

## Detección de la actividad enzimática de la $\beta$ -glucuronidasa de polimorfonucleares neutrófilos en granos de actinomicetoma humano por *Nocardia brasiliensis*, *in vitro*



Palma-Ramos A<sup>1</sup>, Moreno-Aparicio AM<sup>1</sup>, Castrillón-Rivera LE<sup>1</sup>, Castañeda-Sánchez JI<sup>1</sup>, Muñoz-Duarte AR<sup>1</sup>, Mendoza-Pérez F<sup>1</sup>, Padilla-Desgarennes C<sup>2</sup>

### Resumen

**ANTECEDENTES:** el micetoma es un síndrome inflamatorio común en México que afecta principalmente la piel, el tejido subcutáneo y en menor medida la fascia, los músculos e incluso los huesos y los órganos internos. Es causado por actinomicetos (actinomicetoma) o por hongos verdaderos (eumicetoma). La inflamación intensa logra penetrar los granos de actinomicetoma por la liberación de enzimas como la  $\beta$ -glucuronidasa.

**OBJETIVO:** evaluar la degradación del polisacárido neutro presente en los granos formados por *Nocardia brasiliensis*, tratados con  $\beta$ -glucuronidasa de neutrófilos.

**MATERIAL Y MÉTODO:** en granos provenientes de pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis* se realizaron dos estudios que consistieron en: a) cuantificación de la diferencia de peso de los granos tratados con  $\beta$ -glucuronidasa proveniente de neutrófilos y b) cuantificación de azúcares totales liberados en la degradación del polisacárido de los granos de *N. brasiliensis*, por el método de fenol-sulfúrico. Además, en cortes histológicos de piel de pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis* atendidos en el Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua se realizó la determinación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa presente en los granos, utilizando el paquete de enzimas linfocitarias de Sigma Aldrich número 181-C.

**RESULTADOS:** la diferencia en la cuantificación del peso de granos de *N. brasiliensis* después de 96 horas de tratamiento con  $\beta$ -glucuronidasa proveniente de neutrófilos fue de 58% en promedio. La concentración de azúcares totales en sobrenadantes provenientes de la degradación de granos de *N. brasiliensis* fue de 27.2 y 21 mg/mL al utilizar 200 y 100 unidades/mL de enzima, respectivamente. La actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en cortes histológicos de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* se confirmó al observar la coloración roja característica de la reacción de la enzima con el sustrato Naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico.

**CONCLUSIÓN:** la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de neutrófilos muestra buena actividad enzimática sobre el cemento de unión (polisacárido neutro) de los granos del actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

**PALABRAS CLAVE:** *Nocardia brasiliensis*, micetoma,  $\beta$ -glucuronidasa.

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

**Recibido:** junio 2016

**Aceptado:** agosto 2016

### Correspondencia

M en C Alejandro Palma Ramos  
alpalma@correo.xoc.uam.mx

### Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Moreno-Aparicio AM, Castrillón-Rivera LE, Castañeda-Sánchez JI y col. Detección de la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa de polimorfonucleares neutrófilos en granos de actinomicetoma humano por *Nocardia brasiliensis*, *in vitro*. Dermatol Rev Mex. 2016 nov;60(6):488-498.

Dermatol Rev Mex 2016 November;60(6):488-498.

## Detecting enzymatic activity of $\beta$ -glucuronidase polymorphonuclear neutrophil in human grains *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma, in vitro.

Palma-Ramos A<sup>1</sup>, Moreno-Aparicio AM<sup>1</sup>, Castrillón-Rivera LE<sup>1</sup>, Castañeda-Sánchez JI<sup>1</sup>, Muñoz-Duarte AR<sup>1</sup>, Mendoza-Pérez F<sup>1</sup>, Padilla-Desgarennes C<sup>2</sup>



### Abstract

**BACKGROUND:** Mycetoma is a common inflammatory syndrome in Mexico that mainly affects the skin, subcutaneous tissue and to a lesser extent, fascia, muscles and even bones and internal organs. It is caused by actinomycetes (actinomycetoma) or true fungi (eumycetoma). Intense inflammation penetrates grains actinomycetoma by releasing enzymes such as  $\beta$ -glucuronidase.

**OBJECTIVE:** To evaluate neutral polysaccharide degradation in the grains with *Nocardia brasiliensis*  $\beta$ -glucuronidase treated of neutrophils.

**MATERIAL AND METHOD:** Three studies were conducted in grains of patients with actinomycetoma by *N. brasiliensis* assisted at the Dermatological Center Ladislao de la Pascua, Mexico City: a) Quantification of the difference in weight of grains treated with  $\beta$ -glucuronidase from neutrophils. b) Quantification of total sugars released by polysaccharide degradation of *N. brasiliensis* grains, by the phenol-sulfuric method. c) In histological sections provided by the same hospital, the determination of the enzymatic activity of  $\beta$ -glucuronidase present in the grains, with the use of the kit of lymphocyte enzymes Sigma Aldrich No. 181-C was performed.

**RESULTS:** Difference in weight in grains of *N. brasiliensis* treated with  $\beta$ -glucuronidase from neutrophils after 96 hours of treatment was 58% on average, when using an enzyme concentration of 200 and 100 units/mL. Concentration of total sugars by the method of phenol-sulfuric, supernatants from degradation grains *N. brasiliensis* using 195 units/mL of enzyme was 27.2  $\mu$ g/mL and 97 units/mL of enzyme was 21  $\mu$ g/mL. Enzymatic activity of  $\beta$ -glucuronidase was observed in red color, which is result of the reaction of Naphthol AS-BI- $\beta$ -D glucuronic acid.

**CONCLUSION:**  $\beta$ -glucuronidase enzyme from neutrophils has good enzymatic activity on the cement binding (neutral polysaccharide) of grains of actinomycetoma caused by *N. brasiliensis*.

**KEYWORDS:** *Nocardia brasiliensis*; mycetoma;  $\beta$ -glucuronidase

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

### Correspondence

M en C Alejandro Palma Ramos  
alpama@correo.xoc.uam.mx



## ANTECEDENTES

El micetoma es un síndrome anatomoclínico, de tipo inflamatorio crónico, constituido por aumento de volumen, deformación de la región y fístulas, por las que drena un exudado filante que contiene las formas parasitarias llamadas "granos". Afecta principalmente la piel y el tejido celular subcutáneo, pero puede afectar fascia, músculo y hueso subyacente. Los agentes causales son de origen exógeno, pueden ser actinomicetos o eumicetos. La frecuencia de micetoma por género corresponde a 76% en hombres. El 76% se manifiesta en adultos entre 16 y 50 años de edad. El grupo laboral predominante es el de campesinos (58%), seguido de amas de casa (22%). Los estados con mayor casuística son: Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero, Veracruz y Michoacán. Las regiones corporales más afectadas son las extremidades inferiores (60%) y el tronco (20%). En México predominan los actinomicetomas y tienen frecuencia de 96.5%, el principal agente etiológico es *Nocardia brasiliensis* (65.5%), seguido por 8% de *Actinomadura* (incluida *A. pelletieri*) y 1% de *Streptomyces somaliensis*.<sup>1,2</sup> El eumicetoma (3%) es causado principalmente por *Trematospheria grisea* (28%) y *M. mycetomatis* (268%).<sup>3</sup> En el estudio histopatológico los cortes microscópicos del tejido afectado muestran una epidermis con hiperqueratosis paraqueratósica, depósitos de fibrina, eritrocitos y restos celulares, acantosis irregular intensa con área de hiperplasia pseudoepiteliomatosa. En la dermis superficial, media y profunda se observa un infiltrado moderadamente denso de linfocitos, histiocitos, plasmocitos y focos de polimorfonucleares,<sup>4</sup> así como acumulación de neutrófilos en la dermis que causan microabscesos, que rodean un grano eosinófilo con clavas en su superficie.<sup>5-7</sup> Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) se encuentran en la primera línea de defensa contra infecciones, principalmente a través de la fagocitosis; la generación

de moléculas tóxicas, así como la liberación de enzimas son cada vez más importantes por su contribución a la regulación en el desarrollo de la respuesta inmunitaria inflamatoria.<sup>8</sup> La degranulación de los gránulos azurófilos se limita principalmente una vez que se forma la vacuola fagocítica durante el proceso de la fagocitosis. La mieloperoxidasa en los gránulos azurófilos es de gran importancia para el correcto funcionamiento del sistema bactericida dependiente de oxígeno y junto con esta enzima se encuentran también en estos granos defensinas y otras enzimas, como la  $\beta$ -glucuronidasa, lisozima y la elastasa, entre otras.<sup>9</sup> La  $\beta$ -glucuronidasa es miembro de la familia de las glucosidasas que catalizan la descomposición de carbohidratos complejos. En humanos, la  $\beta$ -glucuronidasa es un tipo de glucuronidasa (miembro de la familia de las glucosidasas 2) que cataliza la hidrólisis del  $\beta$ -D-ácido glucurónico del extremo no reductor de mucopolisacáridos (también conocido como glicosaminoglicanos), como el heparán sulfato.<sup>10</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

### Determinación de actividad enzimática *in vitro* de la $\beta$ -glucuronidasa de polimorfonucleares neutrófilos sobre los granos de *Nocardia brasiliensis*<sup>11,12</sup>

Los granos de *Nocardia brasiliensis* utilizados los proporcionó el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua; se secaron cuatro granos de *N. brasiliensis* en la estufa a 37°C durante 40 minutos. Una vez secos, se pesó cada uno por separado.

Para determinar la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa, los cuatro granos se colocaron uno en cada pozo de una placa de 96 pozos, identificándolos de acuerdo con su peso de mayor a menor (1-3) y se dejó un grano como control negativo.



Se prepararon tres concentraciones de la enzima a partir de un vial con una concentración de 400 unidades/mL (200, 100 y 50 unidades/mL) en solución buffer de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2; se colocó un grano por concentración.<sup>11,13</sup>

Los granos se incubaron durante cuatro días en cámara húmeda a 37°C y 150 rpm, se tomaron alícuotas del sobrenadante a las 0, 48, 72 y 96 horas, una de 30  $\mu$ L para la cuantificación de azúcares por el método de fenol-ácido sulfúrico y una de 20  $\mu$ L para realizar la cuenta estándar de bacterias.

Después de 96 horas de incubación, los granos se secaron a 37°C durante 40 minutos y se pesaron para cuantificar la diferencia del peso seco después del tratamiento con la enzima.

#### **Método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico para cuantificación de azúcares totales (DuBois M, 1956)<sup>14</sup>**

A partir de una solución stock de glucosa de 400  $\mu$ g/mL se preparó una curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa (10, 20, 30, 40, 50 y 60  $\mu$ g/mL).

1. Se tomaron 30  $\mu$ L de cada dilución o muestra problema y se colocaron en una placa de 96 pozos.
2. Se adicionaron 15  $\mu$ L de solución de fenol a 5% e inmediatamente después se agregaron 75  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado. Se dejaron reposar por 15 minutos y se colocaron en una incubadora a 30°C por 15 minutos.
3. Las muestras se leyeron con un lector de ELISA a una longitud de onda de 492 nm.

#### **Cuenta estándar de bacterias de los granos de *N. brasiliensis***

Se tomaron 10  $\mu$ L del sobrenadante de los granos tratados con  $\beta$ -glucuronidasa en amortiguador

de acetato de sodio 100 mM pH 5.2, se sembró directamente en agar de infusión cerebro corazón (BHI) en cajas de Petri, después se tomó la segunda alícuota de 10  $\mu$ L del sobrenadante, se realizaron diluciones en solución salina ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) y se incubaron a 37°C durante 48 horas.

Para determinar si el amortiguador de acetato de sodio es capaz de inhibir el crecimiento de *Nocardia* se realizó la curva de crecimiento en este medio.

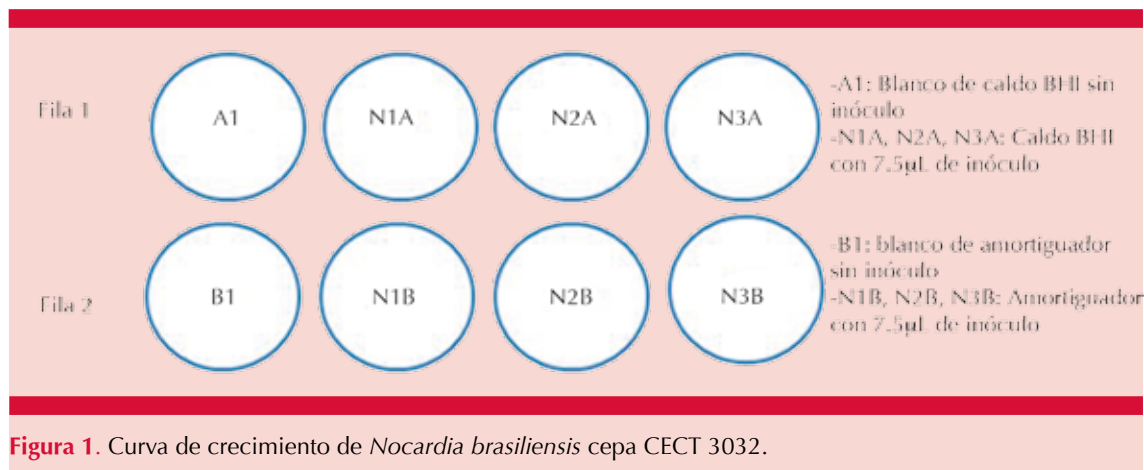
#### **Curva de crecimiento de *Nocardia brasiliensis* cepa CECT 3032 en amortiguador**

Se realizó una suspensión bacteriana con *N. brasiliensis* en caldo BHI  $300 \times 10^6$  UFC/mL. Se utilizó una placa de 12 pozos. En la fila 1 se agregó 1.5 mL de caldo BHI y en la fila 2 se agregó 1.5 mL de la solución amortiguador de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2 en cada uno de los pozos; después se agregó una alícuota de 7.5  $\mu$ L de la suspensión de *N. brasiliensis*, como se muestra en la Figura 1.

La placa se incubó a 37°C durante 48 horas en un equipo EPOCH/2 lector de microplacas (Biotek), se tomaron muestras cada hora para obtener la curva de crecimiento. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 492 nm.

#### **Determinación de la actividad enzimática de la $\beta$ -glucuronidasa presente en cortes histológicos de muestras de pacientes infectados con *Nocardia brasiliensis***

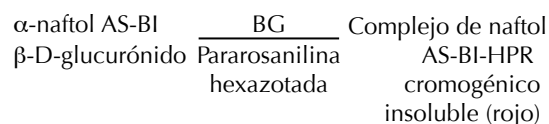
Se desparafinaron las laminillas para posteriormente fijarlas por 30 segundos con la solución citrato/acetona/formaldehído del paquete; se aclararon con agua desionizada para su posterior incubación en la solución incubadora del paquete, contenida en un vaso de Coplin protegido de la luz, a 37°C por 90 minutos; al término de la incubación cada muestra se aclaró con agua de grifo por tres minutos; se dejó secar al aire por 15



minutos para finalmente sumergirla en un vaso de Coplin con una solución de azul de metileno a 10% para el contraste.

Se determinó la existencia de la enzima en tres cortes histológicos de pacientes con actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*; esto se realizó con ayuda del equipo de enzimas linfocitarias número 181-C de Sigma Aldrich que contiene Naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico como sustrato y pararosanilina como indicador. La prueba se realizó en tres cortes histológicos.<sup>12</sup>

El fundamento de la reacción se muestra a continuación:  
 $\beta$ -glucuronidasa:



## RESULTADOS

### Determinación de la actividad enzimática *in vitro* de la $\beta$ -glucuronidasa cuantificando la diferencia de peso en los granos de *Nocardia brasiliensis*

Antes del tratamiento con la enzima, los granos de *N. brasiliensis* se secaron y pesaron para obtener su peso inicial. Después de 96 horas

de tratamiento con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa se realizó el mismo procedimiento: los granos se dejaron secar y se volvieron a pesar para tener su peso final, como se muestra en el Cuadro 1.

Como se observa en el Cuadro 1, al utilizar una concentración de enzima de 200 unidades/mL en el primer grano, el peso perdido fue de 500  $\mu$ g, es decir, 50% de su peso inicial; con la concentración de 100 unidades/mL utilizada en el segundo grano el peso perdido fue de 200  $\mu$ g, es decir, 67% de su peso inicial y con la concentración de 50 unidades/mL utilizada en el tercer grano no hubo efecto. La pérdida de peso entre los dos primeros granos fue de 58% en promedio, al utilizar una concentración de enzima aproximada entre 100 y 200 U/mL (Figura 2).

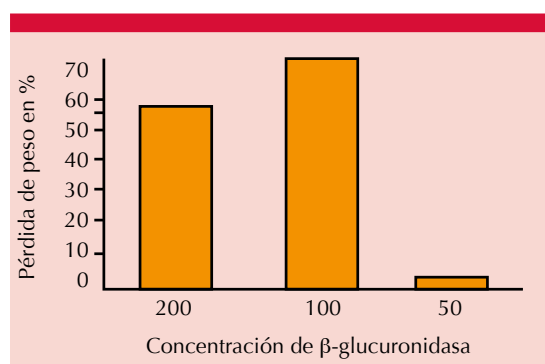
### Determinación de la actividad enzimática *in vitro* de la $\beta$ -glucuronidasa sobre los granos de *Nocardia brasiliensis* por el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (DuBois M)<sup>15</sup>

Para determinar la concentración de azúcares presentes en el sobrenadante proveniente del tratamiento enzimático de los granos se elaboró una curva estándar con concentraciones conocidas de glucosa. Una vez realizada la curva de calibración de glucosa se realizó el tratamiento



**Cuadro 1.** Peso de los granos al inicio y final del tratamiento con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa

| Granos | Concentración de $\beta$ -glucuronidasa (U/mL) | Peso inicial ( $\mu$ g) | Peso final ( $\mu$ g) a las 96 horas | Pérdida de peso por acción de la $\beta$ -glucuronidasa | Pérdida de peso por acción de la $\beta$ -glucuronidasa (%) |
|--------|------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1      | 200                                            | 1000                    | 500                                  | 500                                                     | 50                                                          |
| 2      | 100                                            | 300                     | 100                                  | 200                                                     | 67                                                          |
| 3      | 50                                             | 100                     | 100                                  | 0                                                       | 0                                                           |



**Figura 2.** Porcentaje de pérdida de peso de los granos de *N. brasiliensis* después de las 96 horas del tratamiento con  $\beta$ -glucuronidasa proveniente de células de polimorfonucleares neutrófilos.

de tres granos con tres diferentes concentraciones (200, 100 y 50 unidades/mL) de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en solución amortiguadora de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2 (un grano por cada concentración de enzima), se tomaron alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos y se cuantificaron la concentración de azúcares por el método de DuBois (Cuadro 2).

La concentración de azúcares en el sobrenadante de los granos tratados con las concentraciones de enzima de 200 y 100 unidades/mL aumentó en las primeras 72 horas. En el grano 3 se utilizó una concentración de 50 unidades/mL y se observó aumento en la concentración de azúcares únicamente a partir de las 48 horas y se mantuvo así hasta las 96 horas. Las otras dos concentraciones mostraron

tres veces más degradación (Cuadro 2). Debido a que los granos utilizados no tenían el mismo peso, se realizó la normalización, que permite determinar la relación de los valores de concentración de azúcares liberados respecto al peso de los granos; posteriormente se comparó con el valor del tiempo 0 h (sin tratamiento), los resultados relativos de la liberación de azúcares se muestran en la Figura 3.

#### Cuantificación de UFC en sobrenadantes de granos de *N. brasiliensis* tratados con diferentes concentraciones de $\beta$ -glucuronidasa

Durante el tratamiento de los granos con la enzima se tomaron muestras del sobrenadante y se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) de *N. brasiliensis* en agar BHI (Cuadro 3).

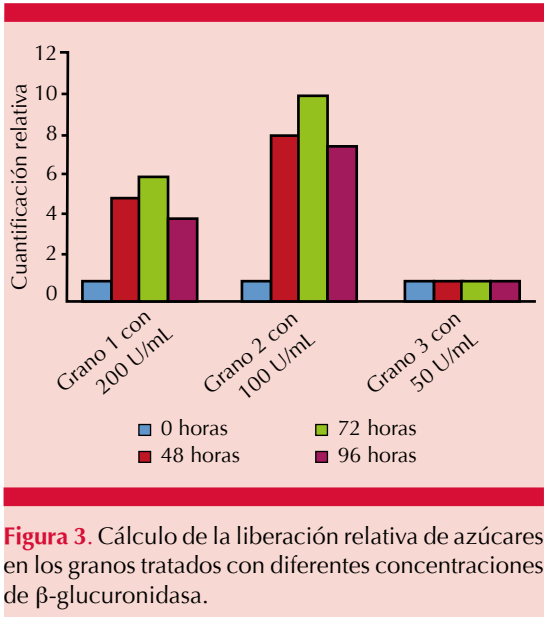
Como se observa en el Cuadro 3, a las 0 horas no hubo crecimiento en ninguno de los tres sobrenadantes de los granos de *N. brasiliensis* tratados con la enzima, a las 48 y 72 horas sólo hubo crecimiento de *N. brasiliensis* en el grano 2 tratado con 100 unidades/mL de la enzima, donde se encontró aumento gradual en cada tiempo; a las 96 horas no hubo crecimiento en ningún sobrenadante.

Para observar si el amortiguador de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2 puede inhibir o facilitar el crecimiento de *N. brasiliensis* se utilizó la cepa tipo de *N. brasiliensis* CECT 3032 en



**Cuadro 2.** Concentración de azúcares totales en el sobrenadante a distintas concentraciones de  $\beta$ -glucuronidasa y en diferentes tiempos

| Tiempo de incubación (horas) | Concentración de azúcares ( $\mu\text{g/mL}$ )               |                                                              |                                                             |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                              | Grano 1.<br>Concentración de $\beta$ -glucuronidasa 200 U/mL | Grano 2.<br>Concentración de $\beta$ -glucuronidasa 100 U/mL | Grano 3.<br>Concentración de $\beta$ -glucuronidasa 50 U/mL |
| 0                            | 4.6                                                          | 2.1                                                          | 1.0                                                         |
| 48                           | 21.7                                                         | 18.0                                                         | 8.1                                                         |
| 72                           | 27.7                                                         | 21.2                                                         | 8.0                                                         |
| 96                           | 21.2                                                         | 19.4                                                         | 7.7                                                         |



**Figura 3.** Cálculo de la liberación relativa de azúcares en los granos tratados con diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucuronidasa.

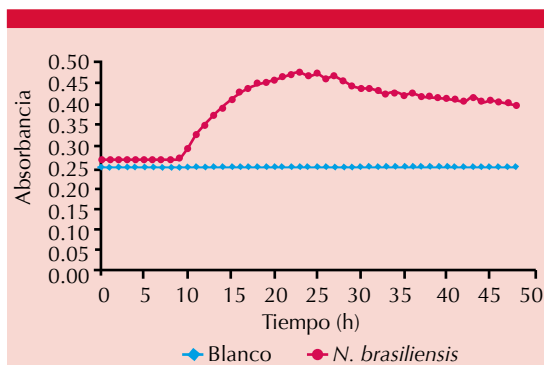
amortiguador de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2 y se realizó la curva de crecimiento, se comparó con el crecimiento de la misma cepa en caldo BHI.

En la Figura 4 se muestra que *N. brasiliensis* en caldo BHI tuvo un crecimiento típico en el que puede verse que la fase exponencial comienza a las 10 horas y se mantiene hasta las 23 horas, después comienza su fase estacionaria hasta las 27 horas.

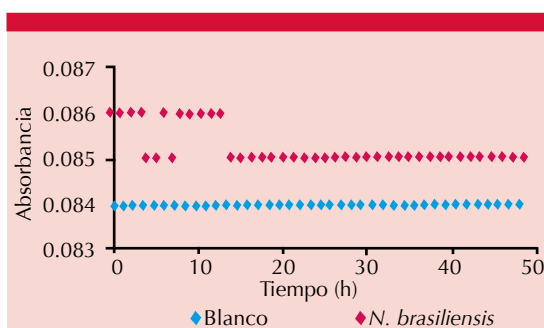
En la Figura 5 se muestra el comportamiento de *N. brasiliensis* en el amortiguador de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2 utilizado en el ensayo enzimático; como se observa, se mantuvo la concentración del inóculo las primeras 12 horas.

**Cuadro 3.** Cuenta de UFC/mL de los sobrenadantes de granos de *N. brasiliensis* tratados con diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucuronidasa

| Tiempo de incubación (horas) | Unidades formadoras de colonias                              |                                                              |                                                             |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                              | Grano 1.<br>Concentración de $\beta$ -glucuronidasa 200 U/mL | Grano 2.<br>Concentración de $\beta$ -glucuronidasa 100 U/mL | Grano 3.<br>Concentración de $\beta$ -glucuronidasa 50 U/mL |
| 0                            | -                                                            | 0                                                            | -                                                           |
| 48                           | -                                                            | $5 \times 10^4$                                              | -                                                           |
| 72                           | -                                                            | $5 \times 10^6$                                              | -                                                           |
| 96                           | -                                                            | -                                                            | -                                                           |



**Figura 4.** Curva de crecimiento de *N. brasiliensis* CECT 3032 durante 48 horas en caldo BHI.

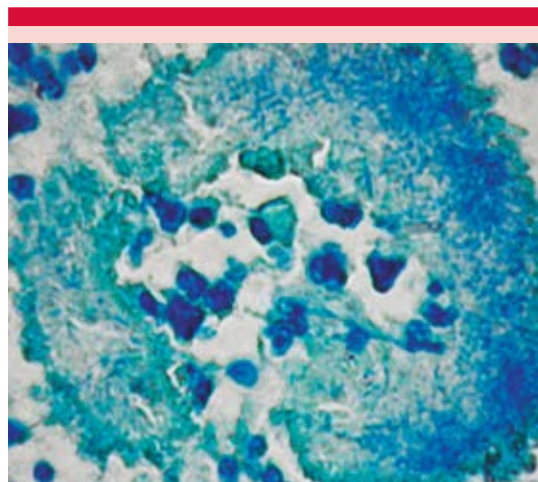


**Figura 5.** Curva de crecimiento de *N. brasiliensis* cepa CECT 3032 durante 48 horas en amortiguador de acetato de sodio 100 mM con pH 5.2.

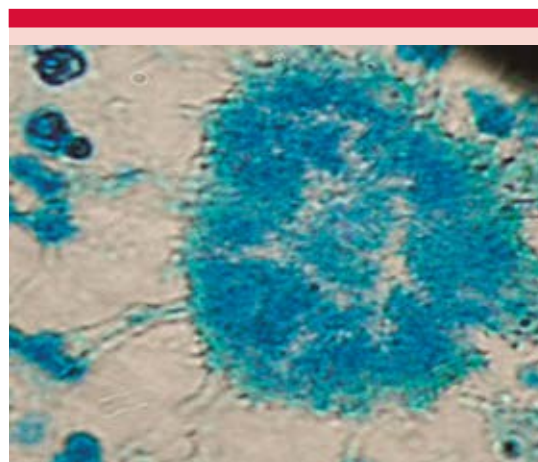
#### Determinación de la actividad enzimática de la $\beta$ -glucuronidasa presente en los granos de *Nocardia brasiliensis*

En el grano por *Nocardia brasiliensis* se observan células mononucleares y polimorfonucleares rodeadas por bacilos en agregados y la formación de filamentos.

En las Figuras 6 a 8 puede observarse actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa proveniente de células polimorfonucleares neutrófilos presentes en actinomicetomas por *Nocardia brasiliensis*, demostrada a través de la reacción efectuada con el paquete de enzimas linfocíticas número

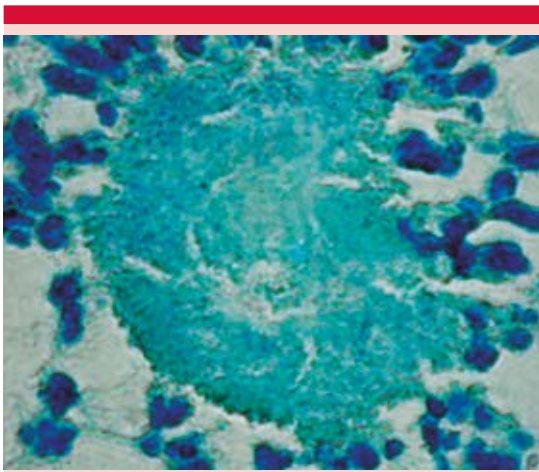


**Figura 6.** Actividad enzimática positiva de  $\beta$ -glucuronidasa en corte histológico de un actinomicetoma por *N. brasiliensis* demostrada por la coloración roja en el centro del grano (paciente 1).



**Figura 7.** Actividad enzimática positiva de  $\beta$ -glucuronidasa en corte histológico de un actinomicetoma por *N. brasiliensis* demostrada por la coloración roja en el centro del grano (paciente 2).

181-C que utiliza como sustrato al Naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico y pararosanilina como indicador y al entrar en contacto con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa contenida en el corte, libera naftol y forma un complejo cromogénico de co-



**Figura 8.** Actividad enzimática positiva de  $\beta$ -glucuronidasa en corte histológico de un actinomictoma por *N. brasiliensis* demostrada por la coloración roja en el centro del grano (paciente 3).

lor rojo. Esta coloración puede observarse en el grano, como se muestra en las figuras anteriores. La cantidad de enzima que se encuentra en los granos es capaz de degradar al polisacárido neutro que amalgama a las bacterias en el grano.<sup>15</sup>

## DISCUSIÓN

En 2014 Palma y su grupo demostraron la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa en granos de pacientes con actinomictoma por *Actinomadura madurae* que dio como resultado la degradación del polisacárido ácido sulfatado presente en estos granos, cuantificando la concentración de azúcares en el sobrenadante del estudio de la actividad enzimática.<sup>16,17</sup>

En el caso de los granos de *Nocardia brasiliensis* el polisacárido es neutro y al cuantificar el peso de los granos tratados con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa se encontró pérdida significativa de 58%, aproximadamente, al utilizar las concentraciones enzimáticas de 200 y 100 unidades/mL se observaron buenos resultados.

Al cuantificar los azúcares totales en el amortiguador usado para realizar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en los granos de *N. brasiliensis* también comprobamos que la enzima logra degradar la capa de polisacárido neutro que rodea los granos, porque la concentración de azúcares fue en aumento hasta las 72 horas de actividad, principalmente en las concentraciones de 200 y 100 unidades/mL.

De acuerdo con la cuenta estándar de *N. brasiliensis* a las 48 y 72 horas de actividad enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa, en la concentración de 100 unidades/mL se observó aumento en las UFC/mL en cada tiempo, por lo que se demostró que las bacterias que se encuentran en los granos de actinomictoma se liberaron debido a la degradación de la capa de polisacárido neutro que las rodea. Hay un problema en la cuantificación de UFC/mL porque es probable que las bacterias presentes en el centro del grano no sean viables.

En los estudios realizados utilizando el paquete de enzimas linfocíticas número 181-C de Sigma Aldrich en cortes histológicos de granos de *N. brasiliensis* se logró observar la actividad enzimática *in situ* de la  $\beta$ -glucuronidasa proveniente de los polimorfonucleares que se encuentran rodeando y dentro de los granos en el actinomictoma por este microorganismo.

En la determinación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa presente en los cortes de los granos de *N. brasiliensis* también se observan células mononucleares y polimorfonucleares que contienen bacilos en agregados y la formación de filamentos.<sup>18</sup>

Es importante reflexionar acerca de la importancia del polisacárido en los granos de *Nocardia brasiliensis* como factor de patogenicidad porque puede considerarse biopelícula. Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización de los



microorganismos;<sup>19,20</sup> también son el origen de muchas enfermedades, como fibrosis quística, otitis media, periodontitis e infecciones nosocomiales, entre otras.<sup>21,22</sup> Se consideran comunidades bacterianas que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y adheridas a una superficie inerte o un tejido vivo.<sup>23</sup> La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases: acondicionamiento, adhesión, síntesis de matriz extracelular, maduración y dispersión,<sup>24</sup> lo que lleva a la generación de una estructura uniforme a manera de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeadas de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua.<sup>25</sup> Estos hallazgos son importantes porque la descripción del crecimiento de *N. brasiliensis* como biopelícula puede modificar sustancialmente el conocimiento de la posibilidad de interferencia en las respuestas inmunológicas para eliminar a este patógeno; incluso puede considerarse un factor de virulencia que facilite la persistencia de esta bacteria en el huésped y la posibilidad de que el exopolisacárido que ésta secreta interfiera en la resistencia a los antibióticos en el tratamiento del actinomicetoma.<sup>26,27</sup>

## CONCLUSIÓN

La enzima  $\beta$ -glucuronidasa de neutrófilos tiene buena actividad enzimática sobre el cemento de unión (polisacárido neutro) de los granos del actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

## REFERENCIAS

1. Padilla DM, Vidal A. Micetoma en dorso por *Nocardia brasiliensis*. Comunicación de un caso. Rev Cent Dermatol Pascua 2004;13:33-36.
2. Lavalley AP, Padilla DM, Pérez GJ, Rivera I, Reynoso RS. Micetomas por *Actinomyces madurae* en México. Rev Cent Dermatol Pascua 2000;9:19-24.
3. López MR, Méndez TL, Bonifaz A, Arenas R y col. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. Gac Méd Méx 2013;149:586-592.
4. Rodríguez AM, Sánchez D, Paulino R, Padilla DM, Ramos GA. Micetoma podal por *Nocardia brasiliensis*. Rev Cent Dermatol Pascua 2004;13:37-40.
5. Hinshaw M, Longley BJ. Histopathology of the skin. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 2005;626-627.
6. Barrón TM, Araiza J, Estrada AL, Mercadillo PP y col. Actinomicetoma por *Actinomyces pelletieri*. Dermatología Rev Mex 2011;55:223-228.
7. Padilla DM, Caballero AM, Martínez GE. Micetoma por *Nocardia brasiliensis* en región abdominal. Rev Cent Dermatol Pascua 2014;23:17-21.
8. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. Front Immunol 2014;5:1-7.
9. Mollinedo F. Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. Immunología 2003;22:340-358.
10. William NL, Barshop B, Ozand P. Atlas de enfermedades metabólicas. 2<sup>a</sup> ed. Londres: Hodder Arnold, 2005;501-503.
11. Fishman WH, Springer B, Brunette R. Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood beta-glucuronidase. J Biol Chem 1948;173:449-456.
12. Talalay P, Fishman WH, Huggins C. Chromogenic substrates; phenolphthalein glucuronic acid as substrate for the assay of glucuronidase activity. J Biol Chem 1946;166:757-772.
13. Goldstein G. Serum  $\beta$ -glucuronidase assay by the phenolphthalein mono- $\beta$ -glucuronide method. Clin Chem 1961;7:136-142.
14. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350-356.
15. Lorbacher P, Yam L, Mitus W. Cytochemical demonstration of  $\beta$ -glucuronidase activity in blood and bone marrow cells. J Histochem Cytochem 1967;15:680-687.
16. Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC, Reyes FF. Caracterización histoquímica de micetomas por *Actinomyces madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Mycobacterium mycetomatis*. Dermatología Rev Mex 2005;49:51-58.
17. Palma RA, Reyes MS, Castrillón RL, Fernández LS, et al. Detection of  $\beta$ -glucuronidase activity within *Actinomyces madurae* grains of human actinomycetoma. Advan Microbiol 2014;4:317-323.
18. Salinas CM, Torres LE, Ramos AI, Licon TA, González SD. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c Mice. Infect Immun 1999;67:2428-2432.
19. Bethencourt M, García LJ, Corzo A, Villahermosa D, Matres V. Efecto de la biopelícula de aceros inoxidables austeníticos en estaciones depuradoras de aguas residuales. Rev Metalurgia 2010;46:37-51.
20. Beech IW, Sunner J. Biocorrosion: towards understanding the interactions between biofilms and metals. Curr Opin Biotechnol 2004;15:181-186.



21. Hall SL, Costerton WJ, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infection diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108.
22. Donlan RM, Costerton WJ. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-193.
23. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
24. Castrillón RL, Palma RA, Padilla DM. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex* 2010;54:14-24.
25. Sutherland WI. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001;147:3-9.
26. Djordjevic D, Wiedmann M, McLansborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2950-2958.
27. Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, Madhyashta MS. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34:1-4.