

## Artículo original

## Diseminación hematológica por *Nocardia brasiliensis* en tres ratones Balb/c a partir de un micetoma en el cojinete plantar

Alejandro Palma Ramos,\* María Vanesa Cuevas Moreno,\*\* Roberto Arenas Guzmán,\*\* María Elisa Vega Memije,\*\*\* Laura E Castrillón Rivera\*

### RESUMEN

**Antecedentes:** los micetomas actinomicéticos, específicamente los causados por *N. brasiliensis*, suelen invadir rápidamente los planos profundos; de allí que sea tan grave el pronóstico cuando se localiza en el tórax, ya que pueden invadir el canal vertebral y la médula espinal.

**Objetivo:** demostrar la diseminación hematológica e invasión a diferentes órganos de *Nocardia brasiliensis*, a partir de su inoculación en el cojinete plantar de ratones.

**Material y métodos:** se inocularon 39 ratones con 0.15 mL de una suspensión de *Nocardia brasiliensis* (concentración de 1.0 mg/mL) en el cojinete plantar. Los ratones control se inocularon con el mismo volumen de solución salina y por la misma vía. Los ratones con síntomas sistémicos fueron disectados para realizar estudios histológicos del cerebro y el riñón. Las tinciones se realizaron mediante las técnicas hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen, y se cultivaron en agar Sabouraud para el reisolamiento del microorganismo.

**Resultados:** todos los ratones desarrollaron micetoma en el cojinete plantar; tres de ellos tuvieron diseminación hematológica: dos manifestaron lesiones renales granulomatosas, y en el otro se detectaron grandes cantidades de bacilos delgados ácido alcohol resistentes en el cerebro y el riñón, el cual no tuvo reacción inflamatoria en dichos órganos ni coexistencia de granos.

**Conclusión:** *Nocardia brasiliensis* se diseminó e invadió los órganos por vía hematológica, a partir de micetomas en las extremidades, en 7.6% de los ratones infectados experimentalmente.

**Palabras clave:** micetoma, *Nocardia brasiliensis*, diseminación hematológica.

### ABSTRACT

**Background:** The actinomycetic mycetomas, mainly by *Nocardia brasiliensis*, show premature tendency to invade profound tissues, and so the serious prognostic in the dorsal localization that invades the vertebral channel and the spinal cord.

**Objective:** To demonstrate the blood dissemination and the invasion to organs by *Nocardia brasiliensis* since footpad mycetoma in Balb/c mice.

**Material and methods:** Thirty nine Balb/c mice were inoculated with 0.15 mL of a *Nocardia brasiliensis* suspension (1 mg/mL) by footpad route. The control animals received the same volume with saline solution. The animals that showed systemic symptoms were dissected and their brain and kidneys were analyzed by haematoxinil-eosin and Ziehl-Neelsen stains. Besides, the cultures in Sabouraud agar to reisolate the microorganism were done.

**Results:** All the animals developed *Nocardia brasiliensis* mycetoma in footpad, only three mice showed blood dissemination manifestations as granulomatous lesions and numerous fast acid resistant thin bacilli in kidney and brain associated with brain damage without inflammatory reaction in these organs or grain presence.

**Conclusion:** *Nocardia brasiliensis* is able to disseminate and invade organs by blood since mycetoma in extremities in 7.6% of the cases, during murine experimental infection.

**Key words:** mycetoma, *Nocardia brasiliensis*, blood dissemination.

\* Profesor Investigador del Laboratorio de Inmunopotenciadores. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos.

\*\* Servicio de micología.

\*\*\* Servicio de dermatología. Hospital General Manuel Gea González.

Hueso 1100, colonia Villa Quietud, CP 04960, México, DF. E-mail: apalma@correo.xoc.uam.mx

Recibido: enero, 2008. Aceptado: febrero, 2008.

Este artículo debe citarse como: Palma RA, Cuevas MMV, Arenas GR, Vega MME, Castrillón RLE. Diseminación hematológica por *Nocardia brasiliensis* en tres ratones Balb/c a partir de un micetoma en el cojinete plantar. Dermatol Rev Mex 2008;52(2):70-76.

Correspondencia: Dr. Alejandro Palma Ramos. Laboratorio de Inmunopotenciadores, Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calzada del

**E**l micetoma es una enfermedad granulomatosa e inflamatoria progresiva que afecta frecuentemente el tejido subcutáneo, después de la inoculación traumática del organismo causal.<sup>1,2</sup> La enfermedad no es detectada por el paciente, a menos que sea visible macroscópicamente, pues desde el inicio de la infección es indolora y puede transcurrir mucho tiempo (de meses a años) para detectar la tumoración y se forme el grano característico.<sup>3</sup> El micetoma por *Nocardia brasiliensis* invade los planos profundos, y en algunas ocasiones el canal vertebral y la médula espinal, lo que produce parálisis, parestias e incluso la muerte por ataque a los centros nerviosos superiores; igualmente la localización en la cara anterior del tórax puede ser mortal, ya que invade la pleura y los pulmones. La penetración al esqueleto se hace, primero, por el periostio y después al hueso mismo, con lo que origina lesiones de diferente tipo.<sup>4</sup> Bèzes estableció la relación entre la imagen radiológica de las lesiones y el agente causal del micetoma.<sup>5</sup>

En México la enfermedad es común en los hombres (proporción 3 o 4:1) de 31 a 45 años de edad, y es menos frecuente a los 60 años. En lo que a ocupación respecta, la infección predomina en los campesinos, pero también se ha encontrado en estudiantes, profesionistas, obreros, amas de casa, etc.<sup>6</sup> El agente causal predominante implica actinomicetos (97.2%), de los cuales *Nocardia* corresponde a 85.6% de los casos, específicamente *Nocardia brasiliensis* (71.9%), *Actinomadura madurae* (9.6%), *Streptomyces somaliensis* (11.6%) y *Actinomadura pelletieri* (0.12%).<sup>7</sup> Los microorganismos aislados con mayor frecuencia en países africanos son *Madurella mycetomatis*, *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae*.

*Nocardia* tiene la capacidad de invadir el cerebro de muchos mamíferos y causar diversas infecciones en el sistema nervioso central de los humanos.<sup>8</sup>

En 1891 Eppinger reportó el caso de un hombre de 52 años de edad que desarrolló meningitis, un absceso cerebral y hemiplejía del lado izquierdo por *Cladothrix asteroides*, ahora conocida como *Nocardia asteroides*.<sup>9,10</sup> La predilección de este microorganismo por el cerebro, como el sitio secundario de la infección, se ha reportado en 23% de las metástasis, seguida de la infección pulmonar.<sup>11</sup> También se han reportado casos en los que se observaron abscesos y en otros no.<sup>12-14</sup>

En modelos de experimentación animal se ha demostrado que los ratones infectados por vía intravenosa con

*Nocardia asteroides* GUH-2 desarrollan distintos signos neurológicos, ocasionados por la disminución en la concentración de L-dopa como resultado del crecimiento de dicho microorganismo en el cerebro de los ratones.<sup>15</sup>

El objetivo de este estudio fue demostrar la diseminación hematogena e invasión a diferentes órganos de *Nocardia brasiliensis*, a partir de un micetoma en el cojinete plantar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 39 ratones Balb/c hembras de 21 g de peso, proporcionados por la unidad de reproducción y experimentación animal de la UAM Xochimilco. *Cepa del microorganismo*: se aisló *Nocardia brasiliensis* de un paciente del servicio de micología del Hospital General Manuel Gea González, cultivada en medio Sabouraud a 37°C durante 15 días; se filtró en papel filtro núm. 41, se pesó y se resuspendió en solución salina a 1 mg/mL; posteriormente, se agitó con perlas de vidrio y un agitador mecánico durante dos horas. En todos los ratones se inocularon 0.15 mL de una suspensión de *Nocardia brasiliensis* (1.0 mg/mL), en el cojinete plantar derecho. Los ratones control (n=11) se inocularon con el mismo volumen de solución salina en la pata derecha y por la misma vía. Después de dos meses se aplicó un refuerzo por la misma vía, volumen y suspensión. *Histología*: se sacrificaron los animales que manifestaron el cuadro clínico de septicemia (inflamación, dolor abdominal, hemiparesia), y se disecaron el riñón, músculo esquelético, cerebro, mesotelio, bazo y cojinete plantar. Se realizó la técnica de impregnación en parafina y las tinciones de hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen. *Tinción con hematoxilina-eosina*: se desparafinó la muestra, se tiñó con hematoxilina de Harris durante un minuto y se realizó un lavado. Se diferenció con alcohol ácido, se lavó y viró con agua amoniacal; nuevamente se lavó la muestra, se aplicó eosina durante 30 segundos, se deshidrató y se observó al microscopio. Se observan núcleos azules y citoplasma en color rosa o naranja.<sup>16</sup> *Tinción con Ziehl-Neelsen*: se desparafinó la muestra, se tiñó con carbol fuchsina, se calentó a emisión de vapores durante cinco minutos, se lavó con agua y decoloró con alcohol-ácido al 3%; se lavó nuevamente con agua, se hizo el contraste con azul de metileno durante un minuto, se enjuagó y secó a temperatura ambiente. Se observan bacilos rojos con fondo azul. *Cultivo (reaislamiento)*: se

obtuvo una porción del órgano donde apareció la lesión, se tiñó con un mortero, una malla de plástico y solución salina estéril; se tomaron 0.5 mL de dicha suspensión y se extendió en cajas de Petri con agar Sabouraud; finalmente, se incubó a 37°C durante ocho días.

## RESULTADOS

Todos los ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* en el cojinete plantar desarrollaron el micetoma a los dos meses de inoculación (figura 1); 3 (7.6%) de éstos manifestaron los siguientes cuadros clínicos: grupo A: inflamación en los pómulos, dolor abdominal, pelo erizado, pata derecha inflamada e hipoactividad (n=2 ratones). Grupo B: hemiparesia, movimiento giratorio al levantarlo de la cola, dolor abdominal e hipoactividad (n=1 ratón).

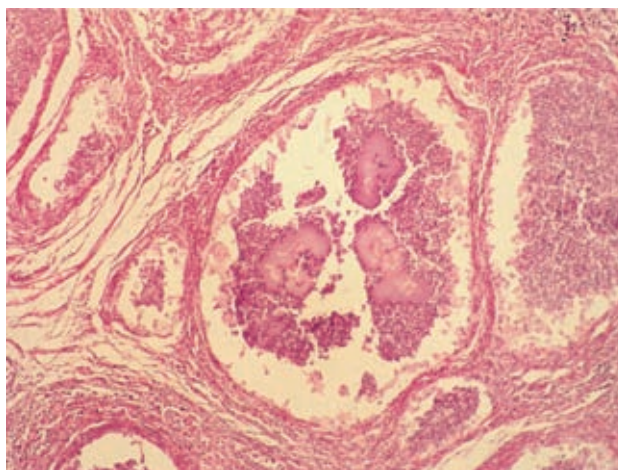


**Figura 1.** Ratón con micetoma después de dos meses de evolución.

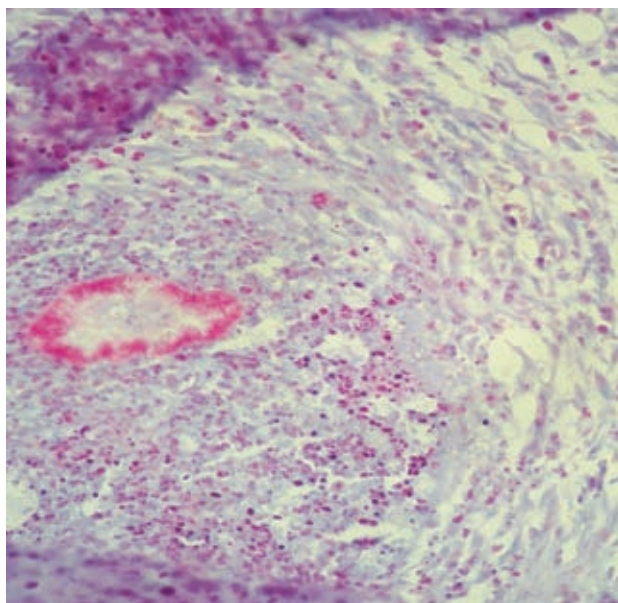
En la disección del cojinete plantar derecho se encontró el micetoma (figura 2); se observaron granos pequeños de forma arriñonada, poco afines a la hematoxilina, característicos de la infección por *Nocardia brasiliensis*.

Al realizar la tinción de Ziehl-Neelsen (figura 3) se encontró una reacción positiva y bacilos ácido alcohol resistentes en el grano, principalmente en los microorganismos localizados en la periferia, con lo que se demostró la coexistencia de *Nocardia brasiliensis*.

En la disección de los ratones del grupo A se observaron abscesos en la pierna derecha (figura 4) y en los riñones,



**Figura 2.** Ratón con dos meses y medio de infección. Tinción de hematoxilina-eosina (40X), se observan los granos característicos, pequeños y de forma arriñonada.

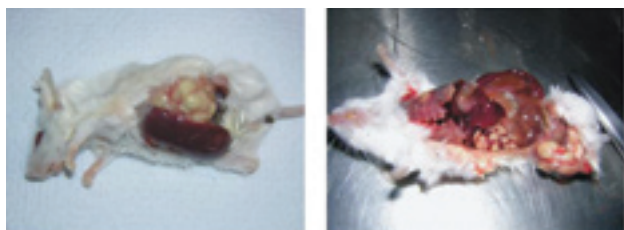


**Figura 3.** Ratón con dos meses y medio de infección. Tinción con Ziehl-Neelsen (40 X), se observan bacilos ácido alcohol resistentes en la periferia del grano.

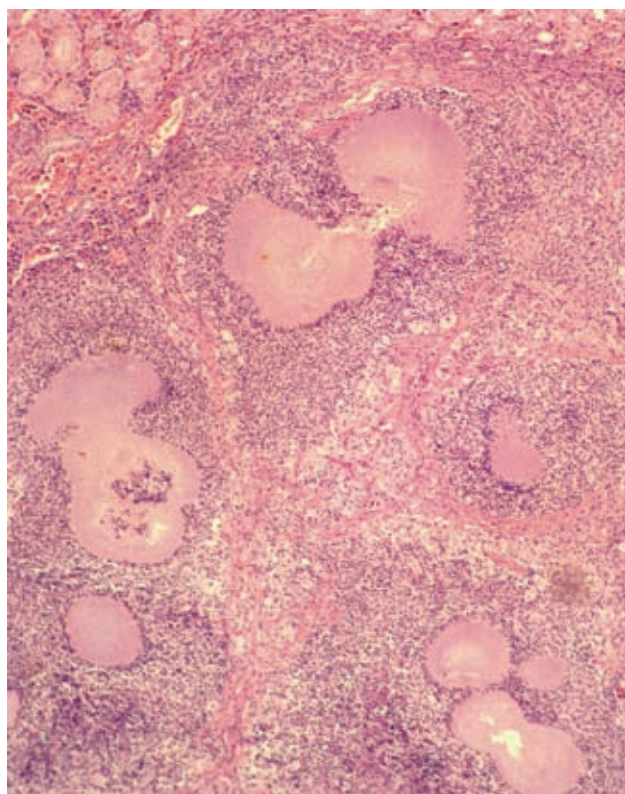
por diseminación hematogena a partir de las lesiones en la pierna infectada.

En los riñones se encontraron múltiples abscesos. Al realizar las biopsias y los cortes teñidos con hematoxilina-eosina (figura 5) observamos granos pequeños con forma arriñonada, característicos de la infección por *Nocardia brasiliensis*, lo que hizo pensar en diseminación hemató-





**Figura 4.** Abscesos después de dos meses y medio de inoculación en el riñón y músculo esquelético (en pata); aumento considerable en el tamaño del bazo. Micetomas en la pata y el mesotelio.

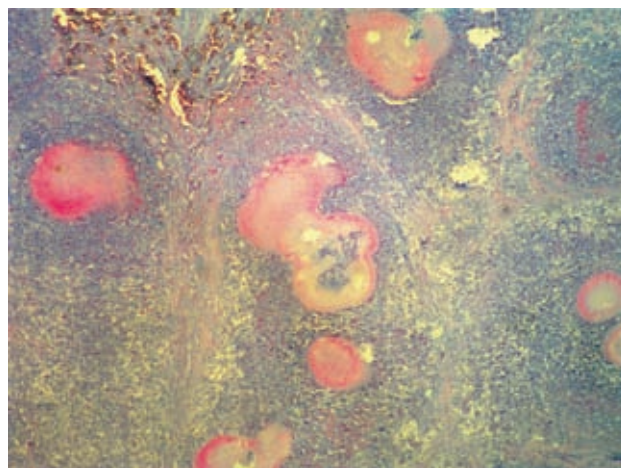


**Figura 5.** Micetoma renal teñido con hematoxilina-eosina, se aprecian los característicos granos pequeños arriñonados (40 X).

gena, ya que los animales fueron infectados vía cojinete plantar.

En las muestras teñidas con Ziehl-Neelsen (figura 6) se observó una reacción positiva para bacilos ácido alcohol resistentes en el grano, principalmente en los microorganismos localizados en la periferia del grano, con lo que se confirmó *Nocardia brasiliensis*.

A partir de los abscesos renales se aisló *Nocardia brasiliensis* en medio Sabouraud (figura 7), y a los ocho días de incubación a 37°C se encontró el microorganismo con su



**Figura 6.** Micetoma renal teñido con Ziehl-Neelsen, se observan los característicos granos pequeños arriñonados (40 X).



**Figura 7.** Aislamiento de *Nocardia brasiliensis* del absceso renal.

morfología colonial característica (blancas-amarillentas), en forma de “palomita de maíz”, mediante la prueba de caseína positiva.

El ratón del grupo B tuvo desviación de la cabeza y disfunción al caminar (figura 8), movimiento giratorio (hemiparesia) al suspenderlo por la cola, e hipoactividad, que son parte de los signos neurológicos.

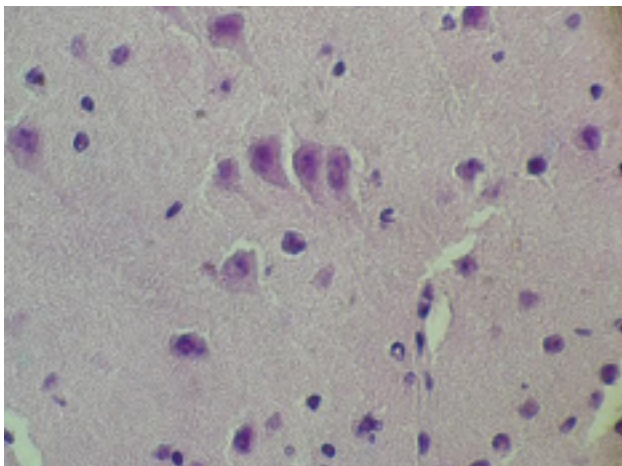
En la disección de este ratón se extrajo su cerebro, los riñones, el bazo, el hígado, los pulmones y el cojinete plantar. Se incluyeron en parafina para realizar las tinciones citadas.

Los cortes de cerebro teñidos con hematoxilina-eosina mostraron un órgano aparentemente estéril, con poca

o ninguna respuesta inflamatoria (figura 9), pues no se observó infiltración celular, como polimorfonucleares neutrófilos, monocitos o linfocitos. Solamente se detectaron abundantes coco-bacilos delgados ácido alcohol resistentes (figura 10).



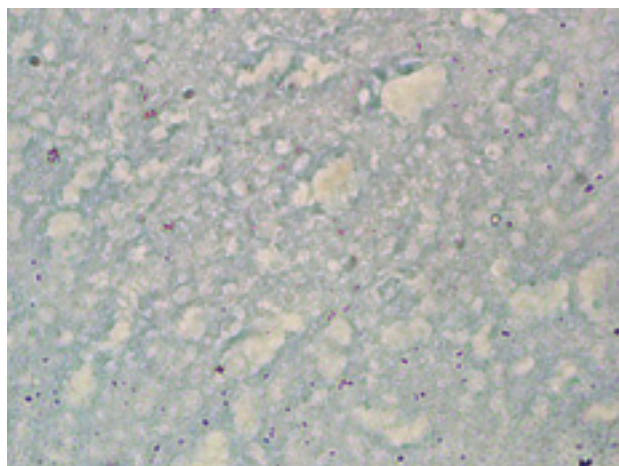
**Figura 8.** Ratón con hemiparesia y movimiento giratorio al levantarlo de la cola después de dos meses y medio de inoculación.



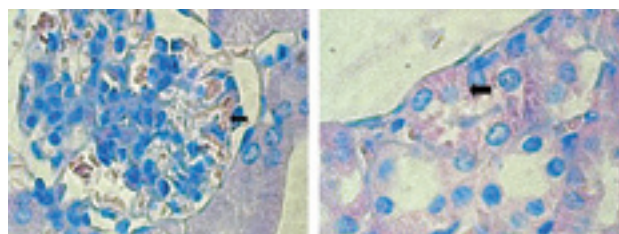
**Figura 9.** Muestra cerebral teñida con hematoxilina-eosina. Se observa la falta de respuesta inflamatoria, con aparente tejido estéril (40 X).

En los riñones también se observaron grandes cantidades de bacilos ácido alcohol resistentes que invadían los glomérulos (figura 11), con lo que se sospechó la diseminación hematogena de *Nocardia brasiliensis* a partir de la infección en el cojinete plantar (micetoma).

Los cortes renales teñidos con hematoxilina-eosina mostraron una estructura normal de la neurona, sin res-



**Figura 10.** Coco-bacilos ácido alcohol resistentes en el cerebro. Muestra teñida con Ziehl-Neelsen (100 X).



**Figura 11.** Bacilos ácido alcohol resistentes en el riñón. Micetoma en el cojinete plantar y diseminación hematogena después de dos meses y medio de evolución. Muestra teñida con técnica de Ziehl-Neelsen (100X).

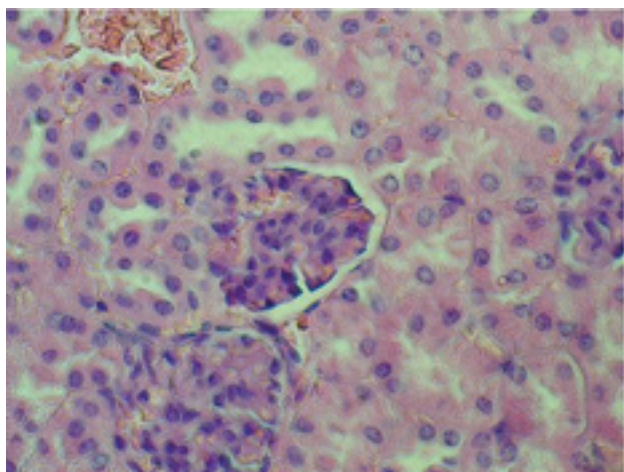
puesta inflamatoria. Con la tinción de Ziehl-Neelsen se observaron bacilos (figura 12).

## DISCUSIÓN

Los micetomas actinomicéticos, específicamente por *N. brasiliensis*, suelen invadir los planos profundos de manera temprana; de allí que sea tan grave el pronóstico cuando se localiza en el tórax, ya que pueden invadir el canal vertebral y la médula espinal, ocasionar parálisis, parestias e incluso la muerte; lo mismo ocurre con la localización en la cara anterior del tórax, por invasión de la pleura y los pulmones.<sup>5</sup>

En 1992 Beaman inoculó *N. asteroides* GUH-2 por vía intravenosa en un ratón y encontró invasión en el cerebro, sin inducir una respuesta inflamatoria. Esta cepa puede crecer en las neuronas, y en las áreas adyacentes causa daño neurológico sin producir abscesos. Después de dos





**Figura 12.** Muestra renal teñida con hematoxilina-eosina. No se observa el proceso inflamatorio (40 X).

semanas de inoculación, los ratones parecen estar estériles pero inician la manifestación de diversos síntomas, incluidos la deficiencia de L-dopa y movimientos involuntarios de la cabeza,<sup>8</sup> como sucedió en el ratón del grupo B, cuyo cuadro clínico y estudio histopatológico fue semejante. Los mecanismos de respuesta no se conocen, pero hay datos que indican activación fagocitaria (microglía) en el cerebro, la cual representa una importante línea de defensa primaria, seguida de la activación de linfocitos T, importantes como respuesta secundaria en el cerebro invadido por *Nocardia*; finalmente, los linfocitos B y la respuesta humoral pueden estar implicados en esta compleja interacción; sin embargo, aún no se establece cómo esta respuesta se relaciona con el daño permanente y progresivo en el cerebro inducido por *Nocardia*.<sup>17</sup> Ogata y Beaman sugieren que hay receptores específicos en la superficie de los capilares del endotelio que facilitan el ataque de *Nocardia*. La distribución y el crecimiento acelerado en las regiones del cerebro son variables y dependen de una región específica, en la que el crecimiento bacteriano puede ser el precursor para originar el daño celular y las alteraciones neurológicas.<sup>10</sup>

En este estudio observamos que la lesión en la pata es capaz de producir lesiones renales (en el primer grupo) y cerebrales (en el segundo grupo) por diseminación hematológica. En el riñón se observaron lesiones granulomatosas (micetoma en el riñón de los ratones del primer grupo) y grandes cantidades de bacilos delgados ácido alcohol

resistentes, sin reacción inflamatoria ni granos en éste o el cerebro, similar a los hallazgos de Beaman.<sup>17</sup>

De los 39 ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* en el cojinete plantar, 3 (7.6 %) manifestaron los cuadros clínicos característicos (daño renal y lesión cerebral) después de 15 días de aplicar la segunda inoculación.

Estos hallazgos sugieren que un paciente con micetoma por *Nocardia brasiliensis* en el pie puede tener diseminación e invasión a otros órganos, como se ha descrito en infecciones por *Nocardia* en el tórax o la espalda, e incluso por otras cepas (*Nocardia asteroides*, *Nocardia caviae*, *Nocardia nova* o *Nocardia veterana*).<sup>18,19</sup>

## CONCLUSIÓN

En este estudio observamos que 7.6% de los animales tuvo diseminación hematológica hacia varios órganos.

## REFERENCIAS

1. Lumbreras BC, Martínez LB. Nocardiosis. *Medicine* 2002;8(67):3573-8.
2. Kalb RE, Kaplan MH, Grossman ME. Cutaneous nocardiosis. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:125-33.
3. Magaña M. Mycetoma. *Int J Derm* 1984;23:221-36.
4. Bèzes H. Mycoses osseuses. In: Destombes P, editor. *Encycl Med Chir. Paris: App Loc*, 1972;pp:1-8.
5. Lavalley P. Clinical aspects and therapy of micetoma. *Dermatol Int* 1966;5(2):117-20.
6. Lavalley P. Micetomas por *Actinomyces madurae* en México. *Rev Centro Dermatológico Pascua* 2000;9:19-24.
7. Bouot G, Lavalley P, Mariat F, Suchill P. Etude epidemiologique des mycetomes au Mexique: apropos de 502 cases. *Bull Soc Pathol Exo Fil* 1987;80:329-39.
8. Beaman BL. *Nocardia*: an environmental bacterium possibly associated with neurodegenerative diseases in humans. In: Isacson RL, Jensen K, editors. *The vulnerable brain and environmental risks*, Vol. 2. Toxins in food. New York: Plenum Press, 1992;pp:147-66.
9. Eppinger H. Ueber eine pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 1891;9:287-328.
10. Ogata SA, Beaman BL. Site-Specific growth of *Nocardia asteroides* in the murine brain. *Infect Immun* 1992;60(8):3262-7.
11. Palmer DL, Harvey RL, Wheeler JK. Diagnostic and therapeutic considerations in *Nocardia asteroides* infection. *Medicine (Baltimore)* 1974;53:391-401.
12. Curry WA. Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. *Arch Intern Med* 1980;140:818-26.
13. Buggy BP. *Nocardia asteroides* meningitis without brain abscess. *Rev Infect Dis* 1987;9:228-31.
14. Carlisle WK, Holley KE, Logan GB. Fatal acute disseminated nocardiosis in a child. *J Am Med Assoc* 1987;184:477-80.

15. Kohbata S, Beaman BL. L-Dopa-responsive movement disorder caused by *Nocardia asteroides* localized in the brains of mice. *Infect Immun* 1991;59:181-91.
16. Cormack HD. *Histología de HAM*. México: Harla, 1987;pp:1-28.
17. Beaman BL. *Nocardia* as a pathogen of the brain: mechanisms of interactions in the murine brain- a review. *Gene* 1992; 115:213-7.
18. Shimizu A, Ishikawa O, Nagai Y, Mikami Y, Nishimura. Primary cutaneous nocardiosis due to *Nocardia nova* in a healthy woman. *Br J Dermatol* 2001;145:154-6.
19. Pottumarthy S, Limaye AP, Prentice JL, Houze YB. *Nocardia veterana*, a new emerging pathogen. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1705-9.