

T  
600

96449

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

**“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  EN MICETOMAS Y  
CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS CON *Madurella*, *Actinomadura  
madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Candida albicans*”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS

PRESENTA

ENCINAS PARRA MIRNA GABRIELA  
MATRÍCULA 202180955

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: M EN C. ALEJANDRO PALMA RAMOS

ASESORA: DRA. LAURA ESTELA CASTRILLÓN RIVERA

ASESORA: M EN C. ANTONINA OLTRA RAMÍREZ

MÉXICO, D.F

DICIEMBRE DEL 2006

**“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  EN MICETOMAS Y  
CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS CON *Madurella*, *Actinomadura  
madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Candida albicans*”**

**Vo. Bo. DEL COMITÉ TUTORIAL**

TUTOR: M EN C. ALEJANDRO PALMA RAMOS



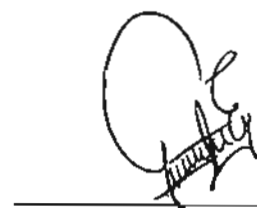
ASESORA: Dra. LAURA ESTELA CASTRILLÓN RIVERA



ASESORA: M EN C. ANTONINA OLTRA RAMÍREZ



ALUMNA: ENCINAS PARRA MIRNA GABRIELA 202180955



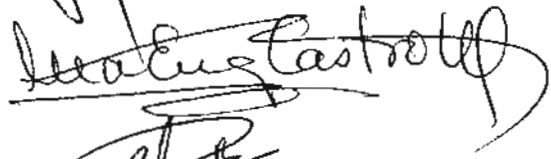
**“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  EN MICETOMAS Y  
CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS CON *Madurella*, *Actinomadura  
madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Candida albicans*”**

**JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

PRESIDENTE:



VOCAL:



SECRETARIO:



## RESUMEN

El micetoma es una enfermedad granulomatosa e inflamatoria progresiva que usualmente involucra al tejido subcutáneo, después de una inoculación traumática del organismo causal. Dependiendo del agente etiológico, los micetomas se dividen en 2 grupos: los eumicetomas que son producidos por hongos y los actinomicetomas producidos por bacterias. La lesión tisular del micetoma está caracterizada por un infiltrado de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> alrededor de neutrófilos y macrófagos, los cuales al ser activados estimulan la inflamación aguda por medio de la secreción de citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , quimiocinas, y mediadores lipídicos como el factor activador de las plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos. El análisis de la posible participación de las citocinas proinflamatorias en el micetoma, permite explicar el carácter inflamatorio de ésta infección, así como proponer la participación de las células TH<sub>1</sub> como la subpoblación responsable del proceso crónico de ésta patología, en virtud de su capacidad para estimular al macrófago, así como la producción sostenida de citocinas proinflamatorias secretadas por éste. Por esta razón el objetivo de este trabajo es demostrar la presencia de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en las células que rodean al grano en los micetomas directamente en biopsias de pacientes y cuantificar su producción *in vitro* en células fagocíticas purificadas de sangre de individuos sanos, infectadas con *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella mycetomatis*. El estudio se realizó mediante la determinación *in situ* de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , en biopsias de pacientes con micetoma por *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella mycetomatis*, mediante estudios inmunohistoquímicos; así como la determinación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  por la técnica de ELISA en sobrenadantes de cultivo de monocitos de sangre periférica de individuos sanos purificados por la técnica de separación magnética y estimulados *in vitro* con los microorganismos antes mencionados, encontrándose que la concentración del IL-1 $\beta$  es mayor cuando se estimuló con *Actinomadura madurae* seguida en orden descendiente por *Nocardia brasiliensis*, *Madurella sp* y *Candida albicans*.

En contraste, la producción de TNF- $\alpha$  en las células de donadores femeninos, en orden descendiente fue: *Madurella sp*, *Actinomadura madurae*, *Candida albicans* y *Nocardia brasiliensis* y en el caso de los varones la estimulación en orden descendiente fue: *Candida albicans*, *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella sp*.

En el estudio de marcaje *in situ* en micetomas encontramos tanto a la IL-1 $\beta$  como al TNF- $\alpha$  en los granos de los micetomas, y en las células espinosas de la epidermis encontramos principalmente al TNF- $\alpha$ , de todo esto hacemos notar que hubo producción tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$  por los macrófagos cuando fueron estimulados con estos microorganismos. Nosotros al observar un micetoma en donde tenemos un grano (acumulo de microorganismos) lo encontramos rodeado en mayor proporción por células polimorfonucleares y macrófagos, esto explica la presencia de estas citocinas, las cuales contribuyen a la estimulación de reacciones inflamatorias locales. Podemos concluir que la presencia de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  nos explica porque el micetoma esta formado por un grano rodeado por células polimorfonucleares y macrófagos, aunque aparece después de un largo período de infección que es de aproximadamente 5 años.

En pacientes con micetoma se encontró la presencia tanto de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en todas las biopsias estudiadas (*Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella sp*).

De los microorganismos estudiados los que mejor activan a los macrófagos *in vitro* en orden decreciente son: *Candida albicans*, *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella sp*.

Todos los microorganismos estudiados son capaces de activar a los monocitos transformados a células fagocíticas, ya que se encontraron valores del doble de lo que presentaron las células sin estimular y las estimuladas con lipopolisacarido tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$ .

Por tanto con estos resultados se demuestra la participación de las citocinas proinflamatorias, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , como efectoras del proceso infeccioso *in vivo* e *in vitro*.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

### **A LA UAM-X:**

Porque gracias a esta Institución soy una profesionista

### **A CONACYT:**

Porque gracias a su apoyo económico pude continuar mis estudios

### **AL IPN:**

Por brindarme todo su apoyo académico

### **A MI TUTOR DE TESIS:**

Por toda su paciencia y apoyo para la elaboración de ésta tesis.

### **A MIS ASESORES DE TESIS:**

Por permitirme aprender de sus experiencias y por todas sus enseñanzas

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

### **A MI MAMÁ:**

Porque has estado en todos los momentos más importantes de mi vida. Y es la mejor mamá del mundo

### **A MI PAPÁ:**

Porque siempre me diste lo más que pudiste

### **A MI ESPOSO:**

Por apoyarme en todos los aspectos de mi vida y porque día con día me motivas a seguir superándome

### **A MIS ABUELITAS:**

Porque son la luz de mi vida

### **A MIS HERMANAS:**

Porque siempre conté con ellas, porque las quiero y porque son mi apoyo

### **A MI SOBRINO CARLOS:**

Porque me contagias día con día con tu alegría

### **A TODA MI FAMILIA:**

Porque con su ejemplo y apoyo he logrado cumplir mis objetivos



## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	4
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	6
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	7
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	15
- Datos históricos	15
- Micetoma	15
- Descripción clínica	16
- Agentes etiológicos	17
- Distribución geográfica	18
- Epidemiología	18
- Cuadro clínico	19
- Diagnóstico del micetoma	19
- Diagnóstico histológico	20
- Tratamiento	20
- Inmunología	21
- TNF- $\alpha$	22
- IL-1 $\beta$	23
- IL-1 en la inflamación	25
- Papel de la IL-1 en la respuesta inmune	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28

## ÍNDICE

	Página
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
GLOSARIO	68

## INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad granulomatosa e inflamatoria progresiva que usualmente involucra al tejido subcutáneo, después de una inoculación traumática del organismo causal. Dependiendo del agente etiológico, los micetomas se dividen en 2 grupos: los producidos por hongos (eumicetoma) y los provocados por bacterias (actinomicetoma)<sup>1</sup>. Los principales géneros responsables del actinomicetoma son *Nocardia* sp, *Streptomyces* sp, y *Actinomadura* sp. Por otra parte, el género más importante que produce eumicetoma es *Madurella* sp. Estos microorganismos son saprófitos del suelo y para causar infección se introducen al organismo a través de pequeñas heridas; crecen lentamente y de esa forma se genera el micetoma.

El micetoma está constituido por un infiltrado de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> alrededor de neutrófilos y macrófagos<sup>2</sup>, dando como resultado que los macrófagos produzcan una mayor cantidad de proteínas responsables de la activación de células encargadas de las funciones de la inmunidad celular (linfocitos TH<sub>1</sub>) y estas estimulen macrófagos para destruir eficientemente a los microorganismos fagocitados por medio de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) como los radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>); enzimas lisosómicas microbicidas y óxido nítrico (NO).

Los macrófagos activados estimulan la inflamación aguda por medio de la secreción del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , quimiocinas, y mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos; su acción conjunta causa una inflamación local rica en neutrófilos, los cuales fagocitan y destruyen a los microorganismos infecciosos. También inducen la formación de tejido de reparación mediante la secreción de factores de crecimiento los cuales estimulan la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno y la neoformación de vasos sanguíneos o angiogénesis.

Por otra parte, los macrófagos activados se convierten en células presentadoras de antígeno (APC) más eficientes debido al aumento de la expresión en su superficie de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) coestimuladoras, y a la producción de citocinas como la IL-12 que estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos T.

Los macrófagos activados pueden fusionarse formando células gigantes multinucleadas. Estos grupos de macrófagos activados a menudo rodean al microorganismo, produciendo nódulos de tejido inflamatorio denominados granulomas.

La inflamación granulomatosa es una respuesta característica de algunos microorganismos persistentes, como *M. tuberculosis* y algunos hongos que inducen en el huésped una forma de hipersensibilidad tardía crónica.

La inflamación granulomatosa se asocia a menudo a fibrosis tisular, aunque esta suele ser una reacción de cicatrización de la lesión y puede interferir con la función normal del tejido.

Las células T activadas por el antígeno y por la IL-12 se convierten en productoras de INF- $\gamma$ , mismo que actúa estimulando macrófagos para la producción adicional de IL-12, potenciando así el desarrollo de las células T<sub>H1</sub> y proporcionando un mecanismo de amplificación importante responsable de la inmunidad celular.

La inmunidad innata es la respuesta inicial a los microorganismos que impide la infección del huésped y, en muchos casos, es capaz de eliminar a los microorganismos.

Los mecanismos efectores de la inmunidad innata se utilizan a menudo para eliminar microorganismos incluso en las respuestas de la inmunidad adaptativa.

Algunas de las células de la inmunidad innata, en especial los macrófagos y las células NK, secretan citocinas que activan y estimulan la reacción celular de la inmunidad innata, denominada inflamación.

La inflamación consiste en el reclutamiento de leucocitos a un sitio de infección y su activación para eliminar el agente infeccioso.

Si los microorganismos entran en la circulación, diversas proteínas plasmáticas los combaten. Las principales son las proteínas del sistema complemento, las colectinas, las pentraxinas, las proteínas del sistema de coagulación y los anticuerpos específicos cuando llegan a estar presentes.

La función de ingestión y destrucción de los microorganismos está mediada por los neutrófilos en las primeras fases de la respuesta inmunitaria innata y por los macrófagos en las fases tardías de la misma.

El proceso de migración leucocitaria a los sitios de infección depende de la estimulación de las citocinas y está mediado por los receptores de asentamiento leucocitarios y por los ligandos endoteliales de estos receptores.

Las citocinas de mayor importancia en éste proceso son  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y las quimiocinas que producen los macrófagos.

La principal función fisiológica del  $\text{TNF-}\alpha$  es la estimulación y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección y la activación de estas células para erradicar microorganismos.

El  $\text{TNF-}\alpha$  hace que las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de superficie (moléculas de adhesión, principalmente las integrinas leucocitarias y las selectinas endoteliales), que hacen que los leucocitos se adhieran a la superficie de la célula endotelial, inicialmente los neutrófilos y, posteriormente, los monocitos y los linfocitos. También actúa sobre los fagocitos mononucleares para estimular la secreción de  $\text{IL-1}\beta$ .

Los efectos biológicos de la  $\text{IL-1}$  son similares a los del  $\text{TNF-}\alpha$  y depende de la cantidad de interleucina producida. En bajas concentraciones, la  $\text{IL-1}$  actúa como mediador de la inflamación local.

Actúa sobre las células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión leucocitaria, como los ligandos para integrinas.

Los macrófagos participan también como células efectoras de la inmunidad adaptativa ya que son células presentadoras de antígeno que fagocitan activamente partículas de gran tamaño, y desempeñan un papel importante en la

presentación de antígenos derivados de organismos infecciosos fagocitados tales como bacterias y parásitos.

La mayoría de los macrófagos expresan niveles bajos de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC), y la citocina interferón-  $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) induce niveles mucho más altos en los macrófagos de esta molécula.

La mayoría de los péptidos asociados a moléculas de clase II derivan de antígenos proteicos captados e internalizados en endosomas por células presentadoras de antígeno (APC) especializadas.

La necesidad de la unión al péptido para la estabilización de las moléculas de clase II del MHC asegura que sólo los complejos péptido-molécula del MHC sobrevivan suficiente tiempo para ser expuestos en la superficie celular. Una vez expresados en la superficie de la APC, los complejos péptido-molécula de clase II son reconocidos por las células T CD4+.

Los fagocitos son las células más importantes de la defensa del huésped poco después de una infección, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir e incluso replicarse en el interior de los fagocitos, en esta situación, la inmunidad celular actúa potenciando las acciones microbicidas de los fagocitos y de esta manera eliminar a los microorganismos.

Las células T responsables de la activación de los macrófagos son células T cooperadoras CD4+ de la subpoblación TH<sub>1</sub>, así como los linfocitos T CD8+, que comparten la capacidad de secretar una citocina activadora de los macrófagos, el interferón -  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ).

Las células T cooperadoras estimuladas por el antígeno inducen la producción de IL-12 en los macrófagos y las células dendríticas, principalmente por el acoplamiento del ligando de CD40 de las células T con el CD40 de los macrófagos y las células dendríticas.

Los macrófagos producen IL-12 en respuesta a muchos microorganismos. La IL-12 estimula en las células NK y en los linfocitos T, la producción de INF- $\gamma$ , que a su vez activa a los macrófagos para que destruyan a los microorganismos fagocitados.

La IL-12 estimula la diferenciación de los linfocitos T cooperadoras CD4+ en células TH1 productoras de INF $\gamma$ .

El INF- $\gamma$  es la citocina de activación de los macrófagos que proporciona el medio por el cual los linfocitos T y las células NK activan a los macrófagos para que destruyan a los microorganismos fagocitados. El INF- $\gamma$  potencia la función microbicida de los macrófagos al estimular la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno y óxido nítrico.

El INF- $\gamma$  induce la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes a la subpoblación TH1 e inhibe la proliferación de la subpoblación TH<sub>2</sub>, este efecto inductor está mediado por la activación de los fagocitos mononucleares para producir IL-12, que es la citocina inductora de las células TH<sub>1</sub><sup>3</sup>.

La importancia de cuantificar la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  es que ponen de manifiesto la activación de los macrófagos en un proceso infeccioso crónico que puede conducirnos a pensar en la estimulación a la respuesta adaptativa a partir de estas células, con la ayuda y la presencia de moléculas como la IL-12 también producida por el macrófago.

Por esta razón es interesante estudiar la posible participación de la IL-1 $\beta$  en el micetoma ya que esta citocina participa en el proceso de diferenciación de TH<sub>0</sub> a TH<sub>1</sub> y por tanto permite explicar las respuestas inflamatorias tan evidentes y sostenidas en el micetoma. Con esto se sugiere que en el inicio de la infección por estos microorganismos, hay una activación de la inflamación, pero ¿qué es lo que ocurre, en el caso del micetoma en donde se encuentran células inflamatorias (PMN) en una infección crónica?

La respuesta podría estar en la presencia de células fagocíticas estimuladas por moléculas provenientes de la inmunidad adaptativa como es el factor de necrosis tumoral- beta (TNF- $\beta$ ) producida por linfocitos o bien, por la eliminación de células muertas en la zona de infección llevada a cabo por los macrófagos activados.

## MARCO TEÓRICO

### **Micetoma.**

#### **Datos históricos.**

La formación de micetomas fue descrito por primera vez en el Atharva Veda en la India hace siglos<sup>4</sup>. En 1842, McGill<sup>5</sup> observó la enfermedad en Madrás en la región de Madura en India y la llamo "tumor de pie", enfermedad caracterizada por la salida de un líquido aceitoso y fétido, además de la destrucción de huesos y cartílagos. Godfrey reportó cuatro casos entre 1844 y 1845, los cuales presentaban úlceras en el pie después de varios años de duración, por lo que llamo a la enfermedad "tubérculos del pie". La amputación era el único tratamiento efectivo<sup>6</sup>. En esos mismos años Colebrook<sup>7</sup> le llamó pie de Madura, debido a la parte del cuerpo que generalmente es afectada y a la región de, Madura, India. Minas<sup>8</sup> en 1860 describe la enfermedad en el distrito de Izar, el observó que en la mano se podían desarrollar lesiones similares y ese mismo año, Carter<sup>9</sup> acuñó el término de micetoma. Catorce años después McQuestin<sup>10</sup> señaló la existencia de micetomas en América, en Sonora y México mientras Boccaro,<sup>11</sup> en Bombay, realizó un estudio detallado de 100 casos de micetoma, tanto clínico como histológico; debido a que en sus cortes no observó granos blancos y negros simultáneamente, infirió que se trataban de diferentes agentes etiológicos. A principios del siglo XX, en 1902, Laveran<sup>12</sup> aisló *Actinomadura pelletieri* en Senegal, seguido por Brumpt<sup>13</sup> en 1905 quien señaló que varios hongos podían originar la misma enfermedad. Tarozzi y Radeli<sup>14</sup> en 1909 describieron casos producidos por hongos de granos blancos (*Monosporium apiospermum*) y dos años después Cicero estudió por primera vez casos de micetoma en México y los reportó un año más tarde<sup>15</sup>.

Fue hasta 1945 cuando González-Ochoa precisó el papel preponderante de *Nocardia brasiliensis* como causa de los micetomas en México<sup>16</sup> y en 1947 Latapí, al tratar con sulfonas a un paciente que padecía lepra lepromatosa



nodular y micetoma, observó una notable mejoría de ambas enfermedades por lo que propuso su empleo en actinomicetomas<sup>17</sup>.

A principios de los sesentas Mariat señaló a México como uno de los países con mayor incidencia de micetoma en el mundo, esto fue avalado por González-Ochoa quien determinó los principales agentes de micetoma y Lavallo destacó la frecuencia en México<sup>18</sup> y en 1964 Lynch describe varios casos dados por actinomicetos y proporciona una estimación conservadora de 300 a 400 casos nuevos por año en Sudán<sup>19</sup>.

### **Descripción clínica.**

El micetoma es un síndrome clínico que consiste en lesiones inflamatorias deformantes, no dolorosas y fístulas que afectan tejidos cutáneo y subcutáneo, aponeurosis y hueso<sup>16</sup>.

La evolución de esta enfermedad es muy lenta y por lo tanto poco invalidante durante los primeros meses o años de su aparición. La enfermedad es el resultado de la implantación traumática de microorganismos del suelo dentro de los tejidos. Las lesiones se componen de abscesos que supuran, granulomas y fístulas que drenan, así como presencia de granos que son característicos de los agentes etiológicos.

El Dr. John Gill<sup>5</sup> describió en 1842 por primera vez el micetoma, también llamado pie de Madura, como entidad médica, esto lo determinó cuando la pierna de un paciente fue amputada y encontrando que el pie tenía una masa patológica de naturaleza fibrocartilaginosa con destrucción completa de las articulaciones, cartílagos y ligamentos, sin ninguna forma o característica y cubierta con grandes excrescencias fungoideas que secretaban un líquido incoloro de olor desagradable<sup>9</sup>.

En 1860 Vandyke Carter utilizó por primera vez el término "micetoma" para designar a todos los tumores producidos por hongos y descubrió 2 variedades de micetoma, el tipo melanoide con gránulos negros y el ocroide con gránulos blancos<sup>9</sup>.

## Agentes etiológicos

Los agentes etiológicos son una amplia variedad de bacterias (actinomicetomas) y hongos (eumicetomas) del suelo<sup>1</sup>.

En la tabla 1 se enlistan a los diferentes agentes etiológicos productores de micetomas actinomicósicos y que representan el 98% de los casos.

<b>*N. brasiliensis</b>	<i>N. dassonvillei</i>
<i>N. otitidis caviarum</i>	<i>S. somaliensis</i>
<i>N. coeliaca</i>	<i>S. griseus</i>
<b>*A. madurae</b>	<i>S. albus</i>

Tabla 1. Micetomas actinomicósicos.

\* Microorganismos estudiados en esta tesis.

En la tabla 2 se enlistan a los agentes etiológicos causantes del micetoma eumicósico, los cuales representan el 2% de los casos.

<i>Pseudoallescheria boydii</i>	<i>Exophiala janselmei</i>
<i>Madurella grises</i>	<i>Neotestudina rosatii</i>
<b>*Madurella mycetomatis</b>	<i>Pyronochaeta romeroi</i>
<i>Acremonium kiliense</i>	<i>Curvularia geniculata</i>
<i>Acremonium falciforme</i>	<i>Curvularia lunata</i>
<i>Acremonium recifei</i>	<i>Cochliobolus spicifer</i>
<i>L. senegalensis</i>	<i>Fusarium sp</i>
<i>Leptosphaeria tompkinsii</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>

Tabla 2. Micetomas eumicósicos.

- Microorganismo estudiado en esta tesis.
- 

En México<sup>10</sup> el agente etiológico mas frecuente es la *Nocardia brasiliensis* en un 87% de los casos, seguido por *Actinomadura madurae* con un 10% y en mucho menor frecuencia *Streptomyces somaliensis* seguido de *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia otitidis-caviarum*.

En los micetomas eumicóticos predominan *Madurella mycetomatis* y la *Madurella grisea*, aunque también se ha visto *Pseudoallescheria boydii* y *Acremonium sp.*

### **Distribución geográfica**

La enfermedad predomina en aquellos países que están cerca del trópico de cáncer, entre los paralelos 14 y 32: México, Brasil, Senegal, Venezuela, Sudán, India, Somalia, Tailandia, etc. Se da en países donde presentan una estación lluviosa corta y una estación seca larga.

En México se han descrito casos prácticamente en toda la república, predominando en los estados de: Morelos, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí y Nuevo León.

### **Epidemiología**

La enfermedad se observa principalmente en los hombres en una proporción de 3 o 4:1; en niños esta diferencia es mucho menor. La mayor frecuencia de la enfermedad se encuentra entre los 31 y 45 años de edad y es menos frecuente a los 60 años. Con respecto a la ocupación, la enfermedad predomina en campesinos, pero también se ha encontrado en personas con otras ocupaciones como estudiantes, profesionistas, obreros, amas de casa etc<sup>20</sup>.

Los agentes etiológicos predominantes son los actinomicetos con 97.2%, de los cuales *Nocardia* es en el 85.6% y de éstos *Nocardia brasiliensis* en 71.9% de los casos, *Actinomadura madurae* en 9.6 % *Streptomyces somaliensis* 11.6% y *Actinomadura pellitieri* únicamente 0.12 % de los casos. Los agentes más frecuentemente aislados en países africanos son *Madurella mycetomatis*, *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae*.

## **Cuadro clínico**

La inflamación es usualmente firme y rodeada de células polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos, pero puede ser suave y raramente lobulada, y es a menudo móvil<sup>21</sup>, a veces se pueden desarrollar nódulos secundarios que supuran y drenan a través de tractos sinuosos. Usualmente descargan exudados purulentos y seropurulentos que contienen los gránulos<sup>22</sup>. Durante la fase activa el color de los gránulos depende del organismo causal. Los gránulos pueden ser negros, blancos, rojos o amarillos y varían en tamaño y consistencia. El examen visual de los granos a veces es de utilidad para la identificación del organismo causal (actinomicetoma o eumicetoma)<sup>23</sup>. La presentación clínica del micetoma siempre es idéntica de acuerdo al organismo causal, la velocidad de progreso de la lesión es más rápida en actinomicetomas que en eumicetomas. En el eumicetoma la lesión crece lentamente y permanece encapsulados por un largo periodo, mientras que en el actinomicetoma la lesión presenta inflamación, destrucción e invaden el hueso en los primeros estadíos<sup>24</sup>.

## **Diagnóstico del micetoma**

Primero se debe diferenciar entre el eumicetoma y el actinomicetoma ya que el tratamiento es completamente diferente. El agente etiológico se identifica de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas. Si las hifas que lo componen son microsifonadas su etiología es bacteriana (98% de los casos), si las hifas son macrosifonadas su etiología es micótica (2% de los casos). Las pruebas bioquímicas son particularmente útiles para identificar actinomicetos<sup>25</sup>.

Las herramientas factibles para el diagnóstico del micetoma son pocas y limitadas. Los métodos más comunes para el diagnóstico son: histopatología del material de biopsia, cultivo de supuraciones, cultivo de descargas o biopsias quirúrgicas. El examen microscópico de los granos permite la identificación del agente causal, pero para la diferenciación de hongos es limitado, el cultivo es necesario para el diagnóstico definitivo;<sup>26</sup> sin embargo, la técnica es compleja,

consume tiempo, existen posibilidades de contaminación y siempre se requiere biopsias quirúrgicas profundas.

### **Diagnóstico histológico**

Desde el punto de vista histológico las lesiones son semejantes sin considerar el agente etiológico<sup>23</sup>. Los granos se observan en el centro de un absceso agudo, y a menudo cubiertos con una capa de polisacárido neutro en el caso de los granos de *Nocardia* y polisacáridos ácido sulfatado en el caso de los granos por *Actinomyces madurae*<sup>27</sup>, estos están rodeados de grandes acumulos de neutrófilos en todos los estados de degeneración, inmediatamente alrededor del absceso hay un área de fibrosis densa y tejido de granulación rico en capilares, células epiteliales y macrófagos.

El diagnóstico es posible por la confrontación sistemática de los resultados microbiológicos e histológicos de las biopsias obtenidas de lesiones. Se ha encontrado que el cuadro histopatológico revela una inflamación granulomatosa con formación de absceso. Hay una zona central donde las células polimorfonucleares son abundantes y donde también se encuentran gránulos o granos. Esta zona central es rodeada por linfocitos, histiocitos y fibroblastos. Los actinomicetos se ven bien con tinción de Hematoxilina-Eosina, ó con Gomori Grocott<sup>28</sup>; los eumicetos se observan más fácilmente con Hematoxilina-Eosina<sup>29</sup>, ácido peryódico de Schiff (PAS)<sup>30</sup>, metanamina de plata<sup>28</sup> y azul alciano<sup>31</sup>.

### **Tratamiento**

No existen medidas preventivas para esta enfermedad y sólo se recomienda el uso de calzado y la atención primaria adecuada de las heridas de la piel. Una vez que el individuo ha sido infectado y se ha desarrollado un micetoma, el tratamiento va a depender del agente causal y del avance de la enfermedad. Hace algunos años el único tratamiento era la amputación de la parte afectada o la escisión quirúrgica<sup>21</sup>. La diamino difenil sulfona (DDS) fue usada por primera

vez en 1947 por Latapí y colaboradores, para tratar micetomas actinomicóticos con buenos resultados. En la actualidad el tratamiento de elección es sulfametoxazol-trimetoprim y en algunos casos se emplea diamino-difenil-sulfona, rifampicina, minociclina o estreptomicina y en los casos en los que se presenta resistencia, se utilizan combinaciones de trimetoprim-sulfametoxazol y amikacina.

El tratamiento de los micetomas eumicóticos es a base de: ketoconazol, itraconazol, fluocomazol o anfotericina B. Si la lesión es pequeña y resecable, se recomienda su extirpación quirúrgica y continuar con el tratamiento médico ya descrito.

## **Inmunología**

La capacidad de un individuo para mantenerse libre de infecciones depende tanto de su resistencia natural (inmunidad innata), como de la resistencia específica que puede desarrollar o adquirir durante su vida, (inmunidad adquirida).

En ambos tipos de respuesta inmunitaria los microorganismos que llegan a implantarse en los tejidos son ingeridos y destruidos por células llamadas fagocitos profesionales. Los macrófagos y los polimorfonucleares neutrófilos son los principales fagocitos encargados del consumo y la eliminación de microorganismos, para lo que poseen mecanismos bioquímicos potentes presentes en sus organelos del citoplasma.

Los macrófagos son responsables de la secreción de muchas citocinas. Por razones históricas varios tipos de citocinas han emergido incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento tumoral (TGF), factor estimulante de colonias (CSF), interferón (IFN) e interleucina 1 (IL-1).

## TNF- $\alpha$

El factor de necrosis tumoral (TNF), fue descubierto inicialmente por Lloyd Old en 1985 al demostrar que los sueros de ratones inoculados con lipopolisacárido (LPS) o con BCG tenían efecto anti-tumoral en ratones que presentaban ciertos tumores.

Se conocen dos tipos de TNF, uno producido por macrófagos y llamado TNF- $\alpha$  y otro producido por linfocitos T conocido como TNF- $\beta$ , ambos tipos de TNFs muestran actividad antitumoral tanto "*in vivo*" como "*in vitro*".

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina inflamatoria pleiotrópica, aislada por primera vez por Carswell y colaboradores en 1975 en un intento para identificar al factor de necrosis tumoral responsable de la necrosis de el sarcoma Meth A<sup>32</sup>.

El TNF- $\alpha$  es una citocina que es producida por una gran variedad de células estimuladas por diferentes sustancias tales como: lipopolisacárido, IL-2, factor estimulador de crecimiento de granulocito y macrófagos e IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ).

El TNF- $\alpha$  es un polipéptido de 17 kDa que se puede encontrar en dímeros, trímeros o pentámeros y contiene varios tipos de glicosilación. Los datos de clonación han evidenciado que es un polipéptido de 157 aminoácidos y que su precursor es de 235 aminoácidos, el 79% de los aminoácidos son conservados tanto en el TNF de humanos como de ratones<sup>3</sup>.

El TNF tiene diversas funciones en el sistema inmunológico ya que estimula la atracción de neutrófilos hacia las zonas de infección para activar a estas células y erradicar a los microorganismos, induce la actividad antiviral y mitogénica, puede aumentar la expresión de moléculas del MHC-I en los polimorfonucleares y la proliferación y diferenciación de linfocitos B.

El TNF- $\alpha$  induce la proliferación de neutrófilos durante la inflamación, pero también induce la apoptosis de neutrófilos cuando se une al receptor TNF-R55<sup>33</sup>. La citocina es producida por varios tipos de células, pero especialmente por macrófagos. Tracey y Cerami sugieren que bajos niveles de la citocina

pueden ayudar en el mantenimiento de la homeostasis regulando el ritmo cardiaco del cuerpo<sup>34</sup>. Por otra parte el TNF- $\alpha$  juega un papel importante en la respuesta inmune en infecciones por bacterias, ciertos hongos, virus e infestaciones parasitarias, así como también en la necrosis de tumores específicos. El TNF- $\alpha$  es una proteína de fase aguda que inicia una cascada de citocinas e incrementa la permeabilidad vascular, reclutando macrófagos y neutrófilos en el sitio de infección. El TNF- $\alpha$  secretado por los macrófagos causa coagulación sanguínea y sirve para contener la infección<sup>34</sup>.

El TNF- $\alpha$  causa necrosis de algunos tipos de tumores y promueve el crecimiento de otros tipos de células tumorales. Niveles altos de TNF- $\alpha$  aumentan el riesgo de mortalidad<sup>36</sup>. Factores exógenos y endógenos de bacterias, virus y parásitos estimulan la producción de TNF- $\alpha$  y otras citocinas. El lipopolisacárido de la pared celular de bacterias es un potente estimulador para la síntesis de TNF- $\alpha$ <sup>37</sup>. Los pacientes que experimentan el shock séptico y un aumento considerable de los niveles de circulantes de TNF- $\alpha$  presentan fiebre, disminución en la presión sanguínea, supresión del miocardio, deshidratación, falla renal aguda y por lo tanto suspensión de la respiración<sup>37</sup>. Una sobreproducción prolongada de TNF- $\alpha$  trae como resultado una condición conocida como caquexia, caracterizada por anorexia, catabolismo, pérdida de peso y anemia, como ocurre en enfermedades como el cáncer y el SIDA<sup>38</sup>.

### **Interleucina 1**

La hormona polipeptídica conocida como interleucina-1 (IL-1) es una de las mediadoras claves de la respuesta del huésped a la invasión microbiana, de la inflamación, del daño al tejido y de diversas reacciones inmunológicas. Históricamente, la IL-1 fue descrita por primera vez en los años 40 como una sustancia productora de fiebre y liberada por leucocitos activados; es por ello que durante este tiempo también fue llamada "pyrexina" o "pirógeno endógeno". Atkins<sup>39</sup> caracterizó la producción de IL durante eventos de fiebre experimentales y estableció que ésta era un polipéptido distinto a la toxina lipopolisacárida.



La IL-1 es sintetizada por una amplia variedad de células, incluyendo fibroblastos sinoviales, queratinocitos y células de Langerhans de la piel, células mesangicas del riñón, linfocitos B, células NK, astrocitos y células de la microglia del cerebro, células vasculares, endoteliales y del músculo liso, células de cornea, gingivales y del epitelio del timo y también por algunas líneas celulares de linfocitos T. Los monocitos de sangre circulante comienzan a transcribir ARNm para IL-1 a los 15 minutos después de adherirse a la superficie de vidrio o plástico. La transcripción para IL-1 puede ser iniciada sin que se traduzcan cantidades importantes de proteína, y en algunos casos, como en el ratón con defecto genético HeJ, se presenta un alto nivel de transcripción sin que apenas se produzca traducción a proteína<sup>40</sup>. La IL-1 es traducida inicialmente a una proteína precursora de 31kD que requiere una proteólisis limitada para ser transformada en péptidos maduros más activos. Las células estimuladas con agentes tales como endotoxinas, o que han fagocitado, no sólo incrementan la transcripción, sino que se muestran más eficientes en la traducción y maduración del precursor de IL-1. La transcripción es un evento corto, que puede ser incrementado por la supresión de la síntesis de una proteína represora<sup>41</sup>. La traducción es reducida por la producción de AMPc inducido por prostaglandinas. Los monocitos y macrófagos continúan siendo una fuente importante de IL-1, dada su localización estratégica que las capacita a sintetizar grandes cantidades de ésta molécula (100 fg de IL-1 $\beta$ /célula/24 horas), y se debe a que procesan el precursor de IL-1 más eficientemente que otras células, debido a sus altos niveles de elastasa y otras serinproteasas.

Hay dos formas de IL-1, llamadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que muestran una homología entre sí inferior al 30%, pero que se unen a los mismos receptores de superficie y median las mismas actividades biológicas. Ambos polipéptidos se sintetizan como precursores de 33 kD y son secretados como proteínas maduras de 17 kD.

En la figura 1 se ilustran los momentos clave durante la activación, transcripción, traducción y maduración de IL-1 $\beta$ <sup>41</sup>.

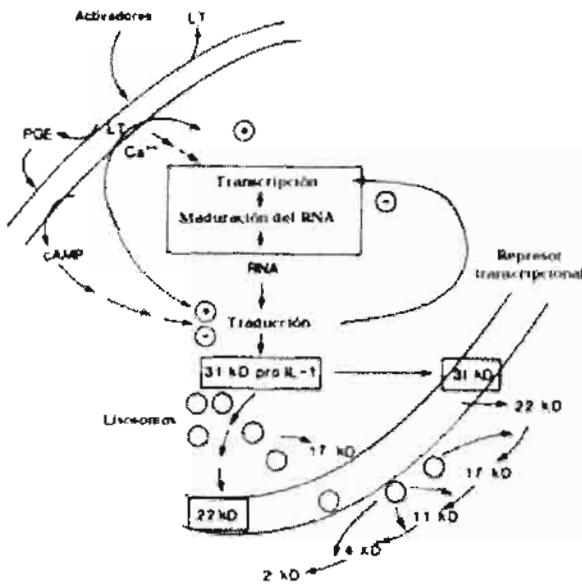


Figura 1. Eventos ocurridos durante la producción de IL-1 $\beta$ .  
 Estos eventos corresponden a la transcripción, traducción y maduración de IL-1 $\beta$ .

Entre las moléculas que inducen la producción de IL-1 $\beta$  se encuentran la prostaglandina E (PGE), leucotrienos (LT) y niveles altos de calcio intracelular. El precursor de 31 kDa de la IL-1 (pro-IL-1) está limitado a romperse en péptidos de 22 y 17 kDa que pueden estar asociados con la membrana celular, así como a los componentes extracelulares. La IL-1 unida a membrana puede ser el precursor de 31 kDa o el producto de 22 kDa. Las enzimas lisosomales y las serinproteasas son responsables del corte de la molécula de pro-IL1 en varios péptidos con pesos moleculares de 17 kDa que son las formas extracelulares predominantes, 11 kDa, 4 kDa y 2 kDa que se pueden aislar a partir de electroforesis en gel.

### IL-1 en la inflamación

La IL-1 atrae leucocitos al tejido inflamado y causa degranulación de basófilos y eosinófilos, estimula la síntesis de tromboxanos en macrófagos y neutrófilos, y también potencian la activación de neutrófilos por péptidos quimioattractantes. La activación de osteoclastos es también una propiedad de la IL-1. Además participa en el proceso de reparación tisular porque incrementa la proliferación

de fibroblastos y la síntesis de colágena y glucosaminoglicanos, es mitogénica para las células mesangicas en el riñón, células gliales en el cerebro y queratinocitos.

### **Papel de la IL-1 en la respuesta inmune**

La IL-1 estimula el sistema inmunológico participando en la activación de linfocitos y macrófagos. En fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos, la IL-1 induce la producción de interferones, factores estimulantes de colonias hematopoiéticas y factores de diferenciación y crecimiento de linfocitos T y B. Por ejemplo, en presencia de IL-1, la proliferación de factores de crecimiento de linfocitos T y B se aumenta, al igual que la producción y diferenciación de anticuerpos, también se incrementa la unión de células NK a sus células tumorales blanco. Un perfil de respuesta sugiere que IL-1, como los ésteres de forbol, aumentan la respuesta funcional de células inmunocompetentes, esta propiedad apoya la noción de que es uno de los adyuvantes naturales del cuerpo, y como todos los adyuvantes, incrementa de manera no específica la respuesta inmune a los antígenos y células malignas<sup>3</sup>.

Se ha puesto particular atención en el papel de la IL-1 en las respuestas inmunes dependientes de linfocitos T. Para proliferar, los linfocitos T requieren de la IL-2 y la expresión de los receptores específicos para dicha molécula, estudios relacionados al receptor de IL-1 en líneas celulares de linfocitos T, demuestra que a concentraciones de 1-10 pM se induce la transcripción, síntesis y secreción de IL-2. Las respuestas a IL-1 aumentan de 10 a 100 veces en presencia de agentes que incrementan los niveles de calcio citosólico y activan la proteincinasa C. Existen datos suficientes para demostrar que IL-1 disminuye el umbral de proliferación de linfocitos inducida por mitógenos o antígenos, y que esta disminución es debida al incremento de producción de IL-2 y la expresión de receptores para la misma. Esta co-estimulación es un fenómeno bien descrito para la activación de linfocitos T inducida por IL-1.

Durante la respuesta inmune, un antígeno específico es presentado en la superficie de una célula presentadora de antígenos junto con el complejo del MHC, además de que se requiere una segunda señal antigénica no específica para proliferar linfocitos T. La primera señal puede ser substituida por activación directa del TCR, pero en la ausencia de macrófagos la división celular no se lleva a cabo. En algunos estudios, la adición de IL-1 soluble reemplaza el requerimiento por el macrófago para proliferar, pero en otros experimentos la IL-1 soluble no puede restituir la respuesta inmune al antígeno sin los macrófagos. El requerimiento absoluto de la IL-1 soluble no está bien establecido y depende del estado de activación del linfocito T<sup>41</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Mariat señaló a México como uno de los países con mayor incidencia de micetoma en el mundo, esto fue avalado por González Ochoa quien determinó los principales agentes de micetoma y Lavallo destacó la frecuencia en México.

Debido a que aún se conoce poco de la relación huésped-parásito del micetoma, nosotros tratamos de dar pie a esta investigación estudiando a las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ambas proinflamatorias y que juegan un papel importante en la activación de las células que participan de manera relevante en la formación del micetoma.

## HIPÓTESIS

1. Si los macrófagos son una de la células efectoras más importantes de la respuesta inmune innata y estos al ser activados por algún microorganismo producen cierta cantidad de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  entonces esperamos que estas dos citocinas estén presentes en el proceso inflamatorio de los micetomas, y en la activación *in vitro* de células mononucleares infectadas con *Madurella*, *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Candida albicans*.
2. De acuerdo con las características histológicas que presenta el micetoma se podrá demostrar la presencia de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  *in situ* en biopsias de pacientes.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

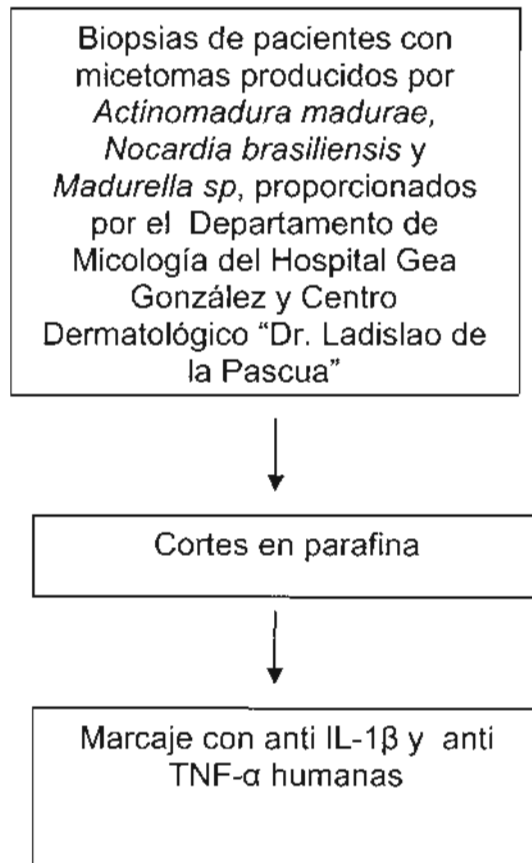
- Demostrar la presencia de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en las células que rodean al grano en los micetomas directamente en biopsias de pacientes y cuantificar su producción *in vitro* en células fagocíticas purificadas de sangre de individuos normales infectadas con *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella mycetomatis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar la presencia de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en células presentes en lesiones de micetoma.
- Cuantificar la producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en cultivo de células mononucleares normales humanas infectadas por estos agentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama que muestra los pasos a seguir para demostrar la presencia de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en biopsias de micetomas





## A. Estudio Histopatológico

1. Biopsias. Las 8 biopsias de los pacientes con micetoma (por *N. brasiliensis*, *A. madurae* y *Madurella*) fueron proporcionadas por el Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” y el Hospital “Dr. Manuel Gea González”, Departamento de Micología.
2. Fijar las biopsias en formalina neutra al 10% con un volumen aproximado de 20 veces el tamaño de la pieza con dos cambios (cada seis días), durante 15 días.
3. Lavar las piezas en agua corriente hasta eliminar el formol del tejido durante 30 minutos aproximadamente.
4. Inclusión en parafina.
  - I. Colocar la pieza en etanol al 70% durante 2 días.
  - II. Sumergir la pieza en etanol al 96% en tres ocasiones 30 minutos cada una.
  - III. Colocar la pieza en etanol absoluto en tres ocasiones 30 minutos cada una.
  - IV. Colocar la pieza en una mezcla de etanol–tolueno (v/v) durante 15 minutos.
  - V. Colocar la muestra en tolueno durante 15 minutos.
  - VI. Sumergir la pieza en una mezcla de tolueno–parafina (v/v) durante 15 minutos.
  - VII. Colocar la pieza en parafina de punto de fusión de 54°-56°C durante dos horas.
  - VIII. Sumergir en parafina de inclusión con punto de fusión de 58°-60 °C durante 5 minutos.
  - IX. Poner alcohol glicerinado en los moldes.
  - X. Colocar un poco de parafina en el molde.
  - XI. Adicionar la pieza en el molde y adicionar la parafina de inclusión definitiva.
5. Obtención de cortes.

- I. Rebajar con una navaja el cubo de parafina hasta acercarse al tejido.
  - II. Rebajar con cortes de 20  $\mu$  de grosor hasta presentar una cara de todo el tejido.
  - III. Obtener cortes de 7  $\mu$  de grosor.
  - IV. Colocar el corte en un baño de flotación que contenga agua con gelatina a una concentración de 0.1g /L a una temperatura de 50°C.
  - V. Montar en portaobjetos silanizados.
  - VI. Meter en estufa a 60 °C durante 15 minutos para eliminar exceso de parafina y secar.
6. Técnica para desparafinar
- I. Sumergir el corte en xilol durante 10 minutos.
  - II. Colocar el corte en una mezcla de xilol-etanol (1:1) absoluto por 5 minutos.
  - III. Poner el corte en etanol absoluto durante 3 minutos.
  - IV. Sumergir en etanol al 96% durante 3 minutos.
  - V. Colocar en etanol al 70% por 3 minutos.
  - VI. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.

## **B. Tinción hematoxilina-eosina<sup>29</sup>**

- I. Cubrir el corte con hematoxilina de Harris la cual contiene 0.1g de hematoxilina/ml de etanol, durante un minuto.
- II. Lavar con agua de la llave.
- III. Diferenciar con etanol-ácido, HCL al 1% en etanol al 70%, hasta que vire el color.
- IV. Lavar con agua de la llave.
- V. Virar con 30 ml de agua amoniacal, la cual contiene 0.6 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado.
- VI. Lavar tres veces con agua destilada.

- VII. Cubrir el corte con Eosina, 0.01g de eosina/ml de agua destilada, durante 30 segundos.
- VIII. Lavar con etanol 96% tres veces por 3 minutos cada uno.
- IX. Colocar la pieza en etanol absoluto por 3 minutos.
- X. Sumergir en etanol absoluto-xilol (v/v) por 5 minutos.
- XI. Colocar la muestra en xilol 10 minutos.
- XII. Montar en resina sintética.
- XIII. Observar los núcleos de color azul y el citoplasma de color rosa o naranja

### **C. Demostración de la presencia de IL-1 $\beta$ en biopsias de pacientes con micetoma**

El marcaje se realizó con el kit comercial "Cell and Tissue staining kit" de R&D Systems de la siguiente manera:

1. Cubrir la muestra con 1-3 gotas de reactivo bloqueador de peroxidasa ( $H_2O_2$  al 3%) por 5 minutos.
2. Sumergir la muestra en regulador PBS, pH 7, durante 5 minutos. Lavar la muestra suavemente hasta que el peróxido de hidrógeno se libere de los tejidos.
3. Cubrir la muestra con 1-3 gotas de reactivo bloqueador (suero de cabra en regulador PBS pH7) por 15 minutos. Decantar cuidadosamente y limpiar el exceso con papel absorbente.
4. Incubar la muestra con 1-3 gotas de reactivo de avidina (6 ml de solución avidina con 0.1% de azida de sodio) durante 15 minutos.
5. Enjuagar la muestra con regulador PBS, pH7 y dejar escurrir, limpiar cuidadosamente el exceso de regulador con papel absorbente.
6. Cubrir la muestra con 1-3 gotas de reactivo de biotina (6 ml de solución de biotina con 0.1% de azida de sodio) por 15 minutos.

7. Enjuagar la muestra con regulador PBS pH7, dejar escurrir y limpiar cuidadosamente el exceso de regulador con papel absorbente.
8. Incubar la muestra con 1-3 gotas de anticuerpo primario (suero de cabra anti IL-1 $\beta$  humano a una concentración de 0.1mg/mL de PBS pH7).
9. Enjuagar la muestra con regulador PBS pH7. Sumergir el portaobjetos tres veces en 40 ml de regulador PBS durante 15 minutos/lavado.
10. Dejar escurrir y limpiar cuidadosamente el exceso de regulador con papel absorbente.
11. Incubar la muestra con 1-3 gotas de anticuerpo biotinado secundario (anticuerpo secundario anti-cabra en PBS 0.01M) por 30-60 minutos dependiendo del espesor de la muestra (entre mas gruesa sea, mayor es el tiempo de incubación).
12. Introducir la muestra en regulador PBS pH7 tres veces 15 minutos/lavado.
13. Escurrir cuidadosamente el exceso de regulador.
14. Incubar la muestra con 1-3 gotas de conjugado HSS-HRP (conjugado de streptavidina-peroxidasa de rábano en PBS al 0.01M conteniendo 1% de proteína acarreadora y 0.04% de conservador) por 30 minutos.
15. Sumergir el portaobjetos tres veces en regulador PBS pH7 durante 2 minutos/lavado.
16. Escurrir cuidadosamente el regulador y limpiar el exceso de igual manera que en las ocasiones anteriores.
17. Cubrir el tejido con solución de cromógeno que contiene 3 amino-9-etilcarbazol al 2% en 2 ml de regulador de acetatos pH7 adicionado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01%, el cual debe prepararse en el momento inmediato antes de su uso.
18. Incubar durante 3-20 minutos dependiendo la intensidad de la tinción la cual se supervisa con un microscopio óptico.
19. Lavar con agua destilada por 5 minutos.
20. Montar la muestra después de contrastarse con hematoxilina, durante 10 segundos y enjuagar con agua de la llave.

21. Dejar escurrir verticalmente la muestra en un papel absorbente o toalla para quitar exceso y dejar secar.
22. Montar en gelatina a una concentración de 200g/L, y sellar con barniz de uñas.
23. Observar las preparaciones bajo el microscopio.

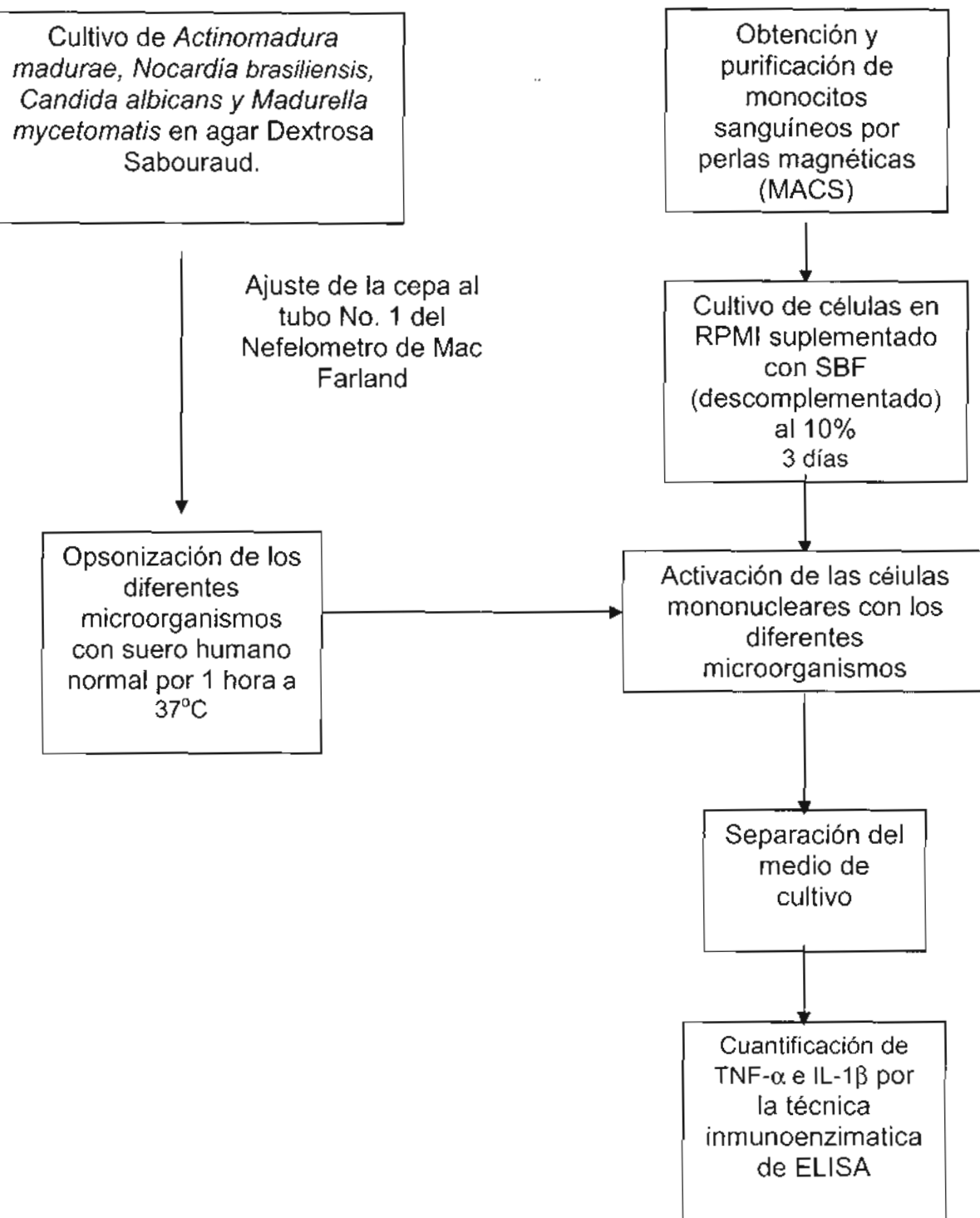
#### **D. Demostración de la presencia de TNF- $\alpha$ en biopsias de pacientes con micetoma.**

El marcaje se realizó con el kit comercial "Cell and Tissue staining kit" de R&D Systems de la siguiente manera:

1. Cubrir la muestra con 1-3 gotas de reactivo bloqueador de peroxidasa ( $H_2O_2$  al 3%) por 5 minutos.
2. Sumergir la muestra en regulador PBS, pH 7, durante 5 minutos. Lavar la muestra suavemente hasta que el peróxido de hidrógeno se libere de los tejidos.
3. Cubrir la muestra con 1-3 gotas de reactivo bloqueador (suero de cabra en regulador PBS pH7) por 15 minutos. Decantar cuidadosamente y limpiar el exceso con papel absorbente.
4. Incubar la muestra con 1-3 gotas de reactivo de avidina (6 ml de solución avidina con 0.1% de azida de sodio) durante 15 minutos.
5. Enjuagar la muestra con regulador PBS, pH7 y dejar escurrir, limpiar cuidadosamente el exceso de regulador con papel absorbente.
6. Cubrir la muestra con 1-3 gotas de reactivo de biotina (6 ml de solución de biotina con 0.1% de azida de sodio) por 15 minutos.
7. Enjuagar la muestra con regulador PBS pH7, dejar escurrir y limpiar cuidadosamente el exceso de regulador con papel absorbente.
8. Incubar la muestra con el anticuerpo primario (suero de cabra anti TNF- $\alpha$  humano a una concentración de 0.1mg/mL de PBS pH7).
9. Enjuagar la muestra con regulador PBS pH7. Sumergir el portaobjetos tres veces en 40 ml de regulador PBS durante 15 minutos/lavado.

10. Dejar escurrir y limpiar cuidadosamente el exceso de regulador con papel absorbente.
11. Incubar la muestra con 1-3 gotas de anticuerpo biotinado secundario (anticuerpo secundario anti-cabra en PBS 0.01M) por 30-60 minutos dependiendo del espesor de la muestra (entre mas gruesa sea, mayor es el tiempo de incubación).
12. Introducir la muestra en regulador PBS pH7 tres veces 15 minutos/lavado.
13. Escurrir cuidadosamente el exceso de regulador.
14. Incubar la muestra con 1-3 gotas de conjugado HSS-HRP (conjugado de streptavidina-peroxidasa de rábano en PBS al 0.01M conteniendo 1% de proteína acarreadora y 0.04% de conservador) por 30 minutos.
15. Sumergir el portaobjetos tres veces en regulador PBS pH7 durante 2 minutos/lavado.
16. Escurrir cuidadosamente el regulador y limpiar el exceso de igual manera que en las ocasiones anteriores.
17. Cubrir el tejido con solución de cromógeno que contiene 3 amino-9-etilcarbazol al 2% en 2 ml de regulador de acetatos pH7 adicionado con  $H_2O_2$  al 0.01%, el cual debe prepararse en el momento inmediato antes de su uso.
18. Incubar durante 3-20 minutos dependiendo la intensidad de la tinción la cual se supervisa con un microscopio óptico.
19. Lavar con agua destilada por 5 minutos.
20. Montar la muestra después de contrastarse con hematoxilina, durante 10 segundos y enjuagar con agua de la llave.
21. Dejar escurrir verticalmente la muestra en un papel absorbente o toalla para quitar exceso y dejar secar.
22. Montar en gelatina a una concentración de 200g/L, y sellar con barniz de uñas.
23. Observar las preparaciones bajo el microscopio.

**Diagrama que muestra los pasos a seguir para la infección *in vitro* y la cuantificación de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$**



## **A. Purificación de monocitos sanguíneos con perlas magnéticas (MACS).**

1. Obtener 20 ml de sangre venosa de cuatro individuos sanos con una jeringa conteniendo 4 ml de gelatina al 3% en solución de Alsever estéril. Mezclar.
2. Dejar sedimentar en posición vertical a 37 °C por 30-45 min.
3. Colectar el plasma rico en leucocitos manteniendo siempre la jeringa en posición vertical y doblando la aguja en un ángulo de 75° en 4 tubos estériles y siliconizados.
4. Centrifugar a 20 °C durante 7 min a 1300 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante y despegar el botón del fondo del tubo para resuspender.
6. Adicionar 1 mL de agua destilada estéril y homogeneizar con la ayuda de una pipeta Pasteur siliconizada evitando la formación de burbujas.
7. Inmediatamente adicionar 10 mL de solución de Alsever y homogeneizar.
8. Centrifugar a 20 °C durante 7 min. a 1300 rpm.
9. Descartar el sobrenadante por decantación y volver a resuspender el paquete celular con una pipeta Pasteur estéril y siliconizada de la misma manera que en el paso 6.
10. Adicionar 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera.
11. Remover grumos pasando las células por un embudo cubierto de organza.
12. Contar las células de la suspensión con azul tripan al 20% y ajustar a  $10^7$  células/30  $\mu$ l de regulador PBS pH7.
13. Adicionar 10  $\mu$ l/ $10^7$  células de reactivo bloqueador FcR y 10  $\mu$ l de una mezcla de anticuerpos biotinilados anti CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123.
14. Mezclar e incubar por 10 min a 4-8 °C.
15. Adicionar 30  $\mu$ l de regulador PBS pH7/ $10^7$  células de regulador PBS pH7.



16. Adicionar  $20 \mu\text{l}/10^7$  de micro esferas que contienen anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón anti-biotina Bio3-18E7.2.
17. Mezclar adecuadamente e incubar durante 15 min a  $4-8^\circ\text{C}$
18. Lavar con regulador PBS pH7 las células, con un volumen de 10-20 veces más que el volumen contenido en el tubo.
19. Centrifugar a 1000 rpm por 10 min y eliminar el sobrenadante completamente.
20. Ajustar las células resuspendiendo en PBS pH7 a una concentración de  $10^8/500 \mu\text{L}$  de regulador y mantenerlos en baño de hielo.
21. Colocar la columna "LS", la cual está compuesta de esferas ferromagnéticas cubiertas con una capa plástica, en la barra magnética del separador MACS y adicionar 3 ml de regulador PBS pH7.
22. Pasar la suspensión de células por la columna y coleccionar la fracción efluente de células no marcadas y que presentan la fracción enriquecida de monocitos.
23. Lavar la columna tres veces con 3 ml de regulador PBS pH7 y en el mismo tubo coleccionar el efluente.

## **B. Cultivo de microorganismos**

1. Cultivar *Actinomyces madurae*, *Nocardia brasiliensis*, *Candida albicans* y *Mycobacterium sp.* a  $37^\circ\text{C}$  en su fase estacionaria en medio Dextrosa-Sabouraud.
2. Tomar una colonia de cada uno de los microorganismos y resuspender en solución salina isotónica (SSI).
3. Ajustar al tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland que corresponde a  $300 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias/ml).

## **C. Opsonización de microorganismos**

1. Centrifugar las suspensiones a 1500 rpm y eliminar el sobrenadante.

2. Resuspender el sedimento bacteriano en 1 ml de suero humano normal fresco para asegurar la actividad del complemento.
3. Incubar durante 1 hora a 37 °C.
4. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min y eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender al volumen inicial con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera y homogeneizar por agitación.

#### **D. Reducción del NBT**

1. Ajustar los microorganismos, previamente opsonizados, para activar a los monocitos en una proporción de 10 microorganismos/célula.
2. Sembrar en placas de cultivo desechables de 4 pozos (Well Cell Culture Cluster. Costar<sup>R</sup>)  $1 \times 10^6$  monocitos/ml.
3. Incubar durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
4. Adicionar a cada pozo  $10 \times 10^6$  UFC de cada uno del microorganismo seleccionado opsonizado con 0.25 ml de NBT al 0.1%.
5. Incubar una hora a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
6. Lavar con medio RPMI 1640 suplementado.
7. Cubrir los pozos con safranina al 0.5% en agua destilada durante 10 minutos.
8. Enjuagar con solución salina.
9. Dejar secar las preparaciones y posteriormente montarlas con resina sintética.
10. Observar los fenómenos de ingestión y reducción del NBT (microorganismos azules en el interior) en un microscopio óptico bajo el objetivo de inmersión (100x). El grado de endocitosis ocurrido y la capacidad de las células para reducir el NBT, se evalúa determinando el porcentaje de células que habiendo fagocitado, han reducido al colorante.
11. Realizar el mismo procedimiento pero a las 48, 72 y 96 horas.

### **C. Infección de monocitos humanos humanos purificados (fagocitosis)**

1. Ajustar los microorganismos, previamente opsonizados para infectar a los monocitos en una proporción de 10 microorganismos/célula.
2. Sembrar en placas de cultivo desechables de 24 pozos (Well Cell Culture Cluster. Costar<sup>R</sup>)  $1 \times 10^6$  monocitos/ml.
3. Incubar durante 3 días a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
4. Adicionar a cada pozo  $10 \times 10^6$  UFC de cada uno del microorganismo seleccionado opsonizado, a otro pozo 0.1 mg/ml de LPS el cual se utiliza como testigo positivo de activación y se considera la condición de cultivo de monocitos sólo con RPMI 1640 suplementado como testigo negativo (todo por triplicado para cada uno de los individuos).
5. Incubar a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 1 hora.
6. Lavar con medio RPMI 1640 suplementado y mantener el cultivo por 24 horas a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.
7. Tomar dos alícuotas de 400 µl de cada pozo a las 24 horas y centrifugar a 1300 rpm durante 2 min.
8. Congelar los sobrenadantes a  $\leq 20$  °C para la posterior determinación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  por la técnica de ELISA.

### **D. Determinación cuantitativa de IL-1 $\beta$ por la técnica de ELISA**

1. Preparar todos los reactivos y los estándares de trabajo.
  - A. Regulador de lavado. Diluir 20 mL de solución reguladora concentrada en 500 ml de agua destilada.
  - B. Solución de sustrato. Mezclar 12.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 12.5 de tetrametilbenzidina 15 minutos antes de usarse y proteger la solución de la luz.
  - C. Solución estándar de IL-1 $\beta$ . Reconstituir el estándar de IL-1 $\beta$  que contiene 1.25 ng de IL-1 $\beta$  recombinante humana, con 5 ml de

regulador proteínado para producir una solución estándar de 250 pg/mL.

D. Realizar una serie de diluciones para la curva estándar agregando 500 µl del regulador proteínado en 6 tubos y pipetear 500 µl de la solución estándar en el primer tubo, homogeneizar bien la solución y evitar la formación de espuma antes de trasvasar 500 µl al tubo siguiente. La solución estándar sin diluir sirve como estándar superior con 250 pg/ml y el regulador proteínado sirve como el estándar cero con 0 pg/ml.

E. Organizar las muestra para la técnica de ELISA.

En la figura 2 se muestra la organización de las muestras para la realización de la técnica de ELISA.



Figura 2. Esquema de la organización de las muestras para la cuantificación de IL-1β.

S. Curva tipo; X. Donador mujer 1; A. Donador hombre 1; G. Donador mujer 2; Y. Donador hombre 2; B<sub>m</sub>. Testigo (-) monocitos sin activar; B<sub>a</sub>. Testigo (+) monocitos activados con LPS; D<sub>s</sub>. Directo de curva estándar.

2. Sacar la placa de su empaque, eliminar los excesos de plásticos y regresar la placa a su estuche.
3. Adicionar 50 µl del regulador de bloqueo a cada pozo.

4. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  del estándar o muestra en cada pozo. Cubrir los pozos con la cubierta adhesiva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Aspirar cada pozo, lavar con regulador y repetir el proceso dos veces más para un total de tres lavados. Es importante eliminar perfectamente el líquido en cada paso, ya que esto es esencial para el buen funcionamiento de la prueba, por ello después de cada lavado se debe retirar el líquido por aspiración o decantación invirtiendo la placa y golpeándola suavemente contra una toalla de papel secante.
6. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de anti IL-1 $\beta$  conjugado a cada pozo. Cubrir con una nueva cubierta adhesiva.
7. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Repetir el proceso de aspiración y lavado del paso 5.
9. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de la solución de sustrato, que contiene peróxido con tetrametilbenzidina v/v, a cada pozo e incubar durante 20 min. a temperatura ambiente. Proteger la placa de la luz.
10. Adicionar 50  $\mu\text{l}$  de solución de detención la cual contiene  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N a cada pozo. Si el cambio de color no es uniforme, agitar cuidadosamente la placa para asegurar su homogenización.
11. Determinar la densidad óptica de cada pozo antes de 30 min, usando un lector de microplacas y establecer la corrección a 540 o 570nm a los valores obtenidos a 450 nm para corregir las imperfecciones ópticas de la placa.
12. Promediar las lecturas por triplicado para el estándar, el control y las muestras para sustraer a estos valores la densidad óptica leída con el estándar cero. Calcular la curva estándar graficando la medida de las absorbancias para cada concentración del estándar (250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml y 3.9 pg/ml) en el eje y contra la concentración de los mismos en el eje x. Para linealizar los datos, se debe graficar el logaritmo de la concentración de IL-1 $\beta$  contra el logaritmo de la densidad óptica y la mejor línea se calcula por análisis de regresión.

13. Determinar la significancia de la diferencia entre las medias, utilizando la prueba de T student para muestras pareadas;  $p < 0.05$  es considerada como indicación de significancia.

#### **E. Determinación cuantitativa de TNF- $\alpha$ por la técnica de ELISA**

1. Preparar todos los reactivos y los estándares de trabajo.
  - A. Regulador de lavado. Diluir 20 mL de solución reguladora concentrada en 500 ml de agua destilada.
  - B. Solución de sustrato. Mezclar 12.5 ml de  $H_2O_2$  con 12.5 de tetrametilbenzidina 15 minutos antes de usarse y proteger la solución de la luz.
  - C. Solución estándar de TNF- $\alpha$ . Reconstituir el estándar de TNF- $\alpha$  que contiene 1.25 ng de TNF- $\alpha$  recombinante humana en 1 ml de agua desionizada para producir una solución estándar de 1000 pg/mL.
  - D. Realizar una serie de diluciones para la curva estándar agregando 500  $\mu$ l del regulador proteínado en 6 tubos y pipetear 500  $\mu$ l de la solución estándar en el primer tubo, homogeneizar bien la solución y evitar la formación de espuma antes de trasvasar 500  $\mu$ l al tubo siguiente. La solución estándar sin diluir sirve como estándar superior con 1000 pg/ml y el regulador proteínado sirve como el estándar cero con 0 pg/ml.
  - E. Organizar las muestra para la técnica de ELISA.

En la figura 2 se muestra la organización de las muestras para la realización de la técnica de ELISA.



Figura 2. Esquema de la organización de las muestras para la cuantificación de TNF- $\alpha$ .

S. Curva tipo; X. Donador mujer 1; A. Donador hombre 1; G. Donador mujer 2; Y. Donador hombre 2; B<sub>M</sub>. Testigo (-) monocitos sin activar; B<sub>A</sub>. Testigo (+) monocitos activados con LPS; D<sub>S</sub>. Directo de curva estándar.

2. Sacar la placa de su empaque, eliminar los excesos de plásticos y regresar la placa a su estuche.
3. Adicionar 50  $\mu$ l del regulador de bloqueo a cada pozo.
4. Adicionar 200  $\mu$ l del estándar o muestra en cada pozo. Cubrir los pozos con la cubierta adhesiva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Aspirar cada pozo, lavar con regulador y repetir el proceso dos veces más para un total de tres lavados. Es importante eliminar perfectamente el líquido en cada paso, ya que esto es esencial para el buen funcionamiento de la prueba, por ello después de cada lavado se debe retirar el líquido por aspiración o decantación invirtiendo la placa y golpeándola suavemente contra una toalla de papel secante.
6. Adicionar 200  $\mu$ l de anti TNF- $\alpha$  conjugado a cada pozo. Cubrir con una nueva cubierta adhesiva.
7. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Repetir el proceso de aspiración y lavado del paso 5.

9. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de la solución de sustrato, que contiene peróxido con tetrametilbenzidina v/v, a cada pozo e incubar durante 20 min. a temperatura ambiente. Proteger la placa de la luz.
10. Adicionar 50  $\mu\text{l}$  de solución de detención la cual contiene  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N a cada pozo. Si el cambio de color no es uniforme, agitar cuidadosamente la placa para asegurar su homogenización.
11. Determinar la densidad óptica de cada pozo antes de 30 min, usando un lector de microplacas y establecer la corrección a 540 o 570 nm a los valores obtenidos a 450 nm para corregir las imperfecciones ópticas de la placa.
12. Promediar las lecturas por triplicado para el estándar, el control y las muestras para sustraer a estos valores la densidad óptica leída con el estándar cero. Calcular la curva estándar graficando la medida de las absorbancias para cada concentración del estándar (1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml y 15.6 pg/ml) en el eje y contra la concentración de los mismos en el eje x. Para linealizar los datos, se debe graficar el logaritmo de la concentración de TNF- $\alpha$  contra el logaritmo de la densidad óptica y la mejor línea se calcula por análisis de regresión.
13. Determinar la significancia de la diferencia entre las medias, utilizando la prueba de T student para muestras pareadas;  $p < 0.05$  es considerada como indicación de significancia.



## RESULTADOS

### **Análisis inmunohistoquímico.**

#### Piel normal

La apreciación histológica de piel normal se presenta en la microfotografía 1, en la que se puede observar la epidermis, la dermis, el tejido fibroso conectivo y un poco de la capa muscular en condiciones normales teñidos con Hematoxilina-Eosina.



Microfotografía 1. Piel humana normal. (10X)

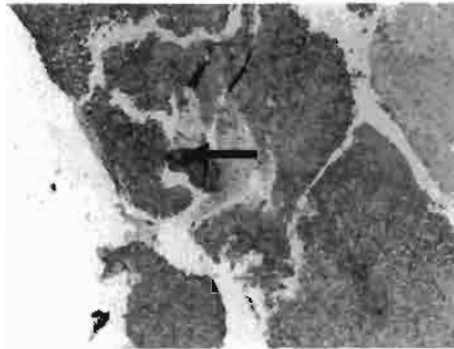
#### Micetoma por *Nocardia brasiliensis*

En la microfotografía 2 se presenta un micetoma por *Nocardia brasiliensis* teñido con hematoxilina-eosina, donde se observa la dermis con infiltrado inflamatorio y predominio de neutrófilos, formación de microabscesos, histiocitos epiteloides, linfocitos, los vasos sanguíneos se encuentran dilatados, congestionados, infiltrados y engrosados.



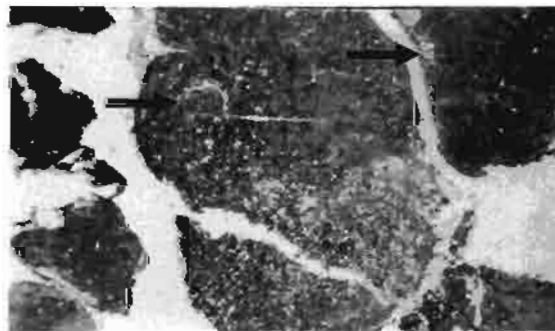
Microfotografía 2. Micetoma por *Nocardia brasiliensis*. (10x)

La presencia de producción de IL-1 $\beta$  en micetoma por *Nocardia brasiliensis* se muestra en la microfotografía 3, donde se observa el grano producido por *Nocardia brasiliensis* en coloración roja por la marca al tratarse con anti-IL-1 $\beta$  humana.



Microfotografía 3. Micetoma por *Nocardia brasiliensis* marcado con anti IL-1 $\beta$ . (10x)

La demostración de TNF- $\alpha$  en micetoma por *Nocardia brasiliensis* se muestra en la microfotografía 4 en la que se observa la presencia de TNF- $\alpha$  en el grano y en células de la capa espinosa de la epidermis.



Microfotografía 4. Micetoma por *Nocardia brasiliensis* marcado con anti TNF- $\alpha$ . (10x)

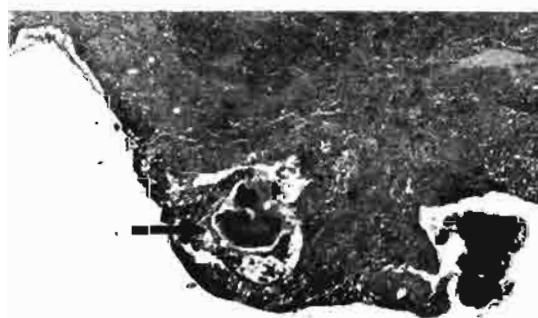
### Micetoma por *Actinomadura madurae*

El micetoma por *Actinomadura madurae* provenientes de paciente se muestra en la microfotografía 5 donde se observa un actinomicetoma por *Actinomadura madurae* con un contorno cartográfico, bacterias de forma filamentosa de color violeta debido a la hematoxilina, se puede considerar de naturaleza ácida debido a su reacción con la hematoxilina de naturaleza básica, hay presencia de pseudoclavas que forman el fleco característico de este grano.

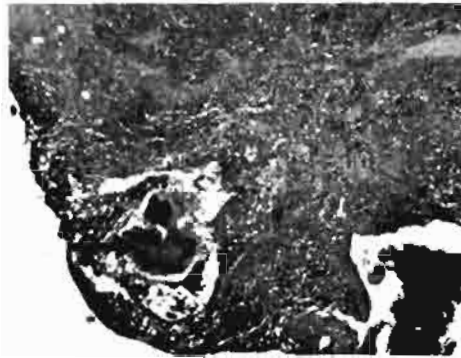


Microfotografía 5. Grano característico de *Actinomadura madurae* teñido con Hematoxilina-eosina. (10x)

La presencia de las interleucinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en lesiones de micetomas por *Actinomadura madurae* se presentan en las microfotografías 6 y 7 en las que se puede observar la marca con anti-IL-1 $\beta$  y anti TNF- $\alpha$  en el grano característico de *Actinomadura madurae* y zona adyacente.



Microfotografía 6. Micetoma por *Actinomadura madurae* marcado con anti IL-1 $\beta$ . (10x)



Microfotografía 7. Micetoma por *Actinomadura madurae* marcado con anti TNF- $\alpha$ . (10x)

### Micetoma por *Madurella*

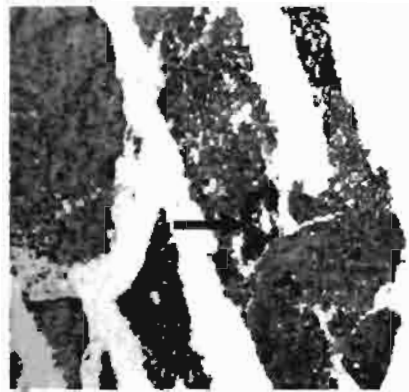
En las microfotografías 8,9 y 10 se muestra el estudio del micetoma por *Madurella* mostrándose primero el grano teñido con hematoxilina-eosina, posteriormente revelado por IL-1 $\beta$  y por último el revelado para TNF- $\alpha$ .

En la microfotografía 8 se muestra el corte de un eumicetoma por *Madurella* donde se observa un grano de color amarillo-ámbar a café claro como resultado de la tinción.



Microfotografía 8. Hematoxilina y eosina en corte de biopsia por *Madurella* sp. (40x)

En la microfotografía 9 se puede observar la marca con anti-IL-1 $\beta$  en el grano.



Microfotografía 9. Micetoma por *Madurella* sp marcado con anti IL-1 $\beta$ . (10x)

En la microfotografía 10 se observan las células de la epidermis (capa de células espinosas) productoras de TNF- $\alpha$ , en un corte de piel con micetoma por *Madurella*.



Microfotografía 10. Micetoma por *Madurella* sp marcado con anti-TNF- $\alpha$ . (10x)

### **Infeción de monocitos humanos humanos purificados (fagocitosis).**

El dato teórico de valores normales de linfocitos extraídos en sangre completa es de  $20 \times 10^6$  células por cada  $20 \text{ ml}^3$  de acuerdo a los resultados en nuestros ensayos por cada 20 ml de sangre se obtuvo un promedio de  $13 \times 10^6$  células/ml., es decir el 65% de rendimiento, dato relativamente bajo con respecto al teórico, esto puede ser debido a la manipulación de células durante el desarrollo de la técnica, entre otras.

Para lograr la transformación de los monocitos humanos a macrófagos se realizó el estudio para observar ésta y se probó el tiempo de activación y fagocitosis de las células mononucleares.

Se incubaron los monocitos purificados durante 24, 48, 72 y 96 horas y en cada uno de estos tiempos se llevó a cabo la prueba de fagocitosis usando *Candida albicans* y activación de las células mediante la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), llevándose a cabo en cinco repeticiones, obteniéndose los siguientes resultados, la mejor activación de las células ocurrió a las 72 hrs.

Tiempo (hrs)	Fagocitosis (%)	Activación (%)
24	29	31
48	67	64
72	86	86
96	43	54

**TABLA I.** Tiempo de incubación celular, eficiencia en la fagocitosis y activación de las mismas estimuladas con *Candida albicans*. (testigo positivo)

Una vez que se conoció el tiempo ideal en el cual los monocitos presentaron el mejor porcentaje de fagocitosis y activación se procedió a cuantificar la secreción de citocinas por estas células.

### Determinación de citocinas secretadas en sobrenadantes de cultivo

Después de que se encontró el tiempo ideal de incubación para llevar a cabo la fagocitosis se infectaron las células de cada uno de los donantes con *Madurella sp*, *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Candida albicans*; para obtener los sobrenadantes a las 24 hrs post infección.

La determinación de IL-1 $\beta$  secretada, en los sobrenadantes de los cultivos de células mononucleares de donantes normales estimuladas por agentes productores del micetoma y *Candida albicans* por la técnica de ELISA se presenta en la TABLA II.

Micetoma por:	Donador 1 (M) pg/mL	Donador 2 (M) pg/MI	Donador 3 (H) pg/mL	Donador 4 (H) pg/mL
<i>Madurella mycetomatis</i>	135.73	146.64	241.18	239.36
<i>Candida albicans</i>	94.82	81.18	117.54	104.82
<i>Nocardia brasiliensis</i>	157.55	152.09	307.55	314.82
<i>Actinomadura madurae</i>	115.73	114.82	423.0	393.0
Testigo negativo	35.18	29.36	42.09	32.09
Testigo positivo	132.55	150.27	156.64	147.54

**TABLA II.** Concentración de IL-1 $\beta$  secretada por células mononucleares de pacientes normales estimuladas por agentes productores de micetoma.

T(-) Monocitos sin activar

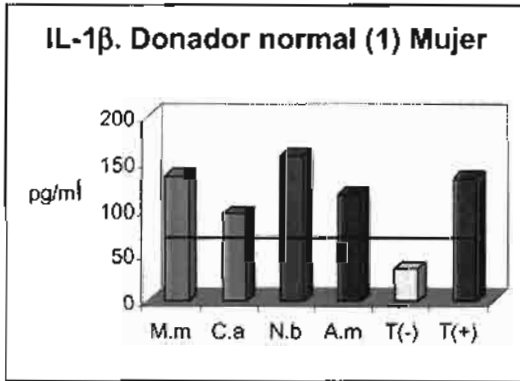
T(+) Monocitos activados con LPS

La concentración de IL-1 encontrada en el medio de cultivo a las 72 horas de incubación celular, después de 24 horas post infección es mayor para

*Actinomyadura madurae* seguida en orden descendiente por *Nocardia brasiliensis*, *Madurella sp* y *Candida albicans*, cuando las células provienen de donadores masculinos, como se muestra en la gráfica 1.5.

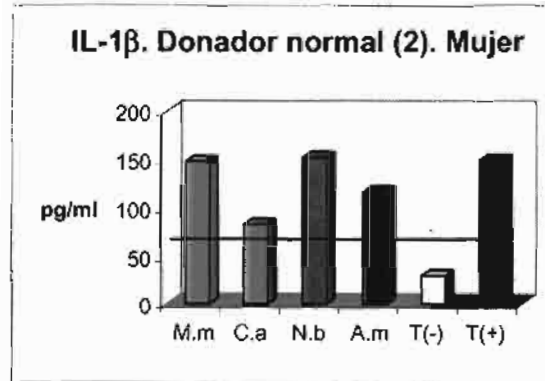
Gráfica 1. Estimulación de la producción de IL-1 $\beta$  *in vitro* por agentes de micetomas en monocitos humanos de personas sanas.

Gráfica 1.1



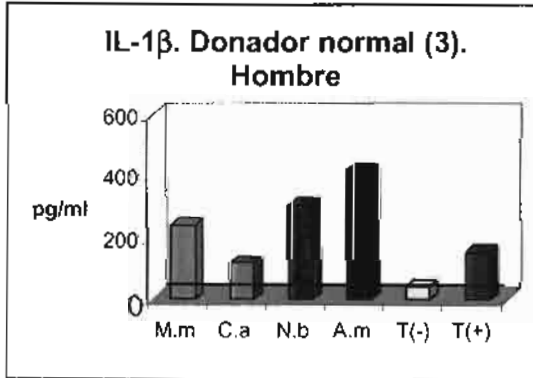
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomyadura madurae*

Gráfica 1.2



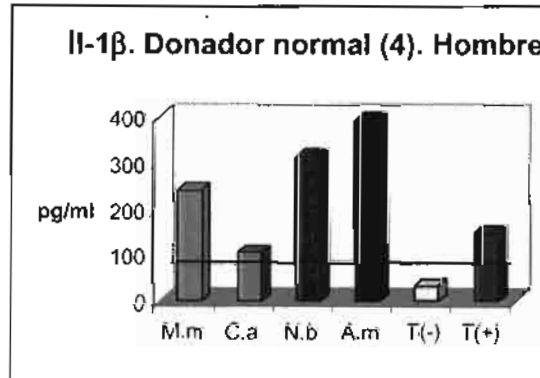
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomyadura madurae*

Gráfica 1.3



T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomyadura madurae*

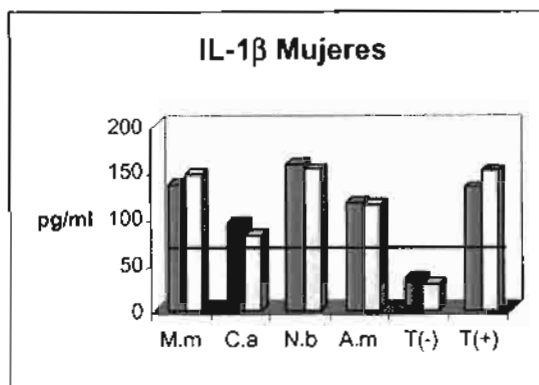
Gráfica 1.4



T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomyadura madurae*

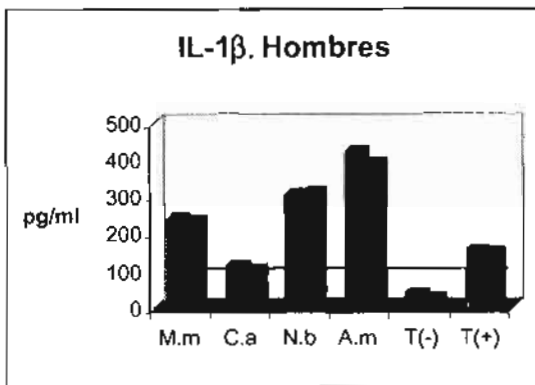


Gráfica 1.5



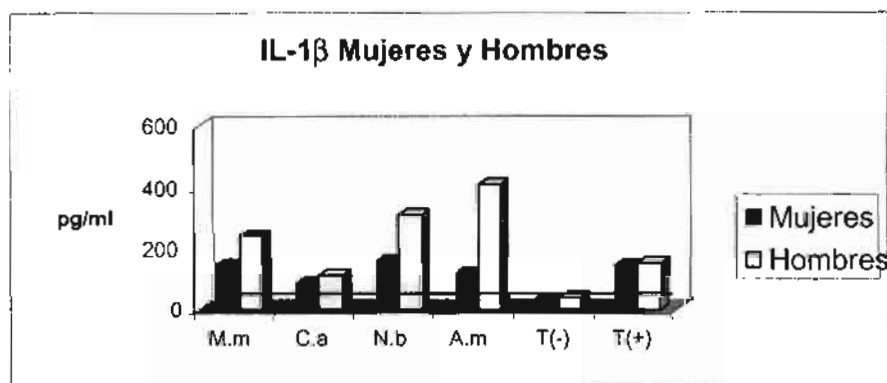
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomadura madurae*

Gráfica 1.6



T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomadura madurae*

Gráfica 1.7



T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomadura madurae*

Para las determinaciones de TNF- $\alpha$  se utilizaron los mismos sobrenadantes que en el estudio anterior, obteniéndose los siguientes resultados: (TABLA III)

Micetoma por:	Donador 1 (M) pg/mL	Donador 2 (M) pg/mL	Donador 3 (H) pg/mL	Donador 4 (H) pg/mL
<i>Madurella mycetomatis</i>	115	125	46	46
<i>Candida albicans</i>	105	90	70	46
<i>Nocardia brasiliensis</i>	52	65	52	52
<i>Actinomadura madurae</i>	115	95	46	38
Testigo negativo	10	15	10	10
Testigo positivo	38	46	46	30

**TABLA III.** Concentración de TNF- $\alpha$  secretada por células mononucleares de individuos sanos estimuladas por agentes productores de micetoma.

T(-) Monocitos sin activar      T(+) Monocitos activados con LPS

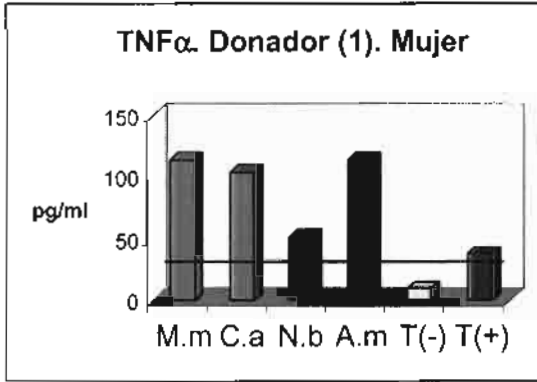
En el caso de los dos primeros donadores (mujeres) se encontraron los mayores títulos comparados con los varones y el microorganismo que más estimuló a estas células en la producción de TNF- $\alpha$  en orden decreciente es: *Madurella sp*, *Actinomadura madurae* y *Candida albicans*, *Nocardia brasiliensis*.

En el caso de los varones el microorganismo que mas estimulo a sus células en la producción de TNF- $\alpha$  en orden decreciente fue: *Candida albicans*, *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella sp*.

Como se muestra en las siguientes gráficas.

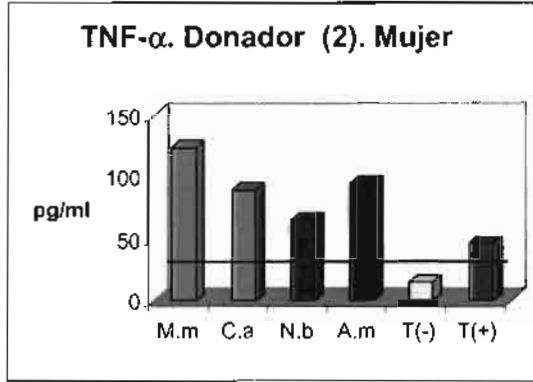
**Gráfica 2.** Estimulación de la producción de TNF- $\alpha$  in Vitro por agentes de micetoma a células mononucleares humanas normales.

Gráfica 2.1



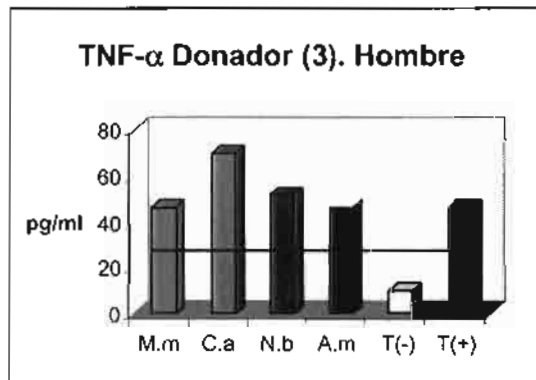
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomadura madurae*

Gráfica 2.2



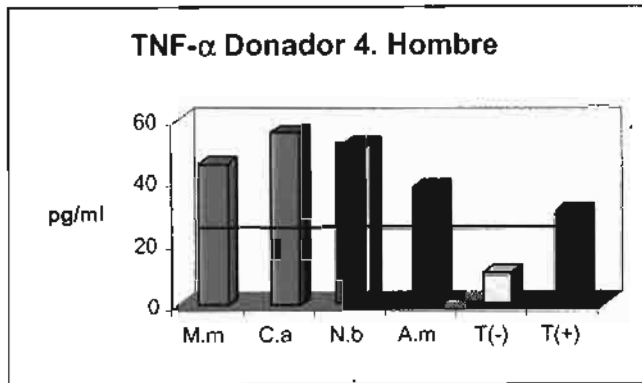
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomadura madurae*

Gráfica 2.3



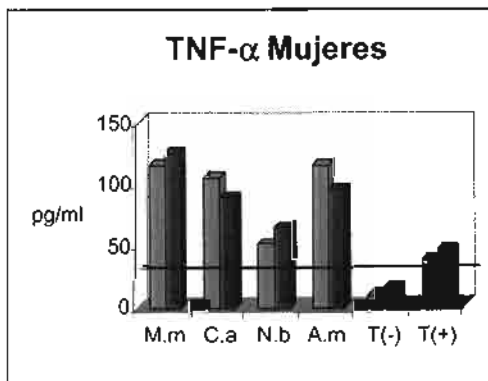
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinomadura madurae*

Gráfica 2.4



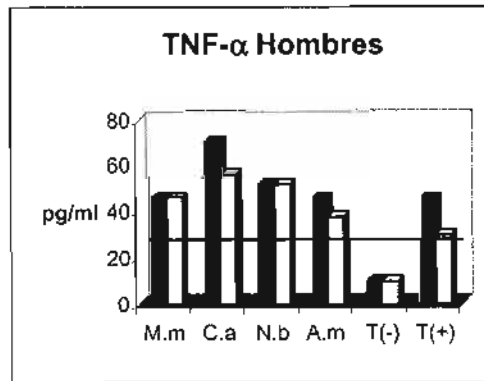
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinoadura madurae*

Gráfica 2.5



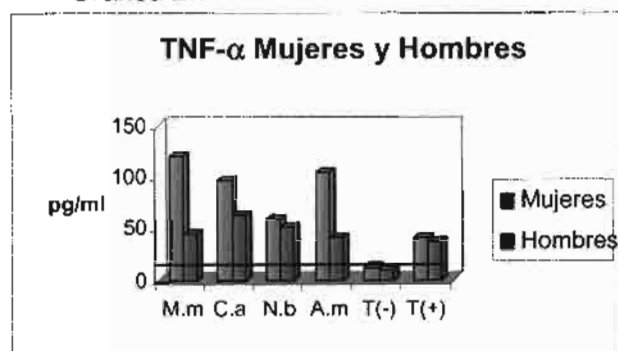
T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinoadura madurae*

Gráfica 2.6



T(+)= Monocitos activados con LPS  
 T(-)= Monocitos sin activar  
 M.m= *Madurella mycetomatis*  
 C.a= *Candida albicans*  
 N.b= *Nocardia brasiliensis*  
 A.m= *Actinoadura madurae*

Gráfica 2.7



T(+)= Monocitos activados con LPS

T(-)= Monocitos sin activar

M.m= *Madurella mycetomatis*

C.a= *Candida albicans*

N.b= *Nocardia brasiliensis*

A.m= *Actinomyces madurae*

Estos últimos resultados se asemejan más a otros estudios realizados por nuestro laboratorio, en donde se encontró que el mayor título de IL-1 $\beta$  en un estudio en ratón Balb/c infectados con *Madurella*, *Candida albicans* fue a las seis semanas de infección siendo más del doble el título encontrado para *Candida albicans* (500 pg/ml) que el encontrado en *Madurella* (250 pg/ml).<sup>42</sup>

Por otra parte en este estudio encontramos títulos más altos de TNF- $\alpha$  en los donadores mujeres que en los donadores hombres.

## DISCUSION

En todos los cultivos de macrófagos se obtuvo activación celular por estos microorganismos, en el caso de las mujeres hay mayor cantidad de IL-1 $\beta$  cuando son estimuladas con *Nocardia brasiliensis* seguido de *Madurella*, *Actinomadura madurae* y *Candida albicans*. La concentración de IL-1 $\beta$  en macrófagos estimulados por estos microorganismos es similar a lo encontrado con el testigo positivo (lipopolisacárido). Para el caso de los hombres las concentraciones de IL-1 $\beta$  de los testigos son similares que en el caso de las mujeres pero cuando estas células se activaron con los microorganismos las concentraciones de IL-1 $\beta$  fueron mucho mayores en comparación con las concentraciones de IL-1 $\beta$  encontrados en las mujeres. Las concentraciones encontradas de esta interleucina en orden descendiente fue *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis*, seguido por *Madurella* y finalmente *Candida albicans*, pero todos activaron ya que dan valores al doble del testigo negativo y cantidades semejantes o mayores al testigo positivo, como lo muestran las gráficas 1.5, 1.6 y 1.7.

La concentración de TNF- $\alpha$  encontrado, en los testigos tanto en hombres como en mujeres fue similar en ambos casos (25pg/ml testigo negativo y 45 pg/ml testigo positivo). En el estudio realizado con macrófagos de donadores femeninos encontramos que todos los microorganismos estimularon la producción de TNF- $\alpha$  en concentraciones de casi el doble de la encontrada en el testigo positivo (LPS) encontrándose aproximadamente la misma concentración cuando se estimuló con *A. madurae*, *C.albicans*, *Madurella* y en menor concentración *N. brasiliensis*.

Por otra parte los macrófagos de hombres no dieron cantidades tan elevadas como en el caso de las mujeres, los valores encontrados cuando estimulamos con los microorganismos se encuentran en un rango entre 50-70 pg/ml y casi el mismo valor que el encontrado cuando se estimuló con LPS, lo que representa un valor casi del doble del testigo negativo. El microorganismo que más estimula

la producción de TNF- $\alpha$  dentro de éste mismo rango son *C. albicans*, *N.brasiliensis* y en valores similares *A. madurae* y *Madurella*.

Cabe hacer notar que hubo producción tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$  por estos macrófagos cuando fueron estimulados con estos microorganismos, dando concentraciones mayores que las encontradas por el testigo positivo, y esta es la razón por la cual al encontrarse la presencia tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$  hay reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el sitio de la infección, y por lo mismo la activación de estas células para tratar de erradicar a los microorganismos infectantes. Nosotros al observar un micetoma en donde tenemos un grano (acúmulo de microorganismos) lo encontramos rodeado en mayor proporción por células polimorfonucleares y macrófagos, esto explica la presencia de estas citocinas, las cuales contribuyen a la estimulación de reacciones inflamatorias locales. En algunos casos como se observa en la microfotografía 5, el grano de *Actinomadura madurae* se segmenta por la infiltración de células inflamatorias activadas tratando de destruir al microorganismo.

Uno de los mecanismos mediante el cual estos microorganismos resisten el ataque por las células fagocíticas es porque se encuentran amalgamados en un cemento constituido por un polisacárido, en el caso de infección por *Actinomadura madurae* es un polisacárido ácido sulfatado, en el caso de *Nocardia brasiliensis* es un lipopolisacárido neutro y en *Madurella* aún no se ha encontrado. Otro mecanismo por el cual, en el caso de la *Nocardia asteroides*, que resiste a la fagocitosis es porque ésta es capaz de producir una superóxido dismutasa que nos transforma al ión superóxido en peróxido de hidrógeno y una catalasa que transforma a este último en agua. Es por esto que en el caso de este microorganismo es posible encontrar una diseminación hematógena.

Es probable que, como el micetoma es una infección crónica, donde hay la presencia en poca cantidad de linfocitos, una de las citocinas que ayudan en el proceso inflamatorio sea el TNF- $\beta$  el cual sería interesante estudiar más adelante.

## CONCLUSIONES

- La presencia de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  nos explica el porque el micetoma esta formado por un grano rodeado por células polimorfonucleares y macrófagos, aunque aparece después de un largo período de infección que es de aproximadamente 5 años.
- En pacientes con micetoma se encontró la presencia tanto de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en todas las biopsias estudiadas (*Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella sp*).
- De los microorganismos estudiados los que mejor activan a los macrófagos *in vitro* en orden decreciente son: *Candida albicans*, *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Madurella sp*.
- Todos los microorganismos estudiados son capaces de activar a los monocitos transformados a macrófagos, ya que se encontraron valores del doble de lo que presentaron las células sin estimular y las estimuladas con lipopolisacarido tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$ .

Por tanto con estos resultados se demuestra la participación de las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) como efectoras del proceso infeccioso *in vivo* e *in vitro*.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magaña, M. 1984. Mycetoma. *Int. J. Derm.* 23: 221-236.
2. Guimaraes C, Castro L, Sotto M. 2003. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop.* 87: 377-384.
3. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología Celular y Molecular*, 4ª ed. España: Mc Graw Hill Interamericana, 2003.
4. Carter H. *On mycetoma or the fungus disease of India*, Londres: J&A Churchill, 1874.
5. Mahgoub E, Murray I. *Mycetoma*, Londres: William Heinemann Medical Books, 1973.
6. Godfrey J. 1846. Diseases of the foot not hitherto described. *Lancet.* 1:593-594.
7. Destombes P. 1964. Structure histologique des mycetomes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 44:897-908.
8. Lavalley P, Millan J. 1949. Estudio clínico y micológico de un micetoma de la mano. *Prensa Med. Mex.* 14:106-107.
9. Carter H. 1860. On a new striking form of fungus disease principally affecting the foot and prevailing endemically in many parts of India. *Tans. Med. Phys. Soc. Bombay.* 6:104-142.
10. Bout G, Lavalley P, Mariat F, et al. 1987. Etude epidemiologic des mycétomes au Mexique a propos de 502 cas. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* 80 :329-339.
11. Desai S, Pardovani D, Sreedevi N, et al. 1970. Studies on Mycetoma Indian. *Jour of Surg.* 32 :427-447.
12. Andleigh H. 1966. Mycetoma foot. *Indian J. Dermatol.* 11:45-47.
13. Brupt B. 1905. Les mycetomes humaines. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 58:997-999.
14. Hay R, Mackenzie D. 1982. The histopathological features of pale grain eumycetoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76:839-844.

15. Lavallo P. 1966. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gac. Med. Mex. 96: 377-384
16. González O. 1975. Mycetoma in: clinical tropical dermatology. Ed. Cañizares O. Oxford, Blackwell Scientific; 24-29.
17. Latapí F, Das mycetom. Die Pilzkrankheiten der Haut durch Helen. 1963. Schimmel Aktinomyceten and Verwan die Erreger. Hunbuch der Haut and Gechlechskrankheiten. Jadassohn IV/4. Deutschland. Springer-Verlag.
18. López M, Mendez T, Lavallo P. 1992. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gac. Med. Mex. 128: 477-481.
19. Linch J, Raphael S, Mellor D, et al. 1994. Técnicas histológicas: métodos de laboratorio. 2ª ed. Ed. Interamericana.
20. Lavallo P. 2000. Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. Rev. Centro Dermatológico Pascua. 9 :19-24.
21. Fahal A, Hassan A, Abella A, et al. 1998. Cystic mycetoma: An unusual clinical presentation *Madurella mycetomatis*. Transaction of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 92: 66-67.
22. Ahmed A, Fahal A, Abugroun E, et al. 1998. Unexpected high prevalence of secondary bacterial infection in mycetoma. Journal of Clinical Microbiology. 36:850-851.
23. Hay R, Mackenzie D. 1982. The histopathological features of pale grain eumycetoma. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:839-844.
24. Mahgoub E, Hay R, Mahgoub E, et al. 1992. Mycetoma. Journal. Med. Veterinari. Mycology. 30:41-49.
25. López R, Méndez T, Lavallo P. 1992. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gac. Med. Méx. 128: 477-481.
26. Hassan A, Mahgoub E, El Hag I, et al. 1994. The pathology of mycetoma: Light microscopic and ultrastructural features. Sudan Medical Journal. 32: 23-54.
27. Palma R, Castrillón R, Padilla D, Reyes F. 2005, Caracterización histoquímica de micetomas por *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis*. Dermatol Rev Mex 49: 51-58.

28. Grocott R. 1955. A Stain for fungi in tissue section and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technique. *Am. J. Clin. Pathol.* 17:975-979.
29. Cormack D. 1987. La histología y sus métodos de estudio. En: *Histología de HAM*. 9ª.ed. Editorial HARLA:1-28.
30. Spannhof L. *Hidratos de carbono: Histoquímica práctica*, Gustav Fisher Verlag Jena, 1964.
31. Gurr E. *Synthetic dyes in Biology: Medicine and Chemistry*, New York: Academic Press, 1971.
32. Carswell E, Old L, Kassel R, et al. 1975. An Endotoxin-Induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Science.* 72 (9): 3666-3670.
33. Murray J, Barbara J, Dunkley, S, et al. 1997. Regulation of Neutrophil Apoptosis by Tumor Necrosis Factor-Alpha: Requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for Induction of Apoptosis In Vitro. *Blood.* 90 (7): 2772-2783.
34. Tracey K, Cerami A. 1990. Metabolic Response to Cachectin/TNF. *Annals of the New York Academy of Sciences: Vol. 587*. Eds. Boland, B. Cullinan, J., Kimball, C. New York: New York Academy of Sciences. 325-330.
35. Janeway C, Travers P, Walport M, et al. 1999. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York, New York: Garland Publishers.
36. Rink L, Kirchner H. 1996. Recent Progress in the Tumor Necrosis Factor-Alpha Field. *International Archives of Allergy and Immunology.* 111(3):199-209.
37. Tracey K, Cerami A. 1994. Tumor Necrosis Factor: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Annual Review of Medicine.* 45: 491-503.
38. Beutler B, Greenwald D, Hulmes, J, et al. 1985. Identity of Tumour Necrosis Factor and the Macrophage-Secreted Factor Cachectin. *Nature.* 316 (8): 552-554.
39. Atkins E. 1960. The pathogenesis of fever. *Physiol. Rev.* 40:580-646.

40. Ikejima T, Orencole S, Warner S, et al. 1987. TSST-1 resistance in mice is related to interleukin-1 production., J. Leukocyte Biol. 42: 561-565.
41. Fenton M, Clark B, Collins K, et al. 1987. Transcriptional regulation of the human prointerleukin-1-beta gene. J. Immunol. 138: 3972-3979.
42. Rosaura Calzada León. 2006. Tesis profesional para el título de Químico Farmacéutico Biólogo UAM-X. "Determinación de IL-1 $\beta$  murino en infecciones in vivo e in Vitro por *Madurella mycetomatis*. 20-25.

## GLOSARIO

- IL-1 $\beta$ . Interleucina 1beta.
- TNF- $\alpha$ . Factor de necrosis tumoral alfa.
- T CD4+. Linfocito T CD4+.
- T CD8+. Linfocito T CD8+.
- IL-12. Interleucina 12.
- IFN $\gamma$ . Interferón gamma.
- T<sub>H</sub>1. Subpoblación funcional de células T cooperadoras.
- T<sub>H</sub>2. Subpoblación de células T cooperadoras.
- ELISA. Análisis de inmonoabsorción ligado a enzimas.
- ROI. Intermediarios reactivos de oxígeno.
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Radical superóxido.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido de hidrógeno.
- OH<sup>-</sup>. Radical hidroxilo.
- NO. Oxido nítrico.
- APC. Célula presentadora de antígeno.
- MHC. Complejo principal de histocompatibilidad.
- MHC-I. Complejo principal de histocompatibilidad de clase I.
- MHC-II. Complejo principal de histocompatibilidad de clase II.
- HE. Hematoxilina-eosina.
- PAS. Ácido peryódico de Schiff.
- DDS. Diamino difenil sulfona.
- TGF. Factor de crecimiento transformante.
- CSF. Factor estimulante de colonias.
- G-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos.
- M-CSF. Factor estimulante de colonias de monocitos.
- LPS. Lipopolisacárido.
- BCG. Bacilo de Calmette-Guérin.
- TNF- $\beta$ . Factor de necrosis tumoral beta.
- LB. Linfocito B.

NK. Células citocidas naturales.  
ARN<sub>m</sub>. Ácido ribonucleico mensajero.  
PGE. Prostaglandina E.  
LT. Leucotrienos.  
IL-12. Interleucina 12.  
PBS. Solución amortiguadora de fosfatos.  
AEC. 3-amino-9-etilcarbazol.  
MACS. Magnetic cell sorting.  
FcR. Receptor para fracción Fc.  
Fc. Fracción cristalizable de las inmunoglobulinas.  
SSI. Solución salina isotónica.  
UFC. Unidades formadoras de colonias.  
NBT. Nitroazul de tetrazolio.  
PMN. Leucocito polimorfonuclear.  
HSS-HRP. Streptavidina-peroxidasa de rábano.