

## Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón

Alejandro Palma Ramos,\* Laura Estela Castrillón Rivera,\* Julián Javier Elija Sánchez,\*  
Carmen Padilla Desgareñes,\*\* Yvonne Heuze IJ\*\*\*

### RESUMEN

La carencia de un modelo experimental en infecciones por *Actinomadura madurae* nos ha llevado a reproducir las condiciones reportadas con el uso de *Nocardia*. Por esta razón, el objetivo del presente estudio consistió en infectar ratones CFW, CD1 y Balb/c por la vía del cojinete plantar con las cepas de *A. madurae* ATCC 19425 y GIIAP-1 emulsificadas en adyuvante incompleto de Freund. Se cuantificaron semanalmente los diámetros de las patas y se realizaron análisis histológicos de los pulpejos así como la búsqueda de la bacteria por la tinción de Brown-Brenn.

Los resultados obtenidos demuestran que se logró la infección al encontrar la presencia de *A. madurae* en el tejido muscular del cojinete plantar únicamente en la cepa Balb/c, sin embargo, no se presentó respuesta inflamatoria lo que sugiere que la posibilidad de que esta bacteria induzca temporalmente algún mecanismo de tipo anérgico en el huésped infectado.

Palabras clave: *Actinomadura*, actinomicetos, actinomicetoma, micetoma.

### ABSTRACT

*The absence of an experimental model by Actinomadura madurae infections led us to reproduce the reported conditions using Nocardia. In consequence we infected CFW, CD1 and Balb/c mice in footpad with ATCC 19425 and GIIAP-1 Actinomadura madurae strains emulsified with incomplete Freund adjuvant. Weekly the diameters of footpads were measured. The histologic analysis by H-E stain and the search of bacteria by Brown-Brenn technique were done at these samples. Our results demonstrate the presence of the infection in muscular tissues only in Balb/c mice, however the inflammatory response was absent, this findings suggest us that this bacteria can induce temporary anergic response in infected host.*

Key words: *Actinomadura*, actinomycetes, actinomycetoma, mycetoma.

### INTRODUCCIÓN

El micetoma es un padecimiento que afecta el tejido subcutáneo, se disemina y profundiza hasta el hueso; su etiología puede ser micótica (eumicetoma) o bacteriana (actinomicetoma). La infección es por penetración transcutánea de las formas infectantes en heridas o traumatismos. Las manifestaciones clínicas son aumento de volumen, deformación de la región, pre-

sencia de fístulas y salida de líquido filante o purulento.<sup>1</sup> La información existente acerca de las complicaciones clínicas asociadas con el micetoma reportadas, son la formación de fístulas internas<sup>2</sup> y fracturas.<sup>3</sup>

Los principales agentes etiológicos del actinomictoma son *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidis caviarum* y *Streptomyces somaliensis*, en menor frecuencia se encuentran *Nocardia farcinica* y *Nocardiosis dassonvillei*.<sup>4</sup>

En estudios recientes realizados por el Dr. Lavalle y colaboradores en 625 pacientes con micetoma evaluados en el Centro Dermatológico Pascua de la Ciudad de México se presenta la información recopilada desde 1956 a 1991, en donde se reporta que la etiología preferente es para el actinomicetoma en 610 de los casos (97.5%), en contraste con eumicetomas con solamente 15 casos (2.5%). Los principales actinomicetos encontrados fueron *Nocardia* en 536 casos (85.7%) ocupan-

\* Profesor Investigador del Laboratorio. Inmunopotenciadores. Departamento de Sistemas Biológicos UAM Xochimilco, Calz. del Hueso 1100 Col. Villa Quietud Del. Coyoacán CP 04960 FAX 54837353.

\*\* Jefe del Laboratorio de Micología del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua.

\*\*\* Profesor Investigador Departamento Producción Agrícola y Animal UAM Xochimilco, Calz. del Hueso 1100 Col. Villa Quietud Del. Coyoacán CP 04960 FAX 54837585.

do *N. brasiliensis* el primer lugar con 419 casos (67%). El diagnóstico histopatológico de los granos de los pacientes estudiados demostró que de 114 muestras correspondían a infecciones por *Nocardia* sin determinar la especie, y solamente se encontraron 2 casos de actinomicetoma por *N. asteroides* y uno por *N. caviae*. La incidencia de actinomicetomas por *Actinomadura madurae* en este estudio fue de 65 casos lo que correspondió al 10.4% de los pacientes estudiados en donde 64 de los cuales la especie predominante fue *Actinomadura madurae* y solamente 1 caso por *A. pelletieri* (0.2%). Es importante mencionar que *Streptomyces somaliensis* fue identificado únicamente en 9 de los pacientes, lo que corresponde al 0.4% del total.<sup>5</sup>

Debido a la importancia de las bacterias como agentes causales del micetoma, es muy conveniente el poder contar con un modelo experimental adecuado ya que trae diversos beneficios como conocer aspectos de la relación huésped-parásito y cuáles podrían ser los mecanismos de agresión del patógeno o los mecanismos de defensa del huésped, una ventaja adicional es que sirve para posteriormente desarrollar métodos efectivos de diagnóstico y tratamiento.

Los modelos experimentales de micetoma se han logrado para las infecciones con *Nocardia* sp. en ratón por medio de dos estrategias, en primer lugar se encuentra el uso de inmunosupresores, generalmente, corticosteroides,<sup>6</sup> cuyo efecto es la destrucción de tejido linfático, lo que propicia condiciones favorables para que se desarrolle la infección. En segundo lugar tenemos el uso de adyuvantes que se mezclan con el inóculo para obtener una emulsión; logrando así una dosificación lenta y prolongada, además de causar un efecto irritante y propiciar el desarrollo de la infección.

Entre los modelos logrados con el uso de adyuvantes se encuentra el reportado por Folb y colaboradores en 1976 los cuales establecieron un modelo de infección por *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*. Sus hallazgos histopatológicos demostraron que las lesiones producidas son diferentes. Las lesiones de *N. asteroides* presentan supuración aguda en abscesos y las de *N. brasiliensis* producen granulomas además de una gran concentración de macrófagos los cuales contienen en su citoplasma organismos intracelulares.<sup>7</sup>

Zlotnic y Buckley en 1980 realizaron un estudio en que se indujo actinomicetoma crónico asociado a la producción de granos mediante la inoculación subcutánea de *Nocardia brasiliensis* en ratón Balb/c, y el uso de adyuvante incompleto de Freund en cojinete plantar. El micetoma apareció un mes después de la inoculación de  $1.2 \times 10^7$  UFC/mL de *N. brasiliensis* y tres meses des-

pues de la inoculación de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. La adición del adyuvante aceleró el desarrollo de la infección.<sup>8</sup>

Otro de los modelos reportados para producir actinomicetoma es el de Unaogu y colaboradores, para ello se inoculó *Nocardia transvalensis* en ratón utilizando adyuvante incompleto de Freund para ayudar a desarrollar el micetoma. La infección se manifestó como nódulos palpables bajo la piel, los cuales descargan pus color blanco o crema conteniendo gránulos nocardiales. Las lesiones en la piel necrosada del cojinete plantar provocaron la destrucción del hueso.<sup>9</sup>

En relación a las infecciones experimentales por *Actinomadura madurae* desgraciadamente aún no se cuenta con un modelo animal, por esta razón en trabajos anteriores de nuestro laboratorio estudiamos el efecto de dosis y sensibilidad a la infección en diferentes cepas de ratón utilizando CFW, NIH y CD1 los resultados obtenidos demostraron que las cepas NIH y CD1 son resistentes a la infección, en cambio los animales CFW son susceptibles a ser infectados y pueden utilizarse para cuantificar la dosis letal 50.<sup>10</sup> Sin embargo, los resultados anteriores se lograron cuando se utilizó la vía de administración intravenosa, lo que difícilmente es compatible con la vía de infección natural, por esta razón, el objetivo de este trabajo es establecer un modelo experimental de infección por *A. madurae* basado en el modelo de *Nocardia*, en donde la vía de administración es el cojinete plantar, lo que se acercaría a las condiciones normales de infección.

## MÉTODOS

### Animales:

Se utilizaron 3 cepas de ratón las cuales fueron CFW y CD1 proporcionadas por el bioterio de la UAM Xochimilco, y Balb/c donados por el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM; se formaron lotes de hembras entre 20 y 25 g.

### Inóculo:

Se utilizaron las cepas de *A. madurae* GIIAP1 (Grupo Internacional de Investigación de Actinomicetos Patógenos) y la cepa de referencia ATCC 19425, se sembraron en medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI), y se incubaron a 37°C durante 14 días hasta obtener suficiente biomasa, posteriormente se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min. a 4°C y se lavó por tres ocasiones en solución salina estéril 0.85% a pH 7.0. La biomasa así obtenida se agitó con perlas de vidrio para fragmentar la forma filamentosa hasta alcanzar la forma bacilar. La suspensión bacteriana se ajustó a los

tubos 10 y 2 del nefelómetro de Mc Farland que corresponden a  $3000 \times 10^6$  UFC/mL y  $600 \times 10^6$  UFC/mL respectivamente. Una vez estandarizada la suspensión bacteriana se preparó una emulsión con adyuvante incompleto de Freund en una proporción volumen a volumen y se les administró a cada animal un volumen final de 0.1 mL vía cojinete plantar.

#### Granos:

Se separaron los granos provenientes de un paciente infectado con *Actinomadura madurae*, los cuales fueron proporcionados por la Dra. Carmen Padilla D. del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, fueron lavados con solución salina estéril 0.85% y se inoculó un grano a cada animal resuspendido en esta misma solución.

#### Esquema de inoculación:

Se formaron siete lotes de 10 ratones cada uno, a cada ratón se le administró 0.1 mL del inóculo vía cojinete plantar en una de las extremidades traseras de acuerdo al esquema de inoculación presentado en el cuadro I.

Se dejó un lote de ratones testigo a los cuales se les inoculó 0.1 mL de solución salina estéril al 0.85%. Después de la inoculación se registró la dimensión de la pata inoculada utilizando un vernier, y se comparó con la pata testigo del mismo animal que se le administró únicamente el vehículo por la misma vía.

Once semanas después de la inoculación se sacrificaron los ratones Balb/c (para reproducir el esquema reportado en infecciones por *Nocardia*); y 22 semanas después de la inoculación las cepas CD1 y CFW, se amputaron las patas inoculadas fijándolas durante 20 días en formol, posteriormente las muestras se sometieron a un tratamiento de descalcificación de hueso con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 5% durante 7 días.<sup>11</sup>

Analisis histológico:  
Una vez degradado el hueso las muestras se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 5 micras aproximadamente. Para la descripción histológica de la lesión se realizó la técnica de tinción hematoxilina-eosina, y para la búsqueda de la bacteria en las muestras se uso la tinción Brown-Brenn, para confirmar la identificación de *Actinomadura madurae* se utilizó la técnica inmunohistoquímica marcaje anticuerpo peroxidasa.<sup>12</sup>

## RESULTADOS

La dimensión del cojinete plantar de ratones CD1 inoculados con la cepa de *Actinomadura madurae* GIIAP-1 se muestra en la figura 1 en donde se observa aumento en el tamaño del cojinete plantar, en los lotes que recibieron la emulsión con la bacteria más aun aquellos que recibieron dos dosis, sin embargo a partir de la semana 6 posinoculación ambos lotes se comportaron de la misma manera hasta el final del experimento presentando aumento en la dimensión de la pata, comparado con el lote testigo.

Los resultados que se presentan en la figura 2 corresponden a la dimensión del cojinete plantar de animales CFW inoculados en las mismas condiciones que el experimento anterior, encontrándose semejanzas en el aumento del volumen del pulpejo en la segunda semana, sin embargo a partir de la semana seis ambos lotes se comportaron de la misma manera.

La respuesta a la infección por dos cepas de *Actinomadura madurae* a dosis única en ratón Balb/c, se muestran en la figura 3, donde no se observa diferencia en la hinchazón de los pulpejos de los animales independiente del microorganismo utilizado ya que desde la semana 1 se alcanza el máximo diámetro (0.4 cm) y a partir de la semana tres se mantuvo el mismo valor hasta el final del experimento en la semana once.

En este estudio también se inoculó un lote de estos mismos animales con granos provenientes de un paciente con actinomicetoma por *A. madurae* los cuales fueron administrados vía cojinete plantar en solución salina isotónica. La respuesta de los animales a esta forma de inoculación presentó aumento de volumen de la pata, únicamente durante una semana ya que la dimensión del pulpejo regresó a sus niveles normales a partir de la segunda semana.

El análisis histológico de las muestras sometidas a la técnica de Hematoxilina-Eosina demostró que no se

CUADRO I. ESQUEMA DE INOCULACIÓN

Lote	A. Madurae	No. de dosis $3000 \times 10^6$ UFC/mL	No. de dosis $600 \times 10^6$ UFC/mL	No.
CFW	GIIAP1	1		
	GIIAP1	2		
CD1	GIIAP1	1		
	GIIAP1	2		
	GIIAP1		1	
Balb/c	ATCC		1	
	19425			
	Granos			1

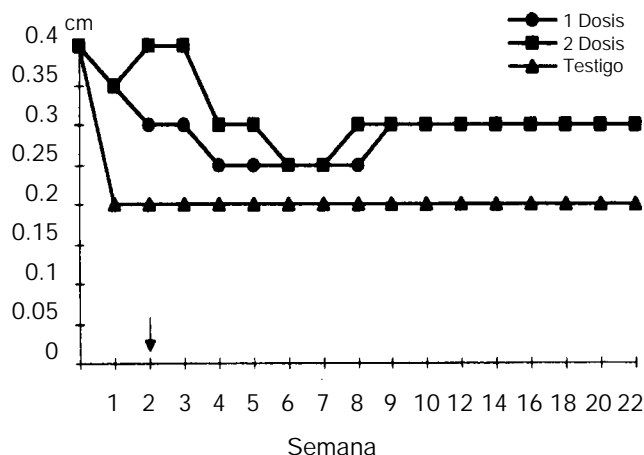


Figura 1. Dimensión del cojinete plantar en ratones CD1 inoculados con *A. madurae* GIIAP1. Con la cepa GIIAP1 de *A. madurae* en adyuvante incompleto de Freund se preparó una emulsión agua en aceite con una proporción volumen a volumen y se administró vía cojinete plantar 0.1 mL en ratones CD1 una o dos dosis del inóculo (se indica con una flecha el momento de la segunda inoculación). Se hicieron registros semanales de la dimensión del cojinete plantar.

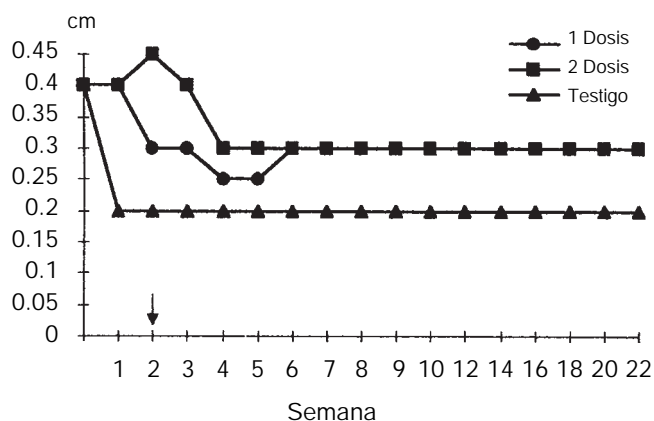


Figura 2. Dimensión del cojinete plantar en ratones CFW inoculados con *A. madurae* GIIAP1. Con la cepa GIIAP1 de *A. madurae* en adyuvante incompleto de Freund se preparó una emulsión agua en aceite con una proporción volumen a volumen y se administró vía cojinete plantar 0.1 mL en ratones CFW una o dos dosis del inóculo (se indica con una flecha el momento de la segunda inoculación). Se hicieron registros semanales de la dimensión del cojinete plantar.

presenta daño tisular en los pulpejos de los animales tratados ni algunas de las respuestas esperadas, es decir, inflamación, hipersensibilidad tardía o micetoma.

La búsqueda del microorganismo en los tejidos se realizó utilizando la tinción de Brown-Brenn y se encon-

tró su presencia, en el tejido muscular en 2 de los 10 animales Balb/c inoculados con la cepa ATCC 19425. En los animales inoculados con los granos de paciente o en las otras cepas de ratón no se logró la infección. (Figura 4).

La bacteria se presentó Gram positiva y con morfología diversa como cocos, bacilos y filamentos.

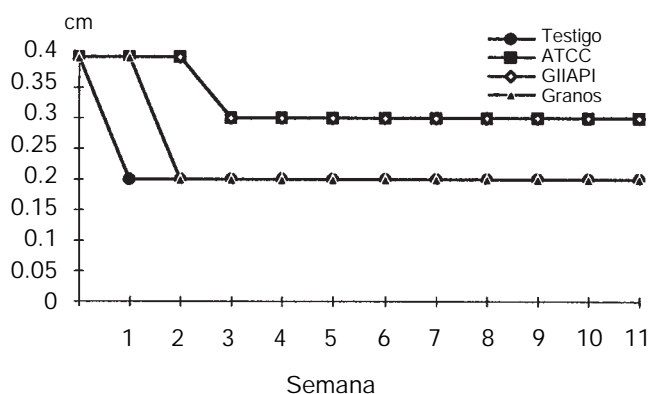


Figura 3. Dimensión del cojinete plantar en ratones Balb/c inoculados con *A. madurae* y granos de micetoma. A dos lotes de animales se inocularon con *A. madurae* de las cepas ATCC 19425 y GIIAP-1, un tercer lote recibió granos de micetoma obtenidos de paciente resuspendidos en solución salina en el mínimo volumen. Los tres grupos recibieron una dosis única del inóculo respectivo, vía cojinete plantar. El lote testigo recibió solución salina fisiológica estéril en volumen equivalente. Se hicieron registros semanales de la dimensión de la pata.

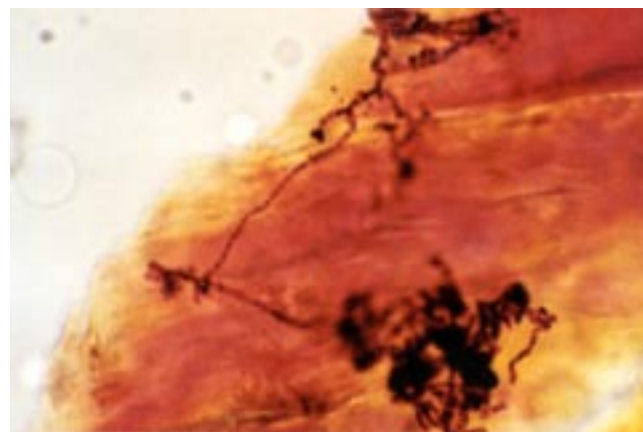


Figura 4. Análisis histológico. Apreciación histológica del cojinete plantar de ratón Balb/c inoculado con la cepa ATCC 19425 de *A. madurae* a las 22 semanas. Se observa el crecimiento de la bacteria en forma filamentososa y la ausencia total de células inflamatorias alrededor. Técnica Brown-Brenn. 100x.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que hubo aumento en el diámetro del cojinete plantar desde el momento de la inoculación hasta el final del experimento independientemente de la cepa de ratón y de *A. madurae* utilizada; excepto por los ratones Balb/c inoculados con granos de paciente que fue el único caso en que las patas recuperaron su dimensión normal, lo que demuestra la importancia del vehículo en el que se presentó la bacteria.

Histológicamente la inflamación se caracteriza por la presencia de células polimorfonucleares y macrófagos en el caso de respuestas agudas. Las características reportadas para el micetoma por *Actinomadura* son acúmulos bacterianos rodeados de células polimorfonucleares, sin embargo, en ninguna de las muestras se detectó la presencia de células inflamatorias aunque se demostró la presencia de la bacteria en los tejidos.

Al reproducir las condiciones experimentales para inducir actinomicetoma por *Nocardia*, ahora utilizando *A. madurae*, se logró la infección, lo que sugiere que probablemente sea cuestión de tiempo el lograr el micetoma. Sin embargo, es importante señalar que después de once semanas de evolución, se observa la presencia del microorganismo en el pulpejo sin manifestar ningún tipo de respuesta inflamatoria, lo que nos lleva a pensar que posiblemente *A. madurae* sea capaz de despertar respuestas de tolerancia inmunológica o anergia temporal que le permitan sobrevivir por largos periodos de tiempo.

La participación de respuestas anérgicas en patologías producidas por actinomicetos se ha reportado extensivamente en infecciones por *Mycobacterium leprae* donde se ha demostrado que las respuestas anérgicas a la lepromina se relacionan con la limitada capacidad para inhibir la multiplicación bacteriana.<sup>13</sup>

Otro reporte que apoya la pérdida de la capacidad inmunológica como responsable de la diseminación en actinomicetos, plantea un mecanismo diferente donde se observa que la infección de macrófagos murinos *in vitro* por *Mycobacterium kansasii* inhibe la expresión de antígenos Ia, por lo tanto interfiere en el proceso de presentación antigénica y así evade los mecanismos de protección inmunológica.<sup>14</sup>

Aunque a la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos que conducen a la incapacidad de respuesta inmune específica o anergia, se han realizado gran cantidad de estudios que permiten proponer diferentes mecanismos, los cuales se han estudiado desde hace varios años y se sugiere que probablemente la pérdida de respuesta celular específica se deba a la presencia

de linfocitos T supresores en modelos de hipersensibilidad retardada o en respuestas cutáneas.<sup>15</sup>

En procesos infecciosos se han descrito respuestas anérgicas en sarcoidosis, infecciones virales y en procesos granulomatosos en donde la respuesta celular esta abatida y las posibles explicaciones para esto se relacionan con la modificación del tráfico de linfocitos, ya que por la estimulación inmunológica se altera la arquitectura y función de órganos linfoides o bien por la participación de factores humorales que pueden deprimir la transformación de linfocitos,<sup>16</sup> sin embargo, el avance en el conocimiento de las respuestas inmunológicas ha permitido hacer nuevas propuestas en relación a la tolerancia inmunológica o anergia que de manera integral incluyen los siguientes mecanismos:

a) Ausencia de señales co-estimulatorias entre las células presentadoras del antígeno y el linfocito T (moléculas de superficie B7 y CD28 respectivamente).<sup>17</sup>

b) Participación de citocinas para la inducción de tolerancia periférica como lo son IL-10 e IL-12.<sup>18,19</sup>

c) Inducción de delección clonal o anergia clonal en células T respondedoras inducidas por superantígenos.<sup>20,21</sup>

Aunque desconocemos cual o cuales pueden ser los mecanismos involucrados para inducir respuestas anérgicas por *Actinomadura madurae* probablemente sean éstos los responsables de la lenta evolución que caracteriza al actinomicetoma inducido por esta bacteria.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que se logró producir la infección por *Actinomadura madurae* al demostrarse su presencia en el tejido muscular del cojinete plantar de ratón Balb/c sin que se presentara respuesta inflamatoria a las once semanas posinfección, lo que sugiere que es posible que esta bacteria induzca algún mecanismo de tipo anérgico en el huésped infectado.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Romero, Cabello R. Microbiología y parasitología humana. 1ª ed., Médica-Panamericana. México, 1993; pag. 334.
2. Fahal AH, Sharfi AR, Sheik HE, El Hassan, Maghoub S. Internal fistula formation; an unusual complication of mycetoma. Trans Roy Trop Hyg 1996; 90: 550-552.
3. Fahal AH, Sheik HE, El Hassan AM. Pathological fracture in mycetoma. Trans Roy Trop Hyg 1996; 90: 675-676.
4. Schaal KP, Beaman B L 1984. Clinical significance of actinomycetales. En: Goodfellow M, Mordarski, Williams ST

- (Eds.), The biology of the actinomycetes. London Academy press. pp. 389-424.
5. Lavalle P, Suchil P. 1991. Correlación etiológica, clínica y epidemiológica de los micetomas en México. Memorias XII Congreso Iberoamericano de Dermatología en Guadalajara, Jal. 30 nov-5 dic.
6. Mishra SK, Sandhu RS, Randhawa HS, DamodaranVN, Abraham S. Effect of cortisone administration on experimental nocardiosis. *Inf Immun* 1973; 7(2): 123-129.
7. Fold P, Jaffe R y Altmann G. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice. *Infection and immunity*. 1976; 13: 1490-1496.
8. Zlotnik H y Buckley H. 1980. Experimental production of actinomycetoma in Balb/c mice. *Infection and immunity* 1980; 29(3): 1141-1145.
9. Unaogu C, Gugnani H y Ikerionwu S. Experimental actinomycetoma due to *Nocardia transvalensis* in laboratory mice. *Mycoses* 1989; 32(2): 99-102.
10. Laura Castrillón R, Alejandro Palma R, Eduardo Gastellum I. Efecto de dosis y susceptibilidad a la infección por *Actinomadura madurae* en ratones CFW, NIH y CD1 *Rev Mex Cienc Farm* 1997; 28(1): 16-19.
11. Lynch JM, Raphael SS, Mellor DL, Spare DP, Inwood JHM. Descalcificación y tinción de hueso. en: *Métodos de Laboratorio* Cap. 40 Editorial Interamericana 1984 pag. 1173.
12. Cormack DH. La histología y sus métodos de estudio. en: *Histología de HAM*. 9a. ed Editorial HARLA 1987: 1-28.
13. Rojas-Espinosa O, Estrada-Parra S. Immunology of leprosy: cellular anergy to *Mycobacterium leprae*. *Arch Invest Med (Mex)* 1989; 20: 335-341.
14. Mshana NR, Hastings CR, Krahenbuhl LJ.) Infection with live mycobacteria in vitro inhibits in vitro detection of Ia antigen on macrophages. *Immunobiol* 1988; 177: 40-54.
15. Collins MF. Cellular antimicrobial immunity. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 1978; 7(1): 27-91.
16. Ward E, Bullock. Anergy and Infection. *Adv Intern Med* 1976; 21: 149-168.
17. Hedge HR. Anergy, AIDS and Tuberculosis. *Medical Hypotheses* 1995; 45: 433-440.
18. Grazia RM.) Anergy in sarcoidosis: The role of interleukin-1 and prostaglandins in the depressed in vitro lymphocyte response. *Clin Exp Immunol* 1984; 57(2): 324-330.
19. Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J Exp Med* 1997; 186(7): 1119-1128.
20. Van Parijs L, Perez VL, Abbas AK. Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Found Symp* 1998; 215: 5-14. Discussion 14-20: 33-40.
21. Vanier EL, Gérard J, Prud'homme. Cyclosporin A markedly enhances superantigen-induced peripheral T cell deletion and inhibits anergy induction. *J Exp Med* 1992;176(1): 37-46.
22. Blackman MA, Woodland DL. In vivo effects of superantigens. *Life Sci* 1995; 57(19): 1717-1735.