PRODUCCION EXPERIMENTAL DEL MICETOMA POR *NOCARDIA BRASILIENSIS* EN EL RATON[1]

DR. ANTONIO GONZÁLEZ-OCHOA[2]

La inoculación de *N. brasiliensis* a diversos animales de laboratorio por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular subcutánea o intracutánea, produce lesiones trascientes con tendencia a la curación espontánea; pero cuando se usan las dos primeras vías o cuando el *inoculum* es muy grande, el animal muere.

La inoculación en la almohadilla plantar del ratón blanco, mantenido a la temperatura de laboratorio, produjo una tumoración fistulosa crónica con granos actinomicéticos sin clavas; es decir un micetoma típico sin tendencia hacia la evolución espontánea, que se extiende por contigüidad.

Este micetoma puede ser igualmente producido con *inoculi* que varían de 20 a 0.2 mgs. del actinomicete. Las infecciones con grandes inoculi originan amputación espontánea de la pata o del muslo, pero la infección continúa en el muñón. En algunos animales aparece adenopatía inguinal e intraabdominal, y menos frecuentemente la infección se extiende al pulmón y al hígado.

La implicación de este modelo experimental radica en la posibilidad de usarlo para la búsqueda de fármacos con miras a tratar el micetoma; y más aún, teniendo como base las relaciones taxonómicas e inmunológicas entre *N. brasiliensis y M. leprae*, y dado que iguales medicamentos se usan para el tratamiento de las infecciones por ambos gérmenes, sería posible usar este mismo micetoma experimental para la búsqueda de medicamentos contra la lepra. (GAC. MÉD. MÉX. 99: 773 1969).

EL ACTINOMYCETE hoy denominada *Nocardia brasiliensis* fue aislado y descrito por Lindenberg en 1909,[1] reportando sus resultados negativos en las inoculaciones al cuye y al conejo; y otro tanto, es decir los mismos resultados negativos, fue comunicado por Gomes en 1923.[2] González Ochoa y cols. en 1952,[2] 1955[4] y 1956[5] reportaron haber logrado la infección en ratones inoculados con 10 mg. de *N. brasiliensis* por vía intraperitoneal; las lesiones, que aparecieron a la primera semana y al-

[1] Trabajo de sección presentado en la sesión ordinaria del 12 de marzo de 1969.

[2] Académico numerario. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.

canzaron su máximo al mes de incubación, consistieron en pequeños nódulos en el peritoneo visceral y parietal en cuyo contenido purulento se encontraron abundantes granos actinomicéticos. Posteriormente numerosos autores publicaron los resultados positivos de sus inoculaciones empleando la vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o la muscular, y en diversos animales de laboratorio.[6, 7, 8] En todas esas inoculaciones, lo mismo que en dos de las más recientes a las que nos referimos en particular, los autores encontraron que la lesión producida curaba en un lapso mayor o menor, o bien mataba al animal, según la dosis, la vía y técnica empleadas o la especie de animal inoculado; estas dos últimas publicaciones fueron la de Georg y cols. en 1962[9] y las de Macotela Ruiz y Mariat en 1963;[10 y 11] los primeros autores inocularon 10 cepas de *N. brasiliensis* encontrando que solamente una, inoculada por vía intraperitoneal adicionada de mucina gástrica al 5%, fue patógena para el cobayo, produciéndole la muerte por diseminación; Macotela Ruiz y Mariat realizaron inoculaciones intraperitoneal y subcutánea al ratón, hamster y cobayo, y los animales, que fueron sacrificados ocho semanas después de la inoculación, mostraron en el peritoneo granulomas con abundantes granos, y en el tejido subcutáneo la formación de lesiones que los autores denominan "micetoides" cuya imagen histológica podría ser "la de un absceso con polimorfonucleares, un granuloma rico en células de Langhans e histiocitos, o bien la de una lesión intermedia con un centro abscedado, una zona media granulomatosa y un borde fibrohistiocitario".

Es un hecho de observación común que el micetoma predomina en el pie; tanto es así que una de las más antiguos denominaciones para esta micosis es la de "pie de Madura" debida a la frecuencia con que el padecimiento fue observado en el pie de habitantes de la ciudad de Madura, India. El micetoma por *N. brasiliensis,* el más frecuente en México y a cuya reproducción experimental nos referiremos, predomina en el campesino y se localiza en el pie en el 55% de los casos. En 1960[12] demostramos que el *habitat* de *N. brasiliensis* lo constituyen los suelos, de manera que con base a este hecho más la predominancia podal, proponíamos la hipótesis simplista de que la frecuencia de esa localización se debía a la costumbre del campesino mexicano de andar descalzo o con huarache, lo que le hacía propenso a traumatizarse los pies, y que al través de esas heridas, inclusive mínimas, la *N. brasiliensis* penetraría a los tejidos originando la enfermedad. Sin embargo, en contraposición con esa hipótesis casi infantil no dejaba de impresionarnos la rareza del micetoma en las extremidades superiores, y si consideramos que las manos se traumatizan con mayor frecuencia que los pies, y el micetoma de mano apenas alcanza una incidencia de 4%, se ve lo absurdo de la hipóteesis mencionada.

Los resultados de las investigaciones de Ferner[13] realizadas en 1956 sobre la inoculación de *Mycobacterium ulcerans* y *M. balnei* en la almohadilla plantar

del ratón produciéndose un marcado proceso inflamatorio con pululación de gérmenes, condujeron a que Shepard[14] usara la misma vía para inocular *M. leprae,* logrando la multiplicación de bacilos. Por otra parte, Mackinnon[15] observó experimentalmente que las variaciones de temperatura en las extremidades de los animales de laboratorio explicarían que la multiplicación de algunas especies de hongos, agentes de micosis profundas, sea posible en determinadas regiones del cuerpo e imposible en otras. Recientemente Hastings y cols.[16] demostraron que la densidad bacteriana en la piel de los lepromatosos está claramente relacionada con la temperatura; los sitios más calientes contienen significativamente menos microorganismos que los más fríos, pareciendo que las áreas de la piel de los lepromatosos "clínicamente inmunes" corresponden a sitios más calientes en los que *M. leprae* preferiría no desarrollarse.

Tomando en consideración los hechos expuestos, y fundamentalmente el de la afinidad tan extraordinaria de *N. brasiliensis* por el pie, más las semejanzas biológicas de las *Mycobacteria: ulcerans, balnei, leprae* y *tuberculosis* con *N. brasiliensis,* emprendimos un trabajo consistente en inocular el actinomicete en la almohadilla plantar del ratón, sitio anatómico que no había sido explorado anteriormente. No obtante la copiosa información bibliográfica acerca de que la inoculación de ese *Actinomycete* por las vías intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica produce nodulillos con tendencia espontánea a la curación, repetimos las inoculaciones siguiendo todas esas vías con la finalidad de que nos sirviesen como testigos en comparación con las lesiones obtenidas por la inoculación en la almohadilla plantar. Realizado así el trabajo nos fue posible obtener en la pata del ratón una tumoración fistulosa, crónica, progresiva, con ataque óseo y granos actinomicéticos, sin tendencia espontánea a la curación; es decir un micetoma típico en todo semejante al humano, contrariamente a las lesiones obtenidas siguiendo las otras vías mencionadas en las que los nodulillos producidos mostraron tendencia espontánea a la curación.

Las peculiaridades de este modelo experimental, y los aspectos de su importancia práctica, constituyen la finalidad de esta nota.

MATERIAL Y MÉTODO

Además de un lote de 100 animales inoculados con cantidades de la *Nocardia* que variaron de 0.20 a 20 mg. y que mantuvimos a la temperatura del laboratorio, hicimos otros lotes de 50 animales cada uno en que establecimos variantes por lo que respecta al *inoculum,* y por lo que respecta a los animales. La primera consistió en inocular la *Nocardia* adicionada de bacterias (Staphylococcus) que habíamos aislado de enfermos con micetoma. Las variantes relacionadas con los animales fueron la de establecer una lote de animales previamente sensibilizados con la misma *N. brasiliensis,* y la de incubar otro lote a 10° C.

a) *Preparación de los inoculi.* Se tomaron colonias de *N. brasiliensis* (cepa 4129) de 15 a 30 días de desarrollo en gelosa de Sabouraud glucosado al 2%, e incubados a 27° C. Las colonias se desprendieron del medio, pesaron y trituraron, suspendiendo el germen en aceite mineral, e inyectándole en 0.1 ml. de vehículo.

b) *Sensibilización previa a la inoculación.* Para tratar de obtenerla se practicaron cuatro inyecciones semanarias, por vía subcutánea, de *N. brasiliensis* suspendida en aceite mineral.

c) *Lectura de los resultados.* Fueron convencionalmente valorados en (—) cuando no se advirtió cambio en la pata inoculada; (±) cuando la inflamación fue mínima; (+) cuando la inflamación fue evidente; (++) cuando la tumoración alcanzó dos tantos del tamaño de la pata contralateral; y (+++) cuando la tumoración fue de tres tantos de la otra pata, ya sea que se extendiese o no al muslo, o hiciera metástasis viscerales.

d) *Estudios histopatológicos.* Se recogieron las diversas piezas anatómicas, tanto de los ratones que murieron como de los que fueron sacrificados en el transcurso de los estudios. Las piezas se fijaron en formalina, descalcificándose con ácido tricloracético, e incluyendo en parafina; las coloraciones usadas fueron hematoxilina - eosina, Gallego, tricrómico de Gomori y Grocott. Estos estudios fueron realizados en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales por el Dr. Manuel Martínez Báez.

RESULTADOS

La inoculación de *N. brasiliensis* en la almohadilla plantar del ratón, produjo prácticamente en todos los animales, una tumoración fistulosa, crónica, evolutiva, con presencia de granos actinomicéticos, y sin tendencia a la curación espontánea, extendiéndose por contigüedad e invadiendo los huesos; es decir, un típico micetoma en todo semejante al humano (Fig. 1).

Este tipo de micetoma se produjo igualmente con los inoculi de 20, 10, 2, 1 y 0.20 mg., salvo que con los *inoculi* más pequeños la tumoración fue de menor volumen durante las primeras semanas que siguieron a la inoculación, si bien a la larga las lesiones se igualaron con las producidas por los *inoculi* mayores.

Los *inoculi* más grandes originaron tempranamente la amputación de los dedos, de la pata o hasta del muslo, pero el proceso infeccioso continuó en el muñón, tal como acontece cuando el micetoma humano es amputado de manera conservadora, extendiéndose a los ganglios linfáticos regionales, intraabdominales, al pulmón y al hígado. Prácticamente en todos los animales la tumoración fistulizó, pero mientras algunos de estos trayectos fistulosos cerraban temporalmente otros se formaban, de manera igual al micetoma humano.

Basados en estos resultados preferimos usar *inoculi* de uno a dos mgs. para realizar las diferentes variantes del estudio, obteniéndose los siguientes resultados:

La adición de bacterias al inoculum

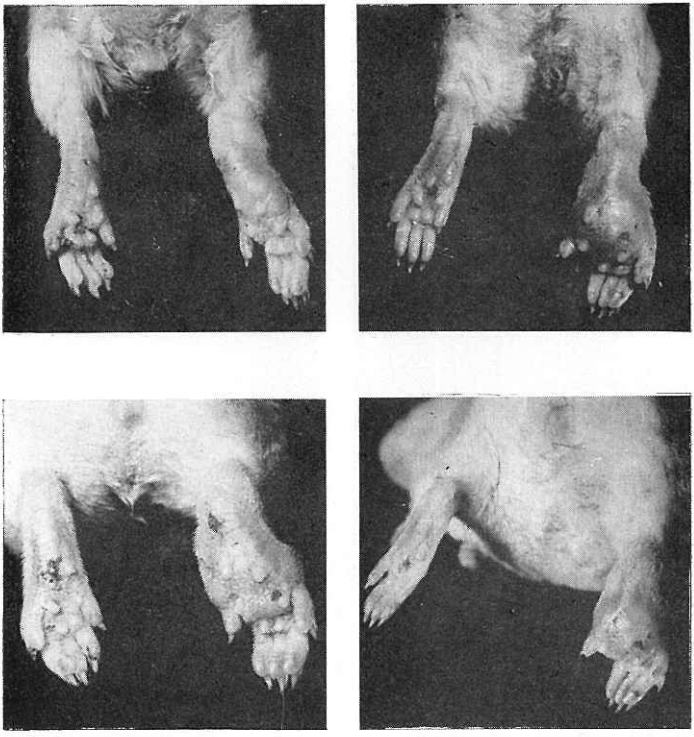

FIG. 1. Diversos aspectos del micetoma experimental por *N. brasiliensis* en la pata del ratón blanco.

de *N. brasiliensis* produjo una inflamación más precoz, pero desapareció en una semana, y posteriormente la tumoración se volvió en todo semejante a la originada por la *Nocardia* sola.

La sensibilización previa, y la incubación de los animales a 10°C en nada modificaron la evolución del micetoma con relación a los lotes testigos.

Una semana después de la inoculación aproximadamente la mitad de los animales mostraron inflamación traumática, la que desapareció después de unos ocho días en el 30% de los animales, persistiendo en forma mínima en el resto. Para la tercera semana la inflamación comenzó a acentuarse y en aquellos animales que habían sido ne-

gativos la tumoración comenzó a formarse. Un mes después el 50% de los animales mostraba la lesión, continuando su desarrollo en los animales positivos, y principiando a formarse en aquellos negativos. A la sexta semana el número de animales positivos ascendió a 80%, aumentando este porcentaje con el transcurso del tiempo de manera que para los seis meses prácticamente

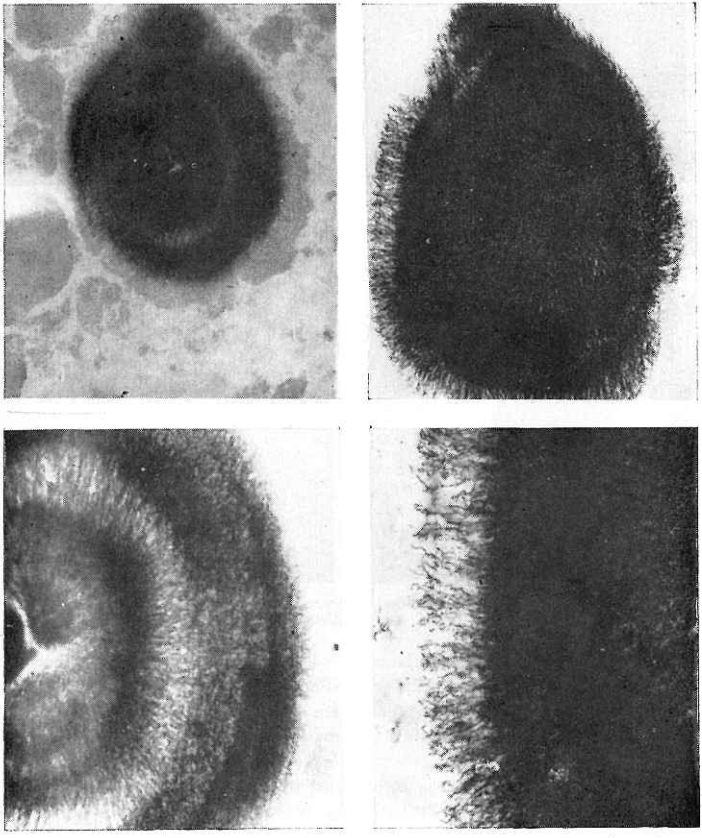

FIG. 2. Diversos aspectos de granos actinomicéticos en el micetoma experimental por *N. brasiliensis* en la pata del ratón blanco.

el 100% de los animales mostraron la enfermedad.

Para esa época el 25% de los animales presentaban micetoma de + + +; el 20% de + +; el 35% de +; y en el 20% restante sólo se observó una inflamación mínima. Esta situación se estabilizó, excepto en aquellos animales con micetoma de ± en los que la lesión fue cambiando lentamente para convertirse en micetoma de + o de + +; y en la mayoría de los animales con micetoma de + + + y una pequeña parte de los de + + el proceso invadió muslo o produjo la amputación. Algunos de los animales con micetoma de + + + y + + desarrollaron adenopatía inguinal e intraabdominal, y en algunos cuantos hubo invasión de pulmón, peritoneo e hígado, en ese orden de frecuencia. En los meses subsecuentes los ratones comenzaron a morir por causas diferentes de su micetoma.

Una vez establecida la tumoración fue sumamente fácil observar granos actinomicéticos, ya fuese por el examen microscópico directo del pus, o en los tejidos al través del corte histológico. Estos granos tenían la peculiaridad de carecer de masas. En cualquiera de los periodos evolutivos de este micetoma experimental fue posible el aislamiento de *N. brasiliensis* por cultivo.

La histopatología mostró imágenes esencialmente constantes en los diversos animales. Consistió en una neoformación granulomatosa amplia, densa, constituida por nódulos separados entre sí por formaciones de tejido fibroso laxo, o bien fundidos unos con otros por sus bordes; en el centro de muchas de estas formaciones granulomatosas hubo microabscesos en torno de granos actinomicéticos; los granos, de tamaño variable, eran redondos, ovalados o arriñonados, con zonas concéntricas de diversa densidad dándoles aspecto de escarapela, y presentando filamentos cortos en su borde, si bien en algunos estos granos de filamentos avanzaban considerablemente entre los elementos celulares (Fig. 2). También se observaron fragmentos aislados de micelio. Ninguno de los granos mostró clavas.

En algunos animales hubo invasión ósea con formación de cavidades, ocupadas por un granuloma con microabscesos y granos, y otros animales mostraron caries ósea. Los ganglios linfáticos presentaban hiperplasia linfoide sin granos. En algunos animales con lesiones en pulmón e hígado la *Nocardia* fue observada dentro de granulomas focales con necrosis central, adoptando la morfología de filamentos ramificados aislados, de cúmulos flojos de micelio, o de granos compactos.

DISCUSIÓN

Los hechos observados en este micetoma experimental del ratón blanco, tales como la formación de una tumoración fistulosa con granos micósicos, que no muestra tendencia espontánea a la curación, que sigue un curso lentamente invasor extendiéndose por contigüidad, y con frecuente ataque óseo, imitan muy de cerca al micetoma humano.

La histopatología también es muy semejante a la observada en el humano, por el tipo de granuloma, su tendencia

a respetar músculos y nervios, y sobre todo por la especial afinidad para invadir hueso formando cavidades.

Los antecedentes bibliográficos analizados, más los resultados de esta experimentación, permitirían suponer que la temperatura óptima, específica de parasitismo, es particularmente significativa en el micetoma. Juntamente con el factor temperatura probablemente existan otros como la situación circulatoria nutricional y calidad del tejido mismo, factores que explicarían la frecuencia del micetoma por *N. brasiliensis,* y otros agentes del micetoma, en el pie.

La implicación práctica de este modelo experimental consistiría en la importancia que representa para la búsqueda de fármacos encaminados a tratar este tipo de micetoma. Pero es aún más, con base a las relaciones taxonómicas e inmunológicas entre *N. brasiliensis* y *M. leprae,* y dado que los mismos medicamentos se usan para el tratamiento de las infecciones por ambos gérmenes (DDS, Fanasil, G 30320), sería posible usar este mismo micetoma experimental para la búsqueda de medicamentos contra la lepra.

SUMMARY

The inoculation of *N. brasiliensis,* either intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous or intracutaneous, produces only transient lesions with a tendency toward spontaneous cure. When the first two routes of inoculation are used, or when the *inoculum* is large, the animals die.

Inoculation into the foot pad of the albino mouse, maintained at laboratory temperature, results in a chronic, fistulous tumor with actinomycetic grains, i. e., typical mycetoma in evolution without any tendency toward spontaneous cure, which grows by contiguity, but in which the granules lack clubs.

A mycetoma can be produced equally well with *inoculi* of 20 to 0.2 mgs. Infections with large *inoculi* cause spontaneous amputations of the foot or the limb, with the infection continuing in the stump. In addition, invasion of the inguinal and intraabdominal nodes, progressing to the lungs and liver, has been shown.

The implication of this experimental model is not only its importance in the search for pharmaceutical agents to be used for the treatment of mycetoma; but that it will also permit experimentation with drugs active against leprosy, due to the biological and immunological relationships between *N. brasiliensis* and *M. leprae,* and to the fact that the same medication is used for both diseases.

REFERENCIAS

1. Lindenberg, A.: *Un nouveau mycetoma.* Rev. Med. Sao Paulo, *18:* 30, 1909.
2. Gómez, J. M.: Citado por Silva-Lacaz, C., 1945.
3. González Ochoa, A.; Shiels, J. y Vázquez, P.: Acción de la 4. 4-diamino-difenil-sulfona frente a *Nocardia brasiliensis* (estudios *in vitro,* en la infección experimental y en clínica). GAC. MÉD. MÉX., *82:* 345, 1952.
4. González Ochoa, A. y Sandoval, Ma. de los A.: *Características de los actinomyces patógenos más comunes.* Rev. Inst. Salubr. Enfs. Trop., *16:* 1949, 1955.
5. González Ochoa, A. y Sandoval, Ma. de los A.: *Revisión determinativa de*

algunas especies de Actinomycetes patógenos, descritas como diferentes. Rev. Inst. Salubr. Enfs. Trop., *16:* 17, 1956.

6. Soto, P. R.: *Contribución al estudio de la actinomicosis experimental.* Rev. Biol. Trop., *1:* 43, 1955.
7. Mackinson, J. C. y Artagaveytia-Allende, R. C.: *The main species of pathogenic aerobic actinomycetes causing mycetoma.* Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., *50:* 3140, 1956.
8. Pizoli, A.: *Characteristics of Nocardia asteroides and N. brasiliensis in tissue culture.* Am. Fac. Med. Montevideo, *46:* 2936, 1961.
9. Georg, L. K.; Ajello, L.; McDurmont, C. y Hosty, T.: *The identification of Nocardia asteroides and N. brasiliensis.* Am. Rev. Resp. Dis., *84:* 337, 1961.
10. Macotela Ruiz, E. y Mariat, F.: *On the production of experimental mycetomas by Nocardia brasiliensis and N. asteroides.* Bull. Soc. Path. Exot. *56:* 4654, 1963.
11. Macotela Ruiz, E.; Mariat, F. y Destombes, P.: *Pseudofungal aspects of resorption in experimental Nocardia mycetomas.* Ann. Inst. Pasteur, *104:* 538, 1963.
12. González Ochoa, A. y Sandoval Ma. de los A.: *Aislamiento de Nocardia brasiliensis y N. asteroides a partir de suelos.* Rev. Inst. Salub. Enfs. Trop., *20:* 147, 1960.
13. Fenner, F.: *The pathogenic behaviour of Mycobacterium ulcerans and M. balnei in the mouse and the developing chick embryo.* Amm. Rev. Tuberc., *73:* 150, 1956.
14. Shepard, C. C.: *The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into footpads of mice.* J. Exp. Med., *112:* 445, 1960.
15. MacKinnon, J. E.: *The effect of temperature on the deep mycoses. Systemic mycoses. A Ciba Fundation Symposium.* London, J. & A. Churchill Ltd., 1968.
16. Hastings, R. C.; Brand, P. W.; Mansfield, R. E. y Ebner, J. D.: *Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature.* Lep. Rev., *39:* 71, 1968.