

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA
PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE RATONES
BALB/c INFECTADOS O INMUNIZADOS CON
ANTIGENOS DE *Nocardia brasiliensis*.**

Por
LUIS EDGAR RODRIGUEZ TOVAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de
**MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1997.

TM

QR82

.N6

R6

c.1



1080071212

TM
QR82
.N6
R6

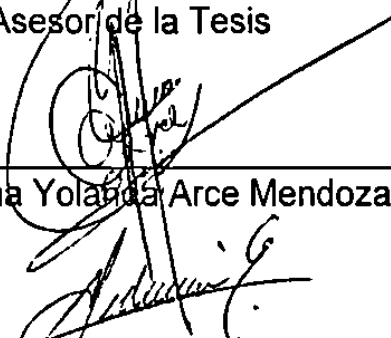


**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE
LINFOCITOS DE RATONES BALB/c INFECTADOS O INMUNIZADOS CON
ANTÍGENOS DE *Nocardia brasiliensis*.**

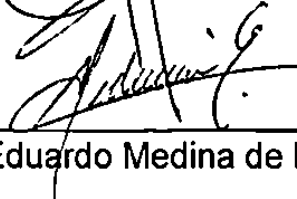
Aprobación de la Tesis:



Dr. Mario César Salinas Carmona
Asesor de la Tesis



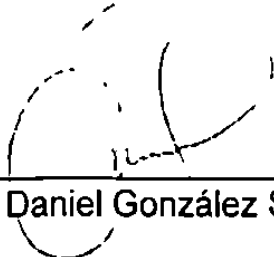
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza



Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza



M. C. Alicia Suárez Semour



Dr. Daniel González Spencer



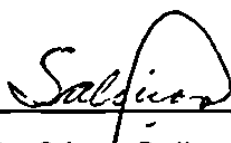
Dra. Ma. Esthela Morales Pérez
Secretaria Académica del Área Básica
Subdirección de Estudios de Postgrado

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE
LINFOCITOS DE BAZO Y GANGLIO LINFÁTICO DE RATONES BALB/c
INFECTADOS O INMUNIZADOS CON ANTÍGENOS DE *Nocardia*
brasiliensis.**

Presentado por: M.V.Z. Luis Edgar Rodríguez Tovar

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona. Apoyado por CONACYT, proyecto F 123-19201.

Asesor



Dr. Mario César Salinas Carmona

DEDICATORIA

A Dios, guía constante y fuente de iluminación durante toda mi vida.

A mi esposa Alicia Magdalena, quien siempre ha estado a mi lado dándome la calidez de su compañía, la franqueza de su apoyo y motivándome a seguir adelante. Te amo.

A mi hijo Luis Roberto, que con su llegada a nuestras vidas ha infundido un nuevo sentido de alegría y superación ilimitados.

A mis padres, José Luis y Prisci de Rodríguez, que siempre creyeron en mí y son un ejemplo a seguir.

Con profundo cariño y respeto a mis hermanos, Omaira, Jorge Luis y Mary de Rodríguez, Roberto (q.e.p.d), Celina y Juan Nevárez.

A mis padres políticos Roberto e Irma de Nevárez quienes han sido un gran apoyo y mi segunda familia.

AGRADECIMIENTOS

Con profunda admiración y respeto a mi profesor y asesor, Dr. Mario César Salinas Carmona, por el honor de permitirme participar en su equipo de investigación y por ser un verdadero ejemplo de dedicación al trabajo y superación constante.

Con especial agradecimiento a la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza por todo su apoyo y por sus valiosas sugerencias, como la de externar siempre conceptos sólidos.

Al Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza, por sus acertados comentarios y consejos, así como el involucrarme en sus trabajos de investigación.

A la M.C. Alicia Suárez Semour, por su paciencia, sugerencias y disponibilidad de apoyarme siempre.

Al Dr. Daniel González Spencer por sus valiosos y enriquecedores comentarios e ideas que le dieron sentido a mi tesis.

Al Dr. Rafael Ramírez Romero por su incondicional apoyo al permitirme estudiar y obtener un nivel más de preparación.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez, por las facilidades y apoyo que me brindó para concluir esta tesis.

A la M.C. Alma Isabel Ramos y al Dr. Ángel Licón por ser ejemplos de paciencia y disciplina en el trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Inmunología Celular que me ayudaron con sus sugerencias y que aligeraron mi estancia en el mismo: Angeles Castro, Irma Martínez, Verónica López, Ernesto Torres, Luz Isabel Pérez y Silvia Casillas.

A todos mis compañeros del Departamento de Inmunología, quienes me brindaron su amistad y parte de su tiempo: Helga Leslie García, Sergio Domínguez, Marisol Espinosa, Sonia y Velia Marmolejo.

Al personal del Departamento de Inmunología: Bety, Lizzy, Aracely, Carlitos y Francisco.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	3
III. OBJETIVOS.	13
1. Objetivo general.	
2. Objetivos específicos.	
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	
1. Animales de Experimentación.	14
2. Obtención de la Cepa Bacteriana.	14
3. Obtención de la Suspensión Unicelular.	15
4. Obtención del Extracto Celular Crudo (ECC).	15
5. Obtención del Extracto Semipurificado (ES).	16
5.1 Precipitación con Sulfato de amonio.	16
5.2 Cromatografía de Filtración en gel con Sephadex G-100.	17
6. Análisis del ECC y del ES de <i>N.brasiliensis</i> por Electroforésis en gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes.	18
7. Determinación de la Dosis Optima de los Antígenos de <i>N.brasiliensis</i> para la Estimulación <i>in vitro</i> de Linfocitos.	20
7.1 Animales.	20
7.2 Medio de Cultivo.	21
7.3 Antígenos Utilizados.	21
7.3.1 <i>N. brasiliensis</i> radiada con UV.	21
7.3.2 Extracto Celular Crudo.	22

	Página
7.3.3 Extracto Semipurificado.	22
7.4 Estimulación <i>in vitro</i> de Linfocitos.	22
8. Esquema de Inmunización General.	24
9. Cinética de la Respuesta Proliferativa de Linfocitos de Bazo y Ganglio Linfático Poplíteo de ratones BALB/c.	26
9.1 Animales Infectados con <i>N. brasiliensis</i>	26
9.2 Animales Inmunizados con el ECC.	27
9.3 Animales Inmunizados con el ES.	27
10. Evaluación Estadística.	27
V. RESULTADOS.	
1. Obtención de la Suspensión Unicelular de <i>N. brasiliensis</i> .	28
2. Recolección de la Masa Bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> .	28
3. Obtención del ECC.	28
4. Análisis Electroforético del ECC.	29
5. Precipitación del ECC.	29
6. Obtención del ES por Filtración en gel con Sephadex G-100.	29
6.1 Calibración de la Columna Cromatográfica Para la Obtención del ES.	29
6.2 Elución del ECC Precipitado con Sulfato de Amonio.	31
7. Análisis Electroforético del ES.	31
8. Dosis Optima de los Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> Para la Respuesta Proliferativa de Linfocitos.	33

	Página
8.1 Condiciones Ideales.	33
8.2 Concentración Óptima de <i>N. brasiliensis</i> .	37
8.3 Concentración Óptima de ECC.	37
8.4 Concentración Óptima de ES.	37
9. Cinética de la Respuesta Proliferativa de Linfocitos de bazo y de Ganglio Linfático Poplíteo de Ratones BALB/c.	37 37
9.1 Animales Inyectados con <i>N. brasiliensis</i> .	42
9.1.1 Células de Bazo.	42
9.1.2 Células de Ganglio Linfático Poplíteo.	42
9.2 Animales Inyectados con el Extracto Complejo Soluble.	42
9.2.1 Células de Bazo.	42
9.2.2 Células de Ganglio Linfático Poplíteo.	46
9.3 Animales Inyectados con el ES con AIF.	46
9.3.1 Células de Bazo.	46
9.3.2 Células de Ganglio Linfático Poplíteo.	46
9.4 Animales Inyectados con el ES sin AIF	46
9.4.1 Células de Bazo.	46
9.5 Animales Empleados Como Control.	50
9.5.1 Células de Bazo.	50
10. Análisis de Varianza y Distribución t (t de Student).	50
10.1 Linfocitos de Bazo.	50
10.2 Linfocitos de Ganglio Linfático Poplíteo.	60
11. Determinación de Ac anti-p24 por ELISA.	60

	Página
VI. DISCUSIÓN.	62
VII. CONCLUSIONES.	70
VIII. BIBLIOGRAFIA.	71
IX. APÉNDICES.	
APÉNDICE A. EQUIPO.	75
APÉNDICE B. REACTIVOS QUÍMICOS.	77
APÉNDICE C. ABREVIATURAS.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente 8-18% del ECC de <i>Nocardia brasiliensis</i> . Carril N° 1: Marcadores de peso molecular. Carril N° 2: ECC.	30
2. Perfil de elución del extracto soluble semipurificado de <i>Nocardia brasiliensis</i> junto con marcadores de PM en una columna de Sephadex G-100.	32
3. Análisis en SDS-PAGE en gradiente 8-18% de las fracciones obtenidas en Sephadex G-100 al eluir el sobrenadante obtenido al precipitar el ECC para obtener el Ag soluble semipurificado (ES). Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carriles 2-5: Fracciones del ES.	34
4. Estandarización de las condiciones de cultivo utilizando ConA como mitógeno.	35
5. Estandarización de las condiciones de cultivo utilizando PHA como mitógeno.	36
6. Determinación de la dosis óptima de <i>Nocardia brasiliensis</i> para el estímulo <i>in vitro</i> de linfocitos de bazo.	38
7. Determinación de la dosis óptima del ECC de <i>Nocardia brasiliensis</i> para el estímulo <i>in vitro</i> de linfocitos de bazo.	39
8. Determinación de la dosis óptima del ES de <i>Nocardia brasiliensis</i> para el estímulo <i>in vitro</i> de linfocitos de bazo.	40

	Página
9. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> .	43
10. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> .	44
11. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el ECC de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	45
12. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c inmunizados con el ECC de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	47
13. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el ES de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	48
14. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c inmunizados con el ES de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	49
15. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> (Control positivo y negativo).	51
16. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> . (Control positivo y negativo).	52
17. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el ECC de <i>Nocardia</i>	54

	Página
18. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c inmunizados con el ECC de <i>Nocardia brasiliensis</i> . (Control positivo y negativo).	55
19. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el ES de <i>Nocardia brasiliensis</i> . (Control positivo y negativo).	56
20. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c inmunizado con el ES de <i>Nocardia brasiliensis</i> . (Control positivo y negativo).	57
21. Respuesta proliferativa de Linfocitos de Bazo. Ratones Inmunizados con el E.S. (Control Positivo y Negativos).	58
22. Respuesta Proliferativa de Linfocitos de Ganglio Linfático Poplíteo. Ratones Inmunizados con el E.S. (Controles Positivo y Negativos).	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Volumen de elución de 3 marcadores de peso molecular aplicados a una columna para cromatografía de filtración en gel empaquetada con Sephadex G-100.	31
II. Determinación de la dosis óptima de los Ags de <i>N. brasiliensis</i> para la estimulación <i>in vitro</i> de linfocitos.	41
III. Índice de Estimulación de linfocitos de bazo y de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c.	53
IV. Distribución t. Comparación de las cinéticas de los linfocitos de bazo de ratones BALB/c.	61
V. Distribución t. Comparación de las cinéticas de los linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c.	

I. RESUMEN

Nocardia brasiliensis es un agente causal de micetoma, el cual afecta la piel y el tejido subcutáneo. Es una bacteria grampositiva, parcialmente ácido resistente y se comporta en el hospedero como intracelular facultativo. El papel que juega la inmunidad humoral en la resistencia contra la infección experimental parece nulo. Se ha considerado a la inmunidad celular como un mecanismo esencial para la defensa contra la infección. En el presente trabajo nos propusimos estudiar la respuesta inmune celular contra antígenos de *N. brasiliensis* a través de la respuesta proliferativa de linfocitos de ratones BALB/c infectados o inmunizados con antígenos solubles.

La obtención de los antígenos fue como sigue: de un cultivo de *N. brasiliensis* (HUJEG-1), mantenida en caldo BHI se obtuvieron, 1) la suspensión unicelular, 2) el antígeno soluble complejo (Extracto Crudo) y, 3) el antígeno soluble semipurificado (Extracto Semipurificado). El análisis de los antígenos solubles se realizó mediante SDS-PAGE en gradiente. El antígeno soluble semipurificado se obtuvo mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-100. Con estos antígenos se inocularon diferentes ratones por vía S.C. Luego, se sacrificaron en grupos de 5, al cabo de 7, 14, 21, 28, 45 y 60 días.

Preparamos una suspensión de células mononucleares de bazo que se resuspendieron (2×10^5), en 0.2 ml de RPMI-1640 con glutamina 2mM, antibióticos y SFB (5%). Se cultivaron en placas de microcultivo de fondo plano. Se estimularon con ConA (0.05 μ g), *N. brasiliensis* UV/radiada

(1×10^6), antígeno soluble complejo (2 μg) y antígeno soluble semipurificado (0.6 μg), y se incubaron por 5 días a 37° C en 5 % de CO_2 .

La proliferación celular se determinó por la incorporación de timidina tritiada medida en cuentas por minuto y los resultados se expresaron como índice de estimulación (IE).

La respuesta proliferativa de linfocitos de los ratones infectados y la de los inmunizados con ambos antígenos solubles fue mayor en el día 21 postinmunización. En el grupo infectado, el IE fue de 7.6 para el antígeno soluble complejo y de 5.26 para el antígeno homólogo (*N. brasiliensis*). Para el grupo inmunizado con el antígeno soluble complejo, el mayor IE (4.73) correspondió para el antígeno homólogo. Así mismo, para el grupo inmunizado con el antígeno soluble semipurificado, el mayor IE fue para el antígeno homólogo (IE=9).

La infección con *N. brasiliensis* induce mayor proliferación linfocitaria que la observada con antígenos solubles.

II. INTRODUCCIÓN

Nocardia brasiliensis es uno de los agentes productores de micetoma, el cual es una infección crónica y granulomatosa que afecta la piel, el tejido subcutáneo, músculo y órganos adyacentes al sitio de la lesión.

Históricamente fue reconocida como una entidad infecciosa por Gill en 1842 mientras trabajaba en la provincia de Madura, en la India, en donde fueron observados los primeros casos de esta infección; de ahí su designación a esta enfermedad como **pie de Madura**. Posteriormente, en 1860, Carter estableció una etiología micótica para este padecimiento y la denominó **micetoma**. No obstante, en 1906 Brump propuso el término de **Madurella** para un hongo aislado de un **gránulo negro** en un paciente (7, 20). No fue sino hasta 1913 cuando Pinoy subdividió a los micetomas en dos grandes grupos: los que eran causados por bacterias del grupo de los **actinomicetos** y los que eran ocasionados por los **eumicetos** u hongos verdaderos. Posteriormente otros investigadores harían importantes contribuciones al estudio de estos dos importantes grupos (37).

Entre las bacterias que producen los **actinomicetomas** se encuentran *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia caviae*.

El género *Nocardia* se encuentra muy relacionado a otros actinomicetos que poseen abundantes ácidos micólicos en su pared celular, entre los que se encuentran los géneros *Corynebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Actinomyces* (39,40). Las

Nocardias son bacterias bacilares aerobias, grampositivas, no móviles, no esporuladas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes. Estos microorganismos desdoblan los azúcares por oxidación e hidrolizan a las proteínas, lo cual constituye la base para su diferenciación bioquímica. En agar Sabouraud crecen en un período de 4 a 5 días a una temperatura que oscila entre los 27 y 37° C. Las colonias presentan pliegues irregulares, están resaltadas y pueden ser lisas o rugosas, de color blancoamarillentas. Sin embargo, cuando crecen en medio líquido, como el medio de infusión cerebro-corazón (BHI), se origina la formación de una película en la superficie de apariencia seca y cerosa (11). La presencia de elementos miceliares permite diferenciar a las Nocardias de las micobacterias atípicas y saprófitas.

Las especies patógenas más importantes para el hombre son *N. asteroides* y *N. brasiliensis* (37). Se les considera como agentes saprófitos del suelo, los cuales están ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales de algunos países de Centroamérica, Venezuela, Colombia, Brasil, Estados Unidos de Norteamérica y México. En este último, el 98% de los micetomas son causados por actinomicetos, de los cuales el 86% es causado por *N. brasiliensis*.

La incidencia mundial más alta de micetoma está comprendida alrededor del trópico de Cáncer, entre las latitudes 15° S y 30° N. Los estados más afectados de la República Mexicana son: Morelos, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León. En el continente africano se localizan en Sudán, Senegal y Somalia. La India es el país asiático que presenta el mayor número de casos (49).

Actualmente se conocen cinco formas básicas de la infección por Nocardias: nocardiasis cutánea, subcutánea y linfocutánea (esporotricoides), sistémica y actinomicetoma.

La infección por Nocardias también ha sido reconocida en forma natural en los animales, siendo descrita en vacas, cabras, cerdos, ovejas, caballos, perros, gatos, primates, armadillos, venados, mamíferos marinos, aves y peces (4).

N. asteroides fue descubierta por el médico veterinario francés Nocard en 1888 a partir de una lesión que aún sigue afectando al ganado bovino, la mastitis. Esta bacteria produce la nocardiosis humana, la cual es una enfermedad caracterizada por la formación de múltiples abscesos en el pulmón o en el sistema nervioso central. Por otro lado, *N. brasiliensis* produce una infección localizada, el micetoma (50).

Por lo general, la nocardiosis se presenta como una infección oportunista, preferentemente en aquellos individuos que se encuentran inmunocomprometidos, tal y como sucede con los pacientes afectados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, o bien, los que se encuentran bajo un tratamiento antitumoral o postransplante, lo cual constituye uno de los factores predisponentes más frecuentemente asociados a esta infección. Así mismo, también se ha encontrado en personas que padecen diabetes mellitus (25).

En contraste, el micetoma se presenta en individuos inmunocompetentes, usualmente comienza en un sitio localizado, tal y como

sucede después de la punción causada por una espina o una astilla. Es por esto que el micetoma se observa frecuentemente en los pies, piernas, brazos y manos. Sin embargo, pueden localizarse en cualquier sitio anatómico, como en la espalda y en los hombros (24,49).

El micetoma inicia como un nódulo indoloro, desarrollándose días o meses después de la infección. Este nódulo incrementa de tamaño, llegando a ser purulento y necrótico. El pus es descargado a través de varias fístulas y va generalmente acompañado de los típicos **granos**, que son característicos de la enfermedad. Estos granos representan a las microcolonias del agente infeccioso, el cual se encuentra rodeado de células inflamatorias. También se pueden presentar alteraciones verrucosas de los bordes de la lesión que resultan en deformaciones de las extremidades inferiores (23,28).

El exámen microscópico de la lesión revela un proceso inflamatorio y fibroplásico de los tejidos caracterizado por la presencia de numerosos microabscesos en cuyo interior aparecen las microcolonias de nocardia incluidas en un exudado inflamatorio rico en polimorfonucleares neutrófilos (PMN). Entre este exudado y el micelio nocardial aparece un material eosinófilo de aspecto fibrilar dispuesto a manera de corona radiante. En la periferia de los abscesos aparece una reacción granulomatosa acompañada de fibroplasia extensa. Los abscesos se encuentran comunicados entre sí y a la superficie mediante trayectos fistulosos.

A pesar de que los actinomicetos son abundantes en el medio y existe la posibilidad de adquirirlos, los casos de micetoma son pocos. Por lo

tanto, se cree que existan múltiples factores que influyan en la presentación y desarrollo de la enfermedad. No se conocen todavía los mecanismos de patogenicidad de la *Nocardia* ni el papel que juega la respuesta inmune del hospedero durante la infección por estas bacterias. La respuesta inmune contra *Nocardia* ha sido estudiada empleando animales como modelo experimental, ya que ofrecen la posibilidad de investigar varios aspectos de esta enfermedad (13,20,47,50).

Se ha observado que dentro de la **inmunidad no específica**, los macrófagos pueden eliminar a la mayoría de estas bacterias del tejido del hospedero mediante la fagocitosis no selectiva. Además, pueden actuar tanto bajo el control de la inmunidad humoral como de la celular (3, 4). La tasa de bacterias que son fagocitadas y eliminadas depende de varios factores tanto del hospedero como del agente patógeno (3) . En un estudio realizado *in vitro* (15) se utilizaron macrófagos peritoneales de ratón y *N. asteroides*. En dicho experimento se observó que estos microorganismos eran fagocitados fácilmente, disminuyendo drásticamente el número de bacterias ingeridas durante los primeros doce días. Sin embargo, fue seguido por un aumento en el número de las mismas a los 16 días aproximadamente. El exámen microscópico reveló que solo unos cuantos microorganismos fueron capaces de sobrevivir intracelularmente en un **estado alterado** (formas L). Esto fue corroborado posteriormente por Beaman y Smather (6, 10), empleando para su estudio macrófagos alveolares de conejo.

Por otro lado, *N. asteroides* resultó ser citotóxica para los macrófagos peritoneales de cobayo (40). Algunas de las cepas virulentas

llegaron a ser destruidas por la formación de células gigantes multinucleadas (3).

Beaman observó que las cepas virulentas de *N. asteroides* son capaces de crecer dentro de los macrófagos alveolares de conejo. Sin embargo, esta proliferación intercelular era inhibida, sin llegar a ser destruidas, al utilizar células bacterianas en fase estacionaria de crecimiento y solo apareció un retardo temporal en el crecimiento al usar bacterias en la fase logarítmica. En contraste, al agregar suero específico a los microorganismos antes de la incubación con macrófagos se incrementó la inactivación de las bacterias en fase logarítmica, pero no las que se encontraban en la fase estacionaria (3, 6, 39).

Por otra parte, se ha logrado disminuir el número de bacterias vivas e incrementar el daño a la pared celular de las mismas, cuando macrófagos alveolares provenientes de conejo son activados al ser incubados concomitantemente con linfocitos específicos, mismos que se obtuvieron del ganglio linfático, en presencia de suero inmune y surfactante. La activación de los macrófagos es una condición necesaria para la protección contra *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. (15,20). De la misma manera, se ha estudiado el papel que juegan los PMN en la infección provocada por *Nocardia*. Estas células fagocíticas eliminan la mayor parte de los microorganismos a través de las vías dependientes e independientes de oxígeno (5, 19,39).

Filice y colaboradores, observaron que el porcentaje de *N. asteroides* viable dentro de los PMN era menor, 10%, si se le comparaba con la eliminación casi total, 90%, de otros microorganismos tales como *Listeria*

monocytogenes y *Staphylococcus aureus*, al cabo de 4 horas de incubación (19).

Estos mismos investigadores encontraron, mediante técnicas de quimioluminiscencia, que *N. asteroides* era capaz de resistir los mecanismos bactericidas de la célula inflamatoria, al parecer por presentar esta última un estallido respiratorio menos intenso; lo opuesto se presentaba al emplear *Candida* spp. Esto mismo fue corroborado por otros investigadores (40).

A diferencia de lo que sucede en el caso del macrófago, las células de *Nocardia* no son parásitos intracelulares facultativos de los PMN. Estas células inflamatorias desempeñan un papel importante en la resistencia al retardar el crecimiento de las bacterias, esto es, al permitir el desarrollo de una respuesta inmune celular adecuada (19).

Se ha sugerido que la resistencia del microorganismo a los mecanismos bactericidas tanto de los macrófagos como de los PMN, puede deberse a lo siguiente: un incremento en los niveles de catalasa y de superóxido dismutasa bacterianos; una disminución en la actividad de las enzimas lisosomales; un bloqueo en la acidificación del fagosoma ó a cambios constantes, estructurales y bioquímicos, de la envoltura bacteriana, entre los que se encuentra el efecto tóxico del **factor cuerda** (dimicolato de trealosa) ya que inhibe la fusión de las membranas dependientes del calcio (5, 41).

En lo referente a la **inmunidad adoptiva**, es poca la información que se tiene de la inmunidad humoral. Aparentemente, existen anticuerpos anti-*Nocardia* en circulación sanguínea durante las diferentes etapas de la

infección. La concentración de anticuerpos séricos en el ratón es evidente a los 14 días postinfección y se mantiene por 200 días (47); sin embargo, el requerimiento de los linfocitos B en los mecanismos de resistencia hacia *Nocardia* no parece ser tan importante como el papel que desempeñan los linfocitos T durante los mismos (14,32).

En un experimento, Rico y colaboradores (32), observaron que la **transferencia** de anticuerpos anti-*Nocardia* tanto a ratones que previamente habían sido timectomizados como a ratones normales no los protegió de la aparición y posterior desarrollo del micetoma experimental; sino que aumentó la severidad de la infección. No obstante, en un estudio reciente llevado a cabo en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina (UANL), (47), se demostró que el suero hiperinmune de ratones que habían sido inoculados con *N. brasiliensis* muerta por calor evitó el establecimiento de la infección; empero, este mismo suero no mostró tener efectos protectores en ratones con el micetoma experimental establecido, lo cual concuerda con lo observado por otros investigadores (14).

Se ha empleado la **determinación de anticuerpos anti-*N. brasiliensis*** para desarrollar pruebas serológicas de rutina para el diagnóstico de pacientes infectados tanto por *N. asteroides* como por *N. brasiliensis* (1, 2,35).

La **respuesta inmune celular anti-*N. brasiliensis*** ha sido demostrada durante la infección por este germen. Esta respuesta se hace evidente *in vivo* por la reacción de hipersensibilidad tardía y por la formación de granulomas.

Se han realizado varios estudios sobre la hipersensibilidad tardía en el hombre y en los animales de laboratorio, estos últimos infectados con diferentes especies de *Nocardia*, con el objeto de confirmar infecciones en animales de experimentación. Sin embargo, la limitación de esta técnica ha sido el aislamiento y purificación de antígenos (Ags) específicos (37).

La inmunidad celular se ha considerado un mecanismo esencial para la defensa contra la infección por estos microorganismos (23,28). A este respecto, se ha investigado el papel de las células T en varios estudios: se ha encontrado que los ratones desnudos congenitamente atímicos, (Nu/Nu) son más susceptibles de sufrir lesión al infectarse con *N. asteroides* que su contraparte heterocigota (Nu/+) (16).

Se ha demostrado el papel del macrófago activado por los linfocitos T en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada anti-*N. brasiliensis* Deem, et. al. (17), han observado una población de linfocitos T específicos que matan directamente a *N. asteroides* por medio de una íntima asociación entre la pared celular del microorganismo y la membrana celular del linfocito T, en ausencia de otras células como PMN, mononucleares o macrófagos. Esta habilidad de las células T para matar a las células de *Nocardia* es inmunológicamente específica y pudiera ser considerado como un mecanismo de defensa del hospedero (17).

Es importante hacer notar que la patogénesis de la infección por *N. brasiliensis* es poco comprendida. El papel que juega la inmunidad humoral en la resistencia contra la infección experimental parece nulo; sin embargo, se ha sugerido que la inmunidad mediada por células juega un

papel mucho más importante (17,25). De igual manera, la mayoría de los estudios se han limitado a la respuesta del individuo hacia los antígenos particulados de esta bacteria, es decir, microorganismos vivos o muertos, y poca atención se le ha prestado a la respuesta inmune inducida por los antígenos solubles de este agente patógeno (25,29,43).

El trabajo en esta tesis se dirigió al estudio de la respuesta inmune celular en ratones infectados por *N. brasiliensis* o inmunizados con antígenos de la misma, mediante la determinación de la respuesta proliferativa de linfocitos retados *in vitro* contra antígenos particulados y solubles de la *N. brasiliensis*.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta inmune celular de ratones BALB/c contra antígenos de *N. brasiliensis* a través de la respuesta proliferativa de linfocitos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1. Obtener los antígenos particulados y solubles de *N. brasiliensis*.**
- 2. Determinar la dosis óptima de los antígenos de *N. brasiliensis* para estimular la respuesta proliferativa de linfocitos.**
- 3. Estudiar la cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y ganglio linfático de ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis* viva (antígeno particulado).**
- 4. Estudiar la cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y ganglio linfático de ratones BALB/c inmunizados extracto celular crudo de *N. brasiliensis* (antígeno soluble complejo).**
- 5. Estudiar la cinética de la respuesta de linfocitos de bazo y ganglio linfático de ratones BALB/c inmunizados con el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* (antígeno soluble semipurificado).**

IV. MATERIAL Y METODOS

1. Animales de experimentación.

Para realizar este trabajo utilizamos 102 ratones BALB/c (hembras de 16-18 semanas de edad), con un peso promedio de 28 g. Esta cepa fue gentilmente donada por el Dr. Hanson de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda, Ma) en 1982 y ha sido mantenida en el Bioterio del Departamento de Inmunología a una temperatura de 24°C en jaulas de acrílico de 37 cm x 27 cm x 15.5 cm en una relación de 8 animales por caja. Se les proporcionó alimento comercial (Purina de México S.A. de C.V.) y agua estéril *ad libitum*.

2. Obtención de la cepa bacteriana.

La bacteria *N. brasiliensis* utilizada en este estudio se obtuvo de la lesión de un paciente al cual se le diagnosticó micetoma en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (U.A.N.L). Este microorganismo fue identificado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y posteriormente se confirmó su identificación en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, (GA), Estados Unidos de América, gracias a la colaboración del Dr. Libero Ajello.

A esta bacteria se le denominó *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1, la cual posteriormente fue cultivada y mantenida en agar Sabouraud.

3. Obtención de la suspensión unicelular.

Se tomaron algunas pequeñas colonias que habían crecido en el agar Sabouraud y se colocaron en 2 matraces Erlenmeyer (Pyrex) de 125 ml a los cuales se les agregaron previamente 30 ml de caldo de cultivo infusión cerebro corazón (BHI, Difco Co.). Se incubaron en agitación constante a 37°C durante 48-72 h (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific).

Las colonias hidratadas se colocaron en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) con tapón de rosca y se centrifugaron en solución salina fisiológica (SSF 0.85%, Pisa) a 3,000 r.p.m. durante 15 minutos en tres ocasiones (Beckman TJ-6). Luego, se decantó el sobrenadante y las colonias fueron trituradas con el extremo romo de una varilla de vidrio y se centrifugaron de nuevo. Para su propagación se tomó 1 ml del sobrenadante y se inocularon 100 µl en 4 matraces Erlenmeyer (125 ml) con 30 ml de BHI, manteniéndose a 37°C por 48-72 h en agitación. Las colonias obtenidas se centrifugaron en tres ocasiones con SSF para luego disgregarse en un homogenizador de vidrio. (Potter-Ebelham Wheaton S. P.). El producto obtenido constituyó la suspensión unicelular, a la cual se le determinó cuenta viable por el método de Miles y Misra (11), para infectar a los ratones por vía subcutánea.

4. Obtención del Extracto Celular Crudo.

Para la expansión de la suspensión unicelular obtenida, se inocularon 40 matraces Erlenmeyer de 1 lt con 160 ml de BHI, manteniéndose a 37°C

por 7 días en reposo. La masa bacteriana se obtuvo pasando el contenido de los matraces utilizando un sistema de vacío a través de un embudo Buchner, el cual tenía en el fondo un papel filtro Whatman 1. En este mismo sistema, se deslipidizó con una mezcla de etanol-éter etílico en los siguientes volúmenes, 1:1, 1:2 y 1:3. Al final de este procedimiento, el sistema de vacío se dejó por 5 minutos más. La masa bacteriana ya seca, se trituró en un mortero de porcelana con polvo de vidrio (Pyrex) en 3 sesiones y luego se reconstituyó en 300 ml de Tris 0.01M pH 7.4 con acetato de magnesio 0.01M, dejándose en agitación constante a 4°C durante 12 h. El vidrio se eliminó por centrifugación y el sobrenadante se filtró al vacío en un embudo desmontable de 250 ml con filtros Whatman 1 y milipore de 0.45 μ . El extracto celular crudo obtenido se dializó contra agua bidestilada a 4°C durante 12 h en sacos de diálisis (Sigma R50-9U) con un poro de exclusión de 12-14 kDa. Luego, el dializado se liofilizó (Freeze Mobile Virtis) y la concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (9). Este extracto celular crudo (ECC) constituyó el antígeno para inmunizar a los ratones. Se tomó una alícuota para su análisis electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE), en gradiente 8-18%. El resto se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

5. Obtención del Extracto Semipurificado.

5.1 Precipitación con Sulfato de Amonio. La muestra liofilizada (100 mg) del ECC se reconstituyó en 12 ml solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1M pH 7.6. Posteriormente, se precipitó con sulfato de amonio saturado $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, ajustado a un pH de 7.4, a una concentración del 50%, el cual se agregó lentamente por goteo con una pipeta Pasteur, manteniéndose en agitación constante en baño de hielo por 1 h. El producto obtenido se

centrifugó a 3,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante colectado se dializó exhaustivamente contra solución salina fisiológica (SSF) mantenida en agitación constante a 4°C, comprobando periódicamente la presencia de sales de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ por la reacción de precipitación con cloruro de bario (BaCl). La muestra obtenida fue liofilizada, la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y se mantuvo en refrigeración para su posterior fraccionamiento por cromatografía en columna de tamizaje molecular.

5.2 Cromatografía de Filtración en Gel con Sephadex G-100. Se utilizó una columna de vidrio (Wheaton S. P.) de 23 cm de largo por 2.5 cm de diámetro interno, misma que se empaquetó con una matriz de Sephadex G-100 hidratada en PBS 0.1M pH 7.6 mantenida a 4°C. A esta columna se le determinó su volumen vacío (V_0) al pasar por la misma Dextrana Azul (1 mg en 1 ml de PBS), la cual se eluyó con PBS a razón de 0.5 ml por minuto. Después se calibró empleando marcadores de PM conocido:

<i>Marcador</i>	<i>P.M.</i>	<i>Reconstituido</i>
Citocromo C	16 kDa	2 mg/ml PBS
Anhidrasa Carbónica	29 kDa	3 mg/ml PBS
Albúmina Sérica Bovina	66 kDa	5 mg/ml PBS

Cada marcador se aplicó por separado eluyéndose con PBS a una velocidad de flujo de 0.5 ml por minuto a una temperatura de 4°C. Se recolectaron fracciones de 2 ml, se leyeron a una absorbancia (Abs) de 280 nm (Beckman DU-6) y se obtuvo el perfil de elución.

La muestra liofilizada obtenida al precipitar el ECC con sulfato de amonio se reconstituyó en PBS, se aplicó en la columna y se eluyó con éste mismo amortiguador, todo esto mantenido a 4°C. Se recolectaron fracciones de 2 ml del mismo y el volumen de elución (Ve) se graficó con los valores obtenidos de los marcadores de PM conocido obteniéndose aquellos eluidos que tenían una mayor Abs a 280 nm. Se tomaron alícuotas de los eluidos, las cuales se analizaron posteriormente en SDS-PAGE en gradiente 8-18%. El resto de las muestras se almacenó a -20° C. El gel fue teñido con azul de Coomassie para detectar en cuales eluidos se encontraba el ES. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Este extracto soluble constituyó el antígeno para inmunizar a los ratones por vía subcutánea.

6. Análisis del ECC y del ES de *N. brasiliensis* por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

El análisis electroforético de los **extractos solubles complejo y extracto semipurificado (E.S)**, se realizó en minigeles verticales de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, en gradiente 8.75-18% T, 2.7 C, discontinuos pH 6.8-8.6, según la metodología descrita por Laemmli (26). El SDS-PAGE lo preparamos como a continuación se describe.

El gel de corrimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Reactivos	8.7%	18%
Acrilamida-Bisacrilamida (30% T, 2.7% C)	0.720 ml	1.297 ml

Amortiguador Tris-HCl 3M		
ph 8.8	0.396 ml	0.396 ml
Glicerol al 50%	0.144 ml	0.222 ml
Agua Bidestilada	0.874 ml	0.193 ml
Dodecilsulfato de sodio	0.020 ml	0.020 ml
Persulfato de Amonio al 10 %	0.007 ml	0.007 ml

Para la formación del gel en gradiente, se contó con la ayuda de un aparato formador de gradientes con dos recipientes, uno para la solución de acrilamida al 8.7% y el otro para la de 18%. Las dos soluciones se mezclaron y fueron transferidas con una bomba peristáltica (LKB 2132 Microperpex) hacia un mini-cassette (Bio-Rad Laboratories) de 10 x 10 cm. El grosor de este gel fue de 0.75 mm.

Para preparar el gel de empaquetamiento, se realizó lo siguiente:

Reactivos	Cantidad
Acrilamida-Bisacrilamida (30% T, 2.7% C)	0.449 ml
Amortiguador Tris-HCl 1M	
pH 6.8	0.375 ml
Agua Bidestilada	1.98 ml
Dodecilsulfato de sodio al 10%	0.03 ml
Persulfato de Amonio al 10%	0.105 ml
TEMED	0.003 ml

Nuevamente, utilizamos el dispositivo formador de gradientes para transferir el gel de empaquetamiento hacia el mini-cassette. Para la formación de los carriles, se utilizó un peine de teflón con un espesor de 0.75 mm.

Las muestras de los ECC y ES, que previamente habían sido guardadas, así como los marcadores de P.M. conocido se mezclaron con amortiguador de muestra (Tris-HCl 125mM, pH 6.8, SDS al 10%, β -Mercaptoetanol al 10%, glicerol al 50% y 0.2% de azul de bromofenol como indicador del frente de corrimiento), en una relación de 1:4. Luego se calentaron a 100°C por 2 minutos. Una vez que se enfriaron, nuestras muestras y los marcadores se aplicaron con una micropipeta automática a los carriles del gel concentrador y se sometieron a electroforesis con un voltaje inicial de 80 V (Bio-Rad Laboratories), para luego incrementarlo a 150 V una vez que las muestras alcanzaron el gel de corrimiento. Cuando el colorante indicador llegó al extremo inferior del gel se procedió a teñirlo con azul de Coomassie.

Para la tinción del gel, éste se sumergió durante 30 minutos en una solución que contenía azul de Coomassie al 0.1%, metanol al 40% y ácido acético al 10%. Luego, se colocó en una solución desteñidora (metanol al 40% y ácido acético al 10%), para su posterior observación y análisis.

7. Determinación de la dosis óptima de los antígenos de *N.brasiliensis* para la estimulación *in vitro* de linfocitos.

7.1 Animales. Para este ensayo se utilizaron 8 ratones BALB/c, infectados con *N. brasiliensis* que desarrollaron micetoma experimental, hembras de

16-18 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en jaulas de acrílico propias para el caso y mantenidos a una temperatura de 24°C. El agua y el alimento se suministraron *ad libitum*.

7.2 Medio de cultivo. El medio de cultivo que empleamos fue el RPMI-1640 (Sigma R8005) al cual se le agregó L-glutamina 2 mM (Sigma), gentamicina 50 µg/ml (Sigma), penicilina 100 U.I./ml (Sigma). El suero fetal bovino (SFB) fue proporcionado por el Departamento de Inmunología. Este medio de cultivo se preparó según el fabricante en condiciones de esterilidad y se filtró pasándolo a través de filtros millipore de 0.45 y 0.22 µ; se envasó en recipientes de 0.5 y 0.25 lt y la temperatura para su almacenamiento fué de 4°C. Las placas de microcultivo eran de poliestireno con 96 micropozos con fondo plano (Corning).

7.3 Antígenos utilizados. Los Ags empleados para la estimulación *in vitro* de linfocitos fueron *N. brasiliensis* radiada con luz UV, ECC y ES. Estos Ags se prepararon de la siguiente manera:

7.3.1 *N. brasiliensis* radiada con UV. Se realizó con la finalidad de conservar las características antigénicas de la célula bacteriana intacta. Se siguió la metodología desarrollada por la QFB MC Alma Isabel Ramos Cano en el Departamento de Inmunología (31). A partir de la suspensión unicelular preparada y cuantificada previamente, se tomó 1 ml que contenía 1×10^9 UFC, colocándose en el fondo de una caja de Petri abierta (Pyrex), de 5 cm de diámetro interno. Luego se sometió a tratamiento con luz UV (115 volts, 50/60 Hz, 15 watts. Lapine Scientific Company), durante 90 minutos en un gabinete cerrado (Contamination Control Inc). Después, la suspensión radiada se recolectó bajo condiciones de esterilidad con una jeringa de 3 ml.

A continuación sometimos la suspensión unicelular a una diálisis contra RPMI-1640, para igualar las condiciones de cultivo y eliminar sales y agentes pirógenos, durante 12 h a 4°C. La diálisis se desarrolló en un tubo de vidrio de 6 cm x 1 cm de diámetro interno; uno de los extremos del tubo se encontraba esmerilado (Bio-Rad, Aparato de Electroelución). De igual forma, se empleó un empaque de hule de 2 cm x 1.3 cm de diámetro interno; entre el empaque y el tubo se colocó una membrana de diálisis con un poro de exclusión de entre 12-14 kDa. En el interior de este dispositivo se depositó 1 ml del Ag *N. brasiliensis* /UV. Al final, se obtuvo el Ag dializado, recolectándose en 2 alícuotas de 1ml. Estas, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.3.2 Extracto Celular Crudo. Se reconstituyó (240 µg) en RPMI-1640 sometiéndose a diálisis -en el dispositivo anteriormente descrito-, durante 12 h a 4°C. Al final se recolectaron 2 alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20°C.

7.3.3 Extracto Semipurificado. Se reconstituyó (570 µg) en RPMI-1640 y se dializó de la manera ya mencionada. Se recolectó en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

7.4 Estimulación *in vitro* de linfocitos.

Las células linfoides se obtuvieron de bazo y de ganglio linfático poplíteo de animales que habían sido infectados con *N. brasiliensis* (1x10⁶ bacterias vivas) y que habían desarrollado micetoma. Para la extracción de los órganos linfoides y obtención de las células se realizó el siguiente procedimiento:

El sacrificio se realizó por dislocación de las vertebrales cervicales; el bazo y el ganglio linfático poplíteo de la extremidad trasera infectada fueron extraídos bajo condiciones quirúrgicas estériles y se colocaron por separado en cajas de Petri de 5 cm de diámetro interno con 5 ml de RPMI-1640 adicionado con gentamicina 50 mg/ml, penicilina 100 U./ml y estreptomina 100 mg/ml (33,35). A continuación, estos órganos fueron disgregados y se obtuvo una suspensión celular reconstituida en 2.5 ml de RPMI. Las células fueron ajustadas a una concentración de 2×10^5 en 200 μ l de medio y se sembraron en placas de microcultivo de fondo plano. Para determinar la dosis óptima del mitógeno a utilizar, de los Ags y del SFB se siguió el esquema que se muestra a continuación:

Muestra	Dosis (μg/10μl/pozo)	SFB %
Fitohemaglutinina (PHA)	0.05, 0.1, 0.5, 0.75, 1.5, 5, 10, 50 y 100.	5 y 10%
Concanavalina A (ConA)	0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1.5, 5, 10, 50, 100	
E.C.C.	0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2, 10, 20, 50 y 100.	
E.S.	0.2, 0.4, 0.6, y 1.2.	
<i>Nocardia brasiliensis</i>		
Concentración UFC	1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 .	

Cada experimento se realizó por triplicado tanto para las células del bazo como para las del ganglio linfático poplíteo. Una vez que se llenaron los pozos, tapamos las placas con la cubierta y se incubaron por 4 días para el caso de los mitógenos y por 5 días para los Ags.

Dieciocho horas antes de terminar el cultivo, a cada pozo se le adicionaron 10 μ l (0.1 μ Ci) de timidina tritiada. Al final de la incubación,

obtuvimos las células de los pozos por medio de un microcosechador (Minimash, Bio-Rad) que las depositó sobre un papel filtro de fibra de vidrio y las lavó con agua destilada.

Posteriormente, se secó el papel filtro a temperatura ambiente por 24 h. Con la ayuda de unas pinzas de disección se tomaron los discos que contenían a las células marcadas y se colocaron en viales de vidrio (Wheaton) que previamente tenían líquido de centelleo (5 ml). Los viales con los discos de papel filtro se leyeron en un contador de centelleo de emisiones β (Beckman LS600TA), obteniéndose la lectura en **cuentas por minuto** (CPM). Para estimar el **índice de estimulación** se realizó el siguiente cálculo:

$$IE = \frac{\text{CPM del cultivo estimulado}}{\text{CPM del cultivo no estimulado}}$$

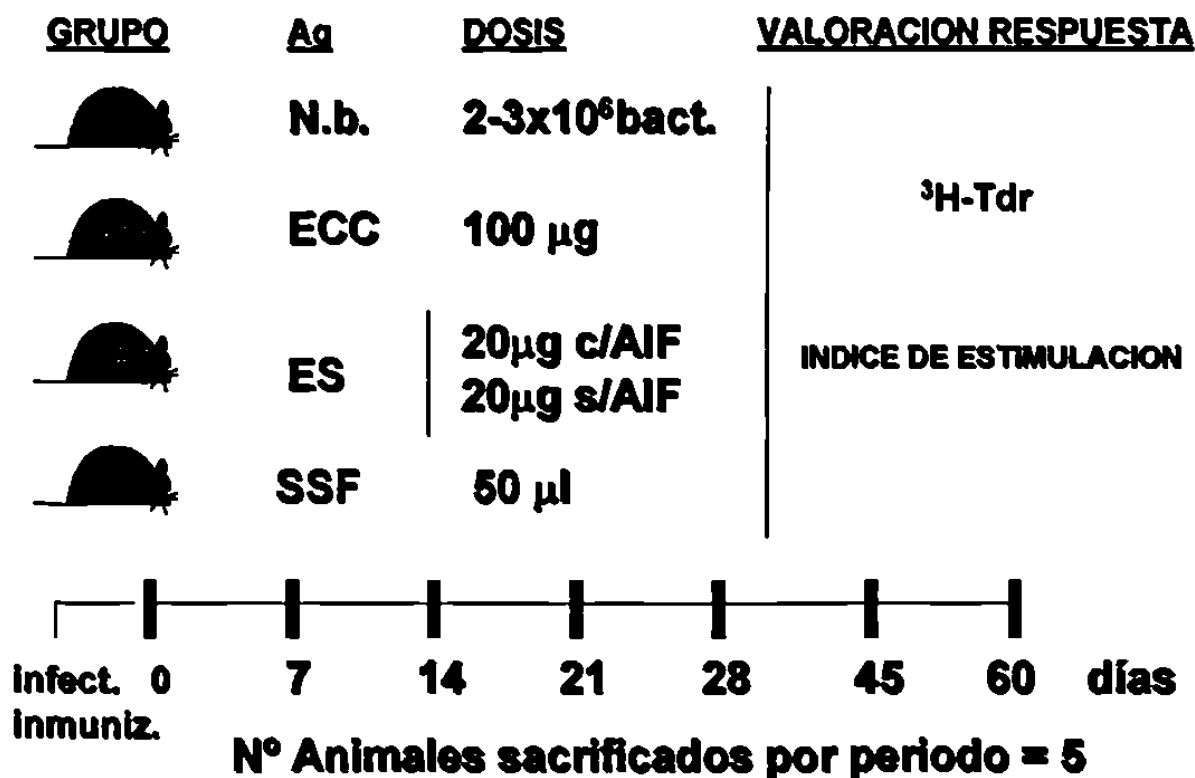
Se consideró que hubo estimulación de los linfocitos cuando el IE fue igual o mayor de 1.5. De igual manera, se obtuvieron las desviaciones estándar de los triplicados de los cultivos (22,29).

8. Esquema de inmunización general.

Para la realización de nuestro experimento se utilizó un esquema que había sido determinado en el Departamento de Inmunología (12,47). Se formaron cuatro grupos de 30 animales cada uno y un quinto grupo de 12 ratones como control. Cada grupo representaba a cada uno de los Ags utilizados:

- * Grupo A.- infectado con *N. brasiliensis* . Dosis: 2-3 millones de bacterias en 50 μ l de SSF.
- * Grupo B.- inmunizado con el ECC. Dosis: 100 μ g en 50 μ l de SSF.
- * Grupo C.- inmunizado con el ES. Dosis: 20 μ g en 50 μ l de AIF.
- * Grupo D.- inmunizado con el ES. Dosis: 20 μ g sin AIF.
- * Grupo E.- inoculado con 50 μ l de SSF (control).

Para mayor detalle, ver la figura siguiente:



La aplicación de los diferentes Ags de *N. brasiliensis* se realizó con la ayuda de una jeringa de tuberculina en el cojinete plantar de la extremidad posterior derecha, previa desinfección con alcohol etílico. La inoculación del Ag fue única (día 0). Los animales fueron sacrificados en grupos de 5 ratones siguiendo un calendario ya establecido en el Departamento de

Inmunología, desde el día de la aplicación del Ag hasta los 60 días postinmunización o postinfección.

9. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c.

9.1 Animales infectados con *N. brasiliensis*. Se infectó un lote de 30 ratones con *N. brasiliensis* viva a través del cojinete plantar. Posteriormente, se sacrificaron, de acuerdo al calendario, en grupos de 5, por dislocación de las vertebrales cervicales. Para la obtención de las células linfoides, se siguió la metodología descrita en el punto 7.4. La estimulación *in vitro* de los linfocitos se llevó a cabo adicionando, con la ayuda de una micropipeta automática, a los pozos de la placa de microcultivo el Ag homólogo (*N. brasiliensis* /UV), el ECC y el ES. Estos Ags estaban contenidos cada uno, en un volumen de 10 μ l de medio. Cada experimento se realizó por triplicado. De igual manera se tuvieron controles positivos, es decir, con mitógeno, y controles negativos, sin ningún agente estimulante. Se determinó la incorporación de timidina tritiada, medida en CPM, se calculó el IE y la desviación estándar para cada grupo de 5 animales. Posteriormente, el IE obtenido se graficó en función del tiempo.

9.2 Animales inmunizados con el ECC. Se inmunizó un grupo de 30 ratones con el ECC por vía SC. Las células linfoides se obtuvieron de la misma forma que el grupo anterior. Estas células se estimularon adicionando a los pozos respectivos en la placa de microcultivo el Ag homólogo (ECC), el ES y la *N. brasiliensis*/UV. De la manera descrita anteriormente, se determinó el IE y la desviación estándar, los cuales fueron graficados.

9.3 Animales inmunizados con el ES. De igual modo, se obtuvieron los linfocitos de bazo y ganglio linfático poplíteo del grupo de ratones inmunizados con el ES con y sin AIF por vía SC. La estimulación se llevó a cabo con el Ag homólogo (ES), el ECC y la *N. brasiliensis*/UV. Posteriormente, determinamos el IE. El esquema general de estos experimentos se muestran a continuación:

GRUPO <i>in vivo</i>	ESTIMULO <i>in vitro</i>	
	Ag Homólogo	Ags Heterólogos
Infectado c/<i>N.brasiliensis</i>	<i>N.brasiliensis</i>/UV	ECC, ES
Inmunizados con ECC	ECC	<i>N. brasiliensis</i>, ES
Inmunizados con ES c/AIF	ES	<i>N. brasiliensis</i>, ECC
Inmunizados con ES s/AIF	ES	<i>N. brasiliensis</i>, ECC
Control		

10. Evaluación Estadística.

Los datos que se obtuvieron de la cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos, mismos que se expresaron como IE, fueron evaluados mediante el estudio estadístico del análisis de varianza (ANAVAR). Mediante la t de Student se compararon las diferencias encontradas entre las cinéticas del grupo infectado contra el grupo inmunizado con el ECC. De igual manera, se comparó el primero contra el grupo inmunizado con el ES (42).

V. RESULTADOS

1. Obtención de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*.

A partir del caldo de cultivo BHI utilizado para la propagación de *N. brasiliensis*, se recolectó la masa bacteriana en 16 ml de SSF. Para tener una suspensión unicelular homogénea se necesitaron 5 sesiones de disgregación con el Potter-Ebelham. Después, se determinaron las UFC por el método de Miles y Misra, obteniéndose una concentración de 4×10^6 bacterias por ml.

2. Recolección de la masa bacteriana de *N. brasiliensis*.

Mediante la inoculación de 6 lt de medio de cultivo BHI se obtuvieron 65g de masa bacteriana húmeda, de la cual, una vez deslipidizada, obtuvimos 8.8 g de masa seca. Mediante la recolección y deslipidización de la masa bacteriana en el embudo Buchner con el sistema de vacío, el procedimiento se acortó a 3 h.

3. Obtención del Extracto Celular Crudo.

Después de triturar la masa bacteriana deslipidizada se extrajeron 275 ml de ECC, al cual se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. La cantidad de proteínas totales fue de 152 mg.

4. Análisis electroforético del Extracto Celular Crudo.

Para analizar la composición del ECC que obtuvimos, se realizó un gel vertical de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie, el patrón de bandas se comparó con uno que se tiene de referencia en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina (UANL), observándose una similitud entre ambos. Nuestro ECC tenía aproximadamente 35-40 bandas (Figura 1), cuya localización estaba comprendida entre los marcadores de PM de 66 y 22 kDa. Aunque también aparecieron bandas con un rango aproximado de 100 y 15 kDa. La proteína de 24kDa estaba perfectamente representada en esta muestra.

5. Precipitación del Extracto Celular Crudo.

Una muestra de 100 mg del ECC fue precipitada con sulfato de amonio saturado al 50%, pH 7.6. Se recolectaron 25 ml del precipitado del cual, una vez centrifugado, se obtuvieron 15 ml del sobrenadante, mismo que fue dializado exhaustivamente en una membrana de diálisis por 4 días / 4°C. El producto dializado lo concentramos por liofilización y le determinamos una concentración de 22.88 mg de proteína total por el método de Bradford.

6. Fraccionamiento del precipitado del ECC en cromatografía de filtración en gel con sephadex G-100.

6.1 Calibración de la columna cromatográfica para la obtención del ES.

La columna se empaquetó con Sephadex G-100 hidratado con PBS 0.1M pH 7.2. El volumen muerto (V_0) se determinó haciendo pasar Dextrana Azul (PM

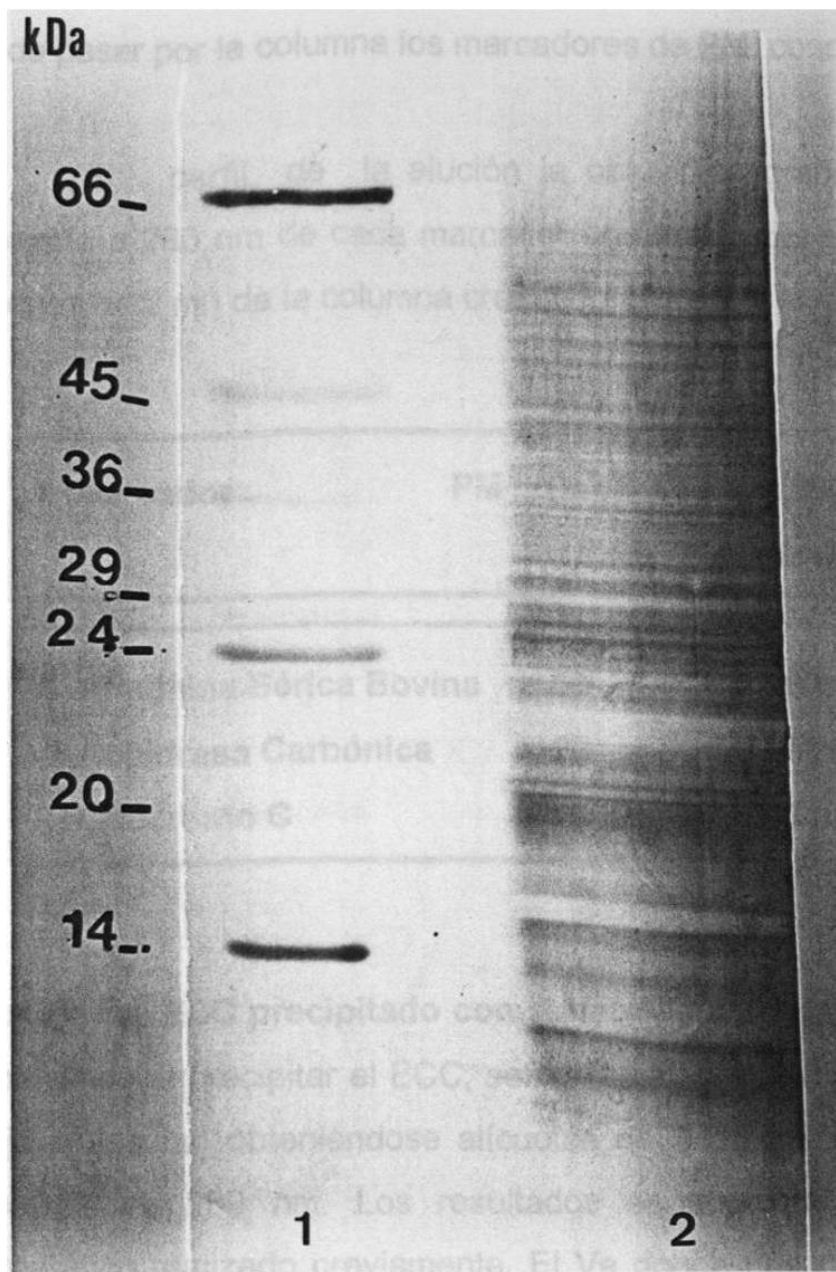


Figura 1. Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente 8-18% del Extracto Celular Crudo de *Nocardia brasiliensis* (Tinción con nitrato de plata). Carril N° 1: marcadores de peso molecular. Carril N° 2: Extracto Celular Crudo.

2000 kDa), el cual correspondió a 30 ml. La calibración la realizamos haciendo pasar por la columna los marcadores de PM conocido.

El perfil de la elución la obtuvimos graficando la máxima absorbancia a 280 nm de cada marcador en función del eluido recolectado (volumenes de 2 ml) de la columna cromatográfica. Ver la siguiente tabla I.

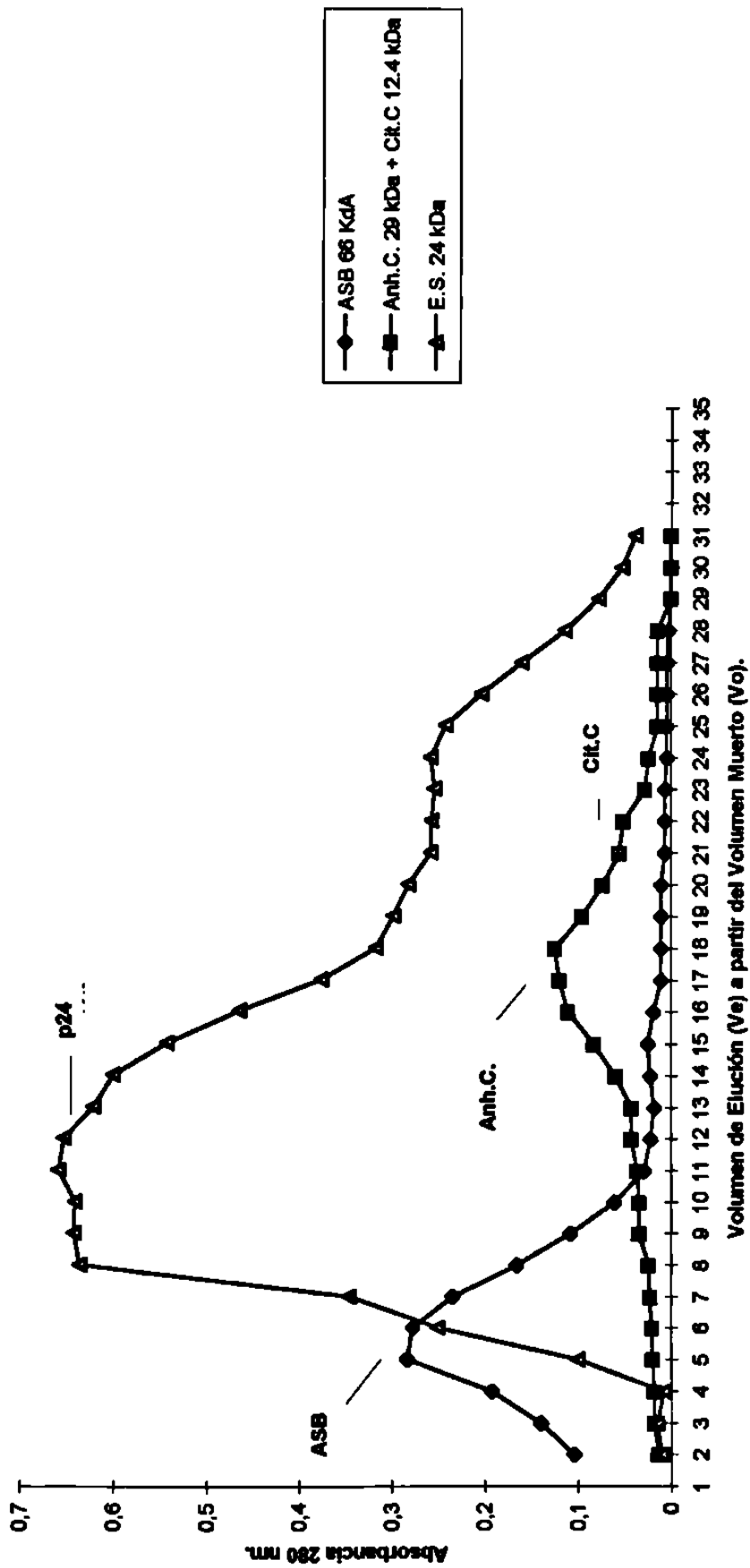
Marcador	PM (kDa).	Ve (Abs 280 nm) a partir del Vo.
Albúmina Sérica Bovina	66	18 ml
Anhidrasa Carbónica	29	28 ml
Citocromo C	16	40 ml

6.2 Elución del ECC precipitado con sulfato de amonio. El sobrenadante que obtuvimos al precipitar el ECC, se dializó y se aplicó en la columna de tamizaje molecular, obteniéndose alícuotas de 2 ml que se leyeron a una absorbancia de 280 nm. Los resultados se compararon con el perfil cromatográfico realizado previamente. El V_e donde observamos el máximo pico de absorción correspondió a 22 ml, a partir del V_o (Figura 2). Estas alícuotas fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

7. Análisis electroforético del ES.

Para determinar en donde se encontraba nuestro ES, sometimos a SDS-PAGE las alícuotas obtenidas de la columna cromatográfica de

FIGURA 2. PERFIL DE ELUCION DEL EXTRACTO SOLUBLE SEMIPURIFICADO DE *Nocardia brasiliensis* JUNTO CON MARCADORES DE PM EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-100.



filtración en gel. Se analizaron las fracciones recolectadas hasta el V_e de 46 ml. Para esto, se realizaron 2 minigeles verticales con 10 carriles cada uno. Se mezclaron aproximadamente 30 μ l de cada fracción con 10 μ l del buffer de muestra y se colocaron en los carriles respectivos del gel de empaquetamiento junto con los marcadores de PM conocido. Se sometieron a electroforesis y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie (Figura 3). Al analizar cada gel, pudimos apreciar que la máxima concentración del ES estaba comprendido entre los eluidos 11 y 15, es decir, con un V_e de entre 22 y 30 ml a partir de V_o , obteniéndose una concentración de 3 mg de proteína total por el método de Bradford.

8. Dosis optima de los antígenos de *N. brasiliensis* para la respuesta proliferativa de linfocitos.

8.1 Condiciones ideales. Se realizaron varios ensayos *in vitro* para determinar las concentraciones adecuadas del mitógeno a utilizar como control positivo de la estimulación de linfocitos. La cantidad de células que se cultivaron fue de 2×10^5 por pozo y varias concentraciones de ConA y de PHA desde 0.05 μ g hasta 100 μ g contenidos en un volumen de 10 μ l de RPMI-1640. De igual manera, manejamos 2 concentraciones de SFB, al 5 y 10%. Mediante estos ensayos observamos que la máxima proliferación, al cabo de 4 días de cultivo, correspondió para la ConA a una concentración de 0.5 μ g/10 μ l de medio con un IE de 95 y con un 5% de SFB; en tanto que para la PHA a la misma concentración de SFB apreciamos un IE de 12. (Figuras 4 y 5).

Las condiciones ideales para nuestro cultivo fueron las siguientes: CO_2 al 5%, humedad relativa del 95%, temperatura de 37°C, ConA 0.5 μ g y SFB al 5%.

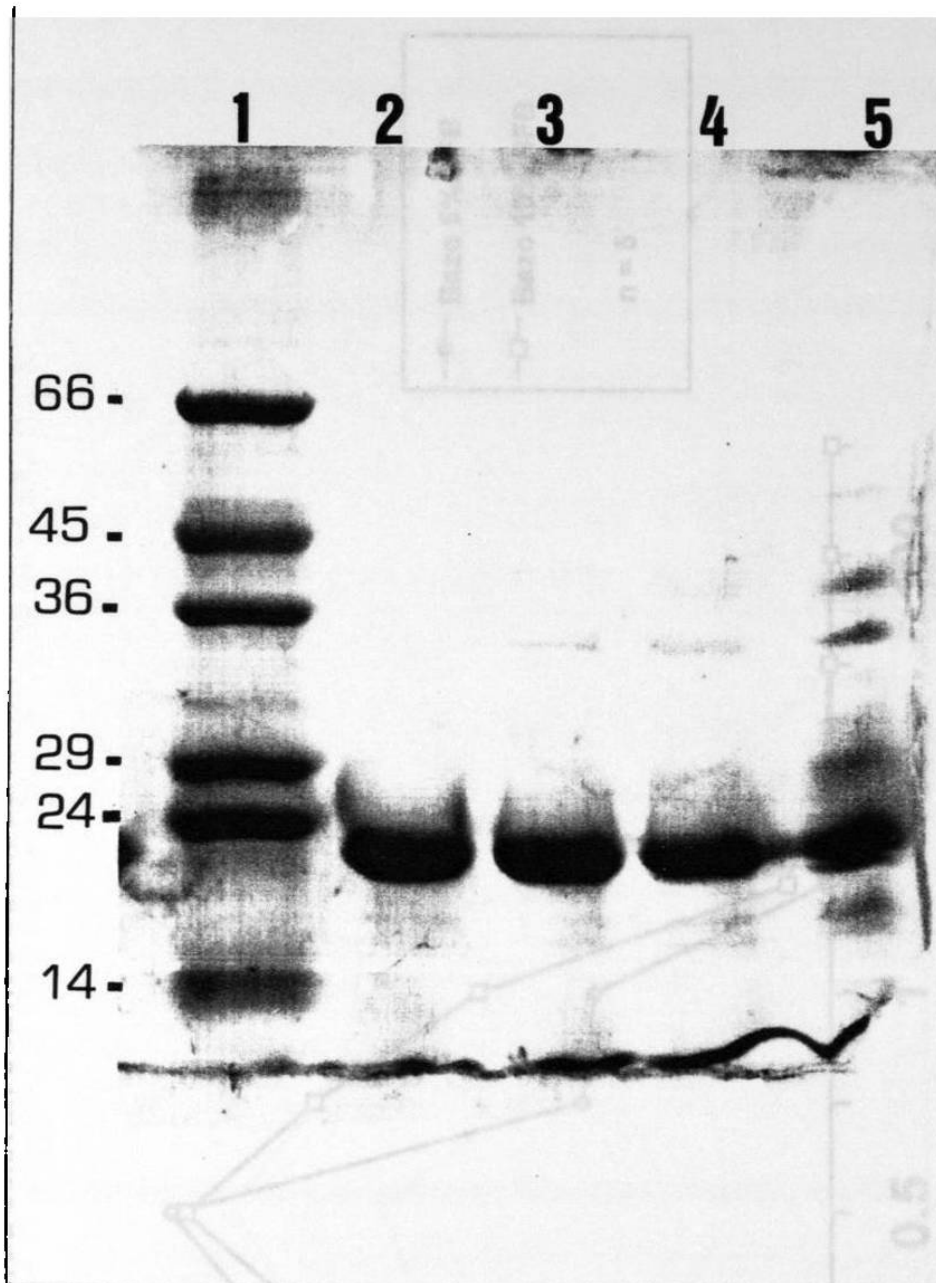


Figura 3. Análisis en SDS-PAGE en gradiente 8-18% del Ag soluble semipurificado (enriquecido con p24). Carril N° 1: marcadores de peso molecular. Carriles 2-5: fracciones del Extracto Semipurificado.

FIGURA 4. CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ConA EN CULTIVO DE ESPLENOCITOS DE RATONES BALB/c.

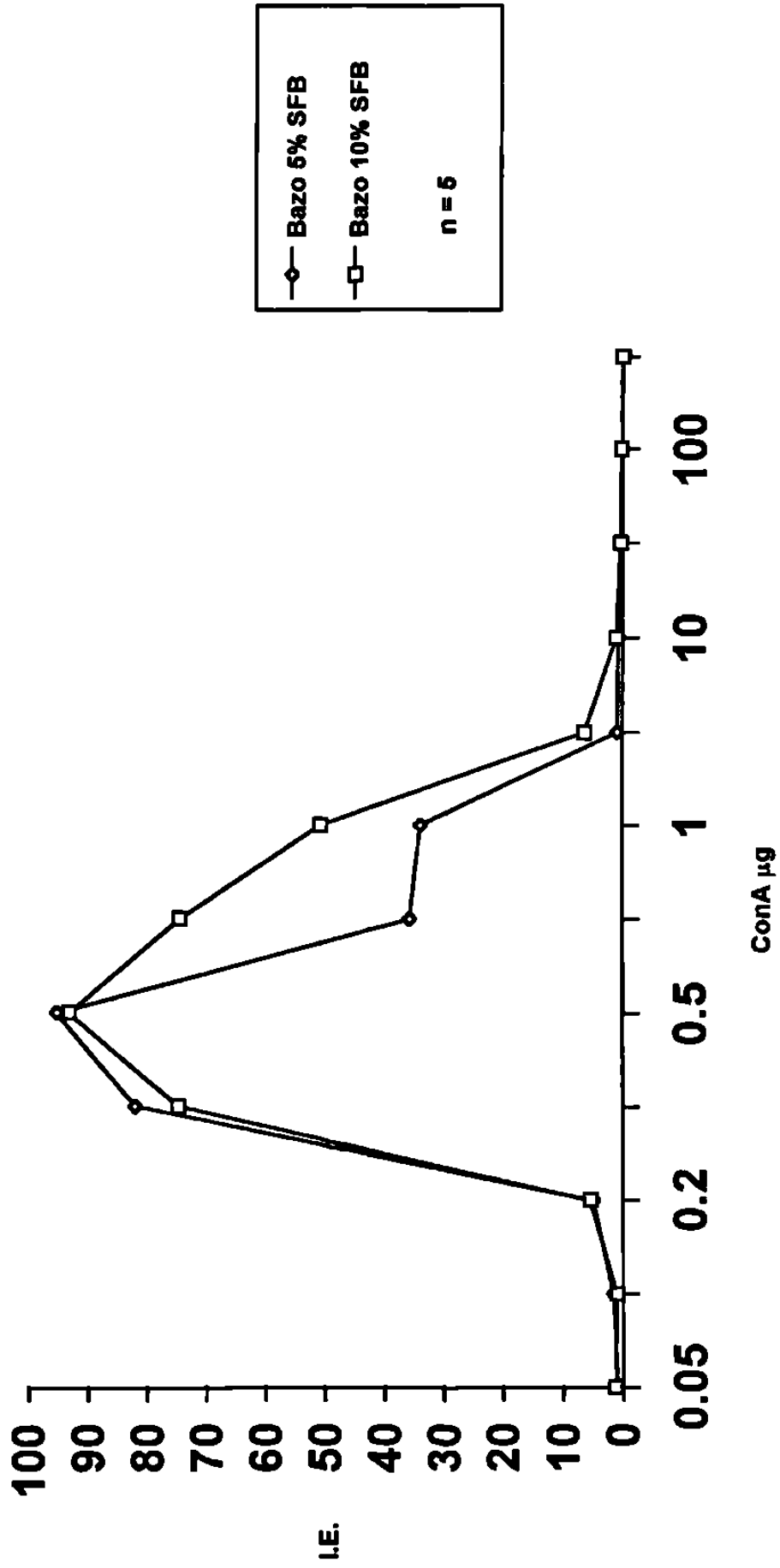
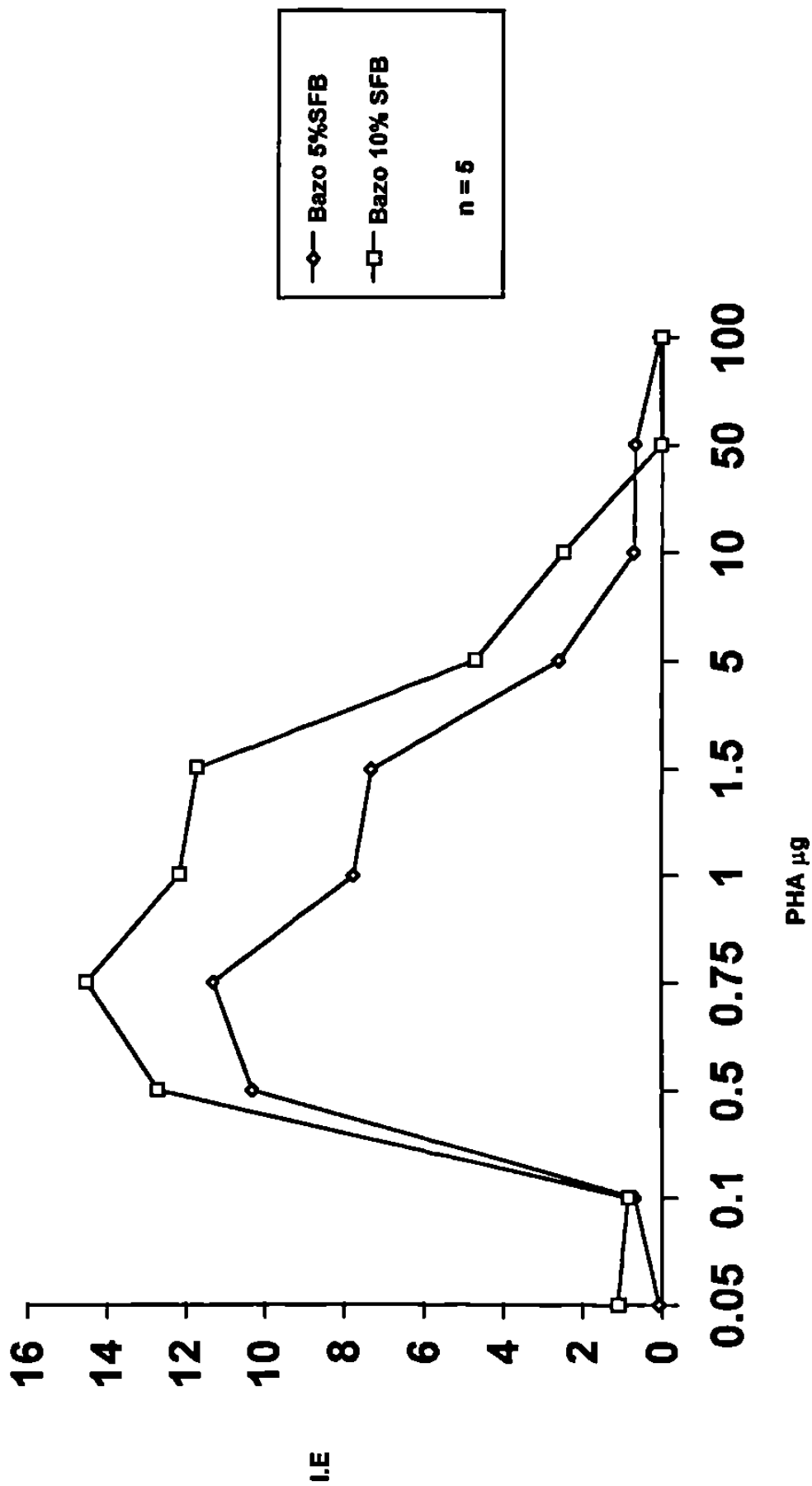


FIGURA 5. CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE PHA EN CULTIVO DE ESPLENOCITOS DE RATONES BALB/c.



8.2 Concentración óptima de *N. brasiliensis*. A continuación, determinamos la concentración adecuada de antígenos particulados de *N. brasiliensis*. IUV al emplear diferentes concentraciones que iban desde 1×10^3 - 1×10^6 bacterias en 10 μ l de medio de cultivo RPMI-1640. Estos ensayos los realizamos por triplicado. Observamos que el mayor IE, correspondiente a 1.5, al cabo de 5 días de cultivo correspondió para la concentración de 1×10^6 bacterias (Figura 6).

8.3 Concentración óptima de ECC. Del mismo modo, la determinación de la concentración óptima del ECC se realizó al adicionar, por triplicado, al cultivo de linfocitos diferentes cantidades del extracto soluble complejo, las cuales iban desde 0.2 a 100 μ g/10 μ l de medio. Se determinó que la concentración de 2 μ g nos proporciona una mayor respuesta proliferativa, cuyo IE es de 2.5 (Figura 7).

8.4 Concentración óptima del ES. Los linfocitos se estimularon con diferentes concentraciones del Extracto Soluble Semipurificado; desde 0.2 hasta 1.2 μ g/10 μ l de RPMI-1640. A través de la incorporación de timidina tritiada, determinamos que las células con mayor I.E., cuyo resultado correspondió a 3, fueron las que crecieron con 0.6 μ g del ES (Figura 8).

En la tabla II se resumen las dosis óptimas de las diferentes presentaciones de los Ags de *N. brasiliensis* para la estimulación *in vitro* de linfocitos.

9. Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y de ganglio linfático poplíteo de ratones BALB/c.

FIGURA 6. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DE *Nocardia brasiliensis* PARA EL ESTÍMULO *In vitro* DE LINFOCITOS DE BAZO

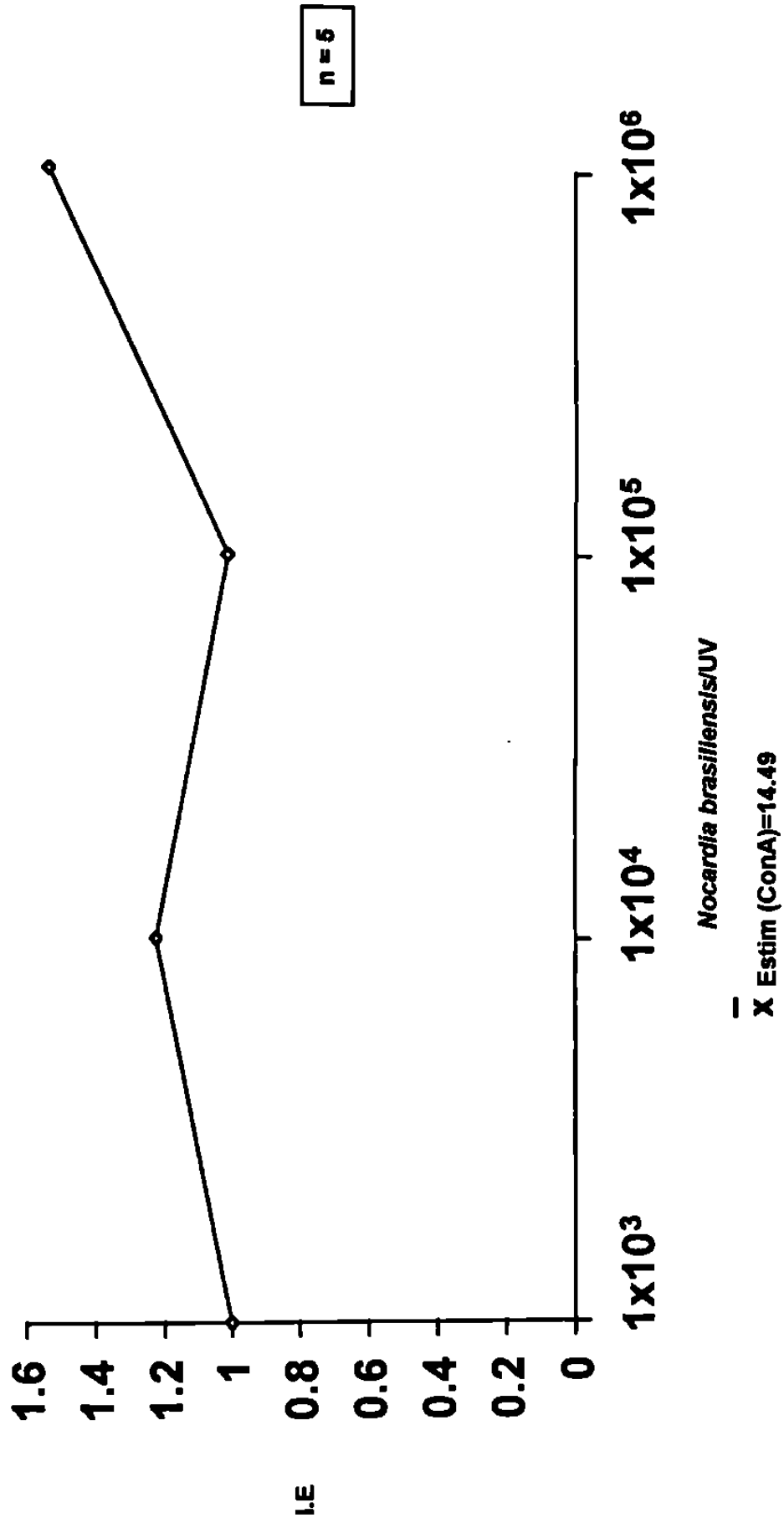


FIGURA 7. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DEL E.C.C. DE *Nocardia brasiliensis* PARA EL ESTÍMULO *in vitro* DE LINFOCITOS DE BAZO.

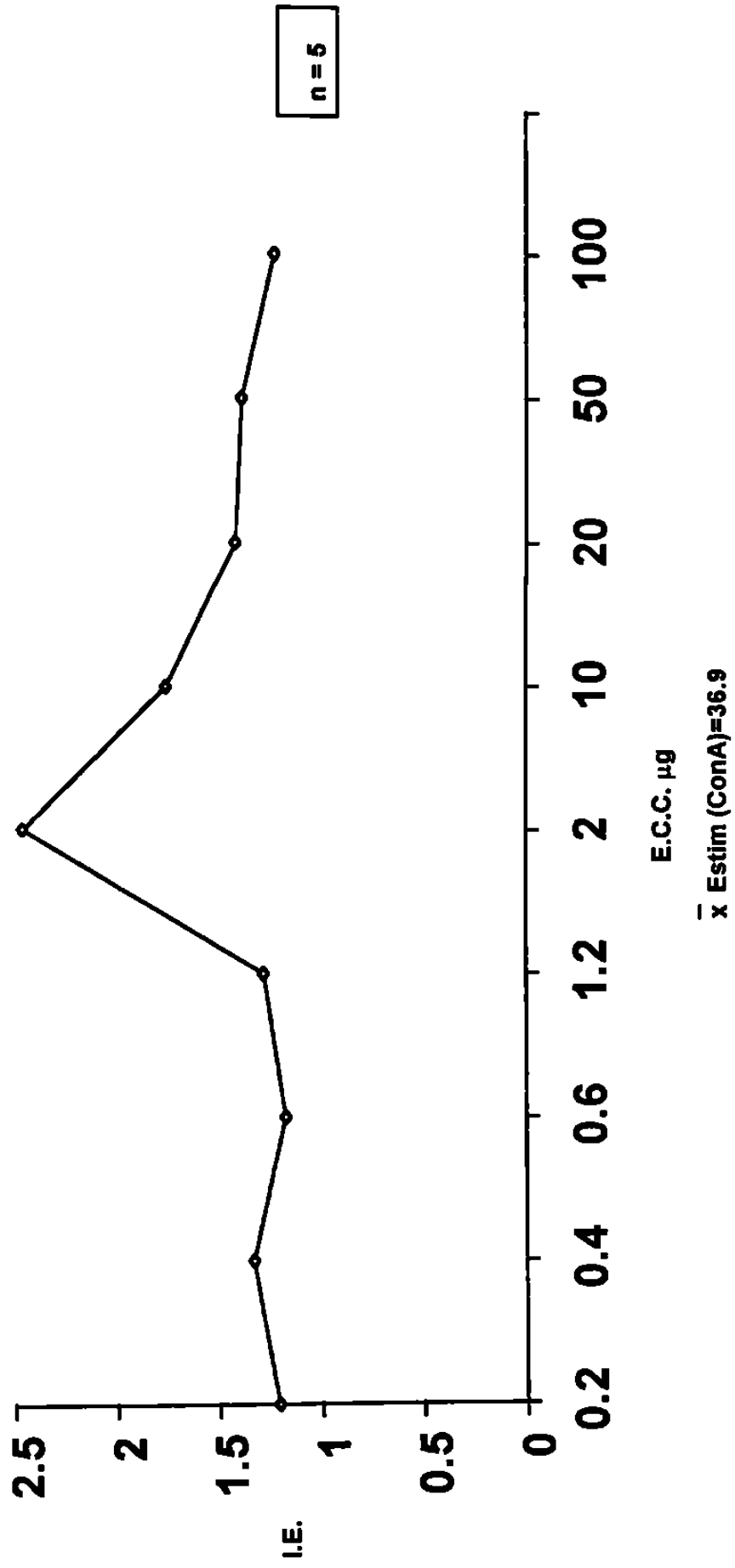


FIGURA 8. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DEL E.S. DE *Nocardia brasiliensis* PARA EL ESTMULO *in vitro* DE LINFOCITOS DE BAZO.

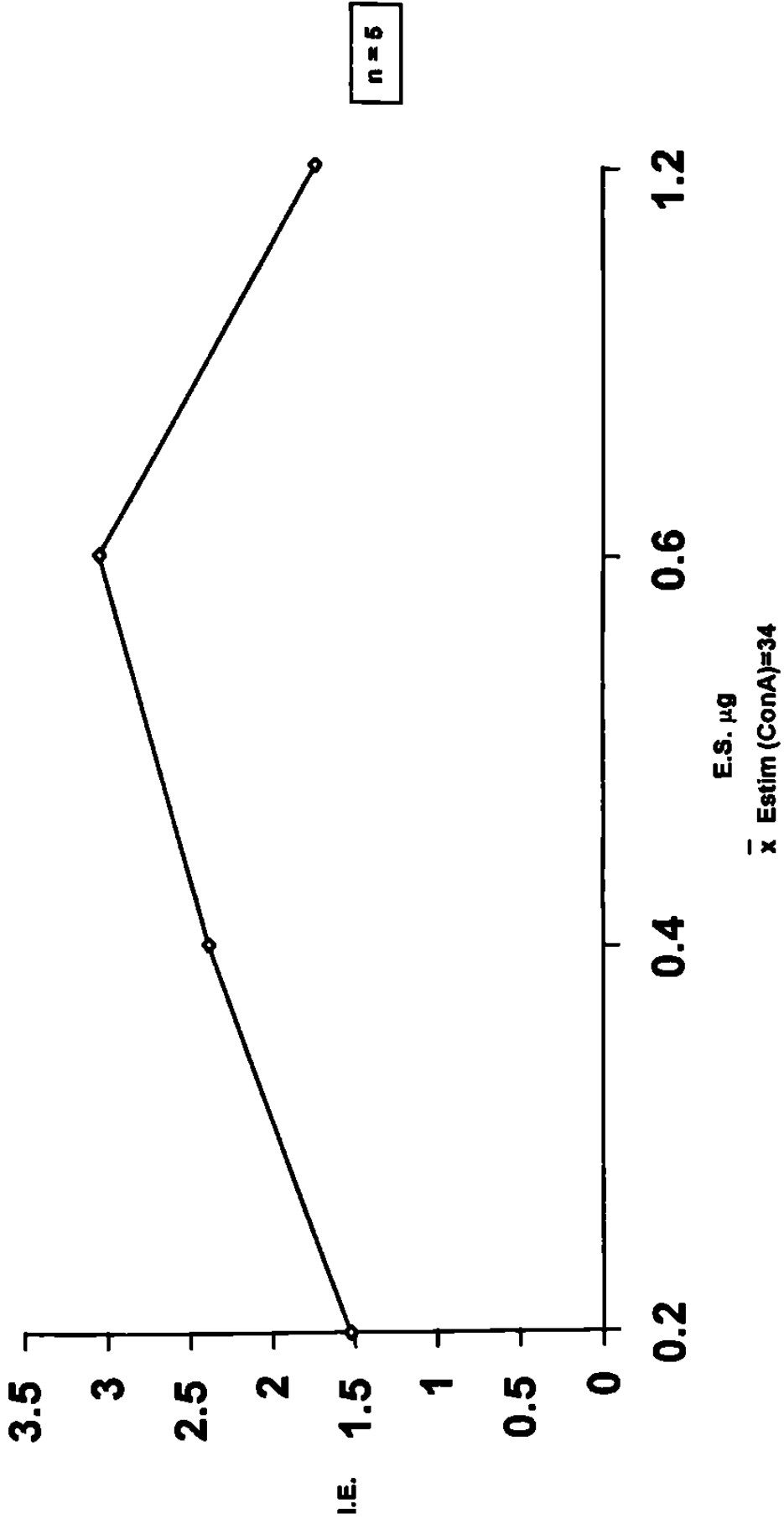


TABLA II. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE LOS Ags DE *N.brasiliensis* PARA LA ESTIMULACIÓN *in vitro* DE LINFOCITOS*

ANTÍGENO	DOSIS ÓPTIMA (10 µl/micropozo)	ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN
<i>Nocardia brasiliensis</i>	1 x10⁶ bacterias	95
EXTRACTO CELULAR CRUDO (Extracto Soluble Complejo)	2 µg	1.55
EXTRACTO SEMIPURIFICADO (Extracto Soluble Semipurificado)	0.6 µg	3.1

*Condiciones del Cultivo: RPMI-1640, SFB 5%, CO² 5%, 37° C, humedad 95%, ConA 0.5 µg.
(control positivo)

9.1 Animales infectados con *N. brasiliensis*. Las células de bazo y de ganglio linfático poplíteo de estos animales fueron estimuladas *in vitro* con el Ag homólogo y heterólogos de *N. brasiliensis*.

9.1.1 Células de bazo. Observamos que el mayor IE para el Ag homólogo se obtuvo en el día 14 post infección, cuyo valor fue de 5.26. Para el Ag soluble complejo, la mayor respuesta proliferativa se apreció en el día 21, con un IE de 7.6. La respuesta proliferativa más significativa para el Ag soluble semipurificado se observó en el día 14, con un IE de 3.5 (Figura 9).

9.1.2 Células de ganglio linfático poplíteo. Para este órgano linfoide, pudimos apreciar que tanto para los Ags homólogo y heterólogos, la respuesta proliferativa más significativa estuvo presente en el día 21 post inmunización. Los IE para *N. brasiliensis*/UV, ECC y ES fueron de 11, 4 y 3, respectivamente (Figura 10).

9.2 Animales inmunizados con el Extracto Complejo Soluble. De la misma manera, las células obtenidas de estos ratones, se estimularon con los Ags homólogo y heterólogos.

9.2.1 Células de bazo. Se observó que las células estimuladas con el ECC tuvieron una mayor respuesta proliferativa a partir del día 21, con un IE de 4.3 manteniéndose constante hasta el día 45 post inmunización. Las células estimuladas con *N. brasiliensis*/UV tuvieron un mayor IE de 3.6 en el día 28 manteniéndose hasta el día 45, con un IE de 3.3. El IE más alto para las células desafiadas con el ES se obtuvo en el día 21 y 28 cuyo valor se mantuvo en 2.6 (Figura 11).

FIGURA 9. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO.
 RATONES INFECTADOS CON *Nocardia brasiliensis*.

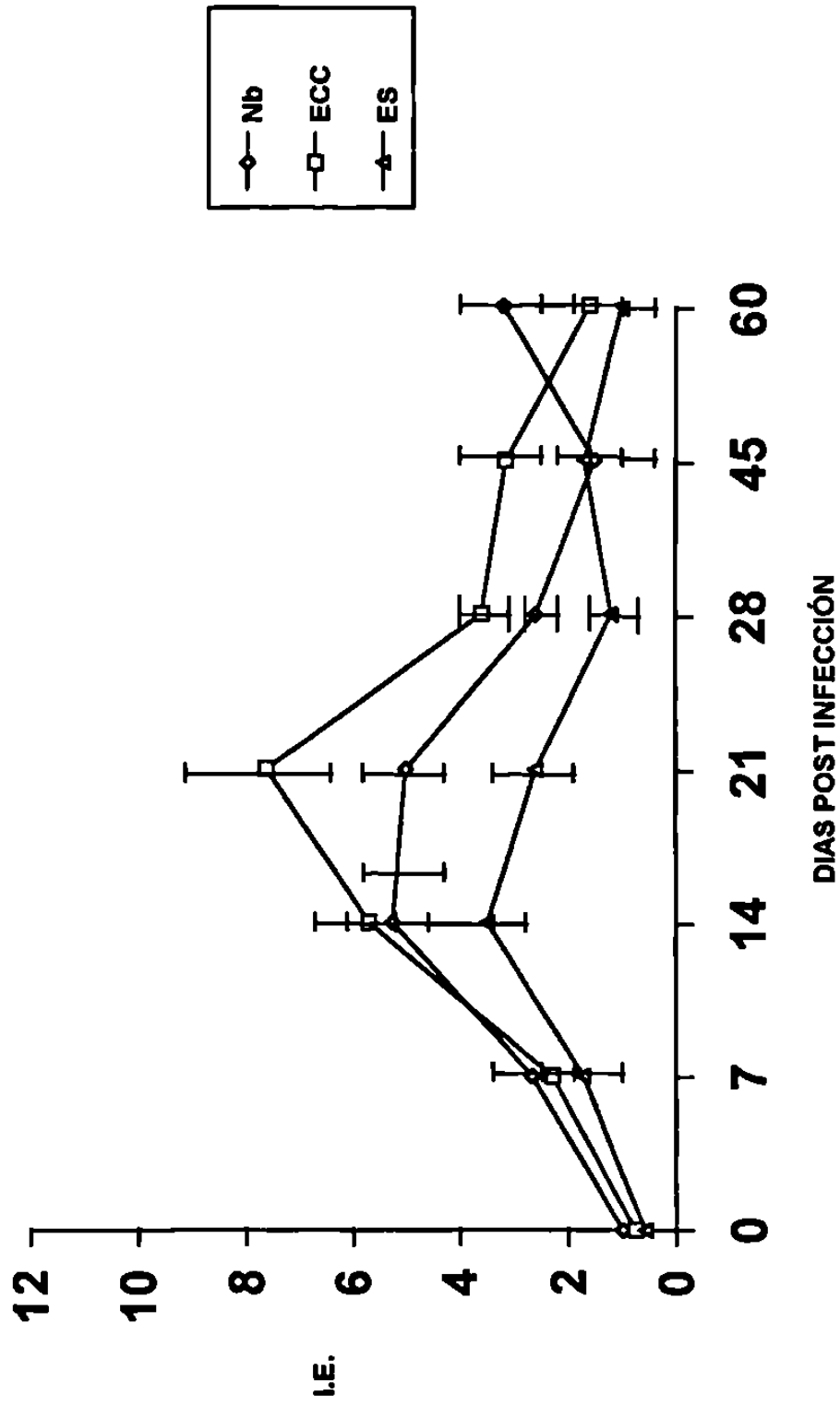


FIGURA 10. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE GANGLIO LINFÁTICO POPLÍTEO. RATONES INFECTADOS CON *Nocardia brasiliensis*

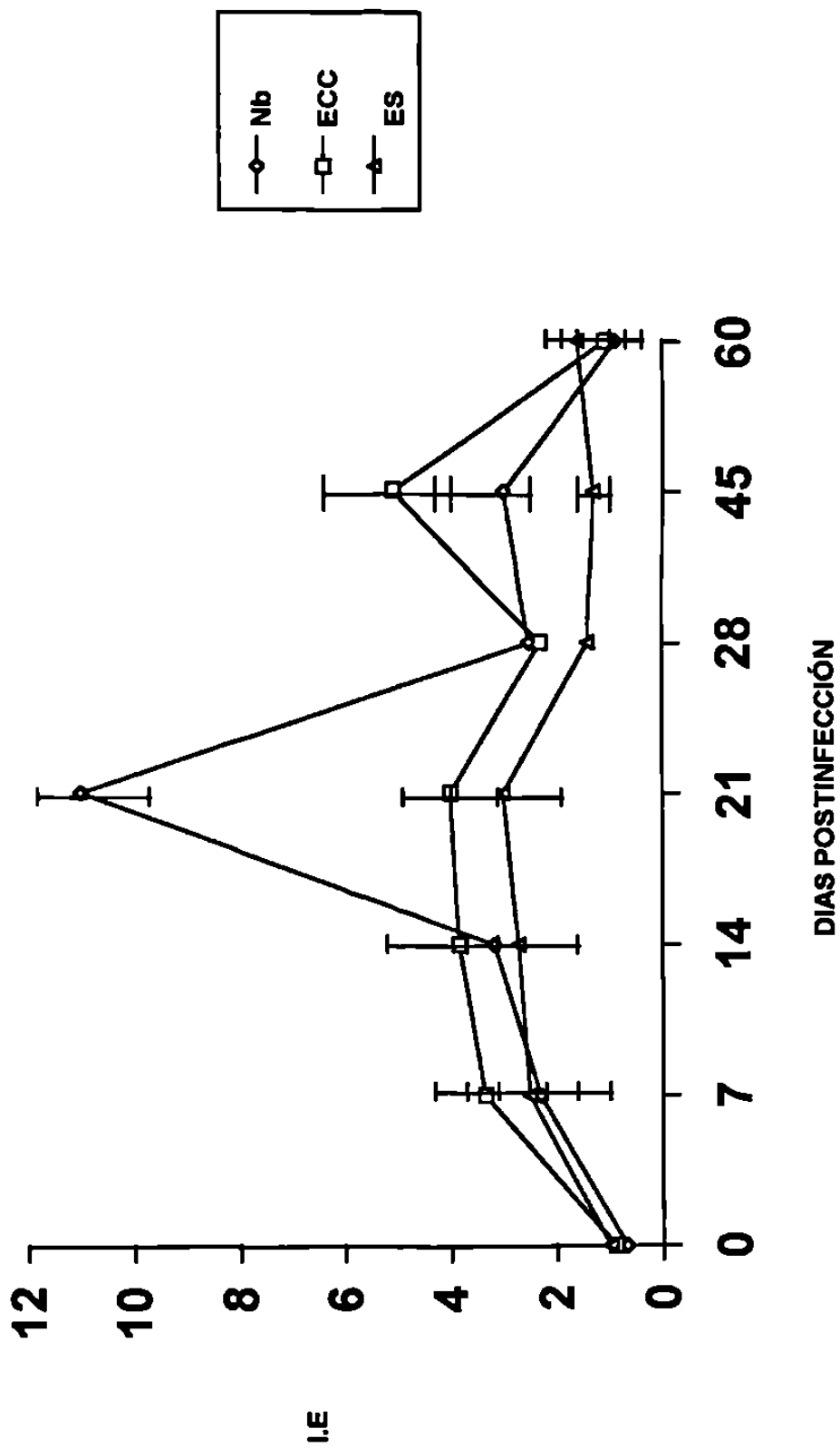
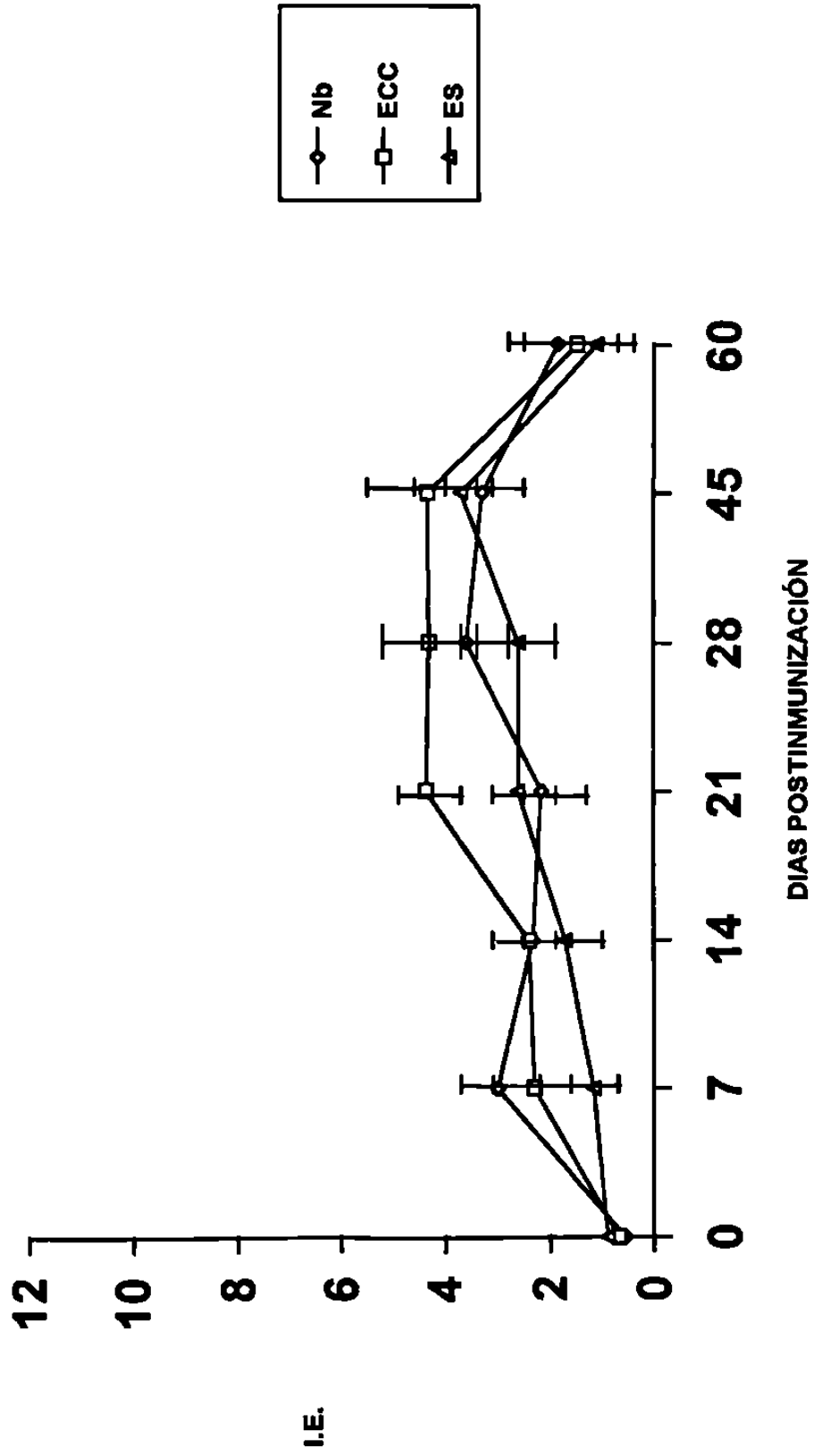


FIGURA 11. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO. RATONES INMUNIZADOS CON EL EXTRACTO CRUDO.



9.2.2 Células de ganglio linfático poplíteo. El mayor IE para el Ag homólogo lo apreciamos hasta el día 45 post inmunización, con un valor de 4.78. Para las células desafiadas con la *N. brasiliensis*/UV, la respuesta proliferativa más significativa sucedió en el día 14, con un IE de 2.57. En este mismo día observamos que el mayor IE, de 2.05, se presentó en las células estimuladas con el ES (Figura 12).

9.3 Animales inmunizados con el E.S. más AIF.

9.3.1 Células de bazo. La respuesta proliferativa de las células desafiadas con el Ag homólogo alcanzó su máximo IE, 9, en el día 21 post inmunización. En tanto que para las células estimuladas con el Ag particulado, el IE fue mucho mayor en el séptimo día de inmunización, este valor correspondió a 4.7. En este mismo lapso de tiempo la respuesta alcanzada por el desafío con el ECC fue de un IE de 6. (Figura 13).

9.3.2 Células de ganglio linfático poplíteo. Las células estimuladas con el Ag homólogo tuvieron el mayor IE, que correspondió con 3.1 en el día 45 de inmunización. Para las que se estimularon con la *N. brasiliensis*/UV, el mayor IE que fue de 2.2 ocurrió en el día 21. Entre tanto, en el día 14 apreciamos la mayor respuesta proliferativa para el Ag ECC, cuyo IE fue de 2.24 (Figura 14).

9.4 Animales inmunizados con el E.S. sin AIF.

9.4.1 Células de bazo. A diferencia del grupo anterior, la mayor respuesta proliferativa se observó en el 7º día postinmunización para las células estimuladas con el ECC, cuyo IE fue de 4.7. En tanto que para las células

FIGURA 12. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE GANGLIO LINFÁTICO POPLÍTEO. RATONES INMUNIZADOS CON EL EXTRACTO CRUDO.

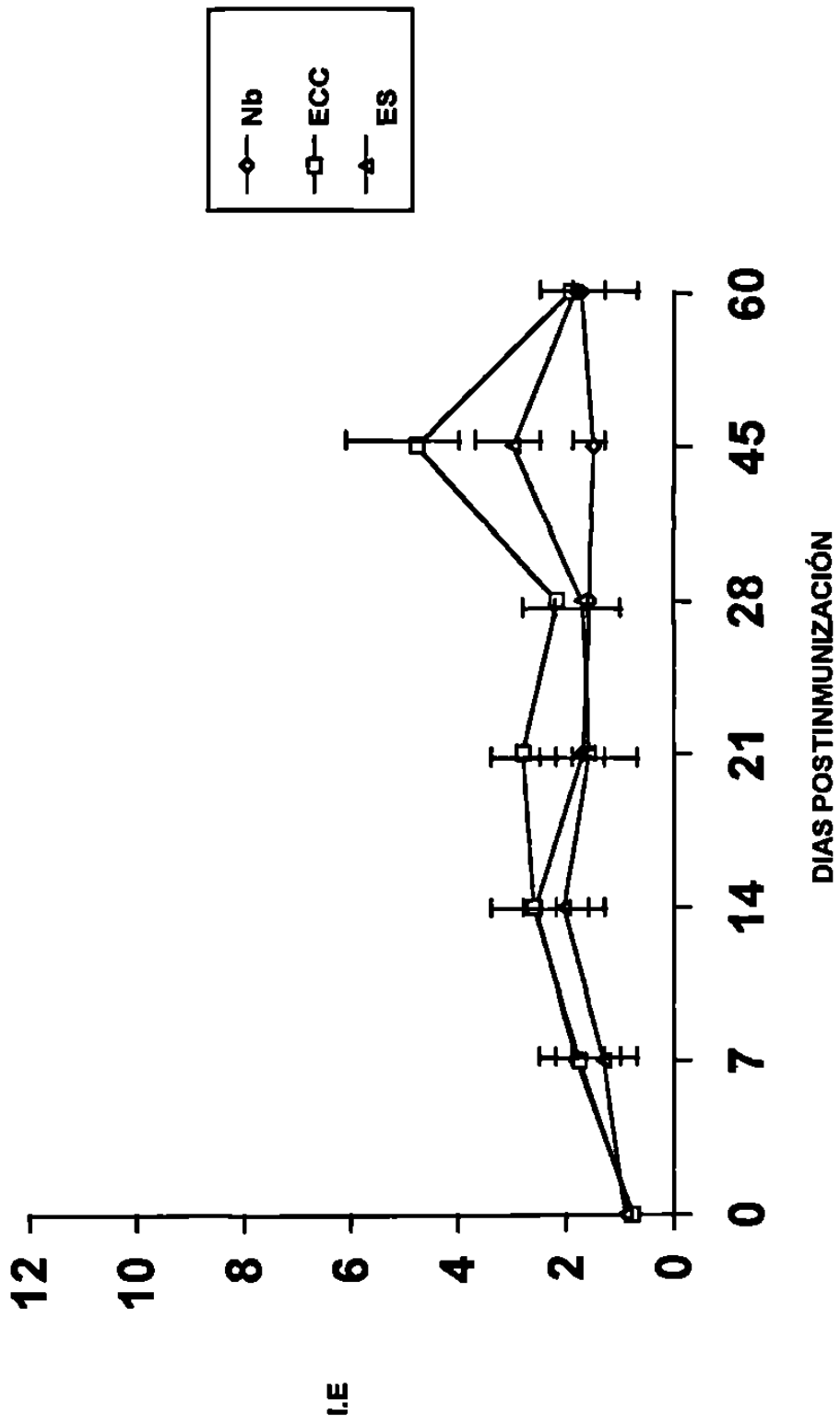


FIGURA 13. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO. RATONES INMUNIZADOS CON EL EXTRACTO SEMIPURIFICADO (C/AIF).

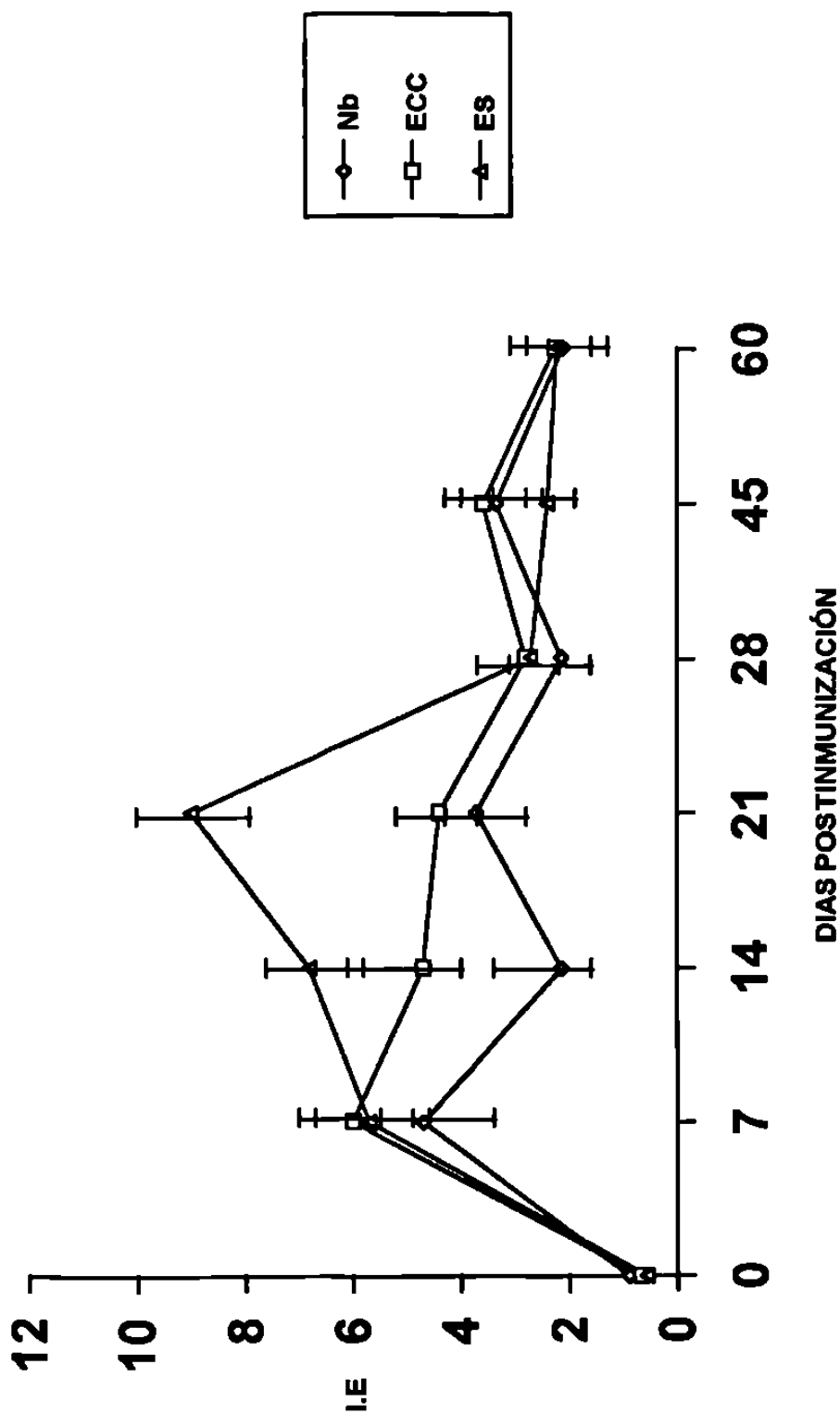
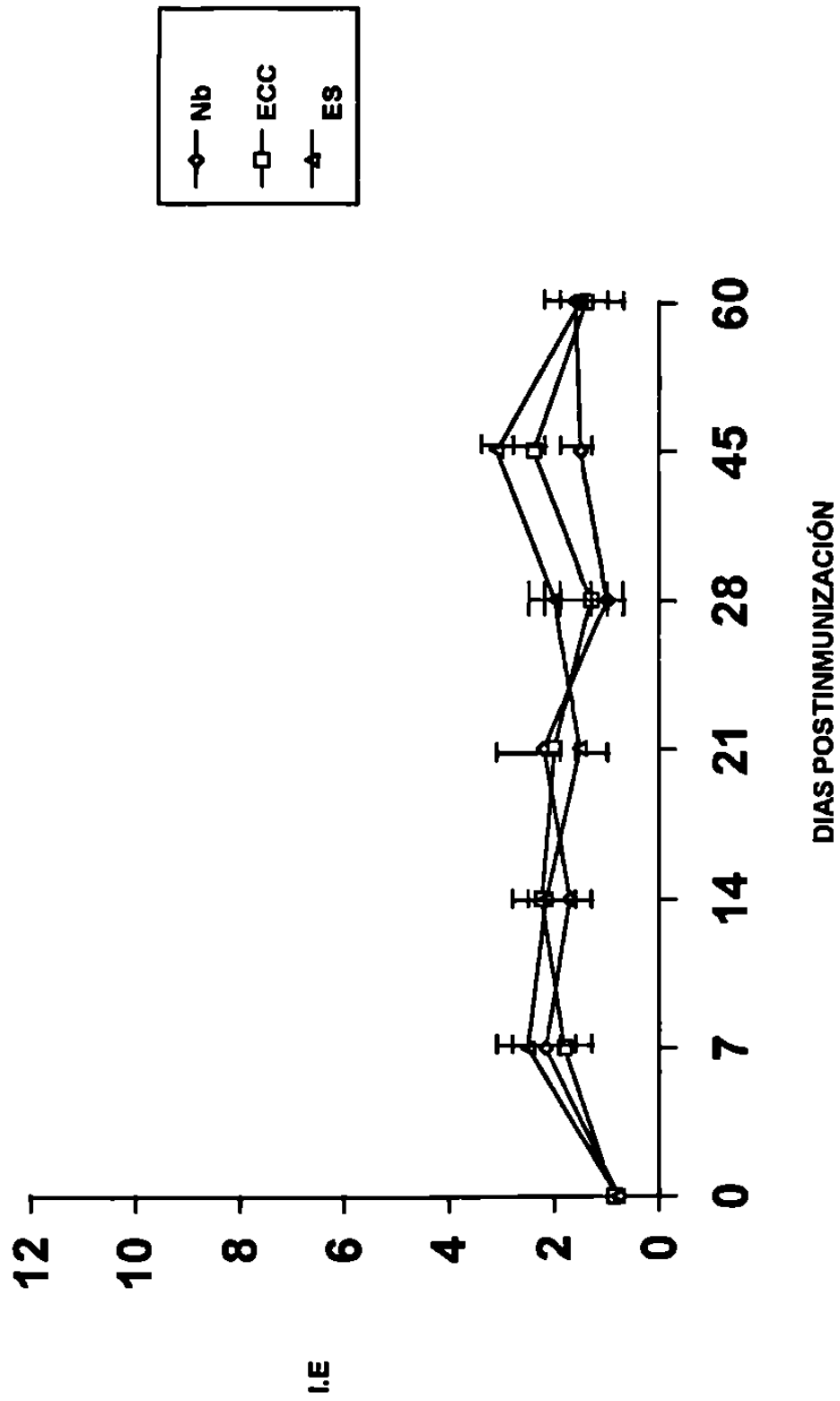


FIGURA 14. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE GANGLIO LINFÁTICO POPLTEO. RATONES INMUNIZADOS CON EL EXTRACTO SEMIPURIFICADO.



estimuladas con el Ag homólogo (ES), el mayor IE también se observó en el día 7 y fue de 3.8. Sin embargo, las células desafiadas con la *N. brasiliensis*/U.V. tuvieron una respuesta proliferativa mínima durante los días utilizados para las estimulaciones (Figura 15).

9.5 Animales empleados como control. Inyectados con SSF.

9.5.1 Células de bazo. La respuesta proliferativa de las células estimuladas tanto con la *N. brasiliensis*, como con el ECC y el ES se mantuvo por abajo del estímulo basal (Figura 16).

En la tabla III se muestran en resumen los resultados completos de dichos experimentos. En tanto que, los controles positivos y negativos se muestran de la figura 17 a la 22.

10. Análisis de varianza y distribución t (t de Student)

10.1 Linfocitos de bazo. Al realizar el ANAVAR en los animales infectados con *N. brasiliensis* se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) que se presentó en los días 28 y 60 postinfección respectivamente. Para los ratones de los grupos inmunizados con el ECC y ES, la mayor diferencia significativa, en ambos, se observó en el día 21 postinmunización.

Mediante la prueba t de Student, se comparó la cinética del grupo infectado contra la de el grupo inmunizado con el ECC: Indicó una diferencia significativa ($p > 0.05$) al 7º día postinmunización solo para el E.S. A los 14 días de la inmunización se encontró una diferencia estadística para los 3

FIGURA 15. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO. RATONES INMUNIZADOS CON EL EXTRACTO SEMIPURIFICADO(S/AIF).

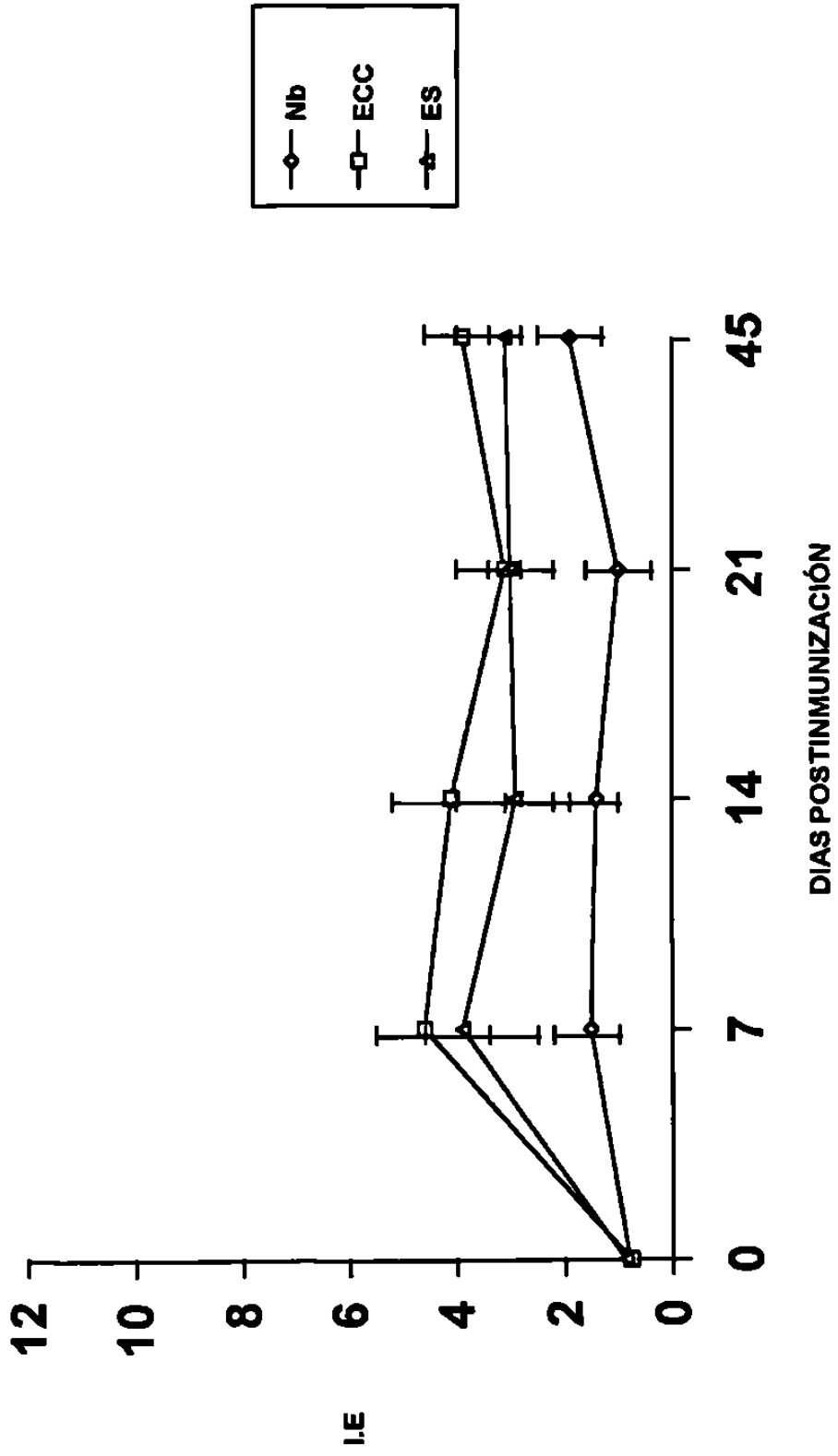


FIGURA 16. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO.
 RATONES INOCULADOS CON SSE (CONTROL).

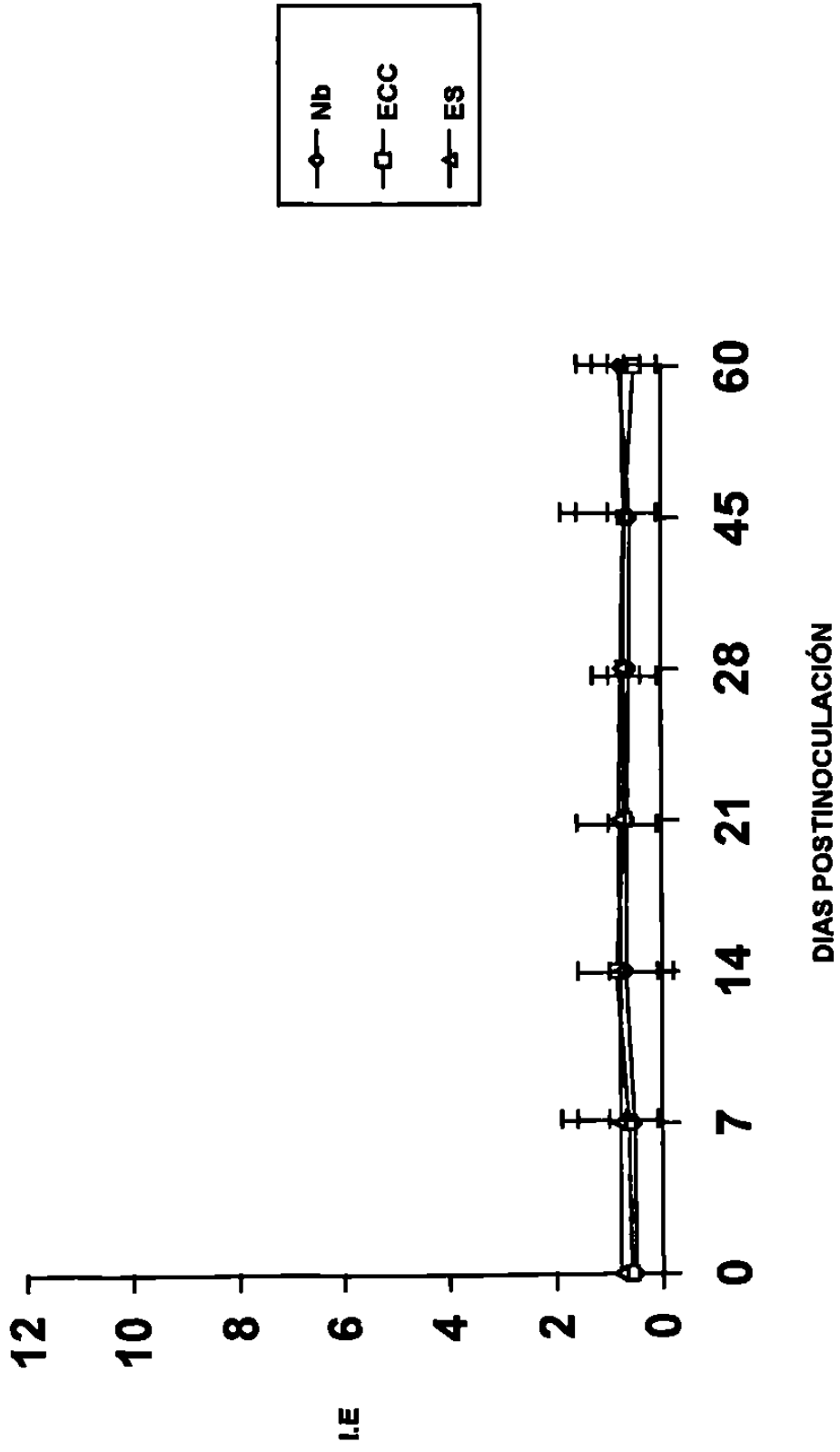


TABLA III. I.E. DE LINFOCITOS DE BAZO Y GANGLIO POPLÍTEO DE RATONES BALB/c.						
Días	7	14	21	28	45	60
<i>Nocardia brasiliensis</i>. Células de bazo.						
Ag						
Nb	2.67+/-1.34	5.26+/-3.84	5+/-3.58	2.6+/-1.17	1.5+/-0.065	3.2+/-1.85
ECC	2.3+/-1	5.7+/-1.6	7.6+/-7.31	3.6+/-1.27	3.15+/-1.63	1.6+/-0.48
ES	1.72+/-1	3.5+/-1.87	2.6+/-1.86	1.19+/-0.39	1.7+/-0.19	1+/-0.31
	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05	P>0.05
<i>Nocardia brasiliensis</i>. Células de Ganglio Poplíteo.						
Ag						
Nb	2.33+/-0.3	3.16+/-0.15	11+/-5	2.5+/-1	3+/-1	0.9+/-0.4
ECC	3.34+/-0.7	3.84+/-0.19	4+/-1	2.3+/-0.7	5.1+/-4	1.1+/-0.3
ES	2.5+/-1.1	2.7+/-0.3	3+/-1	1.4+/-0.4	1.3+/-0.6	1.6+/-0.8
	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Extracto Celular Crudo. Células de Bazo.						
Ag						
Nb	3+/-2	2.33+/-0.86	2.17+/-0.8	3.6+/-2	3.3+/-1.49	1.85+/-0.9
ECC	2.3+/-1.74	2.4+/-0.64	4.37+/-0.97	4.3+/-2.4	4.34+/-2.48	1.48+/-0.86
ES	1.15+/-0.74	1.71+/-0.45	2.61+/-0.85	2.6+/-1.82	3.7+/-3.2	1.11+/-0.95
	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Extracto Celular Crudo. Células de Ganglio Poplíteo.						
Ag						
Nb	1.8+/-0.78	2.57+/-1.51	1.7+/-0.68	1.55+/-1.05	1.5+/-0.15	1.73+/-0.85
ECC	1.75+/-0.45	2.6+/-1.5	2.8+/-2.1	2.16+/-2	4.78+/-3.32	1.92+/-1.13
ES	1.3+/-0.18	2.05+/-0.92	1.57+/-0.67	1.7+/-0.65	3+/-0.5	1.85+/-0.58
	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Extracto Semipurificado (enriquecido con p24). Células de Bazo.						
Ag						
Nb	4.7+/-2.28	2.14+/-1.14	3.72+/-1.93	2.14+/-0.4	3.36+/-1.1	2.13+/-0.99
ECC	6+/-4.44	4.7+/-2.6	4.4+/-2.85	2.8+/-1.49	3.6+/-1.2	2.27+/-0.75
ES	5.7+/-3.02	6.8+/-4.66	9+/-7.15	2.7+/-1.17	2.4+/-1.17	2.24+/-0.68
	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05
Extracto Semipurificado (enriquecido con p24). Células de Ganglio Poplíteo.						
Ag						
Nb	2.16+/-0.8	1.7+/-0.7	2.2+/-0.8	1+/-0.4	1.5+/-0.1	1.6+/-0.7
ECC	1.8+/-0.6	2.24+/-1	2+/-0.9	1.3+/-0.6	2.4+/-0.8	1.4+/-0.1
ES	2.5+/-1	2.15+/-1.2	1.5+/-0.4	2+/-0.9	3.1+/-1.2	1.5+/-0.3
	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

Los resultados se expresan como la media aritmética (n=5), +/- desviación estándar.

FIGURA 17. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO. RATONES INFECTADOS CON *N. brasiliensis*. CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVOS.

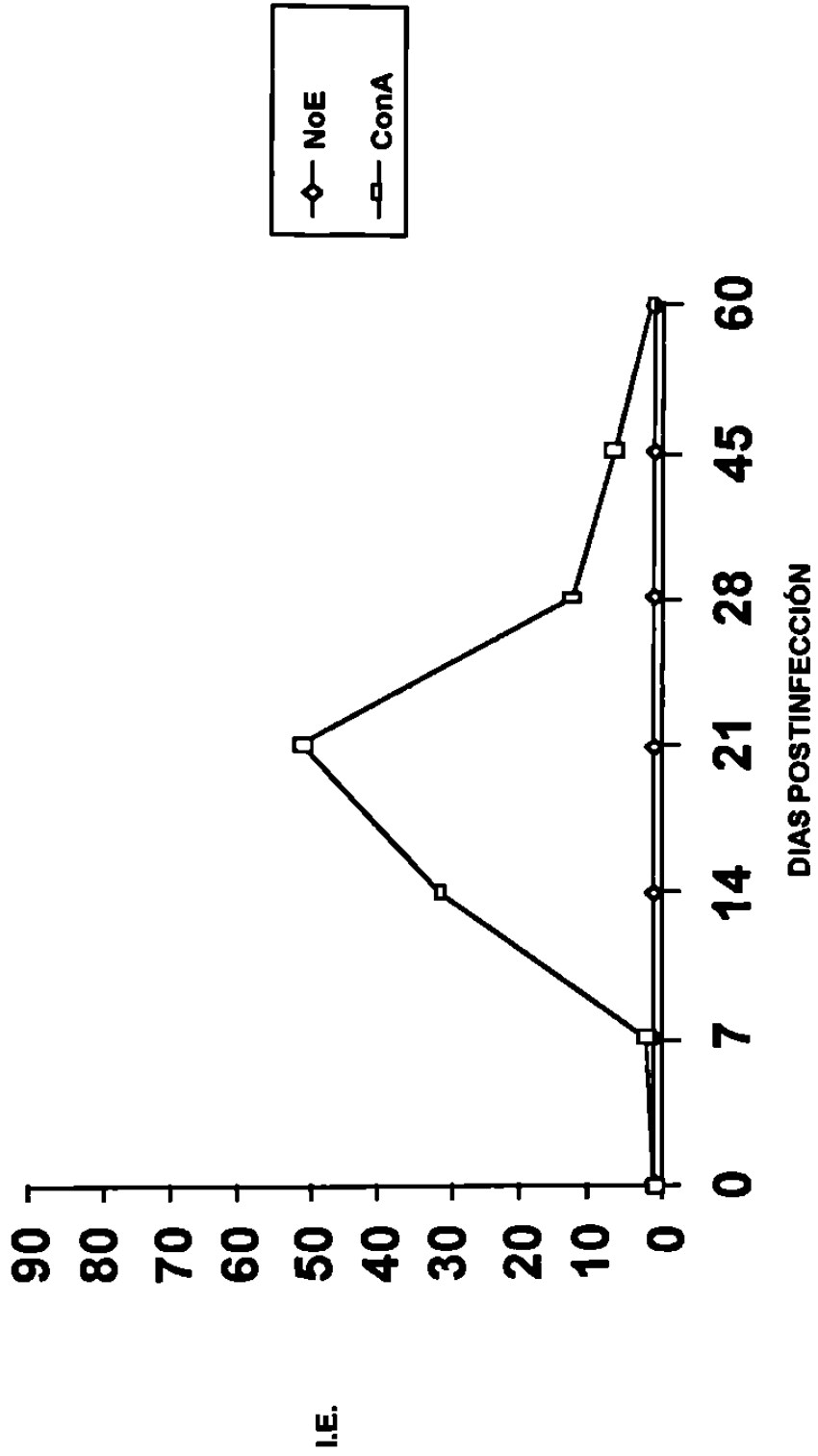


FIGURA 18. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE GANGLIO POPLÍTEO. RATONES INFECTADOS CON *N. brasiliensis*. CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVOS.

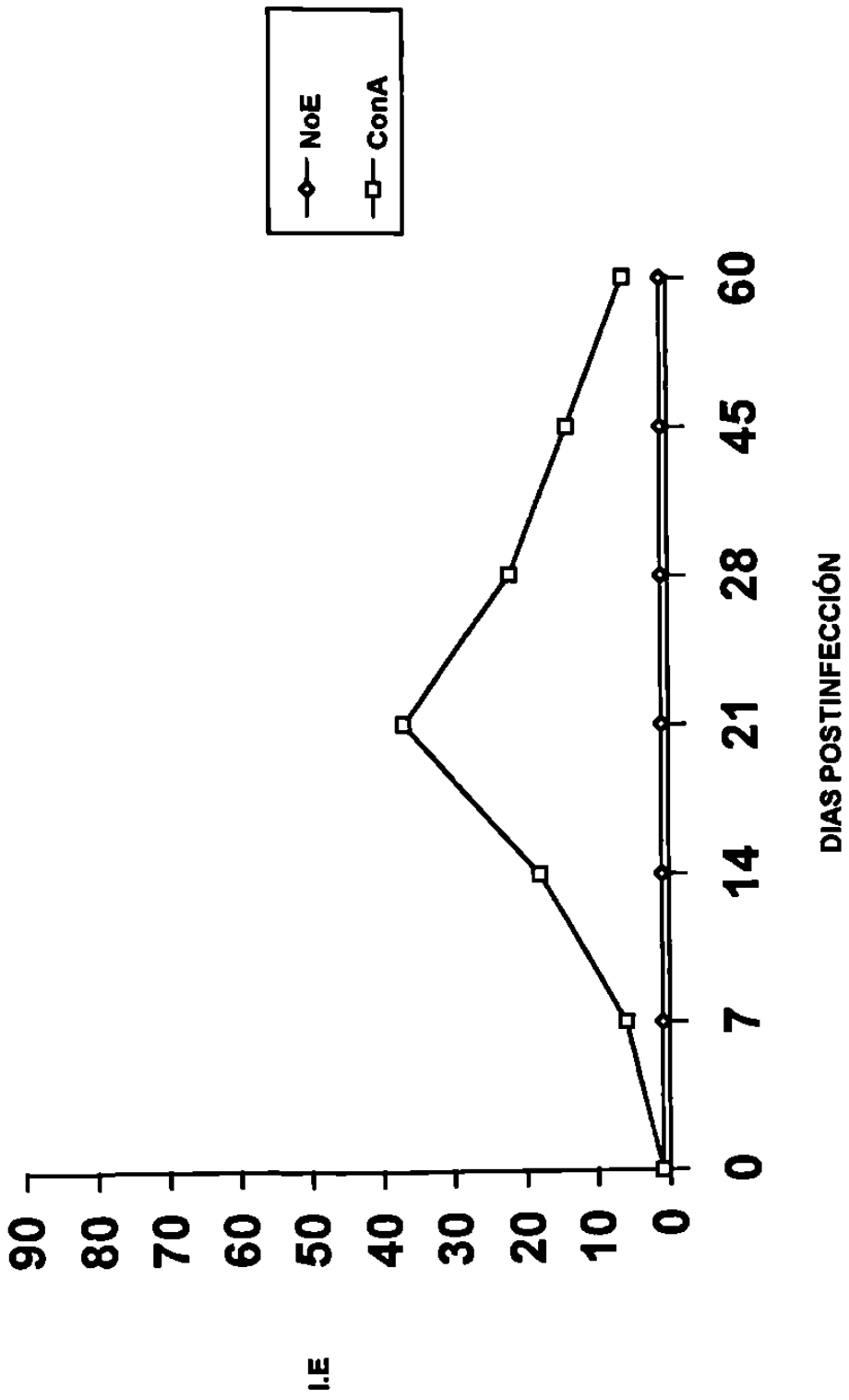


FIGURA 19. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO. RATONES INMUNIZADOS CON EL ECC. CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVOS.

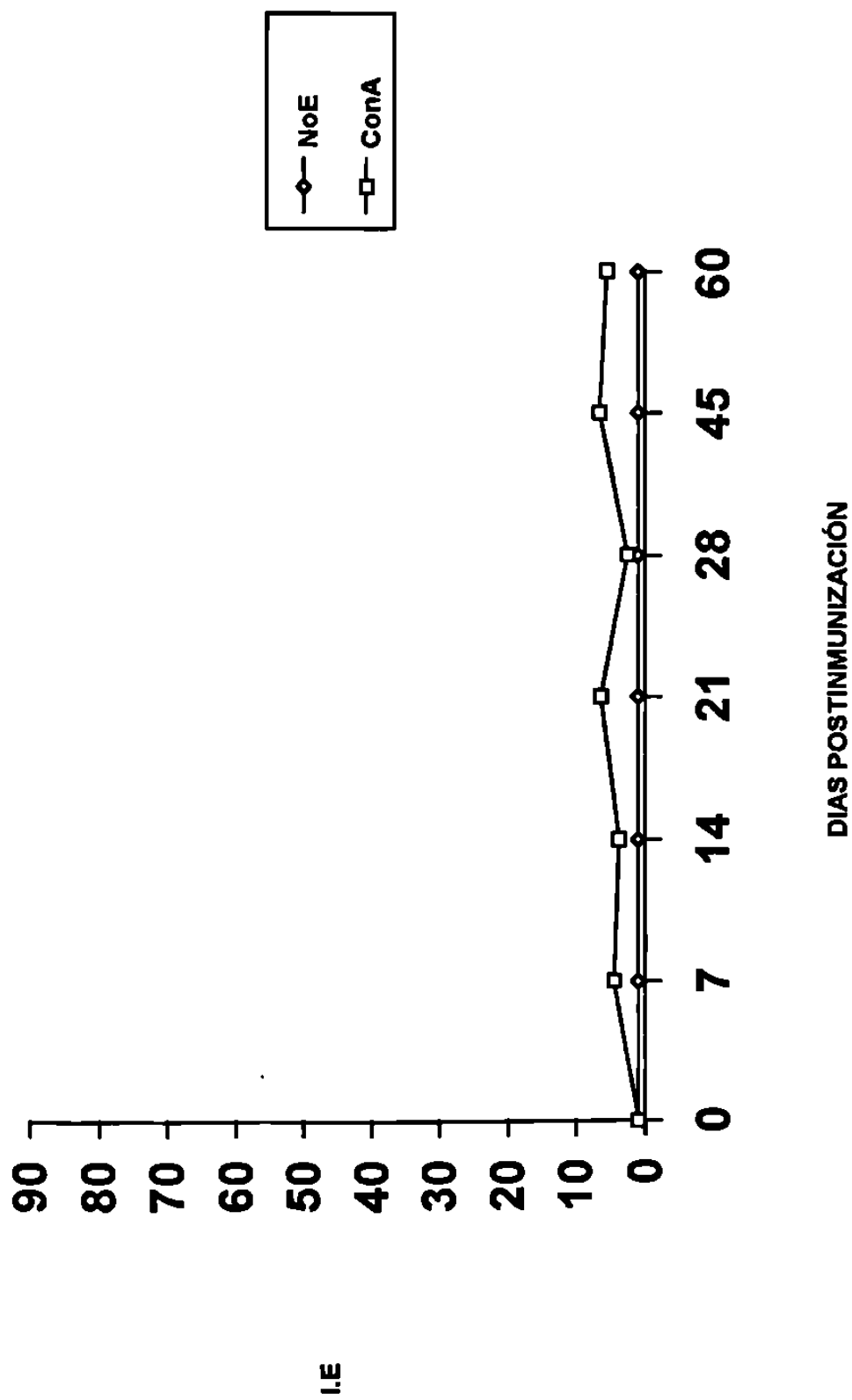


FIGURA 20. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE GANGLIO POPLÍTEO. RATONES INMUNIZADOS CON EL ECC. CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVOS.

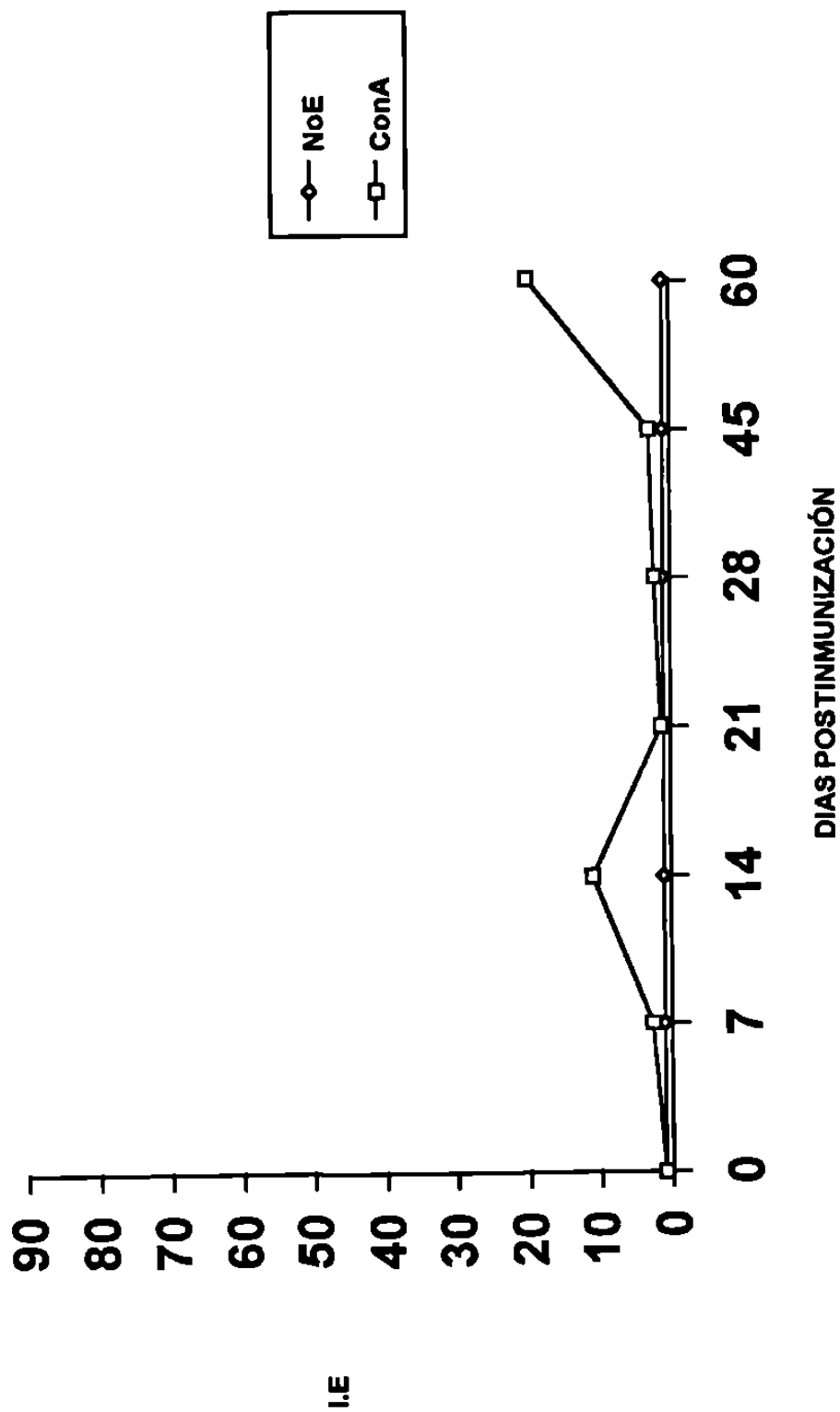


FIGURA 21. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO. RATONES INMUNIZADOS CON EL ES. CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVOS.

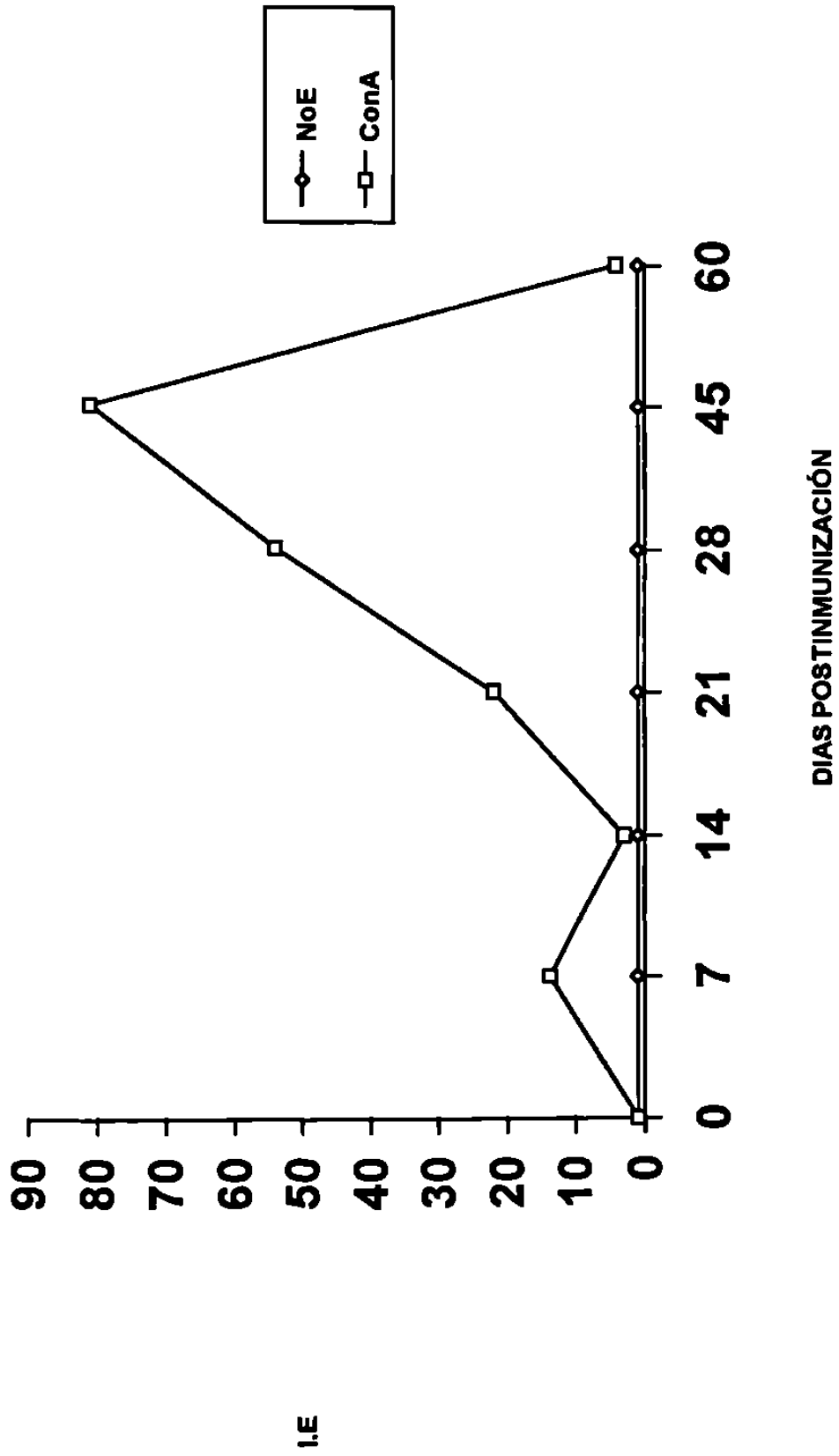
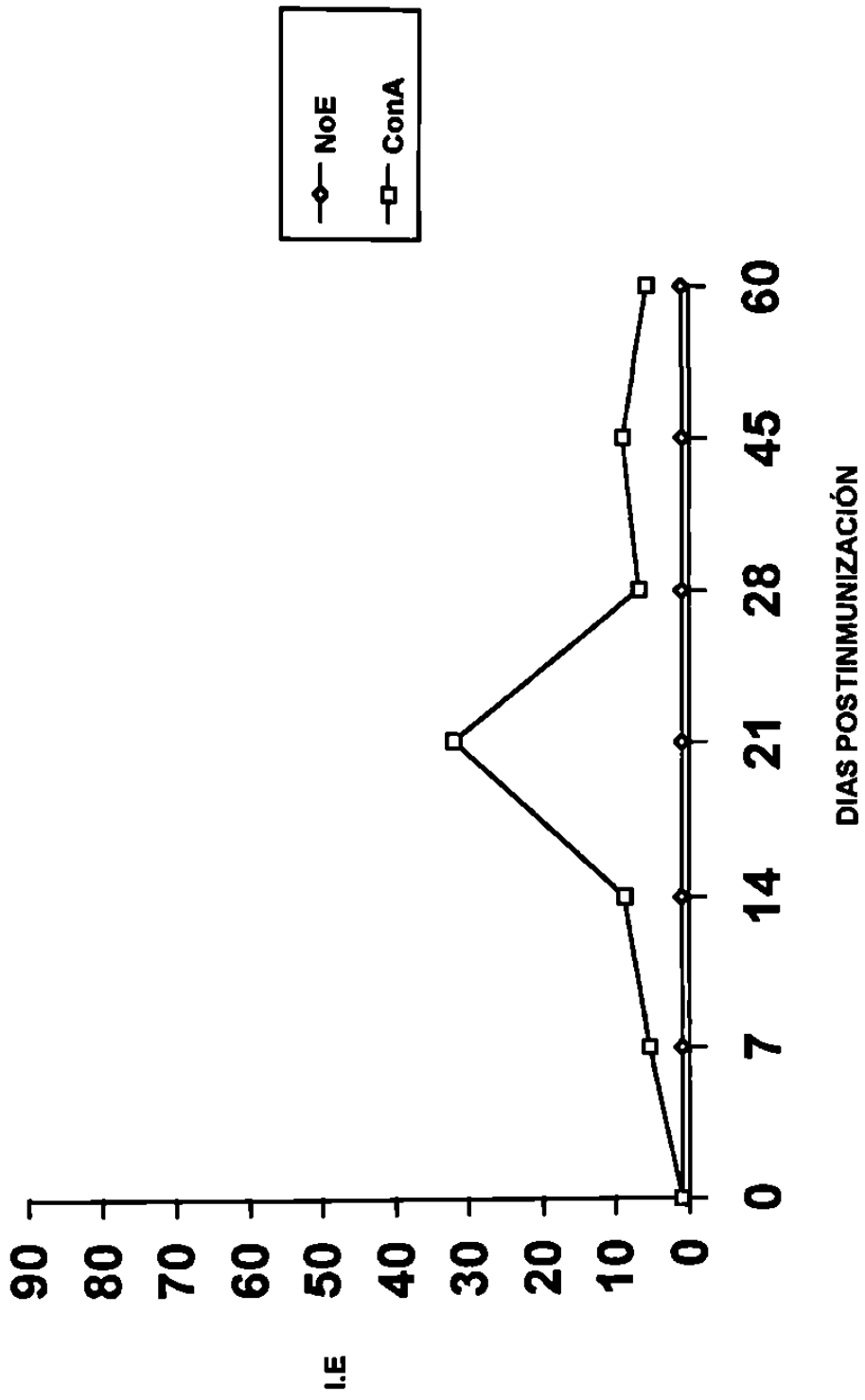


FIGURA 22. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE GANGLIO POPLÍTEO. RATONES INMUNIZADOS CON EL ES. CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVOS.



Ags empleados. No obstante, encontramos diferencias para los Ags *N. brasiliensis* y ECC en el día 21. Para el día 28, la diferencia solo la apreciamos para el Ag E.S. Para el día 45, la significancia se observó en los Ags *N. brasiliensis* y E.S. A los 60 días postinmunización se encontró una diferencia significativa en los 3 Ags. Del mismo modo, se comparó con la prueba t de Student la cinética del grupo infectado contra el inmunizado con el E.S: En los días 7 y 21 postinmunización se observó significancia estadística para los 3 Ags. A los 14, 28 y 45 días solo el ECC no mostró diferencia. Además, no existió significancia a los 60 días postinmunización en los 3 Ags (Tabla IV).

10.2 Linfocitos de ganglio linfático poplíteo. En los tres grupos de animales, es decir, los infectados con *N. brasiliensis*., e inmunizados con ECC y ES no se encontró una diferencia estadística mediante ANAVAR. Así mismo, se realizó la distribución de t en estos grupos. En la tabla V se aprecian estos resultados.

11. Concentración de anticuerpos anti-p24 determinado por ELISA.

Se determinó la concentración de anticuerpos anti-p24 en los sueros de estos grupos de animales. Estos datos no se contemplaron en los objetivos iniciales de este trabajo. Los resultados* se muestran a continuación:

<u>DIA</u>	7	14	21	28	45	60
<u>GRUPO</u>						
<i>N.brasiliensis</i>	0.187	N. D.	0.203	0.288	0.222	0.233
ECC	0.243	0.213	0.198	0.204	0.191	1.087
ES c/AIF	0.163	0.352	1.023	0.522	1.235	N.D.
ES s/AIF	0.174	0.099	0.162	N.D.	0.168	N.D.

* Absorbancia 492 nm. N.D.= no dato Ag usado= p24 0.5 µg/pozo.

TABLA IV. DISTRIBUCIÓN t. COMPARACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE LOS LINFOCITOS DE BAZO DE RATONES BALB/c. RESULTADOS MAYORES QUE 1.83 SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS (P>0.05).

Grupo infectado contra grupo inmunizado con el ECC.

Ag/Días	0	7	14	21	28	45	60
Nb	1.1	0.39	10.81	11.23	1.2	3.25	3.35
ECC	0.46	0	16.33	10.55	0.89	1.13	2.82
ES	0.79	2.43	14.2	0	2.43	2.17	5.74

Grupo infectado contra grupo inmunizado con el ES.

Ag/Días	0	7	14	21	28	45	60
Nb	0.45	2.81	8.66	2.09	3.62	3.82	0.31
ECC	1.3	2.64	1.18	3.57	1.69	1.17	0.3
ES	0.33	2.09	2.26	2.52	4.14	1.98	0.57

TABLA V. DISTRIBUCIÓN t. COMPARACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE LOS LINFOCITOS DE GLP DE RATONES BALB/c. RESULTADOS MAYORES QUE 1.83 SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS (P>0.05).

Grupo infectado contra grupo inmunizado con el ECC.

Ag/Días	0	7	14	21	28	45	60
Nb	0.88	17.91	1.25	15.8	3.18	0	3.19
ECC	0.97	11.35	2.63	7.27	1.58	1.56	2.34
ES	0.78	21.25	2.27	49.04	0.79	5.33	1.38

Grupo infectado contra grupo inmunizado con el ES.

Ag/Días	0	7	14	21	28	45	60
Nb	0.85	0.56	6.63	35.2	12.5	50	3.18
ECC	1.2	8.5	5.16	7.14	5.55	8.48	13.3
ES	0.98	0	1.51	12.5	2.14	3.78	1.11

VI. DISCUSION

Los mecanismos inmunológicos que intervienen en la patogenia del micetoma producido por *N. brasiliensis* no han sido completamente definidos (20,25); se ha sugerido que la respuesta inmune humoral no juega un papel preponderante en la resistencia contra esta bacteria (14,32,47), y que la inmunidad mediada por células es un mecanismo esencial para la defensa contra esta infección (16,17,23). Los trabajos llevados a cabo para examinar la respuesta inmune celular en esta enfermedad son escasos. En ellos se han estudiado diversos modelos experimentales en donde se utiliza la transferencia adoptiva de células T específicas en animales timectomizados o congénitamente atímicos, o bien, ratones con depleción de linfocitos T, pero la bacteria empleada ha sido *N. asteroides* (6,16,32). En otros se han empleado preparados antigénicos de utilidad en las pruebas de hipersensibilidad retardada (37), pero cuyos resultados son contradictorios debido a la dificultad de obtener Ag específicos purificados (21).

En este trabajo evaluamos la respuesta inmune celular de ratones BALB/c, a través de la estimulación *in vitro* de linfocitos sensibilizados con Ag de *N. brasiliensis*. Para este propósito utilizamos la incorporación de timidina tritiada, un precursor radiomarcado del DNA. Los Ags que empleamos en este estudio, tanto para sensibilizar como para el reto *in vitro* fueron los mismos que se habían reportado en trabajos previos por el Dr. Salinas y colaboradores en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina (UANL) (12,27,48).

Preparamos y utilizamos tres Ags bacterianos relacionados: uno particulado, la *N. brasiliensis* viva, un extracto soluble complejo y un extracto soluble semipurificado de bajo peso molecular. Cada una de estas preparaciones contiene a la proteína inmunodominante de 24 kDa (p24), pero posiblemente con algunas diferencias en su forma y organización estructural (43).

Observamos que cuando empleamos a la bacteria muerta con luz UV como agente inductor de la proliferación de células linfoides, no se presentó una diferencia significativa en las respuestas proliferativas dentro de algunas concentraciones utilizadas. Se necesitarán más ensayos para determinar si realmente se obtienen IE similares al emplear diferentes concentraciones de bacterias. Cantidades mayores de bacterias tienden a formar grumos. Sin embargo, decidimos aplicar la concentración de 1×10^6 bacterias para asegurarnos de tener una estimulación celular adecuada.

Para las diferentes concentraciones del ECC que se emplearon para desafiar a los linfocitos de esos mismos animales observamos que la concentración de 2 μg nos dió el más elevado I.E. Dosis mayores a esta cantidad no produjeron proliferación significativa. Esta disminución pudiera deberse a un efecto inhibitorio o tóxico del ECC sobre la proliferación celular. Este mismo efecto se pudo presentar al emplear concentraciones mayores de 0.6 μg del ES.

En nuestro trabajo, es de interés hacer notar que aunque la dosis empleada como estímulo *in vitro* del ES representó una cantidad relativamente menor, comparada con los otros Ag utilizados, fue el que nos dió el IE más alto.

Esto posiblemente se deba a que este Ag inmunodominante se ofrece en una forma más accesible para las células de bazo que el ECC y la *N. brasiliensis*, a pesar de la gran cantidad y diversidad de epitopes que estos contienen.

Investigamos el efecto de tres presentaciones antigénicas en su cualidad para inducir una respuesta celular secundaria usando como agente infectante la *N. brasiliensis* viva, ya que nuestro interés se enfocó directamente en el desarrollo del micetoma experimental.

El desafío *in vitro* lo realizamos exponiendo las células linfoides al Ag con el que previamente habían sido infectadas o inmunizadas (Ag homólogo); sin embargo, también utilizamos las otras formas antigénicas de la *N. brasiliensis* (Ags heterólogos), con la finalidad de observar hacia que Ag, ya sea particulado o soluble, se sensibilizaron los linfocitos de los ratones BALB/c. Este tipo de ensayos también ha sido empleado en trabajos cuyo interés se ha enfocado en estudiar la respuesta celular contra ciertos Ags derivados de agentes infecciosos intracelulares (44,45,46).

Los linfocitos de bazo obtenidos de los animales infectados tuvieron su máxima estimulación entre los días 14 y 21 postinfección, lo cual coincide con el período de tiempo en el que observamos el inicio del desarrollo del micetoma experimental. La presentación de este granuloma concuerda con lo observado por Torres en 1995 (47), quien también reportó un incremento de inmunoglobulinas totales alrededor del día 14 en ratones BALB/c. También apreciamos una diferencia estadística entre los IE de los Ags usados como estímulo *in vitro* en el día 21 postinfección. Estos datos nos pudieran sugerir una aparición temprana de células específicas para cada una de las diferentes presentaciones antigénicas empleadas como desafío.

Contrariamente a lo esperado, la máxima proliferación celular se apreció no al utilizar el Ag homólogo (*N. brasiliensis*), sino al emplear el ECC. Esto pudiera deberse a: 1) que el ECC posea un efecto de activación policlonal para linfocitos. La proliferación celular que nosotros apreciamos en respuesta al estímulo antigénico del ECC pudiera confundirse con un efecto mitogénico para linfocitos B que ocurre con extractos celulares obtenidos de ciertas bacterias filogenéticamente relacionadas con la *N. brasiliensis*, tal y como ha sido reportada por otros investigadores (8,18,30). Sin embargo, no observamos este efecto, puesto que las células linfoides de bazo de los ratones BALB/c que utilizamos como controles, es decir, sin infectar o inmunizar, no proliferaron al ser estimuladas con el ECC, con el ES o con la *N. brasiliensis*. O bien, 2) en el ECC, las proteínas de mayor concentración como la p24, son las responsables de la proliferación de los linfocitos, ya que esta proteína se manifiesta notoriamente en el patrón electroforético bajo condiciones desnaturalizantes del ECC. Además, esta proteína inmunodominante ha demostrado ser fuertemente reconocida en el ECC, pero por la respuesta humoral (34, 48).

La bacteria muerta con luz UV también fue reconocida por las células linfoides del bazo de nuestros animales desde el 7º día postinfección, aunque fue hasta el día 21 donde fue estadísticamente significativa su diferencia al compararla con los otros dos Ags. Esto nos sugiere que la bacteria no pierde sus determinantes antigénicos al ser radiada con luz UV. Posteriormente, la respuesta proliferativa decayó en el día 60, lo que se puede explicar como un declinamiento del estímulo inicial, ya que solamente infectamos o inmunizamos una sola vez. En este mismo grupo, el hecho de encontrar un menor IE para el ES (enriquecido con p24), en comparación con los otros Ags, nos sugiere que no está tan accesible en la superficie de

la bacteria viva. Esta observación ha sido reportada en un trabajo anterior, pero en donde se utilizó un Ac monoclonal anti-p24 para detectar el Ag inmunodominante en la superficie de la bacteria viva (12).

En un estudio colateral, pero no contemplado en los objetivos de este trabajo, se midió la presencia de Ac en los sueros de estos mismos animales infectados. Mediante la técnica de ELISA se observó que la respuesta de Ac anti-p24 fue mínima en los días de máxima proliferación celular. Puesto que estos animales desarrollaron micetoma, los resultados obtenidos sugerirían que el reconocimiento celular anti-p24 ocurre antes que la respuesta humoral contra esta misma proteína inmunodominante.

Las células linfoides del ganglio linfático poplíteo de este mismo grupo proliferaron intensamente en el día 21, pero en respuesta al Ag particulado. Esto nos pudiera indicar que la mayor parte de la *N. brasiliensis* es retenida en este lugar, debido a una intensa respuesta inflamatoria, ya que el sitio de aplicación de este Ag fue en el cojinete plantar. Esta suposición parte de estudios histopatológicos comparativos en el cojinete plantar de ratones infectados con *N. brasiliensis* y *N. asteroides*, aunque en ellos no se evaluaron lesiones en el ganglio poplíteo (14, 19). Esta respuesta proliferativa también se observó en el bazo, a pesar de estar anatómicamente alejado. Este hecho se pudiera explicar por una movilización de células T estimuladas o de macrófagos que transportaron antígenos al bazo. Serán necesarios estudios posteriores tendientes a explicar el tráfico celular que ocurre durante esta infección. La estimulación celular inducida por el ECC tuvo una intensidad moderada y tardía comparada con la respuesta proliferativa hacia el ES, la cual se mantuvo baja. Posiblemente estos Ags solubles fueron transportados mayormente por circulación sanguínea hacia el bazo y una escasa cantidad ingreso por linfa hacia el ganglio poplíteo.

La respuesta proliferativa observada en los linfocitos de bazo de los animales inmunizados con el ECC coincidió con lo esperado, es decir, fue mayor y más prolongada en aquellas células desafiadas con el Ag homólogo que con los Ag heterólogos. El carácter soluble de este complejo antigénico probablemente le permitió tener un mejor acceso hacia este órgano linfoide. Las células retadas con el ES (enriquecido con p24) no respondieron significativamente sino hasta los 45 días. La posible explicación para esto pudiera deberse a una relativa escasa proporción de la p24 contenida en la dosis del ECC empleada para la inmunización, o bien, a su reconocida baja inmunogenicidad (13). Así mismo, el nivel de Ac anti-p24 determinado por ELISA en los sueros de estos animales fue más alto a los 60 días postinmunización, lo que sugiere que en animales inmunizados con el ECC las células específicas para p24 tanto para la inmunidad celular como humoral aparecen después de los 45 días.

Los linfocitos de ganglio linfático poplíteo de este grupo de ratones tuvieron una respuesta similar al observado en las células de bazo. El mayor IE se observó con el Ag homólogo, también a los 45 días. Esto nos sugiere que primeramente este Ag complejo es reconocido mayormente en el bazo de manera temprana y posteriormente las células específicas son reclutadas hacia el ganglio poplíteo. La respuesta contra el Ag particulado en ambos casos fue de carácter intermedio, sugiriendo que varios Ag del ECC están contenidos en la superficie de la bacteria intacta. Estas células, de manera similar a las células de bazo, reconocen al ES de manera mínima. Esto se pueda explicar por las mismas razones dadas para los esplenocitos de este mismo grupo de animales.

En el siguiente grupo, el extracto soluble semipurificado fue emulsificado en adyuvante incompleto de Freund (AIF), debido a que en estudios previos realizados en el Departamento de Inmunología se demostró la escasa inmunogenicidad de la p24 cuando se inyectó sin AIF, a pesar de que tiene un carácter inmunodominante durante las infecciones naturales o experimentales, así también como al inmunizar con el ECC.

El reto de las células linfoides de bazo alcanzó su máxima proliferación alrededor del día 21 postinmunización y coincidió con el empleo del Ag homólogo. La respuesta de anticuerpos anti-p24, detectada por la técnica de ELISA, también se hizo evidente en este día. Sin embargo, este incremento en la estimulación celular pudo deberse en gran parte al efecto del AIF, ya que se le pudo comparar con un grupo similar de ratones BALB/c en el cual solamente se utilizó la p24 sin AIF y cuyo IE fue más alto en el 7º día. El desafío con el ECC produjo una moderada respuesta proliferativa y algo más baja para el reto con el Ag particulado, sugiriendo en este último de nueva cuenta su escasa presencia en la superficie bacteriana (12).

En el caso de los linfocitos de ganglio linfático poplíteo, observamos un comportamiento similar a las células de bazo, solo que en el primero la respuesta proliferativa se pudo apreciar hasta los 45 días, posiblemente debido a la utilización del AIF, el cual retardó el acceso de este Ag hacia este órgano linfoide.

En base a nuestros resultados resulta evidente apreciar que durante la presentación del micetoma experimental, las células de bazo respondieron más hacia el ECC, mientras que las células del ganglio poplíteo respondieron contra la bacteria muerta. Los esplenocitos y las células popliteas de los ratones inmunizados con el ECC respondieron

sostenidamente al Ag homólogo y por último, se observó la notoria influencia del AIF en las respuestas proliferativas de las células del bazo y del ganglio poplíteo. Sin embargo, serán necesarios más estudios para dilucidar el papel protector de estos Ag al tomar en cuenta la vía de inoculación, el estado físico del Ag empleado y la dosis del mismo, así como el fenotipo de las células involucradas (CD4+, CD8+) en la patogenia de esta infección. Consideramos que los resultados obtenidos en nuestro trabajo serán de utilidad en el desarrollo de los mismos.

VII. CONCLUSIONES

1. La infección experimental con *N. brasiliensis* en ratones BALB/c induce una mayor respuesta proliferativa de linfocitos de bazo anti-Ag soluble complejo que anti-Ag particulado (*N. brasiliensis* / UV).
2. Los linfocitos de ganglio linfático poplíteo de ratones infectados producen una mayor respuesta proliferativa con el Ag homólogo (Ag particulado) que con los antígenos solubles (ECC y ES).
3. La infección experimental con *N. brasiliensis* también genera una respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y ganglio linfático en contra de los antígenos presentados en forma soluble.
4. La infección con *N. brasiliensis* induce mayor proliferación linfocitaria que la estimulada por la inmunización de los Ags solubles.
5. La inmunización de ratones BALB/c con los extractos solubles complejo y semipurificado induce una mayor respuesta proliferativa contra los antígenos homólogos, tanto en células de bazo como de ganglio poplíteo.
6. El ECC no posee efecto mitogénico para linfocitos de bazo en animales sin experiencia previa contra antígenos de *N. brasiliensis*.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Angeles, A. M., and Sugar, A. M. 1987. Identification of common immunodominant protein in culture filtrates of three *Nocardia* species and use in etiologic diagnosis of mycetoma. *J. Clin. Microbiol.* **12**: 2278-2280.
- 2.- Angeles, A. M., and Sugar, A. M. 1987. Rapid diagnosis of Nocardiosis with an enzyme immuneassay. *J. Infect. Dis. Vol.* **155. 2**: 292 - 296.
- 3.- Beaman, B. L. 1979. Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with *in vitro* maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbit. *Infect. Immun.* **26**: 355 - 361.
- 4.- Beaman, B. L., and Beaman, L. 1994. *Nocardia* species. Host parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev. Vol.* **7. 2**: 213 -264.
- 5.- Beaman, B. L., Black, C. M., and Beaman, L. 1985. Role of Superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* **47**: 135 - 141.
- 6.- Beaman, B. L., and Maslan, S. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infect. Immun. Vol.* **20.1**: 290 - 295.
- 7.- Bintoard, C. H., and Connor, D. H. 1976. Pathology of Tropical and Extraordinary Disease. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D. C.
- 8.- Bona, C., Chedid, L., Damais, R., Ciorbaru, R., Shek, P.N., Dubiski, S., and Cinader, B. 1975. Blast transformation of rabbit B-derived lymphocytes by a mitogen extracted from *Nocardia*. *J. Immunol. Vol.* **114. 1**: 348-353.
- 9.- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- 10.- Burgeois, L., and Beaman, B. L. 1974. Probable L-forms of *Nocardia asteroides* induced in cultured mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **9**: 576-590.
- 11.- Carter, G. R. 1985. Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos Especiales. 1a. Edición Editorial El Manual Moderno. México, D. F.

- 12.- Castro, A. 1995. Obtención de anticuerpos monoclonales para buscar a la proteína inmunodominante de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.
- 13.- Conde, C., Y. Melendro, E., Fresan, M., and Ortiz., L. 1982. *Nocardia brasiliensis*: Mycetoma induction and growth cycle. Infect. Immun. Vol. 38. 3: 1291-1295.
- 14.- Conde, C., Mancilla, R., Fresan, M , and Ortiz O., L. 1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. Immun. Vol. 30.3: 1218- 1222.
- 15.- Davis S., C., and Beaman, B. L. 1980. Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: immunological enhanced of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and microbicidal activity. Infect. Immun. 30: 578-587.
- 16.- Deem, L., Beaman, B. L., and Eric G., G., M. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. Infect. Immun. Vol. 38.1: 914-920.
- 17.- Deem, L., Doughty, F. A., and Beaman, B. L. 1983. Immunologically specific direct T Lymphocyte-mediate killing of *Nocardia asteroides*. J. Immunol. 130: 2401-2406.
- 18.- Engel, D., Clagett, J., Page, R., and Williams, B. 1977. Mitogenic activity of *Actinomyces viscosus*. I. Effects on murine B and T lymphocytes, and partial characterization. Vol. 118. 4:1466-1471.
- 19.- Filice, G. A., Beaman, B. L. and Krick, J. A. Effect of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*.: failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. J. Infect. Dis. 142: 432-438.
- 20.- Folb, P., Jaffe, R. and Altmann, G. : *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infection on mice. Infect. Immun. 13: 1490-1496.
- 21.- Gupta, R. Pancholi, V., Vinayac, V. K. and Khuller, G. K. 1985. Immunological responses to protein, carbohydrate and lipid fraction of *Nocardia asteroides* in mice. J. Med. Microbiol. Rev. 20: 263-274.
- 22.- Hudson L. and C. Hay, F. 1989. Practical Immunology. Third Edition. Blackwell Scientific Publications. England.

- 23.- Kaufman, S. H. E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 129-163.
- 24.- Kobayashi, C. S. 1987. Bacterias Parecidas a Hongos. Actinomicetos. Tomado de: Tratado de Microbiología de Davis. 2da. Edición. Salvat. Barcelona, España.
- 25.- Krick, J. A. and Remington, J. S. 1975. Resistance to infection with *Nocardia asteroides*. *J. Infect. Dis.* **132**: 6. 665-672.
- 26.- Laemmli. E. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- 27.- Martínez D., I. A. 1996. Determinación de la respuesta de anticuerpos contra fracciones lipídica, proteica y polisacárida de *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c U. A. N. L. Facultad de Medicina. Tesis de Maestría.
- 28.- McNeil, M., and Brown, J. M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:3. 357-417.
- 29.- Morilla, M. C. 1985. Manual de Inmunología. Diana. México, D. F.
- 30.- Ortiz O., L., Elliot, P. D., Sullivan L., and Weigle, O. W. 1979. B lymphocyte activation with extract of *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* **25**: 2. 627 -634.
- 31.- Ramos C., A. I. 1995. Efecto de la concentración y del estado físico de antígenos de *Nocardia brasiliensis* en las respuestas humoral y celular contra una fracción inmunodominante en ratones BALB/c. Tesis Doctoral. En Proceso.
- 32.- Rico, G. Ochoa, R., Oliva, A., Gzz. M.A. 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *J. Immunol.* **129**: 4. 1668-1693.
- 33.- Salinas C., M. C. Nussenblatt, B., and Gery, I. 1982. Experimental autoimmune uveitis in athymic nude rat. *Eur. J. Immunol.* **12**: 480-484.
- 34.- Salinas C., M. C., Gery, Y., Rusell, P., and Nussenblatt, B. 1992. Mitogen-induced suppressor factor(s) from human lymphocytes: effects of lymphoid and non lymphoid cells and biophysical properties. *Cellular Immunol.* **71**: 44-53.

- 35.- Salinas C., M. C., Welsh, O., and Casillas, S. M. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 11. 2901-2903.
- 36.- Salinas C., M. C., Vera, L. Welsh, O., and Rodríguez, M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* in man. *Zbl. Bakt.* **276**: 390-397.
- 37.- Sandoval T. 1993. Actinomicetos. 1a. Edición. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, México, D. F.
- 38.- Serrano, J. A. y Sandoval T., H. 1992. Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetos Patógenos. Universidad de los Andes. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico. Consejo de Publicaciones. Mérida, Venezuela.
- 39.- Silva, C. L. and Faciolo, L. H. 1992. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from livers and spleen of mice. *Infect. Immun.* **60**:9. 3566-3570.
- 40.- Splino, M., V. Merka and F. Kintera. 1975. Phagocytosis and intracellular of *Nocardia asteroides* in cell structures *in vitro*. 1. Alveolar macrophages of Guinea pigs. *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, 1. Abt. Originaria.* **232**: 334-340. Tomado de Beaman, B. L., and Beaman, L. 1994. *Nocardia* species. Host parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 7. **2**: 213 -264.
- 41.- Spargo, B. J., Crowe, L. M. Ionedá, T., Beaman, B. L. and Crowe, J. H. 1991. Cord factor (α, α - threosyl 6, 6' dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 737-740.
- 42.- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 2nd. edition. McGraw-Hill Book Company, USA.
- 43.- Sterzl J. 1965. Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation. Proceedings of Symposium Held in Prague on Jul 1-5, 1964. Academic Press, Czechoslovakia.
- 44.- Stevens, M. G, Olsen, S. C. and Pugh, G. W. 1994. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* 2308 or RB51 antigens in mice infected with strain 2308, RB51, Or 19. *Infect. Immun.* **62** (10): 4659-4663.

- 45.- Stevens, M. G., Olsen, S. C. and Cheville, N. F. 1994 Lymphocyte proliferation in response to immunodominant antigens of *Brucella abortus* 2308 and RB51 in strain 2308- infected cattle. *Infect. Immun.* 62 (10): 4646-4649.
- 46.- Theus, S. A., Sullivan, D. W., Walzer, P. D. and Smulian, A. G. 1994. Cellular responses to a 55-kilodalton Recombinant *Pneumocystis carinii* antigen. *Infect. Immun.* 62 (8) 3479-3484.
- 47.- Torres, E. 1994. Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.
- 48.- Vera, C. L., Salinas C., M. C., and Rodríguez, M.A. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J.Clin. Microbiol.* 5: 1183-1188.
- 49.- Welsh, O. 1991. Mycetoma. Current concepts in treatment. *Internacional Journal of Dermatology.* 30:6. 387-398.
- 50.- Zlotnik, H., and Bucley, H. R. 1980. Experimental production of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 29:3. 1141-1145.

IX. APENDICES

APENDICE A

EQUIPO

1. Agitador magnético Nuova II (THERMOLYNE)
2. Balanza analítica 2024MP (SARTORIUS)
3. Balanza granataria (SARTORIUS)
4. Baño a temperatura constante Modelo BMT-4 (MAPSA)
5. Bomba peristáltica (LKB)
6. Cámara para electroforesis (BIO-RAD)
7. Cámara para electroforesis (SIGMA)
8. Cámara para cromatografía en capa fina (SIGMA-ALDRICH)
9. Campana de flujo laminar (CONTAMINATION CONTROL INC.)
10. Centrifuga eppendorf 5415 (BRINKMANN)
11. Centrífuga TJ-6 (BECCKMANN)
12. Centrífuga Serofugall (CLAY ADAMS)
13. Columna para cromatografía (WHEATON)
14. Cosechadora automática múltiple (M. A. BIOPRODUCTS)
15. Espectofotómetro DU-6 (BECKMAN)
16. Fuente de poder. Modelo 1000/500 (BIO-RAD)
17. Formador de gradientes. Modelo 385 (BIO-RAD)
18. Homogenizador (EVER-BACH)
19. Incubadora (J.M. ORTIZ)
20. Incubadora con agitador. Dubnoff metabolic (GCA/PREC. SCI.)
21. Invertoscopio (ZEISS) 47 12 03 - 9901
22. Lámpara de luz ultravioleta Modelo 51438 (GELMAN SCIENCES INC.)
23. Liofilizadora (VIRTIS)

24. Pipet-aid (DRUMMOND SCIENTIFIC CO.)
25. Placas para microcultivo de fondo plano (CORNING)
26. Potenciómetro 43 (BECKMAN)
27. Refrigerador (KELVINATOR)
28. Secador de geles (EPHORTEC)
29. Tubos eppendorf (BIO-RAD)
30. Vortex mixer s/p (AMERICAN SCI. PROD.)
31. Unidades de filtración 0.22 μm (MILLIPORE)

APENDICE B

REACTIVOS QUIMICOS

1. Acetona (BAKER)
2. Acetato de magnesio (MALLINCKRODT)
3. Acido acético glacial (MERCK)
4. Acido clorhídrico (MERCK)
5. Acrilamida (SIGMA)
6. Acetato de magnesio (MALLINCKODT)
7. Adyuvante incompleto de Freund (SIGMA)
8. Agar dextrosa Sabouraud (BIOXON)
9. Albúmina bovina (SIGMA)
10. Alcohol deshidrogenasa (SIGMA)
11. Amberlita (LKB)
12. Amortiguador de referencia pH 7 (SIGMA)
13. Amortiguador de referencia pH 4 (SIGMA)
14. Anhidrasa carbónica (SIGMA)
15. Azida de sodio (FISHER)
16. Azul de bromofenol (SIGMA)
17. Azul de Coomassie G-250 (LKB)
18. Azul de Coomassie R-250 (SIGMA)
19. Azul dextrana (SIGMA)
20. β -Mercaptoetanol (SIGMA)
21. Bicarbonato de sodio (MERCK)
22. Dodecilsulfato de sodio (SIGMA)
23. Carbonato de sodio (FISHER)
24. Citocromo c (SIGMA)
25. Cloroformo (BACKER)

26. Cloruro de bario (MONTERREY)
27. Cloruro de potasio (MERCK)
28. Concanavalina A (SIGMA)
29. Cloruro de sodio (MERCK)
30. Duodecilsulfato de sodio (SIGMA)
31. Etanol (MERCK)
32. Eter etílico (MERCK)
33. Fenol (MERCK)
34. Fitohemaglutinina (SIGMA)
36. Formol (MONTERREY)
37. Glicerol (SIGMA)
38. Glicina (SIGMA)
39. Gentamicina (SHERING)
40. Glucosa (BAKER)
41. Hidróxido de amonio (MONTERREY)
42. Hidróxido de sodio (MERCK)
43. L-Glutamina (SIGMA) HYBRI MAX
44. Marcadores de peso molecular stock No SDS-7L Dalton Marck (SIGMA)
45. Medio de cultivo RPMI-1640 (HY-CLONE)
46. Medio Infusión Cerebro Corazón (DIFCO)
47. Membrana de diálisis (SIGMA)
48. Metanol (MERCK)
49. Nitrato de plata (MERCK)
50. N,N,'-metilen-bis-arilamida (SIGMA)
51. N,N,N',N'-tetrametiletildiamino (SIGMA)
52. Papel filtro mini mash glass fiber (M. A. BIOPRODUCTS)
53. Papel Whatman No. 1
54. Persulfato de amonio (SIGMA)
55. Sephadex G-100 (SIGMA)
56. Suero bovino fetal (DEPTO. DE INMUNOLOGIA)

57. Sulfato de amonio (MONTERREY)
58. Timidina 3H (AMERSHAM)
59. Tolueno (MERCK)
60. Trizma-base (SIGMA)
61. Trizma hidrociorado (SIGMA)

APENDICE C

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
Ags	Antígenos
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund.
ANAVAR	Análisis de Varianza.
Abs	Absorbancia.
BaCl	Cloruro de Bario.
BHI	Infusión Cerebro Corazón.
°C	grados centígrados.
cm	centímetro.
CPM	Cuentas Por Minuto.
ECC	Extracto Celular Crudo / Ag Soluble Complejo.
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas.
ES	Extracto Semipurificado / Ag Soluble Semipurificado Enriquecido con p24.
gr	gramo.
h	hora.
³ H-Tdr	Timidina Tritiada.
IE	Indice de Estimulación.
kDa	kilodalton.
M	Molar.
ml	mililitro.

μ	micra.
μg	microgramo.
μl	microlitro.
<i>N.b.</i>	<i>Nocardia brasiliensis.</i>
Nu/Nu	Ratones Congenitamente Atímicos.
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos.
PMN	Polimorfonucleares Neutrófilos.
%	por ciento.
r.p.m.	revoluciones por minuto.
RPMI-1640	Medio de Cultivo Celular.
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio.
SFB	Suero Fetal Bovino.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
U.I.	Unidades Internacionales.
UV	Luz Ultravioleta.
Ve	Volumen de Elución.
Vo	Volumen Vacío.

