

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFECTO DE LA CONCENTRACION Y DEL ESTADO
FISICO DE ANTIGENOS DE *Nocardia brasillensis* EN
LAS RESPUESTAS HUMORAL Y CELULAR CONTRA
UNA FRACCION INMUNODOMINANTE EN
RATONES BALB/c.

POR

ALMA ISABEL RAMOS CANO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad
en Inmunología.

Febrero, 1999

TD
QR82
.N6
R45
c.1

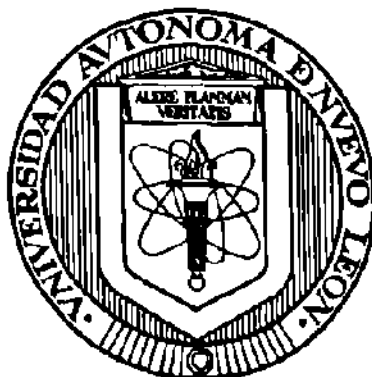


1080085189

FOR INFORMATION ONLY

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA CONCENTRACION Y DEL ESTADO FISICO DE
ANTIGENOS DE *Nocardia brasiliensis* EN LAS RESPUESTAS
HUMORAL Y CELULAR CONTRA UNA FRACCION
INMUNODOMINANTE EN RATONES BALB/c.**

POR

ALMA ISABEL RAMOS CANO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología.**

Febrero, 1999

QR
.N6
R45

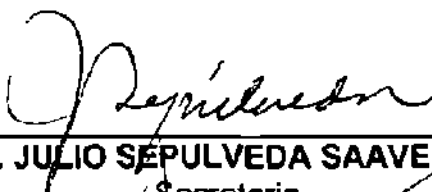


EFFECTO DE LA CONCENTRACION Y DEL ESTADO FISICO DE ANTIGENOS DE *Nocardia brasiliensis* EN LAS RESPUESTAS HUMORAL Y CELULAR CONTRA UNA FRACCION INMUNODOMINANTE EN RATONES BALB/c

Aprobación de la Tesis:



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Presidente



DR. JULIO SÉPULVEDA SAAVEDRA
Secretario



DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
1er. Vocal



DR. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO
2do. Vocal



DR. GERARDO VELAZCO CASTAÑON
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mis Maestros: Dr. Mario César Salinas Carmona, Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, Dra. María del Socorro Flores de Castañeda, Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla (q.e.p.d.), Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, Dr. Gerardo Velazco Castañón, Dr. Mario Alberto Garza Elizondo, Dr. Carlos Medina de la Garza.

Al Personal del Departamento de Inmunología de esta Facultad: Aracely, Lizzy, Betty, Martita Galindo, Paty, Francisco, Don Carlitos, el Sr. Santana, Vicente y Alejandro.

Al Personal de la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado: Sra. Socorrito Valles, Sra. Normita Sánchez, Dra. Herminia Martínez R., Dra. Ma. Esthela Morales P.

A Don Manuelito, Don Juan y el Sr. Víctor, vigilantes del edificio donde se encuentra el Departamento de Inmunología.

A los señores J. Trinidad Pérez R. y José S. Sanmiguel A. del Depto. de Fisiología de esta Facultad, por auxiliarme en la atención de los ratones.

A la Sra. S. Leticia Betancourt de Chaires, por realizar la impresión final de este trabajo.

A la QCB Adriana I. Pizaña (Depto. de Microbiología) por proporcionarme tan gentilmente la cámara para radiación U.V. y el área para realizar el trabajo.

A la M.C. Raquel Ballesteros (Depto. de Histología) y a la M.C. Sachiko Leo Wong (Depto. de Farmacología), por su amable disposición para fotografiar al microscopio cultivos de linfocitos.

A la Dra. María de los Angeles Castro Corona, por las incontables e invaluable muestras de compañerismo y amistad.

Al M.C. Ernesto Torres López, por compartir conmigo sus conocimientos sobre micetoma experimental en ratón, por su incansable amabilidad al llevar a cabo la lectura en el citómetro de flujo de más de 2,000 muestras.

A mis Compañeros: M.C. L. Isabel Pérez, M.C. Irma A. Martínez, M.C. Silvia Casillas, QCB Verónica López, M.C. Paula Cordero, M.C. Gloria Molina, M.C. Luis Edgar Rodríguez, Dra. Catalina Rivas, Dra. Anna Velia Vázquez, Dr. Lucio Vera, Dr. Angel Licón, por su valiosa amistad.

A mi Familia, especialmente a mi Madre Sra. Alma Cano Vda. de Ramos, por su incesante apoyo moral y material durante toda mi vida.

A Yavéh, mi Padre Dios, por la oportunidad de encontrarme en este momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca-crédito que me proporcionó.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	xv
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	15
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODOS	18
1. Material Biológico.	18
1.1 Animales de Experimentación.	18
1.2 Antígenos.	18
2. Obtención de los Antígenos de <i>Nocardia brasiliensis</i> Cepa HUJEG-1.	18
2.1 Obtención de Suspensión Unicelular de <i>N. brasiliensis</i> Cepa HUJEG-1.	18
2.1.1 Tinción de Kinyoun.	19
2.1.2 Micrométodo de Miles y Misra.	19
2.1.3 Método de Vaciado en Placa.	19
2.1.4 Medición de la Turbidez.	20
2.1.4.1 Densidad Optica.	20
2.1.4.2 Nefelometría.	20
2.2 Obtención de los Antígenos Particulados de <i>N. brasiliensis</i> Cepa HUJEG-1.	20
2.2.1 Obtención de <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor.	20
2.2.1.1 Determinación de Peso Seco y de Proteína en la Dosis 10 ⁹ UFC de Antígeno Particulado <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor.	20
2.2.1.2 Deslipidización del Antígeno Particulado <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor.	21

2.2.2 Obtención de <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Radiación Ultravioleta.	21
2.3 Obtención de los Antígenos Solubles de <i>N. brasiliensis</i> Cepa HUJEG-1.	21
2.3.1 Extracto Celular Crudo.	21
2.3.1.1 Determinación de Proteína por el Procedimiento de Bradford.	22
2.3.1.2 Insolubilización del Extracto Crudo.	22
2.3.2 Fracción Inmunodominante (fID).	23
2.3.2.1 Calibración de la Columna con Sephadex G-100.	23
2.3.2.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.	24
2.3.2.2.1 Tinción de Coomassie.	24
2.3.2.2.2 Tinción Argéntica.	25
3. Determinación del Efecto de la Concentración y del Estado Físico de Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> en las Respuestas Humoral y Celular Contra una Fracción Inmunodominante en Ratones BALB/c.	25
3.1 Inmunización de Ratones BALB/c.	25
3.2 Determinación del Efecto de la Concentración y del Estado Físico de Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> en la Respuesta Humoral.	26
3.2.1 Cuantificación por Enzimoimmunoanálisis (ELISA) de Anticuerpos Séricos Anti-fID de la Bacteria.	26
3.2.1.1 Obtención de Suero.	26
3.2.1.2 Desarrollo del ELISA.	26
3.3 Determinación del Efecto de la Concentración y del Estado Físico de Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> en la Respuesta Celular.	27
3.3.1 Ensayo de Respuesta Proliferativa de Células de Bazo y de Ganglio Linfático Poplíteo (GLP).	27
3.3.1.1 Obtención de Suspensiones de Células de Bazo y de	

GLP de Ratones.	27
3.3.1.2 Respuesta Proliferativa a Mitógenos y Antígenos, de Linfocitos de Bazo y de GLP de Ratones.	27
3.3.2 Análisis por Citometría de Flujo de las Poblaciones de Linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de Bazo y de GLP de Ratones.	28
4. Análisis Estadístico.	29
RESULTADOS	30
1. Obtención de los Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> Cepa HUJEG-1.	30
1.1 Antígenos Particulados.	30
1.1.1 Obtención de Suspensión Unicelular de <i>N. brasiliensis</i> .	30
1.1.2 Obtención de los Antígenos Particulados <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor y <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Radiación Ultravioleta.	38
1.2 Obtención de los Antígenos Solubles Extracto Celular Crudo y Fracción Inmunodominante.	44
2. Determinación del Efecto de la Concentración y del Estado Físico de Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> en las Respuestas Humoral y Celular Contra una Fracción Inmunodominante en Ratones BALB/c.	47
2.1 Respuesta Humoral. Respuesta de Anticuerpos Anti-fID de <i>N. brasiliensis</i> .	47
2.2 Respuesta Celular.	52
2.2.1 Respuesta Proliferativa.	52
2.2.1.1 Determinación de la Dosis Óptima de fID para Inducir <i>in vitro</i> Respuesta Proliferativa de Linfocitos de Ratones Inmunizados con los Antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .	52
2.2.1.2 Determinación de la Respuesta Proliferativa Anti-fID de <i>N. brasiliensis</i> , de Linfocitos de Bazo y de GLP	

de Ratones Primoinmunizados con las Diferentes Concentraciones de los Antígenos Particulados y Soluble de la Bacteria.	56
2.2.2 Fenotipo.	61
2.2.2.1 Determinación de las Condiciones para el Análisis por Citometría de Flujo del Fenotipo de los Linfocitos de Bazo y de GLP de Ratones.	61
2.2.2.2 Efecto de los Antígenos Particulados.	65
2.2.2.2.1 Fenotipo de las Poblaciones de Linfocitos de Bazo y de GLP de los Ratones BALB/c Primoinmunizados con los Antígenos Particulados <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor y <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Radiación Ultravioleta.	65
2.2.2.2.2 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo en Diferentes Tiempos Después de la Primoinmunización con Antígeno Particulado.	70
2.2.2.2.3 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo Después del Estimulo Antigénico en Cultivo, en Diferentes Tiempos Posteriores a la Primoinmunización con Antígeno Particulado.	76
2.2.2.2.4 Fenotipo de los Linfocitos de GLP, en Diferentes Tiempos Después de la Primoinmunización con Antígeno Particulado.	77
2.2.2.2.5 Fenotipo de los Linfocitos de GLP Después del Estimulo Antigénico en Cultivo, en Diferentes Tiempos Posteriores a la Primoinmunización con Antígeno Particulado.	77
2.2.2.3 Efecto del Antígeno Soluble.	83
2.2.2.3.1 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo en Diferentes Tiempos Después de la Primoinmunización	

con Antígeno Soluble.	83
2.2.2.3.2 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo Después del Estímulo Antigénico en Cultivo, en Diferentes Tiempos Posteriores a la Primoinmunización con Antígeno Soluble.	88
2.2.2.4 Análisis de la Población de Linfocitos TCD3+.	91
DISCUSION	92
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFIA	105
LISTA DE ABREVIATURAS	113
APENDICE	117

12. Respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c, en presencia de mitógeno. 54
13. Respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c, en presencia de la fID de *N. brasiliensis*. 55
14. Respuesta proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c inmunizados con el antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. 58
15. Respuesta proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c inmunizados con el antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. 59
16. Respuesta proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el antígeno soluble (extracto crudo) de la bacteria. 60
17. Registro de los niveles de ajuste de los detectores del citómetro de flujo. 62
18. Gráficas de puntos que muestran la localización de las poblaciones de linfocitos de bazo y de GLP de ratón, en el plano coordinado de análisis del citómetro de flujo. 63
19. Hoja de reporte obtenida del citómetro de flujo. 64
20. Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC y con 10^7 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. 66
21. Fenotipo de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. 67
22. Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC y con 10^7 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. 68
23. Fenotipo de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. 69
24. Gráficas de puntos (citometría de flujo), que muestran los patrones

- celulares de las subpoblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC de antígeno particulado. 72
25. Gráficas de puntos (citometría de flujo), que muestran los patrones celulares de las subpoblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^7 UFC de antígeno particulado. 73
26. Gráficas de puntos (citometría de flujo), que muestran los patrones celulares de las subpoblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC de antígeno particulado. 74
27. Gráficas de puntos (citometría de flujo), que muestran los patrones celulares de las subpoblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC de antígeno particulado. 75
28. Fenotipos antes y después del reto antigénico en cultivo, de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC y con 10^7 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. 79
29. Fenotipos antes y después del reto antigénico en cultivo, de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. 80
30. Fenotipos antes y después del reto antigénico en cultivo, de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC y con 10^7 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. 81
31. Fenotipos antes y después del reto antigénico en cultivo, de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. 82
32. Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con el antígeno soluble de *N. brasiliensis*. 86
33. Gráficas de puntos (citometría de flujo), que muestran los patrones celulares antes del reto antigénico en cultivo, de las subpoblaciones de

- linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con diferente concentración de antígeno soluble. 87
34. Fenotipos antes y después del reto antigénico en cultivo, de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 5 y con 40 microgramos de antígeno soluble de *N. brasiliensis*. 89
35. Fenotipos antes y después del reto antigénico en cultivo, de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 100 y con 300 microgramos de antígeno soluble de *N. brasiliensis*. 90
36. Esquema propuesto para relacionar algunos de los eventos inmunes identificados en el hospedero en respuesta a la presencia de antígenos de *N. brasiliensis*. 100

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Comparación de las técnicas de vaciado en placa (VP) y de Miles y Misra (MM) utilizadas en la cuantificación de unidades formadoras de colonias de <i>N. brasiliensis</i> .	33
2. Efecto de la radiación U.V. sobre la viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> en función del tiempo de tratamiento.	40
3. Efecto de la radiación U.V. sobre la viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> en función de la densidad celular.	41
4. Efecto de la radiación U.V. sobre la viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> en función de la densidad y el volumen de la suspensión celular.	42
5. Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> a los 25 días del tratamiento letal con radiación U.V.	43
6. Determinación de las condiciones básicas para la evaluación de la respuesta proliferativa de células mononucleares de bazo de ratones BALB/c.	53

RESUMEN

Alma Isabel Ramos Cano
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Obtención del Grado: Enero de 1999

Título del Estudio: EFECTO DE LA CONCENTRACION Y DEL ESTADO FISICO DE ANTIGENOS DE *Nocardia brasiliensis* EN LAS RESPUESTAS HUMORAL Y CELULAR CONTRA UNA FRACCION INMUNODOMINANTE EN RATONES BALB/c

Número de Páginas: 120

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología

Area de Estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: *Nocardia brasiliensis*, agente etiológico de actinomietoma, induce respuesta inmune mediada por anticuerpos y por células. En el presente trabajo se determinó en un modelo experimental la influencia de la dosis y del estado soluble o particulado del antígeno en la respuesta inmune. En la hipótesis de trabajo se planteó que el antígeno particulado induciría respuesta inmune, humoral y celular, mayor que el antígeno soluble, en forma dependiente de la dosis. Los antígenos soluble y particulados se obtuvieron de la cepa HUJEG-1 de *N. brasiliensis*, se inmunizaron ratones BALB/c y se evaluó la respuesta inmune contra una fracción inmunodominante de la bacteria: nivel sérico de anticuerpos, respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y de ganglio linfático y fenotipo TCD4+, TCD8+, BCD45R+.

Contribuciones y Conclusiones: Se estandarizó el procedimiento para cuantificar unidades formadoras de colonias de *N. brasiliensis* mediante el micrométodo de Miles y Misra y de la relación Densidad Óptica/Densidad Celular, y se establecieron las condiciones para obtener la bacteria muerta por radiación U.V. Los cambios en pigmentación, hidrofobicidad y densidad celular no modificaron la antigenicidad de las bacterias radiadas. La cantidad de anticuerpos y su permanencia fueron dependientes de la concentración del antígeno particulado, pero a los 5 meses el nivel de anticuerpos fue semejante para los antígenos particulado y soluble. La magnitud de la respuesta de linfocitos fue dependiente directamente de la dosis del antígeno particulado pero solo durante la primera semana post-inmunización, y fue igual en magnitud, y notablemente constante, en el curso de 5 meses independientemente de la cantidad y de la forma física del antígeno. Estos resultados aportan conocimiento esencial para el desarrollo de una vacuna que, además de proteger no desencadene los efectos secundarios asociados con las dosis altas de los antígenos particulados. El fenotipo de los linfocitos mostró dependencia de la forma física del antígeno y del tejido de origen de las células: En bazo, el antígeno particulado indujo el cambio mayor en la expresión de linfocitos TCD4+ (reducción en 50%) y el antígeno soluble en la de linfocitos BCD45R+ (incremento en 80%), en forma independiente de dosis de antígeno durante los primeros 30 días post-inmunización. En ganglio linfático solo el antígeno particulado en concentración alta estimuló respuesta apreciable: notable expresión temprana de linfocitos TCD8+ (incremento en 300%) que permaneció breve tiempo (7 días), aumento (en 80%) de la cantidad de linfocitos TCD4+ y reducción (en 42%) en la de linfocitos BCD45R+. Así, la respuesta inmune hacia *Nocardia brasiliensis* puede ser modulada por activación diferencial de subpoblaciones de linfocitos con antígenos solubles o particulados, en diferente concentración.

Firma del Asesor


Dr. Mario César Sálina Carmona