



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Proyecto de investigación

**Estudio de la expresión de los receptores tipo-Toll (TLR2, TLR4 y TLR6),  
y la cuantificación de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,  
MCP-1 e IL-6) en queratinocitos humanos (HaCaT), activados con  
*Nocardia brasiliensis*.**

Línea de investigación:

Diseño y Producción de Biológicos

Comunicación idónea de resultados para obtener el grado de Maestra en  
Ciencias Farmacéuticas.

Presenta

Sánchez Hernández Gisela Monserrat

2141800626

Comité Tutorial:

M. en C. Alejandro Palma Ramos  
Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez  
Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

**Enero 2016**



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

**Estudio de la expresión de los receptores tipo-Toll (TLR2, TLR4 y TLR6),  
y la cuantificación de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,  
MCP-1 e IL-6) en queratinocitos humanos (HaCaT), activados con  
*Nocardia brasiliensis*.**

Comité Tutoral:

M. en C. Alejandro Palma Ramos

\_\_\_\_\_

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

\_\_\_\_\_

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

\_\_\_\_\_

Q. F. B. Sánchez Hernández Gisela Monserrat  
No. de matrícula 2141800626

\_\_\_\_\_



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

**Estudio de la expresión de los receptores tipo-Toll (TLR2, TLR4 y TLR6),  
y la cuantificación de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,  
MCP-1 e IL-6) en queratinocitos humanos (HaCaT), activados con  
*Nocardia brasiliensis*.**

Jurado

Presidente: Dr. Julieta Luna Herrera \_\_\_\_\_

Vocal: Dra. María Eugenia Castro Mussot \_\_\_\_\_

Secretario: M. en C. Alejandro Palma Ramos \_\_\_\_\_

## Resumen

El actinomicetoma es una enfermedad infecciosa crónica, progresiva de la piel y tejido subcutáneo de tipo inflamatorio, caracterizadas por edema, deformidad de la región, nódulos eritematosos y fistulas que drenan material filante o seropurulento. *Nocardia brasiliensis* es uno de los principales agentes causales de esta infección que a su entrada activa la respuesta inmune innata y posteriormente genera granos en la región infectada.

En el presente trabajo se evaluó mediante un modelo *in vitro* la activación de queratinocitos y la sobreexpresión de sus receptores (TLR-2, TLR-4, TLR-6) frente a una infección por *Nocardia brasiliensis* y en consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, MCP-1) capaces de participar en una respuesta inmune contra el actinomicetoma. De esta manera, se analizó la participación de los queratinocitos como células inmunológicamente activas en el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Se realizaron cultivos de queratinocitos HaCaT en monocapas de 400 mil células las cuales se infectaron con una suspensión bacteriana de *Nocardia brasiliensis* en fase exponencial (MOI 10:1) siguiendo una cinética de 0, 2, 6, 24, 48 y 72 h post-infección y a partir de ellas con el medio se realizó la cuantificación de citocinas por la técnica de ELISA. Con las células lisadas se extrajo mRNA para hacer determinaciones por PCR tiempo real.

Se obtuvieron monocapas de células HaCaT con 40 mil células para cada tiempo de infección con cubreobjetos estériles, paralelamente y para tener un control positivo de la expresión de TLRs, se estimularon monocapas de células HaCaT con PMA (forbol- miristato-acetato); todo ello para hacer una determinación con microscopía confocal.

Los resultados mostraron que los queratinocitos humanos infectados con *Nocardia brasiliensis* contribuyen con la generación de un ambiente proinflamatorio caracterizado por la presencia principalmente de IL-8 y MCP-1 así como de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en menor cantidad.

En este estudio se realizó la evaluación de tres receptores tipo Toll, TLR2, TLR4 y TLR6, los queratinocitos humanos expresan de manera constitutiva los tres receptores, sin embargo cuando las células fueron infectadas con *N. brasiliensis* se observó una sobreexpresión de los receptores TLR4 y TLR6, de

los cuales la expresión de TLR4 fue en mayor proporción, lo cual quedó demostrado con los experimentos de qPCR y microscopía confocal. Respecto al TLR2 no encontramos diferencias en los niveles de expresión a lo largo de la cinética de infección.

Por lo anterior se concluye que los queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis* son células que contribuyen a la generación de un ambiente proinflamatorio por la producción de IL6 y TNF  $\alpha$ , aunado a esto también generan moléculas quimiotácticas como MCP1 e IL8 las cuales podrían contribuir al reclutamiento de neutrófilos y monocitos.

## **Agradecimientos Institucionales**

**Agradezco:**



**A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y a la coordinación y profesores del programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas.**



**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca para la realización de mis estudios de posgrado.**



**A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por su apoyo para la realización del análisis por microscopía confocal.**

## **Agradecimientos**

La presente tesis es un esfuerzo conjunto de diversas personas que directa o indirectamente participaron en ella opinando, leyendo, corrigiendo, compartiendo o consiguiendo algún reactivo, material o equipo; dando ánimo, acompañando en los momentos difíciles y en los momentos de felicidad.

Agradezco a mi comité tutorial al M en C Alejandro Palma, al Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez y a la Dra. Laura Castrillón, por haber dirigido este trabajo, por haber confiado en mí, por su apoyo incondicional, paciencia, los consejos y el ánimo en todo el proceso de elaboración de esta Tesis.

Gracias también a mis queridos amigos y compañeros, que estuvieron conmigo desde el inicio en los buenos, malos y los peores momentos que pese a toda incertidumbre, me han apoyaron incondicionalmente.

Agradezco también a mi familia por mi oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de esta gran meta.

Agradezco a Dios porque de alguna forma cuando las cosas parecen perdidas coloca a las personas correctas para seguir adelante.

Gracias

## Índice

	Pág.
<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>3</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>6</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>9</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>10</b>
3.1 Actinomicetos	10
3.1.1 <i>Nocardia</i>	10
3.1.2 <i>Nocardia brasiliensis</i>	11
3.2. Micetoma	12
3.3. Estructura y función de la piel	13
3.4. Respuesta inmune innata de la piel	16
3.4.1. Receptores tipo Toll	18
3.5. Los queratinocitos humanos como células participantes de la respuesta innata	22
<b>4. Planteamiento del problema</b>	<b>23</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>23</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>24</b>
6.1. Objetivo general	24
6.2. Objetivos específicos	24
<b>7. Materiales y métodos</b>	<b>25</b>
a) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.	25
a.1) Tripsinización de células	26
b) Cultivo del microorganismo	26
c) Suspensión bacteriana	27
d) Ensayo de infección celular	27
e) Ensayo de multiplicación intracelular	27
f) Microscopia confocal	28
f.1) Medición de la intensidad media de fluorescencia de los receptores tipo Toll	28
g) RT-qPCR	29



g.1) Expresión de citocinas IL1 $\beta$ , IL8, MCP1, TNF $\alpha$ en queratinocitos humanos infectados por <i>Nocardia brasiliensis</i> .	29
g.2) Expresión de TLRs 2,4 y 6 en queratinocitos humanos infectados por <i>Nocardia brasiliensis</i> .	30
h) Cuantificación de citocinas.	31
i) Interpretación de resultados	31
<b>8. Resultados</b>	<b>32</b>
a) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.	32
b) Cultivo de microorganismo	32
c) Suspensión bacteriana	33
d) Ensayo de infección celular	33
e) Ensayo de multiplicación intracelular	34
f) Receptores tipo Toll	35
f.1) RT-qPCR	35
f.2) Microscopía confocal	37
f.3) Medición de la intensidad media de fluorescencia de los receptores tipo Toll	39
g) Citocinas	41
g.1) RT-qPCR.	41
g.2) Cuantificación de citocinas	44
<b>9. Discusión</b>	<b>52</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>55</b>
<b>11. Perspectivas del proyecto</b>	<b>55</b>
<b>12. Bibliografía</b>	<b>56</b>
<b>13. Anexos</b>	<b>61</b>
Anexo 1 Preparación de buffer fosfato salino (PBS) 1x	61
Anexo 2 Expresión de los receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en el queratinocito humano	62
Anexo 3 Constancia de participación en el XIX Simposium de micología	63
Anexo 4 Constancia de presentación de seminario	64

## Abreviaturas

<i>A. madurae</i>	<i>Actinomadura madurae</i>
BHI	Infusión cerebro corazón
CD	Grupo de diferenciación, por sus siglas en inglés cluster of differentiation
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CLA	Antígeno de linfocito cutáneo, por sus siglas en inglés, Cutaneous Lymphocyte Antigen
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños, por sus siglas en inglés, Damage-associated molecular pattern molecules
DAP	Ácido mesodiaminopimélico, por sus siglas en inglés, Diaminopimelic acid
DMEM	Medio esencial mínimo, por sus siglas en inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium
ETAF	Factor activador de timocitos derivado de células epidérmicas, por sus siglas en inglés, epidermal cell derived thymocyte activating factor
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos, por sus siglas en inglés, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
hBD-2	$\beta$ -defensinas humanas tipo 2, por sus siglas en inglés, Human beta-defensin-2
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1, por sus siglas en inglés, Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico, por sus siglas en inglés, lipoteichoic acid
MAPc	Complejo micoloil-arabinogalactan- peptidoglicano, por sus siglas en inglés, mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex

MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1, por sus siglas en inglés, Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos, por sus siglas en inglés, Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad, acrónimo para el inglés major histocompatibility complex
<i>N. brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
NK	Asesina natural, acrónimo para el inglés Natural killer
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés Pathogen-associated molecular patterns
Pam <sub>3</sub> Cys	N-palmitoil-S-[2,3-bis (palmitoil)-(2RS)- propil]- cisteinil-alanil-glicina
PBS	Buffer fosfato salino, de sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline
PDGF	Factor de crecimiento/diferenciación plaquetario, por su nombre en inglés, platelet derived growth factor
PGN	Peptidoglicano
PMA	Forbol- miristato-acetato
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones, por su nombre en inglés pattern-recognition receptors
qPCR.	PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
T CD8+	Linfocitos T citotóxicos
TGFβ	Factor de crecimiento transformante, abreviatura del inglés transforming growth factor β
TLR	Receptor tipo Toll , por su nombre en inglés, Toll-like receptor
TNFα	Factor de necrosis tumoral α, abreviatura del inglés tumor necrosis factor α

## Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Agentes etiológicos del actinomicetoma y eumicetoma	12
Tabla 2. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).	17
Tabla 3. Receptores tipo Toll en mamíferos	19
Tabla 4. Iniciadores específicos de citocinas	30
Tabla 5. Iniciadores específicos de TLRs	30

## Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Granos característicos de la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> en tejido de almohadilla plantar de ratón con micetoma.	11
Figura 2. Estructura de la piel	14
Figura 3. Cultivo de queratinocitos (Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT).	25
Figura 4. Cultivos celulares de queratinocitos humanos HaCaT en botellas de plástico.	32
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>Nocardia brasiliensis</i> CECT3032.	33
Figura 6. Cultivos de queratinocitos HaCaT observado por medio de microscopio invertido.	34
Figura 7. Curva de replicación intracelular de <i>Nocardia brasiliensis</i> CECT3032	35
Figura 8. Expresión del receptor TLR2 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i>	36
Figura 9. Expresión del receptor TLR4 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i>	36
Figura 10. Expresión del receptor TLR6 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i>	37
Figura 11. Expresión de receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos humanos infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> .	38
Figura 12. Expresión de receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos humanos infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i>	39
Figura 13. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de TLR2 en queratinocitos infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> .	40
Figura 14. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de TLR4 en queratinocitos infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> .	40
Figura 15. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de TLR6 en queratinocitos infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> .	41

Figura 16. Expresión de IL 1 $\beta$ , en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	42
Figura 17. Expresión de TNF $\alpha$ en expresión relativa en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	42
Figura 18. Expresión de IL 8, en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	43
Figura 19. Expresión de MCP-1 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	44
Figura 20. Concentración de TNF $\alpha$ en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	45
Figura 21. Concentración de IL-1 $\beta$ en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	46
Figura 22. Concentración de IL6 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	47
Figura 23. Concentración de MCP1 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	48
Figura 24. Concentración de IL8 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i> .	49
Figura 25. Concentración de citocinas (TNF- $\alpha$ , MCP1, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6) en queratinocitos humanos HaCaT infectados con <i>N. brasiliensis</i>	49

**Estudio de la expresión de los receptores tipo-Toll (TLR2, TLR4 y TLR6), y la cuantificación de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1 e IL-6) en queratinocitos humanos (HaCaT), activados con *Nocardia brasiliensis*.**

## **1. Introducción.**

El actinomicetoma es una enfermedad infecciosa crónica, progresiva de la piel y tejido subcutáneo de tipo inflamatorio causada por bacterias filamentosas (actinomicetos), se caracteriza por presentar edema, deformidad de la región, nódulos eritematosos y fistulas que drenan material filante o seropurulento que contiene microcolonias de los agentes causales en forma de granos[1,2,3], puede afectar fascia, músculo y hueso subyacente; es [4,5,6,7]. En México los actinomicetomas por el género *Nocardia* son la principal causa de las infecciones, de éste la especie *brasiliensis* es la más frecuente, el resto corresponden a *Actinomadura* y *Streptomyces somaliensis* [8,9].

*Nocardia brasiliensis* uno de los principales agentes causales de esta infección que a su entrada al organismo por inoculación traumática activa la respuesta inmune innata, además de que posteriormente cuando la infección ya se encuentra establecida genera granos con forma arriñonada en la región infectada[10, 11, 12,13].

Debido a que el micetoma es un padecimiento de la piel es necesario reconocer los elementos que participan en el reconocimiento y respuesta de este patógeno, de inicio la epidermis humana provee la primera línea de defensa contra patógenos exógenos, en donde los queratinocitos representan la principal población celular estableciendo un medio local de citocinas y quimiocinas necesarias para atraer a otras células que participan en la respuesta inmune contra estos patógenos [14].

En el año 2009 se encontró que en los actinomicetomas por *N. brasiliensis* y por *A. madurae* mostraban una marcada presencia de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en los queratinocitos, quienes juegan diversos papeles en la respuesta inmunitaria contra las infecciones, lo que supone la estimulación de estas células [15].

Esta estimulación depende del reconocimiento de los patógenos por las células de la inmunidad innata, la cual está mediada por receptores de reconocimiento

de patrones (PRRs), que reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [16,17].

Entre las células de la inmunidad innata se encuentran los queratinocitos que al ser estimulados por los microorganismos inducen la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), quimiocinas (IL-8/CXCL8), y péptidos antimicrobianos (hBD-2), tras la activación de los receptores tipo Toll (TLRs)[15].

Los receptores tipo Toll, en humanos, comprenden a una familia de 11 receptores con distintos perfiles de reconocimiento. En los queratinocitos humanos se conoce la expresión de los receptores tipo Toll (TLR), del TLR-1 al TLR-6 y TLR-9 al TLR-10.

En este contexto, TLR-2 es el principal receptor para bacterias Gram positivas, reconociendo a la peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico (LTA) y lipoproteínas bacterianas. A su vez, el TLR-2 puede formar heterodímeros con el TLR-1 (TLR-2/TLR-1) que reconoce a los lipopéptidos tripalmitoilados como el N-palmitoil-S-[2,3-bis (palmitoil)-(2RS)-propil]-cisteinil-alanil-glicina (Pam<sub>3</sub>Cys). Por otra parte, TLR-4 es estimulado por el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, y el TLR-6 interactúa con el TLR-2 (TLR-2/TLR-6) formando un heterodímero que reconoce a los diacil-lipopéptidos, como el ácido lipoteicoico (LTA) [16,17]. Aunque también este mismo receptor (TLR-6) por sí mismo puede reconocer diacil lipopeptidos y de esta forma activarse [18].

En general, se observa en modelos *In vivo* que el reconocimiento de patógenos a través de los TLRs inicia una respuesta inflamatoria caracterizada por el reclutamiento de células inmunes como son los polimorfonucleares neutrófilos en el sitio de la infección para eliminar al patógeno invasor.

En cultivo de queratinocitos humanos se ha observado que, al utilizar *Staphylococcus aureus* atenuado por calor y *Candida albicans* para activar las células, el peptidoglicano induce la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 [16]. El TNF- $\alpha$  no solamente aumenta las propiedades bactericidas de los neutrófilos, sino también promueve la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales por la inducción de la expresión de la selectina E [14,16]. En el presente trabajo se evaluó mediante un modelo *in vitro* la activación de queratinocitos y la



sobreexpresión de sus receptores (TLR-2, TLR-4, TLR-6) frente a una infección por *Nocardia brasiliensis* y en consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, MCP-1) capaces de participar en una respuesta inmune contra el actinomicetoma. De esta manera, se pretende analizar desde el contexto de la respuesta inmune innata la participación de los queratinocitos como células inmunológicamente activas en el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

## 2. Antecedentes

La investigación sobre el actinomicetoma y su relación con la inmunidad de la piel ha sido un tema relevante. Además de que, el destacar la participación de los queratinocitos en este tipo de infección crónica, ha sido crucial para suponer un posible mecanismo en el cual se explique la presencia del tipo celular presente en el sitio de la lesión.

En el laboratorio de Inmunología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco previamente a la realización de este trabajo, se había investigado la presencia de citocinas producidas en el sitio de la lesión, en biopsias de pacientes anteriormente diagnosticados con micetoma (por *N. brasiliensis*, *A. madurae*) proporcionadas por el Departamento de Micología del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua y del Hospital Dr. Manuel Gea González debido a que se había observado, que los queratinocitos participan activamente en la respuesta inmunitaria innata, ya que expresan receptores tipo Toll (TLRs) y son una fuente importante de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, y son capaces de expresar antígenos del MHC de clase I.

Lo anterior derivó en un artículo en el año 2009, en el que se reportó que en los actinomicetomas por *N. brasiliensis* y por *A. madurae*, se mostraban una marcada presencia de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en los queratinocitos, quienes juegan diversos papeles en la respuesta inmunitaria contra las infecciones, lo que suponía la estimulación de estas células [15].

Por otra parte, en el 2011 en un reporte de servicio social del mismo laboratorio pero en el cual el enfoque fue la búsqueda de la presencia de los receptores tipo Toll 2 y 4 en cortes histológicos de lesiones de pacientes con actinomicetomas por *N. brasiliensis*. Se estudió la activación tanto en el grano como en el tejido específicamente en la zona de queratinocitos.

De esta forma se observó que ambos se encontraban presentes en el tejido, sin embargo, era notable el hecho de que de los dos receptores el TLR4 es el que se expresa en mayor concentración, lo que suponía una acción posiblemente relacionada con la atracción celular [19].

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Actinomicetos

Los actinomicetos forman un grupo grande y diverso de bacilos Gram positivos, cuyas células se elongan para dar formas filamentosas, ramificadas. La proporción y la magnitud de la elongación de los filamentos (hifas) con ramificaciones laterales dependen de la cepa, del medio de crecimiento y de la temperatura de incubación. Algunos microorganismos forman filamentos o hifas, en la superficie del agar mientras que otros se proyectan en el aire y pueden ser aerobios, anaerobios facultativos o anaerobios obligados.

Los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordona* y *Tsukamurella* son actinomicetos aerobios parcialmente ácido-alcohol resistentes que pertenecen a la familia *Nocardiaceae* [20].

##### 3.1.1 *Nocardia*

Los microorganismos pertenecientes al género *Nocardia* son Gram positivos, ácido-alcohol resistente variable, catalasa-positivos y aerobios estrictos, que a medida que se desarrollan forman hifas trepadoras e hifas aéreas. Cuando los microorganismos envejecen las *nocardias* se fragmentan en bacilos pleomorfos o elementos cocoides, cuya pared celular se caracteriza por la presencia de ácido mesodiaminopimélico (DAP) así como los azúcares arabinosa y galactosa en su peptidoglicano de la pared celular. De las 11 especies descritas del género *Nocardia* solamente 9 se han considerado como patógenas o que están implicadas en enfermedades del ser humano, a saber: *Nocardia asteroides sensu stricto*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis*, *N. brevicatena*, *N. carnea* y *N. pseudobrasiliensis* [20].

*Nocardia* se ha considerado, por varios autores, como uno de los principales agentes causales de los actinomicetomas e incluso debido a su capacidad para invadir el cerebro de muchos mamíferos, se le considera capaz de causar diversas infecciones en el sistema nervioso de los humanos [21]. Las lesiones que ocurren con mayor frecuencia se presentan en pies, pues *Nocardia* comúnmente se encuentra en el suelo, siendo los trabajadores de campo los más afectados [22].

### 3.1.2 *Nocardia brasiliensis*

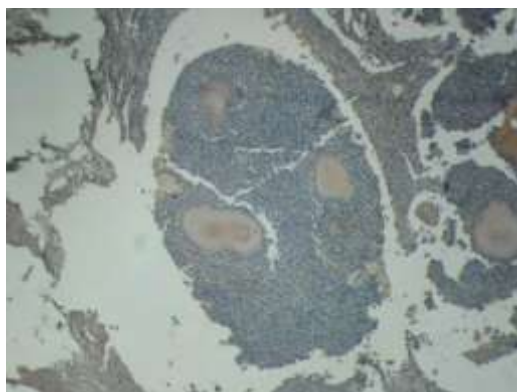
*Nocardia brasiliensis* es una bacteria intracelular facultativa Gram positiva, parcialmente ácido alcohol resistente [12], que vive como un saprófito en el suelo y entra a la piel por inoculación traumática, produciendo inflamación crónica con fistulas y abscesos [5,20]. Forma colonias de aspecto yesoso, blanquecinas o salmonadas con aspecto de “palomitas de maíz”, la tipificación en el caso de *brasiliensis* es con hidrólisis de caseína positiva [9].

Su envoltura celular se caracteriza por tener una cantidad abundante de lípidos con estructuras químicas inusuales, distribuidos en tres componentes principales de la pared celular; a saber la membrana celular, el complejo micoloil-arabinogalactano-peptidoglicana (MAPc) y la capa de la membrana externa.

Los lípidos que integran la capa de la membrana externa son lípidos que contienen trehalosa, glicolípidos, lípidos solubles en dietil éter, ácido tuberculoesteárico, nocobactin y nocardonas [22].

*Nocardia brasiliensis* es considerada como el principal agente etiológico causante de actinomicetomas en México, Sudamérica y África [5,23].

La infección por *Nocardia brasiliensis* muestra en los cortes histológicos de los pacientes y en animales de experimentación un grano característico con forma arriñonada (Figura 1), rodeado de numerosos neutrófilos polimorfonucleares, seguidos de macrófagos, células gigantes y muy pocos linfocitos [20,24]. Sus granos son pequeños miden de 40 a 150  $\mu\text{m}$ , son poli lobulados o vermiformes [9].



**Figura 1. Granos característicos de la infección por *Nocardia brasiliensis*.** Tejido de almohadilla plantar de ratón con micetoma, inmunohistoquímica indirecta para identificar el IFN- $\gamma$ , (10X).

### 3.2. Micetoma

El micetoma es una infección subcutánea crónica de gran importancia en el mundo que afecta principalmente a las poblaciones más pobres y las regiones rurales de África, Latino América y Asia en latitudes definidos como el “cinturón del micetoma”[25], en México toma gran relevancia debido a su frecuencia y la gravedad de algunos casos [26].

Esta infección crónica de la piel, se caracteriza por un aumento de volumen de la lesión relativamente indoloro y fístulas a través de las cuales se elimina pus y granos, constituidos por filamentos. Tiende a afectar a los tejidos subyacentes y a los huesos. Los diversos agentes causales (mostrados en la Tabla 1) son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o actinomicetales (actinomicetoma) [22,26].

**Tabla 1. Agentes etiológicos del actinomicetoma y eumicetoma\***

Actinomicetomas	Eumicetomas
<i>Nocardia brasiliensis</i>	<b>Granos negros</b>
<i>Nocardia asteroides complex</i>	<i>Madurella mycetomatis</i>
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> (Sinónimo de <i>Nocardia caviae</i> )	<i>Trematospheria grisea</i> (Sinónimo de <i>Madurella grisea</i> )
<i>Nocardia spp</i>	<i>Medicopsis romeroi</i> (Sinónimo de <i>Pyrenochaeta romeroi</i> )
<i>Actinomadura madurae</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>
<i>Actinomadura pelletieri</i>	<i>Cladophialophora bantiana</i> (CBS 16363)
<i>Streptomyces somaliensis</i>	<i>Cladophialophora mycetomatis</i> (CBS 122637)
<b>Doble etiología</b>	<b>Granos hialinos (blancos o amarillentos)</b>
<i>N. brasiliensis</i> + <i>N. asteroides s.l.</i>	<i>Scedosporium boydii</i> (sinónimo de <i>Pseudallescheria boydii</i> )
<i>N. brasiliensis</i> + <i>A. madurae</i>	<i>Fusarium solani complex</i> (CBS: 135554)
	<i>Acremonium sp</i>
	<i>Aspergillus nidulans</i>
	<i>Microsporium canis</i>

\*Se describen algunos ejemplos de los agentes etiológicos de los micetomas, específicamente los que presentan mayor relevancia en México, sin embargo; han sido reportados una amplia variedad de agentes causales tanto para actinomicetomas como para eumicetomas. Tomado y modificado de [25]

Afecta generalmente la extremidad inferior y de éstas el pie, ya que se trata de áreas expuestas directamente a la infección en 70 a 75% de los casos pero puede aparecer en cualquier región del cuerpo [13].

Su evolución es crónica y asintomática durante los primeros meses de aparición, que fue el resultado de una implantación traumática de microorganismos del suelo en el tejido subcutáneo [13,25].

La prevalencia del micetoma es principalmente en las cercanías del Trópico de Cáncer [25] por ello no es de sorprenderse que México sea el país latinoamericano que registra el mayor número de casos de micetoma reportados, además de que en él, el tipo de micetoma tiene una distribución mayor para los de actinomicetoma (96.52%) mientras que para el eumicetoma es de 3.48% [26,27].

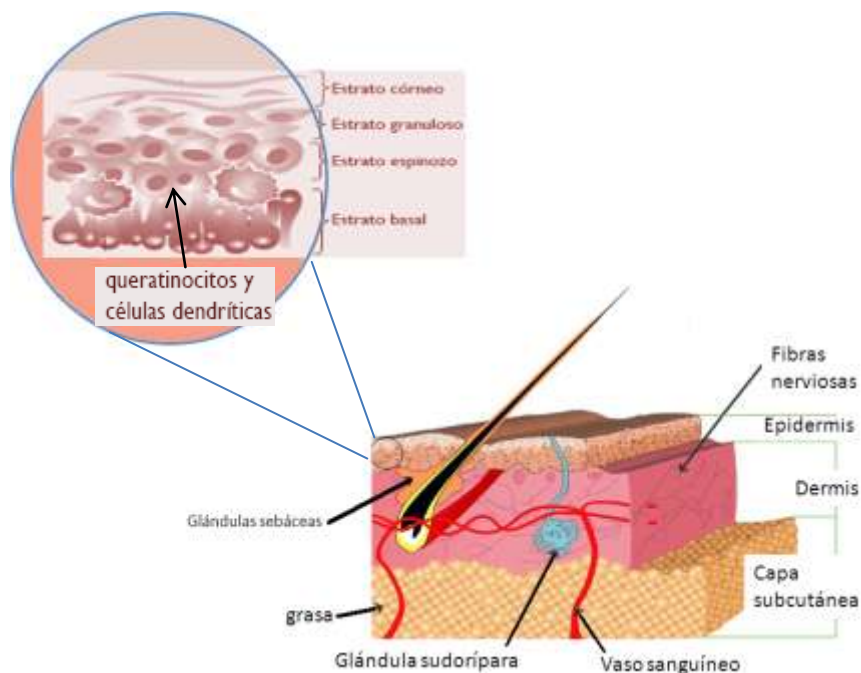
Otro aspecto importante es que se ha descrito que en México los actinomicetomas por el género *Nocardia* causan el 86.5% de las infecciones, de éste la especie *brasiliensis* es la más frecuente con un 65.58% de los casos, el resto corresponde a *Actinomadura* con un 10% del cual *Actinomadura madurae* representa un 7.93%) y *Streptomyces somaliensis* (1.3%) [8, 9, 22,26].

### 3.3. Estructura y función de la piel

Estrictamente la piel es un órgano dinámico formado por diferentes tipos celulares que desempeñan diversos procesos biosintéticos e inmunológicos, entre estos últimos se encuentran los mecanismos de resistencia innata y adaptativa, que se activan cuando existen agresiones al tejido [14]. Algunos autores la definen como una barrera primaria que protege al cuerpo de los microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente o incluso como la interfase que protege el interior del cuerpo de los patógenos externos actuando como uno de los mecanismos protectores más importantes [28, 29].

Representa el 15% del peso corporal y cubre aproximadamente 1,7 m<sup>2</sup> en el adulto promedio.

Se compone por dos capas principales: la epidermis y la dermis. La epidermis es el compartimiento exterior caracterizado por ser un epitelio plano poli-estratificado y queratinizado compuesto de cuatro estratos (Figura 2) [28, 30,31].



**Figura 2. Estructura de la piel.** Se observan tres capas; las dos capas principales: dermis con vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas, raíz de los pelos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas. Así como la epidermis, la capa externa de la piel que muestra en la ampliación los cuatro estratos que la componen (estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal). Como última capa se encuentra la hipodermis o capa subcutánea rica en tejido graso, que al tener una textura blanda actúa como protección de los órganos del cuerpo que hay por debajo. Tomado y modificado de [32].

El estrato basal es la última capa de la epidermis y es la responsable del constante recambio de las células de la epidermis. Esta capa contiene solo un grupo de células epidérmicas sin diferenciar, conocidos como queratinocitos basales.

Los queratinocitos basales se diferencian y se mueven a la siguiente capa (el estrato espinoso también conocido como la capa de células espinosas) donde inicia el proceso de maduración y se divide para reponer la capa basal. Esto explica que la piel se encuentra en cambio constante debido a la migración de los queratinocitos desde la capa basal hasta la capa córnea [28,30]. Las células que se mueven en el estrato espinoso cambian desde ser una forma columnar a una poligonal e inician la síntesis de queratina distinta de la capa de queratina basal. Los queratinocitos en el estrato granuloso son caracterizados

por acumulaciones oscuras de material citoplasmático y estas células producen activamente, proteínas de queratina y lípidos. El estrato corneo, como el último producto de maduración de los queratinocitos es la capa más externa de los cuatro estratos de la epidermis, es la única que no se encuentra en otros epitelios y es altamente responsable de la función de barrera de la piel. Las células en esta capa conocidas como corneocitos son células derivadas de queratinocitos muertos que carecen de organelos [31] y que contienen redes de fibrinas y queratina [28,33].

Entre las células especializadas de la epidermis se incluyen a los melanocitos y células de Langerhans. Además en el estrato basal y el estrato espinoso se pueden encontrar células T, principalmente células de la estirpe TCD8 [31].

Enseguida de la epidermis se encuentra la dermis que contiene estromas de fibrina compuestas de fibras de colágeno y elastina.

Como se puede observar tanto en la dermis como en la epidermis humanas existen muchos tipos diferentes de células inmunes que incluyen queratinocitos, células de Langerhans, macrófagos, células mieloides, células dendríticas, mastocitos, linfocitos T y B, células plasmáticas y células NK. Además la piel se complementa con apéndices como las glándulas sudoríparas (endocrinas y apocrinas), glándulas sebáceas y los folículos pilosos, los cuales se extienden a través de la dermis y la epidermis para abrirse a la superficie de la piel [28, 31,33].

Aunque la función principal de la piel radica en el recubrimiento; pues se encuentra continuamente expuesta al estrés ambiental (incluyendo la radiación solar; daños físicos, químicos, biológicos así como a estímulos antigénicos), es claro que esta, como órgano protector, tiene una importancia mayor debido a su capacidad de responder mediante complejas actividades biológicas, bioquímicas y químicas que pueden ser reguladas por el aparato neuroendocrino y el sistema inmune [34]. De esta forma la piel, componente integral del sistema inmune, se le puede considerar como una primera línea de defensa inmunológica [35] compuesta por diversos tipos celulares, los cuales respaldan la importancia de la respuesta inmunológica en la piel, además de otros hechos como el que el brazo efector de la respuesta inmunitaria ocurre en los órganos linfoides secundarios y no en la sangre, o que el sistema



inmunitario periférico se distingue por una dinámica comunicación entre los epitelios y los órganos linfoides secundarios [14].

#### 3.4. Respuesta inmune innata de la piel

La respuesta inmune a una infección es iniciada por receptores mediante productos microbianos de reconocimiento de la respuesta inmune innata [17]. Esta es filogenéticamente más antigua que la inmunidad adquirida y ha evolucionado para brindar protección contra bacterias, virus y parásitos, haciéndose de esta forma más efectiva y compleja [36]. Se considera la primera línea de defensa que tiene el organismo desde su nacimiento [14] y fue alguna vez considerado como una respuesta proinflamatoria no específica [28] sin embargo, se ha observado que puede distinguir efectivamente lo propio de lo extraño y activar mecanismos inmunitarios para la generación de señales específicas y así estimular la respuesta inmunitaria adaptativa [36].

La inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa se realiza por las células dendríticas (Langerhans) ubicadas en la epidermis y encargadas de la captación, el procesamiento y la presentación de los antígenos a los linfocitos en los ganglios linfáticos locales. Como resultado de este proceso, se sensibilizan los linfocitos T, los cuales expresan la molécula antígeno de linfocito cutáneo (CLA), que les permite unirse a la selectina E de los endotelios, penetrar hasta la epidermis y residir como linfocito T de memoria para desencadenar respuestas inflamatorias, una vez que son activados por las células presentadoras de antígeno[14].

La respuesta inmune innata carece de memoria inmunológica; se compone de barreras físicas, entre las que están piel y las mucosas, tanto del sistema respiratorio, gastrointestinal y genitourinario [36]. Por otra parte también la integran células que se activan luego del reconocimiento de patógenos [14,36]. Tal es el caso de las células de la epidermis (queratinocitos, de Langerhans, melanocitos, linfocitos T y NK) en las cuales existen sistemas de reconocimiento para los microorganismos que pueden dispararse y producir o activar varios agentes anti-infecciosos, como los factores de complemento de las vías clásica y alterna, los péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e histatinas), las citocinas, las quimiocinas y las especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico (NO) [14].

De esta forma parte esencial de la respuesta inmune innata son los receptores que, como sistemas de reconocimiento, son capaces de identificar a los microorganismos invasores e inician la reacción de defensa del huésped. Así en las células de la inmunidad innata se expresan una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés *pattern recognition receptors*), como los receptores tipo Toll y los receptores de manosa que son activados por componentes de los microorganismos patógenos. Estos PRRs son específicos para patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés, *pathogen associated molecular patterns*) que son relativamente invariantes dentro de la clase de microorganismo dado (Tabla 2) [17].

**Tabla 2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)**

Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)*	Localización
Lipopolisacárido (LPS)	Bacterias Gram negativas
Manano	En pared celular de levaduras
Zimosán	
Lipoarabinomanano (LAM)	Componente de la pared celular de micobacterias
Peptidoglicano	Bacterias Gram positivas
Ácido lipoteicoico (LTA)	
*Se describen algunos PAMPs ampliamente estudiados, sin embargo; existen otros lipopéptidos de diversos microorganismos capaces de inducir una respuesta por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Tomado y modificado de [17]	

Por ejemplo, los queratinocitos que son la mayor población celular de la epidermis expresan moléculas de adhesión que regulan el movimiento de células a través de la piel, también expresan moléculas MHC I y MHC II así como moléculas de adhesión ICAM-1 que facilitan el reclutamiento y permanencia de células inmunitarias en piel inflamada [14,37]. Por otra parte se ha encontrado que son capaces de expresar, de manera constitutiva o inducible TLRs, así como receptores de unión a Manosa [17] de estos dos

ejemplos de moléculas de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); se ha demostrado que en ellos se expresan los receptores TLR1 al TLR6 y el TLR9. La expresión de estos receptores permite la producción de mediadores proinflamatorios como citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-12, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), TGF $\beta$  (factor de crecimiento transformante), M-CSF (factor estimulante de colonias de monocitos), PDGF (factor de crecimiento/diferenciación plaquetario), ETAF (factor activador de timocitos derivado de células epidérmicas), TNF $\alpha$ , quimiocinas (IL-8) y péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas, RNasa7, antileucoproteasas (ALP, por su nombre en inglés antileukoprotease)) [14, 17, 37].

De esta forma como se puede observar la respuesta inmune innata en la piel sirve no sólo para eliminar infecciones seguidas de un daño, sino también para mantener la homeostasis e integridad funcional y puede estar activa en la restauración de la estructura de los tejidos dañados [37].

#### 3.4.1. Receptores tipo Toll (TLRs)

Los TLR son proteínas transmembranales de tipo I que incluyen múltiples copias de LRR (repeticiones ricas en leucina, del inglés *leucine-rich repeats*) en el dominio extracelular y un dominio de señalización intracelular compartido por los receptores Toll y los receptores de la IL-1 llamado TIR (toll/interleukin-1 receptor) [38]. Esta familia molecular se asocia estrechamente con la respuesta inmune innata [39] e incluso con la adaptativa reconociendo múltiples patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los receptores tipo Toll (TLRs), no solo reconocen PAMPs, sino también detectan señales de daño endógeno o daño asociado a patrones moleculares (DAMPs) que son liberadas por tejidos o células dañadas o estresadas [37].

En mamíferos trece TLRs han mostrado reconocer patrones moleculares asociados a patógenos conservados (Tabla 3), tales como peptidoglicanos, lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias Gram positivas, lipopéptidos de *Micoplasma* y zimósán de hongos; todos ellos han sido identificados como ligandos de TLR2 y TLR4. TLR4 acoplado a MD-2 y a CD14 reconoce lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas [39].

**Tabla 3. Receptores tipo Toll en mamíferos**

Receptor	Expresión (mRNA)	Ligando	Origen del ligando
<b>TLR1 (con TLR2)</b>	M, N, LB, NK, CDi, CDpl	Lipopéptidos triacilados (Pam3Cys)	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
<b>TLR2</b>	PMN, M, CD, CDi	Lipoproteínas lipopéptidos Peptidoglicano (PG) Ácido lipoteicoico (LTA) Lipoarabidomanano Modulina soluble en fenol Glicoinositolfosfolípidos Glicolípidos Porinas Lipopolisacárido atípico Lipopolisacárido atípico Zimosán	y Varios patógenos Bacterias Gram + Bacterias Gram + Micobacteria <i>S. epidermidis</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonoa gingivalis</i> Hongos
<b>TLR3</b>	CD, CDi	RNA viral de doble cadena Poli(I:C)	Virus Sintético
<b>TLR4</b>	C.End, N, CD	M, Lipopolisacárido (LPS) Proteína de fusión Proteína de la envoltura HSP60	Bacterias Gram – Virus Sincitial respiratorio Virus de tumor mamario <i>Chlamydia pneumoniae</i>
<b>TLR5</b>	M, CD, CDi	Flagelina	Bacterias
<b>TLR6 (con TLR2)</b>	M, CDpl	CDi, Lipopéptidos diacilados (Pam2Cys) LTA Zimosán	Micoplasma Bacterias Gram + Hongos
<b>TLR7</b>	CDpl	Imidazoquinolina ss RNA	Compuesto sintético Virus
<b>TLR8</b>	M, CDi	Imidazoquinolina ss RNA	Compuesto sintético Virus
<b>TLR9</b>	M, CDpl	DNA con motivos CpG	Bacterias y virus
<b>TLR10</b>	CDi	ND	ND
<b>TLR11</b>	Epitelio renal*	ND	Bacterias uropatogénicas

**M: monocito; N: neutrófilo; CD: célula dendrítica, CDi: CD inmadura; CDpl: CD plasmocitoide; C.End: célula endotelial; NK: Natural killer. \* Murino. En humanos se expresa una forma truncada de la proteína. (Tomado de [39])**

En humanos los receptores tipo Toll comprenden a una familia de 11 receptores con distintos perfiles de reconocimiento [16,17, 40]. Basados en la estructura genómica de los genes de TLR humanos y en comparación con las secuencias de aminoácidos, la familia de TLR humanos puede ser dividida en cinco subfamilias, a saber; TLR2, compuesta por TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10. Las subfamilias TLR3, TLR4, TLR5 y por último la subfamilia TLR9, compuesta por TLR7, TLR8 y TLR9 [17].

El reconocimiento de patrones moleculares comunes por TLRs desencadena rápidamente vías de señalización intracelulares que activan la familia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, por medio de este inducen la activación de genes pronflamatorios en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B y T, células epiteliales y fibroblastos [39].

De igual forma, la estimulación de TLRs en células inmunes han mostrado que induce diversas respuestas inmunes innata y modulan la respuesta inmune adaptativa en humanos y ratones. Tal es el caso de la estimulación de TLR de macrófagos con lipopolisacárido, peptidoglicano o CpG-DnA induce la secreción de citocinas inflamatorias y la producción de intermediarios reactivos de oxígeno. También promueve la maduración de células dendríticas. Se cree que las células dendríticas actúan como un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa por ello la maduración de células dendríticas es crítica para iniciar la respuesta inmune adaptativa [41].

Se ha descrito que estos receptores se expresan de manera constitutiva e inducible en los queratinocitos tanto en su membrana plasmática como en compartimientos endosomales; en los queratinocitos humanos se conoce la expresión de ocho miembros de la familia de los receptores tipo Toll (TLR), del TLR-1 al TLR-6 y TLR-9 al TLR-10 [15, 16, 17,33], lo que sugiere un importante participación de dichos receptores en la defensa cutánea de los queratinocitos basada en su capacidad de reconocimiento por su fracción extracelular responsable del reconocimiento de cada ligando específico[17].

El TLR1 se relaciona con el reconocimiento de lipoproteínas de superficie de *Borrelia burgdorferi* [42]. De la misma forma el TLR-1 interactúa con TLR-2 (TLR-2/TLR-1) para reconocer a los lipopéptidos tripalmitoilados o triacil lipopéptidos como el N-palmitoil-S-[2,3-bis (palmitoil)-(2RS)- propil]- cisteinil-alanil-glicina (Pam<sub>3</sub>Cys) [16,17].

El TLR-2 es el principal receptor para bacterias Gram positivas, reconociendo peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico (LTA) y lipoproteínas bacterianas. Una explicación por la cual TLR2 reconoce una amplia variedad de componentes microbianos es debido a que puede formar dímeros heterofílicos con otros TLRs como TLR1 y TLR6 ambos estructuralmente relacionados con TLR2, además de que tiene la capacidad de reconocer componentes derivados de hongos [40,42].

Por otra parte la deficiencia de TLR2 ha sido asociada con una infección progresiva y con una alta carga bacteriana en tuberculosis y lepra, e incluso que macrófagos deficientes de TLR2 se ha observado que estos son incapaces de responder a la estimulación por micobacterias pero logran producir bajas cantidades de citocinas proinflamatorias y una baja respuesta de óxido nítrico [39].

El TLR3 está implicado en el reconocimiento de RNA de doble cadena (dsRNA) y virus [40,42], mientras que el TLR-4 es estimulado por el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas [16,17]; se ha propuesto que TLR4 juega un rol fundamental en el reconocimiento y la lucha contra agentes infecciosos, pues además está implicado en el reconocimiento de ligandos endógenos como proteínas de choque térmico (HSP60 y HSP70) el extradominio A de fibronectinas, oligosacáridos de ácido hialurónico, sulfato de heparina y fibrinógeno [39 ,42].

De esta forma TLR4 actúa en la iniciación de la inmunidad innata y en la respuesta inmune adaptativa [37]. En un estudio realizado por Millán-Chiu y colaboradores (2011) se especula que la expresión de TLR4 es regulada en forma negativa por *Nocardia brasiliensis* en fases posteriores del actinomicetoma, induciendo un desbalance entre la respuesta inmune del huésped y la carga bacteriana presente en el sitio de la infección [39].

Por su parte TLR5 se relaciona con una respuesta hacia la flagelina [40, 42].

El TLR-6 por sí mismo puede reconocer diacil lipopéptidos y de esta forma activarse [18], aunque también en algunos casos interactúa con el TLR-2 (TLR-2/TLR-6) formando un heterodímero que reconoce a los diacil-lipopéptidos, como el ácido lipoteicoico (LTA) [16,17].

3.5. Los queratinocitos humanos como células participantes de la respuesta innata.

Los queratinocitos representan el principal tipo de población celular de la epidermis, corresponden a una cantidad superior al 90% de todas las células epidérmicas [29], operan como primera línea de defensa contra la infección de microorganismos patógenos utilizando múltiples mecanismos que promueven respuestas cutáneas tempranas [28,43], e incluso se considera que forman una barrera efectiva la cual impide la entrada de proteínas antigénicas, irritantes químicos y agentes infecciosos en el cuerpo todo aun resistiendo a factores como la presión externa y la resistencia mecánica [29].

Los queratinocitos presentan múltiples receptores que permiten detectar componentes conservados de los microorganismos e iniciar una respuesta temprana cutánea del tipo de la inmunidad innata como la producción de péptidos antimicrobianos y mediadores proinflamatorios [28] pues su función inmunológica es prevenir las infecciones sistémicas por patógenos potenciales [15], mostrando diferentes tipos de respuesta dependiendo del tipo de microorganismo al que se enfrenten y actuando como un sitio crucial para la respuesta inmune innata. De esta forma los queratinocitos pueden secretar no solo una variedad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, sino también algunos péptidos antimicrobianos cuando son estimulados por los microorganismos [41], tales como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , quimiocinas como la IL-8/CXCL8 y péptidos antimicrobianos [15].

Se ha descrito que los queratinocitos expresan de manera constitutiva e inducible en su membrana plasmática una amplia diversidad de receptores como TLR incluyendo TLR-1, TLR-2, TLR4, TLR5 y TLR6, aunque también expresan en compartimientos endosomal a TLR3 y TLR9, lo que les facilita el reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos. Aparte de ser propensos a activación vía inflamasoma lo que les permite secretar una gran variedad de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos cationicos [15,33].

#### **4. Planteamiento del problema**

El actinomicetoma se caracteriza por ser una enfermedad crónica en la cual existen mecanismos moleculares no bien conocidos que impiden su pronta erradicación [39]. En virtud de que los queratinocitos humanos son células inmunocompetentes frente a las infecciones [44] debido entre otros factores a la presencia de TLRs así como la producción y liberación de citocinas proinflamatorias, en este trabajo se pretende estudiar su activación al ser infectados por *Nocardia brasiliensis* y observar si estas células juegan un papel importante mediante la liberación de citocinas específicas.

#### **5. Hipótesis**

La expresión de los receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) y el incremento de citocinas proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , IL-8, MCP-1 e IL-6) en queratinocitos humanos infectados por *Nocardia brasiliensis* supone su participación en la respuesta inmune innata contra el actinomicetoma por esta bacteria.



## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general

Evaluar la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, y la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, MCP-1) en una línea celular de queratinocitos humanos HaCaT activados con *Nocardia brasiliensis*.

### 6.2. Objetivos específicos

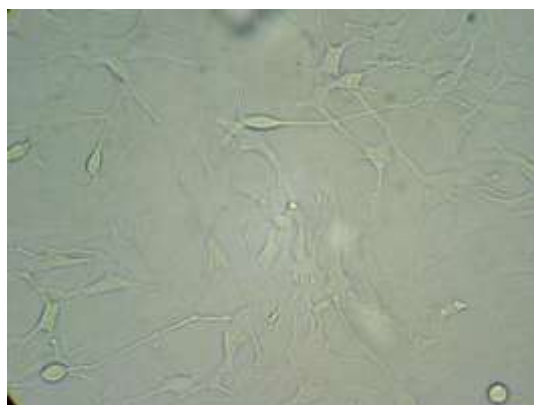
- a) Establecer un modelo de infección de queratinocitos humanos infectados con *N. brasiliensis*
- b) Evaluar la replicación intracelular de *N. brasiliensis* en queratinocitos infectados por cuenta directa de UFC/mL.
- c) Evaluar la magnitud de la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, en la línea celular HaCaT de queratinocitos, infectados con *Nocardia brasiliensis* utilizando PCR en tiempo real y microscopia confocal.
- d) Cuantificar mediante las técnicas de PCR en tiempo real y ELISA la expresión de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1) en los sobrenadantes de cultivo de queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis*, mediante una cinética de 2,6, 24, 48 y 72 h post-infección.

## 7. Materiales y métodos

a) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.

La línea celular de queratinocitos HaCaT proviene de la colección de la ATCC. El cultivo de los queratinocitos se realizó en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con medio DMEM / F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Ham) (Gibco by Life technologies, DMEM/F12 Grand Island, NY), [+] L-glutamina, [+] 2.438 g/L bicarbonato de sodio, 55 mg/L piruvato de sodio, suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO) más penicilina (1000 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizó el recambio de medio cada tercer día hasta obtener un número suficiente de células para cada experimento.

Una vez que las células alcanzaban una confluencia del 70% aproximadamente se procedió a disgregarlas con tripsina (SIGMA Aldrich al 0.025%) para separarlas de las cajas y poder hacer un recuento celular que permitiría por un lado mantener las células y por otro lado realizar las monocapas que posteriormente se utilizarían en la realización de las pruebas de infección celular. Figura 3.



**Figura 3 Cultivo de queratinocitos.** Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (10X) en medio DMEM/ F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Ham) (Gibco by Life technologies, DMEM/F12 Grand Island, NY), [+] L-glutamina, [+] 2.438 g/L bicarbonato de sodio, piruvato de sodio, suplementado con 13 % de suero bovino fetal (GIBCO) más penicilina (1000 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### a.1) Tripsinzación de células

Se retiró el medio de cultivo celular, y se agregaron 5 mL de solución tripsina/verseno (0.25%). Se incubó a 37° C por 5 min tiempo necesario para que las células se separaran de la caja.

En un tubo Falcon de 15 ml de volumen se añadió la suspensión resultante y medio DMEM/F-12 con piruvato de sodio y alta glucosa (Life Technologies) suplementado con 13% de suero bovino fetal (GIBCO) más penicilina (1000 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL) volumen/volumen, se centrifugó a 1000 rpm/ 5 min a 20°C.

Se desechó el sobrenadante y el paquete celular obtenido se resuspendió en un volumen conocido de medio DMEM suplementado.

#### b) Cultivo del microorganismo

Se utilizó la cepa de *Nocardia brasiliensis* CECT 3032, crecida en medio infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C.

Debido a que se requería que *Nocardia brasiliensis* se encontrara en su fase exponencial para la realización del ensayo de infección celular se hizo seguimiento del crecimiento de la bacteria por un periodo de 18 horas tomando lectura cada 2 horas. Se prepararon 4 matraces de 500 mL con 250 mL de medio BHI, de éstos 3 se inocularon con la cepa CECT3032 y el cuarto se tomó como control negativo.

Se obtuvieron 3mL de medio en crecimiento cada hora hasta completar 48 muestras, iniciando con el blanco (previo a la inoculación) y el tiempo 0.

Para realizar la cinética de crecimiento de la bacteria se utilizó la técnica de nefelometría. Las muestras se trataron tomando 3 mL del medio de cultivo, se centrifugaron a 3500 rpm en una centrifuga SORVALL LEGEND MACH 1.6 R durante 30 minutos, posteriormente se separó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 3 mL de solución salina para leer en un espectrómetro UV-visible a una absorbancia de 540 nm. Una vez obtenidas las absorbancias se calculó la UFC/mL utilizando estándares nefelométricos, para poder realizar la gráfica de crecimiento microbiano.

#### c) Suspensión bacteriana

Una vez crecida la cepa de *Nocardia brasiliensis* (CECT 3032) por 12 horas en caldo BHI, se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos a 20°C, luego de eliminar el sobrenadante se resuspendió el paquete celular en solución salina 0.9%, para hacer un lavado.

Posteriormente se volvió a resuspender en solución salina 0.9% hasta alcanzar una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, lo cual se comprobó comparándolo con estándares nefelométricos.

#### d) Ensayo de infección celular

En placas de 6 pozos, se obtuvieron monocapas de células HaCaT con 400 mil células por pozo (las cuales se inundaron con 2 mL de medio de cultivo DMEM/F12). Se lavaron dos veces con PBS 1X (Anexo 1) para eliminar el suero del medio de cultivo y se infectaron con 0.016 mL de la suspensión bacteriana a una MOI 10:1 (multiplicidad de la infección, 10 bacterias por célula) y 3 mL de medio sin antibiótico y sin suero bovino fetal durante 2 h. Se tomaron muestras a las 0, 2, 6, 24, 48 y 72 horas, post-infección.

Para prevenir el crecimiento extracelular de la *Nocardia*, las monocapas infectadas se trataron con 80 µg/mL de amikacina durante 2 h, transcurrido ese tiempo, el medio se reemplazó por el medio de cultivo DMEM/F12 adicionado con 15 µg/mL de amikacina el cual se dejó hasta el término de la cinética.

Una vez colectado el sobrenadante de cada punto de la cinética se añadieron 600 µL de *TRIzol* (Invitrogen Life Technologies USA) al pozo y se dejó reposar durante 3 min. Se retiró el *TRIzol* y se reservó para la extracción de mRNA.

Para evitar alguna alteración en los cultivos contiguos pertenecientes a otros tiempos se lavó en dos ocasiones el pozo trabajado con PBS estéril una vez que se había recogido el *TRIzol*.

#### e) Ensayos de multiplicación intracelular.

Se realizaron ensayos de infección, con una MOI 10:1 como se ha descrito anteriormente. Cada monocapa correspondiente a los tiempos postinfección se lisó con una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.25% y se neutralizó adicionando albúmina sérica bovina estéril al 5%. Para determinar las unidades

formadoras de colonias, se tomaron alícuotas, se realizaron diluciones decimales en microtubos, ( $10^{-1}$ – $10^{-3}$ ) y se sembraron 10  $\mu$ L de las diluciones preparadas, así como del concentrado por triplicado en agar BHI. Una vez absorbida la gota, se invirtieron y se dejó incubar 37°C, 24-48h. Posteriormente se realizó la cuenta de UFC/mL de cada tiempo post infección.

#### f) Microscopía confocal

Se realizaron monocapas de células HaCaT con 40 mil células para cada tiempo de infección en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles a una confluencia celular del 60%, se infectaron con la suspensión bacteriana a una MOI de 10:1, siguiendo una cinética de 0, 2, 6, 24, 48 y 72 h post-infección. Paralelamente y para tener un control positivo de la expresión de TLRs, se estimularon monocapas de células HaCaT con 8  $\mu$ L preparación de PMA (forbol- miristato-acetato) durante 24 h. Después del tratamiento con PMA y de la infección, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% por 1 h a temperatura ambiente. Para la determinación de la expresión de TLR, las preparaciones se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos IgG anti- TLR-2 humano de ratón (Santa Cruz) , IgG anti TLR-4 humana producido en conejo (eBioscience) e IgG anti TLR-6 humano de cabra (Santa Cruz), a una dilución de 1:200 por 2 horas a 37°C, posteriormente se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron por 90 minutos a 37°C con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón producido en cabra-Rodamina (Chemicon international), anti IgG de conejo producido en cabra-TRITC (Santa Cruz) y anti IgG de cabra producido en burro-FITC (Santa Cruz) respectivamente cuya diución de trabajo fue 1:2000. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando las monocapas 5 veces con PBS, finalmente, las preparaciones se montaron en portaobjetos usando Vectashield-DAPI como medio de montaje y se observaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

f.1) Medición de la intensidad media de fluorescencia de los receptores tipo Toll  
El análisis numérico de la intensidad media de fluorescencia se realizó contando 50 células por campo observado mediante la microscopía confocal en

un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss) y calculando la intensidad media de fluorescencia traducido en número de píxeles.

#### g) RT- qPCR

Se realizaron monocapas con 400 mil células, y se infectaron como se describió anteriormente con *N. brasiliensis* CECT 3032 durante 2h a una MOI de 10, siguiendo una cinética de post-infección de 0,2, 6, 24, 48 y 72 h. Después de cada tiempo de post-infección, se adicionaron 500  $\mu$ L de *TRIzol* a cada uno de los pozos para realizar la extracción de RNA total. El RNA total se trató con DNAsa II y precipitó con isopropanol.

Para la retro-transcripción (RT) del RNA se usaron 3  $\mu$ g de RNA total, al cual se le adicionaron 0.5  $\mu$ g de oligo (dT) (Invitrogen) y se incubaron a 70°C por 10 minutos. El master mix para la RT se preparó con 1X *single strand buffer*, 0.5 mM de DTT, 500 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa MMLV (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Invitrogen). Las reacciones de RT se incubaron a 42°C durante 1 h. Después de la formación de cDNA se realizaron las PCRs.

Usando un Master Mix con 1.5 mM de  $MgCl_2$  (Ampliqon III) y usando Eva Green (Ampliqon III) como fluorocromo. Como gen endógeno se utilizó G3PDH usando los siguientes iniciadores específicos 5´-GGTCATCCATGACAACCTTTGG-3´(forward) y 5´GTCATACCAGGAATTGAGCTTGAC-3´ (reverse).

g.1) Expresión de citocinas IL1 $\beta$ , IL8, MCP1, TNF $\alpha$  en queratinocitos humanos infectados por *Nocardia brasiliensis*.

Los iniciadores específicos utilizados para la determinación de citocinas se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Iniciadores específicos de citocinas**

Gen	forward	reverse
<b>MCP1</b>	5'-CTCGCTCAGCCAGATGCAAT-3'	5'-TGCTTGTCCAGGTGGTCCAT-3'
<b>IL8</b>	5'-GCCAAGAGAATATCCGAACT-3'	5'-TCAACACAGCACTACCAACA-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5'-GACTTCCTTGAGACACGG-3'	5'-AGGGCGATTACAGACACA-3'
<b>IL1<math>\beta</math></b>	5'-GCCCTGTGCCTTAGTAGTAT-3'	5'-TGCATCAGCTCATCAATAAC-3'

g.2) Expresión de TLRs 2,4 y 6 en queratinocitos humanos infectados por *Nocardia brasiliensis*.

Los iniciadores específicos utilizados para la determinación de TLRs se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Iniciadores específicos de TLRs**

Gen	forward	reverse
<b>TLR2</b>	5'-GGC CAG CAA ATT ACC TGT GTG - 3'	5'-AGG CGG ACA TCC TGA ACC T -3'
<b>TLR4</b>	5'- CAG AGT TTC CTG CAA TGG ATC A -3'	5'-GCT TAT CTG AAG GTG TTG CAC AT- 3'
<b>TLR6</b>	5'-GAA GAA GAA CAA CC TTT AGG ATA GC-3'	5'- AGG CAA ACA AAA TGG AAG CTT - 3'

Los genes para todas las citocinas y los TLRs se amplificaron de la siguiente manera, 45 s de desnaturalización a 95°C, 45 s de alineamiento a 58°C y 45 s de extensión a 72°C por 35 ciclos.

Todos los valores numéricos de cada gen se normalizaron con su respectivo valor de gen endógeno G3PDH y los experimentos se calibraron utilizando el nivel basal de la expresión de cada gen como valor inicial (células sin infectar). Todos los valores fueron sometidos al análisis de expresión relativa de  $\Delta\Delta Ct$  usando el software Step One V.2.3.1 de Life Technologies USA.

#### h) Cuantificación de citocinas.

Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de queratinocitos activados con *Nocardia brasiliensis*, obtenidos tras la cinética de 0, 2, 6, 24, 48 y 72 h post-infección. Estos cultivos se centrifugaron previamente para eliminar la *Nocardia* y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para su posterior utilización.

Para la cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultivos se empleó la técnica de ELISA descrita para cada citocina en el protocolo del fabricante, utilizando los *Kits* comerciales:

- Human TNF- $\alpha$ , eBioscience® Immunoassay Ref. No. 88734622 (San Diego CA)
- Human IL-1 $\beta$ , Quantikine® Immunoassay catalog No. DLB50 R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN 55413)
- Human IL-8, Quantikine® Immunoassay catalog No. D8000C R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN 55413)
- Human IL-6, Quantikine® Immunoassay catalog No. D6050 R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN 55413)
- Human CCL2/MCP-1, Quantikine® Immunoassay catalog No. DCP00 R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN 55413).

La cuantificación de las citocinas se realizó en pg/mL por medio de una curva de calibración mediante los estándares proporcionados por los *Kits* para cada una de las citocinas.

#### i) Interpretación de resultados

A partir de las imágenes obtenidas, de la microscopía confocal se determinó la sobreexpresión de los receptores mediante la observación de las imágenes con el programa LSM Image Examiner Pascal (Confocal Zeiss).

El método de ELISA permitió cuantificar en los sobrenadantes de cultivo celular la concentración de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 y MCP-1) con base en una curva estándar para cada una.

El análisis estadístico utilizado para la correlación de los datos se realizó mediante la prueba de ANOVA de dos vías para el tratamiento de datos no paramétricos, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism V 5.1.

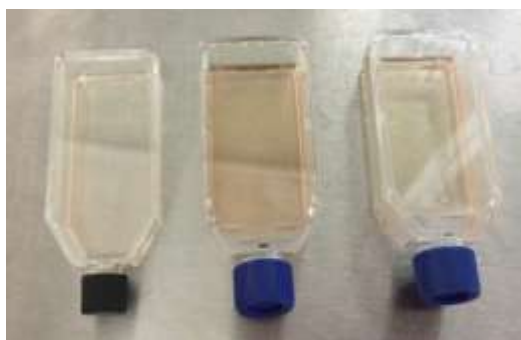


## 8. Resultados

a) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.

Luego de probar diferentes condiciones para el crecimiento de los queratinocitos (Figura 4) se comprobó que las mejores condiciones consistían en cultivos en botellas de 25 cm<sup>2</sup> utilizando medio DMEM/F-12 suplementado con piruvato de sodio y alta glucosa (Life Technologies) además de 13% de suero bovino fetal (GIBCO) más 100 µL de antibiótico (penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL)).

La incubación se realizó a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Todas estas condiciones se mantuvieron aparte de realizar el recambio de medio cada tercer día hasta obtener un número suficiente de células para cada experimento.

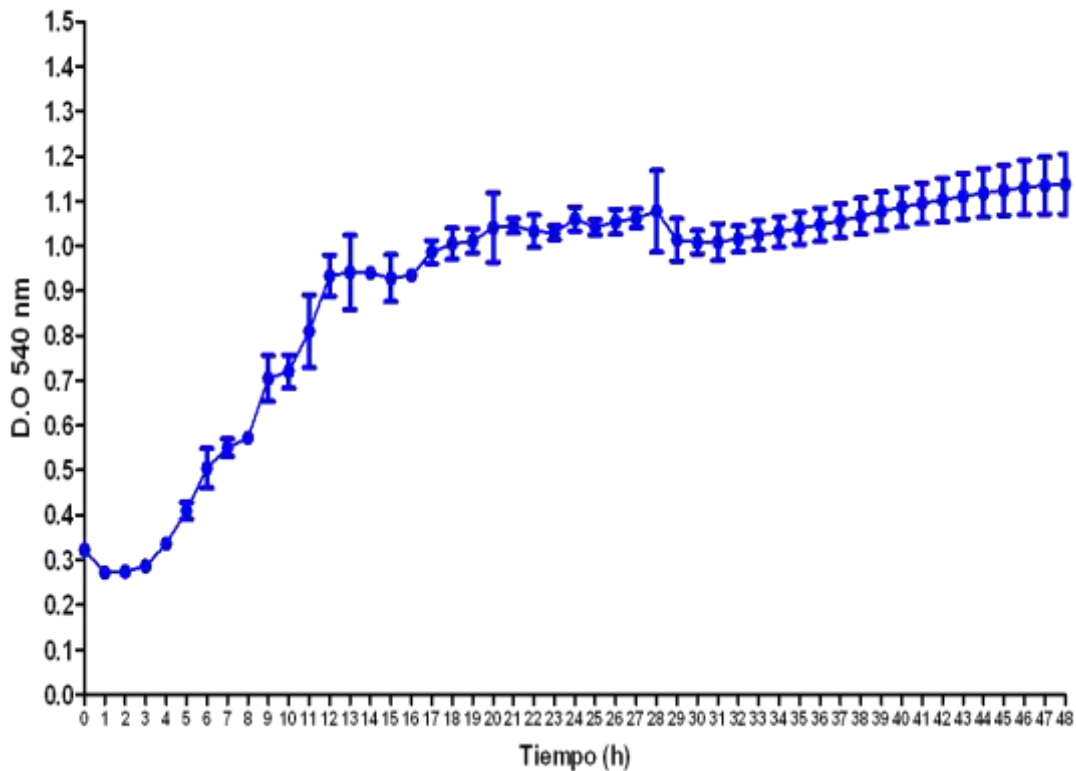


**Figura 4. Cultivos celulares de queratinocitos humanos HaCaT en botellas de plástico.** Del lado izquierdo utilizando medio DMEM/F-12 suplementado con piruvato de sodio y alta glucosa, en el centro medio DMEM suplementado con alta glucosa y sin piruvato de sodio, lado derecho DMEM con piruvato de sodio y alta glucosa, todos suplementados con suero bovino fetal al 13 %, con penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL).

b) Cultivo del microorganismo

Los resultados obtenidos de la curva de crecimiento de *Nocardia brasiliensis* hasta las 48 horas se muestran en la Figura 5.

### *Nocardia brasiliensis* CECT3032



**Figura 5. Curva de crecimiento de *Nocardia brasiliensis* CECT3032.** Se muestran los tiempos de crecimiento hasta las 48 horas en medio BHI a 37°C, cuantificada en base a estándares nefelométricos.

De acuerdo a esta gráfica, la bacteria presenta un crecimiento exponencial entre las 8 y 16 horas a partir de la cual comienza su fase estacionaria.

#### c) Suspensión bacteriana

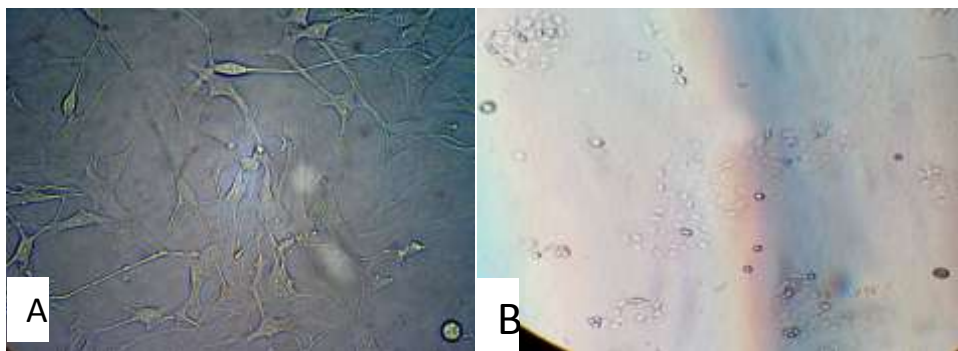
Según los estudios de crecimiento bacteriano anteriores, la cepa se creció por un periodo de 12 horas en las cuales se aseguraba que estaba en la fase exponencial, posteriormente se resuspendió en solución salina 0.9%, para obtener una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

#### d) Ensayo de infección celular

El ensayo de infección celular en el cual se obtuvieron monocapas de células HaCaT para cada tiempo de infección (0, 2, 6, 24, 48 y 72 h) siguiendo las condiciones previamente establecidas, permitió con los lisados la obtención de

mRNA para la técnica de RT-PCR. Los sobrenadantes se utilizaron para la cuantificación de citocinas por el método de ELISA.

Aunque se mantuvieron las mismas condiciones de cuidado en los cultivos celulares con el progreso del tiempo de infección se evidenció la presencia de un efecto citopático en los mismos (Figura 6).



**Figura 6. Cultivos de queratinocitos HaCaT observados en microscopio invertido.** (A) Cultivo de queratinocitos humanos HaCaT sin infección por *Nocardia brasiliensis* (10x) (B) Cultivo de queratinocitos humanos HaCaT infectado con *Nocardia brasiliensis* a 24 horas de infección (10x). Se observa efecto citopático.

#### e) Ensayo de multiplicación intracelular

Como se observa en la curva de replicación intracelular de *Nocardia brasiliensis* CECT3032 (Figura 7) una vez que comienza la infección *N. brasiliensis* se replica hasta que logra internalizarse a la célula a las 2 horas y deja de replicarse desde las 6 horas manteniéndose latente hasta las 72 horas.

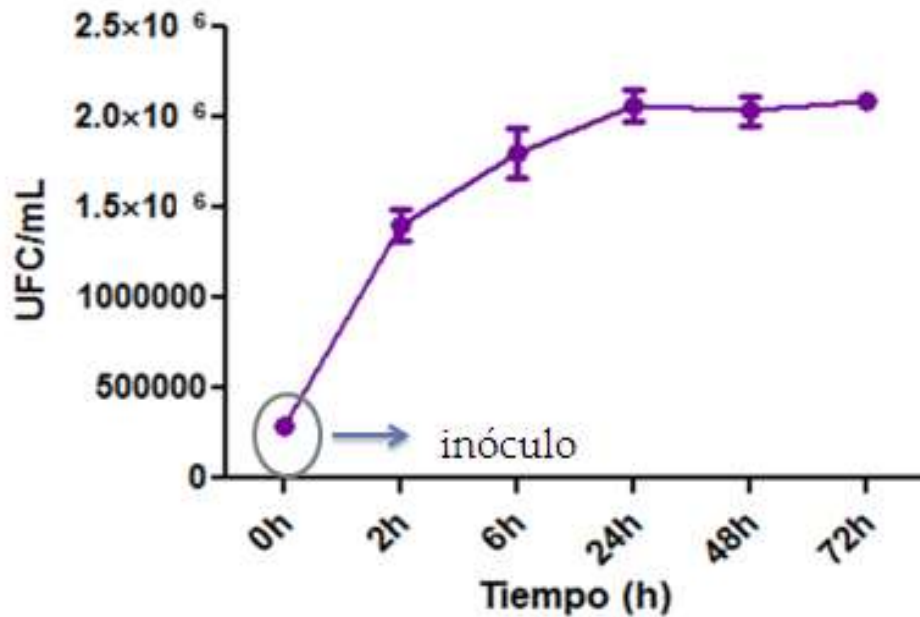


Figura 7. Curva de replicación intracelular de *Nocardia brasiliensis* CECT3032. Se muestra el periodo de evaluación hasta las 72 horas.

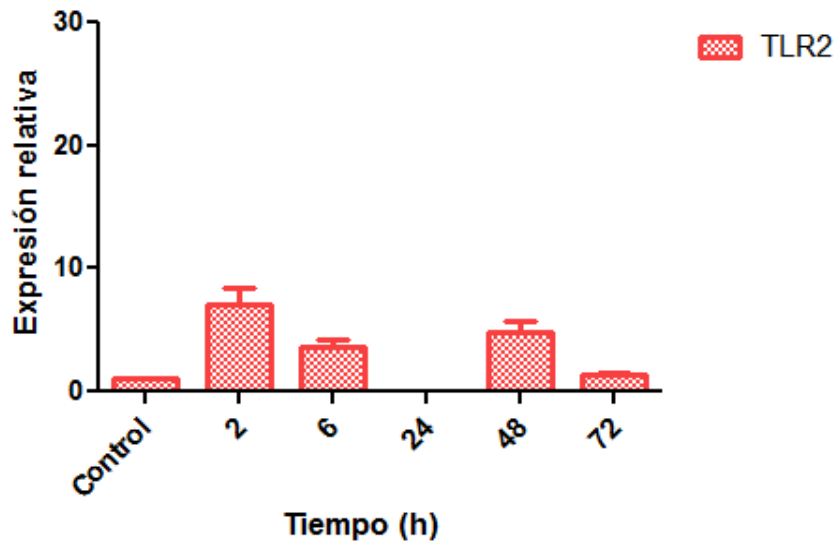
#### f) Receptores tipo Toll

La evaluación de la expresión de los tres receptores tipo Toll se realizó tanto por la técnica de PCR tiempo real como por microscopía confocal.

##### f.1) RT-qPCR.

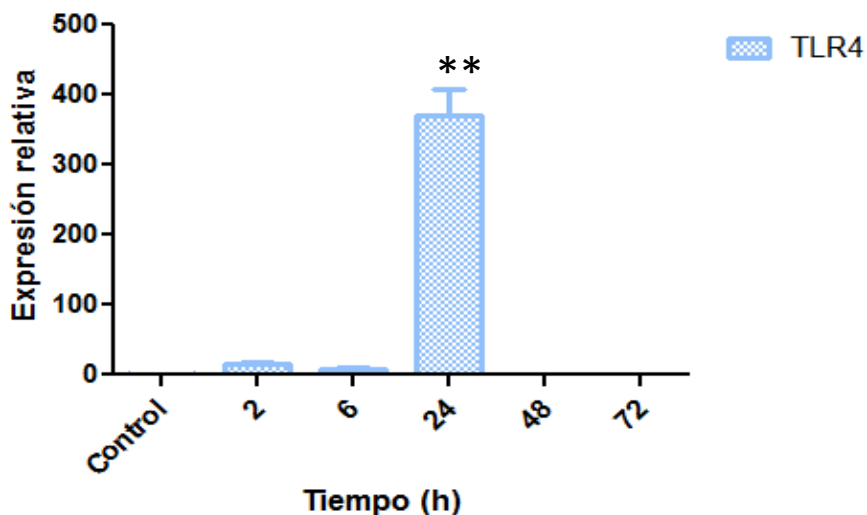
Las figuras 8, 9 y 10 muestran la expresión del mRNA para los TLRs 2, 4 y 6 por la técnica de PCR tiempo real en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis* a una MOI 10:1 obtenidos de una cinética de 2,6,24,48 y 72h. Los valores representados en las gráficas corresponden al promedio de dos experimentos independientes, y son representados como la media más el error estándar en porcentaje.

En la figura 8 se puede apreciar que los queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis* no sobreexpresan el receptor TLR2 lo cual se corrobora con la medición de las UER calculadas en las imágenes de microscopía confocal.



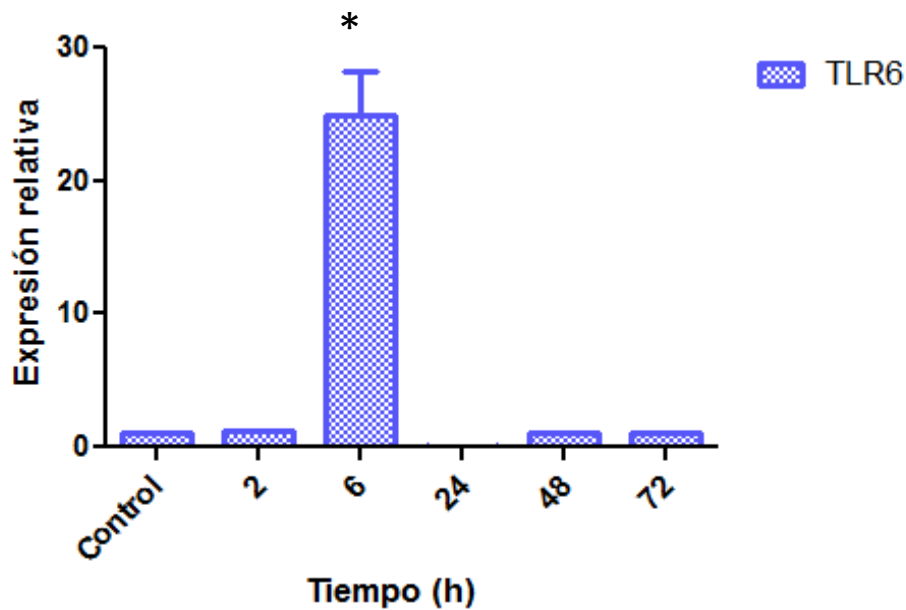
**Figura 8. Expresión del receptor TLR2 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24,48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).**

Por otra parte TLR4 si se sobreexpresa en las células infectadas (Figura 9). Dicha sobreexpresión se aprecia únicamente a las 24horas post infección alcanzando UER de 370.41 y posteriormente los niveles del mRNA disminuyen al mismo nivel que el control sin infectar.



**Figura 9. Expresión del receptor TLR4 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24,48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ .**

El receptor TLR6 se expresa a las 6 hrs post-infección (Figura 10), sus niveles de expresión en los queratinocitos humanos siguen siendo mucho más bajos que los que presenta TLR4, pero son más altos que los de TLR2, sus UER son de 24.95.

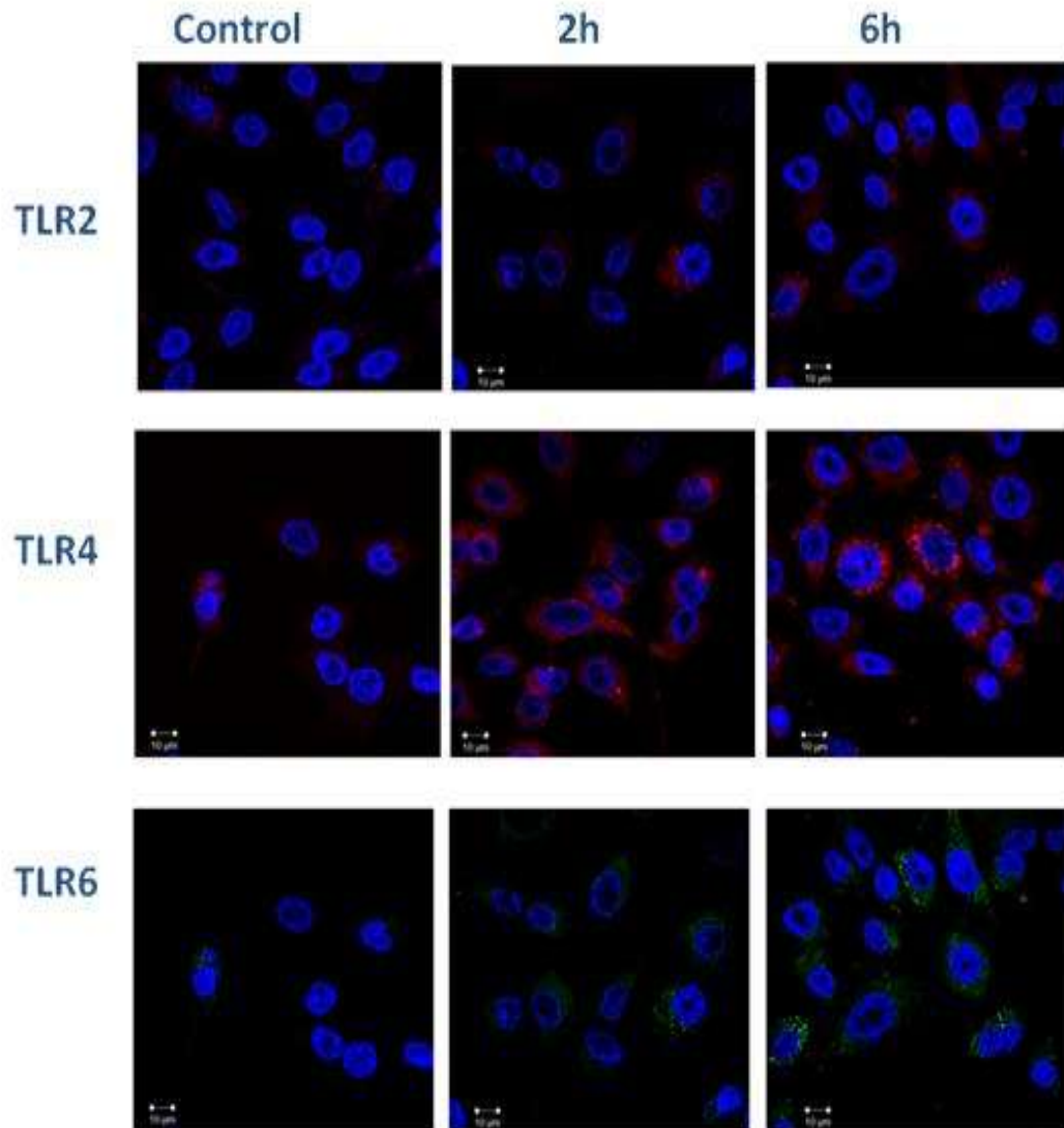


**Figura 10. Expresión del receptor TLR6 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*.** MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24,48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). \*=p<0.05, \*\*=p<0.005 y \*\*\*=p<0.0005.

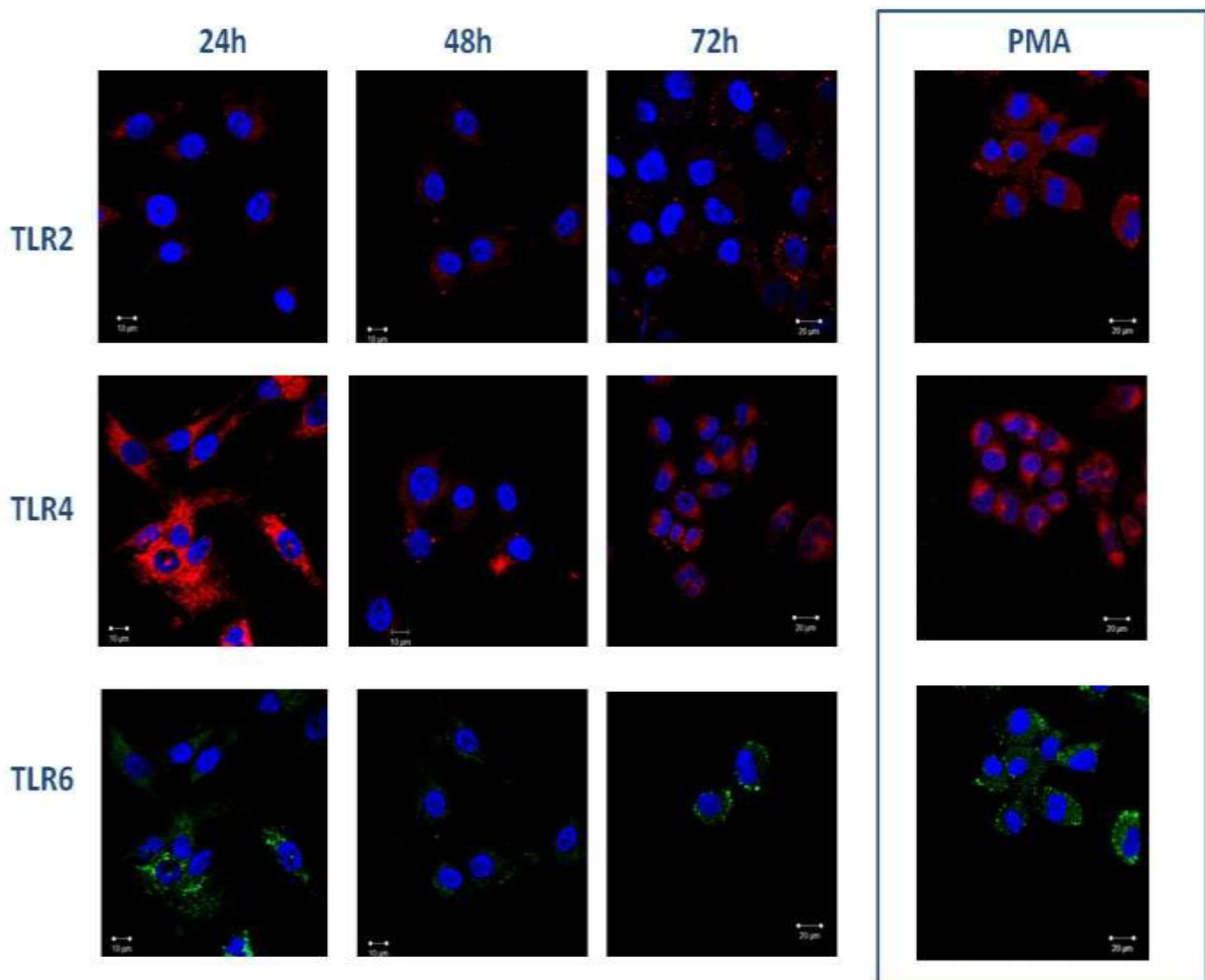
#### f.2) Microscopía confocal

En las figuras 11 y 12 se muestran las imágenes del marcaje de los TLR2, TLR4 y TLR6 en queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis* durante 2, 6, 24, 48 y 72 horas, además del control positivo PMA, en donde podemos observar que la mayor expresión se encuentra en el receptor TLR4 seguido por el TLR6, a las 24 horas de infección. Posteriormente a esa intensidad del marcaje disminuye notablemente en los tres casos.

En el caso del TLR2 su expresión es muy baja aunque se observa un poco más a las 24 horas.



**Figura 11. Expresión de receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos humanos infectados con *Nocardia brasiliensis*.** Los receptores Toll fueron evaluados por microscopía confocal a las 2 y 6 horas postinfección. Se observan en azul teñidos los núcleos celulares de los queratinocitos, en rojo la expresión de TLR2 y TLR4. En verde se observa la expresión de TLR6.



**Figura 12. Expresión de receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos humanos infectados con *Nocardia brasiliensis*.** Los receptores Toll fueron evaluados por microscopía confocal a las 24, 48 y 72 horas postinfección. Se observan en azul teñidos los núcleos celulares de los queratinocitos, en rojo la expresión de TLR2 y TLR4. En verde se observa la expresión de TLR6. Como control positivo se usó PMA a una concentración de  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  por cada  $1 \times 10^6$  células.

### f.3) Medición de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los receptores tipo Toll

El análisis numérico de la intensidad media de fluorescencia para cada receptor (figuras 13, 14 y 15) con el programa LSM Image Examiner Pascal, corrobora los resultados obtenidos en las imágenes, ya que el número de unidades de fluorescencia observados fue mayor a las 24 horas en los tres



receptores; sin embargo se muestra una gran diferencia en la expresión del receptor tipo 4 que sobrepasa ampliamente la expresión de los TLRs 2 y 6 al mismo tiempo y posteriormente se observa una disminución de la misma.

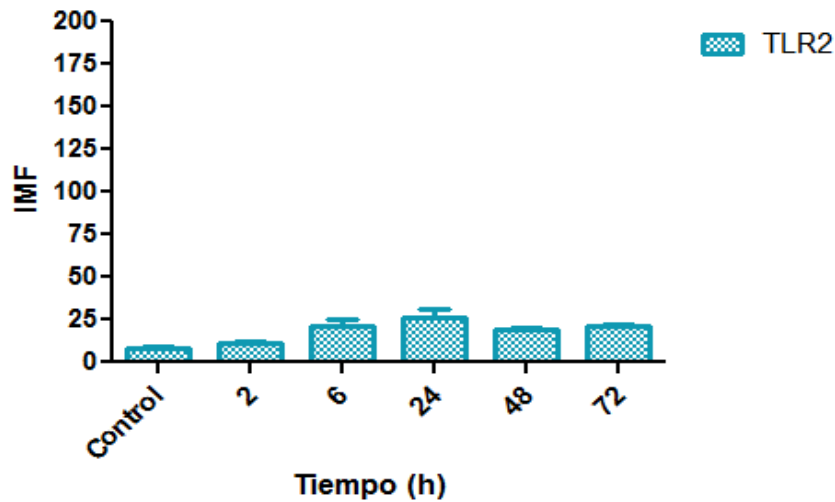


Figura 13. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de TLR2 en queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis*. Todos los tiempos post infección fueron comparados con el control de células sin infectar.

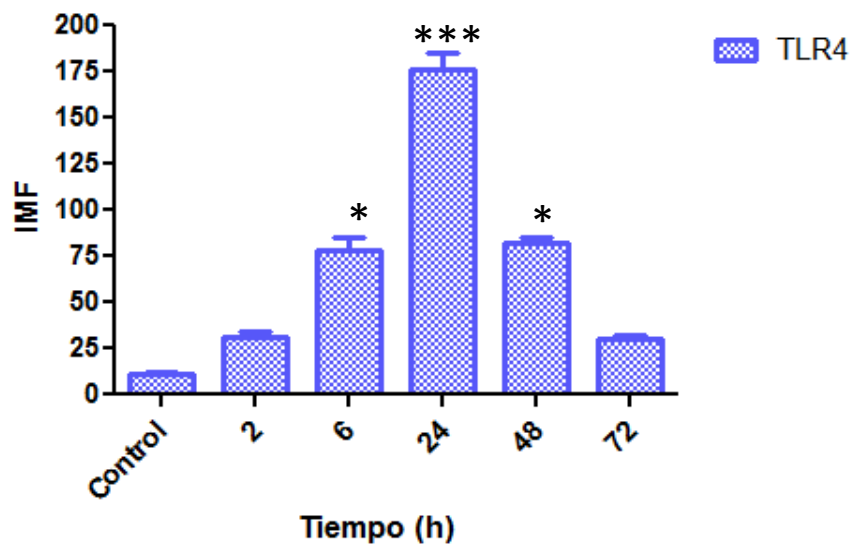
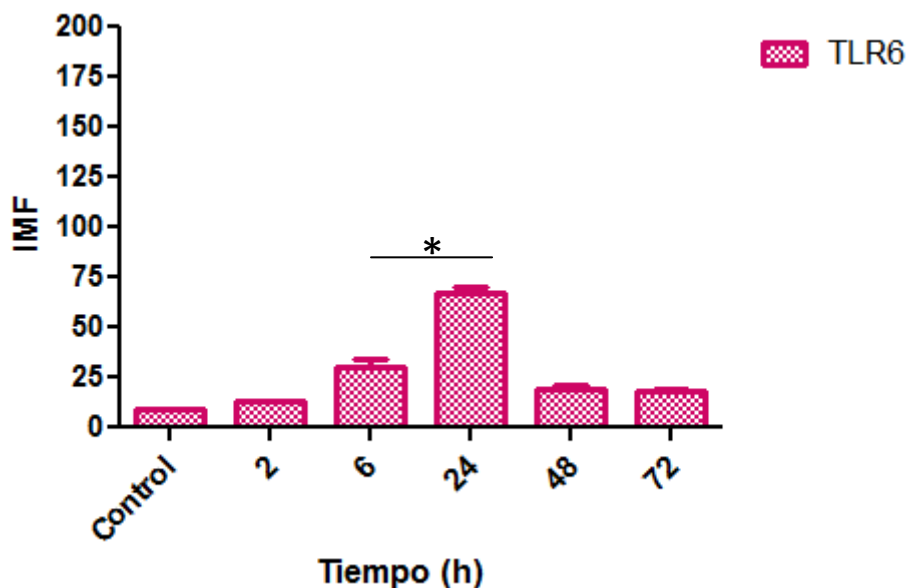


Figura 14. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de TLR4 en queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis*. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ . Todos los tiempos post infección fueron comparados con el control de células sin infectar.



**Figura 15. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión del receptor de TLR6 en queratinocitos infectados con *Nocardia brasiliensis*.** \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ . Todos los tiempos post infección fueron comparados con el control de células sin infectar.

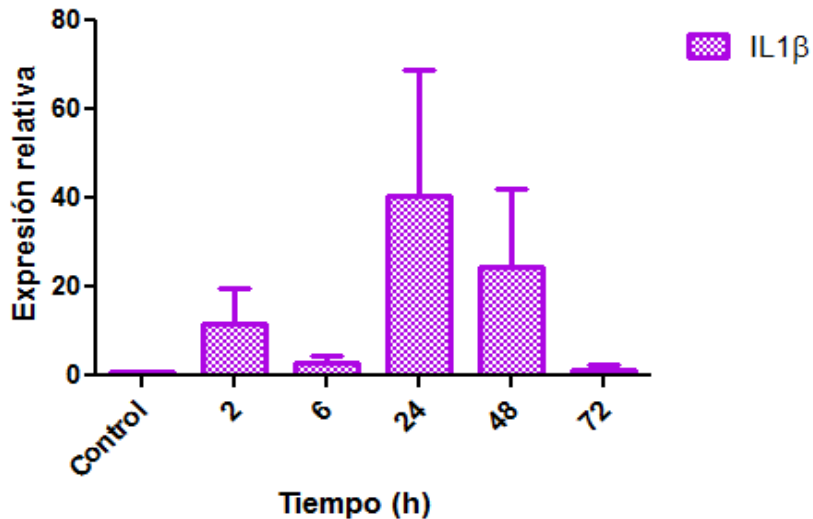
#### g) Citocinas

El estudio de la expresión y la cuantificación de las citocinas IL1 $\beta$ , IL8, MCP1, TNF $\alpha$  en queratinocitos humanos infectados por *Nocardia brasiliensis* se realizó tanto por la técnica de PCR tiempo real como por la técnica de ELISA.

##### g.1) RT-qPCR.

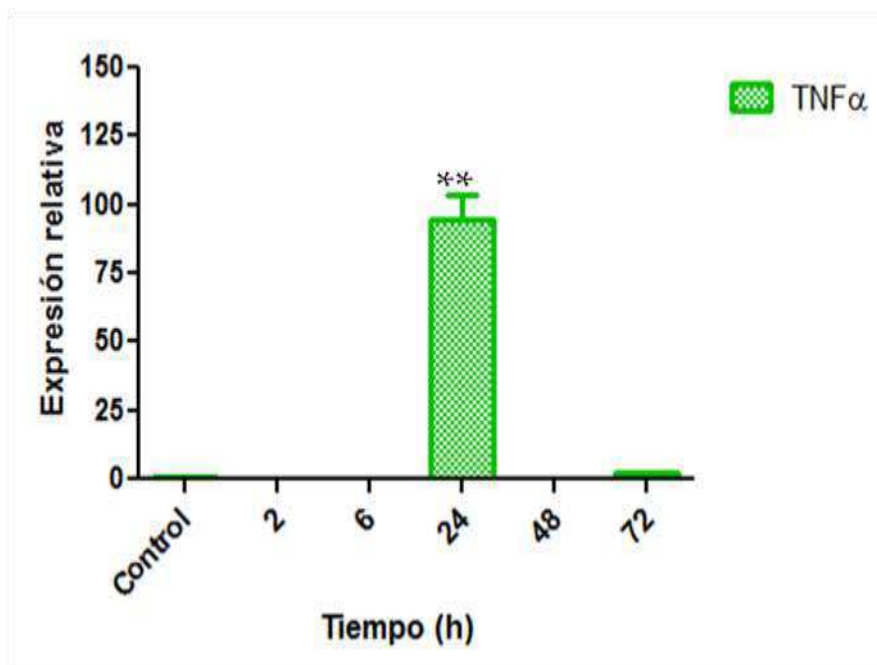
Las figuras 16,17,18,19 y 20 muestran la expresión del mRNA para las citocinas IL1 $\beta$ , IL8, MCP1, TNF $\alpha$  por la técnica de PCR tiempo real en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis* a una MOI 10:1 obtenidos de una cinética de 2,6,24,48 y 72h. Los valores representados en las gráficas corresponden al promedio de dos experimentos independientes, y son representados como la media más el error estándar en porcentaje.

Para la citocina proinflamatoria IL1 $\beta$  las unidades de expresión relativa (UER) encontradas presentan un valor máximo de 40.30 (Figura 16) y se da después de 24 horas de la infección de los queratinocitos por *Nocardia brasiliensis* y disminuye a partir de las 48 horas.



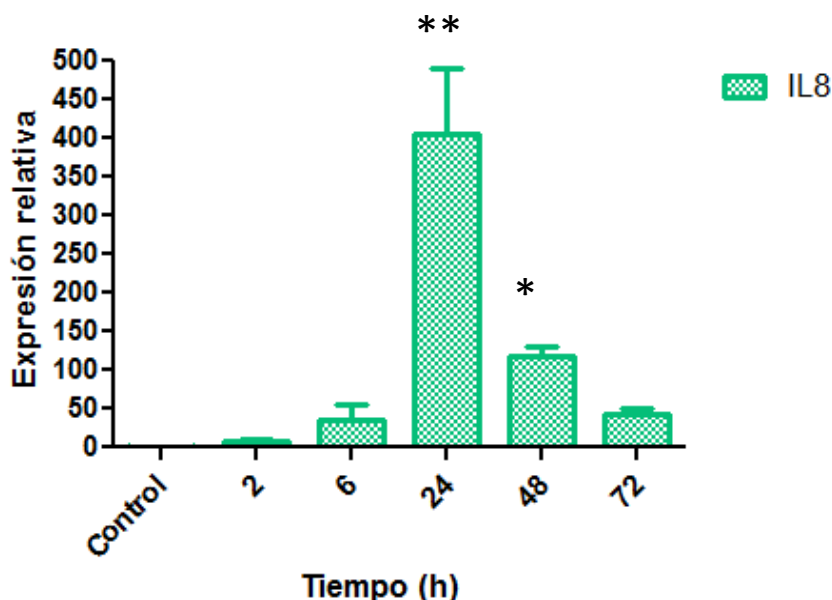
**Figura 16. Expresión de IL 1  $\beta$ , en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24, 48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).**

En la figura 17 se observa el mayor valor de unidades de expresión relativa de TNF $\alpha$ , 24 h después de la infección de los queratinocitos por *Nocardia brasiliensis*, sus niveles de unidades de expresión son mucho más bajos que los de MCP1, para TNF $\alpha$  las UER son de 94.68 y, disminuyen a las 48 y 72 h.



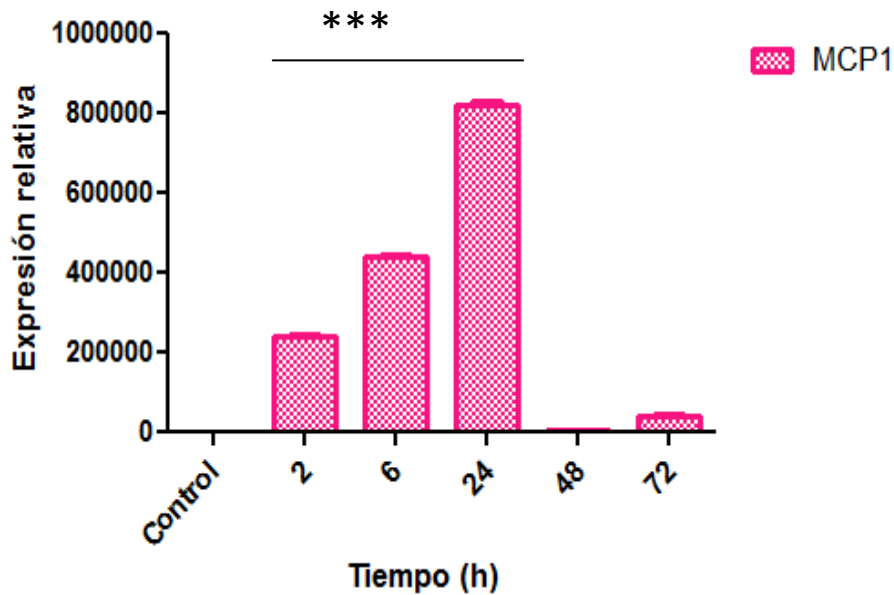
**Figura 17. Expresión de TNF  $\alpha$  en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24, 48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ .**

La figura 18 muestra la expresión de la IL8 la cual es 4 veces mayor que la de IL-1 $\beta$ , las UER de esta citocina es de 404.78 y se da a las 24 h después de haber infectado los queratinocitos con *Nocardia brasiliensis* disminuyendo a las 48 y 72 h.



**Figura 18. Expresión de IL 8, en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*.** MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24,48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) \*=p<0.05, \*\*=p<0.005 y \*\*\*=p<0.0005.

La quimiocina MCP1 es la que presentó una mayor expresión en este estudio, ya que sus unidades de expresión relativa son de 820,987 (Figura 19) con lo que se ve una notable diferencia en comparación con las demás citocinas, que expresan valores menores a quinientas UER. MCP1 se expresa principalmente 24 h después de la infección de los queratinocitos por *Nocardia brasiliensis*, disminuyendo a las 48 y 72 h.

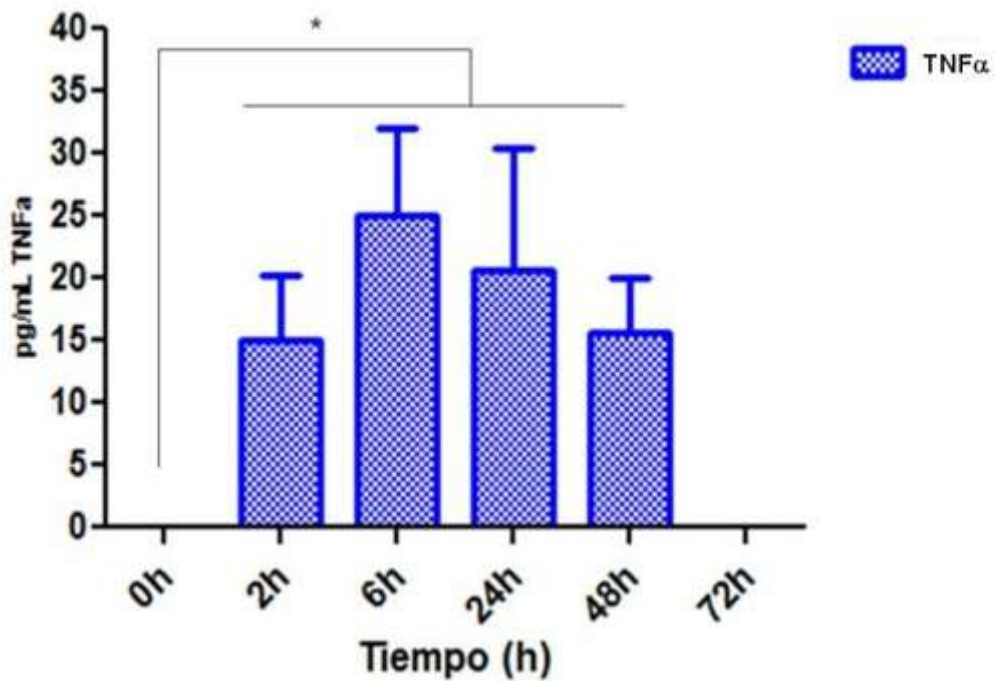


**Figura 19. Expresión de MCP-1 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*.** MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24, 48 y 72h. Por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ .

#### g.2) Cuantificación de citocinas.

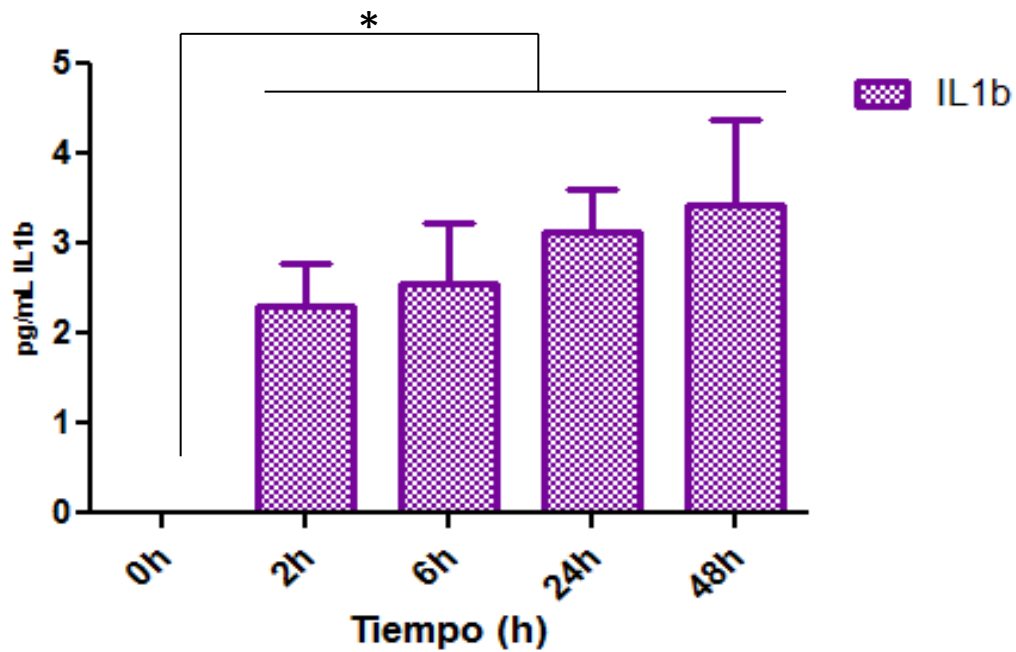
Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de queratinocitos activados con *Nocardia brasiliensis*, obtenidos tras a la cinética de 0, 2, 6, 24, 48 h post-infección. Respecto a los resultados de la cuantificación de las citocinas TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6 por el método de ELISA, los valores fueron sometidos a análisis estadístico usando el software Graph prism V. 6.0, utilizando la prueba no paramétrica ANOVA de dos vías.

La concentración de TNF- $\alpha$  muestra que a las 6 horas se alcanza la mayor expresión de esta citocina (25.024 pg/mL) y pasando este tiempo comienza a disminuir su expresión gradualmente (Figura 20). La prueba estadística de ANOVA de dos vías determinó que existe una diferencia significativa (\* $p < 0.05$ )



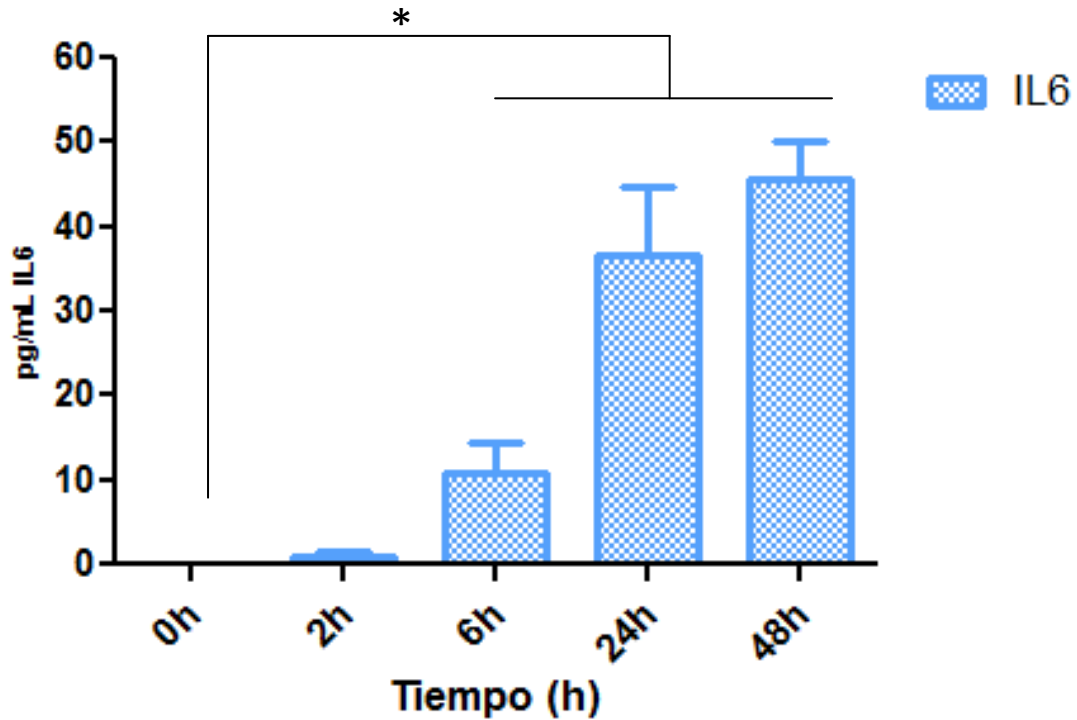
**Figura 20. Concentración de TNF $\alpha$  en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética a 72h. Por la técnica de ELISA \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$**

En la figura 21 se muestran los resultados correspondientes a la concentración de IL 1  $\beta$  la cual aumenta gradualmente conforme pasa el tiempo hasta alcanzar un valor máximo de 3.4 pg/mL a las 48 horas. La prueba ANOVA de dos vías realizado determinó que existe una diferencia significativa (\* $p < 0.05$ )



**Figura 21. Concentración de IL1 $\beta$  en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética a 72h. Por la técnica de ELISA \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ .**

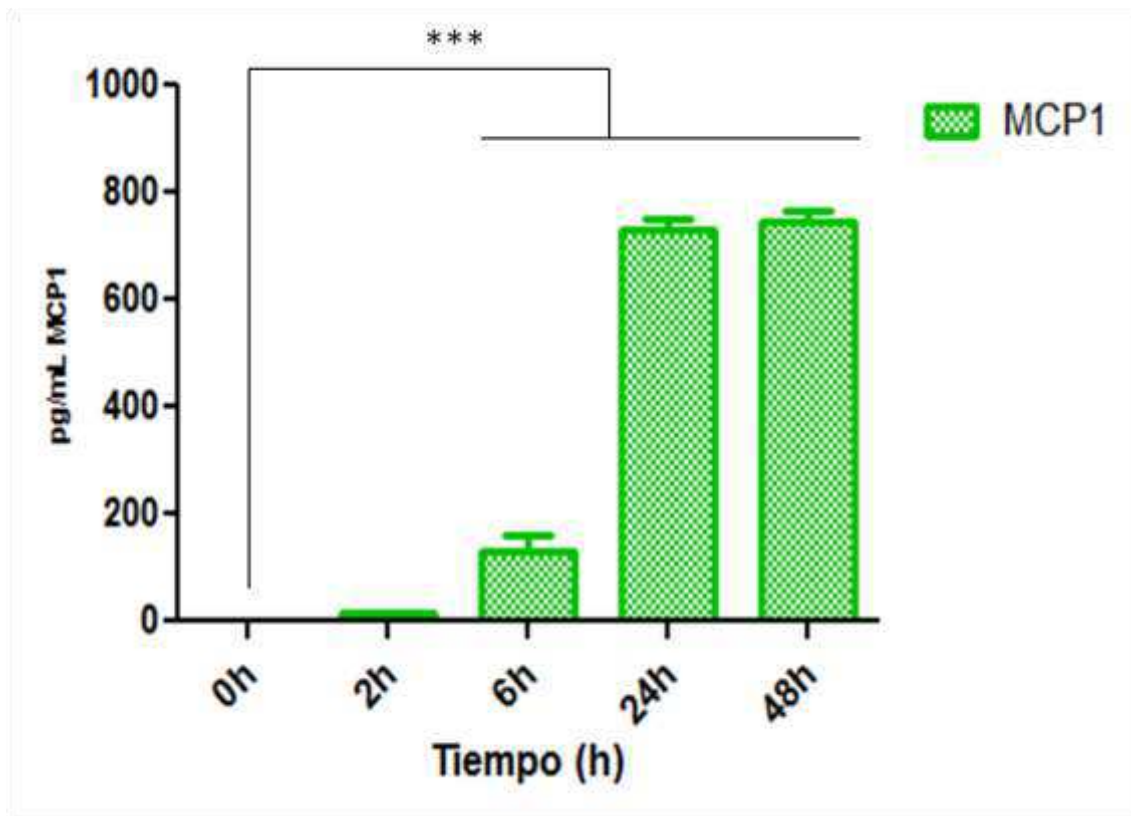
En la figura 22 se muestra la expresión de IL 6 donde se observa un aumento gradual de esta citocina desde las 2 horas hasta alcanzar un valor máximo de 45.8pg/mL a las 48 horas. El análisis estadístico realizado (ANOVA de dos vías) determino que existe una diferencia significativa (\* $p < 0.05$ ) entre los grupos.



**Figura 22. Concentración de IL6 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética a 72h. Por la técnica de ELISA \*p<0.005**

Por otra parte, los resultados correspondientes a la expresión de MCP1 muestran que el valor máximo alcanzado (759.450 pg/mL) se encuentra a las 48 horas aunque el incremento se da desde las 24 horas sin observar disminución hasta las 72 horas (Figura 23). La prueba ANOVA de dos vías realizado determinó que existe una diferencia muy significativa (\*\*p<0.0005)





**Figura 23. Concentración de MCP1 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética a 72h. Por la técnica de ELISA \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.005$  y \*\*\*= $p < 0.0005$ .**

Los resultados de la expresión de IL 8 se muestran en la figura 24 donde aunque hay una disminución de la expresión a las 6 horas se alcanza un valor máximo de 3584.7pg/mL a las 48 horas. Esta diferencia puede explicar que la prueba ANOVA de dos vías realizado determino que existe una diferencia muy significativa (\*\*= $p < 0.0005$ )

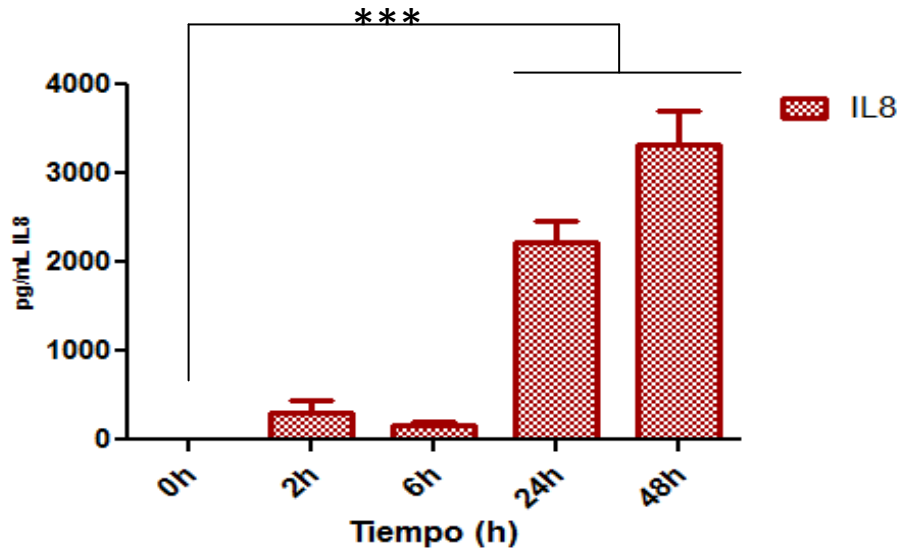


Figura 24. Concentración de IL8 en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética a 72h. Por la técnica de ELISA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  y \*\*\* $p < 0.0005$ .

La figura 25 muestra a modo de resumen la expresión de las citocinas en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*, se puede notar que las dos citocinas que más se expresaron fueron MCP1 e IL8 ambas a partir de las 24 horas. Caso contrario de la IL1 $\beta$  que presento una muy baja expresión a comparación de las demás citocinas.

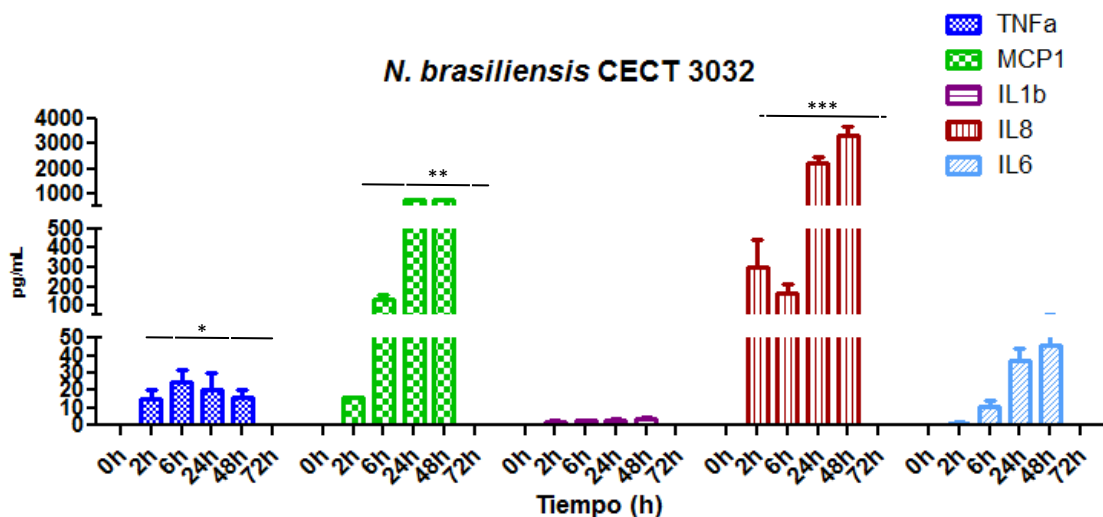


Figura 25. Concentración de citocinas (TNF- $\alpha$ , MCP1, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6) en queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis*. MOI 10:1. Cinética de 2, 6, 24, 48 y 72h. Por la técnica de ELISA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .

## 9. Discusión

La piel es el órgano más grande de nuestro cuerpo, se considera como la barrera externa dinámica más importante formada por diferentes tipos celulares capaces de desempeñar mecanismos de resistencia innata y adaptativa. Estos se activan cuando existen agresiones al tejido que le produzcan un daño protegiéndola así de los diversos agentes causantes ya sean microbianos, químicos o físicos [14, 28,45]. El daño que puede sufrir la piel, en consecuencia genera un proceso inflamatorio, que desencadena a la respuesta inmune innata encargada de movilizar rápidamente los componentes de la respuesta del huésped, como son los queratinocitos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, macrófagos, y compuestos químicos [15] .

Esta respuesta inflamatoria, actúa en la protección localizada en las enfermedades cutáneas desde el inicio de la infección; ejemplo de ello es el micetoma, una patología en la que el proceso generalmente tiende a ser crónico, pero que además requiere de inoculación traumática para ser capaz de penetrar esta primera línea de defensa.

Por ello para estudiar al micetoma desde que el microorganismo se encuentra inicialmente en la piel, se tomó como modelo al queratinocito humano por ser la principal población celular presente en la epidermis de la piel, además de que se ha observado que son células inmunocompetentes frente a las infecciones [44] pues su participación en las enfermedades va más allá de servir únicamente como barrera física, tal como lo menciona Palma y colaboradores en un estudio realizado sobre la participación de los queratinocitos humanos en el actinomicetoma (2009)[15].

Lo anterior se puede suponer debido a que expresan una serie de receptores para diversas citocinas, así como para el reconocimiento de estructuras moleculares ampliamente conservadas presentes en los microorganismos por medio de los receptores tipo Toll (TLRs) de forma constitutiva o inducible. Por otra parte los queratinocitos son por sí mismos, una fuente importante de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  [14], quimiocinas (IL8 y MCP-1) y péptidos antimicrobianos que pueden ser sobre reguladas en casos de inflamación. En ambos casos tal como ocurre con los receptores su producción puede ser sobre regulada en presencia de inflamación [46].

En el presente trabajo se evaluó mediante un modelo *in vitro* la respuesta de queratinocitos y la sobreexpresión de sus receptores (TLR-2, TLR-4, TLR-6) frente a una infección por *Nocardia brasiliensis* y en consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, MCP-1) capaces de participar en una respuesta inmune contra el actinomicetoma.

Por ello se cuantificó la concentración de tres citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y dos quimiocinas (IL-8 y MCP-1). Esta evaluación mostró que las tres citocinas aunque están presentes en el medio, tanto su expresión como su concentración máxima en el medio, no logra alcanzar la expresión y la concentración de las quimiocinas (MCP-1 e IL-8) que tras la infección del queratinocito se expresan a partir de las 24 horas tanto por la técnica de ELISA como por PCR tiempo real.

Evidentemente se entiende que la concentración de las citocinas no tiene que ser forzosamente elevado para que el efecto biológico se manifieste, tal es el caso de un estudio realizado por Salinas y colaboradores (1999) en donde evaluaron mediante un modelo murino infectado con *N. brasiliensis* niveles circulantes de las tres citocinas aquí evaluadas (IL6, IL -1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ); en este estudio se manifestó en la primera semana de infección un aumento dramático de la producción de IL-6 el cual se mantiene hasta el cuarto día, pero no hay un incremento de las otras dos citocinas y sin embargo se mantiene la inflamación [13].

Por ello la presencia de estas citocinas nos permite sugerir, que se estimula en un inicio la inflamación como en el caso de la IL-6 que inició con una expresión notable desde las 2 horas alcanzando su máxima concentración a las 48 horas, en el estudio realizado por la técnica de ELISA, cumpliendo con lo esperado ya que esta citocina tiene la característica de estar presente en fases tempranas de infección, siendo capaz de estimular la formación de polimorfonucleares en médula ósea y la producción de proteínas de fase aguda en el Hígado [12,13].

En el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* es de suma importancia estudiar la inflamación ya que en esta enfermedad se ve afectada principalmente la piel y tejido celular subcutáneo [46] desde el momento en que entra el microorganismo al huésped así como cuando ya se observa la

presencia de granos en forma arriñonada rodeados por un conjunto de células inflamatorias principalmente polimorfonucleares, cercanos a la superficie de los granos, seguido de tejido de infiltración con macrófagos y células mononucleares rodeadas con linfocitos TCD4+ y TCD8+.[39,47, 48]. Por ello para su estudio se ha requerido la utilización de modelos animales (ratones y ratas) y de modelos celulares (macrófagos, queratinocitos) para lograr un entendimiento más profundo de la infección y de esta forma estudiar los mecanismos inmunológicos que contribuyen al establecimiento del actinomicetoma [13,48]. Debido a lo anterior es posible hacer comparaciones entre los modelos murinos y lo encontrado en cortes histológicos de paciente con dicho padecimientos e incluso en modelos celulares [48]. En todos estos modelos es común encontrar por las características de la infección un ambiente proinflamatorio, en el cual se mantiene la presencia de citocinas y quimiocinas como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e IL-8 lo que puede relacionarse con la activación de las células inmunes existentes como son las células dendríticas o los queratinocitos; la proliferación y diferenciación celular, la promoción de la migración de células como monocitos, neutrofilos, [49,50].

Esto refuerza el hecho de que al ser la expresión de quimiocinas (IL-8, MCP-1) superior a los niveles de citocinas estudiadas posteriormente a la activación del queratinocito por *N. brasiliensis* el papel primordial del queratinocito es atraer células (polimorfonucleares y monocitos) al sitio de infección.

Otro aspecto a considerar en el inicio de la infección es el crecimiento del microorganismo dentro del huésped, se ha descrito que *Nocardia brasiliensis* tiene la capacidad de crecer intracelularmente en macrófagos, de tal forma que ésta se internaliza y logra evadir los efectos tanto del sistema inmune como de los antibióticos utilizados para el tratamiento del actinomicetoma [51]. Coincidiendo con estos estudios se encontró en el queratinocito, una vez que comienza la infección por *N. brasiliensis*, ésta se replica hasta que logra internalizarse en la célula a las 2 horas y deja de replicarse manteniéndose latente hasta las 72 horas; sin embargo se desconoce la vía de interiorización que utiliza.

Debido a esta cualidad se han conducido estudios con antimicrobianos como oxazolidonas para probar su eficacia en el tratamiento del actinomicetoma

aparte del uso de los antibióticos ya establecidos como diaminodifenilsulfona y trimetoprim-sulfametoxazol [2,51].

Por otra parte, en los diversos casos clínicos en los que se estudia micetoma por *Nocardia brasiliensis* se ha planteado que independientemente del tratamiento la infección tiende a ser cónica y que además requiere de una protección contra infecciones de patógenos intracelulares atribuida principalmente a la respuesta inmune mediada por células T [52, 53]. Sin embargo, pese a que existe una respuesta inmune mediada por células T, *Nocardia brasiliensis* tiene la capacidad de permanecer latente en el huésped por un periodo prolongado con la formación de los granos en el tejido y con su capacidad de invadir a los fagocitos permitiendo su diseminación en el organismo sin que la respuesta inmune logre erradicarla por completo [13,52]. Es por ello que estudiar el inicio de la infección aunado a la inmunidad innata recobra relevancia pues permite anticipar las complicaciones encontradas con el progreso de la infección.

Una de las formas en que la inmunidad innata logra inducirse es mediante la expresión de una serie de receptores para el reconocimiento de estructuras moleculares ampliamente conservadas presentes en los microorganismos por medio de los receptores tipo Toll (TLRs) [17, 39]. De los ocho TLRs presentes en queratinocitos humanos en el presente estudio únicamente se determinaron tres; TLR2 capaz de identificar a peptidoglicano en bacterias Gram positivas, TLR4 acoplado a MD-2 y a CD14 reconoce lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas así como ácidos lipoteicoicos [39,54] y TLR6 capaz de reconocer a diacilgliceroles [16,17], por considerarse los más representativos .

Al realizar la infección con *Nocardia brasiliensis* de los queratinocitos humanos HaCat y evaluar la sobreexpresión de los receptores TLR 2, 4 y 6 por microscopía confocal se encontró que hasta las 24 horas postinfección se logra la máxima expresión de estos receptores principalmente de TLR4 seguido de TLR6 los cuales disminuyen a las 48 horas.

Este resultado no corresponde con lo esperado ya que la sobreexpresión de TLR4 generalmente se debe a la presencia de lipopolisacárido de bacterias Gram negativas unido con CD-14 y MD-2 [15, 38,55], dicha característica no corresponde a *Nocardia brasiliensis* por ser una bacteria intracelular facultativa

Gram positiva [12] en cuyo caso debería estimular principalmente a TLR2 [55] y al TLR6 [40].

Una explicación a esto puede ser que el TLR4 juega un importante rol en la iniciación de la inmunidad innata y la respuesta inmune [38], además de que en conjunto CD-14 y MD-2 logra unirse al ácido lipoteicoico reconociendo de esta forma a bacterias Gram positivas, mientras que TLR6 se logra expresar considerablemente en función del reconocimiento de *Nocardia*.

De igual manera por PCR tiempo real, la expresión máxima del receptor de superficie TLR2 se observó a las 2 horas después de la infección, TLR4 se expresó a las 24 h y TLR6 se expresó a las 6 hrs post-infección. En ambos casos tanto en ensayos con PCR como con microscopía confocal se puede observar que el mayor nivel de expresión en los queratinocitos humanos tras la infección con *N. brasiliensis* es el de el TLR4, a las 24h.

La estimulación del TLR4 puede inducir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que a su vez controla genes para las citocinas inflamatorias como son la IL-1 $\beta$ , IL-6 y la quimiocina IL-8, así como la expresión de la molécula coestimuladora B7.1, la cual es requerida para la activación de células T.

La activación de TLR6 induce a NF- $\kappa$ B y a la c-Jun NH2 cinasa terminal (JNK) en un modo similar a TLR4 [56].

Los datos anteriores señalan que la infección del queratinocito con *N. brasiliensis* promueve la sobreexpresión de los receptores tipo Toll y en consecuencia permite la liberación principalmente de las quimiocinas IL8 y MCP1, así como de las citocinas IL6, TNF $\alpha$  y en menor medida IL1 $\beta$  al medio en el que se encuentra.

## 10. Conclusiones

Los queratinocitos humanos HaCaT infectados con *N. brasiliensis* son células que contribuyen a la generación de un ambiente proinflamatorio por la producción de IL6 y TNF  $\alpha$ , aunado a esto también generan moléculas quimiotácticas como MCP1 e IL8 las cuales podrían contribuir al reclutamiento de neutrófilos y monocitos.

## 11. Perspectivas del proyecto

Se considera que es necesario continuar con estudios posteriores a este tema considerando:

- Estudiar la participación de otros receptores y mediadores de la inmunidad innata (MR, CR, etc.) en modelos *in vitro*
- Evaluar la respuesta *in vitro* con fracciones celulares de *N. brasiliensis*
- Evaluar las vías de activación de los receptores Toll en los queratinocitos infectados con *N. brasiliensis*
- Estudiar otras moléculas efectoras que podrían tener un papel importante en el control de la infección, por ejemplo: NO, ROS, Péptidos antimicrobianos, entre otros.
- Enfocar el modelo *In vitro* del queratinocito a un modelo murino en el cual se pueda evaluar de forma más certera el comportamiento de la infección por *Nocardia brasiliensis*.



## 12. Bibliografía

1. González O. A. Mycetoma in: Clinical Tropical Dermatology. Edited by Cañizares O. Oxford, Blackwell Scientific 2ed. 1975; 24-29.
2. Padilla D., Castrillón R., Palma R., Pech O. Kanamicina: una alternativa terapéutica para pacientes con actinomictomas. Revista Mexicana de Dermatología. 2011; 55(3):112-118.
3. Muñoz H. B., Noyola M. C., Palma C. G., Rosete D. P., Galván M.A., Manjarrez M. E. Actinomycetoma in arm disseminated to lung with grains of *Nocardia brasiliensis* with peripheral filaments. Mycopathologia. 2009; 168(1):37–40.
4. Castro M. B., Vera C. L., Ocampo C. J., Rendón A., Salinas C. M., Welsh O. Immune response to *Nocardia brasiliensis* extracellular antigens in patients with mycetoma. Mycopathologia. 2008; 165:127–134
5. Salinas C. M., Zúñiga J., Pérez R. L., Segoviano R. J., Vázquez M. A. *Nocardia brasiliensis* modulates IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c mice. Journal of Interferon & Cytokine Research. 2009; 29 (5): 273-271
6. Palma R., Cuevas M., Castrillón R., Vega M., Arenas G. Estudio longitudinal de mediadores inflamatorios (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mediante técnica de ELISA) en lesiones de actinomictoma provocadas por inoculación de *Nocardia brasiliensis* en ratones Balb/c. Revista Mexicana de Dermatología. 2010; 54(3):113-119
7. Méndez T. L., Mondragón G. R., Vega L. F., Dockrell H., Hay R., López M. R, Manzano G. P., Hernández H. F., Padilla D. C., Bonifaz A. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. Mycopathologia. 2004;158: 407–414
8. Magaña M. Mycetoma. International Journal of Dermatology. 1984; 23(4): 221-236.
9. Padilla C., Novales J., Juárez V., Flores A. Minimictoma. Presentación de un caso. Revista del Centro Dermatológico Pascua. 2004; 13 (1): 41-44.
10. Palma R. A., Castrillón R. L. E., Ramos N. E. L., Padilla D.C., Castro M. M. E. Determinación de IL-10 a partir de células mononucleares humanas estimuladas in vitro con *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Candida albicans* y *Madurella mycetomatis*. Revista Mexicana de Dermatología. 2008; 52(5):205-10.
11. Heuze I. I., Castrillón R. L. E., Garibay E. A., Sandoval T. H., Padilla D. C., Palma R. A., Santos A. L. Immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells and intracellular detection of IL-2, IFN $\gamma$  and IL-4 by flow cytometry in patients with actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* and *Actinomadura madurae*. Findings in six patients. Health. 2011;3(3): 172-178

12. Rosas T. A. G., Perez L. A. R., Bocanegra I. P., Perez R. L. I., and Salinas C. M. C. *Nocardia brasiliensis* induces an immunosuppressive microenvironment that favors chronic infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*. 2012; 80(7): 2493–2499
13. Salinas C. M. C., Torres L. E., Ramos A. I., Licon T. A. and Gonzalez S. D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infection and immunity*, 1999; 63(5): 2428–2432
14. Castrillón R. L. E, Palma R. A., Padilla D. C. La función inmunológica de la piel. *Revista Mexicana de Dermatología*. 2008;52(5):211-24
15. Palma R. A., Castrillón R. L., Encinas P. M., Padilla D. C., Arenas G. R. Participación de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra actinomicetoma. *Revista Mexicana de Dermatología*. 2009;53(5):225-33
16. Niebuhr M., Baumert K. y Werfel T. TLR-2-mediated cytokine and chemokine secretion in human keratinocytes. *Experimental dermatology*, 2010; 19: 873-877.
17. Pivarcsi A, Nagy I, and Kemeny L. Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Current Immunology Reviews*, 2005; 1: 29-42.
18. Jin B., Sun T., Yu X., Yang Y., and Yeo A. E. T. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012; 2012:1-32
19. Gutiérrez F. A. L. Búsqueda de la presencia de los receptores tipo Toll 2 y 4 en actinomicetomas de pacientes por *Nocardia brasiliensis* Informe de actividades de servicio social. Laboratorio de Inmunología UIDIS UAM Xochimilco 2011.
20. Forbes B. A., Sahm D., Weissfeld A. Badley y Scott. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 2004. 363-364.
21. Palma R. A., Cuevas M. M. V., Arenas G. R., Vega M. M.E., Castrillón R. L. E. Diseminación hematogénea por *Nocardia brasiliensis* en tres ratones Balb/c a partir de un micetoma en el cojinete plantar. *Revista Mexicana de Dermatología*. 2008;52(2):70-76
22. Trevino V. J. H., Vera C. L., Valero G. P. L. and Salinas C. M. C. *Nocardia brasiliensis* cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity*. 2012, 80(10):3587-3601.
23. Conde C., Melendro E. I., Fresaán M. y Ortiz O. L. *Nocardia brasiliensis*: mycetoma induction and growth cycle. *Infection and Immunity*. 1982, 38(3):1291.
24. Palma R. A., Castrillón R. L., Pizaña C. A., Vega M. M.E., López B. A. P., Arenas G. R. y Padilla D. C. Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. *Revista Mexicana de Dermatología* 2007;51(6):212-8

25. Bonifaz A., Tirado S. A., Calderón L., Saúl A., Araiza J., Hernández M., González G. M., Ponce R.M. Mycetoma: experience of 482 cases in a single center in México. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8(8):1-7
26. López M. R., Méndez T. L. J., Bonifaz A., Arenas R., Mayorga J., Welsh O., Vera C. L., Padilla D. M. del C., Contreras P. C., Chávez G., Estrada R., Hernández H. F. y Manzano G. P. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gaceta Médica de México*. 2013;149: 586-592
27. Jerez R., Schafer F., Fich F., García P., León P., González S. Actinomycotic mycetoma due to *Actinomyces madurae*. *Revista Chilena Infectología*. 2012;29(4):459-63.
28. Krishna S. & Miller L. S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections *Seminars in Immunopathology*. 2012, 34:261–280
29. Lulevich V., Yang H., Isseroff R.R., Liu G. Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy* 2010,110:1435–1442
30. Velásquez P. D., Pineda M. C., Cardona C. M. E., Gómez S. N. E., Gartz M. G.J., Úsuga G. I. C., Tróchez W. D. F., Londoño P. C. Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. *Revista Ingeniería Biomédica Medellín, Colombia*, 2008; 2(3):72-83
31. Nestle F. O., Di Meglio P., Qin J. and Nickoloff B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology* 2009,9:679-691
32. Association of the British Pharmaceutical Industry. Skin structure and function. [www.abpischools.org.uk/lib/lilInteractiveAnim/141/maginfacation%20of-the-epidermis.swf](http://www.abpischools.org.uk/lib/lilInteractiveAnim/141/maginfacation%20of-the-epidermis.swf) recuperado el 5 de octubre 2015.
33. Summerfield A., Meurens F., Ricklin M. E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*. 2015, 66 :14–21
34. Slominski A. T., Zmijewski M. A, Zbytek B., Brozyna A. A., Granese J., Pisarchik A., Szczesniewski A., and Tobin D. J. Regulated Proenkephalin Expression in Human Skin and Cultured Skin Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011, 131(3): 613–622.
35. Novak N, Bieber T. The skin as a target for allergic diseases. *Allergy* 2000; 55:103-7.
36. Del Río D. Y., Velásquez M. M. Inmunidad innata en la piel. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 2011; 19: 307-318.
37. Chen L., Guo S., Ranzer M. J., and DiPietro L. A. Toll-like receptor 4 plays an essential role in early skin wound healing *Journal of Investigative Dermatology*. 2013; 133(1): 258–267

38. Crespo L. A., Juárez R. C. y Plaza M. V., Papel de los receptores Toll-like en las enfermedades respiratorias. *Archivos de Bronconeumología*. 2010;46(3):135–142
39. Millán C. B.E., Hernández H. F., Pérez T. A., Méndez T. L. J. y López M. R. In situ TLR2 and TLR4 expression in a murine model of mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2011; 61: 278–287
40. Mesa V. M., Patiño P.J. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología*, 2006; 25(2): 115-130
41. Frleta D., Noelle R.J., Wade W. F. CD40-mediated up-regulation of Toll-like receptor 4-MD2 complex on the surface of murine dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;74(6):1064-1073
42. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 2005; 17( 1): 1–14
43. Ommori R., Oujii N., Mizuno F., Kita E., Ikada Y., Asada H. Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microbial Pathogenesis* 2013;56:35-39
44. Padilla D C, Novales SCJ, Ortiz ÁM, Cruz P D M. Micetoma torácico con afectación pulmonar. *Revista Mexicana de Dermatología* 2010; 54(1):30-35.
45. Schwarz T. Skin immunity. *British Journal of Dermatology* 2003; 149 (66): 2–4.
46. Valdivia S. J., Maya P. M. y Peña F. J. Las células guardianes residentes de la piel y su papel en la respuesta inmune. Parte 1 Cells resident guardians of the skin and its role in the immune response. *Dermatología Peruana* 2014; 24 (1):19-26.
47. Padilla D.M. C. y Vidal A. Micetoma en dorso por *Nocardia brasiliensis* Comunicación de un caso. *Revista Centro Dermatológico Pascua* 2004;13(1):33-36.
48. Palma R. A., Espinosa A. V.K., Castrillón R. L. E., Nájera M. O., Vega M. M. E., Arenas G. R., Drago S. M. E., Sainz E. T Stimulation of the Protective Response to Actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* in Mice Treated with *Candida albicans* Antigens. *Advances in Microbiology* 2014; 4, 297-305.
49. Díaz N.L., Ponce L.V., Corado J., Tapia FJ., Células de Langerhans. Los inmunocitos viajeros de la piel. Langerhans cells. The skin travelling immunocytes. *Dermatología Venezolana*, 1998, 36: 85-92.
50. Navarrete P. O. Las quimiocinas *Revista Hospital General Dr. M Gea González* 2000;3(1):30-32
51. Espinoza G. N. A., Welsh O., Waksman T. N., Cavazos R. N., Ocampo C. J., Said F. S., Lozano G. G., Choi S.H. and Vera C. L. Efficacy of DA-7218, a New Oxazolidinone Prodrug, in the Treatment of Experimental

- Actinomycetoma Produced by *Nocardia brasiliensis*. *Molecules* 2008, 13, 31-40.
52. Gonzalez S. M. L., Salinas C. M.C., Pérez R. I. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology* 2009, 57:17-24.
  53. Rodríguez A. M., Padilla D.M. C., Ramos A. G., Lara T. M. Micetoma de inoculación múltiple por *Nocardia brasiliensis*. *Revista Centro Dermatológico Pascua*. 2004, 13,( 1)
  54. Adam B. I., Gutiérrez V. G., A. Ballesteros V. A. Efecto del ácido lipoteicoico sobre la expresión de genes en cardiomiocitos de ratón (H9c2). Effect of lipoteichoic acid on gene expression in mice (H9c2) cardiomyocyte. *Revista Odontológica Mexicana* 2013;17 (4): 228-234
  55. Song P.I., Park Y. M., Abraham T, et al. Human keratinocytes express functional CD14 and Toll-like receptor 4. *Journal of Investigative Dermatology* 2002;119(2):424-32
  56. Ruíz L. C. y Gutiérrez V. G. Receptores Toll y mecanismo de transducción en la inmunidad innata *Revista de Educación Bioquímica*, 2003; 22 (2): 67-75

### 13. Anexos

#### Anexo 1 Preparación de buffer fosfato salino (PBS) 1x

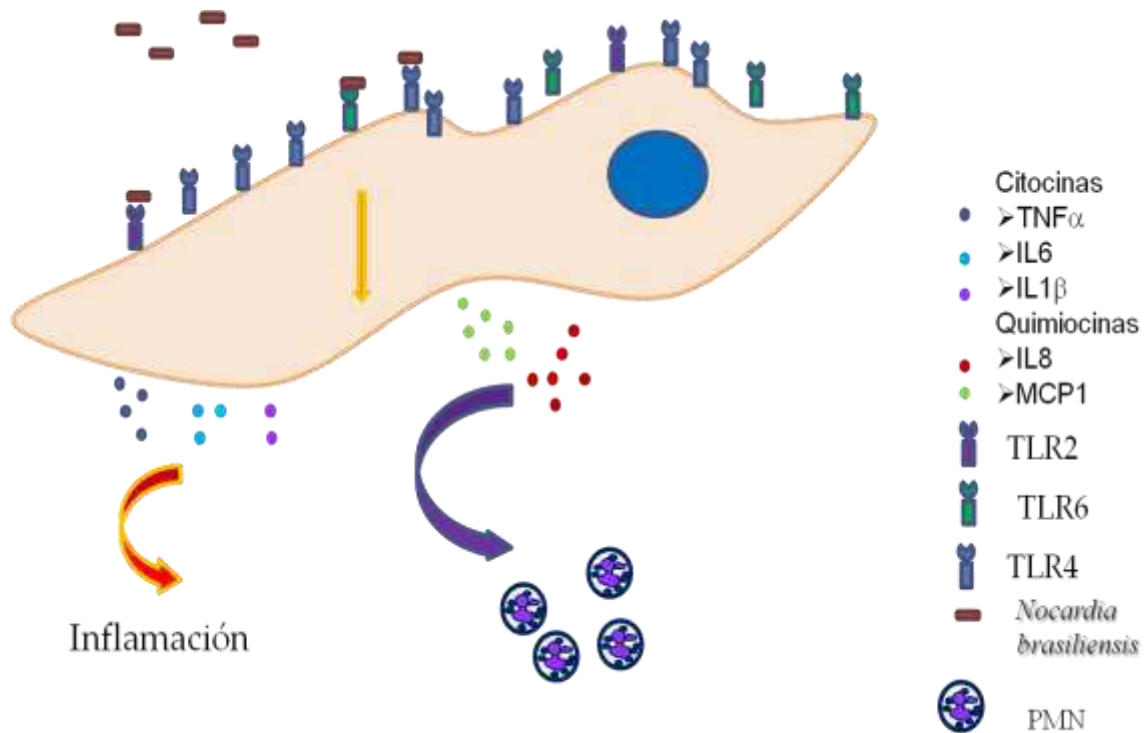
Para preparar 1L (1000mL) de buffer se requerirán :

- 8.06g de NaCl
- 0.22g de KCl
- 1.15g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.20 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1L de agua desionizada

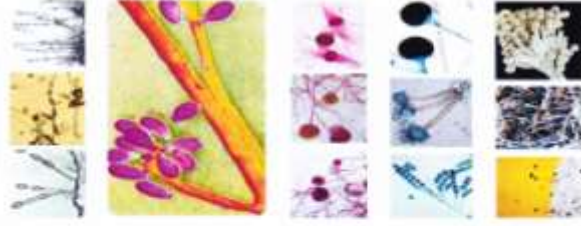
Procedimiento:

1. Añadir las sales a un vaso de precipitados de 1000mL
2. Añadir el 80% del volumen de agua desionizada requerido y mezclar hasta diluir las sales
3. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1M o NaOH 10M (según sea necesario) gota a gota.
4. Aforar la solución con agua desionizada hasta 1000mL
5. En caso necesario filtrar la solución a través de unidades de filtración o discos de 0.45 µm para eliminar partículas suspendidas.
6. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C
7. Almacenar a temperatura ambiente (uso rutinario) o bajo refrigeración entre 4 y 8 °C.

Anexo 2. Expresión de los receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en el queratinocito humano.



La infección de los queratinocitos humanos con *Nocardia brasiliensis* permite la sobreexpresión de los receptores tipo Toll. Con ello a su vez se estimula la expresión de citocinas como TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  capaces de participar en promoción de un ambiente inflamatorio, además de la producción de quimiocinas IL8 y MCP1 las cuales podrían contribuir al reclutamiento de neutrófilos y monocitos.



Otorga la presente

## CONSTANCIA

ã: Sánchez Hernández Gisela Monserrat, Alejandro Palma-Ramos,  
Laura Estela Castrillón-Rivera, Jorge Ismael Castañeda- Sánchez.


Por su Participación como Ponente con el tema:

"Estudio de la expresión de los receptores tipo-Toll y la cuantificación  
de las citocinas proinflamatorias en queratinocitos humanos activados  
con *Nocardia brasiliensis*"

## "XIX Simposium de Micología"

Realizado los días 5 y 6 de noviembre de 2015  
en la Unidad Xochimilco

  
Mtro. Rafael Díaz García  
Director de la División CBS

  
Dra. Julia Pérez Ramos  
Jefa del Departamento  
de Sistemas Biológicos

  
M. en C. Alejandro Palma Ramos  
Presidente del Comité organizador



## La Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Otorgan la presente

A: QFB. Gisela Monserrat Sánchez  
Hernández

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos

Por haber impartido el seminario de actualización: "Estudio de la expresión de los receptores tipo-Toll (TLR2, TLR4 y TLR6), y la cuantificación de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 E IL-6) en queratinocitos humanos (HaCat), activados con Nocardia brasiliensis ", celebrado el día 4 de noviembre de 2015, dentro del Ciclo de Seminarios del trimestre 15-Otoño de la

  
Dr. Martín Gómez Hernández

Coordinador de la  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas