en la cepa silvestre de ratones (Feng *et al.*, 2003). En un estudio se reporta que el fosfatidilinositol manosido (PIM), un componente de la pared celular de *M. tuberculosis* inhibe la vía de TLR4, modificando la liberación de citocinas y quimiocinas por macrófagos estimulados por lipopolisacárido; este efecto es independiente de la presencia de TLR2 (Doz, *et al.*, 2009). A pesar de que no se sabe si *N. brasiliensis* presenta PIM, se ha descrito que presentan fosfatidil inositol, por lo que suponemos que una interacción similar pudiera estar presente en *N. brasiliensis* y regular negativamente la expresión de TLR4.

### **Expresión de Citocinas**

La unión de TLRs a sus respectivos PAMPs es un evento esencial en la respuesta inmune innata contra la infección debido a que desencadena vías de señalización que tienen como resultado la producción de

citocinas que activan otras células de la respuesta inmune del hospedero y que son la unión con la respuesta inmune adaptativa.

Durante la etapa inicial de la infección se observó incremento en las IL-1 $\beta$  e IL-6, citocinas que se han asociado con el reclutamiento de neutrófilos como lo señalan Lee *et al.* (2010). Estos autores observaron que la expresión de E-selectina, esencial para el reclutamiento de neutrófilos, está regulada por la producción y acción de IL-1 $\beta$ . En esta etapa también se incrementó la expresión de IL-10, citocina reguladora, que tal vez podría generar un equilibrio entre el proceso inflamatorio evitando una respuesta exacerbada que pudiera poner en riesgo la integridad de hospedero (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011); por otro lado, la producción de esta citocina podría estar actuando como inhibidor de la respuesta de macrófagos activados por citocinas características de las respuestas de tipo Th1 en etapa aguda, mientras que algunos de los macrófagos podrían ser productores de IL-10 y quimiocinas (Verreck *et al.*, 2006).

Se observaron modificaciones en la expresión de casi todas las citocinas estudiadas en los días 10 y 20; se incrementó la expresión de IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , citocinas relacionadas con una respuesta de tipo Th1 (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011). También hubo incremento en TGF- $\beta$  y disminución en IL-1 $\beta$  e IL-6 partir del día 10, mientras que la expresión de IL-10 se mantuvo prácticamente con valores basales. El análisis de correlación mostró relación inversa de la expresión de citocinas presentes en etapa aguda con respecto a la etapa crónica.

Se ha reportado que las citocinas tienen influencia en los tipos celulares presentes en el foco de infección, por lo que asumimos que las modificaciones en su expresión podrían tener implicaciones en la remodelación celular observada durante los días 10 a 20 de la evolución del actinomicetoma

experimental. En estos tiempos se observó el inicio en la formación de granulomas, lo que coincidió con el incremento en la expresión de TNF- $\alpha$ , como lo observaron Roach *et al.*, 2002; estos autores demostraron la importancia de dicha citocina en la formación de granulomas. De acuerdo a estos autores los ratones deficientes en TNF- $\alpha$  tienen insuficiencias en el reclutamiento de leucocitos y retraso en la formación de granulomas en pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* y *M. smegalensis*. El TNF- $\alpha$  se ha encontrado altamente expresado dentro de granulomas de individuos con tuberculosis (Barnes *et al.*, 1990) y lepra (Khanolkaryoung *et al.*, 1995).

La citocina TGF- $\beta$  se encuentra relacionada con la activación de fibroblastos en conjunto con IL-6 e IL-17 (Booth, 2010), y con la actividad anti-inflamatoria; este fenómeno se ha observado principalmente en el estudio de rechazo a trasplantes de órganos. Durante este trabajo observamos la participación de fibroblastos activos desde las primeras dos horas PI, y una gran cantidad de fibrosis y fibroblastos a los 10 y 20 días PI, lo que coincide con el pico máximo de expresión de esta citocina. Al actuar como mediador anti-inflamatorio, esta citocina podría estar relacionada con lo que se observa en el micetoma de pacientes, en donde se ha reportado la tendencia a desarrollar una respuesta inflamatoria de tipo Th2.

Los resultados del estudio de citocinas que aquí presentamos coinciden con el reporte de Salinas-Carmona *et al.* (2009), quienes observaron incrementos séricos de IFN- $\gamma$  e IL-4, IL-6 e IL-10 desde las primeras horas PI, y no encontraron variaciones en IL-2 y TNF- $\alpha$ , en la etapa temprana de la infección experimental. Méndez-Tovar *et al.* (2004) encontraron que los monocitos de sangre periférica (MSP) de pacientes con micetoma producen mayores cantidades de TNF- $\alpha$  e IL-4, mientras que los MSP de individuos sanos produjeron niveles elevados de IFN- $\gamma$  e IL-12, como se encontró en el presente trabajo: los ratones en etapa inicial de infección tienden a producir citocinas como IFN- $\gamma$ , mientras que el cambio

en expresión de citocinas se relacionó con el cambio celular y el establecimiento de la infección. Así, la producción de citocinas tendría una relación con el tiempo de evolución de la infección.

### **Correlación de TLRs y citocinas**

A pesar de que el análisis de correlación mostró que TLR2 tiene una débil relación directa con la producción de citocinas proinflamatorias, consideramos que TLR2 tiene una participación parcial en la inducción de la respuesta mediada por IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12, como se reporta en el trabajo de Imanishi *et al.* (2007), quienes observaron que los ligandos de TLR2 como el ácido palmitoico, inducen la producción de IFN- $\gamma$  respuesta que sinergiza en presencia de IL-2 e IL-12. En el presente trabajo se observó una débil relación inversa con la inducción de citocinas anti-inflamatorias; la inducción de estas citocinas podría estar mediada por otro tipo de señales y diferentes receptores. Adicionalmente, se observó una correlación directa y débil entre el incremento de IL-6 e IL-10 y la presencia de TLR4, sugiriendo que dicho receptor no tiene una participación relevante en el reconocimiento e inducción de la respuesta inmune innata contra *N. brasiliensis*.

#### **Inmunorreactividad en *N. brasiliensis***

La inmunorreactividad observada en la zona de crecimiento bacteriano nos llevó a realizar pruebas adicionales para descartar la expresión constitutiva de TLR2 y TLR4 por *N. brasiliensis*, usando RT-PCR de manera similar a la descrita en Material y Métodos. Los resultados mostraron que *N. brasiliensis* no expresa constitutivamente TLR2 o TLR4. La explicación para este hallazgo es que probablemente algunas células murinas producen y liberan formas solubles de TLR2 (sTLR2). Esto ha sido demostrado en monocitos sanguíneos, los cuales constitutivamente liberan sTLR2; la cinética de liberación se incrementa con la activación de los monocitos (LeBouder *et al.*, 2003). Suponemos que estos sTLR2

podrían estar reconociendo a *N. brasiliensis* o que podrían estar atrapados en la matriz secretada por este actinomiceto. Los sTLR2 presentes en el granos de *N. brasiliensis* podrían ser reconocidos por los anticuerpos policlonales usados durante este estudio, lo cual explica la inmunoreactividad observada.

## CONCLUSIONES

El estudio morfológico de las poblaciones celulares participantes durante el proceso inflamatorio inducido por *N. brasiliensis*, puso en evidencia que los neutrófilos polimorfonucleares son las principales células de respuesta en etapa aguda de la infección, mientras que en la etapa crónica macrófagos fueron las células predominantes.

Este es el primer reporte de la participación *in situ* de TLRs durante el proceso inflamatorio crónico presente en el actinomicetoma. Se mostró que TLR2 participa en el reconocimiento de *N. brasiliensis*, y que su expresión se incrementa en células cercanas y en contacto con el inóculo bacteriano. Por otro lado, TLR4 disminuyó su expresión por lo que mostramos que su participación en el reconocimiento de *N. brasiliensis* no es significativa.

Mostramos la expresión diferencial de citocinas pro y anti- inflamatorias en las diferentes etapas del proceso inflamatorio, lo que se relacionó con los cambios morfológicos observados durante el mismo.

En este trabajo se mostró la participación parcial de los TLRs en la inducción de citocinas como moléculas de respuesta contra *N. brasiliensis*. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para reforzar los resultados observados.

## PERSPECTIVAS

Para tener un panorama más completo de la respuesta inmune contra *N. brasiliensis* se requiere profundizar en los estudios que permitan conocer la interacción hospedero-patógeno en el actinomicetoma.

Determinar las poblaciones celulares responsables del incremento en los niveles de citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Estudiar la participación de otros receptores: citoplasmáticos (NOD1 y NOD2) y otros TLRs (TLR1, TLR6 y TLR9) en el reconocimiento y regulación de la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*.

Es necesario ampliar el estudio en moléculas de respuesta, citocinas (IL-4, IL-5, IL-17, IL-22) y quimiocinas (IL-8), para tener un perfil más amplio y saber cómo se lleva a cabo la modulación de la respuesta inmune durante el actinomicetoma.

Determinar con mayor precisión los componentes de la pared de *N. brasiliensis* que podrían interactuar con los TLRs.

Explorar en tejido de pacientes con actinomicetoma la presencia de TLRs y la expresión de citocinas.

# Capítulo 4



## Referencias

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 2010. Saunders/Elsevier. Philadelphia, USA. 566 p.
2. Abbott P. Mycetoma in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med.* 1956; 56: 11-30
3. Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJF, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F, Ruffel F. Toll-like receptor 4 Expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol.* 2002; 169: 3155-3162.
4. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med.* 2007; 261: 511-528.
5. Anderson KV, Jürgens G, Nüsselein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 1985; 42: 779-789.
6. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-Like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7: 25-32.
7. Baccala R, González-Quintanilla R, Lawson BR, Stern ME, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. Sensors of the innate immune system: their mode of action. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5: 448-56.
8. Banaiee N, Kinkaid EZ, Buchwald D U, Jacobs WR, Ernst JD. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol* 2006; 176:3019-3027.
9. Barnes PFS, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN- $\gamma$  in tuberculosis pleuritis. *J Immunol.* 1990; 145: 149-154.
10. Barquin MC. Historia de la Medicina. 7 ed. Francisco Mendez Oteo C. México, 1989. 400 p.

11. Beaman B, Blake CM, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinant of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. 1985; 47: 135-141.
12. Beaman B. Overview of actinomycete infections. En Sandoval-Trujillo. Actinomicetos, microorganismos de la luz. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, DF. 1993.
13. Beaman BL and L Beaman. *Nocardia* Species: Host-Parasite Relationships. Clinical Microbiology Reviews. 1994; 7(2):213-264.
14. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 213-264.
15. Betrán A, Rezusta A, Lezcano MA, Villuendas MC, Revillo MJ, Boiron P, Rodríguez-Nava V. First Spanish case of nocardiosis caused by *Nocardia asteroides*. J Clin Microbiol. 2009; 47:1918-1919
16. Beutler B, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptors signalling. Nature 2004; 430: 257-263.
17. Bochud PY, Sinsimer D, Anderm A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, Tadesse Argaw A, Janer M, Hawn TR, Kaplan G. Polymorphisms in Toll-Like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28:1055-1065.
18. Booth A, Bishop DK, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-17 and CTGF direct multiple pathogenesis of chronic cardiac allograft rejection. Immunotherapy. 2010; 2: 511-520.
19. Branger J, Leemans JC, Florquin S, Weijer S, Speelman P, Vander Poll T. Toll-Like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. Int Immunol. 2004; 16:509-516.
20. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M,

- Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowsky PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 2009; 285:732-736.
21. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. Based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19:259-282.
  22. Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GI. Chlamydia pneumonia-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2007; 75: 753-759.
  23. Carrada T, Corrales-Sánchez JS, Corrales-Sánchez DF. Avances en el conocimiento de las micosis subcutáneas y actinomicetomas (I). Agentes etiológicos y aspectos Clínico-epidemiológicos. *Revisiones. Piel* 1995; 10: 64-76.
  24. Charo IF and RM Randohoff. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl. J Med*. 2006; 354:610-21.
  25. Chen X, Zhang M, Zhu X, Dneg Q, Lui H, Larmonier N, Graner MW, Zhou B. Engagement of Toll-like receptor 2 on CD4 (+) T cells facilitates local immune responses in patients with tuberculosis pleurisy. *J Infect Dis*. 2009; 200: 399-408.
  26. Chun J, Goodfellow M. A Phylogenetic analisis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*. 1995; 445: 240-245.
  27. Conde C, Mancilla R, Fresan M, Ortiz-Ortiz L. Immunoglobulin and complement in tisúes of mice infected wwith *Nocardia brasiliensis*. *Infection an Immunity*. 1983;40(3):1218-1222.
  28. *Crónica de la Medicina*, 3 ed. Intersistemas editores SA de CV, 2003.
  29. D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate response to bacterial ans parasite infections. *Int J Immunopharmacol*. 2008; 8: 1308-1315.
  30. D'avila H, Melo RC, Perreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT.

- Mycobacterium bovis* bacillus Calmete-Guérin Induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol.* 2006; 176; 3087-3097.
31. Dalmarco ME, Medeiros YS, Fröde TS. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the mouse of pleurisy induced by carrageenan. *Cell Adh Migr.* 2008; 2: 231-235.
32. Dávila del Real MR y Arenas R. Micetoma diseminado por *N. brasiliensis* con afección ósea y pulmonar. *Dermatología Rev Mex.* 1995; 39:287-289.
33. Doz E, Rose S, Court N, Front S, Vasseur V, Charron S, Gulleron M, Puzo G, Fremaux I, Delneste Y, Erard F, Ryffel B, Martín OR, Quesniaux VF. Mycobacterial phosphatidylinositol mannosides negatively regulate host Toll-like receptor 4, MyD88-dependent proinflammatory cytokines, and TRIF-dependent co-stimulatory molecule expression. *J Biol Chem.* 2009; 284: 23187-23196.
34. Drexler SK, Foxwell BM. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: 506-518.
35. Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamellia RL, Dipietro LA. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen.* 2003; 11: 46-54.
36. Ezziyyani M, Pérez C, Requena M, Ahmed A, Candela M. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum*) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología.* 2004; 26:61-68.
37. Feng CG, Scanga CA, Collazo-Custodio CM, Cheever AW, Hieny S, Caspar P, Sher A. Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and

- TLR4-deficient animals. *J Immunol.* 2003; 171: 4758-4764.
38. Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, Rubin EJ, Ernst JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2004; 172: 6272-6280.
39. Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, Busso N, So A. TLR2 modulates inflammation in zimosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R370-R379.
40. Gallin, JI, Snyderman. *Inflammation, Basic Principles and Clinical Correlates.* Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 1999. 1334 p.
41. Gay NJ, Gangloff M, Weber AN. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 693-698.
42. Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol.* 2004; 173: 2660-2668.
43. Geneser F. *Atlas en color de Histología.* Medica Panamericana. México, 1990.
44. González-Ochoa A, Baranda F. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.* 1953; XIII: 189-197.
45. 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: 542-551.
46. Gonzalez-Ochoa A. *Micetomas y Actinomicosis.* XIII. *Congressus Internationalis Dermatologie-Manchen.* 1967. En Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Nueva Cork 1968. pp. 820-824.

47. Guimarães CC, Castro LG, Sotto MN. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop.* 2003; 87: 377-384.
48. Hasan U, C Chaffois, C Gaillard, V Saulnier, E Merck, S Tancredi, C Guiet, F Brière, J Vlach, S Lebecque, G Trinchieri y EEM Bates. Human TLR 10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *The Journal of Immunology.* 2005;174:2942-2950.
49. Hasebe A, Mu HH, Washburn LR, Chan FV, Pennock ND, Taylor ML, Cole BC. Inflammatory lipoproteins purified from a toxigenic and arthritogenic strain of *Mycoplasma arthritidis* are dependent on Toll-like receptor 2 and CD14. *Infect Immun.* 2007; 75: 1820-1826.
50. Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P. *Nocardia brasiliensis* *in vitro* and *in vivo* growth response to sex steroid hormones. *Mycopathologia.* 1995; 132: 79-85.
51. Hernández-Hernández F. Efecto de las hormonas sexuales humanas en el micetoma experimental y sobre el desarrollo "in vitro" de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de maestría en Ciencia Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. México, DF. 1994.
52. Holt GJ, Krieg RN, Sneath AHP, Stanley TJ, Williams TS. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 2000. 9th edn. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, USA.
53. Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki, Akira S, Saito T. Cutting Edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol.* 2007; 178: 6715-6719.
54. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
55. Jiang D, Linag J, Fan J, Yu S, Chen S, Lou Y, Prestwih GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Regulation of lung

- injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Net Med.* 2005; 11: 1173-1179.
56. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee Jo. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 2007; 130: 1071-1082.
57. Jin MS, Lee JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity.* 2008; 29: 182-191.
58. Jin MS, Lee JO. Structures of TLR-ligand complexes. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 414-419.
59. Jin X, Wang L, Wu HS, Zhang L, Wang CY, Tian Y, Zhang Jh. N-acetylcysteine inhibits activation of Toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2007; 6: 284-289.
60. Jones BW, KA Heldwein, TK Means, JJ Saukkonen, MJ Fenton. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:6-12
61. Kaisho T, Akira S, Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 979-987.
62. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 816-825.
63. Khanolkaryoung S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, Lockwood DNJ. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol.* 1995; 99:196-202.
64. Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, LeeH, Lee JO. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280: 11347-11351.
65. Kincaid EZ, Wolf AJ, Desvignes L, Mahapatra S, Crick DC, Brennan PJ, Pavelka MSJ, Ernst JD (2007) Codominance of TLR2-dependent and TLR-independent modulation of MHC class II in

- Mycobacterium tuberculosis* infection in vivo. J Immunol **179**:3187-3195.
66. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Dev Immunol. 2011; 2011:405310
  67. Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microbes and Infection 2008; 10: 995-1004.
  68. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Samo EM, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptor 2 and 1 in human leprosy. Nat Med. 2003; 9: 525-531.
  69. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. Nat Med. 2005; 11: 653-660.
  70. Kubarenko A, Frank M, Weber AN. Structure-function relationships of Toll-like receptor domains through homology modelling and molecular dynamics. Biochem Soc Trans. 2007; 35: 1515-1518.
  71. Kumar V, Abbas AK, Fausto N & Aster JC (2010) Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease, 8th ed., pp 33-55. Elsevier, Philadelphia, PA.
  72. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, Griffin G, Ferrara P, Schiffrin EJ, Morgan BP, Labéta MO. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR2) capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. J Immunol. 2003; 171: 6680-6689.
  73. Lechevalier HA and MP Lechevalier. Biology of *Actinomycetes*. Annual Review of Microbiology. 1967; 21:71-100.
  74. Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, Burdick A, Sarno EN, Rea



- TH, Modlin RL. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infec Dis.* 2010; 201:558-569.
75. Leemasn JC, Butter LM, Pulskens WP, Teske GJ, Claessen N, Van der Poll T, Florquin S. The role of Toll-like receptor 2 in inflammation and fibrosis during progressive renal injury. *PLoS One.* 2006; 4: e5704.
76. Leiva S, Yáñez M, Zaror L, Rodríguez H, García H. Actividad antimicrobiana de actinomicetales aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile.* 2004; 132: 151-159.
77. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996; 86: 973-983.
78. Leveau JY, Bouix M, 2000. *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial.* Acribia. Zaragoza-España.
79. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Funderber RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Rodolf JD, Golenbock DT. Toll-Like Receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 1999; 274:33419-33425.
80. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neil LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 446-458.
81. López-Martínez R, LJ Méndez-Tovar, P Lavalle, O Welsh, A Saul y E Macotela-Ruiz. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gaceta Médica de México.* 1992; 128: 477-481.
82. López-Martínez R, Mendez-Tovar LJ y grupo de estudio del micetoma en México. Datos epidemiológicos del micetoma en México. *Monogr Dermatol* 2006; 19: 5-12.

83. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saul A, Macotela-Ruiz E. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gaceta Médica de México* 1992; 128: 477-481.
84. Lozada EDV. Manual de inflamación. Tesis de Licenciatura, Facultad de odontología, UNAM. 1998.
85. Lynch JB. Mycetoma in the Sudan. *Ann R Coll Surg*. 1964; 35:319-340.
86. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG & Musser JM. Full-exon resequencing reveals Toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS ONE* 2007; 2(12): e1318. DOI: 10.1371/journal.pone.0001318.
87. 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.
88. Malek T, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: At the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010; 33: 153-165.
89. Mariat F. Sur la distribution géographique et la repartition des agents de mycetomes. *Bull Soc Pathol Exot*. 1963; 156: 35-45
90. Maslin J, Morand JJ, Civatte M. Les eumycetomes (Mycetomes fungiques a grains noirs ou blancs). *Médecine Tropicale*. 2001; 61: 111-114.
91. McGuinnis R. Cutaneous Mycology. *Dermatologic clinics*. 1996; 141:98-104
92. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 357-417.
93. Means, TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of immunology*, 1999;163:3920-3927-

94. Medzhitov R, en William, EP. *Fundamental Immunology*. Capítulo 17. 2003. Lippincott William & Wilkins. Philadelphia, USA. Pp 497-517.
95. Medzhitov R, Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454: 428-435.
96. 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*. *Revista Argentina de microbiología*. 2004; 36: 174-178.
97. Méndez-Tovar LJ, Mondragón-González R, Vega-López F, Dockrell HM, Hay R, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Padilla-Desgarennes C, Bonifaz A. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia*. 2004; 158: 407-414.
98. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 48-54.
99. Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM & Billiar TR. Emerging paradigm: Toll-like receptor 4—sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 2006; 26: 430-237.
100. Nicolle D, Fremont C, Pichon X, Bouchot A, Maillet I, Rifle B, Quesniaux VJF. Long-Term control of *Mycobacterium* Boris BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs): Investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4—deficient mice. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 6994-7004
101. Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn M, Yang M, Paypaert M, Joiner KA, Cappens I. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol*. 2005; 7: 849-867.
102. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT et al (2001) Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen

- processing by 19 kD lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001; 167: 910–918.
103. O’Mahony DS, Pham U, Ivre R, Hawn TR, Liles EC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci*. 2008; 4:1-8.
104. O’Neil LA (2005) How Toll-like receptors signal. What we know and what we don’t know. *Curr Opin Immunol* **17**: 1-7.
105. O’Neil LAJ. Toll-like receptor signal transduction and tailoring of innate immunity: a rol for Mal? *TRENDS and immunology* 2002;23(6):296-300.
106. Oda K, Kitano H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol*. 2006; 2:2006.0015. Epub 2006 Apr 18
107. Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. *Clin exp. Immunol*. 1972; 12:225-229.
108. Ospelt C & Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 495-505.
109. Pai R, Pennini ME, Tobian AAR, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Prolonged Toll-like receptors signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 6603-6614.
110. Palma-Ramos A, Castrillón Ribrea LE, Pizaña Cureño A, Vega-Memije ME, López-Bárceñas AP, Arenas-Guzmán R, Padilla-Desgarenes MC. Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. *Dermatología Rev Mex*. 2007; 51:212-218.
111. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev*

Eukaryot Gene Expr. 2010; 20: 87-103

112. Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. J Immunol 2006; 177:422-429
113. Pérez-Torres A, Rosas-Rosas A, Parás-García A, Juan-Sallés C & Taylor ML. Second case of histoplasmosis in a captive mara (*Dolichotis patagonum*): pathological findings. *Mycopathologia*. 2009; 168: 95-100.
114. Piccinini AM, Midwoods KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*. 2010;2010. pii: 672395. Epub 2010 Jul 13.
115. Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, Hibino T, Litman GW. Genomic Insights into the immune system of the Sea Urchin. *Science*. 2006; 314: 952-956.
116. Rico G, Ochoa R, Oliva A, González-Mendoza A, Walter SM, Ortiz-Ortíz L. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *J immunol*. 1982; 129: 1688-1693.
117. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002; 168: 4620-4627.
118. Robbins S. V. Kumar, RS Cotran. Robbins Basic pathology. Saunders Philadelphia 2003. 873 p.
119. Rocha-Ramírez LM, Estrada-García I, López-Marín LM, Segura-Salinas E, Méndez-Aragon P, Van Soolingen D, Torres-González R, Chacón-Salinas R, Estrada Parra S Maldonado-Bernal C, López-Macías C, Isibasi A. *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4, and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis*. 2008; 88: 212-20.

120. Rodríguez-Nava V., Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F. *Nocardia mexicana* sp. Nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42: 4530-4535.
121. Rubin E, Gorstein F, Scwaring R, Rubin R, Strayer D. *Patología Estructural*. McGraw-Hill Interamericana, Barcelona-España. 2006.
122. Salinas-Carmona M, Castro-Corona CMA, Sepúlveda-Saavedra J, Pérez LI. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *Clin Diag Lab immunol*. 1997; 4: 133-137.
123. Salinas-Carmona M, Pérez-Ribera I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 5597-5604.
124. Salinas-Carmona M, Torres-López E, Ramos AI, Lincon-Trujillo A, González-Spencer G. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an Experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity*. 1999; 67: 2428-2432.
125. Salinas-Carmona M, Vera CL, Welsh O, Rodríguez M. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man *Zentralbl. Bakteriologie*. 1992; 276: 390-397.
126. Salinas-Carmona M, Welsh O, Casillas SM. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with Mycetoma infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31: 2901-2906.
127. Salinas-Carmona MC, Zúñiga JM, Pérez-Ribera LI, Segoviano-Ramírez JC, Vázquez-Marmolejo AV. *Nocardia brasiliensis* modulates IFN-gamma, IL-10, and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2009; 29: 263-271.
128. Sandoval, H, Serrano JA. 1996. Identificación y diagnóstico de actinomicetos patógenos.

Universidad Autónoma Metropolitana.

129. Satyavati G.V. The legacy of Caraka. *Current Science* 85(7):1087-1090. 2003.
130. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010; 140; 821-832.
131. Scott, A. KM Khan, JL, Cook, V Duronio. Whats is “inflammation”? Are we ready to move venid Celsus?. *Br. J. Sports Med.* 2004;38;248-249.
132. Serrano JA, Saldoval-Trujillo AH (2005) Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos, pp. 15-50. Publicaciones del Vicerrectorado Académico, Colección Ciencias de la Salud, Mérida, Venezuela.
133. Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O & Akira S. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol Immunol* 2003;47: 327-336.
134. Sundararaj T, Agarwall SC. Cell-mediated immunity in experimental *Nocardia asteroides* infection. *Infection an Immunity*. 1977;15(2):370-375
135. Sweet L, Zhang W, Torres-Fewell H, Serianni A, Bogges W & Schorey J. *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 2008; 283: 33221-33231.
136. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Nocardia* species base don *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol*. 2010; 59: 165-171.
137. Tjårlund A, Guirado E, Julián E, Cardona PJ & Fernández C. Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. *Microbes Infect* 2006; 8: 1790-800.
138. Vasconcelos AC. Patología General em Hipertexto. Universidade Federañ de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais 2000.
139. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic

- and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 285-293.
140. Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A. Toll-Like receptors are temporally involved in host defense. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 4463-4469.
141. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer m, Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J*, 2006; 20: 2366-2368.
142. Yamamura H., M Hayakawa, Y Nakagawa, Y Limura. Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitatd on the basis of the repetitive extragenic palindromic-PCR Fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3149-3151.
143. Zamora A, LF Bojalil y F Bastarrachea. Immunologically Active Polysaccharides from *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1963; 85:549-555.
144. Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2009; 59: 589-608.
145. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 214: 199-210.
146. Cinel I, Opal SM, molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit care Med.* 2009; 37:291-304.



# Capítulo 5

**Producción en investigación**

## ***In situ* TLR2 and TLR4 expression in a murine model of mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis***

Blanca Edith Millán-Chiu<sup>1</sup>, Francisca Hernández-Hernández<sup>1</sup>, Armando Pérez-Torres<sup>2</sup>, Luis Javier Méndez-Tovar<sup>3</sup> & Rubén López-Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico;

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico; and <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, Mexico

**Correspondence:** Francisca Hernández-Hernández, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, C. P. 04510, México DF, Mexico. Tel./fax: +52 55 56 23 24 58; e-mail: micoher@hotmail.com

Received 6 July 2010; revised 24 November 2010; accepted 14 December 2010.  
Final version published online 31 January 2011.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2010.00775.x

Editor: Patrick Brennan

### **Keywords**

actinomycetoma; mycetoma; *Nocardia brasiliensis*; Toll-like receptors.

### **Introduction**

Mycetoma is a chronic subcutaneous granulomatous infection caused in humans by traumatic inoculation with either fungi (eumycetoma) or Gram-positive filamentous bacteria (actinomycetoma). It occurs worldwide and is endemic in tropical and subtropical regions. In Mexico, 98% of mycetoma cases are actinomycetomas, of which 84% are produced by *Nocardia brasiliensis* (López-Martínez *et al.*, 1992, 2006). The disease progresses slowly from inoculation to the presentation of symptoms, which include chronic swelling and deformation of the infected area and the formation of sinuses discharging purulent material containing tissue debris, inflammatory cells, and granules (microcolonies) of the aetiological agent. The infection generally remains localized, but it can spread to the underlying bone and muscle and to adjacent organs such as lung and brain, which can lead to fatal outcomes (McNeil & Brown, 1994).

### **Abstract**

Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* is a common disease in tropical regions. This ailment is characterized by a localized chronic inflammation that mainly affects the lower limbs. Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogen-associated molecular patterns, inducing the production of proinflammatory mediators. The role of TLRs in the immune response against *N. brasiliensis* is unknown. The aim of this work was to locate and quantify in a murine model the expression of TLR2 and TLR4 in the infection site using reverse transcription-PCR and immunohistochemistry. The results showed that TLR2 expression increased in the infected tissue, whereas TLR4 expression decreased. The presence of TLR2 and TLR4 was demonstrated in different cell populations throughout the chronic infectious process. In the early stages of this process, TLR2 was expressed in neutrophils and macrophages in direct contact with the inoculum, whereas TLR4 was observed in mast cells. In the advanced stages of the infection, TLR2 was expressed in foam cells and fibroblasts and was likely associated with bacterial containment, while TLR4 was downregulated, probably resulting in an imbalance between the host immune response and the bacterial load that favoured chronic disease.

Inflammation involves cells and molecules that limit or eliminate dangerous agents (Rubin *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010). The recognition of common microbial molecular patterns by the Toll-like receptors (TLR), a molecular family associated with the innate immune response, rapidly triggers intracellular signalling pathways that activate the NF- $\kappa$ B transcription factor family, ultimately inducing the activation of proinflammatory genes in macrophages, neutrophils, dendritic cells, B and T cells, epithelial cells, and fibroblasts (Janeway & Medzhitov, 2002; Kaisho & Akira, 2006; Drexler & Foxwell, 2010; Ospelt & Gay, 2010).

In mammals, 13 TLRs have been shown to recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (Kawai & Akira, 2006; O'Neil, 2006). Peptidoglycans, lipopeptides, and lipoproteins of Gram-positive bacteria (Lien *et al.*, 1999); lipopeptides of *Mycoplasma* (Hasebe *et al.*, 2007); and zymosan of fungi (Frasnelli *et al.*, 2005) have all been identified as TLR2 and TLR4 ligands. In addition, TLR4

coupled to MD-2 and CD14 recognizes lipopolysaccharides in Gram-negative bacteria (Kaisho & Akira, 2006).

*Nocardia brasiliensis* is a Gram-positive filamentous bacterium taxonomically related to *Mycobacterium* and other actinomycetes (Beaman & Beaman, 1994; Chun & Goodfellow, 1995). However, infections caused by *N. brasiliensis* show different clinical and histopathological characteristics from those seen in tuberculosis and leprosy (Guimaraes *et al.*, 2003; Singal & Sonthalia, 2010). In these infections, TLRs, primarily TLR2, play a crucial role in the modulation of the immune response. TLR2 has been associated with local responses by CD4<sup>+</sup> T cells (Chen *et al.*, 2009) and with the modulation of proinflammatory cytokine production and major histocompatibility complex (MHC) class II molecules expression in macrophages and dendritic cells (Kincaid *et al.*, 2007; Rocha-Ramirez *et al.*, 2008). Individuals with polymorphisms in the TLR2 gene are more susceptible to infection by *Mycobacterium* spp. (Ma *et al.*, 2007; Korbil *et al.*, 2008; Bochud *et al.*, 2009). The role of TLR4 in these infections has not been determined clearly.

Actinomycetoma is characterized by its chronic evolution. The factors and molecular mechanisms that prevent its early resolution and, in consequence, induce a chronic phase, are not well known. The role of the TLRs involved in the immune response against *N. brasiliensis*-induced actinomycetoma is unknown. In contrast, these receptors have been described as playing a fundamental role in infections such as tuberculosis and leprosy. The aim of this work was to quantify and locate TLR2 and TLR4 expression at the site of *N. brasiliensis* infection in a murine experimental model, using reverse transcription-PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry.

## Materials and methods

### Bacterial inoculum

The *N. brasiliensis* FM-825 strain used was isolated recently from a mycetoma patient and identified using morphological, biochemical, and molecular procedures (Brown-Elliott *et al.*, 2006; Betrán *et al.*, 2009). The strain was grown in brain-heart infusion broth (BD Bioxon, Cuautitlán Izcalli, Mexico) at 37 °C for 4 days. A suspension at  $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> was prepared in a 0.1 M isotonic saline solution using gentle maceration to disperse the bacterial microcolonies.

### Mice

Eighty-four male mice of the wild-type Taconic strain were used, each weighing about 30 g (Hernández-Hernández *et al.*, 1995). They were divided into 21 groups of four mice each. A noninoculated mouse group (NI-MG) was sacrificed at the beginning of the experiment ( $T_0$ ) and was used to locate and measure the basal TLR2 and TLR4 expression

levels. Five groups were inoculated with 0.1 mL of isotonic saline solution (isotonic saline solution-inoculated mice group: ISSI-MG) and used as a control; these were sacrificed at 2, 4, 8, and 48 h postinoculation (PI) and at 10 days PI. Seven groups were inoculated with 0.1 mL of a 2% carrageenan solution (carrageenan-inoculated mice group: CI-MG), and eight groups were inoculated with 0.1 mL of the *N. brasiliensis* suspension (*N. brasiliensis*-inoculated mice group: NBI-MG). All inoculations were in the right footpad. Animals in the CI-MG and NBI-MG were sacrificed at 2, 4, 8, and 48 h PI; at 10, 20, and 50 days PI; and at 6 months PI. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the Universidad Nacional Autónoma de México and were performed in accordance with institutional and national guidelines.

The tissue samples from every group were longitudinally cut (5 µm) and treated with different cell staining methods, including haematoxylin and eosin (H&E), toluidine blue, Giemsa, and Gram, to identify cell populations during infection by *N. brasiliensis* and relate them to the TLR2 and TLR4 localization detected by immunohistochemistry. To detect and quantify TLR2 and TLR4 expression, RT-PCR was used to amplify fragments of mRNA;  $\beta$ -actin was used as a housekeeping gene. Cell localization of TLR2 and TLR4 was determined by specific immunohistochemistry.

### RNA extraction

Total footpad tissue from three mice from each of NI-MG, ISSI-MG, CI-MG, and NBI-MG was washed with a sterile saline solution, pulverized in liquid nitrogen, and homogenized in 1 mL of QIAzol lysis reagent (Qiagen Sciences, MD). The subsequent steps of the total RNA extraction procedure were performed according to the manufacturer's protocols.

### RT-PCR

For the RT reaction, 1.3 µg of RNA was used. The reaction mixture also included final concentrations of  $1 \times$  RT buffer, 10 mM dithiothreitol, 5 mM dNTP, 10 ng oligo dT, and 400 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, CA) in a 10 µL reaction volume. The reaction was incubated at 30 °C for 10 min and then at 38 °C for 60 min.

The PCR technique used the primers first reported by Jin *et al.* (2007) for the TLR2 gene [sense 5'-TTT GCT CCT GCG AAC TCC TA-3', antisense 5'-GCT TTC TTG GGC TTC CTC TT-3', 295 base pair (bp) amplicon], for the TLR4 gene (sense 5'-GGG TCA AGG AAC AGA AGC A-3', antisense 5'-TGA AGG CAG AGG TGA AAG C-3', 349 bp amplicon), and for  $\beta$ -actin (sense 5'-GCT ACA GCT TCA CCA CCA CAG-3', antisense 5'-GGT CTT TAC GGA TTG CAA CGT C-3', 288 bp amplicon). The temperature programme was a 5-min denaturing step at 94 °C, 35 amplification cycles (94 °C for

30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s), and a final extension step of 72 °C for 10 min.

After amplification, 5- $\mu$ L samples of the PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. Images were recorded and analysed using an EDAS 290 system (Kodak, NY), with band density measurements expressed in pixels. The integrated density value (IDV) was determined based on the number of registered pixels minus background:  $IDV = \Sigma(\text{each pixel value minus background})$ . The IDV of each band expressed in nanograms was obtained by comparison with the 300-bp band (equivalent to 80 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) of the GeneRuler molecular weight marker (Fermentas Life Sciences, MD).

### Statistical analysis

To compare the values obtained from the different study groups with the basal values, a one-sample *t*-test was performed using the STATISTICA 8 (2007) software for Windows. *P* < 0.05 was considered significant.

### TLR2 and TLR4 expression by immunohistochemistry

Fragments of tissue from one mouse of each group (NI-MG, ISSI-MG, CI-MG, and *Nbl*-MG) were obtained and fixed in phosphate-buffered saline with 10% formaldehyde for 24 h. They were then washed in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.2), longitudinally cut, and decalcified in a 10% EDTA aqueous solution for 15 days. The tissue was embedded in paraffin, and five sections of 5  $\mu$ m were hydrated and antigenically reactivated in a citrate buffer (0.01 M citric acid, 0.01 M sodium citrate) according to the method of Pérez-Torres *et al.* (2009). Endogenous peroxidase was blocked with aqueous 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nonspecific antigenic sites were blocked with 4% bovine serum albumin, fraction V, dissolved in Tris-HCl and 0.01% Triton X-100 for 20 min at room temperature. The blocking solution was decanted, and the primary antibody for TLR2 or TLR4 was added (rabbit and goat polyclonal anti-mouse TLR2 and TLR4 antibodies, respectively; Santa Cruz Biotechnology, CA) in a 1:50 dilution in Tris-HCl. After an overnight incubation at 4 °C, the secondary antibody (anti-rabbit for TLR2 (Match 4 Kit, Biocare Medical Co. CA) or anti-goat for TLR4 (Goat HRP-Polymer Kit, Biocare Medical Co.) was added, and the tissue was incubated for 60 min in a humid chamber at room temperature. The horseradish peroxidase-coupled complementary polymer (MHR2P for Match4 and Goat HRP-Polymer for Goat Kit, Biocare Medical Co.) for the secondary antibody was added and incubated at room temperature for 30 min. Colour development was assessed after incubation for 5 min with diaminobenzidine (DAB<sub>500</sub> Chromogen System, Biocare Medical Co.) at room temperature. Specimens were counterstained with Mayer's haematoxylin. Fi-

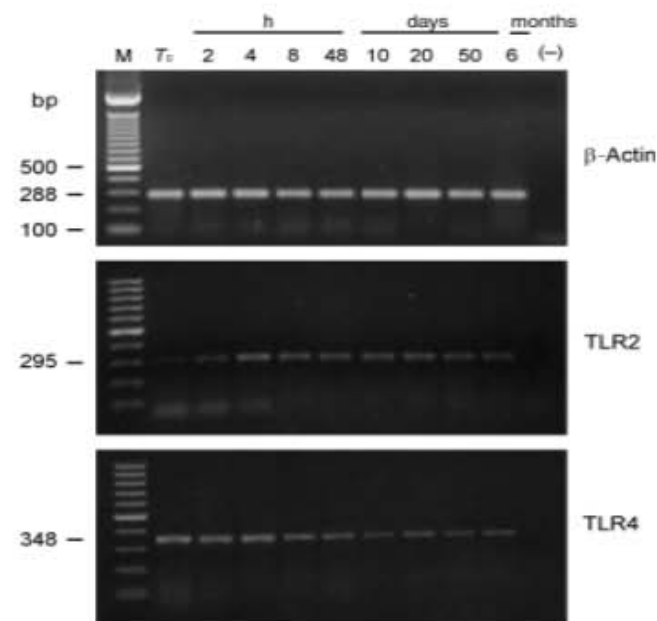
nally, the tissue was dehydrated and mounted with resin (Ecomount Mounting Medium, Biocare Medical Co.) for analysis under a light microscope. Negative staining controls were run in parallel for all mouse groups without anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies.

## Results

### TLR2 and TLR4 expression by RT-PCR

To assess the local expression of TLR2 and TLR4 during the inflammatory process produced by *N. brasiliensis*, sets of mice from each study group were sacrificed at different times. After total RNA extraction from the NI-MG, ISSI-MG, CI-MG, and *Nbl*-MG foot tissue samples, RT-PCR was performed to amplify fragments of the mRNA corresponding to the receptors, using the mRNA for  $\beta$ -actin as a control. All photographs were processed digitally to enhance their quality.

In Fig. 1, the band intensities of the amplified fragments are shown. The intensity of the NI-MG band was considered to be the constitutive basal level for each receptor ( $T_0$ ). The intensity of the bands relative to that of  $\beta$ -actin was constant for all tested tissues at all different times. The density of the band corresponding to the expression of TLR2 was more intense than that of the baseline band after 2 h. The



**Fig. 1.** RT-PCR products obtained at different times and conditions of study. Lane 1, 100 bp molecular weight marker; lane 2, healthy mice (NI-MG), baseline expression ( $T_0$ ); lanes 3–10, *Nocardia brasiliensis*-infected mice (*Nbl*-MG); lane 11, PCR negative control.

maximum intensity was observed at 4 h, after which a slight decrease was observed; it then remained constant for the subsequent time points. The density of the band corresponding to the expression of TLR4 remained similar to the baseline level after 2 and 4 h, but after 8 h, it showed decreasing intensity for the rest of the study.

Figure 2 shows the clinical features of three representative times in the evolution of experimental actinomycetoma. A few minutes after inoculation with *N. brasiliensis*, a slight subcutaneous swelling was observed in the right foot pad (Fig. 2a, arrow). At 20 days PI, a large area of induration with notable erythema had developed (Fig. 2b). At 6 months PI, numerous abscesses were observed under the skin and some sinus tracts extended to the surface, resulting in a necrotic area (Fig. 2c, arrow).

In Fig. 3, the analysis of the densitometry values obtained for the intensity of the TLR2 and TLR4 bands in the three mouse groups is shown. Figure 3a shows that a significant increase in TLR2 expression was observed in the *Nbl*-MG with respect to the baseline value ( $33.87 \pm 5.92$  ng) at all assessed times, with the peak of expression at 4 h PI ( $73.84 \pm 11.82$  ng). In the *ISSI*-MG (Fig. 3b), TLR2 expression decreased significantly at 2 h PI and returned to the baseline level after 4 h. In the *CI*-MG (Fig. 3c), the expression of TLR2 decreased significantly at 2, 4, and 8 h PI relative to healthy individuals; at subsequent times, the values showed a tendency to increase towards the baseline level. TLR4 showed high constitutive expression ( $93.49 \pm 20.7$  ng). In the *Nbl*-MG (Fig. 3d), the expression of this receptor showed a gradual decrease PI, with the lowest value occurring at 50 days PI ( $20.59 \pm 18.3$  ng). A significant difference from the baseline levels was found at all times after 8 h PI. In the *ISSI*-MG (Fig. 3e), a nonsignificant decrease was observed 2 h PI, after which the values showed a tendency to return to the baseline level. In the *CI*-MG (Fig. 3f), TLR4 expression showed a pattern similar to that of TLR2 expression.

### TLR2 and TLR4 expression by immunohistochemistry

To identify the cells expressing TLR2 in the actinomycetoma, five representative time points are shown in Fig. 4. Constitutive TLR2 expression was observed in keratinocytes and in fibroblasts and endothelial cells located in the dermis of healthy skin (*NI*-MG). This expression of both receptors was considered a positive control. The absence of label was considered a negative control for the staining. In the *Nbl*-MG, the cells around and within the inoculum expressed TLR2 during the period from 2 to 48 h PI. In the H&E staining, these cells showed morphology compatible with neutrophils, macrophages, and fibroblasts. At 10 days PI, the cells initiated granuloma organization. At 50 days and 6

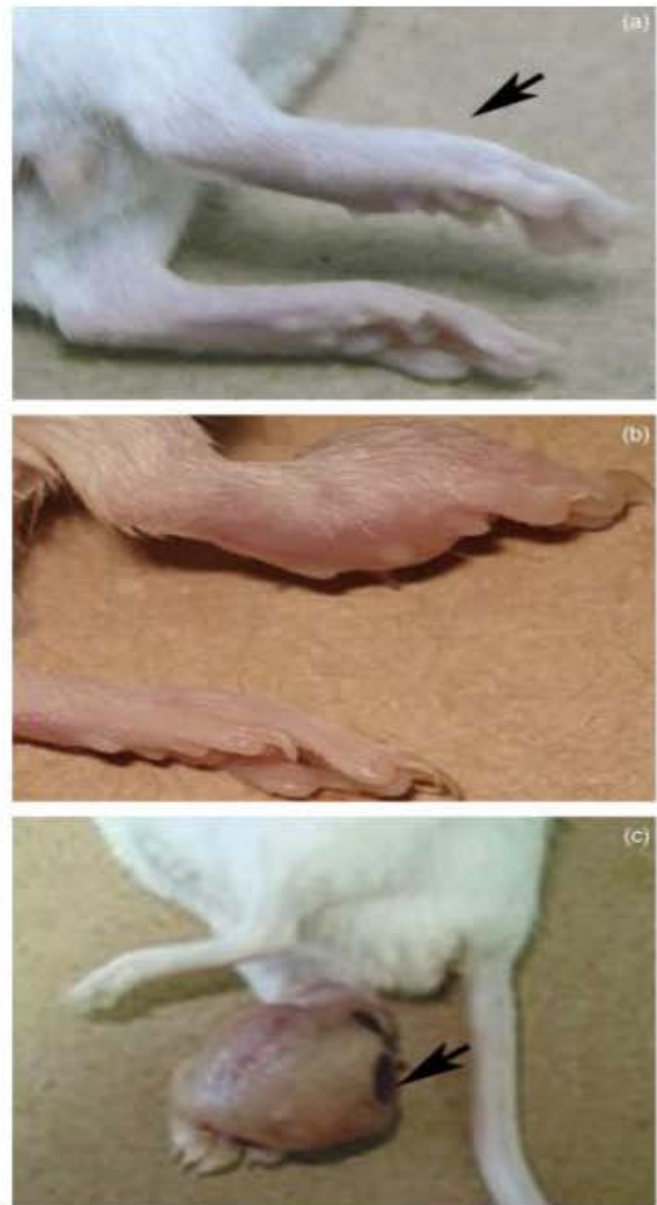
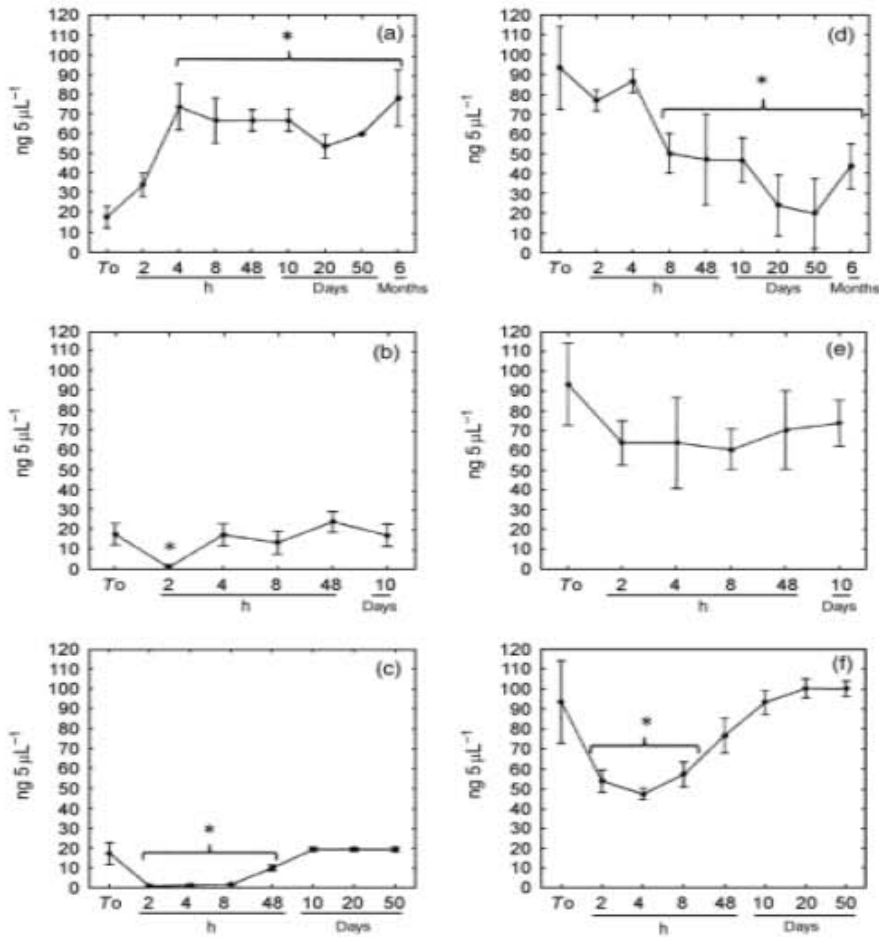


Fig. 2. Clinical features of murine experimental actinomycetoma at each of three stages of evolution (a–c).

months, the granuloma was completely formed; TLR2 expression was observed only in the neutrophil layer in direct contact with the granule, in the foam cells, in macrophages, and in some fibroblasts located in the periphery of the granuloma. Surprisingly, immunoreactivity to TLR2 was observed in the granule and in its periphery (bacterial growth zone).

As shown in Fig. 5, TLR4 was constitutively expressed in keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells (Fig. 5a). In



**Fig. 3.** Densitometric analysis of RT-PCR products for TLR2 (a–c) and TLR4 (d–f) expression in three studied mouse groups. \*Significantly different from the baseline value ( $T_0$ ).

the *Nbi*-MG, immunoreactivity for TLR4 was observed from 2 to 48 h PI in cells with a granular cytoplasm (Fig. 5b); these were identified as mast cells by toluidine blue (Fig. 5c) and Giemsa staining. From 10 days PI onward, although there were numerous mast cells in the fibrosis zone, they showed no expression of this receptor. Its expression in keratinocytes and some muscle cells remained constitutive until the end of the study, although at a lower intensity in the later stages.

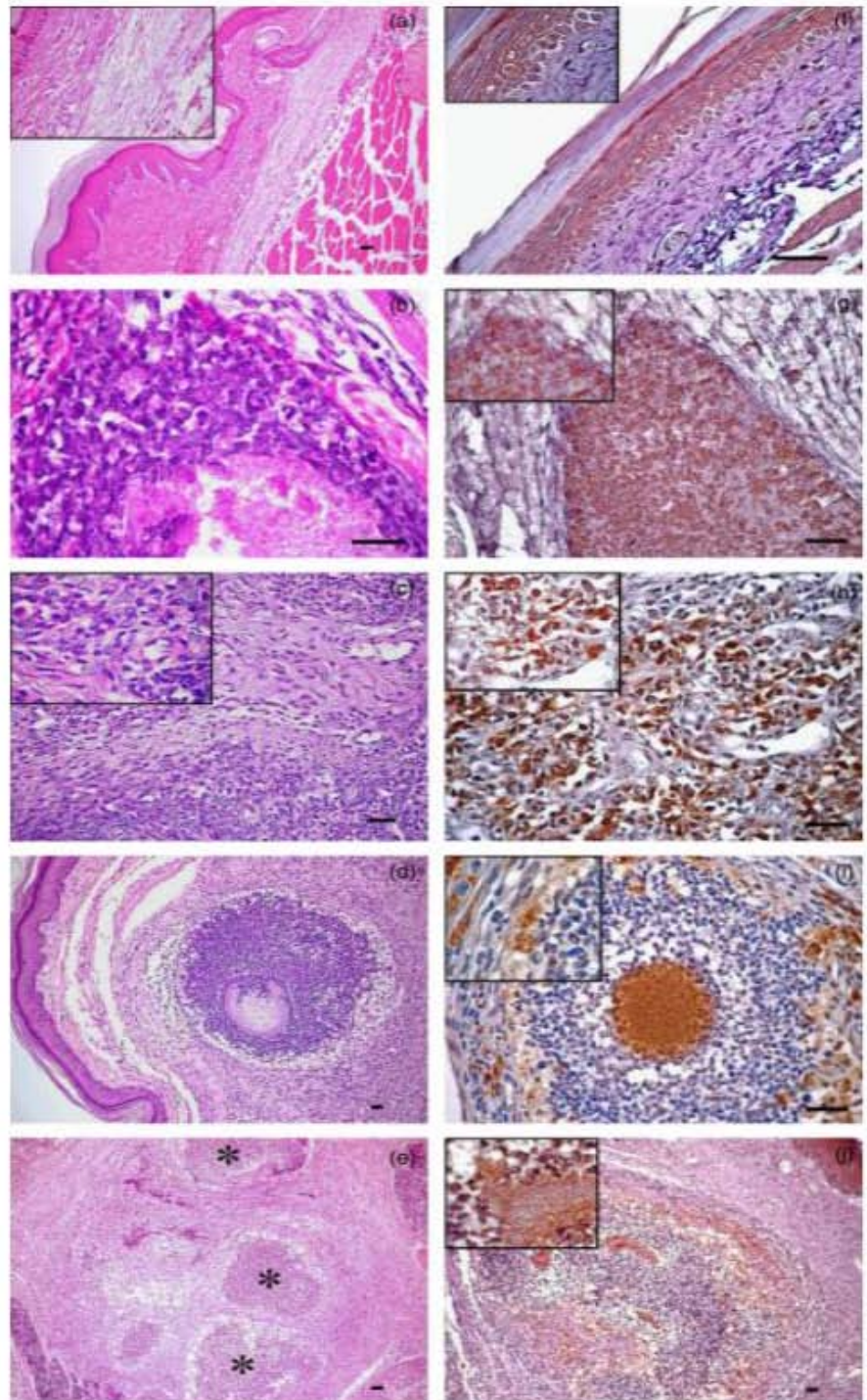
In the *ISSI*-MG, constitutive expression of both TLRs was observed and remained without change during the study. We did not detect any inflammatory process by H&E staining (data not shown).

## Discussion

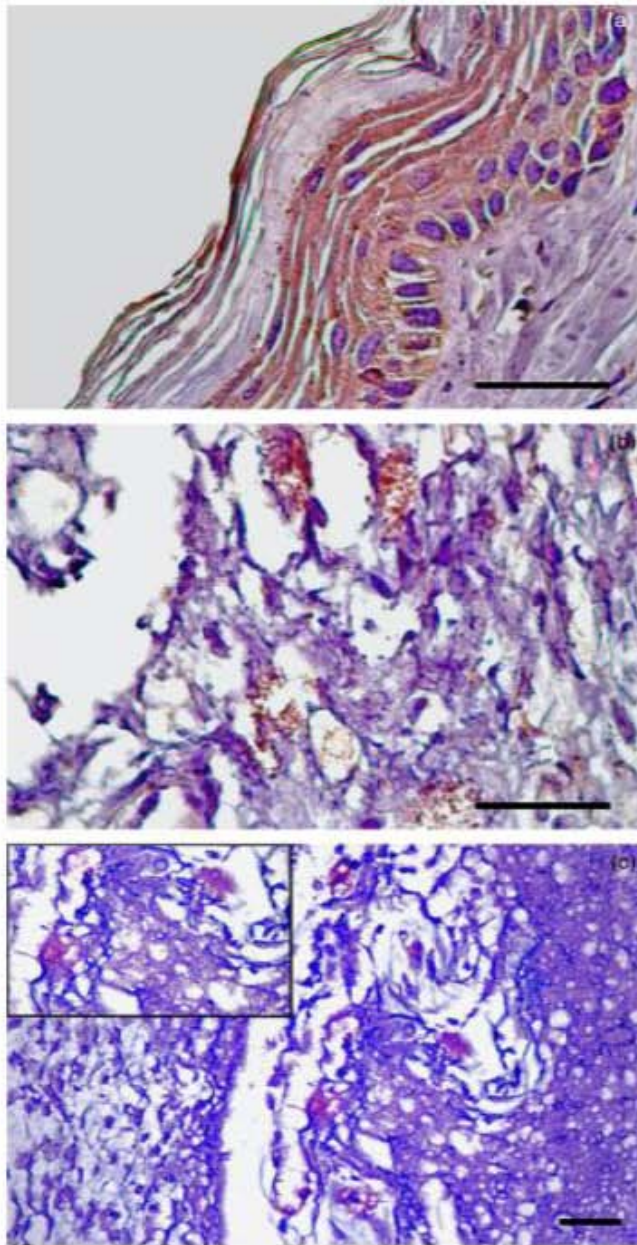
The binding of pathogen-associated molecular patterns to TLRs is an essential event in the innate immune response

against infection, because it triggers signalling pathways resulting in the production of proinflammatory cytokines that, in turn, activate other innate immune cells for host defence and also link with the adaptive immune response.

For this work, actinomycetoma was reproduced experimentally in a murine model and *in situ* TLR2 and TLR4 gene expression was studied during its clinical evolution. It was demonstrated that neutrophils and macrophages close to *N. brasiliensis* increased their TLR2 expression in the early stages of the infection. This finding suggests that some component of the *N. brasiliensis* wall acts as a TLR2 ligand, stimulating its expression and triggering intracellular signals that promote a proinflammatory response at the inoculated site. Consistent with this assumption, the interaction of TLR2 with *Mycobacterium tuberculosis*, mediated by ligands such as LpqH (Brightbill *et al.*, 1999), LprA (Pecora *et al.*, 2006), LprG (Gehring *et al.*, 2004), and other molecules, initiates the cellular activation in response to infection.



**Fig. 4.** Histopathology of experimental actinomycetoma (H&E stain a–e) and immunohistochemistry of TLR2 expression (f–j) in mice. Normal footpad skin of noninoculated mice (a). At depth, hypodermis and striated muscle fibres are observed. Epidermis (except the stratum corneum), muscle, fibroblast, and endothelial cells constitutively express TLR2 (f, inset). After 4 h of intradermal infection with *Nocardia brasiliensis*, the eosinophilic and compacted bacterial inoculum was surrounded by an inflammatory infiltrate (b), with an intense TLR2 immunoreactivity (g). Ten days after *N. brasiliensis* inoculation, bacteria were not evident, but numerous leucocytes, mainly macrophages and neutrophils, and activated fibroblasts were observed (c). TLR2-positive inflammatory cells were organized in clusters limited by fibrosis (h). Fifty days PI with *N. brasiliensis*, typical granules with intense inflammatory infiltrates formed by neutrophils and macrophages had developed (d). A capsule of fibrosis and foam cells limited the inflammatory foci. Unexpectedly, the well-defined granules expressed TLR2 immunoreactivity (i). A neutrophil layer in close contact with the granules and the externally located foam cells and fibroblasts was also TLR2-positive (i, inset). However, the bulk of neutrophils and macrophages were TLR2 negative. Numerous granulomatous foci formed by neutrophils, macrophages, foam cells, and fibrotic tissue were observed 6 months PI of *N. brasiliensis* (e, asterisks). The pattern of immunoreactivity to TLR2 (j) was similar to that described in lesions with 50 days' evolution. Scale bars = 20  $\mu$ m.



**Fig. 5.** Immunohistochemistry of TLR4 expression in normal footpad skin of mice (a) and 8 h after the inoculation of *Nocardia brasiliensis* (b). Note the constitutive expression of TLR4 in keratinocytes, including a faint staining of the superficial cells of the stratum corneum (a). TLR4 immunoreactivity was observed in mast cells, which were identified by their metachromatic granules stained with toluidine blue (c). Scale bars = 20  $\mu$ m.

Therefore, we consider that similar molecules in *N. brasiliensis* could be interacting with TLR2, playing a role similar to that observed in *M. tuberculosis*.

During the later stages of actinomycetoma, TLR2 was expressed in foam cells and fibroblasts localized in the granuloma periphery. These observations suggest that TLR2 could participate in the local confinement of the microorganism (as was proposed for *M. tuberculosis* by Sugawara *et al.*, 2003; Tjärnlund *et al.*, 2006), but not in its elimination, because the disease progresses for an undefined time (at least 6 months in this murine experimental disease and for many years in human disease).

TLR2 deficiency has been associated with progressive infection and a high bacterial load in tuberculosis and lepromatous leprosy, sometimes with fatal outcomes. *In vitro* studies have shown that TLR2-deficient macrophages are unable to respond to stimulation by any of several mycobacterial products tested, but they produced decreased amounts of proinflammatory cytokines and a depressed nitric oxide response (Nicolle *et al.*, 2004). By contrast, in tuberculoid leprosy, some authors suggest that a strong increase in TLR2 expression could play a fundamental role in the control of *Mycobacterium leprae* (Krutzik *et al.*, 2003; Modlin, 2010).

Some studies suggest that TLR2 could negatively modulate some cellular functions: TLR2 engagement with *M. tuberculosis* ligands inhibits macrophage class II MHC antigen presentation (Noss *et al.*, 2001) and impairs macrophage responsiveness to interferon- $\gamma$  (Fortune *et al.*, 2004; Banaiee *et al.*, 2006). Furthermore, it has been reported that in the absence of functional TLR2 during an experimental infection, *M. tuberculosis* growth was controlled, and granuloma formation, T-cell and macrophage recruitment and activation, and inducible nitric oxide synthase expression were normal (Nicolle *et al.*, 2004). TLR2 could have a negative effect in actinomycetoma, contributing to its clinical and pathological evolution. However, additional studies of cytokine profiles are necessary to understand and to propose a conclusive role for TLR2 in the host's immune response to actinomycetoma.

The TLR2 immunoreactivity observed in the bacterial growth zone led us to perform an additional assay to rule out the constitutive expression of TLR2 and TLR4 by *N. brasiliensis*, using RT-PCR and PCR in a manner similar to that described in Materials and methods. The results showed no amplification (data not shown). The probable explanation of this finding is that some murine cells produce and release a soluble form of TLR2 (sTLR2). This has been demonstrated in blood monocytes, which constitutively release sTLR2, increasing the kinetics of release upon monocyte activation (LeBouder *et al.*, 2003). We speculate that this putative sTLR2 could recognize *N. brasiliensis* ligands or could be trapped in the matrix secreted by this actinomycete. It is likely that such sTLR2 would be recognized by the polyclonal antibodies used during our study.

TLR4 expression was observed in mast cells only in the early stages of actinomycetoma. Later, immunoreactivity to



this receptor disappeared. It has been proposed that TLR4 plays a fundamental role in the recognition and fight against infectious agents, but a consensus has not been reached on this issue. Some studies report that TLR4 plays a protective role in experimental pulmonary tuberculosis: in mice with nonfunctional TLR4, an increased susceptibility, mortality, and mycobacterial load in the lungs has been found (Abel *et al.*, 2002; Branger *et al.*, 2004). We speculate that *N. brasiliensis* downregulates TLR4 expression in the later stages of actinomycetoma, inducing an imbalance between the host immune response and the bacterial load present in the infection site, which favours chronicity. In contrast, other authors show that TLR4-deficient mice do not differ from wild-type controls in a model of *Mycobacterium avium* infection (Feng *et al.*, 2003). Some studies report that phosphatidylinositol mannosides, a component of the *M. tuberculosis* cell wall, inhibit the TLR4 pathway, disturbing the release of cytokines and chemokines by lipopolysaccharide-stimulated macrophages; this effect was independent of the presence of TLR2 (Doz *et al.*, 2009). We do not know whether a similar interaction could be present between *N. brasiliensis* and TLR4.

The sudden and early decrease in TLR2 and TLR4 expression that was observed in both the ISSI-MG and the CI-MG, along with the recovery of this expression after 8 h, indicates that both mechanical (trauma with a needle) and chemical (carrageenan as an irritant substance) injuries are capable of modifying the expression of TLR2 and TLR4. However, these findings indirectly underline the importance of *N. brasiliensis* in the maintenance of TLR2 expression and in TLR4 downregulation.

In addition to recognizing and responding to microbial pathogens, TLR2 and TLR4 sense tissue integrity by binding danger-associated molecular patterns – endogenous ligands including some extracellular matrix components, hyaluronidase, and necrotic cell debris released during infectious and inflammatory processes – thereby increasing the tissue damage. A vicious cycle of inflammation–tissue damage–inflammation and its molecular mediators could be the basis of chronic inflammation (Jiang *et al.*, 2005; Mollen *et al.*, 2006; Drexler & Foxwell, 2010). A consequence of the inflammatory process in actinomycetoma is the production of huge quantities of tissue debris. The increased TLR2 expression observed in the present work could be associated with the recognition of both these damage signals and *N. brasiliensis* participating in the maintenance of inflammatory processes, and in consequence, in the chronic evolution of disease.

This is the first report describing the *in situ* expression of TLR2 and TLR4 during the acute and chronic inflammatory processes following experimental *N. brasiliensis* infection. The *N. brasiliensis*-specific ligands that bind to the TLRs are unknown; however, the taxonomical relationship of *N.*

*brasiliensis* with mycobacteria suggests that certain cell wall components (lipoarabinomannans, 19-kDa protein, and phosphatidyl-myo-inositol mannosides) involved in the induction of proinflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecule expression, and migration of different innate immune cell types are implicated in the activation of TLRs (Korbel *et al.*, 2008; Sweet *et al.*, 2008). Our results encourage future investigation to explore the role of other TLRs and cytokines, and the link between the innate and adaptive immune responses, in actinomycetoma pathogenesis in experimental models and in patients.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACyT (México), reference 84272, and by PAPIIT reference IN224006. We are grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. We are grateful to Verónica Rodríguez-Mata, Ivonne Grisel Sánchez-Cervantes, and Irma Elena López-Martínez for their technical assistance. We thank Dr Ricardo Lascurain-Ledesma and Dr Luz María López-Marin for their valuable methodological suggestions.

## References

- Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJF, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F & Ryffel B (2002) Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* **169**: 3155–3162.
- Banaiee N, Kincaid EZ, Buchwald U, Jacobs WR Jr & Ernst JD (2006) Potent inhibition of macrophage responses to IFN- $\gamma$  by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol* **176**: 3019–3027.
- Beaman BL & Beaman L (1994) *Nocardia* species: host–parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* **7**: 213–264.
- Betrán A, Rezusta A, Lezcano MA, Villuendas MC, Revillo MJ, Boiron P & Rodríguez-Nava V (2009) First Spanish case of nocardiosis caused by *Nocardia takedensis*. *J Clin Microbiol* **47**: 1918–1919.
- Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A *et al.* (2009) Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 1055–1065.
- Branger J, Leemans JC, Florquin S, Weijer S, Speelman P & Van der Poll T (2004) Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. *Int Immunol* **16**: 509–516.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR *et al.* (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**: 732–736.
- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS & Wallace RJ (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **19**: 259–282.
- Chen X, Zhang M, Zhu X, Deng Q, Liu H, Larmonier N, Graner MW & Zhou B (2009) Engagement of Toll-like receptor 2 on

- CD4(+) T cells facilitates local immune responses in patients with tuberculous pleurisy. *J Infect Dis* **200**: 399–408.
- Chun J & Goodfellow M (1995) A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 240–245.
- Doz E, Rose S, Court N et al. (2009) Mycobacterial phosphatidylinositol mannosides negatively regulate host Toll-like receptor 4, MyD88-dependent proinflammatory cytokines, and TRIF-dependent co-stimulatory molecule expression. *J Biol Chem* **284**: 23187–23196.
- Drexler SK & Foxwell BM (2010) The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 506–518.
- Feng CG, Scanga CA, Collazo-Custodio CM et al. (2003) Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals. *J Immunol* **171**: 4758–4764.
- Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, Rubin EJ & Ernst JD (2004) *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* **172**: 6272–6280.
- Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, Busso N & So A (2005) TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* **7**: R370–R379.
- Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV & Boom WH (2004) *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* **173**: 2660–2668.
- Guimaraes CC, Castro LG & Sotto MN (2003) Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop* **87**: 377–384.
- Hasebe A, Mu HH, Washburn LR, Chan FV, Pennock ND, Taylor ML & Cole BC (2007) Inflammatory lipoproteins purified from a toxigenic and arthritogenic strain of *Mycoplasma arthritidis* are dependent on Toll-like Receptor 2 and CD14. *Infect Immun* **75**: 1820–1826.
- Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ & Manzano-Gayosso P (1995) *Nocardia brasiliensis*: *in vitro* and *in vivo* growth response to sex steroid hormones. *Mycopathologia* **132**: 79–85.
- Janeway CA Jr & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197–216.
- Jiang D, Liang J, Fan J et al. (2005) Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* **11**: 1173–1179.
- Jin X, Wang L, Wu HS, Zhang L, Wang CY, Tian Y & Zhang JH (2007) *N*-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **6**: 284–289.
- Kaisho T & Akira S (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* **117**: 979–987.
- Kawai T & Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**: 816–825.
- Kincaid EZ, Wolf AJ, Desvignes L, Mahapatra S, Crick DC, Brennan PJ, Pavelka MS Jr & Ernst JD (2007) Codominance of TLR2-dependent and TLR2-independent modulation of MHC class II in *Mycobacterium tuberculosis* infection *in vivo*. *J Immunol* **179**: 3187–3195.
- Korbel DS, Schneider B & Schaible UE (2008) Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* **10**: 995–1004.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA et al. (2003) Activation and regulation of Toll-like receptor 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* **9**: 525–531.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N & Aster JC (2010) *Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease*, 8th edn. pp. 33–55. Elsevier, Philadelphia, PA.
- LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK et al. (2003) Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* **17**: 6680–6689.
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A et al. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* **274**: 33419–33425.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saul A & Macotela-Ruiz E (1992) Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac Med Mex* **128**: 477–481.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Araiza J et al. (2006) Datos epidemiológicos del micetoma en México. *Monogr Dermatol* **19**: 5–12.
- Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG & Musser JM (2007) Full-exon resequencing reveals Toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* **2**: e1318. DOI: 10.1371/journal.pone.0001318.
- McNeil MM & Brown JM (1994) The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* **7**: 357–417.
- Modlin RL (2010) The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* **22**: 48–54.
- Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM & Billiar TR (2006) Emerging paradigm: toll-like receptor 4 – sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* **26**: 430–437.
- Nicolle D, Fremont C, Pichon X, Bouchot A, Maillet I, Ryffel B & Quesniaux VJF (2004) Long-term control of *Mycobacterium bovis* BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs): investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2–TLR4-deficient mice. *Infect Immun* **72**: 6994–7004.
- Noss EH, Pai RK, Sellati TJ et al. (2001) Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kD lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **167**: 910–918.
- O’Neil LA (2006) How Toll-like receptors signal. What we know and what we don’t know. *Curr Opin Immunol* **18**: 3–9.
- Ospelt C & Gay S (2010) TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 495–505.

- Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH & Harding CV (2006) *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* **177**: 422–429.
- Pérez-Torres A, Rosas-Rosas A, Parás-García A, Juan-Sallés C & Taylor ML (2009) Second case of histoplasmosis in a captive mara (*Dolichotis patagonum*): pathological findings. *Mycopathologia* **168**: 95–100.
- Rocha-Ramírez LM, Estrada-García I, López-Marín LM *et al.* (2008) *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4, and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis* **88**: 212–220.
- Rubin E, Gorstein F, Swarting R, Rubin R & Strayer D (2006) *Patología Estructural*. McGraw-Hill Interamericana, Barcelona.
- Singal A & Sonthalia S (2010) Cutaneous tuberculosis in children: the Indian perspective. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **76**: 494–503.
- Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O & Akira S (2003) Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol Immunol* **47**: 327–336.
- Sweet L, Zhang W, Torres-Fewell H, Serianni A, Bogges W & Schorey J (2008) *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **283**: 33221–33231.
- Tjärnlund A, Guirado E, Julián E, Cardona PJ & Fernández C (2006) Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. *Microbes Infect* **8**: 1790–1800.