

INTRODUCCION

Los actinomicetos representan un conjunto de bacterias grande y diverso, ubicuos en la naturaleza. Como saprófitos del suelo participan en la descomposición del material orgánico y producen antibióticos y enzimas de valor industrial. Algunos son agentes de enfermedad en el hombre, los animales y las plantas. Aunque infrecuentemente reportados en la práctica clínica en el pasado, actualmente se reconocen como causa de morbilidad significativa que puede resultar en incapacidad y muerte, tanto en huéspedes inmunocomprometidos como en inmunocompetentes (1-7).

Los actinomicetos patógenos se han clasificado en 2 grupos generales, de acuerdo con la estructura química de su pared celular: aquéllos con pared celular "rara" (1), tipo IV, y los que carecen de tales componentes estructurales; a los primeros pertenece el género *Nocardia*. La pared celular tipo IV está compuesta de un péptidoglicano con ácido meso-diaminopimélico, un polímero de arabinosa-galactosa, ácidos micólicos complejos con longitud de cadena de 44 a 64 átomos de carbono, ácidos grasos saturados e insaturados, ácido 10-metil esteárico (tuberculoesteárico), fosfolípidos que incluyen difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilinositol-manósidos y, además, menaquinonas tetrahidrogenadas con 8 unidades isopreno o dihidrogenadas con 9 unidades isopreno. El porcentaje molar G+C del DNA está en el rango de 64 a 72 (1,3,4,7).

El género *Nocardia* y bacterias relacionadas, igual que los actinomicetos en general, son microorganismos saprófitos del suelo, donde desdoblan productos orgánicos complejos tales como celulosa, proteínas, polisacáridos, lípidos, parafinas y otras fuentes de carbono y energía. Es precisamente el suelo el reservorio principal de nocardias potencialmente patógenas para los seres vivos (1,3-5).

Algunas especies de *Nocardia* patógenas para el hombre se han detectado en polvo doméstico, arena de playa, tierra de jardín, agua de albercas y de la llave. Se han reportado como causa de infección en ganado bovino, en equinos, porcinos, caprinos, ovinos, en

diversos animales domésticos, silvestres y marinos. *N. asteroides* es la Nocardia patógena más comúnmente reconocida, aunque *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* también se han recuperado de infecciones en muchas de estas especies animales (3-6).

Las nocardias ocurren como patógeno primario en población sana y como patógeno oportunista en individuos con factores predisponentes. Contrario a la percepción general de que las infecciones humanas por nocardias son raras, se presentan en todo el mundo con cierta frecuencia, son de diagnóstico difícil y por lo tanto de incidencia subestimada, afectan a múltiples órganos y tejidos, frecuentemente no responden a la terapia y producen una alta tasa de incapacidad y mortalidad (1-4).

No hay manifestaciones clínicas específicas o patognomónicas de las infecciones por Nocardia. La enfermedad puede variar desde un proceso autolimitado, benigno o subclínico, no diagnosticado, hasta una infección aguda, agresivamente destructora, fulminante. Puede presentarse como un absceso crónico, una infección fibronodular crónica, o más raramente como un granuloma (2-4,8). De acuerdo a la vía de infección y subsecuente patología del huésped, las nocardiosis fueron agrupadas en 4 (ó 6 según Beaman) amplias categorías: nocardiosis pulmonar y sistémica, nocardiosis subcutánea y cutánea localizadas, infecciones linfocutáneas (o enfermedad esporotricoides) y actinomicetomas (3,4). En general la nocardiosis en cualquiera de sus formas se reconoce como una infección esporádica, adquirida en la comunidad; no obstante, las nocardiosis de origen hospitalario son cada vez más frecuentes, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Se han señalado como sitios de riesgo mayor las unidades de trasplante, de terapia oncológica y de enfermedades hepáticas, así como los quirófanos, almacenes y laboratorios de análisis clínicos (2-4).

Según Sandoval-Trujillo (1) tres especies de Nocardia causan la mayoría de las infecciones en el hombre: *N. asteroides* (al parecer más común en Estados Unidos y agente etiológico principal de las nocardiosis pulmonar y sistémica), *N. brasiliensis* (más frecuente en Brasil y México y agente causal predominante del micetoma actinomicetósico) y *N. otitidiscaviarum* o *N. caviae* (generalmente asociada a nocardiosis extrapulmonar, y sin predilección geográfica aparente). McNeil (4) considera que *N. transvalensis* también es patógeno importante para el hombre. En general, las infecciones por *N. asteroides* parecen ser de prevalencia mayor en las regiones templadas mientras que las causadas por *N. brasiliensis* predominan en las áreas cálidas, tropical y subtropical (1-4,7).

Nocardia brasiliensis es una bacteria aerobia, no móvil, con forma esférica, ovoide o cocobacilar, que mide aproximadamente de 0.5 a 1µm de diámetro y hasta 20µm de longitud y que tiende a formar cadenas o filamentos de células que pueden semejar al micelio fúngico; típicamente es Gram positiva y parcialmente ácido-alcohol resistente. Las colonias de la bacteria pueden tener una apariencia de superficie lisa o completamente irregular (de roseta de maíz), con pigmento que varía del gris, al amarillo, al naranja según el metabolito sintetizado (carotenoides, o tipo melarina). Pertenece al Orden *Actinomycetales*, a la Familia *Nocardiaceae*, al Género *Nocardia*, con más de 30 especies descritas; de acuerdo con los actuales métodos de análisis taxonómico (composición de su pared celular en aminoácidos y azúcares de péptidoglicanos, en ácidos grasos, particularmente ácidos micólicos, menaquinonas y fosfolípidos, así como constitución de su DNA), tiene muchas características en común con miembros de los géneros *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (1,3-5,7).

El micetoma es la manifestación clínica tardía (semanas o meses, incluso años) de una infección resultado de la inoculación traumática repetida en la piel y tejido subcutáneo, de un actinomiceto, comúnmente *N. brasiliensis* en nuestro medio; usualmente afecta a las extremidades inferiores. El proceso inicia con lesión ulcerativa subcutánea, localizada, frecuentemente sin dolor, que tiende a la cronicidad y progresa lentamente a daño mayor; se caracteriza por nódulos subcutáneos que semejan tumefacción de expansión lenta, con deformidad y fistulas que exudan líquido viscoso seropurulento y serosanguíneo que generalmente contiene partículas granulares ("gránulos") macroscópicamente visibles, de tamaño (cerca de un mm de diámetro) y color variables, y células inflamatorias que rodean las colonias microscópicas del organismo infectante. El estudio histológico de la lesión muestra infiltración de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, de linfocitos y de fagocitos mononucleares (MN) activados, así como fibroblastos que circunscriben la lesión (2,3,8,9).

Los micetomas, comúnmente progresivos, permanecen activos durante la vida del individuo causando tal daño que puede llegar a requerirse amputación del miembro afectado. No responden fácilmente a la quimioterapia y pueden resultar en significativo debilitamiento del paciente (2-4).

La incidencia mundial más alta de micetoma se localiza alrededor del Trópico de Cáncer, entre las latitudes 15°S y 30°N. Los países más afectados son India, Sudán, Senegal, Somalia,

Venezuela, Colombia, Brasil y México, entre otros (1,3-5). Según Beaman (3), de acuerdo con una estimación conservadora varios miles de personas cada año son infectadas con *Nocardia* en los Estados Unidos de Norteamérica y varios cientos de miles de infecciones ocurren en el mundo. En México se considera que el 98% de los micetomas es debido a actinomicetos, de los cuales el 86% corresponde a *N. brasiliensis*. Los estados de la República Mexicana con mayor reporte de casos son Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (1,5).

El interés científico por la patología y la patogenia asociadas a *N. brasiliensis* es reciente. En 1888 Rabe introdujo la exploración experimental de la patogenia de *N. asteroides* en el perro; en 1891 Eppinger empleó conejos y cobayos y, en 1956 se iniciaron los estudios con *N. brasiliensis* en ratones y cobayos. No fue sino hasta hace 20-25 años que se comenzó a adquirir información confiable de los mecanismos de patogénesis y de inmunidad del huésped en las infecciones por *Nocardia* (1,3,4). En los modelos animales se han reportado cepas de *Nocardia* notablemente virulentas, o resistentes a los agentes antimicrobianos así como condiciones de inmunosupresión o inmunodeficiencia del animal como factores predisponentes a la infección. También se tiene evidencia de resistencia natural del huésped animal a la enfermedad (3,4,9).

En ratones, la patogenia del micetoma por *N. brasiliensis* descrita por González-Ochoa en 1973, por Folb *et al.* en 1976 y por Ortiz-Ortiz y cols. en 1982 (1,9-13), comprende una respuesta inflamatoria inicial constituida predominantemente por infiltrado de leucocitos PMN. Una semana más tarde el sitio de inoculación (comúnmente cojinete plantar) muestra una reacción inflamatoria granulomatosa. Después de los 14 días aparece el micetoma característico con granuloma, pequeños abscesos con gránulos actinomicóticos, rodeados de numerosos granulocitos y restos celulares que forman un microabsceso. Los cortes histológicos revelan un anillo de histiocitos y granulocitos que circunscriben el microabsceso y, en una tercera zona excéntrica un infiltrado inflamatorio que contiene macrófagos con abundante citoplasma granular, linfocitos y células epiteliales y plasmáticas.

Para la defensa del huésped contra la infección por *Nocardia* se han propuesto como esenciales tanto los efectores de resistencia innata como los de inmunidad adquirida específica (2-4,9,11-15).

Resistencia Innata. La piel constituye la barrera física primordial contra *Nocardia*.

Estos organismos al parecer son incapaces de desarrollar infecciones cutánea y subcutánea sin ruptura de la integridad de la piel; más aún, las nocardias no permanecen en la piel sana por periodos extensos. Se sugiere que el moco secretado en las superficies internas del cuerpo bloquea la adherencia de nocardias a las células epiteliales, y que las bacterias atrapadas son eliminadas por acción de los cilios de células epiteliales, mediante el estornudo y la tos. Los fluidos corporales (lágrimas, saliva, secreciones nasales, orina) proporcionan una acción de lavado y una fuente de diversos productos microbicidas. La flora bacteriana normal suprime el crecimiento de *Nocardia* mediante producción de sustancias inhibitoras, competencia por nutrientes, bloqueo de los sitios de adherencia y favorecimiento de la activación no específica de las células fagocíticas del huésped (1-4).

Una vez que las nocardias rompen las barreras físicas y químicas del cuerpo encuentran fagocitos "profesionales", ésto es, neutrófilos y MN. A medida que la célula de *Nocardia* se vuelve adherente a la superficie, puede iniciar crecimiento, del cual, a su vez, resulta atracción de células fagocíticas. Si bien, las nocardias son fagocitadas con relativa facilidad, no siempre son destruidas (15-18) y, consecuentemente pueden desarrollarse especialmente dentro del macrófago. A medida que este proceso progresa se establece una respuesta inflamatoria con infiltración de PMNs, macrófagos y linfocitos; si la respuesta no es suficiente para impedir el crecimiento de *Nocardia*, se desarrolla una infección progresiva circunscrita a una lesión local, o diseminada (por vía hemática comúnmente) que afecta otras regiones del cuerpo (2-4,15-18).

Si bien, todas las cepas de *Nocardia* son fagocitadas, aún en ausencia de componentes séricos (particularmente anticuerpos y complemento), su destino intracelular depende de características propias de la cepa microbiana, (tales como el grado de virulencia y las condiciones metabólicas en el momento de ocurrir la fagocitosis), así como de la célula huésped. Con *N. asteroides* se ha observado que las cepas virulentas crecen rápidamente dentro de los fagocitos (y ocurre destrucción del macrófago infectado), mientras que las cepas menos virulentas pueden morir dentro del fagocito (en tanto que las sobrevivientes crecen intracelularmente), y que cepas de baja virulencia, y avirulentas, comúnmente mueren después de la fagocitosis. Con algunas cepas de *Nocardia* la pared celular es dañada y estas bacterias pueden persistir por largos periodos dentro del macrófago (1-4). Se ha señalado que las bacterias virulentas son tóxicas para los fagocitos ya que: inhiben la fusión fagosoma-

lisosoma, bloquean o neutralizan la acidificación fagosomal y modulan el contenido enzimático lisosomal. Cepas menos virulentas manifiestan capacidad intermedia para alterar tales actividades del fagocito mientras que las relativamente avirulentas no lo hacen (2-4,15-20).

Por otra parte, se sabe que macrófagos de distintos sitios anatómicos difieren en sus interacciones con Nocardia. Así, las células de Kupffer de ratones no inmunizados muestran capacidad menor para la fusión fagosoma-lisosoma y permiten el crecimiento de cepas de Nocardia de virulencia alta e intermedia, en tanto que los macrófagos de peritoneo y de bazo expresan capacidad mayor para fagocitar las células microbianas, para la fusión fagosoma-lisosoma y para la actividad nocardicida. Las cepas de virulencia alta e intermedia también crecen dentro de los macrófagos alveolares, no así las cepas relativamente avirulentas. En cuanto a los neutrófilos de sangre periférica, aunque fagocitan fácilmente células de Nocardia, las bacterias no son muertas, incluso las cepas virulentas crecen dentro de estas células huésped. De aquí se ha sugerido que los PMN retardan el crecimiento de Nocardia lo suficiente para permitir que los macrófagos se activen y muestren su capacidad microbicida contra la bacteria a través de los productos bacteriotóxicos del metabolismo oxidativo (radical superóxido, ión hidroxilo, oxígeno singulete y peróxido de hidrógeno), y la potente acción microbicida del haluro oxidado liberado durante la actividad de la mieloperoxidasa (2-4). Por lo tanto, para que el microorganismo crezca dentro del PMN debe ser capaz de bloquear, neutralizar o resistir el ambiente tóxico del neutrófilo. A este respecto se sugiere que cepas virulentas de *N. asteroides* que contienen altos niveles de catalasa citoplásmica y de una superóxido dismutasa (SOD) única asociada a superficie celular, y secretada, son protegidas por ambas enzimas de la muerte oxidativa por los PMN (20-22).

Inmunidad Adquirida anti-Nocardia. En humanos y en animales se han demostrado anticuerpos anti-Nocardia y respuesta de hipersensibilidad tardía hacia antígenos de la bacteria, después de infección por Nocardia, si bien su papel en la resistencia del huésped aún no es claro.

Respuesta Humoral. Diversos grupos de investigación, entre ellos nuestro laboratorio (14,24), han identificado inmunoglobulinas de los isotipos M, G y A, tanto en la infección experimental en animales como en la infección progresiva en humanos (2,3,13,14,23,24). Con estudios de inmunofluorescencia se han detectado anticuerpos en gránulos y células

plasmáticas de las lesiones de ratones infectados con *N. brasiliensis* a las 2 semanas y en suero a los 30-45 días post-infección (13,14). Sin embargo, la inmunización pasiva por inyección de sueros hiperinmunes a ratones no inmunizados, no ha conferido protección significativa contra el reto con células virulentas de *N. brasiliensis* (24-26), ni ha mostrado, *in vitro*, actividades opsonica o microbicida significativas en presencia o ausencia de neutrófilos, monocitos, macrófagos o complemento (no obstante la presencia de depósitos de C3 en el gránulo) (3,4,10,15,24,25); y no solo esto, sino que se ha generado controversia, así, diversos reportes indican que los anticuerpos pueden incrementar la enfermedad nocardica progresiva. En lesiones crónicas inducidas por Nocardia se han identificado cantidades elevadas de complejos antígeno-anticuerpo los cuales, se sugiere, exacerbaban la severidad y cronicidad de las lesiones y juegan algún papel en el extenso daño tisular característico (2,13,25,26). Así mismo, la presencia de anticuerpos fijadores de complemento a títulos altos en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* se ha asociado con lesiones tisulares más extensas, mala condición general y cronicidad, mientras que los títulos bajos se han detectado en pacientes con infección benigna (3,13,26). En ratones CBN (genéticamente deficientes en células B) en los cuales no se han identificado anticuerpos después de inmunización con células virulentas de *N. asteroides*, se ha demostrado mayor resistencia a la infección por Nocardia, que en ratones con respuesta humoral normal (2).

Ahora bien, puesto que se ha aislado un extracto de *N. brasiliensis* con efecto mitogénico y de activación policlonal para linfocitos B de ratón, al parecer independiente de linfocitos T (10,27,28), Beaman y McNeil (3,4) hacen notar que no obstante los títulos altos de anticuerpos que se encuentran en la recuperación de una infección o después de inmunización estándar, los anticuerpos realmente son escasos para el efecto que se pretende demostrar, y/o pueden estar dirigidos contra antígenos no relevantes a la virulencia o a la patogenicidad de la cepa de Nocardia de interés (3,4). Así, anticuerpos purificados para antígenos definidos de superficie celular, parecen ser protectores para el huésped: *in vitro*, IgG policlonal (de conejo) neutralizante de la actividad de SOD de Nocardia, incrementó en los PMN la muerte de células virulentas de *N. asteroides*, e IgM monoclonal (de ratón) neutralizante de la misma actividad, por transferencia pasiva aumentó la capacidad de los ratones para retardar el crecimiento de la bacteria (2,22).

Respuesta Celular. Contrario a las evidencias y opiniones sobre respuesta inmune

humoral y susceptibilidad o resistencia al desarrollo de nocardiosis y de micetoma, las evidencias y opiniones sobre la respuesta inmune mediada por células tienden a concordar en que la deficiencia en la inmunidad celular se acompaña de susceptibilidad mayor al desarrollo de nocardiosis y de micetoma progresivos. Los resultados de la investigación en diversos modelos animales indican que, así como para las bacterias y protozoarios intracelulares más conocidos, la inmunidad mediada por células es el mecanismo por el cual el huésped resiste la infección por *Nocardias* (2-4,11,12,15-19,26,29-32).

En 1953 González-Ochoa mostró que las *Nocardias* inducen no solo reacciones de hipersensibilidad inmediata, reportadas en 1943 por Drake y Henrici para *N. asteroides*, sino también de hipersensibilidad tardía (1-3); así mismo dió a conocer una prueba cutánea para el diagnóstico de micetoma por *N. brasiliensis* con la aplicación de antígenos que posteriormente utilizó en estudios epidemiológicos (1,3). A partir de 1963 los grupos de Bojalil-Jaber y de Dyson y Slack presentaron un conjunto de trabajos sobre la obtención de antígenos para el diagnóstico diferencial de micetoma (producido por *N. brasiliensis*) y de nocardiosis (por *N. asteroides*) mediante prueba cutánea de hipersensibilidad tardía (1-3), y en la década de los años 1970 Ortiz-Ortiz y cols. publicaron aportaciones semejantes para antígenos de *Nocardia* y de *Mycobacterium* (1,11,12). Los resultados de esta serie de trabajos fueron prácticamente los mismos: los antígenos obtenidos eran mezclas de proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos, inadecuados para diferenciar infección no sólo entre las distintas nocardias, sino también entre *Nocardia* y *Mycobacterium*. Entre 1967 y 1972 Kingsbury y Slack dieron a conocer su estudio sobre la inducción de reacción de transformación blastoide de linfocitos de cobayos sensibilizados con *N. asteroides*, para lo cual utilizaron una nocardina (péptido activo con lípidos y carbohidratos) aislada de *N. asteroides*, que en altas concentraciones presentaba reacción cruzada con cepas de *N. brasiliensis* y de *N. otitidiscaviarum* (1). En 1992 Salinas, Vera y Welsh (5,14) reportaron la identificación de 3 proteínas inmunodominantes de *N. brasiliensis* y el aislamiento de 2 de ellas con las cuales Salinas, Casillas y Welsh (23) desarrollaron un ELISA para detectar la presencia de anticuerpos séricos anti-p24 y anti-p26 de *N. brasiliensis*, ensayo que se ha constituido en una prueba diagnóstica de micetoma por *N. brasiliensis*. Estos antígenos, que el mismo grupo ha demostrado son inmunodominantes en el ratón, el conejo y el hombre (23,24), se emplean en nuestro laboratorio para inducir la transformación blastoide de

linfocitos de ratones primoinmunizados con diversos antígenos de *N. brasiliensis*.

A partir de la década de los años 1980 los investigadores han empleado con mayor frecuencia el estudio de Leishmaniasis como sistema modelo para evaluar la respuesta inmune mediada por células en infecciones por microorganismos intracelulares. Si bien es cierto *Leishmania* no es una bacteria, sí es un microorganismo que en una etapa de su ciclo de vida ocurre como forma intracelular obligada y que, además, desencadena una patología muy semejante a aquéllas relacionadas con nocardias y micobacterias (16,18,33-36). Los resultados en esta línea de investigación evidencian la actividad no solo de la población celular T como un todo, sino la participación diferencial de las subpoblaciones T en las distintas etapas del proceso infeccioso, al parecer en estrecha dependencia de las características físico-químicas de los estímulos antigénicos. Así, no solo las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+ son selectivamente activadas, sino también las subpoblaciones CD4-1 y 2 (Th1, Th2) o bien, las CD8 citotóxicas o CD8 supresoras, manifestándose en cada caso efectos característicos sobre la patología del mismo proceso infeccioso, que varían desde el proceso autolimitante, curativo, hasta el no limitante, progresivo. Para algunos microorganismos (*Plasmodium chabaudi chabaudi*, *P. falciparum*, *P. vinckei*, *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *T. pallidum*) el primer proceso se asocia con respuesta de células Th1 en tanto que el segundo lo está con la participación de células Th2 (15-19,32-38).

Aunque no se conoce información tan específica para el caso particular del micetoma producido por *N. brasiliensis*, en ratones y en ratas deficientes en células T se ha demostrado la importancia de esta población celular para proteger contra la infección, aguda o crónica, por Nocardia y microorganismos relacionados: Animales deficientes en células T infectados con *N. brasiliensis* desarrollan infección diseminada grave y persistente, mientras que en los normales ocurre infección localizada de menor duración (2-4,26,29); con *N. asteroides* se demostró en roedores deficientes en linfocitos T, sometidos a transferencia adoptiva de subpoblaciones celulares T obtenidas de animales normales inmunizados, incremento en la capacidad del huésped para eliminar las cepas virulentas de la bacteria (2). Mediante microscopía electrónica se observó adherencia de células de Nocardia a la superficie de la membrana de linfocitos T de ratones inmunizados, y daño en el pared celular de la punto de contacto de la bacteria previo a la lisis bacteriana; este mecanismo de

muerte directa por células T mostró ser específico para el microorganismo sensibilizante, independiente de anticuerpos e incrementable por primoinmunización *in vitro* de los linfocitos con fragmentos de pared celular de Nocardia (2,32).

Con *Rhodococcus equi*, microorganismo muy relacionado filogenéticamente con Nocardia, se demostró la eliminación de las bacterias de bazo, hígado y pulmones en el curso de 3 semanas en ratones normales, mientras que los atímicos fueron incapaces de hacerlo, y mediante agotamiento celular *in vivo* se mostró la participación de las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+ en la eliminación de las bacterias. Se observó que al abatirse únicamente la subpoblación CD8+ ocurría un incremento marcado de unidades formadoras de colonias de la bacteria en hígado y en bazo, por lo cual se sugirió que esta subpoblación de células T pudiera jugar un papel más importante en la erradicación de *Rhodococcus equi* que las células CD4+ (4). Para Nocardia, las observaciones en pacientes con SIDA apuntan en la misma dirección. En una reciente revisión del tema (4) McNeil señala que a pesar de la severa inmunodeficiencia celular característicamente encontrada en las personas infectadas con VIH, las infecciones oportunistas por especies de Nocardia no son frecuentes en ellas, no obstante la ubicuidad de estos microorganismos, y propone que "mecanismos inmunes específicos no celulares pueden ser activos contra estas infecciones, como si la deficiencia en células TCD4+ favoreciera la resistencia contra la infección por Nocardia, así como la proporción mayor de linfocitos TCD8+, además de los macrófagos y los factores humorales". Ivanyi, en 1993, ha señalado que "mientras que las células CD4+ podrían ser la fuente principal de IFN gamma (como representante de la activación de macrófagos), las células CD8+ podrían lisar, en forma restringida por moléculas MHC clase I, a los macrófagos superinfectados refractarios y liberar su contenido bacteriano para ser sometido por los macrófagos recién reclutados de la médula ósea, y por lo tanto con nueva actividad bactericida. Alternativamente las células CD8+ podrían mediar la protección por un mecanismo no restringido por MHC con participación de mediadores humorales con blanco en los macrófagos" (17).

Por otra parte, las evidencias experimentales señalan que la actividad de las células T no ocurre aisladamente. Ensayos *in vitro* con macrófagos alveolares de conejos normales e inmunizados mostraron que los macrófagos solos, aún activados, no mataban a las células ingeridas de cepas virulentas de *N. asteroides*, y que la actividad más efectiva ocurría cuando los macrófagos activados eran incubados con células T primoinmunizadas, además de suero

inmune y material de revestimiento alveolar (4). Para *Rhodococcus equi*, Hietala y Ardans encontraron que la actividad bactericida de los macrófagos se incrementa en presencia de factores derivados de linfocitos de sangre periférica sensibilizados *in vitro* con antígenos de superficie del microorganismo (4). A este respecto, el papel que las citocinas en general, y las linfocinas en particular, desempeñan en la respuesta inmune subsiguiente a la exposición a *Nocardia*, se desconoce, pero las evidencias con otros microorganismos indican que es mediante citocinas que se activan y suprimen las funciones de las diversas poblaciones de células que participan en los mecanismos de inmunidad (39-45). En una revisión reciente sobre inducción de respuestas de células T CD4+ Th1 y Th2 Constant y Bottomly citan que, mediante estudios *in vivo* e *in vitro* se ha estimado que se requieren tan solo unos días después del contacto con el antígeno para que una célula precursora Th sea destinada hacia un fenotipo efector particular, Th1 o Th2 (46).

Por lo tanto, elementos diversos y específicos de la respuesta inmune mediada por células, son necesarios para controlar un cierto proceso infeccioso, de tal manera que su éxito depende tanto de las características microbianas como de la capacidad de respuesta del huésped al patógeno. Es creciente la evidencia experimental que apoya las propuestas de que un cierto número de contactos entre grupos químicos particulares de la célula microbiana y de las células efectoras de la inmunidad determina los fenómenos moleculares y celulares subsecuentes, así como el éxito o el fracaso en el control de un proceso infeccioso. En general se acepta que son factores que influyen en la progresión de enfermedad por exposición a *Nocardia*: las características físicas, químicas y genéticas del microorganismo, su estado metabólico durante su permanencia en el huésped, su cantidad introducida al huésped y su vía de entrada al mismo; la susceptibilidad del huésped en el momento de la exposición a la bacteria, durante la colonización y el desarrollo de la misma, así como la capacidad de respuesta inmune, genéticamente determinada, del huésped (1-4,9,15,20-22,25-32). Por lo tanto, la investigación actual de la relación huésped/parásito ha llamado la atención a reconsiderar que factores tan elementales como tamaño, estado físico, cantidad, naturaleza química y características biológicas de los microorganismos en general, o de un antígeno o de un determinante antigénico particular, no solo afectan, sino que determinan los mecanismos mediante los cuales las defensas inmunes y naturales del huésped interactúan con el agente microbiano para su control y/o eliminación de los tejidos infectados (3,16-19,30-33,35,37-

61). Kjelström y Beaman para *Nocardia* (2,3), Nordmann *et al.* para *Rhodococcus equi* (3,4) y otros autores para diversos patógenos intracelulares (19,30,33,42,51,52,58) encontraron, en modelos animales, un hecho conocido desde el siglo pasado: que la vacunación con bacterias muertas o con algunos productos bacterianos confiere un grado de inmunidad menor, o no la confiere, con respecto a la vacuna de bacterias vivas. Por lo que respecta a las características físicas del antígeno, es clásico el ejemplo de la gamma-globulina como inmunógeno en su forma agregada o como tolerógeno en su forma soluble (51,52,58,59); así, un medio de uso común para tratar de incrementar la inmunogenicidad de un agente proteico es someterlo a calentamiento para favorecer la formación de agregados o bien, precipitarlo o adsorberlo a algún soporte para insolubilizarlo. Recientemente, durante la preparación de antígenos de *Streptococcus mutans*, Challacombe encontró que la inmunización por ingestión de antígenos estreptocócicos presentados como partículas (bacterias completas) inducía síntesis de anticuerpos secretorios y sensibilización sistémica, en tanto que en la forma soluble aunque inducía síntesis de IgAs provocaba tolerancia sistémica (61). Con antígenos de protozoarios en su forma nativa (particulados) y solubles, además de observarse este comportamiento variable en la respuesta de anticuerpos en función del estado físico del antígeno, se ha hecho aparente una selectividad en la activación de las subpoblaciones T, CD4+ y CD8+ (49,50,57). Otras evidencias al respecto han sido publicadas en una revisión reciente por Constant y Bottomly (46).

El efecto de la dosis de antígeno en la inducción de respuesta inmune no puede ser generalizado ni a todos los antígenos ni a todas las especies receptoras, en virtud de que ocurren variaciones considerables en la respuesta inmune según la cantidad de antígeno, las características del mismo y de la especie receptora. Aunque comúnmente las concentraciones bajas inducen tolerancia y las dosis altas parálisis inmunológica, el efecto de dosis de antígeno no es directamente predecible. Así, con dosis bajas de algunos antígenos lejos de inducirse tolerancia se logra la formación de cantidades pequeñas de anticuerpos de gran afinidad y especificidad alta para su antígeno o bien, la estimulación preferencial de células T (58); también se ha reportado que una cantidad aparentemente pequeña de antígeno puede ser rica en epítopes inmunodominantes y ejercer un verdadero efecto estimulante (46). Por otra parte, una dosis alta de algún antígeno en lugar de conducir a parálisis inmunológica, puede inducir síntesis de anticuerpos de baja afinidad y especificidad, o bien, en el curso del tiempo puede

dar lugar a una respuesta inmune efectiva (62). En 1964 Mitchinson demostró que la inyección repetida a ratones adultos de albúmina sérica de bovino (ASB) en dosis inferiores a las inmunogénicas, podía provocar estado de tolerancia; resultados similares se observaron con seroalbúmina humana en conejo y con flagelina en ratón (58). Por su parte, Mond y cols. en un esquema de inmunización de una sola dosis de gamma-globulina bovina dinitrofenilada (DNP-BGG) encontraron que si bien la afinidad del anticuerpo era inversamente proporcional a la dosis de antígeno empleada, la afinidad mejoraba con el tiempo de manera que las dosis mayores de antígeno finalmente resultaban en cantidades importantes de anticuerpos de alta afinidad en comparación con las dosis más pequeñas (62-64). Parish y Liew al primoinmunizar ratas con dosis altas de flagelina indujeron respuestas humorales mientras que con dosis bajas despertaron inmunidad mediada por células (46). Bretscher *et al.* por inyección de ratones BALB/c con una cantidad pequeña (10^2 unidades) del parásito *L. major* indujeron respuesta de hipersensibilidad tardía que disminuía al aumentar el número de parásitos (10^6) (46). Desde la década de los años 1970 Unanue identificó una relación directa entre la captación de antígeno por el sistema fagocítico y el grado de la respuesta inmune, de manera que cambios en la molécula antigénica que aumentaban o disminuían la captación del antígeno por los fagocitos, resultaban en respuesta inmune superior o inferior respectivamente (65). Los trabajos de glicosilación de antígenos y de identificación de los receptores respectivos en las células presentadoras de antígeno (CPA) confirmaron los hallazgos de Unanue y permitieron a los autores concluir que una dosis pequeña de un antígeno rico en grupos que facilitan la fagocitosis puede ejercer el mismo efecto que una dosis mayor con un número menor de grupos de reconocimiento por las CPA (46,57,66). Por otra parte, con el descubrimiento de las linfocinas un nuevo efecto se ha asociado a dosis de antígeno; Seder y Paul en su revisión sobre adquisición de un fenotipo productor de linfocinas por células TCD4+ (45), citan que la dosis de antígeno es un factor que influye en la determinación del fenotipo celular productor de un cierto patrón de linfocinas, particularmente en las células TCD4+ tipos 1 y 2.

Por lo tanto, no hay una cantidad fija, predeterminada, de antígeno soluble o particulado para todos los potenciales inmunógenos, menos aún para los diferentes sistemas inmunocompetentes. Recientemente se ha propuesto, con base en la evidencia experimental, que el concepto de dosis debe referirse a la cantidad del epítope que al cubrir un número

crítico de receptores químicamente específicos desencadena la respuesta total de la célula de interés (61).

Dadas, la importancia clínica de *N. brasiliensis* como agente etiológico de micetoma actinomicótico en el hombre y la escasa información sobre la bacteria y su huésped, en el contexto previamente expuesto, en el presente trabajo de tesis se propuso evaluar el efecto que la dosis de antígeno y la forma física, soluble o particulada, del mismo ejercen sobre la capacidad de producción de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* circulantes en sangre, sobre la capacidad de respuesta de linfocitos hacia la bacteria y sobre el fenotipo de tales linfocitos, en un modelo experimental, ratones BALB/c.

HIPOTESIS

**LOS ANTIGENOS PARTICULADOS DE *Nocardia brasiliensis*,
BACTERIAS COMPLETAS, INDUCEN MAYOR RESPUESTA
INMUNE TANTO HUMORAL COMO CELULAR,
QUE EL ANTIGENO SOLUBLE, EN FORMA
DEPENDIENTE DE LA DOSIS**

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

**DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LA DOSIS Y DEL ESTADO SOLUBLE
O PARTICULADO DEL ANTIGENO EN LA RESPUESTA INMUNE
CONTRA UNA FRACCION INMUNODOMINANTE DE
Nocardia brasiliensis
EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1. Obtener los Antigenos de *N. brasiliensis*.**
 - 1.1 Particulados :**
 - 1.1.1 *N. brasiliensis* Muerta por Calor.**
 - 1.1.2 *N. brasiliensis* Muerta por Radiación U.V.**
 - 1.2 Solubles:**
 - 1.2.1 Extracto Celular Crudo (EC)**
 - 1.2.2 Fracción Inmunodominante (fID)**
- 2. Cuantificar la Respuesta de Anticuerpos anti-fID en el Suero Proveniente de**

Ratones BALB/c, a Diferentes Tiempos de la Inmunización con las Distintas Dosis de los Antígenos Soluble y Particulados de *N. brasiliensis*.

3. Determinar la Dosis Óptima de fID para Inducir *in vitro* la Respuesta Proliferativa de Linfocitos Provenientes de Ratones BALB/c Inmunizados con los Antígenos Soluble y Particulados de *N. brasiliensis*.

4. Estudiar la Cinética de la Respuesta Proliferativa de Linfocitos de Bazo y de Ganglio Linfático Poplíteo Provenientes de Ratones BALB/c Inmunizados con Diferentes Dosis de los Antígenos Soluble y Particulados de *N. brasiliensis*.

5. Identificar, Antes y Después del Reto Antigénico *in vitro*, las Poblaciones de Linfocitos TCD4+, TCD8+ y BCD45R+, Provenientes de Ratones BALB/c Inmunizados con Diferentes Dosis de los Antígenos Soluble y Particulados de *N. brasiliensis*

MATERIAL Y METODOS

1. Material Biológico.

1.1 Animales de Experimentación. Se utilizaron ratones cepa BALB/c, hembras y machos de 12 a 16 semanas de edad, del bioterio del Depto. de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL, derivados a su vez de la cepa BALB/c de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH, Bethesda MD). Fueron alimentados *ad libitum* con agua y nutricubos para roedores.

1.2 Antígenos. Los antígenos fueron obtenidos de subcultivos de la cepa "Hospital Universitario José Eleuterio González-1" (HUJEG-1) de *N. brasiliensis*. La cepa se aisló de las lesiones de un paciente con micetoma dorsal, se identificó mediante pruebas bioquímicas en el Depto. de Microbiología del mismo Hospital y fue confirmada por la Dra. June Brown en los Centros de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica (CDC, Atlanta GA). La cepa se conserva en nuestro laboratorio mediante pases en agar-dextrosa Sabouraud (Bioxon).

2. Obtención de los Antígenos de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1.

2.1 Obtención de Suspensión Unicelular de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 (67). Con colonias de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 conservada en medio de cultivo agar-dextrosa Sabouraud se inoculó caldo infusión cerebro corazón (BHI, DIFCO), en volúmenes de 30ml contenidos en matraces Erlenmeyer de 125ml de capacidad. Después de 48 horas de incubación a 37°C, en agitación continua (Dubnoff Metabolic Shaking Incubator, GCA/Precision Scientific), se transfirió el contenido de los matraces a tubos cónicos de 50ml de capacidad, se recuperó la masa bacteriana por centrifugación durante 10 min a 1500xg (centrífuga Beckman modelo TJ-6), se lavó con solución salina estéril (s.s.e., cloruro de sodio 0.85% p/v) y se disgregó con agitador de vidrio. Con alícuotas de 0.2ml de esta suspensión bacteriana se inocularon volúmenes de 30ml de BHI contenidos en matraces Erlenmeyer de 250ml de capacidad; después de un periodo de

incubación igual al anterior, se lavó la biomasa con s.s.e., se resuspendió con 10ml de s.s.e. y se disgregó a nivel unicelular mediante 4 pases en homogenizador Potter-Elvehjem. Se comprobó el grado de disgregación mediante observación al microscopio de luz (con objetivo 100x) de una alícuota teñida según el procedimiento de Kinyoun (68). Por otra parte, se estimó densidad celular de la suspensión de *N. brasiliensis* por determinación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el micrométodo de Miles y Misra (69) y por medición de turbidez (densidad óptica) a 325nm (espectrofotómetro Beckman modelo DU-6).

Todo el trabajo se efectuó en esterilidad y los productos de desecho, sólidos y líquidos, fueron esterilizados antes de ser reutilizados o eliminados.

2.1.1 Tinción de Kinyoun (68). En un portaobjetos se preparó una extensión de la suspensión de *N. brasiliensis*, y se fijó con calor suave; una vez a la temperatura ambiente, se cubrió con carbol-fucsina de Kinyoun (ver apéndice), durante 5 min. Se eliminó el exceso de colorante, se cubrió con etanol (Baker) al 50% e inmediatamente se lavó con agua. Se decoloró con ácido sulfúrico (CTR) al 1% (en agua) y se lavó inmediatamente con agua. Para contrateñir se cubrió con solución de azul de metileno (ver apéndice), durante un minuto y se lavó con agua. Se dejó secar al ambiente y se examinó con objetivo 100x (microscopio Karl Zeiss).

2.1.2 Micrométodo de Miles y Misra (69). Con alícuotas de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* se prepararon diluciones seriadas 1:10, en s.s.e. En la superficie de una placa de agar granulado (BBL) 2% p/v en BHI se depositaron 3 alícuotas de 20µl de cada una de las diluciones de la bacteria, en cada placa 2 muestras (diluciones) distintas. Después de 3 días de incubación a 37°C (Incubadora Microbiológica J.M.Ortiz, México), se registró el número de UFC presentes en cada alícuota (con ayuda de un cuenta colonias Quebec Darkfield, Reichert-Jung) y se estimó la cantidad de UFC/ml por multiplicación del número promedio de colonias desarrolladas en las 3 alícuotas de una misma dilución por 50 (factor de volumen de muestra) y por el factor de dilución.

2.1.3 Método de Vaciado en Placa (70). De una suspensión unicelular de *N. brasiliensis* se prepararon diluciones seriadas 1:10, en s.s.e. En caja Petri estéril se

mezclaron, con la mayor homogeneidad posible, un ml de una dilución de la bacteria y 18ml de agar-BHI líquido; lo mismo se hizo con cada una de las restantes diluciones de la serie. Una vez solidificado el medio las placas fueron incubadas a 37°C por 3 días. El número de colonias en cada placa se contó con ayuda de un cuenta-colonias (Quebec Darkfield Colony Counter, Reichert-Jung), y la cantidad de UFC/ml se determinó por multiplicación del número promedio de colonias desarrolladas en una superficie de un cm² por el área de la placa utilizada.

2.1.4 Medición de la Turbidez.

2.1.4.1 Densidad Óptica. Se determinó la longitud de onda de máxima densidad óptica (D.O.) de las suspensiones de *N. brasiliensis* con un volumen de 3ml de una dilución 1:100 en s.s.e. de una suspensión unicelular de la bacteria, recién obtenida; se registraron sus valores de D.O. a diferentes longitudes de onda en el rango de 300 a 800nm. Posteriormente las determinaciones de D.O. de las distintas diluciones de las suspensiones de *N. brasiliensis* se efectuaron a 325nm, longitud de onda de mayor D.O.

2.1.4.2 Nefelometría. De una suspensión unicelular de *N. brasiliensis* se preparó en s.s.e. una serie de diluciones 1:10, desde 1:10 hasta 1:10⁹. De cada dilución se transfirieron volúmenes de 700µl a celdas del nefelómetro (Nefelómetro Laser, Behring), para medir la turbidez de la suspensión celular en función del voltaje registrado por el nefelómetro.

2.2 Obtención de los Antígenos Particulados de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1.

2.2.1 Obtención de *N. brasiliensis* Muerta por Calor (24). Alicuotas de suspensión unicelular de la bacteria de densidad celular conocida fueron sometidas a el autoclave (NAPCO modelo 9000-D), 121°C, 15lb/pulg², 20 min. La ausencia de viabilidad (prueba de esterilidad) se determinó mediante cultivo de muestras tratadas y control, tanto en medio sólido (agar-BHI) como líquido (caldo BHI), inmediatamente después del tratamiento y cada 5 días durante un mes.

2.2.1.1 Determinación de Peso Seco y de Proteína en la Dosis 10⁹ UFC de Antígeno Particulado *N. brasiliensis* Muerta por Calor. En recipientes de papel aluminio, de

peso conocido (llevados a peso constante por calentamiento a 90°C durante 2 horas), se colocaron alícuotas de 100µl de paquete de células de *N. brasiliensis* muerta por calor, que contenían 3.307×10^9 UFC de la bacteria, y se sometieron a tratamiento para determinación de peso seco: calentamiento a 90°C por períodos de 2 horas hasta obtener peso constante. En fracciones de este producto se llevó a cabo la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (71).

2.2.1.2 Deslipidización del Antígeno Particulado *N. brasiliensis* Muerta por Calor.

La suspensión unicelular de *N. brasiliensis* fue sometida a extracción sucesivamente con etanol/éter etílico 1:1, 1:2 y 1:3 (sección 2.3.1 de material y métodos); se dejó secar a la temperatura ambiente.

2.2.2 Obtención de *N. brasiliensis* Muerta por Radiación Ultravioleta.

Con suspensiones unicelulares de *N. brasiliensis* de diferente densidad celular se probaron varias condiciones de tratamiento tales como tiempo de radiación, densidad y volumen de la suspensión de células de la bacteria; el efecto de la radiación se estimó por comparación a simple vista del desarrollo, en medio sólido, de colonias de la bacteria en muestras radiada y no radiada, asignándose 5+ al desarrollo del control, muestra no radiada (tablas Nos.2-5). Se definió el siguiente procedimiento: alícuotas de suspensión unicelular de la bacteria con densidad celular en el rango de 1.5 a 2.0 unidades de D.O. a 325nm, se dispersaron en el fondo de recipientes de boca ancha con formación de una capa rectangular de líquido de 2-3mm de espesor; los recipientes, sin tapa, fueron colocados en una cámara para radiación U.V. (Salones de Belleza y Equipos, S.A., México) , 8.5cm abajo de la lámpara (lámpara cilíndrica de 22 watts, de 40.5cm de longitud y 2.2cm de diámetro), emisora de longitud de onda entre 250 y 265nm. Las suspensiones celulares fueron radiadas en estas condiciones durante 90 min a fin de obtener 100% de muerte celular. La ausencia de viabilidad se determinó mediante cultivo de muestras de la suspensión radiada, en medios sólido (agar-BHI) y líquido (caldo-BHI) en diferentes tiempos después del tratamiento, durante un mes.

2.3. Obtención de los Antígenos Solubles de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1.

2.3.1 Extracto Celular Crudo (E.C.) (67). Con la suspensión unicelular de *N.*

brasiliensis se inoculó caldo BHI contenido en matraces Erlenmeyer de un litro, 400µl de suspensión bacteriana/160 ml de BHI estéril. La incubación se llevó a cabo a 37°C por 7 días, en condiciones estacionarias. Concluido el período de desarrollo del cultivo, la biomasa se cosechó en embudo Büchner, sobre papel filtro previamente pesado y esterilizado; ahí mismo se lavó con agua destilada estéril, a temperatura de 40-45°C. En seguida se deslipidizó suspendiéndola en exceso, primero de etanol-éter etílico (Baker) 1:1, en seguida 1:2 y finalmente 1:3; cada mezcla de solventes se agregó cuantas veces fue necesario para que el extracto respectivo resultase incoloro. Se dejó secar en el mismo embudo, cubierto con una delgada película de plástico perforada, y finalmente se transfirió en el papel filtro a desecador a vacío. En mortero estéril, la biomasa seca se mezcló con un volumen igual de polvo de vidrio estéril y se sometió a trituración y pulverización durante 90 min. El producto fue mezclado en matraz Erlenmeyer de 250ml con amortiguador Tris-HCl (Sigma) 10mM, Acetato de magnesio (Mallinckrodt) 10mM, pH 7.4, en una relación de 15ml de amortiguador por cada gramo de peso seco; se dejó en agitación a 4°C durante 12 horas. Se centrifugó en tubos cónicos de 50ml durante 30 min a 1500xg (centrífuga Beckman TJ-6), se recuperaron los sobrenadantes (extractos) y los sólidos fueron sometidos una vez más al mismo proceso de extracción. Los extractos fueron centrifugados a 144,000xg (rotor tipo 70Ti, ultracentrífuga Beckman L8-60M) durante 3 horas a 4°C. En seguida el extracto fue dializado (membrana Sigma 250-90, 12-14 kDa) contra agua por 12 horas a 4°C y liofilizado (Freeze Mobile 12 VirTis, Gardiner NY). La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el procedimiento de Bradford (71).

2.3.1.1 Determinación de Proteína por el Procedimiento de Bradford (71). Un estándar de albúmina sérica de bovino (Sigma) de concentración un mg/ml de agua, fue diluido 1:50. Se construyó una curva de calibración con concentraciones del estándar de proteína de 2 a 18 µg/ml, que se llevaron a un volumen final de 500µl con agua y que se hicieron reaccionar con 500µl de reactivo de Bradford (ver apéndice). Transcurridos 30 min a temperatura ambiente se registró la absorbancia a 595nm.

2.3.1.2 Insolubilización del E.C. (72,73). A 10mg de proteína de E.C. disueltos en un

ml de PBS 0.1M, pH 7 (ver apéndice), se les mezcló poco a poco 120µl de glutaraldehído 25% (Sigma) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Se lavó con PBS 0.1M, pH7 por centrifugación a 3200rpm durante 20 min, se incubó con PBS/glicina (Sigma) 200mM durante una hora en agitación, se lavó en PBS y se resuspendió en el volumen adecuado de s.s.e. para aplicarse en el protocolo de inmunización.

2.3.2 Fracción Inmunodominante (fID) (67). En este trabajo llamamos fID al extracto de *N. brasiliensis* enriquecido en el antígeno inmunodominante, previamente (23,24,67) denominado extracto semipurificado. Para obtener la fID, 50mg de proteína (Bradford) de E.C. de *N. brasiliensis* disueltos en 12ml de PBS 0.1M, pH 7.2, fueron transferidos a matraz Erlenmeyer de 50ml en hielo donde se mezcló gota a gota y en agitación constante, con un volumen igual de sulfato de amonio (Baker) saturado, pH 7.2. Después de 30 min en agitación, a 4°C, la mezcla se centrifugó a 3200rpm por 30 min y se dializó el sobrenadante (SN) contra solución salina isotónica (s.s.) hasta eliminar sulfato de amonio (prueba con cloruro de bario); se estimó cantidad de proteína por Bradford, se dializó y luego se liofilizó. El SN liofilizado se resuspendió en un ml de PBS 0.1M, pH 7.2 y se incubó por 2 horas a 37°C con DNasa I, un µg de enzima por mg de proteína (DNasa I, EC 3.1.21.1 de páncreas de bovino, Sigma). Concluida la digestión con DNasa se centrifugó a 3200rpm por 5 min y el SN se dializó contra agua, por 24 horas a 4°C, se mezcló con glicerol (concentración final 5% v/v, Sigma) y se centrifugó a 3200rpm por un min. El SN se aplicó a columna de Sephadex G-100, previamente calibrada, de donde fue eluido con PBS 0.1M, pH 7.2 a una velocidad de flujo de 0.5ml/min; se colectaron fracciones de 2ml, en las cuales se midió absorbancia a 280nm, se cuantificó proteína por Bradford y se efectuó análisis electroforético en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración (10-18%T) y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para seleccionar las fracciones que contenían fID de *N. brasiliensis*. Tales fracciones se mezclaron, se estimó concentración de proteína (Bradford), se dializaron y se liofilizaron.

2.3.2.1 Calibración de la Columna con Sephadex G-100 (67). Una columna de vidrio (Wheaton Scientific) de 23 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro interno (volumen

de 112.90ml) se empacó con Sephadex G-100 (límite de exclusión para proteínas 150kDa de peso molecular promedio, Pharmacia Fine Chemicals), previamente hidratado y estabilizado con PBS 0.1M, pH 7.2. Se determinó volumen vacío (V_0) de la columna por aplicación de dextrán azul (peso molecular 2,000kDa, Sigma), así como volumen de elución (V_e) de 3 estándares de peso molecular: Citocromo c (12.4kDa, Sigma), Anhidrasa carbónica (29kDa, Sigma), Alcohol deshidrogenasa (150kDa, Sigma).

2.3.2.2. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (67). La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (74) con las modificaciones siguientes: Se utilizó gel concentrador al 5%T, 2.7%C y gel de separación en gradiente 10-18%T, 2.7%C (ver apéndice); los geles fueron construídos en los moldes del equipo de electroforesis Mini-Protean II (BIO RAD) con ayuda del formador de gradiente BIO RAD modelo 385, y pre-corridos a 50 volts por 20 min (fuente de poder BIO RAD modelo 1000/500). Como amortiguador de corrimiento se utilizó Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3 (reactivos Sigma). Las muestras (volúmenes no mayores de 40 μ l) se mezclaron en proporción 3:1v/v, con amortiguador de muestra 4x que contenía SDS y 2-mercaptoetanol (ver apéndice) y se sometieron a calentamiento en agua a ebullición por 2 minutos, los marcadores de peso molecular (7H, Sigma) sólo por un minuto; en seguida fueron aplicadas en el gel (pre-corrido), se agregó el amortiguador de corrimiento (ver apéndice) y la electroforesis se efectuó a 80 volts durante una hora y luego a 150 volts por 3.5 horas, corrimiento de la muestra en el gel concentrador y en el gel de separación respectivamente. Una vez retirado el gel de su molde fue revelado con azul de Coomassie y/o con tinción argéntica. La banda correspondiente a la fID de *N. brasiliensis* fue identificada con referencia a los marcadores de peso molecular: Albúmina sérica bovina 66kDa, Ovalbúmina 45kDa, Gliceraldehído-3P deshidrogenasa 36kDa, Anhidrasa carbónica 29kDa, Tripsinógeno 24kDa, alfa-Lactalbúmina 14kDa (reactivos Sigma).

2.3.2.2.1 Tinción de Coomassie (67). Se sumergió el gel en azul de Coomassie R (azul de Coomassie R, Sigma, al 0.1% p/v en metanol, Baker, 40% v/v, ácido acético, Baker, 10% v/v), durante 30 min en movimiento suave. Se retiró el colorante y se agregó

solución para desteñir (metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v) en cantidad suficiente para eliminar el exceso de colorante. Finalmente se transfirió a agua destilada.

2.3.2.2.2 Tinción Argéntica (67). Se sumergió el gel en solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acético glacial 12% v/v) durante 20 min. Se retiró la solución fijadora y se efectuaron 3 lavados de 10 min cada uno, con etanol 10% v/v, ácido acético glacial 5% v/v. Se colocó en solución oxidante (dicromato de potasio 3.4mM, ácido nítrico 3.22mM) durante 5 min y se lavó 3 veces, 10 min cada vez, con agua. Se sumergió en solución de nitrato de plata (AgNO_3 12mM en agua) inicialmente durante 5 min en presencia de luz intensa y posteriormente 25 min en presencia de luz normal. Se retiró la solución de plata y se agregó solución reveladora (carbonato de sodio 0.28M, formol 0.125ml, disueltos y aforados a 250ml de agua) en presencia de luz intensa hasta aparición de las bandas; rápidamente se retiró la solución reveladora y se añadió ácido acético 1% v/v para detener la reacción.

Los geles fueron conservados en glicerol (Sigma) 10% v/v o bien, deshidratados (secador de geles Ephortec).

3. Determinación del 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.

3.1 Inmunización de Ratones BALB/c. En todos los casos la vía de administración del antígeno fue subcutánea, en un cojinete plantar trasero, aplicándose cada antígeno por una sola ocasión. Los ratones no recibieron tratamiento especial ni antes ni después de la *inmunización*.

Los antígenos y sus dosis fueron:

a. *N. brasiliensis* muerta por calor, 10^3 , 10^7 , 10^9 UFC/70 μl s.s.e. Se inmunizaron 30 ratones con cada una de las dosis y en cada muestreo (a los 7, 15, 30, 90 y 150 días post-inmunización) se procesaron 5 ratones de cada dosis.

b. *N. brasiliensis* muerta por radiación U.V., 10^3 , 10^7 , 10^9 UFC/70 μl s.s.e. Se procedió igual que con la bacteria muerta por calor.

c. E.C. de *N. brasiliensis*, 5, 40, 100 y 300µg de proteína/60 µl s.s.e. Se procedió igual que con los 2 antígenos anteriores.

Cada grupo en tratamiento tuvo un grupo control (además del tiempo cero): ratones sin tratamiento inyectados con 70µl de s.s.e. (s.c. en cojinete plantar trasero).

3.2 Determinación del Efecto de la Concentración y del Estado Físico de Antígenos de *Nocardia brasiliensis* en la Respuesta Humoral.

3.2.1 Cuantificación por ELISA de Anticuerpos Séricos anti-fID de la Bacteria (67).

3.2.1.1 Obtención de Suero. De ratones inmunizados y sin inmunizar (inyectados con s.s.e.), se extrajo sangre mediante punción cardíaca, los días asignados por el protocolo de muestreo; el suero se obtuvo por centrifugación a 1500xg por 5 min y se conservó a -20°C hasta su análisis.

3.2.1.2 Desarrollo del ELISA. La fID (fracciones p24 y p26) de *N. brasiliensis* se unió a placas de poliestireno (pozos fondo plano de 300µl de capacidad, Costar EIA-RIA), mediante la adición a cada pozo de reacción de 0.5µg de proteína de fID en 200µl de amortiguador de acetatos pH5 (ver apéndice) e incubación por 24 horas a 4°C; se lavó con PBS-tween (ver apéndice) 3 veces, 10 min cada vez.

La placa con el antígeno fID, después del último lavado (inciso anterior), recibió 200µl/pozo de solución bloqueadora (ver apéndice) y se incubó a 37°C por 2 horas. Se lavó con PBS-tween, a temperatura ambiente, por 3 veces (2 durante 5 min cada una y la tercera durante un minuto). Se adicionó a cada pozo de reacción 200µl de suero de ratón en estudio diluido 1:50 con solución bloqueadora y se incubó a 37°C durante una hora. Se lavó con PBS-tween por 5 veces (2 durante 5 min cada una y 3 de un min cada una). Se agregó a cada pozo de reacción 200µl de antisuero conjugado a peroxidasa (ver apéndice) y se incubó a 37°C por una hora. Se lavó con PBS-tween por 3 veces (una de 5 min y 2 de un min cada una). La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con solución substrato/cromógeno, 160µl por pozo (ver apéndice), por incubación durante 30 min, en obscuridad, a temperatura ambiente. La reacción se dió por terminada con la adición de 40µl/pozo de ácido sulfúrico 1N. El resultado se obtuvo en unidades de absorbancia a 492nm (DIA MEDIX BP-96 Microassay Reader). Como controles se utilizaron sueros de

ratones con micetoma y no inmunizados, así como los controles de reactivos (reacción en ausencia de solución bloqueadora, en ausencia de suero y en ausencia de antisuero conjugado).

3.3. Determinación del Efecto de la Concentración y del Estado Físico de Antígenos de *N. brasiliensis* en la Respuesta Celular.

3.3.1 Ensayo de Respuesta Proliferativa de Células de Bazo y de GLP.

3.3.1.1 Obtención de Suspensiones de Células de Bazo y de GLP de Ratones (75,76). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y en condiciones de asepsia se extrajeron bazo y GLP recibiéndose en un frasco de vidrio con 5ml de medio de cultivo RPMI o Iscove para transporte, estéril, (ver apéndice). En condiciones de esterilidad se disgregaron los órganos, con ayuda de un cedazo y un émbolo de plástico, en caja Petri que contenía 5ml de medio de cultivo Iscove para suspensión celular (ver apéndice); se transfirió la suspensión celular a tubo cónico de 15ml de capacidad, que contenía 5ml de medio para suspensión celular y se centrifugó por 5 min a 500xg, 4°C (centrífuga Beckman modelo TJ-6). Se lavaron las células con el medio, en iguales condiciones de centrifugación, y se resuspendieron con el mismo medio: a un volumen de 3ml las células de bazo y de un ml las de GLP. Una alícuota de la suspensión celular se diluyó 1:50 con ácido acético al 2% v/v en agua (que contenía 0.1% p/v de azul de metileno, Sigma), se contó el número de células (con ayuda de un hematímetro y microscopio de luz, objetivo 10x) y se estimó la densidad celular. En otra alícuota de la suspensión celular se efectuó prueba de viabilidad celular mediante incubación por 10 min con azul tripano (Sigma) 0.2% p/v en PBS 0.1M, pH 7.2.

3.3.1.2 Respuesta Proliferativa a Mitógenos y Antígenos, de Linfocitos de Bazo y de GLP de Ratones (75,76). El ensayo se llevó a cabo mediante cultivo de las células en pozos de fondo plano, de 300µl de capacidad (placas de poliestireno tratado para cultivo celular, Corning 25860), de la siguiente manera: En cada pozo se colocaron 200µl de medio RPMI para cultivo (ver apéndice) que contenían 2×10^5 células y 0.5µg de Concanavalina A (DIFCO) ó 0.6µg de fID de *N. brasiliensis*; se dejaron en incubación a 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa, (incubadora NAPCO),

durante 3 ó 5 días según se tratase de cultivo con mitógeno (testigo positivo del ensayo de proliferación celular), o con antígeno y 18-20 horas antes de concluir el período de cultivo se adicionó a cada pozo 1 μ Ci de timidina tritiada (metil-tritio/timidina con actividad específica de 5.0Ci/mmol, Amersham). Los microcultivos fueron recuperados con ayuda de una microcosechadora (Mini-Mash, M.A.Bioproducs, cat.23-500) en filtros de papel especial (Mini-Mash glass fiber filter No.23-994, grade 934 AH) para cuantificación de emisión beta, la cual se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido (Beckman, LS 6000 TA). Cada microcultivo se efectuó por triplicado y para cada suspensión celular se preparó un triplicado sin estímulo celular (ni mitógeno, ni antígeno), así que el resultado se expresó como el cociente de las cuentas por minuto (cpm) promedio de cada triplicado en presencia y en ausencia del estímulo (Índice de Estimulación).

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 (77,78). De cada suspensión celular con viabilidad mayor al 90%, (procedente directamente del ratón o bien, de un cultivo celular), se depositaron en tubos de vidrio (de 12x75 mm) contenidos en un recipiente con hielo, 5x10⁶ células mononucleares; se mezclaron con solución de lisis de eritrocitos (ver apéndice) y después de 5 min a temperatura ambiente se recuperaron las células mononucleares libres de glóbulos rojos (mediante centrifugación por 4 min) y se lavaron con 2ml de Iscove (Sigma). Las células se incubaron con 0.5ml de suero normal de cabra (Sigma) al 10% v/v en Iscove, durante 10 min a 4°C; se centrifugaron y se lavaron con 1.5ml de Iscove. La reacción con los anticuerpos anti-CD conjugados a fluorocromo (ver apéndice) se efectuó en los tubos especiales para citometría (Becton Dickinson) que contenían en 100 μ l de Iscove 4-5x10⁵ células (con viabilidad mayor a 90%) y 0.25 μ g de anticuerpo anti-CD/fluorocromo; después de incubar en obscuridad durante 30 min a 4°C, se agregó a cada tubo de reacción 2ml de Iscove, se recuperaron las células por centrifugación, se lavaron con 1 ml de Iscove y se resuspendieron con 0.5ml de paraformaldehído (Merck) al 2% v/v en PBS 0.1M, pH 7.2. La identificación de las distintas poblaciones de linfocitos se efectuó en un citómetro de flujo (FACSort B0273, Becton Dickinson) previamente calibrado con las partículas

fluorescentes específicas para ello (CaliBrite Beads, Becton Dickinson), con los anticuerpos fluorescentes indicadores de unión inespecífica (Sigma) y con las células en estudio, sin marcador fluorescente, como control de autofluorescencia.

4. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con las pruebas t de student y ANOVA. La comparación entre los 2 procedimientos utilizados para contar UFC de *N. brasiliensis* se efectuó mediante la prueba de Wilcoxon (de 2 colas).

RESULTADOS

1. Obtención de los Antígenos de *Nocardia brasiliensis* Cepa HUJEG-1.

1.1 Antígenos Particulados.

1.1.1 Obtención de Suspensión Unicelular de *N. brasiliensis*.

Para la obtención de los antígenos particulados de *N. brasiliensis* primero se prepararon suspensiones unicelulares de la bacteria, con densidad celular conocida. Para ello se obtuvieron 10 suspensiones unicelulares y se recuperó un volumen total de 191ml con una densidad celular promedio de $3.82(d.s.2.26) \times 10^9$ UFC/ml. En la figura No.1 se muestra una de las 10 suspensiones con su característico color naranja y en la figura No.2 puede apreciarse el grado de disgregación celular en una alícuota teñida por la técnica de Kinyoun, con la cual se demuestra su propiedad ácido-alcohol resistente. Para determinar la cantidad de UFC por el micrométodo de Miles y Misra fue necesario efectuar ensayos comparativos entre el procedimiento de vaciado en placa comúnmente empleado y el de Miles y Misra; puesto que los resultados, que se presentan en la tabla No.1, no mostraron diferencia entre ambos métodos (prueba estadística de Wilcoxon, de 2 colas, $p=0.8624$) en cuanto al número de UFC en las suspensiones unicelulares de *N. brasiliensis* y, dadas las ventajas técnicas del procedimiento de Miles y Misra, éste fue utilizado.

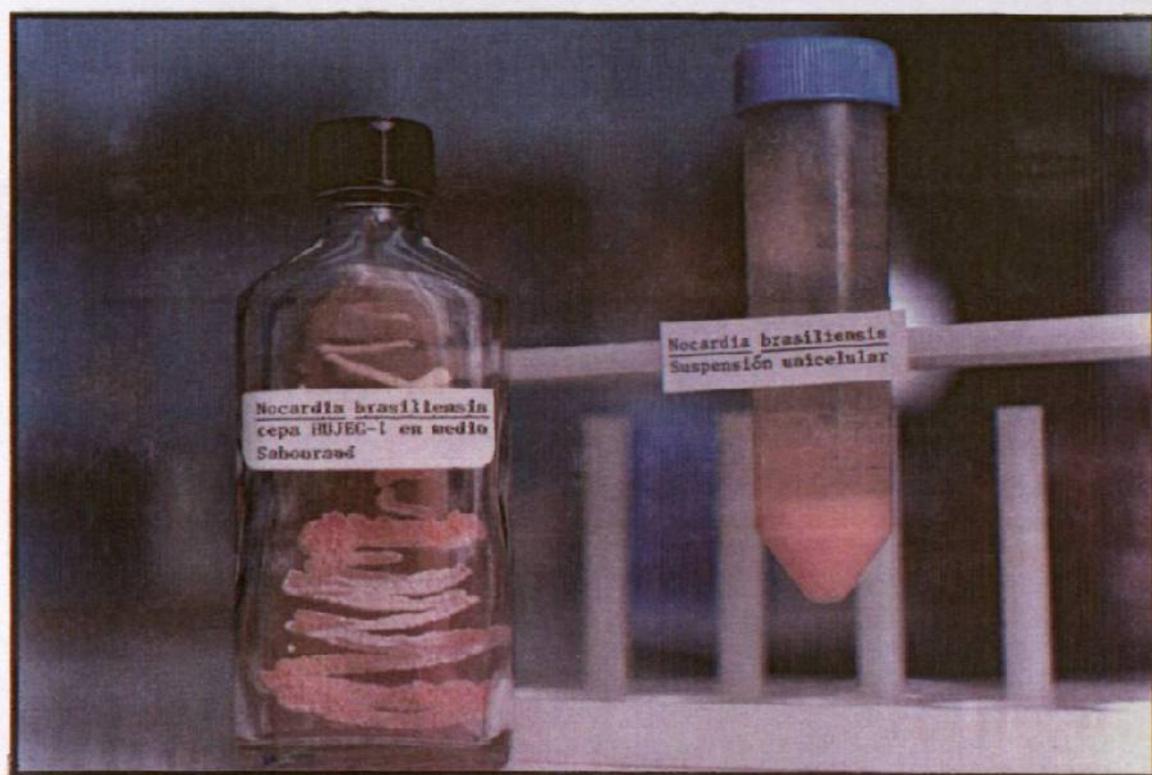


Figura No.1 *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1: izquierda, bacteria aislada de micetoma de ratón BALB/c y conservada en cultivo en agar-Sabouraud; derecha, suspensión unicelular en solución salina obtenida de un cultivo en caldo BHI durante 48 horas a 37°C en agitación continua.

Tabla No.1
Comparación de las Técnicas de Vaciado en Placa
y de Miles y Miera en la Cuantificación de UFC de
N. brasiliensis

Suspensión Uni- celular No.	UFC/ml	
	Vaciado en Placa	Miles y Miera
11	3.12×10^7	3.0×10^7
12	2.85×10^8	1.0×10^8



La comparación de los resultados de ambas procedimientos se efectuó mediante la prueba estadística de Wilcoxon, de 2 colas, con un valor de $p < 0.0024$, utilizando el programa T-Test.

Figura No.2 *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1, tinción de carbol-fucsina para microorganismos ácido-alcohol resistentes (modificación de Kinyoun). Se encuentran células libres y unidas en pequeñas cadenas y filamentos (objetivo 100x).

Tabla No.1
Comparación de las Técnicas de Vaciado en Placa
y de Miles y Misra en la Cuantificación de UFC de
N. brasiliensis

Suspensión Uni- celular No.	UFC/ml	
	Vaciado en Placa	Miles y Misra
1	1.14x10 ⁹	1.0x10 ⁹
2	1.71x10 ⁹	2.0x10 ⁹
3	1.71x10 ⁸	1.5x10 ⁸
4	2.28x10 ⁸	2.0x10 ⁸
5	1.14x10 ⁹	1.0x10 ⁹
6	5.70x10 ⁸	6.0x10 ⁸
7	2.50x10 ⁹	2.72x10 ⁹
8	7.48x10 ⁹	6.0x10 ⁹
9	5.44x10 ⁹	5.0x10 ⁹
10	1.088x10 ¹⁰	9.0x10 ⁹
11	5.13x10 ⁸	5.0x10 ⁸
12	2.85x10 ⁸	3.0x10 ⁸

La comparación de los resultados de ambos procedimientos se efectuó mediante la prueba estadística de Wilcoxon, de 2 colas, con un valor de $p=0.8624$, utilizando el programa True Epistat.

Las suspensiones unicelulares de *N. brasiliensis* mostraron una mayor densidad óptica (D.O.) a una menor longitud de onda (fig. No.3), por lo cual para determinar la densidad celular mediante el parámetro de absorción de luz se utilizó longitud de onda de 325nm y no de 600nm que comúnmente se emplea. Ya que la relación entre D.O. (a 325nm) y densidad celular, figura No.4, resultó en una curva con una región de proporcionalidad directa, la cantidad de UFC en las suspensiones unicelulares recién preparadas se estimó de acuerdo con la porción recta de la curva bifásica. Como alternativa de mayor sensibilidad para determinar densidad celular, se midió la turbidez de las suspensiones unicelulares mediante nefelometría; en la figura No.5 se observa que la relación entre turbidez (voltaje) y densidad celular, es similar a aquélla entre D.O. y densidad celular, así que, dados la mayor accesibilidad y menor costo de la determinación de D.O., éste fue el procedimiento utilizado.

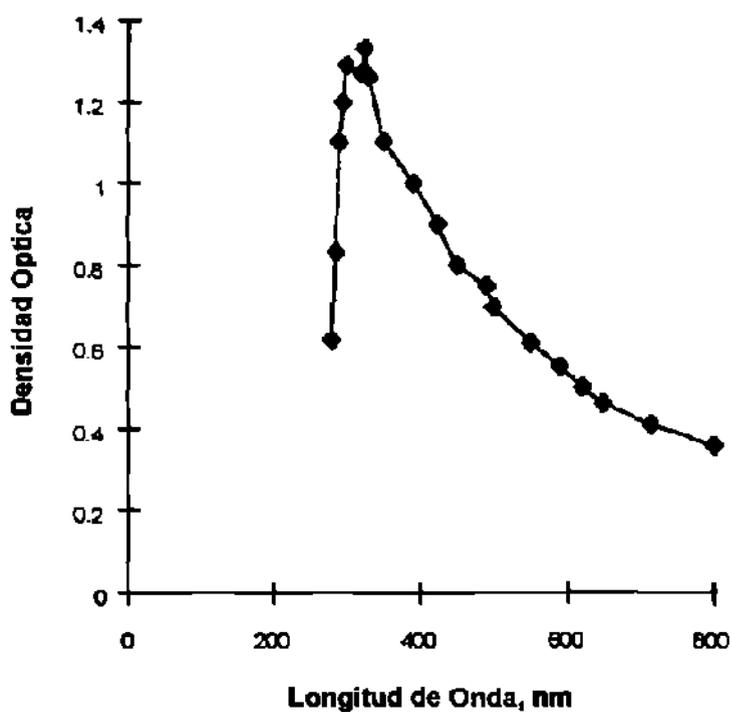


Figura No.3 Espectro de absorción, reportada en unidades de densidad óptica, de la suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1. El espectro se determinó con una suspensión unicelular de la bacteria, recién obtenida y diluida 1:100 en solución salina estéril.

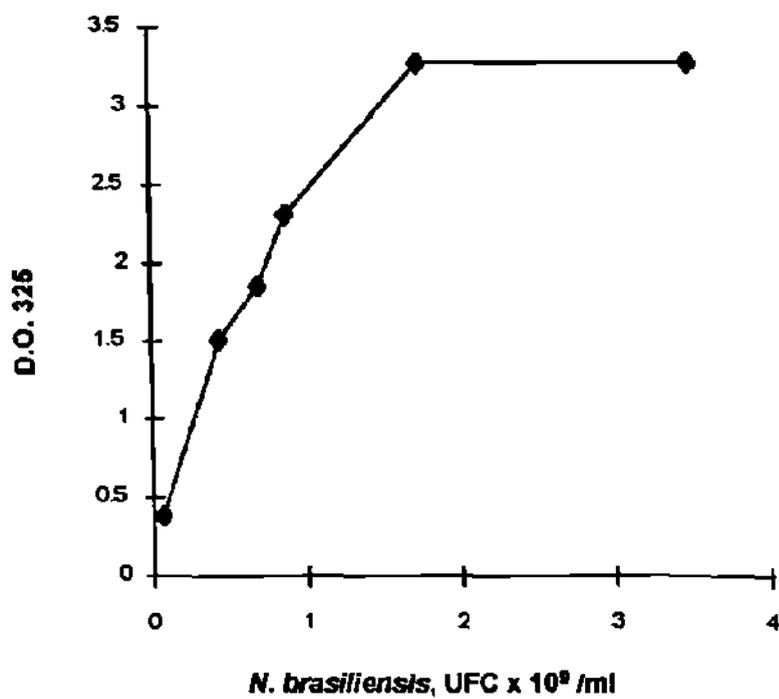


Figura No.4 Relación entre Densidad Óptica y Densidad Celular de suspensiones de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1. La relación se construyó con los valores de D.O. a 325nm de suspensiones unicelulares de la bacteria que contenían diferentes concentraciones celulares, estimadas mediante el micrométodo de Miles y Misra.

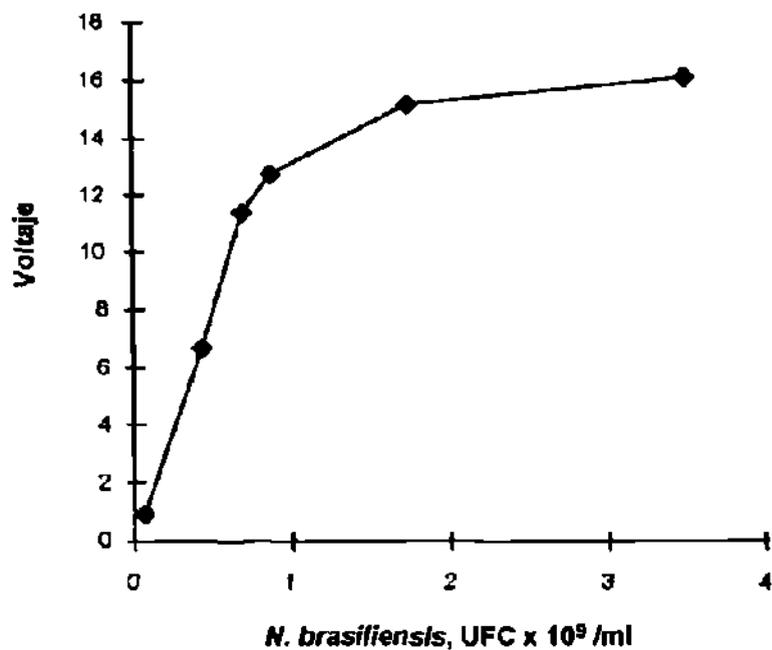


Figura No.5 Relación entre voltaje y densidad celular de suspensiones de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1. La relación se construyó con los valores de voltaje de suspensiones unicelulares de la bacteria que contenían diferentes concentraciones celulares, estimadas mediante el micrométodo de Miles y Misra.

1.1.2 Obtención de los Antígenos Particulados *N. brasiliensis* Muerta por Calor y *N. brasiliensis* Muerta por Radiación U.V.

En este trabajo se utilizaron el calor húmedo a presión y la radiación U.V. para matar las bacterias y conservar a la vez, su estructura como partícula. En la figura No.6 se muestra una suspensión de los antígenos particulados, *N. brasiliensis* muerta por calor y *N. brasiliensis* muerta por radiación U.V. La pérdida del característico color naranja resultó ser irreversible ya que las células radiadas, aún por períodos cortos de tiempo, conservaron su capacidad de multiplicación en un medio enriquecido, pero no su color. Las células radiadas con luz U.V. fueron más hidrofílicas (se suspendieron con facilidad en la solución salina y no permanecieron adheridas a las paredes del tubo) y más fácilmente compactadas, mediante centrifugación, que las células sometidas a autoclave. No se detectó proteína soluble en ninguna de las 2 suspensiones de la bacteria. Por otra parte, a mayor tiempo de permanencia a 4°C, la suspensión celular fue más sensible a la radiación U.V. En las tablas Nos.2-5 se muestran los resultados de los ensayos que permitieron seleccionar el tiempo de radiación, el volumen y la densidad celular para el tratamiento de *N. brasiliensis* con radiación U.V. Fue notable el tiempo prolongado, 90 minutos, necesario para matar el 100% de las bacterias, aún en suspensiones de baja densidad celular (no mayor de 10^9 UFC ó 1.5 a 2 unidades de D.O. a 325nm) y pequeño volumen (no mayor de 2ml) en láminas de líquido de 2-3mm de espesor.

Tabla No.2
 Efecto de la Radiación U.V. Sobre la Viabilidad de
N. brasiliensis en Función del Tiempo de Tratamiento

<i>N. brasiliensis</i> , UPC	Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i>							
	Minutos de Exposición a Luz U.V.							
	10	15	20	30	45	60	90	120

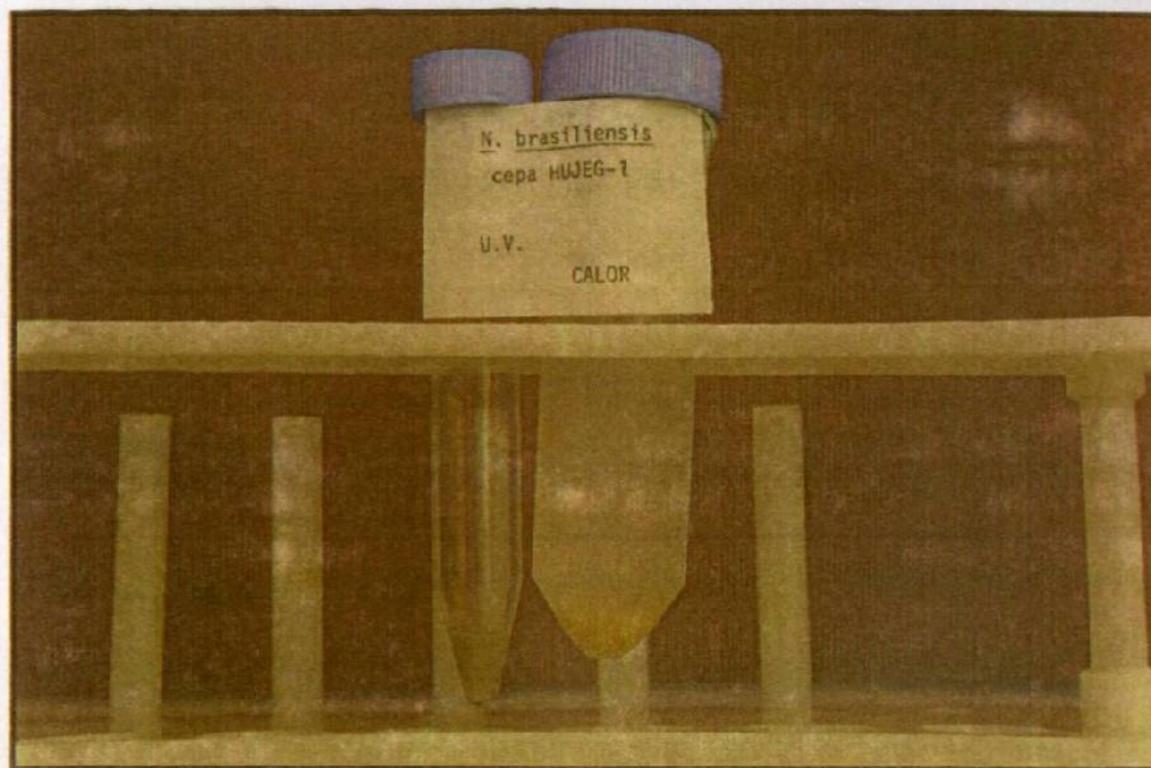


Figura No.6 Antígenos particulados, *Nocardia brasiliensis* muerta por radiación U.V. (izquierda) y *Nocardia brasiliensis* muerta por calor (derecha). Los paquetes de biomasa se obtuvieron por centrifugación de las suspensiones unicelulares de la bacteria tratadas con radiación U.V. o con calor.

Tabla No.2
Efecto de la Radiación U.V. Sobre la Viabilidad de
***N. brasiliensis* en Función del Tiempo de Tratamiento**

<i>N. brasiliensis</i> , UFC	Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i>							
	Minutos de Exposición a Luz U.V.							
	10	15	20	30	45	60	90	120
2×10^9	5+	np	5+	5+	np	np	np	np
4×10^9	5+	np	5+	5+	np	np	np	np
7×10^9	np	5+	np	5+	5+	5+	5+	5+
14×10^9	np	5+	np	5+	5+	5+	5+	5+
<i>N. brasiliensis</i> , testigo sin UV	5+							

np, no probado

Tabla No.3
Efecto de la Radiación U.V. Sobre la Viabilidad
de *N. brasiliensis* en Función de la Densidad Celular

<i>N. brasiliensis</i> , UFC x 10 ⁹ /ml	Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i>	
	Minutos de Exposición a Luz U.V.	
	60	90
2.50	2+	1+
1.25	0	0
0.624	0	0
0.312	0	0
0.156	0	0
0.078	0	0
0.040	0	0
<i>N. brasiliensis</i> , testigo sin UV	5+	

Tabla No.4
Efecto de la Radiación U.V. Sobre la Viabilidad de *N. brasiliensis*
en Función de la Densidad y el Volumen de la Suspensión Celular

		Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i>							
		Densidad Celular, UFC x 10 ¹⁰ /ml							
Volumen de la Suspensión Celular, ml	Rad. UV, min	13.50		6.75		3.37		1.68	
		60	90	60	90	60	90	60	90
0.5		5+	5+	4+	4+	4+	3+	0	0
1.0		np	5+	4+	4+	4+	3+	1+	0
2.0		np	5+	4+	4+	4+	4+	2+	1+
<i>N. brasiliensis</i> , testigo sin UV		5+		5+		5+		5+	

np, no probado

Tabla No.5
Viabilidad de *N. brasiliensis* a los 25 Días del Tratamiento Letal con Radiación U.V.

Muestra No.	Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i>					
	Días post-Tratamiento					
	0	5	10	15	21	25
1	3+	2+	2+	2+	2+	2+
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	1+	1+	1+	1+	1+	1+
5	1+	1+	1+	0	0	0
6	0	0	0	np	np	0
7	0	0	0	np	np	0
8	0	0	0	0	0	0
<i>N. brasiliensis</i> , No Radiada	5+	5+	5+	5+	5+	5+
Muerta con Calor	0	0	0	0	0	0

np, no probado

1.2 Obtención de los Antígenos Solubles Extracto Celular Crudo y Fracción Inmunodominante.

Para la obtención de los antígenos solubles de *N. brasiliensis*, extracto celular crudo (E.C.) y extracto semipurificado, p24-p26 o fracción inmunodominante (fID), se partió de un cultivo de la bacteria en 8 litros de caldo BHI distribuidos en 50 matraces Erlenmeyer de un litro de capacidad e incubados a 37°C durante 7 días en condiciones estacionarias. De 17.4g (peso seco) de biomasa se procedió a la obtención del E.C. del cual se recuperaron 125.2mg de proteínas totales determinadas por el método de Bradford, equivalentes al 0.72% de la biomasa inicial. En el patrón electroforético del E.C. se aprecia, más notablemente en la tinción argéntica, su riqueza en componentes proteicos con peso molecular muy distinto, desde mayores a 66kDa hasta menores a 14kDa (fig. No.7).

De los ensayos realizados para estimar la cantidad de E.C. equivalente a la dosis 10^9 UFC (1.9843×10^9) de antígeno particulado, resultó que esta concentración de células de *N. brasiliensis* correspondió a un peso seco de 2.61mg que, a su vez, contenían 311µg de proteína Bradford.

Para el aislamiento de la fID se utilizó el E.C. obtenido como se describió en el párrafo anterior. Después de la fase de precipitación con sulfato de amonio y del tratamiento con DNasa I, el siguiente paso fue su purificación parcial mediante tamizaje molecular. En la figura No.8 se presenta el perfil de elución de la fID de una columna de Sephadex G-100. Sólo las fracciones con volumen de elución entre 44 y 62ml (registradas por absorbancia a 280nm) mostraron contener tanto proteína (reacción Bradford y absorbancia a 595nm) como la banda de 26-24kDa característica de la fID en electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 10-18% y en condiciones desnaturalizantes (fig. No.7). De este antígeno soluble se recuperaron 11.3mg de proteína (Bradford) equivalentes al 4.5% del E.C. del cual se obtiene directamente la fID, o bien, al 0.065% de la biomasa inicial, peso seco.

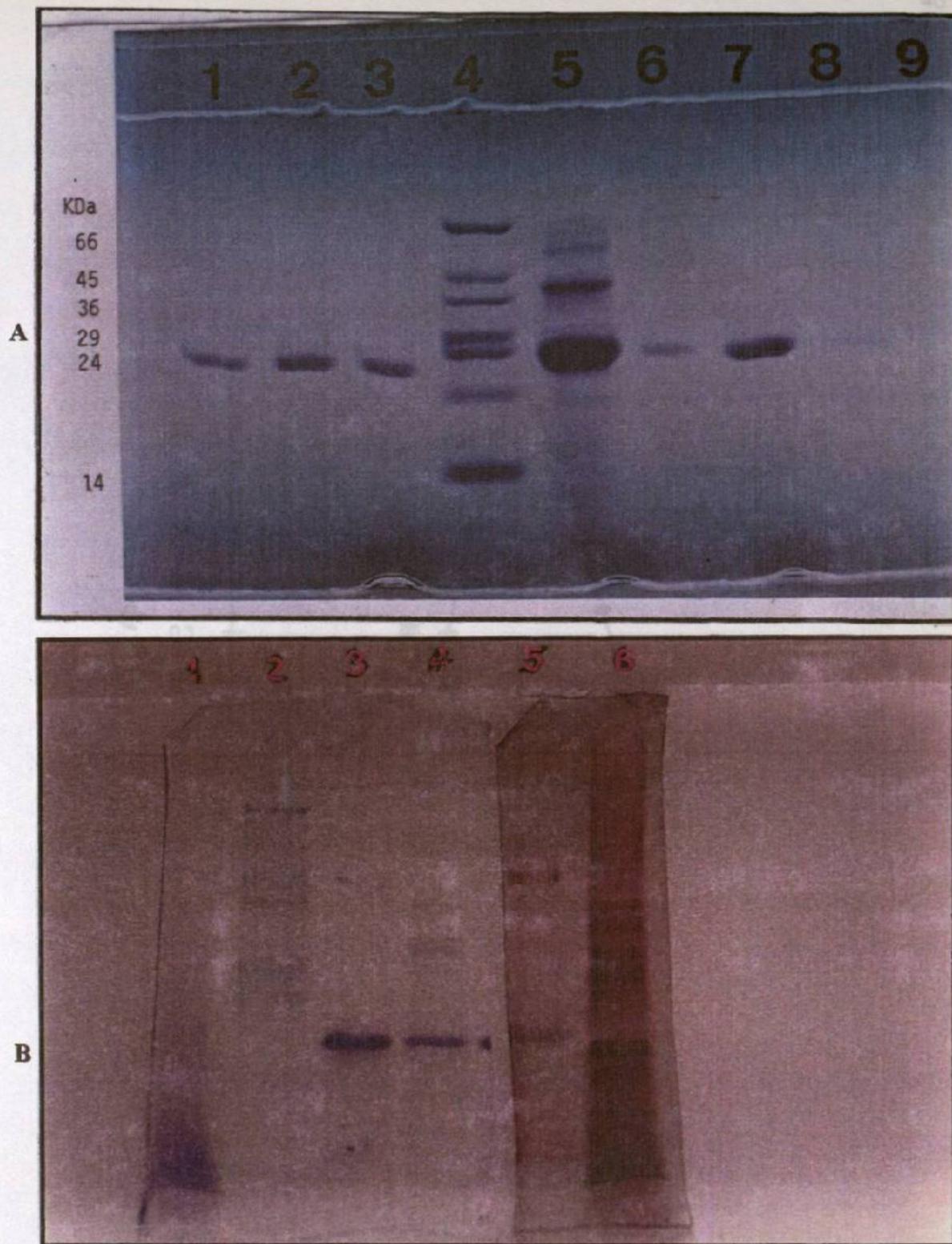


Figura No.7 Electroforesis en SDS-PAGE (gradiente 10-18%, tinciones A, azul de Coomassie y B, nitrato de plata) de extractos de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1. En A: carril 4, marcadores de peso molecular; carril 5, E.C. de *N. brasiliensis*; carriles 1-3 y 6-8 fID extraída de *N. brasiliensis*. En B: carril 2, marcadores de peso molecular; carriles 4 y 6, E.C. de *N. brasiliensis*; carriles 3 y 5, extracto que contiene fID antes de su paso por Sephadex G-100.

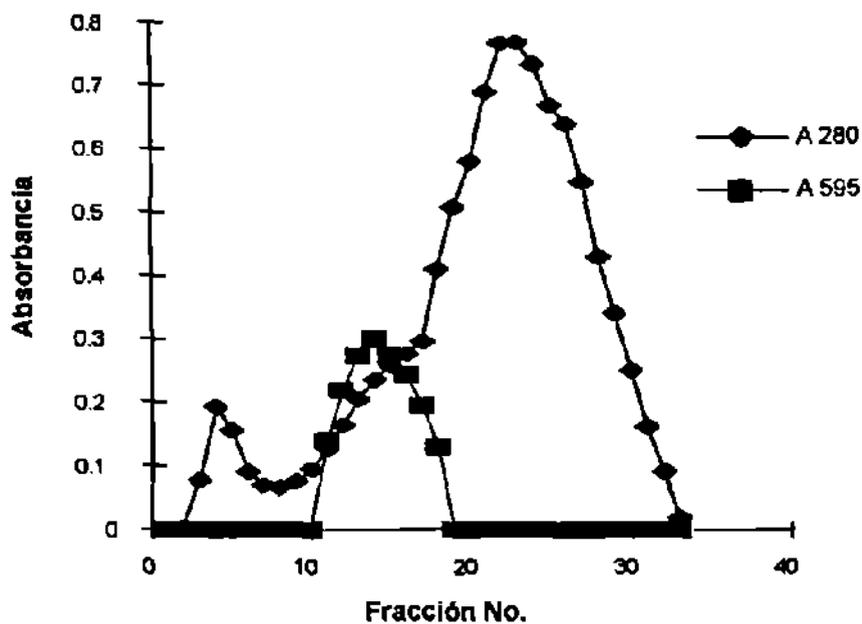


Figura No.8 Perfil de elución de la fracción inmunodominante de *N. brasiliensis*, a partir de una columna de Sephadex G-100. Solo las fracciones 10-17 (registradas por absorbancia a 280nm) mostraron contenido proteico (Bradford, absorbancia a 595nm) y presencia de la banda correspondiente a la fID (p26-p24 en SDS-PAGE) de la bacteria.

2. Determinación del 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.

2.1 Respuesta Humoral. Respuesta de Anticuerpos anti-fID de *N. brasiliensis*.

La respuesta de anticuerpos de ratones BALB/c inmunizados con una sola dosis de antígenos de *N. brasiliensis*, mostró ser dependiente de la concentración y del estado físico del antígeno como se puede apreciar en las figuras Nos.9-11. La respuesta mayor de anticuerpos anti-fID de *N. brasiliensis* se observó entre los días 15 y 90 posteriores a la primoinmunización con la dosis más alta de antígeno, 10^9 UFC de antígeno particulado ó 300 μ g de antígeno soluble. Los antígenos particulados en comparación con el antígeno soluble, resultaron ser aproximadamente 3.5 veces más efectivos como inductores de anticuerpos séricos anti-fID de *N. brasiliensis*, además esta respuesta fue de mayor duración. Los antígenos particulados a dosis media y baja (10^7 y 10^3 UFC respectivamente) produjeron, en general, el mismo efecto que el antígeno soluble en su dosis mayor, con la excepción de que éste resultó en mayor duración y magnitud de la respuesta de anticuerpos ($p < 0.01$ a los 150 días post-inmunización). Los antígenos insolubles o particulados, *N. brasiliensis* muerta por calor y *N. brasiliensis* muerta por radiación U.V., en general mostraron entre sí la misma inmunogenicidad (capacidad antigénica en cuanto a producción de los anticuerpos de interés), ya que los niveles de anticuerpos séricos anti-fID de *N. brasiliensis* inducidos por ambos, fueron iguales ($p = 0.2$ hasta $p > 0.9$), excepto los anticuerpos registrados a los 30 y 90 días que fueron menores, en un 30%, en los ratones inmunizados con 10^9 UFC de *N. brasiliensis* radiada con luz U.V.

Resulta claro de estos experimentos que las bacterias completas, aunque no viables (antígeno particulado), fueron mejores inductores de la síntesis de anticuerpos séricos anti-fID de *N. brasiliensis* que el antígeno soluble, el cual está relativamente enriquecido en el antígeno inmunodominante de *N. brasiliensis*. Así mismo este efecto inmunogénico mostró ser dependiente de la concentración del antígeno en una relación de proporcionalidad directa, si bien, con las cantidades aplicadas sólo fue posible identificar efecto de dosis mayor y menor, y no de la dosis intermedia.

Por otra parte, se investigó el efecto de los lípidos de *N. brasiliensis* en la inducción de los anticuerpos anti-fID y se encontró que la eliminación de los lípidos de la bacteria resultó en disminución (de 63%) del nivel de anticuerpos (0.307 ± 0.033 y 0.113 ± 0.019 unidades de absorbancia a 492 nm, con lípidos y sin lípidos respectivamente), de manera que la cantidad de anticuerpos séricos en animales inmunizados con la bacteria deslipidizada (0.113) no fue estadísticamente diferente a la obtenida cuando el antígeno sensibilizante fue el antígeno soluble (E.C.) insolubilizado (0.07 ± 0.003). La adición de los lípidos a los antígenos previamente deslipidizados no resultó en un efecto estadísticamente significativo: 0.113 ± 0.019 y 0.073 ± 0.013 ; 0.07 ± 0.003 y 0.117 ± 0.045 , niveles de anticuerpos para antígenos particulado y soluble antes y después de la adición de los lípidos, respectivamente.

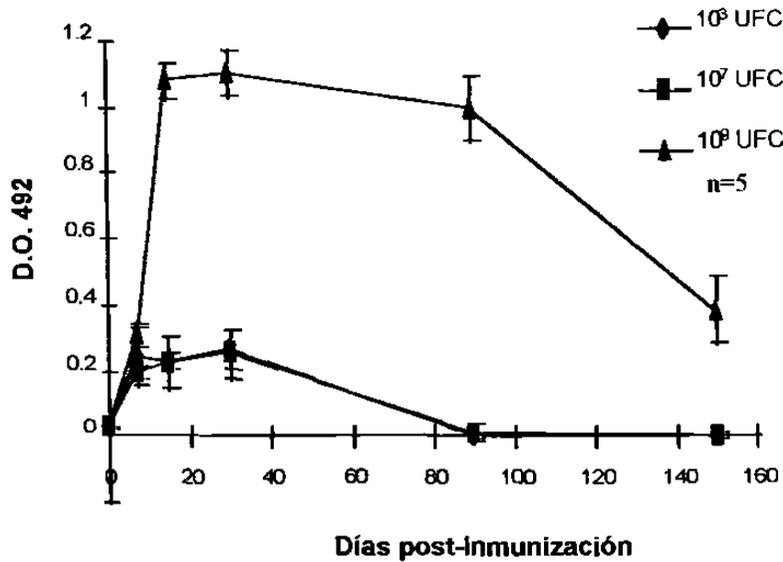


Figura No.9 Respuesta de anticuerpos séricos anti-fID de *N. brasiliensis*, determinados por ELISA, en ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor, a los 0, 7, 15, 30, 90 y 150 días post-inmunización. El valor del nivel de anticuerpos se reporta en unidades de D.O. a 492nm.

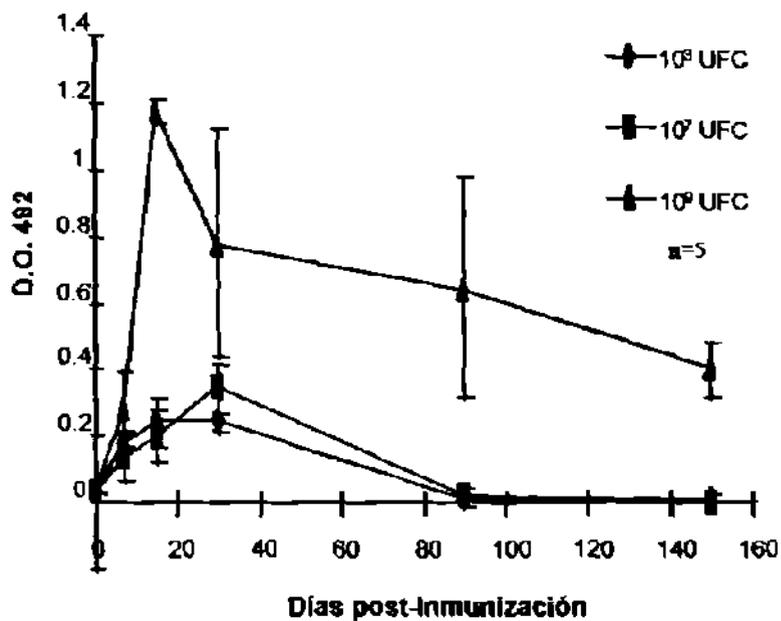


Figura No.10 Respuesta de anticuerpos séricos anti-FID de *N. brasiliensis*, determinados por ELISA, en ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V., a los 0, 7, 15, 30, 90 y 150 días post-inmunización. El valor del nivel de anticuerpos se reporta en unidades de D.O. a 492nm.

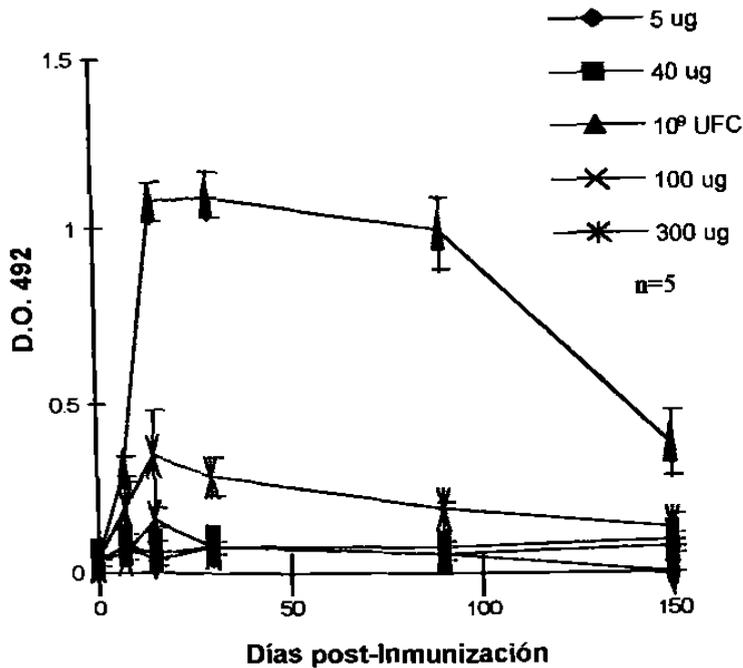


Figura No.11 Respuesta de anticuerpos séricos anti-fID de *N. brasiliensis*, determinados por ELISA, en ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno soluble, extracto crudo de la bacteria, a los 0, 7, 15, 30, 90 y 150 días post-inmunización. Con fines comparativos se incluyeron en la gráfica los resultados de la respuesta de anticuerpos anti-fID en ratones sensibilizados con la dosis mayor (10^9 UFC) del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor, equivalente a la dosis mayor del antígeno soluble E.C., $300\mu\text{g}$ de proteína.

2.2 Respuesta Celular.

2.2.1 Respuesta Proliferativa.

2.2.1.1 Determinación de la Dosis Óptima de fID para Inducir *in vitro* Respuesta Proliferativa de Linfocitos de Ratones Inmunizados con los Antígenos de *N. brasiliensis*.

Los resultados del protocolo de estandarización del ensayo de proliferación celular se muestran en la tabla No.6 y en las figuras Nos.12 y 13. En primer lugar se seleccionó un lote de medio de cultivo RPMI y un lote, y la concentración, de suero bovino fetal (SBF) de 5% (tabla No.6). Como control positivo del ensayo de proliferación celular se escogió el mitógeno Concanavalina A (ConA) en una concentración de 0.5µg/microcultivo (fig. No.12, tabla No.6). Finalmente se determinó la dosis de fID para inducir *in vitro* la respuesta proliferativa óptima de linfocitos de ratones BALB/c primoinmunizados con *N. brasiliensis*, que fue de 0.6µg de proteína de fID por microcultivo, como se observa en la figura No.13.

Tabla No.6
Determinación de las Condiciones Básicas para la Evaluación de la
Respuesta Proliferativa de Células Mononucleares de Bazo de Ratones BALB/c

Mitógeno		Indice de Estimulación y cpm de Linfocitos de Bazo de Ratón Cultivados con Mitógeno a Diferente Concentración de SBF					
		RPMI-1			RPMI-2		
		SBF-1		10%	SBF-1		10%
5%	10%	5%	10%				
ConA 0.5µg	I.E.	63.50	78.93	95.07	93.81		
	cpm	61,786/ 973	79,241/ 1004	116,179/ 1222	124,764/ 1330		
ConA 0.75µg	I.E.	35.66	48.64	86.31	77.77		
	cpm	34,698/ 973	20,139/ 414	105,466/ 1222	103,428/ 1330		

El ensayo de proliferación celular se realizó por cultivo de células mononucleares de bazo de ratones no inmunizados (2×10^5 células en 200µl de medio de cultivo) en las diferentes condiciones que se señalan en la tabla: lote de medio de cultivo, lote y concentración de SBF y concentración del agente mitogénico. La magnitud de la respuesta proliferativa se reportó como Índice de Estimulación, ésto es, el cociente de timidina tritiada (cpm) incorporada en presencia y en ausencia del mitógeno.

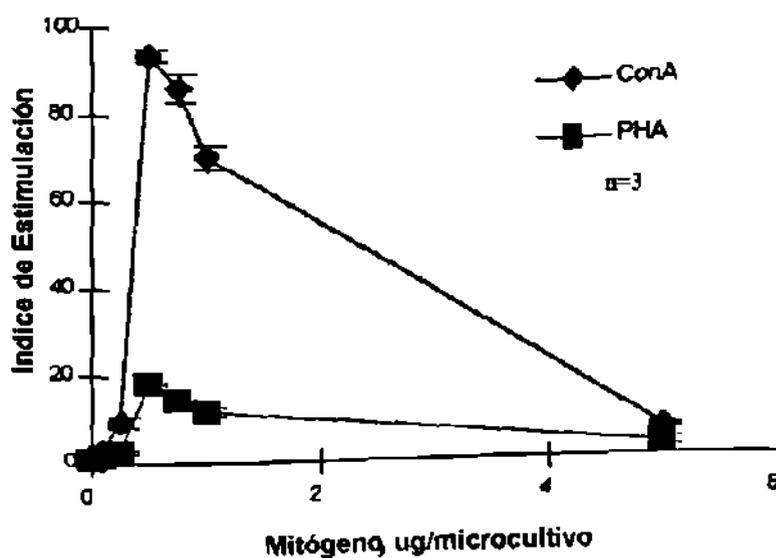


Figura No.12 Respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c, no inmunizados, en presencia de diferentes concentraciones de mitógeno. La magnitud de la respuesta proliferativa se reporta como Índice de Estimulación.

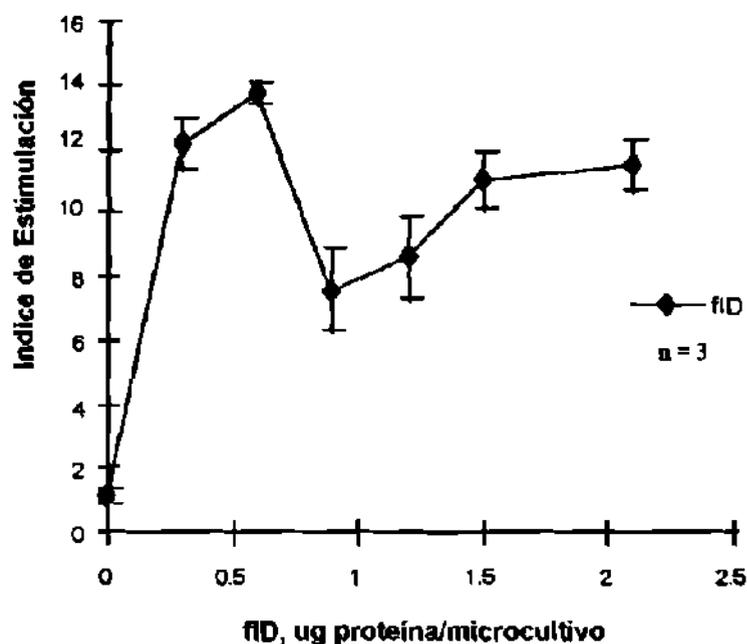


Figura No.13 Respuesta proliferativa de linfocitos de bazo de ratones BALB/c en presencia de diferentes concentraciones de la fID de *N. brasiliensis*. Los ratones fueron infectados (por inyección subcutánea) con *N. brasiliensis*, 3×10^9 UFC dosis inicial y 1×10^6 UFC dosis de reto un mes después de la sensibilización y 12 días antes del ensayo. El I.E. de estas células en presencia de ConA fue 74.65(d.s.2.08; cpm, 15,004/201).

2.2.1.2 Determinación de la Respuesta Proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de Linfocitos de Bazo y de GLP de Ratones Primoinmunizados con las Diferentes Concentraciones de los Antígenos Particulados y Soluble de la Bacteria.

La respuesta inmune mediada por linfocitos en ratones BALB/c inmunizados con una sola dosis de antígenos de *N. brasiliensis*, mostró ser dependiente de la concentración y del estado físico de los antígenos, tanto en bazo como en GLP (figuras Nos. 14-16). La respuesta proliferativa mayor de linfocitos en presencia de la fID de *N. brasiliensis* se obtuvo el séptimo día posterior a la primoinmunización con la dosis más alta (10^9 UFC) de antígeno particulado, independientemente de si fuera *N. brasiliensis* muerta por calor o por radiación U.V.; la respuesta proliferativa en bazo fue 3 a 4 veces mayor que en GLP. Los efectos dosis-respuesta celular y forma física-respuesta celular, tendieron a disminuir con el tiempo, y a los 5 meses post-inmunización ya no se detectó diferencia entre las dosis mayor (10^9 UFC) y menores (10^3 y 10^7 UFC) de antígeno, ni aún entre los antígenos particulados y el soluble en cualquiera de sus dosis (5, 40, 100 y 300 μ g), ($p > 0.05$). En GLP el efecto del tiempo fue más notable ya que a los 90 días de administrarse el antígeno, el tejido linfoide había regresado a su estado basal y ya no fue posible recuperar células para el ensayo de respuesta proliferativa. Los antígenos particulados en dosis media (10^7 UFC) y baja (10^3 UFC) resultaron, en general, en el mismo efecto que el antígeno soluble en sus diferentes concentraciones (valores de p desde 0.1 hasta 0.9). Los antígenos insolubles o particulados, *N. brasiliensis* muerta por calor y *N. brasiliensis* muerta por radiación U.V., en las dosis media y baja mostraron entre sí la misma capacidad antigénica en cuanto a inducción de respuesta celular anti-fID, tanto en bazo como en GLP (valores de p entre 0.2 y 0.9). En cambio, con la dosis mayor (10^9 UFC) se detectó diferencia entre ambos tipos de antígeno particulado, a los 7 días post-inmunización los índices de estimulación de las células sensibilizadas con la bacteria muerta por calor fueron superiores, 33% en bazo, 58% en GLP, (valores de $p < 0.05$), como se muestra en las figuras 14 y 15.

El antígeno soluble, extracto crudo de *N. brasiliensis*, se comportó como pobre inductor de respuesta inmune mediada por células contra el antígeno inmunodominante de la bacteria, p24-p26, en cualquiera de las 4 dosis aplicadas y a lo largo del tiempo de experimentación (valores de p entre 0.2 y 0.9); en GLP la estimulación fue insuficiente

pues no fue posible aislar las células necesarias para el ensayo de respuesta linfoproliferativa. De los resultados de estos experimentos, que se muestran en forma resumida en la figura No.16, fue notable que la magnitud de la respuesta celular se conservó a lo largo de los 5 meses, independientemente de la concentración del antígeno primoinmunizante, no obstante la gran diferencia, en contenido de antígeno, entre las dosis menor y mayor del antígeno soluble (5 y 300 μ g de proteína respectivamente). Llamó la atención también, que este mismo nivel de respuesta proliferativa fue expresado por los linfocitos de animales inmunizados con los antígenos particulados, también en forma independiente de la dosis de antígeno después del período de respuesta primaria (figuras Nos. 14 y 15).

Al analizarse el efecto de los lípidos de *N. brasiliensis* sobre la proliferación *in vitro* de los linfocitos se encontró que, al igual que en la respuesta de anticuerpos, la eliminación de los lípidos de la bacteria resultó en notable disminución del I.E. (8.68 \pm 0.48 y 2.04 \pm 0.49, n=5, índices de estimulación obtenidos con *N. brasiliensis* completa y *N. brasiliensis* deslipidizada, respectivamente), de manera que la respuesta proliferativa resultante de inmunización con la bacteria deslipidizada (I.E. 2.04 \pm 0.49) fue igual a aquella de las células sensibilizadas con el antígeno soluble (E.C.) insolubilizado, I.E. 1.97 \pm 0.05, n=5. No obstante que la adición de los lípidos a los antígenos previamente deslipidizados no resultó en respuesta proliferativa estadísticamente diferente a la obtenida con los antígenos deslipidizados, sí se expresó un leve aumento en el I.E. al adicionar los lípidos a la bacteria completa, no así al antígeno soluble: 2.04 \pm 0.49 y 2.46 \pm 0.45, 1.97 \pm 0.05 y 2.17 \pm 0.15, n=5, índices de estimulación para antígenos particulado y soluble antes y después de la adición de los lípidos, respectivamente.

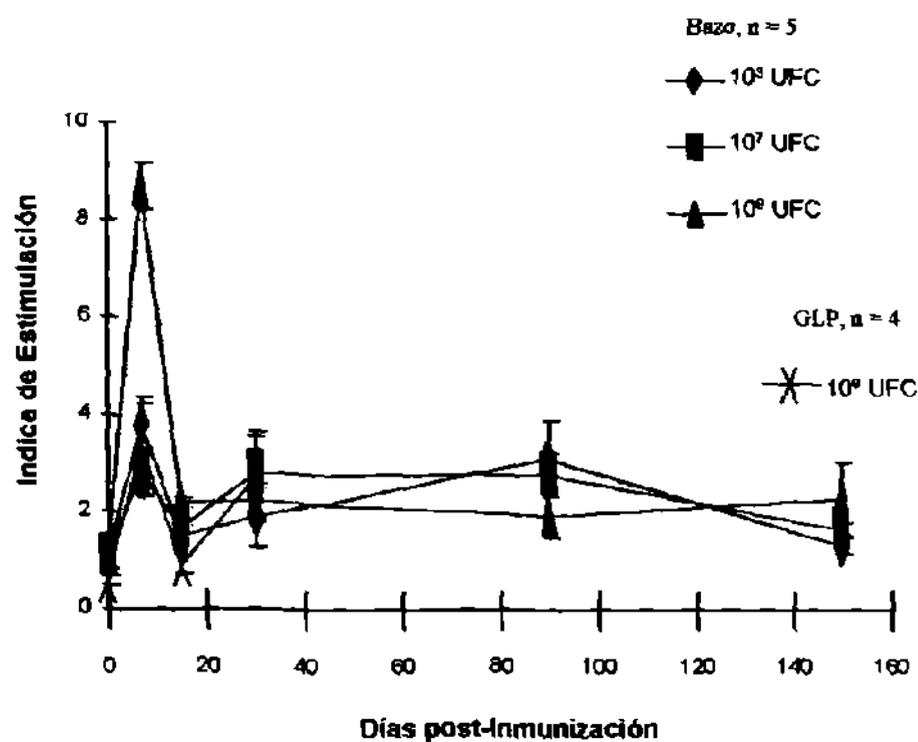


Figura No.14 Respuesta proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor, en diferentes días post-inmunización.

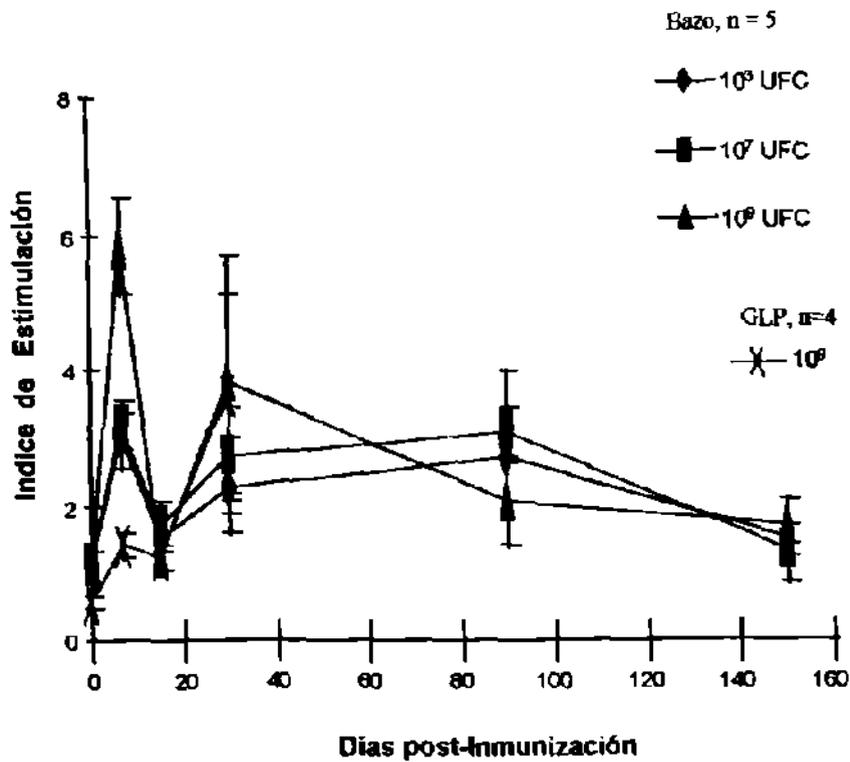


Figura No.15 Respuesta proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V., en diferentes días post-inmunización.

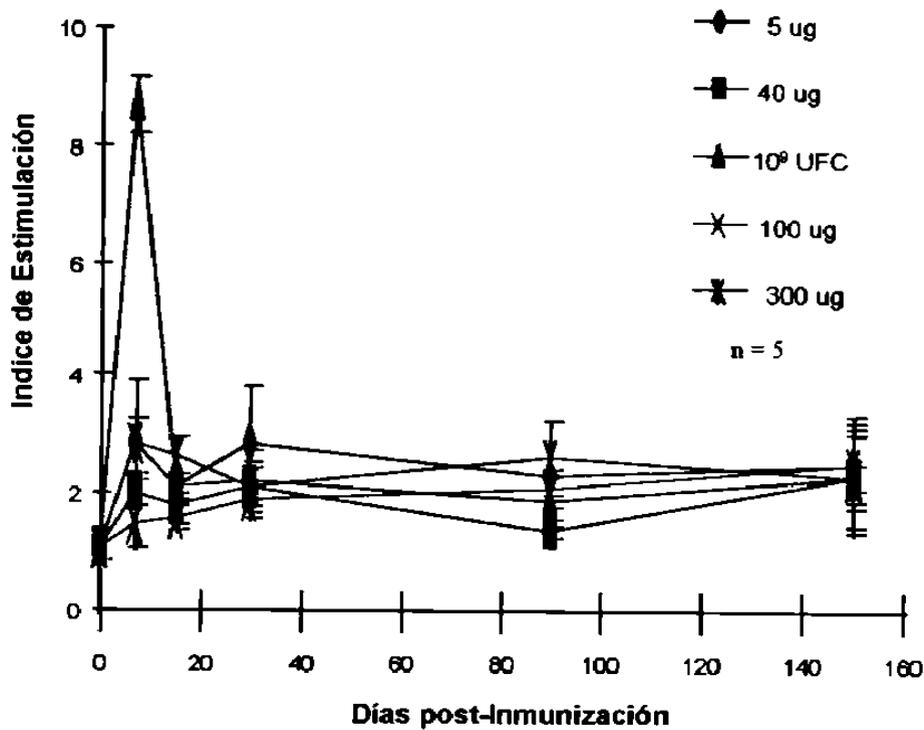


Figura No.16 Respuesta proliferativa anti-fID de *N. brasiliensis*, de linfocitos de bazo de ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno soluble, extracto crudo de la bacteria, en diferentes días post-inmunización. Con fines comparativos se incluyeron en la gráfica los resultados del ensayo de proliferación de las células de bazo de ratones sensibilizados con la dosis mayor (10^9 UFC) del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor, equivalente a la dosis mayor del antígeno soluble E.C., $300\mu\text{g}$ de proteína .

2.2.2 Fenotipo.

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.

En la figura No.17 se muestra un registro obtenido del citómetro de flujo, en el cual se indican los valores que comúnmente se emplearon para los detectores de la luz dispersada por las células en estudio, en virtud de algunas de sus características tales como tamaño y complejidad interna. La luz laser registrada entre 1 y 10 grados del eje de la luz incidente, proporcional al tamaño de la célula, se reporta en el eje de abscisas como FSC o ForwardScatter (dispersión en el plano horizontal) (78); la luz registrada en ángulos mayores es proporcional a la complejidad interna de la célula (cantidad, tamaño y grado de estructuración morfológica del contenido intracelular) y se reporta en el eje de ordenadas como SSC o SideScatter (dispersión en el plano lateral/vertical) (78). También se presentan los valores de los detectores de la fluorescencia emitida por los fluorocromos presentes en las células en estudio, en este trabajo isotiocianato de fluoresceína (FITC, que se registra en el eje de abscisas como FL1) y ficoeritrina (PE, que se reporta en el eje de ordenadas como FL2) (78). Una vez establecidos los parámetros de los detectores se identificó en el plano coordinado la posición ocupada por la población de linfocitos de ratón (fig. No.18) y se fijó la ventana o región correspondiente, determinando así que el citómetro analizara exclusivamente la población de linfocitos de entre la población celular total; fue notable la diferencia en características estructurales intracelulares entre las células linfoides de GLP (gráfica superior) y de bazo (gráfica inferior): las primeras mostraron homogeneidad mayor en tamaño celular y más heterogeneidad en complejidad celular interna, que las células linfoides de bazo. La figura No.19 muestra una hoja de reporte del análisis de fluorescencia, obtenida del citómetro de flujo: gráficas superiores, controles de autofluorescencia (izquierda) y de unión inespecífica del reactivo fluorescente (derecha); gráficas central e inferior, registro en gráficas de puntos, con sus correspondientes tablas de datos, de las subpoblaciones de linfocitos según su marcador fluorescente: TCD4+ y BCD45R+ con PE se reportan en ordenadas, TCD8+ y TCD3+ con FITC en abscisas.

Arithmetic/Linear

No Title

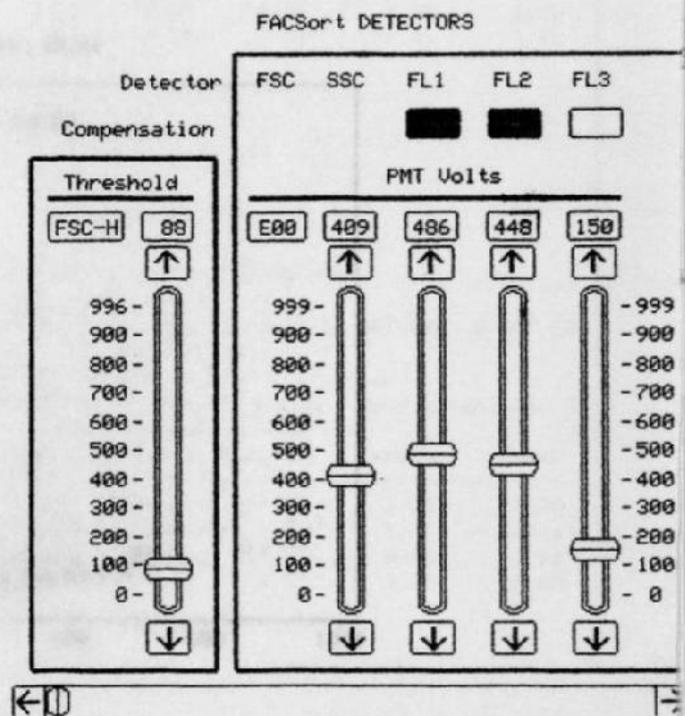
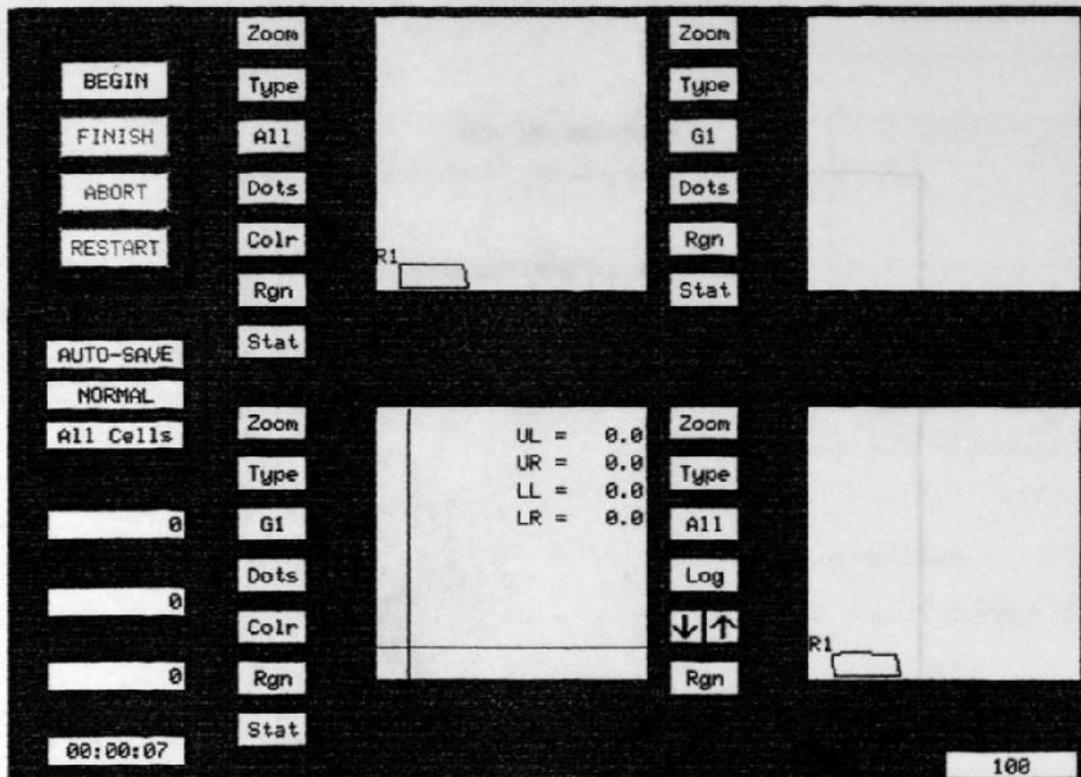


Figura No.17 Registro de los niveles de ajuste de los detectores del citómetro de flujo. Se muestran los valores en los cuales comúnmente se calibraron los 4 detectores de la luz laser dispersada según el tamaño de las células (FSC), la complejidad interna de las células (SSC) y la fluorescencia debida a los fluorocromos FITC (FL1) o PE (FL2).

Arithmetic/Linear

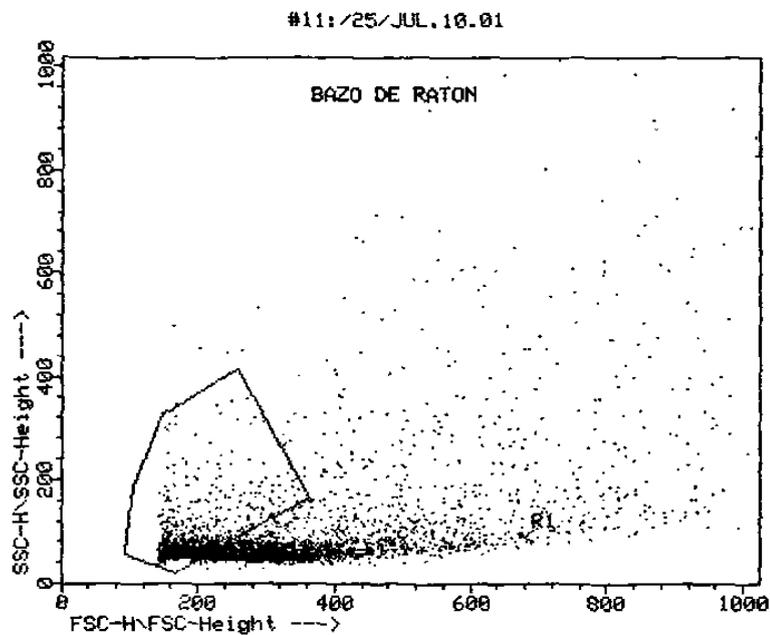
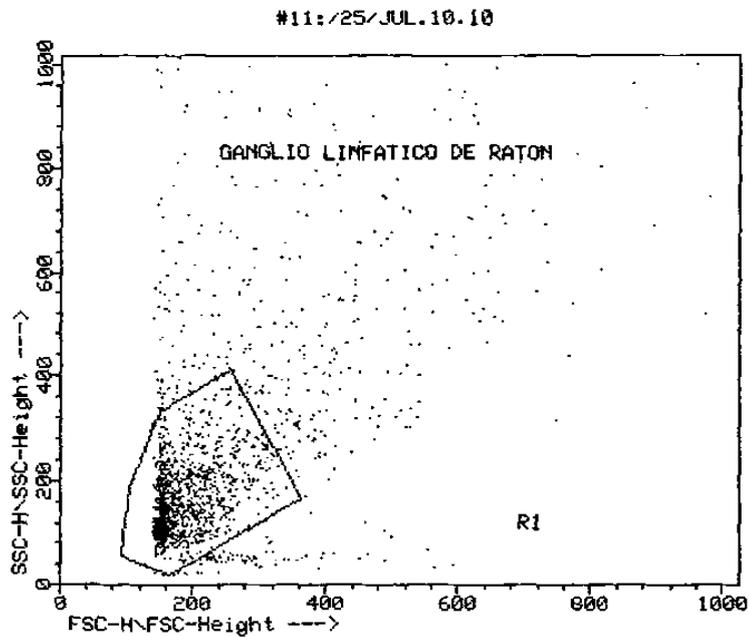
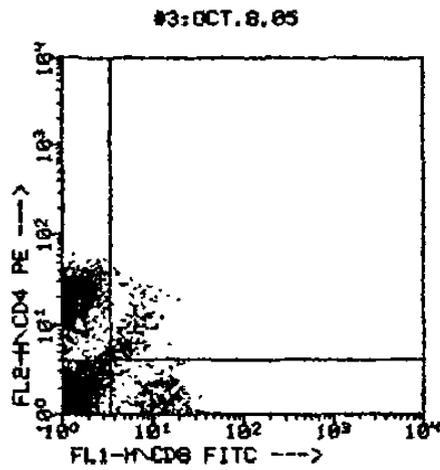
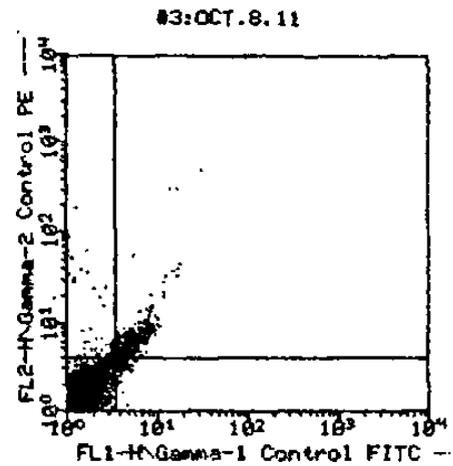
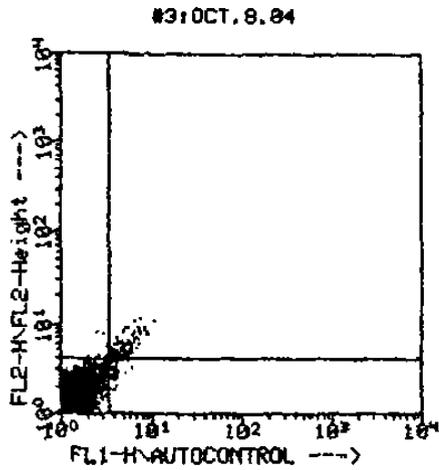


Figura No.18 Localización en el plano coordenado de análisis del citómetro de flujo, de las poblaciones de linfocitos de GLP (gráfica superior) y de bazo (gráfica inferior) de ratones BALB/c, de acuerdo al tamaño de las células (FSC) y a la complejidad interna de las mismas (SSC).

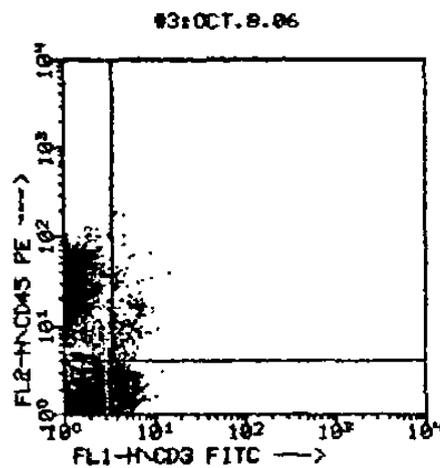


#3:OCT.8.05

----- Quad Stats -----

File: #3:OCT.8.05 Sample: ALMA I. OCTUBRE 8 96' 005
 Date: 10/ 8/96 Gate G1= R1
 Selected Preferences: Arithmetic/Linear
 Parameters: FL1-H(LOG),FL2-H(LOG) Quad Location: 3.52, 4.07
 Total= 5000 Gated= 4877

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	1072	21.98	21.44	1.63	20.98
2 UR	151	3.10	3.02	6.39	10.58
3 LL	3432	70.37	68.64	1.40	1.58
4 LR	222	4.55	4.44	12.41	1.82



#3:OCT.8.06

----- Quad Stats -----

File: #3:OCT.8.06 Sample: ALMA I. OCTUBRE 8 96' 006
 Date: 10/ 8/96 Gate G1= R1
 Selected Preferences: Arithmetic/Linear
 Parameters: FL1-H(LOG),FL2-H(LOG) Quad Location: 3.52, 4.0
 Total= 5000 Gated= 4890

Quad	Events	% Gated	% Total	Xmean	Ymean
1 UL	2854	58.36	57.08	1.38	31.26
2 UR	168	3.44	3.36	5.27	18.11
3 LL	1384	28.30	27.68	2.08	1.82
4 LR	484	9.98	9.68	4.77	2.09

Figura No.19 Hoja de reporte, obtenida del citómetro de flujo, que muestra los resultados del análisis de las células linfoides de acuerdo con el fluorocromo unido a la membrana celular: FITC (abscisas, Lower Right) y PE (ordenadas, Upper Left).

2.2.2.2 Efecto de los Antígenos Particulados.

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 *N. brasiliensis* Muerta por Calor y *N. brasiliensis* Muerta por Radiación U.V.

No se encontró diferencia en el efecto de los 2 antígenos particulados sobre el fenotipo de los linfocitos de bazo ($p=0.1$ hasta $p>0.9$); ésto es, las subpoblaciones TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ presentaron el mismo patrón de variación, en función de dosis de antígeno y de tiempo post-inmunización, en bazo de ratones inmunizados tanto con *N. brasiliensis* muerta por calor como con *N. brasiliensis* muerta por radiación U.V. (figs. Nos.20-23). En GLP, no obstante pequeñas diferencias a los 7 y 15 días posteriores a la primoinmunización, a los 30 días la densidad celular de cada subpoblación de linfocitos fue la misma (figs. Nos.21 y 23). En virtud de ello los resultados fueron referidos en términos de antígeno particulado, en general, y no de *N. brasiliensis* muerta por calor o por radiación U.V., en particular.

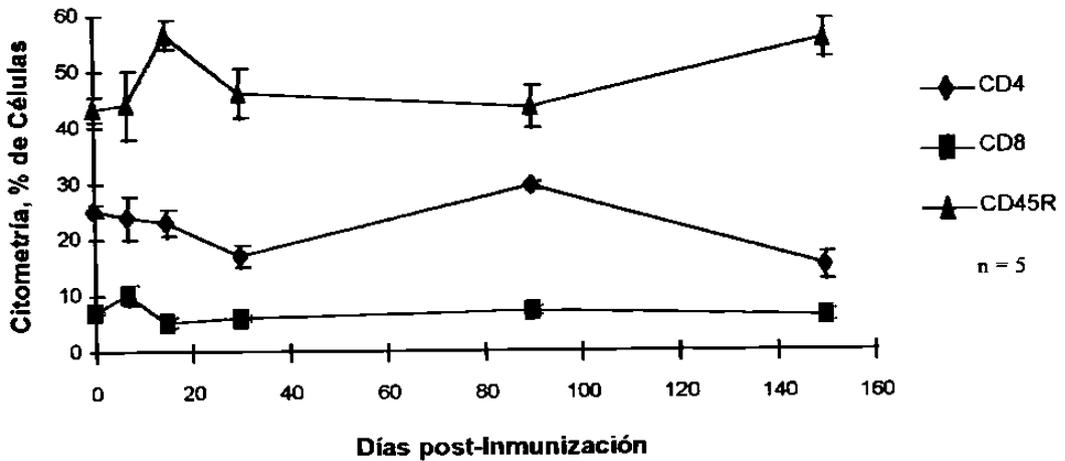
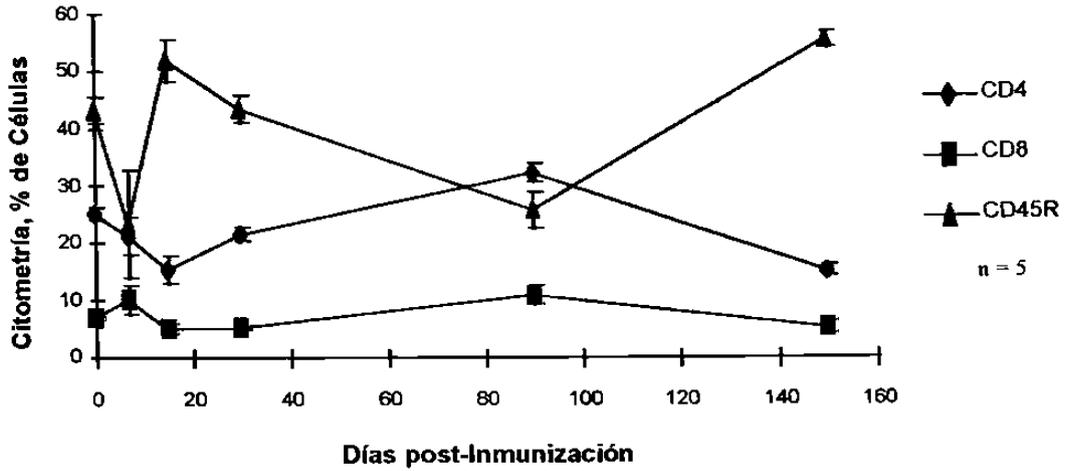


Figura No.20 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC (gráfica superior) y 10^7 UFC (gráfica inferior) del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. El fenotipo se determinó en diferentes días post-inmunización.

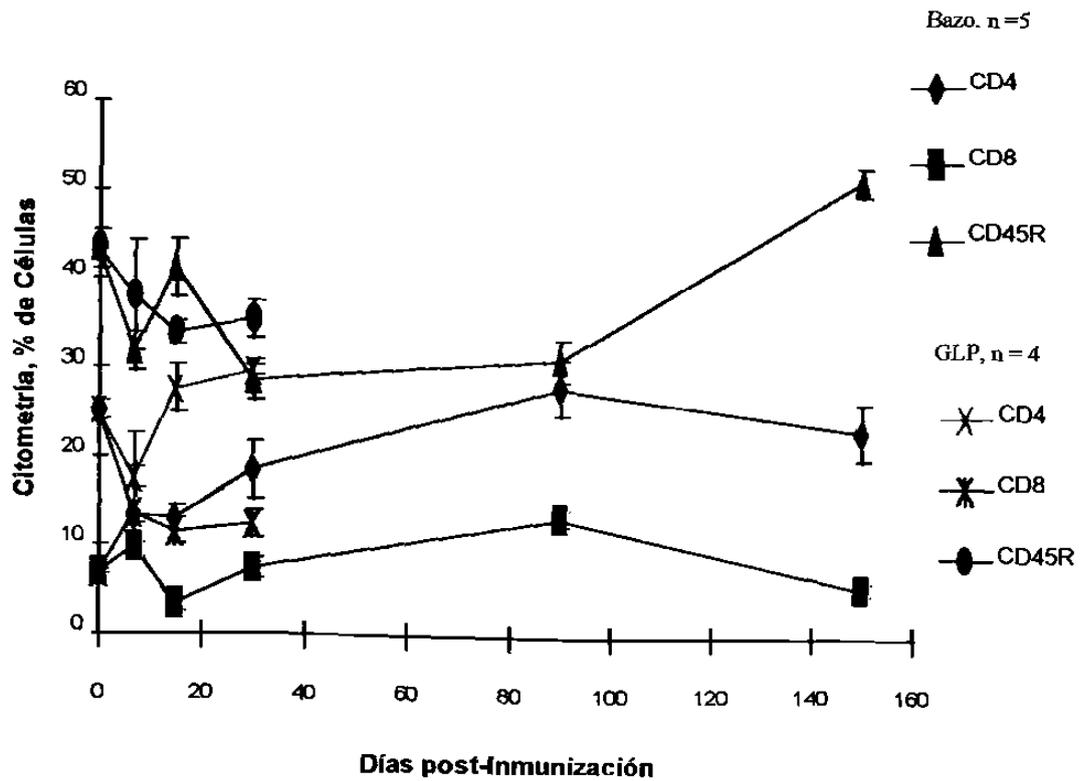


Figura No.21 Fenotipo de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. El fenotipo se determinó en diferentes días post-inmunización.

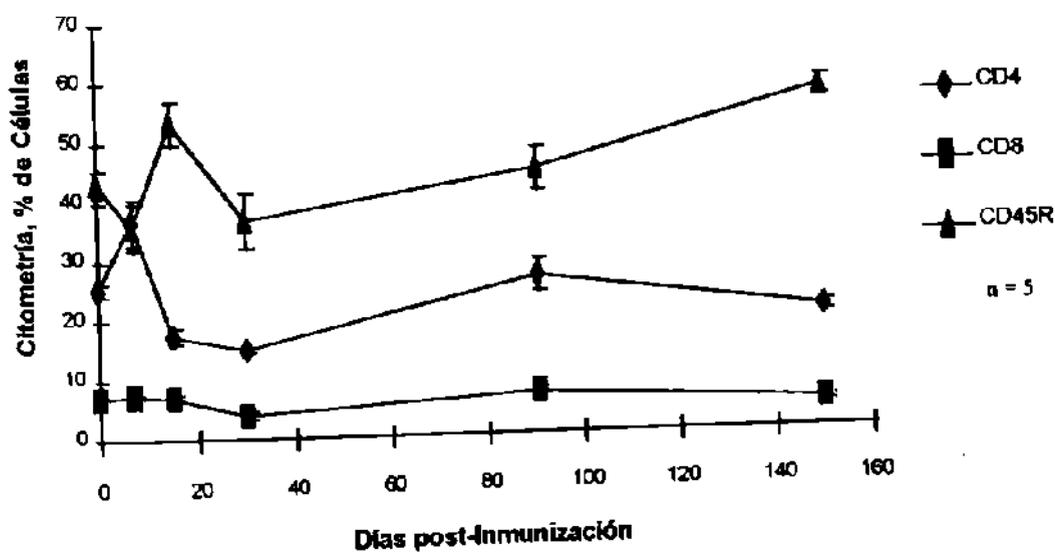
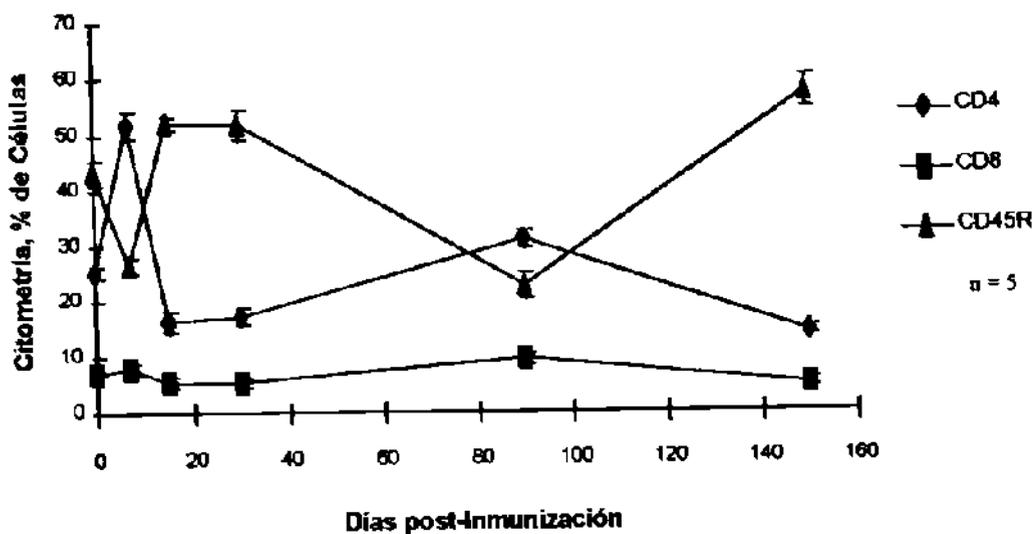


Figura No.22 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^5 y 10^7 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V., (gráficas superior e inferior respectivamente). El fenotipo se determinó en los días señalados después de la inmunización.

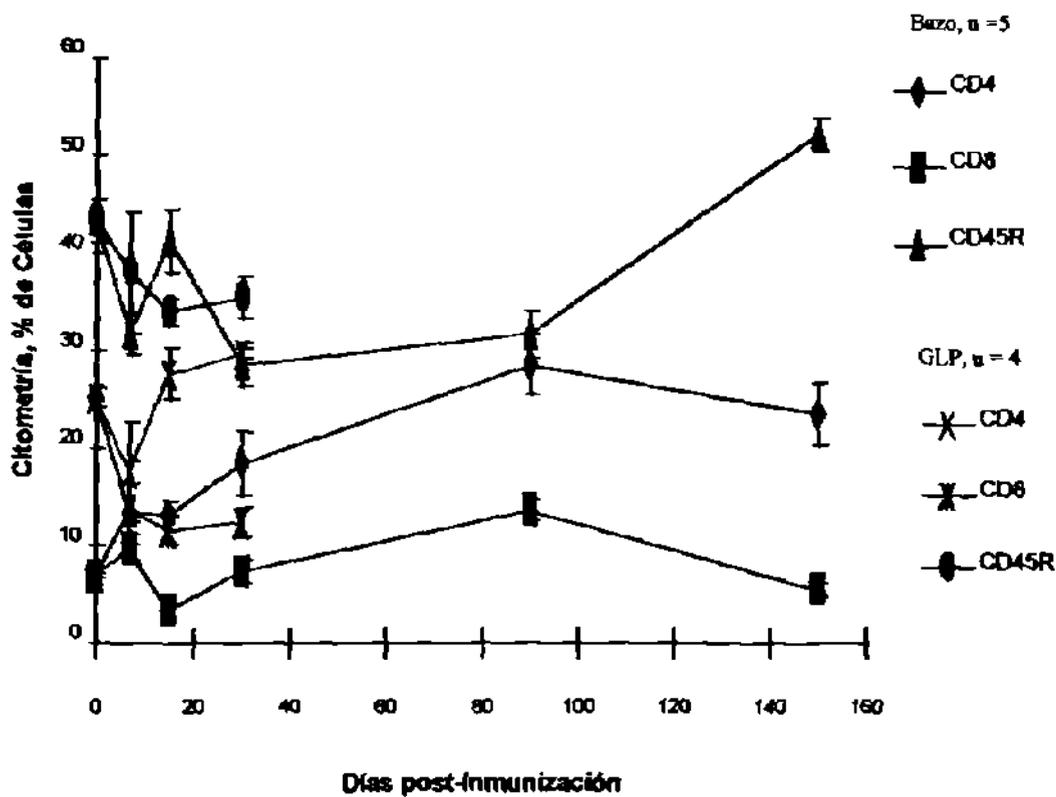


Figura No.23 Fenotipo de linfocitos de bazo y de GLP de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. El fenotipo se determinó en diferentes días post-inmunización.

2.2.2.2.2 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo en Diferentes Tiempos Después de la Primoinmunización con Antígeno Particulado.

No se detectó efecto de concentración del antígeno sensibilizante sobre las subpoblaciones de linfocitos TCD4+, TCD8+ y BCD45R+, al día 7, 15, 30, 90 ó 150 posterior a la primoinmunización, sin embargo, sí se identificó variación en el número de células (figuras Nos.20-23) y en el patrón celular (figuras Nos.24-27) en función del tiempo, encontrándose que ambos parámetros celulares fueron diferentes para cada tipo celular y para cada tejido linfoide de origen de las células (bazo y GLP); el efecto tendió a desaparecer hacia los 150 días post-inmunización, independientemente de la dosis del antígeno, fenómeno que también se observó en la respuesta proliferativa de los esplenocitos. En bazo fue evidente que para las diferentes dosis de *N. brasiliensis* y los distintos tiempos post-inmunización, la subpoblación de linfocitos TCD8+ fue la menos abundante (7% valor basal) y más constante, en tanto que las subpoblaciones TCD4+ y BCD45R+ contribuyeron con los porcentajes mayores de células (valores basales 25% y 43% respectivamente) y mostraron ser las más cambiantes, según se detalla en las figuras Nos.20-23).

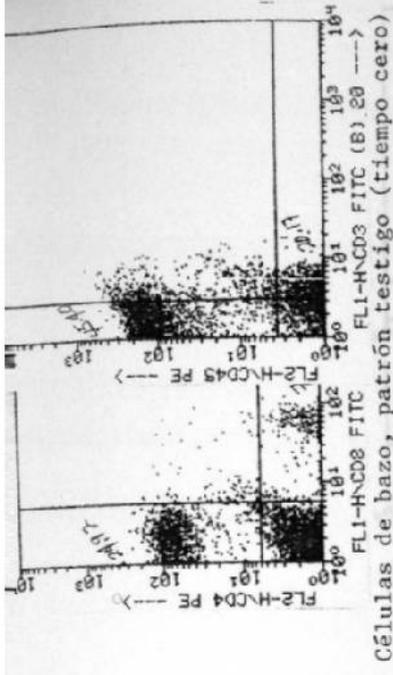
La población de linfocitos TCD8+ presentó 2 picos, uno a los 7 días ($9 \pm 1.5\%$) y otro a los 90 días ($11 \pm 2\%$) post-inmunización (aumento de 29% y de 57% respectivamente, 7% valor basal), independientemente de la dosis de antígeno ($p > 0.05$, ANOVA); en cambio, a los 150 días esta población celular fue inferior al valor de referencia, en relación inversa con la cantidad de antígeno, 28% y 14% para las concentraciones de antígeno baja (10^3 UFC) y media-alta (10^7 y 10^9 UFC) respectivamente (figuras Nos.20-23).

Por el contrario, la población de linfocitos TCD4+ mostró un mínimo y un máximo: disminuyó en un 20-28% (25% cifra basal, 18-20% cifra final) en el lapso de 20 a 30 días post-inmunización, recuperándose hacia los 90 días con un nivel de células superior en 20-28% su valor de referencia, efectos también independientes de la dosis de antígeno ($p > 0.05$, ANOVA), e igual que para los linfocitos TCD8+, a los 5 meses post-inmunización la cantidad de células TCD4+ fue inferior a su valor de referencia, en forma dependiente inversamente de la concentración de antígeno, ésto es, 40% y 20% para las dosis baja-media y alta respectivamente (figuras Nos.20-23).

El efecto de dosis de antígeno fue más aparente para los linfocitos BCD45R+, las diferencias más notables ocurrieron con las dosis extremas, ya que la dosis media resultó en cifras más constantes de células. A los 7 días post-inmunización esta población de linfocitos de bazo de los ratones inmunizados con la dosis menor de *N. brasiliensis* (10^3 UFC) fue 46% inferior al nivel basal, en tanto que para las dosis media (10^7 UFC) y alta (10^9 UFC) no se detectó cambio significativo ($\pm 6\%$, $p > 0.05$); 7 días más tarde la población celular aumentó en relación inversa con la dosis del antígeno, 26% como resultado de la inmunización con las dosis baja-media, en tanto que con la dosis mayor no se identificó cambio. A partir de este momento la población de células B CD45R+ volvió a descender, siendo a los 90 días inferior al nivel basal en 42% para las dosis menor y mayor del antígeno particulado y en 30% para la dosis media. Finalmente, a los 150 días esta subpoblación de linfocitos resultó ser 28% ($\pm 3\%$) superior a su cifra basal, independientemente de la dosis del antígeno ($p > 0.05$, ANOVA) (figuras Nos.20-23).

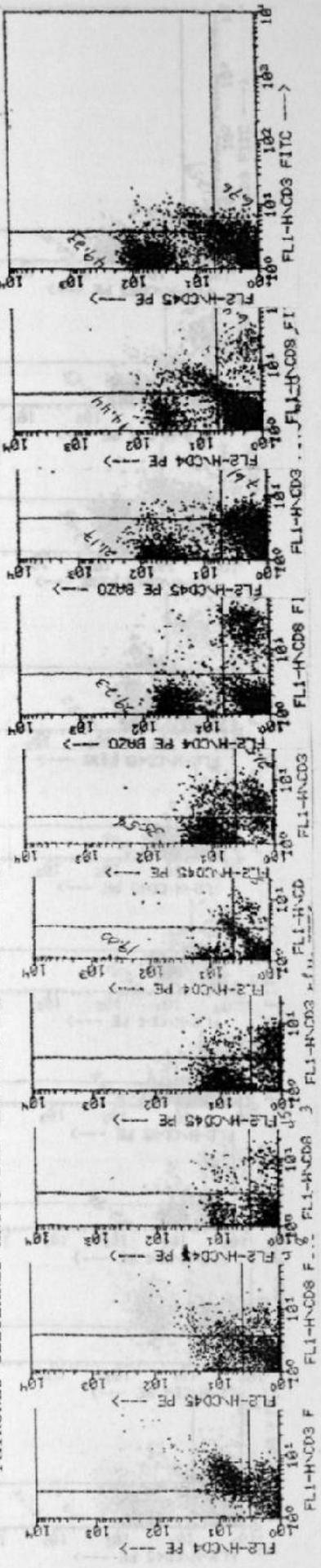
En resumen, en el bazo de ratones BALB/c no se identificó efecto de concentración del antígeno particulado, *N. brasiliensis* muerta por calor o por radiación U.V., sobre las subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+, hasta los 90 días posteriores a la primoinmunización ($p > 0.05$); en cambio, al final del período de estudio (150 días) el efecto de la concentración del antígeno particulado resultó aparente: las poblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+ fueron inferiores a su valor basal, la primera en 40% y 20% para las concentraciones de antígeno baja-media y alta respectivamente y, la segunda en 28% y 14% para las dosis de antígeno baja y media-alta. Los linfocitos BCD45R+ mostraron tendencia a permanecer en valores más altos en animales inmunizados con la concentración intermedia de antígeno (10^7 UFC); a los 150 días la densidad celular fue 28% mayor a su nivel basal, independientemente de la dosis del antígeno particulado. También fue notable que las poblaciones CD4+ y CD8+ en ningún momento fueron mayores a la población CD45R+, en tanto que ésta sí mostró algunas cifras semejantes a las de CD4+ (figuras Nos.20-23).

FIGURA No.24 GRAFICAS DE PUNTOS QUE MUESTRAN LOS PATRONES CELULARES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TCD3+, TCD4+, TCD8+ Y B(CD45R+) SEGUN SU TAMAÑO CELULAR (POSICION EN EL EJE DE ABCISAS) Y SU COMPLEJIDAD CITOPLASMICA (POSICION EN EL EJE DE ORDENADAS). LAS POBLACIONES CELULARES SE OBTUVIERON DE BAZO DE RATONES BALB/c PRIMOINMUNIZADOS CON 10^5 UFC DE ANTIGENO PARTICULADO.

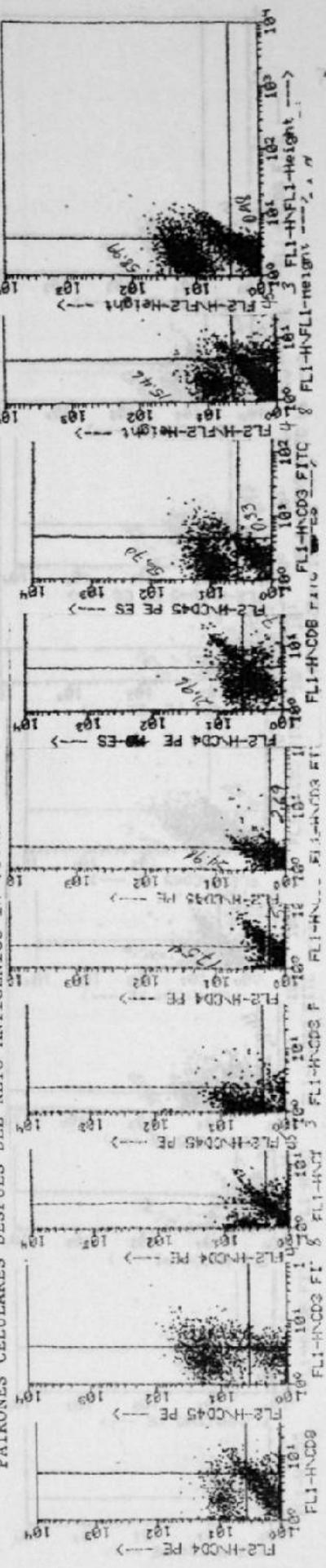


Células de bazo, patrón testigo (tiempo cero)

PATRONES CELULARES ANTES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO



PATRONES CELULARES DESPUES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO



7 15 DIAS PO 30 - INMUNIZACION 90 150 72

FIGURA No.25 GRAFICAS DE PUNTOS QUE MUESTRAN LOS PATRONES CELULARES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TCD3+, TCD4+, TCD8+ Y B(CD45R+) SEGUN SU TAMAÑO CELULAR Y COMPLEJIDAD CITOPASMICA. LAS POBLACIONES CELULARES SE OBTUVIERON DE BAZO DE RATONES BALB/c PRIMINOINUNIZADOS CON 10⁷ UFC DE ANTIGENO PARTICULADO.

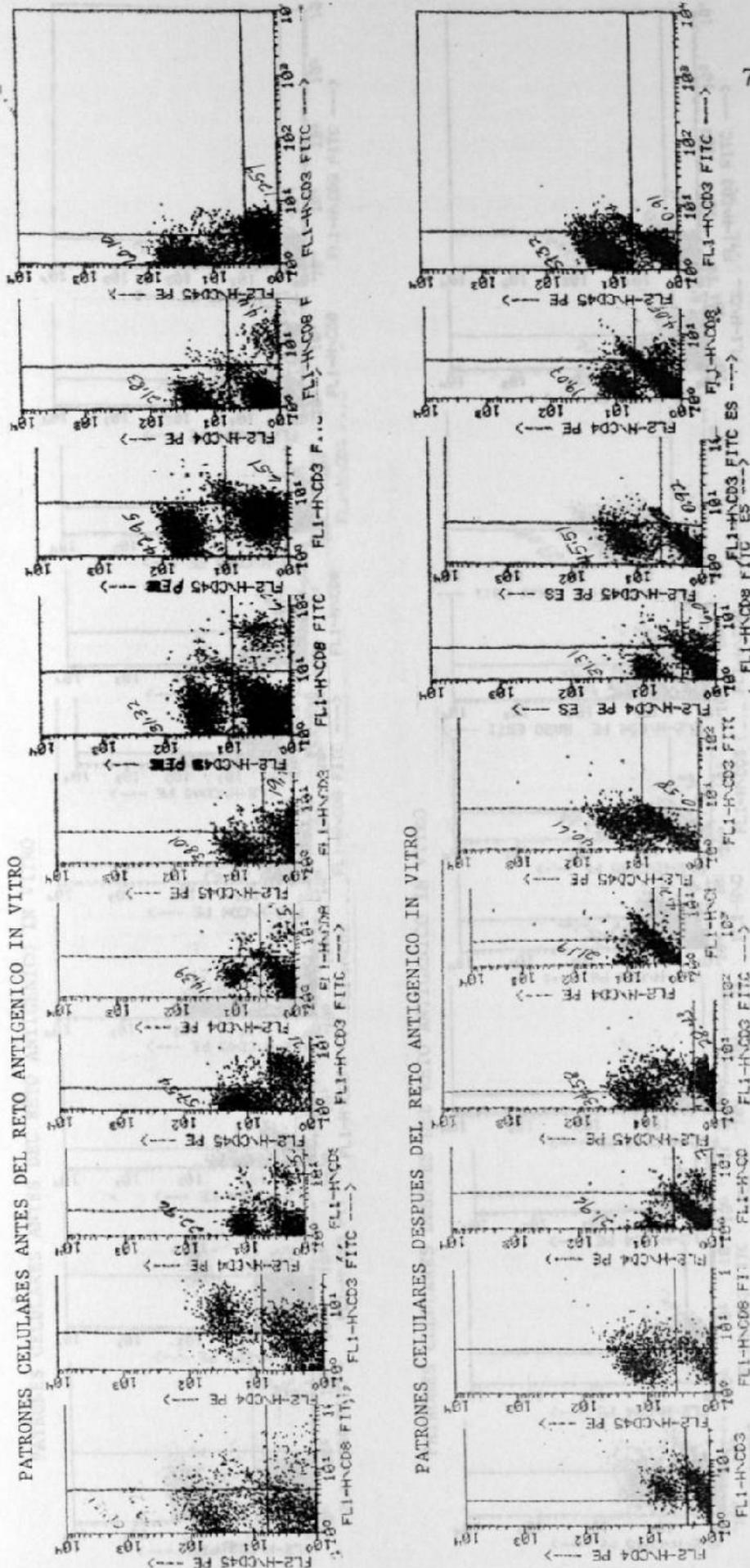
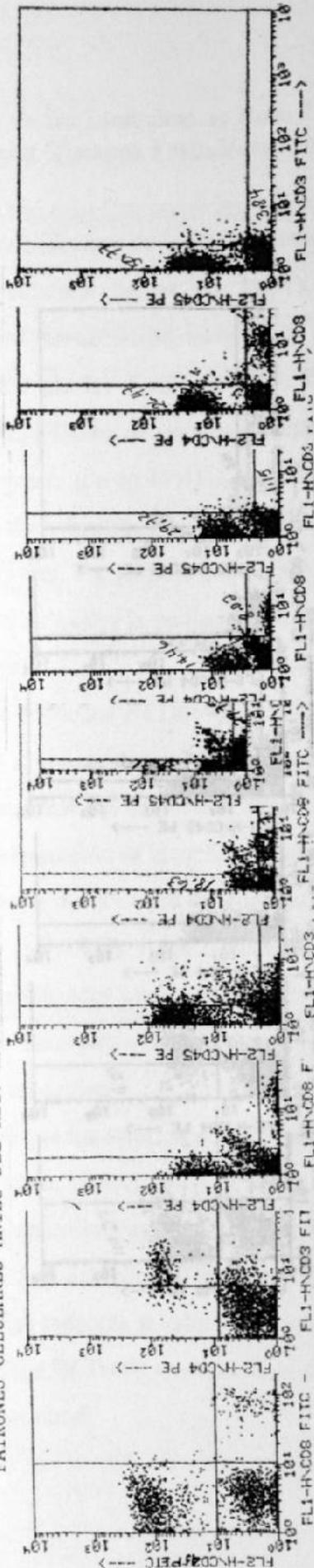
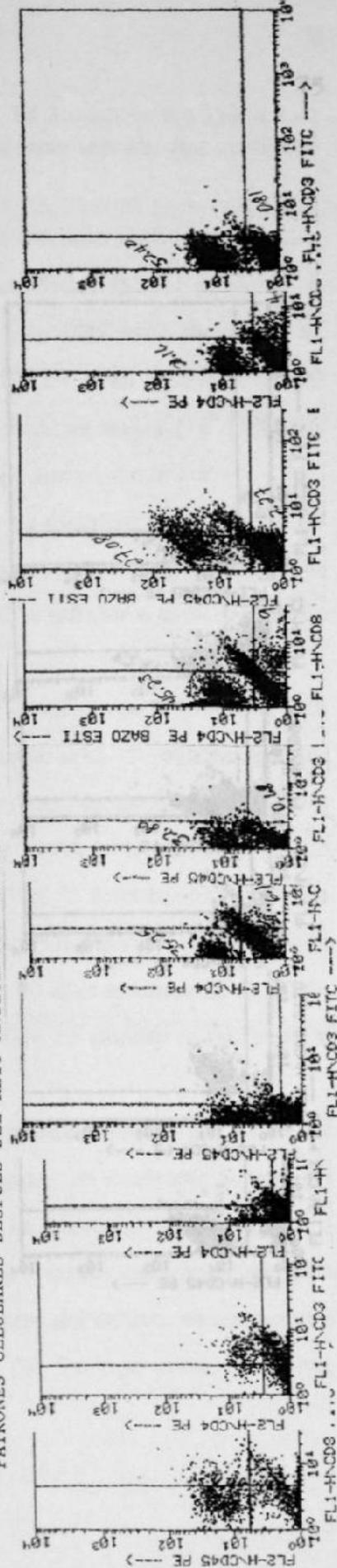


FIGURA No.26 GRAFICAS DE PUNTOS QUE MUESTRAN LOS PATRONES CELULARES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TCD3+, TCD4+, TCD8+ Y B(CD45R+) SEGUN SU TAMAÑO CELULAR Y COMPLEJIDAD CITOPASMICA. LAS POBLACIONES CELULARES SE OBTUVIERON DE BAZO DE RATONES BALB/c PRIMOVINUNIZADOS CON 10⁹ UFC DE ANTIGENO PARTICULADO.

PATRONES CELULARES ANTES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO



PATRONES CELULARES DESPUES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO



DIAS POST-IMUNIZACION

7

15

30

90

150

74

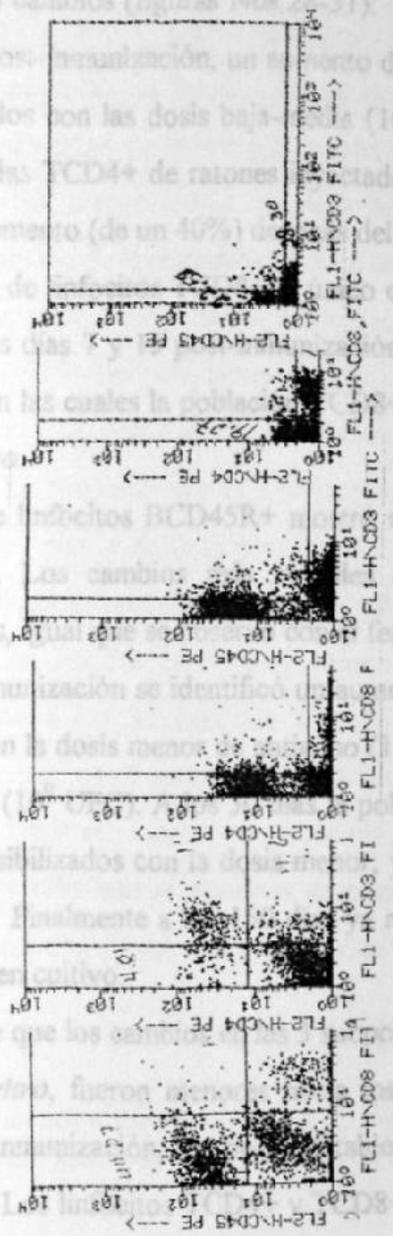
2.2.2.3 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo Después del Estimulo Antigénico en Cultivo, en Diferentes Tiempos Posteriores a la Primoinmunización con Antígeno Particulado.

El fenotipo de los linfocitos de bazo en la respuesta al estímulo antigénico *in vitro*, sufrió los siguientes cambios (figuras Nos 25-31). Para las células TCD4+ se identificó a los 15 y 30 días post-primoinmunización, un aumento de 50% y de 30% respectivamente, en los ratones inyectados con las dosis bajas (10^1 y 10^2 UFC), en cambio a los 15 y 30 días fueron las células TCD4+ de ratones inyectados con la dosis mayor (10^3 UFC) que mostraron incremento (de un 40%) en el número de células TCD4+ en el estímulo antigénico *in vitro*.

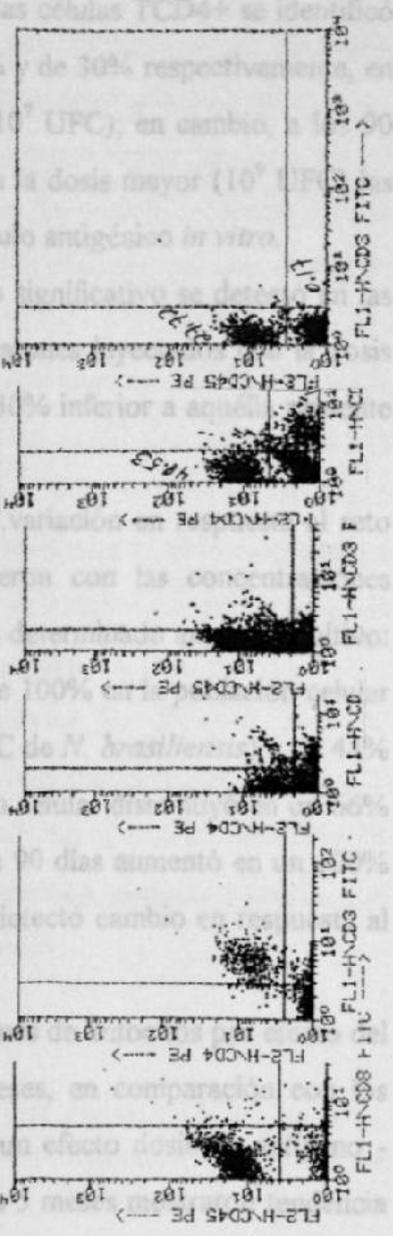
En la población de linfocitos BCD45R+ se observó un cambio significativo en el número de células obtenidas los días 15 y 30 días post-primoinmunización con las dosis mayor (10^3 UFC) en las cuales la población de linfocitos BCD45R+ aumentó en un 30% inferior a aquélla obtenida en el estímulo antigénico *in vitro*.

FIGURA No.27 GRAFICAS DE PUNTOS QUE MUESTRAN LOS PATRONES CELULARES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TCD3+, TCD4+, TCD8+ Y B(GD45R+) SEGUN SU TAMAÑO CELULAR Y COMPLEJIDAD CITOPLASMICA. LAS POBLACIONES CELULARES SE OBTUVIERON DE GANGLIO LINFATICO POPLITEO DE RATONES BALB/c PRIMOINMUNIZADOS CON 10^3 UFC DE ANTIGENO PARTICULADO.

PATRONES CELULARES ANTES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO



PATRONES CELULARES DESPUES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO



DIAS POST-IMMUNIZACION

30

15

7

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.

El fenotipo de los linfocitos de bazo en la respuesta al estímulo antigénico *in vitro*, sufrió los siguientes cambios (figuras Nos.28-31): Para las células TCD4+ se identificó a los 15 y 30 días post-inmunización, un aumento de 50% y de 30% respectivamente, en los ratones inyectados con las dosis baja-media (10^3 y 10^7 UFC); en cambio, a los 90 días fueron las células TCD4+ de ratones inyectados con la dosis mayor (10^9 UFC) las que mostraron incremento (de un 40%) después del estímulo antigénico *in vitro*.

En la población de linfocitos TCD8+ el único cambio significativo se detectó en las células obtenidas los días 7 y 15 post-inmunización, de ratones inyectados con la dosis mayor (10^9 UFC), en las cuales la población TCD8+ fue 30% inferior a aquella presente antes del reto *in vitro*.

La población de linfocitos BCD45R+ mostró mayor variación en respuesta al reto antigénico *in vitro*. Los cambios más notables ocurrieron con las concentraciones antigénicas extremas, igual que se observó con el fenotipo determinado antes del cultivo: a los 7 días post-inmunización se identificó un aumento de 100% en la población celular primoinmunizada con la dosis menor de antígeno (10^3 UFC de *N. brasiliensis*) y de 44% para la dosis mayor (10^9 UFC). A los 30 días la población celular disminuyó en un 66% en los linfocitos sensibilizados con la dosis menor, y a los 90 días aumentó en un 100% para la dosis mayor. Finalmente a los 150 días ya no se detectó cambio en respuesta al estímulo antigénico en cultivo.

Podría resumirse que los cambios en las 3 subpoblaciones de linfocitos por efecto del reto antigénico *in vitro*, fueron menores hacia los 5 meses, en comparación con los primeros días post-inmunización, sin poder establecerse un efecto dosis de antígeno - cambio en fenotipo. Los linfocitos TCD4+ y TCD8+ a los 5 meses mostraron tendencia a permanecer en cifras menores al valor basal, igual que antes del cultivo, en tanto que la población de linfocitos BCD45R+ conservó la cifra alta del fenotipo previo al cultivo, 40% superior al valor basal.

2.2.2.2.4 Fenotipo de los Linfocitos de GLP en Diferentes Tiempos Después de la Primoinmunización con Antígeno Particulado.

En los linfocitos de ganglio linfático poplíteo el efecto de la dosis y del estado físico del antígeno fue bien aparente (figuras Nos.21 y 23): Sólo la dosis mayor (10^9 UFC) del antígeno particulado (*N. brasiliensis* muerta por calor o por radiación U.V.) fue capaz de estimular respuesta en las células de GLP en la magnitud requerida para efectuar su análisis. Así mismo el tiempo posterior a la inmunización fue importante ya que a los 90 días el tejido en GLP había regresado a su estado basal y no fue posible recuperar células para realizar la evaluación de la respuesta inmune celular. No obstante que la cantidad de linfocitos TCD8+ fue menor que la de las subpoblaciones TCD4+ y BCD45R+, sufrió un cambio dramático a los 7 días post-inmunización con un aumento de un 300% el valor de referencia en bazo (7%), con tendencia al nivel basal hacia los 30 días posteriores a la primoinmunización. La subpoblación TCD4+ aumentó en un 80% su nivel de referencia en bazo (25%), a los 7 días, y después presentó la misma tendencia en el tiempo que los linfocitos TCD8+. El comportamiento de la subpoblación BCD45R+ fue diferente, a los 7 días su cantidad fue inferior en 56% al valor de referencia en bazo (43%), luego aumentó y finalmente a los 30 días fue nuevamente inferior (en 20%) al valor de referencia. Notablemente, en el curso de los 30 días post-inmunización, los linfocitos T (CD4+ y CD8+) en GLP estuvieron presentes en cantidad mayor que los linfocitos B (CD45R+), contrario a lo que se observó en bazo, donde esta población celular fue superior a la de los linfocitos T durante los 150 días de estudio.

2.2.2.2.5 Fenotipo de los Linfocitos de GLP, Después del Estímulo Antigénico en Cultivo, en Diferentes Tiempos Posteriores a la Primoinmunización con Antígeno Particulado.

Después del reto antigénico *in vitro* las poblaciones celulares TCD8+ y TCD4+ mostraron diferente comportamiento que los linfocitos BCD45R+ (figuras Nos.21,23,29,31): A tiempos cortos (7-15 días) después de la inmunización las primeras estuvieron presentes en cantidad menor (en 55%) a aquella antes del cultivo, en tanto que las últimas fueron 74% superiores; en tiempos posteriores el comportamiento se

invirtió, las primeras tendieron a aumentar (en 40-50%) y las últimas a disminuir (15%). Para los linfocitos CD4+ y CD8+ los niveles determinados después del cultivo siempre fueron superiores al valor de referencia pre-cultivo, en tanto que los de CD45R+ fueron inferiores, fenómeno contrario al que se observó en bazo. La población CD45R+ derivada de GLP mostró mayor tendencia a disminuir en el cultivo, en comparación con aquella de bazo.

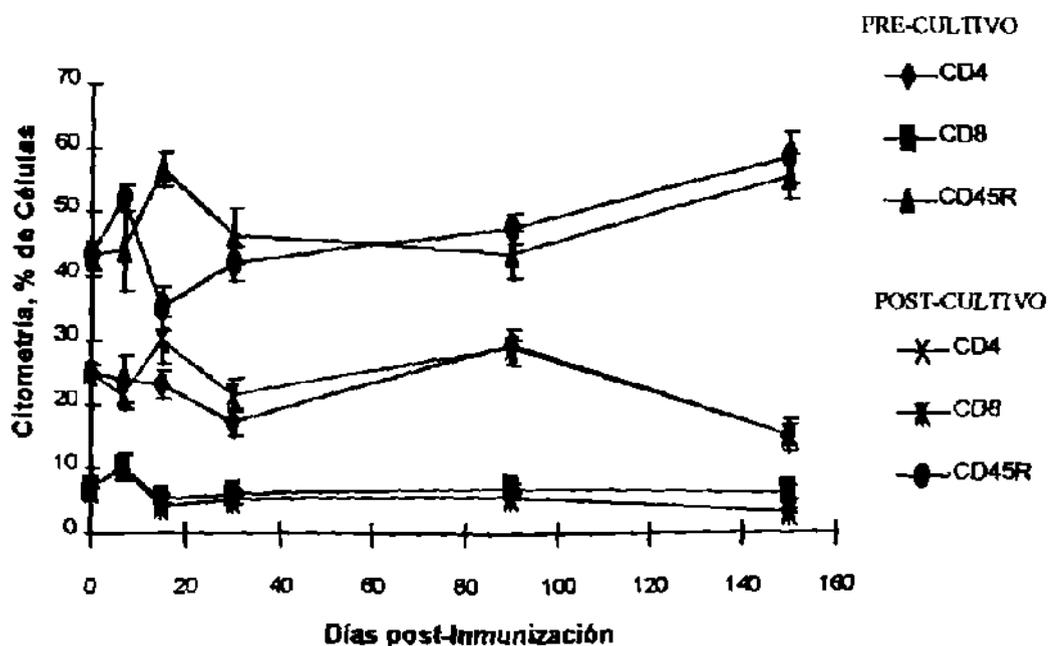
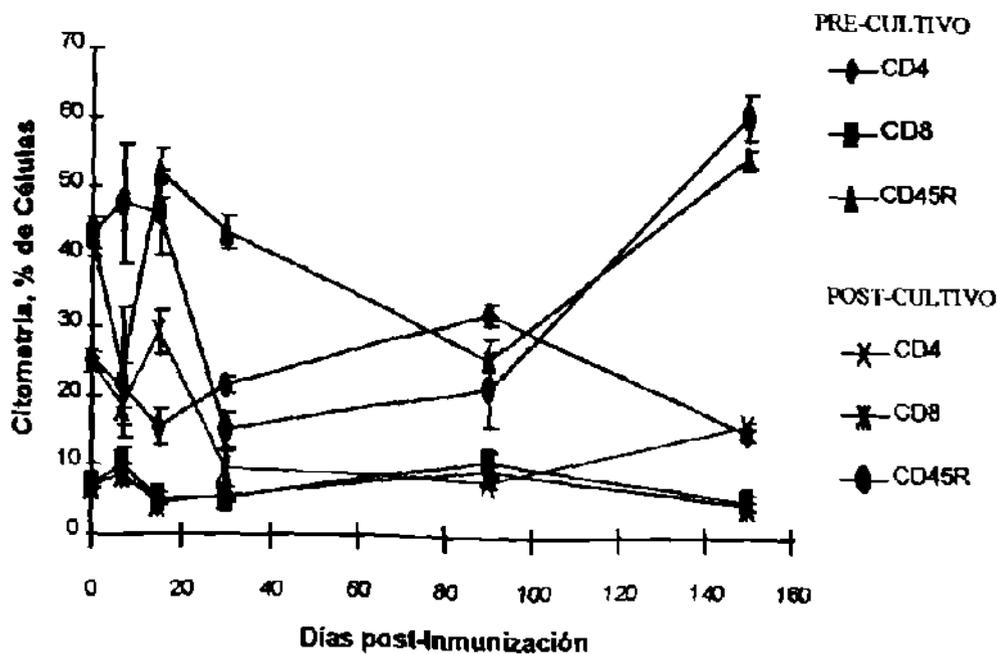


Figura No.28 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^5 UFC (gráfica superior) y 10^7 UFC (gráfica inferior) del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. En cada caso se muestran los fenotipos pre- y post-reto antigénico en cultivo determinados en diferente tiempo posterior a la primoinmunización.

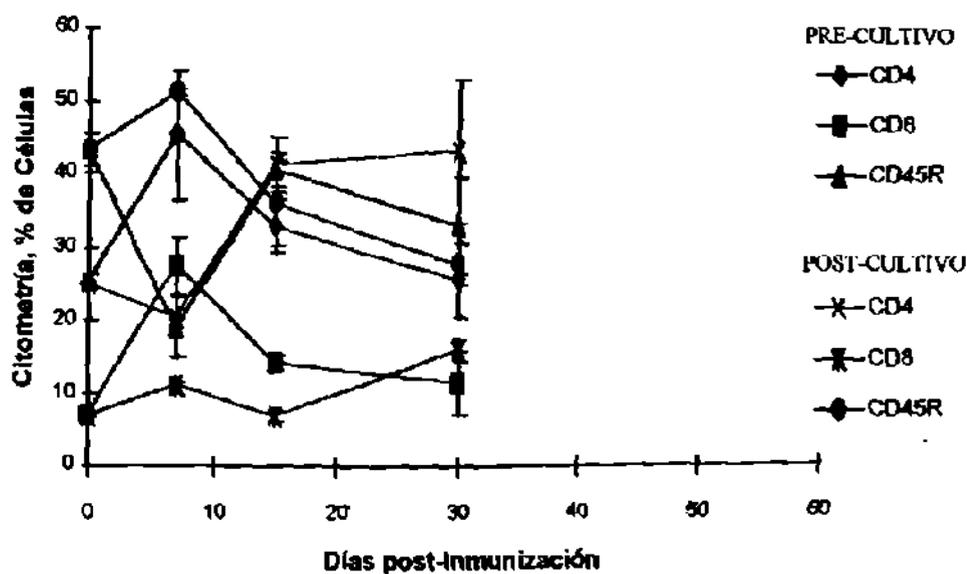
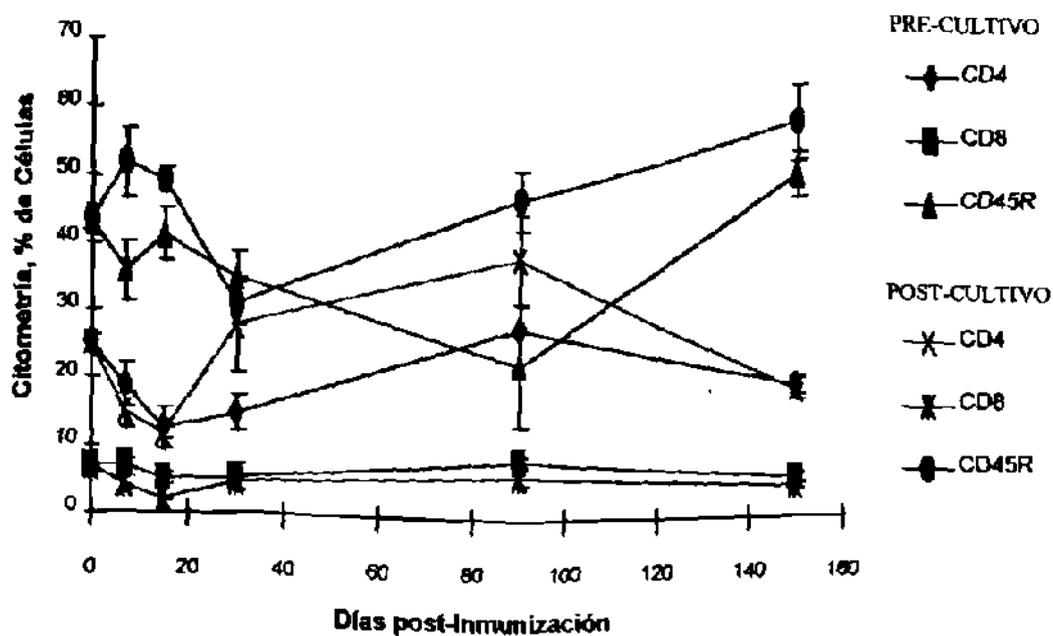


Figura No.29 Fenotipo de linfocitos de bazo (gráfica superior) y de GLP (gráfica inferior) de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con calor. En cada caso se muestran los fenotipos pre- y post-reto antigénico en cultivo determinados en diferente tiempo posterior a la primoinmunización.

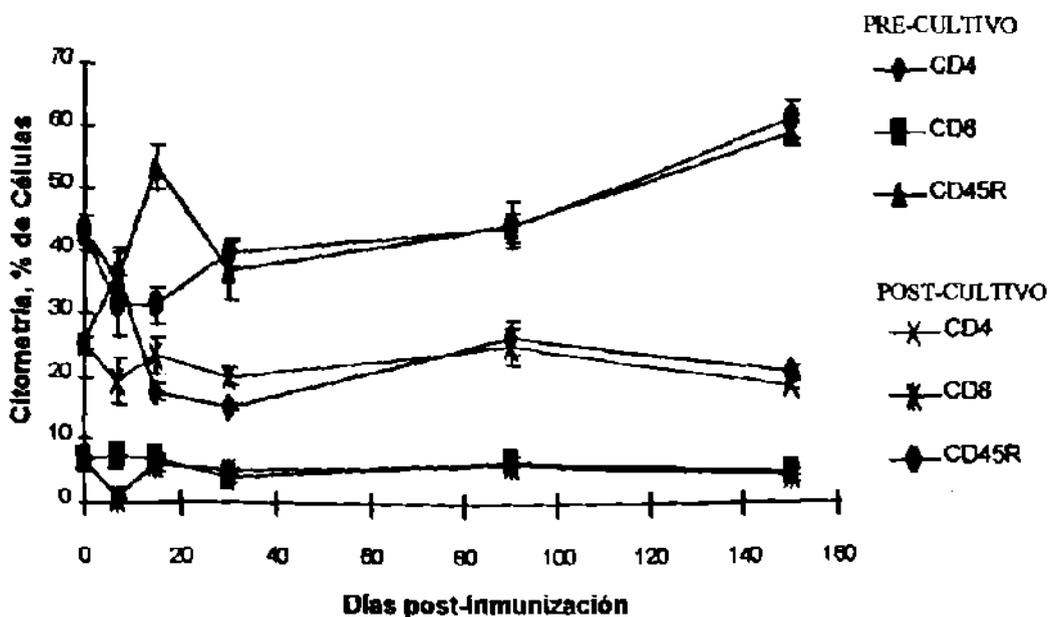
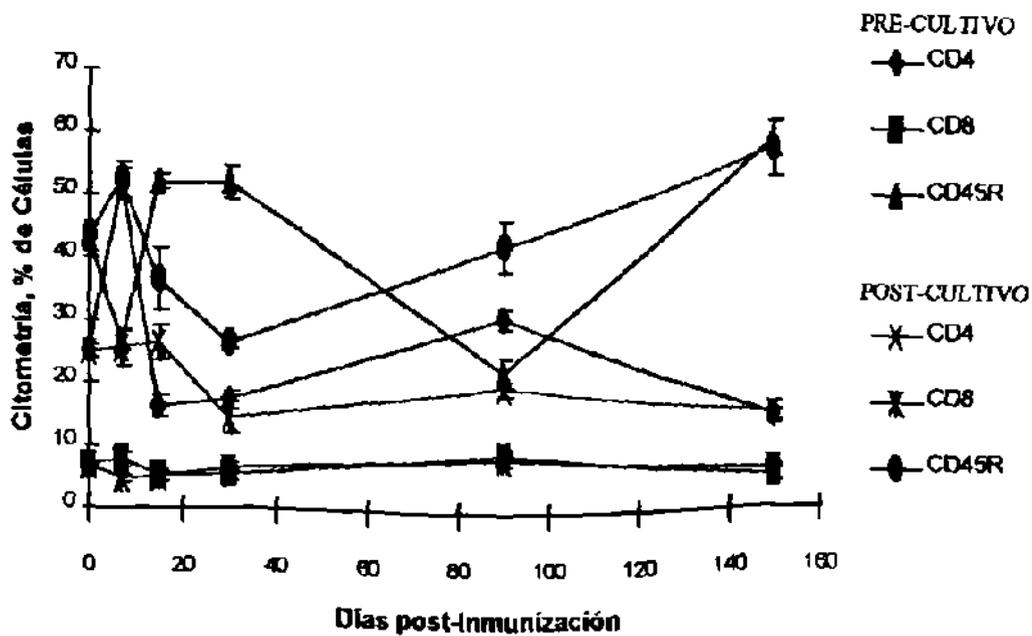


Figura No.30 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^3 UFC (gráfica superior) y 10^7 UFC (gráfica inferior) del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. En cada caso se muestran los fenotipos pre- y post-reto antigénico en cultivo determinados en diferente tiempo posterior a la primoinmunización.

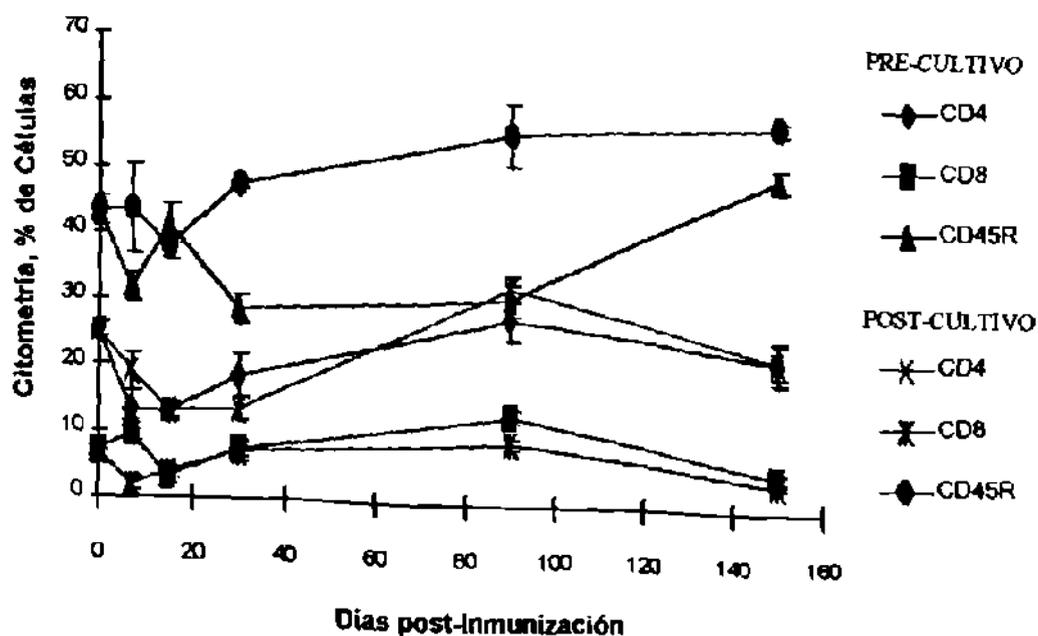


Figura No.31 Fenotipo de linfocitos de bazo (gráfica superior) y de GLP (gráfica inferior) de ratones BALB/c primoinmunizados con 10^9 UFC del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta con radiación U.V. En cada caso se muestran los fenotipos pre- y post-reto antigénico en cultivo determinados en diferente tiempo posterior a la primoinmunización.

2.2.2.3 Efecto del Antígeno Soluble.

2.2.2.3.1 Fenotipo de los Linfocitos de Bazo en Diferentes Tiempos Después de la Primoinmunización con Antígeno Soluble.

En general, no se encontró una relación entre los niveles de las poblaciones celulares TCD4+ y TCD8+ de bazo de ratón y el efecto de concentración del antígeno soluble (5, 40, 100 y 300 μ g), en los diferentes tiempos posteriores a la primoinmunización ($p=0.1$ hasta $p>0.2$), a excepción del valor de CD4+ a los 90 días que fue mayor, en 65%, con la dosis menor (5 μ g). En cambio, la subpoblación de linfocitos BCD45R+ varió en función tanto de la concentración del antígeno como del tiempo post-inmunización: en el día 7 la población fue mayor (80%) para las dosis más altas (100 y 300 μ g), al día 15 esta relación se invirtió y al día 30 no se encontró diferencia entre las 4 dosis de antígeno; finalmente, a partir de los 3 meses fue aparente un efecto de concentración del antígeno soluble, en relación directa, sobre la cantidad de linfocitos BCD45R+: Incremento de 55% para las dosis altas y 45% y 25% para las dosis de 40 μ g y de 5 μ g respectivamente, a los 3 meses, y 62% para las dosis altas y 42% para las dosis bajas a los 5 meses posteriores a la inmunización (fig. No.32).

El efecto del antígeno soluble (E.C.) de *N. brasiliensis* sobre el fenotipo de los linfocitos de bazo fue semejante, en general, al efecto ejercido por el antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta por calor o por radiación U.V., ésto es, leve variación en las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+ y mayor variación en la subpoblación BCD45R+ (figuras Nos.20-23 y 32), si bien el antígeno soluble resultó en cifras mayores (en 50%) de linfocitos BCD45R+, en forma independiente de concentración de antígeno hasta los 15 primeros días posteriores a la primoinmunización, después el efecto tendió a cambiar de manera que a los 5 meses las concentraciones mayores del antígeno soluble, E.C., resultaron en niveles 5-15% superiores (sin diferencia estadística) a los obtenidos con el antígeno particulado en cualquiera de sus dosis ($p < o$ igual 0.05 hasta $p=0.1$), en tanto que las concentraciones menores del antígeno soluble resultaron en poblaciones 10-20% menores (diferencia en el límite de la significancia estadística) que aquéllas obtenidas con las diferentes dosis del antígeno particulado (figuras Nos.20-23 y 32).

En general, en la población de linfocitos TCD8+ no se encontró diferencia ni por efecto de concentración de antígeno ni por efecto de tiempo, con respecto al antígeno particulado. Así mismo, en la población TCD4+ de ratones primoinmunizados con las dosis media y altas del antígeno soluble E.C. (40 y 100 y 300µg respectivamente), los patrones celulares registrados por el citómetro de flujo fueron más constantes, en tanto que el patrón de células de animales inyectados con la dosis menor (5µg) fue variable, en forma semejante al que se obtuvo de los linfocitos derivados de ratones inmunizados con el antígeno particulado en cualquiera de sus dosis (10^3 , 10^7 y 10^9 UFC de *N. brasiliensis* muerta por calor o por radiación U.V.). A los 150 días post-inmunización las poblaciones TCD4+ y TCD8+ de ratones sensibilizados con el antígeno soluble regresaron a su valor basal, en tanto que con el antígeno particulado fueron inferiores a dicho valor en forma dependiente, directamente, de la concentración de antígeno (figuras Nos.20-23 y 32).

En resumen, los patrones de variación en el tiempo de las poblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en función de la concentración de los antígenos soluble o particulado, son semejantes, siendo constante la tendencia hacia una cantidad de células ligeramente superior (valores de p en el umbral de la significancia estadística, $p > 0.02$ y < 0.05) con el antígeno soluble que con el particulado. Para la población de linfocitos BCD45R+ se observó que a dosis mayor de antígeno soluble (100 y 300µg vs 5 y 40µg), aumento mayor de la cantidad de células BCD45R+ en un tiempo menor (7 vs 15 días); así mismo este nivel de las células permaneció alto (a los 150 días superior en 60-65%), por lo tanto en esta subpoblación de linfocitos sí fue aparente un efecto de concentración del antígeno soluble E.C., en forma directamente proporcional. También se detectó efecto de forma física del antígeno en asociación con dosis del antígeno y tiempo post-inmunización; así, dosis bajas del antígeno soluble a tiempos cortos fueron mejores estimulantes de la población BCD45R+, que el antígeno particulado en cualquier dosis y tiempo, pero las dosis bajas del antígeno soluble a tiempos mayores mostraron efecto similar que el antígeno particulado en cualquier dosis y tiempo. Por otra parte, las dosis altas del antígeno soluble, en cualquier tiempo, fueron mejores que el antígeno particulado en cualquier dosis y tiempo. El efecto de forma física del antígeno fue notable también sobre el tejido linfoide de bazo y de GLP; como ya se mencionó, el

antígeno soluble ni aún en su concentración más alta, fue capaz de estimular en GLP respuesta inmune celular detectable mediante la metodología utilizada.

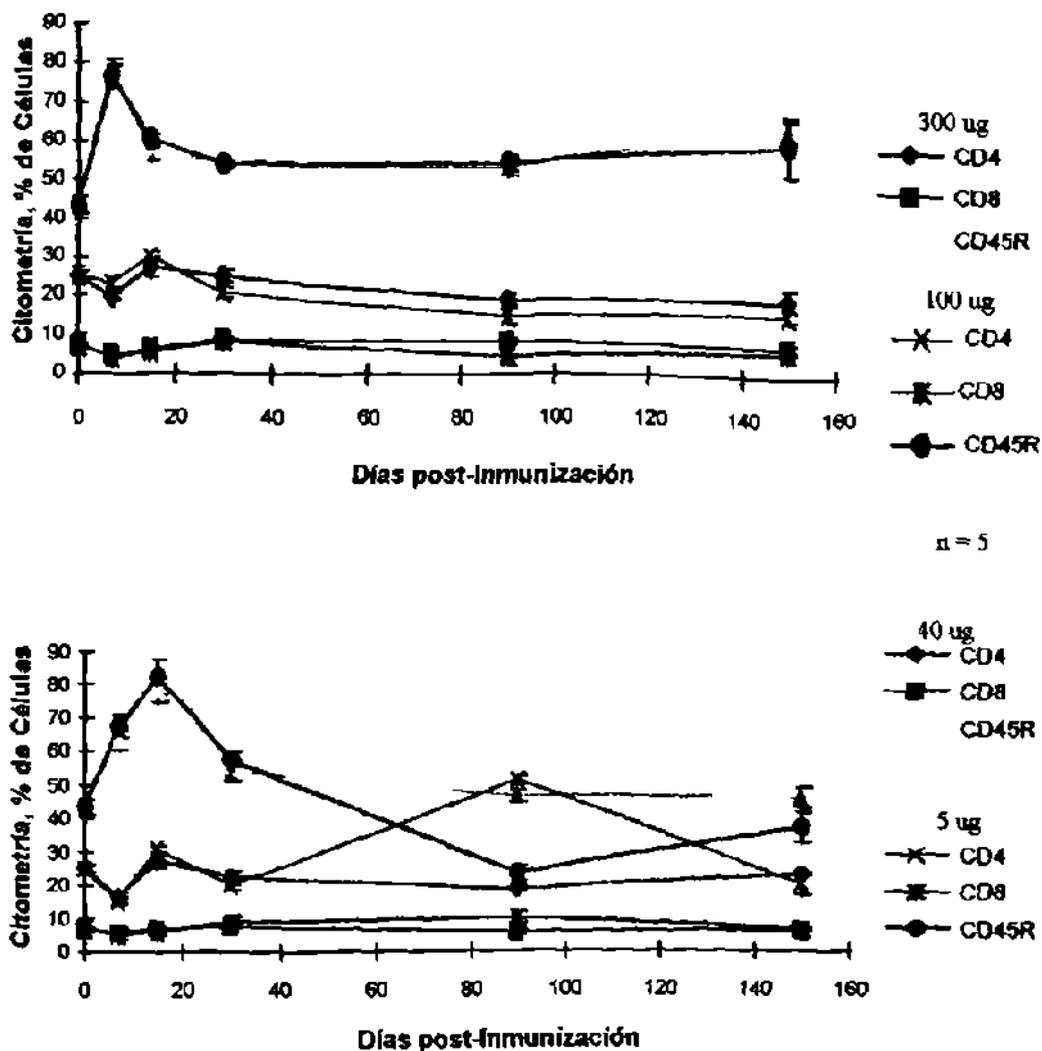


Figura No.32 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con diferentes concentraciones (5, 40, 100 y 300µg de proteína) del antígeno soluble de *N. brasiliensis*. El fenotipo se determinó en los diferentes días post-inmunización señalados en la gráfica.

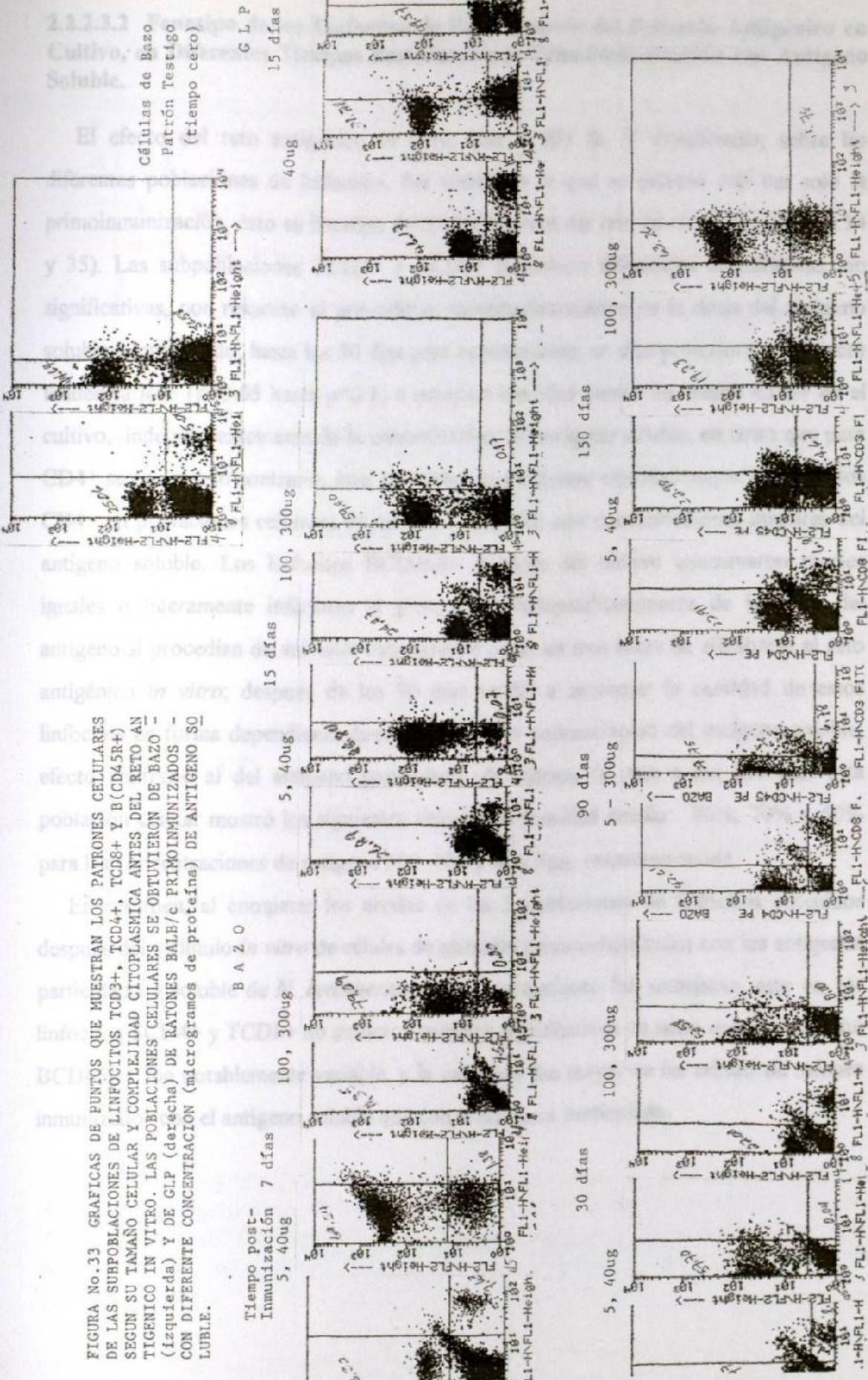


FIGURA No.33 GRAFICAS DE PUNTOS QUE MUESTRAN LOS PATRONES CELULARES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TCD3+, TCD4+, TCD8+ Y B(CD45R+) SEGUN SU TAMAÑO CELULAR Y COMPLEJIDAD CITOPLASMICA ANTES DEL RETO ANTIGENICO IN VITRO. LAS POBLACIONES CELULARES SE OBTUVIERON DE BAZO (izquierda) Y DE G.L.P (derecha) DE RATONES BALE/c PRIMOVINUNIZADOS CON DIFERENTE CONCENTRACION (microgramos de proteina) DE ANTIGENO SOLUBLE.

BAZO G.L.P
 Tiempo post-Immunización 7 días 15 días 30 días 90 días 150 días
 5, 40ug 100, 300ug 5, 40ug 5, 40ug 100, 300ug 5, 40ug 100, 300ug 5, 40ug 100, 300ug

Células de Bazo
 Patrón Testigo
 (tiempo cero)

primovinunizados
 y 35). Las
 significativa
 cultivo, in
 antigeno soluble. Las
 iguales y
 antigeno al proceden
 antigeno in vitro de

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.

El efecto del reto antigénico *in vitro*, con la fID de *N. brasiliensis*, sobre las diferentes poblaciones de linfocitos, fue semejante al que se detectó con tan solo la primoinmunización, ésto es fenotipo determinado antes del reto *in vitro* (figuras Nos.34 y 35). Las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+ mostraron diferencias cuantitativas, no significativas, con respecto al pre-cultivo, independientemente de la dosis del antígeno soluble administrado, hasta los 30 días post-inmunización; en días posteriores se detectó tendencia leve ($p=0.05$ hasta $p<0.1$) a expresar cantidad menor de células CD8+ en el cultivo, independientemente de la concentración del antígeno soluble, en tanto que para CD4+ se observó lo contrario, ésto es, tendencia a expresar cantidad mayor de linfocitos CD4+ en poblaciones celulares de ratones inyectados con concentraciones menores del antígeno soluble. Los linfocitos BCD45R+ después del cultivo conservaron niveles iguales o ligeramente inferiores al pre-cultivo, independientemente de la dosis del antígeno si procedían de animales inmunizados hasta un mes antes de efectuarse el reto antigénico *in vitro*; después de los 90 días tendió a aumentar la cantidad de estos linfocitos en forma dependiente directamente de la concentración del antígeno soluble, efecto contrario al del antígeno particulado, de manera tal que a los 150 días esta población celular mostró los siguientes valores de densidad celular: 80%, 70% y 50% para las concentraciones de antígeno 300, 100 y 40 y 5 μ g, respectivamente.

En resumen, al comparar los niveles de las 3 poblaciones de linfocitos obtenidos después del estímulo *in vitro* de células de animales primoinmunizados con los antígenos particulado y soluble de *N. brasiliensis*, el comportamiento fue semejante, ésto es, los linfocitos TCD4+ y TCD8+ no sufrieron cambios significativos en tanto que la población BCD45R+ fue notablemente variable, y la variación fue mayor en las células de ratones inmunizados con el antígeno soluble que con el antígeno particulado.

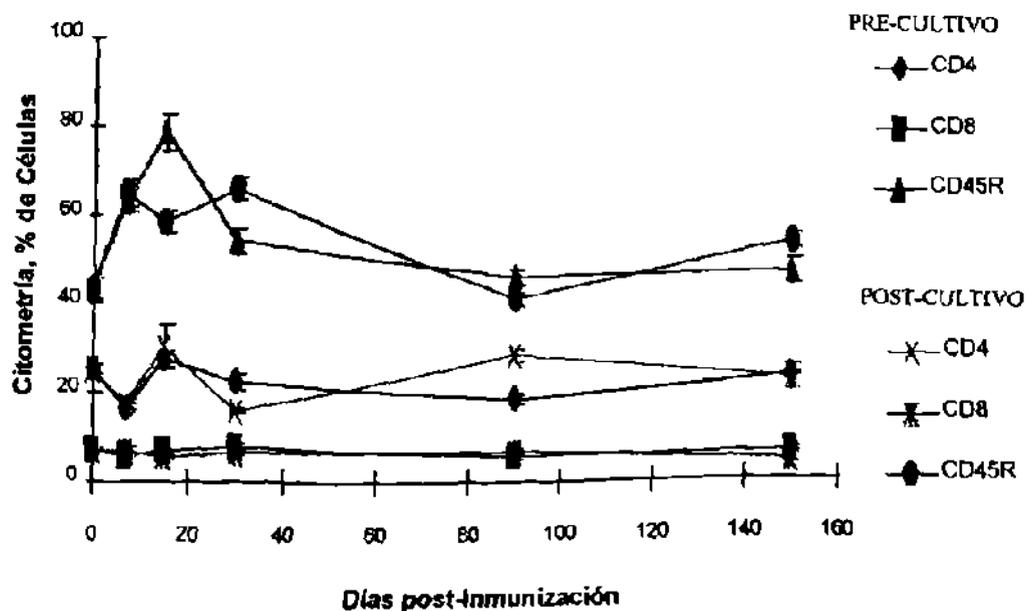
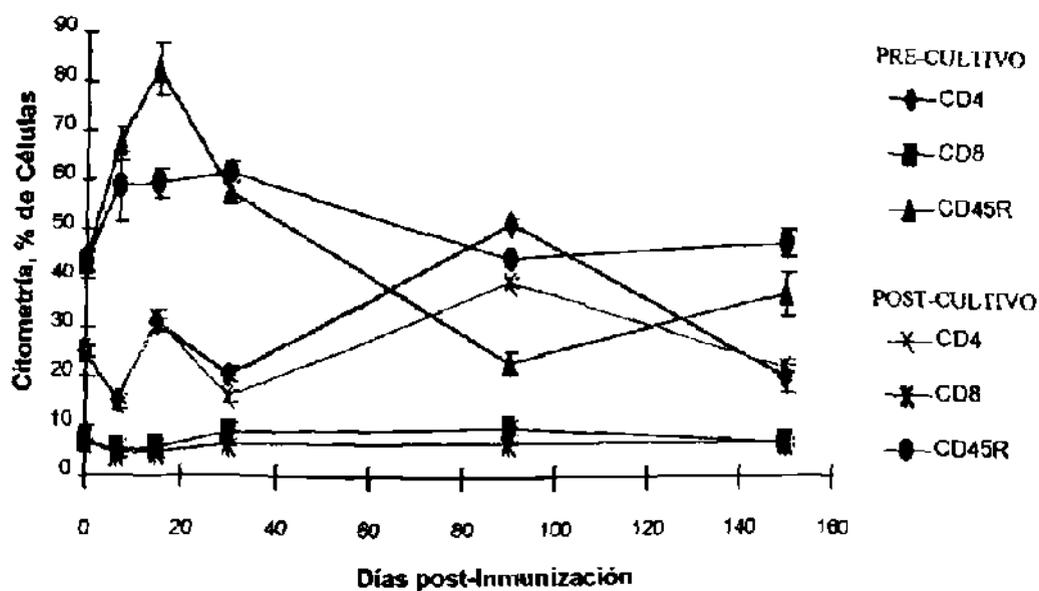


Figura No.34 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 5 microgramos (gráfica superior) y 40 microgramos (gráfica inferior) de antígeno soluble Extracto Crudo de *N. brasiliensis*. En cada caso se muestran los fenotipos pre- y post-reto antigénico en cultivo, determinados en diferente tiempo posterior a la primoinmunización.

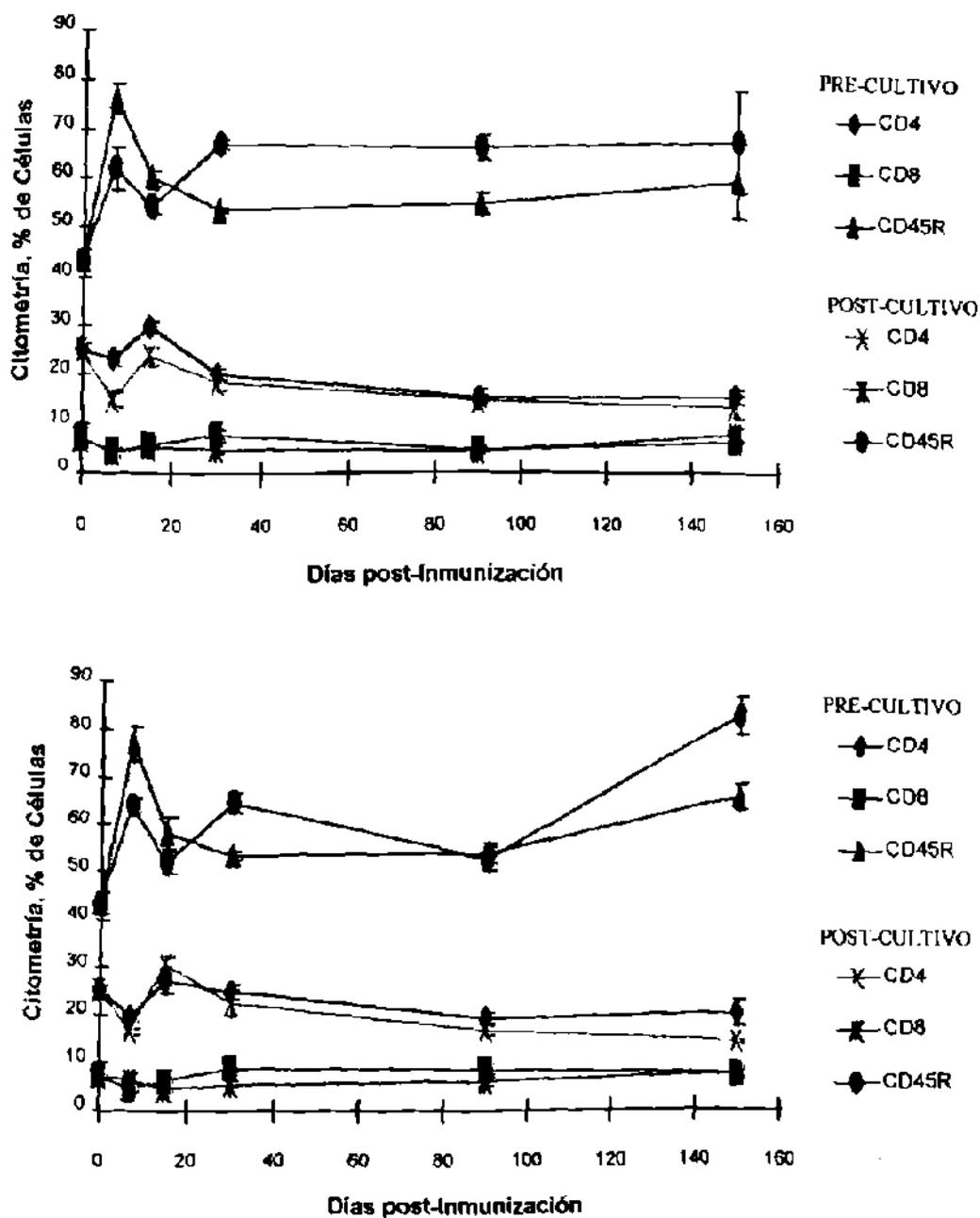


Figura No.35 Fenotipo de linfocitos de bazo de ratones BALB/c primoinmunizados con 100 microgramos (gráfica superior) y 300 microgramos (gráfica inferior) de antígeno soluble Extracto Crudo de *N. brasiliensis*. En cada caso se muestran los fenotipos pre- y post-reto antigénico en cultivo, determinados en diferente tiempo posterior a la primoinmunización.

2.2.2.4 Análisis de la Población de Linfocitos TCD3+.

No obstante que la determinación de la cantidad de linfocitos TCD3+ se realizó simultáneamente con las de los linfocitos TCD4+, TCD8+ y BCD45R+, los resultados de su análisis no se incluyeron en este reporte porque los valores obtenidos fueron no solo imprecisos sino además frecuentemente irreales, ésto es, cifras hasta 90-100% inferiores a la suma de los linfocitos CD4+ y CD8+. El análisis de los registros proporcionados por el citómetro de flujo reveló patrones celulares en los cuales no fue factible delimitar la población TCD3+ (figuras Nos.24-27 y 33). Este mismo fenómeno ocurrió con las otras 3 subpoblaciones de linfocitos analizadas después del reto antigénico *in vitro*, y ocasionalmente en el análisis pre-cultivo. Así, en este trabajo los patrones celulares en los cuales se expresaron amplios rangos de tamaño y complejidad celular, resultaron en cifras de los marcadores CD4, CD8 y CD45R con grandes desviaciones estándar, o bien, con valores no reales o no aceptables; también se obtuvieron patrones celulares muy diferentes y que sin embargo mostraron cifras de células fluorescentes iguales o muy semejantes. De estos resultados, entonces, surge la necesidad de considerar además de la información numérica, cuantitativa, la información cualitativa que contiene el patrón celular ya que éste expresa cambios no sólo de la presencia del marcador celular fluorescente de interés, sino también del tamaño y de la complejidad interna de las células, características que pueden ser modificadas con el tratamiento a que se someten las células y que, en última instancia revelan también efectos del mismo, efectos que comúnmente no se perciben ni se evalúan, pero que sí son reportados por el citómetro de flujo según lo muestran los resultados aquí presentados.

DISCUSION

Las enfermedades infecciosas, en sus distintas presentaciones, constituyen aún el problema principal de salud pública en muchos países del mundo (16-18), entre ellos México (1,5). Una forma de resolver este problema es la de conocer la relación que se establece entre el huésped inmunocompetente y el agente infeccioso, con el propósito de diseñar medidas que favorezcan la respuesta o la resistencia inmune del primero hacia el segundo.

La respuesta inmune a la infección es una red compleja de eventos bioquímicos cuya iniciación, sostenimiento y terminación dependen de una variedad de factores tanto del agente infeccioso como del hospedero, factores que determinan la participación diferencial de las subpoblaciones de células tanto propias como ajenas al sistema inmune y de sus respectivos mediadores solubles, de todo lo cual depende, en última instancia, el conjunto de procesos biológicos que caracteriza la patología asociada a un agente infeccioso (16-18, 39-47). En este caso particular, el estudio de la respuesta inmune a la infección por el patógeno intracelular *Nocardia brasiliensis*, se demuestra que tanto la concentración del antígeno primoinmunizante como su estado físico, y al parecer su naturaleza química según nuestras observaciones preliminares, no sólo modulan la intensidad y permanencia de la respuesta inmune mediada tanto por anticuerpos como por células, sino que además seleccionan la presencia, y su consecuente actividad, de ciertas sub-poblaciones de linfocitos, tal como era de esperarse de los antecedentes bibliográficos reportados para diversos antígenos, diferentes a *N. brasiliensis* (33-46,48-50,53-57,61,65,66,82).

La respuesta inmune humoral, medida en función de la cantidad de anticuerpos séricos anti-fID de *N. brasiliensis*, en ratones BALB/c inmunizados con una sola dosis de los antígenos de la bacteria (particulado y soluble), muestra ser dependiente de la concentración y del estado físico del antígeno después de los primeros 15 días post-inmunización, obteniéndose la cantidad más alta de anticuerpos con la dosis mayor de antígeno, particulado o soluble, en el tiempo comprendido entre los 15 y 90 días posteriores a la primoinmunización. La cantidad de anticuerpos anti-fID es 3.5 veces

mayor en ratones inmunizados con el antígeno particulado que con el soluble. Cabe mencionar que estos niveles de anticuerpos son semejantes a los obtenidos en trabajos previos en nuestro laboratorio, por infección de ratones con la bacteria (24,81) o por inmunización con la bacteria muerta por calor o con un extracto crudo de la misma (81).

Aunque sin antecedentes sobre el efecto de la dosis y de la forma física del antígeno de *N. brasiliensis* sobre la respuesta inmune mediada por células, esperábamos un comportamiento similar al de la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Nuestros resultados demuestran que la respuesta inmune celular, medida en función de la magnitud de la respuesta proliferativa de linfocitos obtenidos de los ratones BALB/c inmunizados con una sola dosis de los antígenos de *N. brasiliensis*, particulado y soluble, también es dependiente de la concentración y del estado físico del antígeno, pero a diferencia de la respuesta inmune humoral, la respuesta celular lo es en un periodo temprano (7 días post-inmunización), tanto en bazo como en ganglio linfático poplíteo, si bien la respuesta proliferativa en bazo es 3-4 veces superior que en GLP. La respuesta más alta de los linfocitos hacia la fracción inmunodominante (fID) de *N. brasiliensis* se obtiene con la dosis mayor de antígeno particulado el séptimo día posterior a la primoinmunización; después de esta etapa se pierde el efecto de la dosis y del estado físico del antígeno sobre la respuesta linfoproliferativa.

Resultan aparentes semejanzas y diferencias en las respuestas humoral y celular contra la fID de *N. brasiliensis*. La magnitud de ambas respuestas es modulada por la concentración, en una relación de proporcionalidad directa, y por el estado físico, particulado o soluble, del antígeno primoinmunizante. Sin embargo, hay disociación entre las 2 respuestas en el tiempo de expresión máxima, en el tiempo de duración y en el tiempo de dependencia de concentración y de forma física del antígeno inductor de la respuesta inmune. La respuesta proliferativa de linfocitos precede, en aproximadamente una semana, a la respuesta de anticuerpos y permanece en niveles biológicamente significativos (índices de estimulación superiores a 2) por periodos muy cortos, (alrededor de una semana), en comparación con la presencia de niveles importantes de anticuerpos anti-fID, aún a los 3 meses post-inmunización; la respuesta linfoproliferativa es dependiente de la concentración y del tipo de antígeno primoinmunizante durante la etapa temprana de la respuesta e independiente después de este periodo, en tanto que el

comportamiento de la respuesta de anticuerpos es inverso. Esta dicotomía temporal entre las respuestas humoral y celular permitiría la selección y/o diseño de epítopes específicos para inducir cualquiera de ellas, en virtud de la posibilidad de estimular clonas de linfocitos comprometidos en uno u otro tipo de respuesta (42,45,46,48,49,54,56,80).

Es evidente entonces, que el mejor agente para inducir respuesta de anticuerpos y de linfocitos contra el patógeno intracelular *N. brasiliensis* (fID), es el antígeno particulado, la bacteria completa muerta por calor o por radiación U.V., en concentración 10^9 UFC de la bacteria, que fue aplicado sub-cutáneamente en ratones BALB/c. Así mismo, según nuestros resultados, sólo este antígeno, y en esta concentración elevada, es capaz de inducir niveles significativos de anticuerpos anti-fID hasta por 3 meses. No obstante que la respuesta inmune celular de mayor magnitud se obtiene con el antígeno particulado en concentración alta, el período de respuesta máxima es de breve duración. Por otro lado, una respuesta celular anti-fID modesta pero constante a lo largo de 5 meses se obtiene, según nuestro trabajo, tanto con el antígeno particulado en concentración media y baja (10^7 y 10^3 UFC respectivamente), como con el soluble en cualquiera de sus dosis. Será conveniente aclarar en cuál de estos casos es más efectiva una dosis de reactivación, y si los anticuerpos (anti-fID) son necesarios en la defensa contra *N. brasiliensis* o si basta con una respuesta celular baja (índice de estimulación entre 2 y 4) inducible con las dosis 10^3 ó 10^7 UFC del antígeno particulado, o con el antígeno soluble en sus diferentes concentraciones. Cabe mencionar que la cantidad mayor del antígeno particulado induce una grave lesión inflamatoria en la región de aplicación del antígeno, con un tiempo de evolución de aproximadamente 30 días en el cual ocurre desarrollo de abscesos y de zonas de necrosis, además de fiebre e incapacidad de movimiento; ninguno de estos efectos secundarios, ni algún otro, fue identificado con las dosis menores del antígeno particulado, ni con el antígeno soluble en cualquiera de sus concentraciones. En este sentido, Stanford y Rook (19) han reportado para *M. tuberculosis*, que el daño puede evitarse si la respuesta inmune se induce con antígenos comunes no específicos de especie; Kaufmann y cols. (18) con antígenos del filtrado de cultivo de corto tiempo de *M. tuberculosis*, inducen resistencia que a largo plazo es similar a aquélla resultante de inmunización con BCG, comportamiento semejante al que nosotros observamos en las

respuestas de anticuerpos y de linfoproliferación inducidas con los antígenos particulado y soluble de *N. brasiliensis*. Ahora bien, aunque no estudiamos la relación entre concentración y forma física del antígeno primoinmunizante, y protección contra la infección por *N. brasiliensis*, consideramos que hemos reunido información valiosa que permitirá diseñar el trabajo conducente a estimular en este modelo experimental, una respuesta inmune humoral y/o celular capaz de conferir protección contra la infección por *N. brasiliensis*, tanto en su establecimiento como en su resolución. Dado que no se conoce si la protección depende de anticuerpos y/o de linfocitos, e incluso de alguna subpoblación particular de linfocitos, habría que valorar la capacidad de reactivación de ambos tipos de respuesta inmune con un esquema de aplicación de dosis de reinmunización, ya con el antígeno particulado en sus dosis media o baja, ya con el antígeno soluble en sus diferentes concentraciones. A este respecto, Ehlers, Mielke y Hahn (19) han señalado para *M. tuberculosis* que antes de probar esquemas de reactivación de la respuesta inmune es fundamental conocer el comportamiento de la respuesta a la primoinmunización, estudio en el cual se permite que el sistema inmune regrese a su estado quiescente antes de intentar el reto, ya que se evita así el desarrollo de una supuesta respuesta protectora, que no es más que una reacción inespecífica resultante de la cercanía entre la vacunación y el reto. En cuanto a la concentración del antígeno primoinmunizante, la literatura reciente llama la atención hacia el empleo de cantidades pequeñas; para *M. tuberculosis* se han utilizado dosis bajas del microorganismo completo, o mezclas antigénicas o extractos antigénicos estimulantes de subpoblaciones linfoides particulares (48,82); en leishmaniasis, listeriosis, y malaria entre otras (33,35,39,40,42,43,56) se han probado combinaciones de antígenos en concentración pequeña, con citocinas asociadas a la resistencia inmune tales como IL-2, IL-12 e IFN γ .

Al reconsiderar esta información surgen diversos comentarios, por ejemplo, la diferencia en anticuerpos inducidos por las dosis 10^3 - 10^7 UFC y 10^9 UFC puede deberse al efecto adyuvante además del efecto de concentración de antígeno, ya que la consistencia física de la dosis 10^9 es semejante a la de un preparado antigénico en adyuvante; así mismo, la diferencia en el efecto de los antígenos particulado y soluble no parece ser resultado sólo del estado físico del antígeno, ya que se obtiene el mismo

efecto con las 2 formas físicas del antígeno pero en diferente concentración (dosis 10^3 y 10^7 UFC de antígeno particulado y $300\mu\text{g}$ de antígeno soluble equivalente a la dosis mayor del antígeno particulado). De aquí la posibilidad de que la presencia o ausencia de lípidos, o de algún otro componente químico no antigénico o de ciertas moléculas acarreador-epitope contribuyan a la producción de anticuerpos.

Para conocer la influencia de los lípidos de la pared celular de *N. brasiliensis* (ausentes en el antígeno soluble) sobre las respuestas de anticuerpos y linfoproliferativa anti-fID, llevamos a cabo algunos experimentos preliminares de determinación de anticuerpos séricos anti-fID y de respuesta linfoproliferativa en ratones inmunizados con la dosis mayor de antígeno particulado deslipidizado, de antígeno soluble "insolubilizado" y con ambos antígenos adicionados de los lípidos previamente eliminados. Si bien, los resultados no son concluyentes, ambas respuestas parecen requerir de los lípidos de la bacteria, y no en forma aislada, sino en un soporte adecuado ya que la simple adición de los lípidos al antígeno insolubilizado no permite recuperar las respuestas de anticuerpos y de proliferación de linfocitos que se obtienen con la bacteria deslipidizada adicionada de lípidos.

Así, parece que no sólo la concentración del antígeno y/o su estado físico afectan la respuesta inmune, los resultados de este trabajo indican que el efecto es del conjunto, de las características físico-químicas del antígeno.

En cuanto a la participación de las subpoblaciones de linfocitos, pudimos constatar para *N. brasiliensis*, así como se ha reportado para otros microorganismos intracelulares (16,18,33,35,38,40,42,45,46,50,56,57,66), la presencia selectiva de linfocitos TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ según la concentración y la forma física del antígeno, según el tiempo transcurrido después de la primoinmunización y, muy notablemente, según el órgano linfoide fuente de las células evaluadas. Si bien, de los resultados obtenidos del estudio de citometría de flujo no puede establecerse una relación bien definida de dependencia entre concentración y estado físico del antígeno, y cantidad de linfocitos TCD4+, TCD8+ y BCD45R+, sí podemos afirmar que tanto la concentración como el estado físico del antígeno inducen variación no sólo en el número de células de cada subpoblación linfoide, sino también en el patrón celular registrado por el citómetro de flujo, patrón que es expresión de los cambios en tamaño y composición interna de la

célula, que a su vez son expresión de la respuesta celular a algún estímulo. Este efecto es particularmente notable en las poblaciones celulares sometidas a cultivo *in vitro*, de manera que, como se describe en la sección de Resultados, es común no detectar diferencias significativas en la cantidad de una (o más) subpoblación linfoide antes y después del cultivo, pero sí diferencias en los patrones celulares, los cuales suponemos de acuerdo con la teoría en citometría de flujo, son debidos a los cambios bioquímicos y morfológicos que experimentan las células en proliferación y diferenciación.

En términos generales, en el bazo los antígenos soluble y particulado ejercen un efecto semejante sobre el fenotipo de los linfocitos: variación leve en las subpoblaciones TCD4⁺ y TCD8⁺, variación mayor en BCD45R⁺; sin embargo, es aparente que el antígeno soluble induce cifras más altas de linfocitos BCD45R⁺ que el particulado, en forma independiente de la concentración durante los primeros 15 días posteriores a la inmunización, en tanto que a los 5 meses son mínimas, o nulas, las diferencias entre ambas formas antigénicas en sus diferentes concentraciones. La inmunización con el antígeno particulado resulta en movilización mayor de linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺. En ganglio linfático poplíteo este efecto es dramático ya que las células TCD8⁺ aumentan en un 300%, en tanto que con el antígeno soluble no es posible detectarlas.

Si la administración del antígeno soluble resulta en la mayor movilización y concentración de linfocitos BCD45R⁺ con niveles bajos de anticuerpos anti-fID, este antígeno, no obstante ser pobre inductor de anticuerpos anti-fID, podría ejercer un efecto policlonal sobre linfocitos B, efecto que concuerda con los reportes de Ortiz-Ortiz y cols. (10) y de Bona y cols. (28) de un factor activador policlonal de linfocitos B presente en la bacteria. Estos resultados, junto con la observación de que *N. brasiliensis* completa (antígeno particulado) estimula movilización mayor de células TCD8⁺, y luego TCD4⁺, pudieran indicar que los lípidos, al menos en *N. brasiliensis*, favorecen la respuesta por linfocitos T, en tanto que su ausencia favorece la respuesta policlonal de linfocitos B; o bien, de acuerdo con Ehlers (19) y Kemeny (38) podría esperarse que dentro de esta población de linfocitos B estuviera presente una subpoblación que actuara como célula presentadora de antígeno, suposición que tendría como apoyo los patrones celulares, que obtuvimos por citometría de flujo, que revelan la presencia de subpoblaciones de linfocitos B. Una evidencia adicional del papel de los lípidos en la

respuesta a *N. brasiliensis* la constituyen nuestros resultados de que la bacteria completa muerta (antígeno particulado), en dosis alta, es la que induce la producción significativa de anticuerpos anti-fID, en tanto que las dosis menores no lo hacen, no obstante ser antígeno particulado y contener lípidos (relativamente menor cantidad que la dosis mayor); este hecho también podría estar relacionando con el efecto de adyuvante anteriormente discutido, así como con el hallazgo de Castro-Corona y Salinas-Carmona de que la fID, que se extrae del antígeno soluble que utilizamos, tiene pobre antigenicidad en ausencia de adyuvante (83). Puesto que los linfocitos TCD8⁺ son la subpoblación menor, de entre las que evaluamos tanto en GLP como en bazo, ¿el bajo índice de respuesta proliferativa de linfocitos de GLP estimulado con el antígeno particulado estaría dado principalmente por linfocitos TCD8⁺, que se expresan notablemente en estas condiciones?, ¿porqué este gran incremento en la presencia de linfocitos TCD8⁺ en GLP y no en bazo?, ¿qué papel desempeña esta población de linfocitos en la respuesta a la bacteria completa, al antígeno soluble?, ¿ésto significa que los antígenos que llegan a bazo son distintos de aquéllos en GLP, en qué lo son, porqué lo son?, ¿en qué momento ingresan los antígenos a circulación linfo-hemática y qué procesamiento ocurre en ella?, ¿qué citocinas están presentes desde el inicio del contacto entre antígeno y hospedero y qué papel desempeñan en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en la movilización diferencial de las subpoblaciones de linfocitos?

Con base en los resultados de nuestro trabajo, en las consideraciones arriba vertidas, en las preguntas formuladas en el párrafo anterior y en recientes reportes de la literatura (48,49,56,57,65,66,82, 84-93), hemos construido un esquema que relaciona algunos de los eventos inmunes del hospedero que acompañan a la presencia de los antígenos de *N. brasiliensis* que utilizamos en este trabajo (fig. No.36): En GLP, tejido linfoide que tiene contacto más inmediato que bazo, con el antígeno administrado en el cojinete plantar del ratón, durante la primera semana post-inmunización, los macrófagos (abundantes en esta etapa según nuestras observaciones) procesan antígenos peptídicos y no peptídicos, entre éstos notablemente lípidos, y los presentan en el contexto de sus moléculas CD1, no moléculas Clase I, a linfocitos T citotóxicos CD8⁺ particularmente. Al activarse estos linfocitos, además de la proliferación celular (incremento en respuesta proliferativa y en nivel de células CD8⁺ en GLP), se liberarían citocinas propias (IFN γ ,

linfotoxinas, IL-16, TGF- β , o bien IL-4, 5, 10) y ajenas a las células CD8+ y se llevarían a cabo los procesos de lisis de los macrófagos infectados (por mecanismos dependientes de la acción de los mediadores de los gránulos citotóxicos de estos linfocitos, tales como granzimas, defensinas y granulicina) y la muerte de las bacterias intracelulares. Posteriormente, alrededor de los 15 días post-inmunización según nuestros resultados (movilización mayor de linfocitos TCD4+ y BCD45R+ después de inmunizar con antígeno soluble, no hidrofóbico), se tendría predominio de macrófagos con procesamiento de antígenos no lipídicos, derivados tanto del antígeno particulado como del soluble, con la consecuente estimulación y acción de las subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y BCD45R+ en bazo, activadas como resultado de la presentación de antígeno restringida por moléculas Clase II. De acuerdo con Kemeny y cols. (38) podríamos agregar que los macrófagos son las células presentadoras de antígeno en GLP, en tanto que las células B lo son en bazo y en consecuencia la respuesta inmune es diferente ya que, según el mismo Kemeny, la evidencia experimental indica que los macrófagos favorecen el desarrollo de células Th1, en tanto que las células B el de células Th2; esta sugerencia tendría su contraparte en nuestros resultados, incremento temprano en células TCD4+ en GLP, e incremento posterior de células TCD4+ en bazo y de anticuerpos séricos. No es necesario señalar que el contenido de esta propuesta debe ser comprobado experimentalmente, especialmente la participación sugerida de los linfocitos TCD8+ (su acción por sí mismos o a través de sus mediadores solubles, arriba citados). El conocimiento de la relación huésped/parásito se revela con complejidad creciente cada día y, en el caso particular de *Nocardia brasiliensis* y su hospedero animal (incluyendo al hombre) podemos expresar, como hace más de un siglo (1882) lo hiciera Robert Koch con respecto a *Mycobacterium tuberculosis* “...el bacilo no lo es todo para la enfermedad tuberculosa” (19).

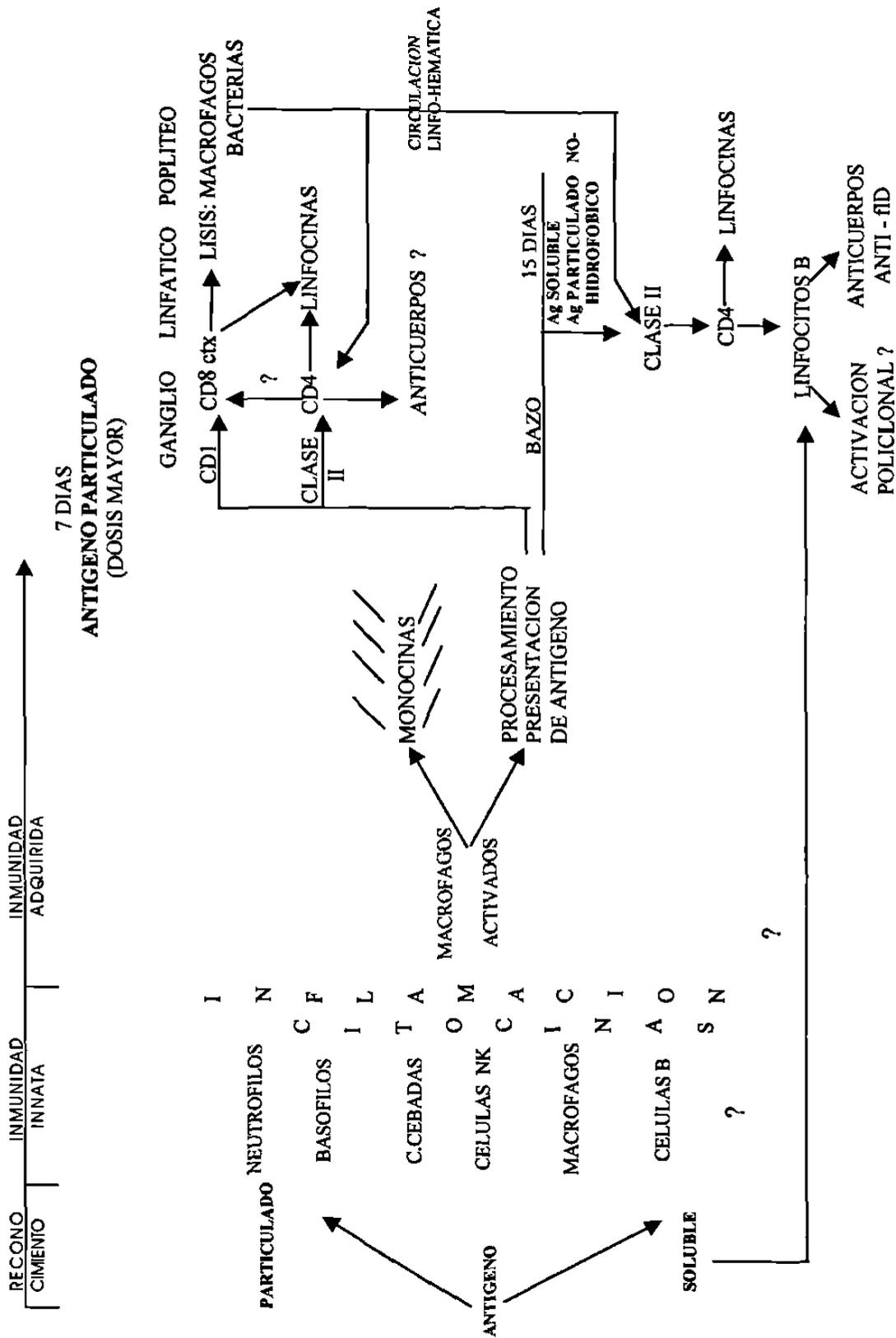


FIGURA No. 36 ESQUEMA PROPUUESTO PARA RELACIONAR ALGUNOS DE LOS EVENTOS INMUNES IDENTIFICADOS EN EL HOSPEDERO EN RESPUESTA A LA PRESENCIA DE ANTIGENOS DE *Nocardia brasiliensis*.

Estimamos que en este trabajo se generaron también algunas aportaciones técnicas.

1. Al inicio del trabajo experimental de tesis se recomendó utilizar el micrométodo de Miles y Misra para evaluar la cantidad de unidades formadoras de colonias de *N. brasiliensis*, en lugar del procedimiento de Vaciado en Placa comúnmente empleado. Ya que estadísticamente no hubo diferencia entre ellos según los resultados de los ensayos comparativos, optamos por utilizar la técnica de Miles y Misra por las siguientes ventajas prácticas: requiere menor cantidad de medio de cultivo y de recipientes para cultivo, así como preparación de diluciones bacterianas en volúmenes menores; no se necesita controlar la temperatura del medio de cultivo en el estrecho rango que permite tanto el estado líquido del medio como la viabilidad original de la suspensión bacteriana; se evita el riesgo de que la distribución de bacterias en el medio de cultivo no sea homogénea; es mucho más sencillo, y por lo tanto confiable, contar colonias en una superficie de 0.8cm^2 que en una de 60cm^2 .

2. Puesto que la determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias de *N. brasiliensis* requiere un tiempo de 72 horas (tiempo de desarrollo en cultivo de la bacteria), para disponer de suspensiones unicelulares recién preparadas con densidad celular conocida se consideró que una curva Densidad Óptica - Densidad Celular permitiría resolver esta necesidad. Aunque las primeras determinaciones de D.O. se llevaron a cabo a 600nm (longitud de onda comúnmente empleada en Microbiología para este propósito), se estimó conveniente determinar la longitud de onda de máxima D.O. para *N. brasiliensis*, la cual fue 325nm. Este resultado indica un comportamiento diferente, ante el espectro electromagnético, de los componentes de superficie de *N. brasiliensis* y de las bacterias y levaduras comúnmente cuantificadas por este procedimiento. La determinación de la turbidez de las suspensiones unicelulares de *N. brasiliensis* tanto por nefelometría como por D.O., mostró la misma sensibilidad, pero la estimación de densidad celular se llevó a cabo por determinación de la D.O. (a 325nm), dado que ésta se efectúa en tubos de vidrio reutilizables, en tanto que la primera requiere de cubetas desechables.

3. La selección del antígeno particulado *N. brasiliensis* muerta por radiación U.V. se debió a la necesidad de contar con un antígeno particulado y no viable, que no hubiera sido tan drásticamente tratado como lo fue la bacteria sometida al autoclave y utilizada en este laboratorio por Salinas-Carmona y Torres-López en el estudio de la respuesta inmune humoral contra *N.*

brasiliensis en ratón (24). La acción bactericida de la radiación electromagnética U.V. se conoce desde 1877 y sus diversos efectos sobre la viabilidad celular desde fines de los años 1950 (94,95); al considerar que la longitud de onda entre 255 y 280nm tiene mayor especificidad de acción sobre la molécula de DNA (cadena doble o sencilla), y de RNA, se diseñó un primer experimento de tratamiento de suspensiones bacterianas concentradas, con radiación U.V. de este rango de longitud de onda, durante tiempos cortos (10 a 30 minutos) según antecedentes para bacterias comunes (96). En virtud de que no se logró la muerte de *N. brasiliensis*, se desarrolló una serie de experimentos en los cuales se varió el tiempo de tratamiento, la densidad celular y el volumen de la suspensión bacteriana. En el curso de estos ensayos se observaron varios efectos sobre el desarrollo de *N. brasiliensis*: pérdida irreversible de su característico color naranja a tiempos cortos de radiación (15 a 30 minutos, según la densidad celular), efecto que también se obtuvo por exposición a la luz ordinaria del laboratorio pero en el curso de 25 a 30 días; disminución de la velocidad de crecimiento en cultivo (en condiciones óptimas para ello), y cambio en las características macroscópicas de desarrollo, de rugoso con bordes plegados a superficie lisa con bordes planos, efectos en relación directa con el tiempo de tratamiento; además, pérdida de la hidrofobicidad de la superficie celular. En la literatura se reporta la disminución de la velocidad de crecimiento y la consecuente pérdida de viabilidad como resultado de la acción de la radiación sobre los componentes del DNA, no sólo timina (principalmente) y citosina, sino también ruptura de puentes de hidrógeno y del esqueleto azúcar-fosfato particularmente en dosis altas de radiación. También están reportados cambios en las características de desarrollo macroscópicas y microscópicas por efecto sobre puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro de proteínas, en uracilo de RNA, en aminoácidos y otras moléculas del metabolismo celular (94,95). Aunque sin antecedentes directos en la literatura, la pérdida tanto del color naranja de las células de *N. brasiliensis* (asociado a la presencia de carotenos), como de la hidrofobicidad de la superficie celular pudiera explicarse por una acción hidrolítica o fotolítica de dobles enlaces por acción de la energía U.V. (reportada para moléculas sintéticas) sobre los lípidos insaturados de la superficie bacteriana; estimamos que los cambios químicos responsables de este efecto de la radiación U.V. sobre *N. brasiliensis* merecen ser estudiados con mayor

profundidad, más aún si se considera que la cubierta lipídica pudiera actuar como barrera contra la acción letal de la luz U.V. sobre los ácidos nucleicos o las moléculas internas involucradas en el metabolismo celular y ser responsable, en parte al menos, de la resistencia a la radiación U.V. y de la persistencia en el ambiente. Esta resistencia también pudiera ser resultado de los mecanismos de reparación descritos para los microorganismos en general: reparación espontánea dependiente de las condiciones ambientales (medio de cultivo), reactivación enzimática en presencia de luz o recuperación enzimática en obscuridad mediante una hidrolasa y una polimerasa. En el caso de las suspensiones de *N. brasiliensis* muertas por radiación U.V. en las condiciones aquí descritas, ninguno de estos mecanismos de recuperación en caso de estar presentes en *N. brasiliensis*, o alguno otro no conocido para la bacteria, fue capaz de revertir el efecto letal del tratamiento aplicado. No obstante los cambios ocurridos en *N. brasiliensis* sometida a radiación U.V., la respuesta inmune humoral (anticuerpos anti-fID) y celular (respuesta linfoproliferativa anti-fID y fenotipo de linfocitos) de los ratones inmunizados con este antígeno particulado, no mostró diferencias estadísticamente significativas de la respuesta inducida por inmunización con la bacteria muerta por calor, así que, aparentemente la radiación U.V. aplicada no alteró el reconocimiento de él, o los epítopes involucrados en la respuesta inmune estudiada. 4. Durante el proceso de obtención de la fID de *N. brasiliensis*, observamos que para seleccionar las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G-100 que contenían la fID, no era suficiente con tan sólo la determinación de absorbancia a 280nm ya que adyacente a la fID eluye un pigmento que presenta absorbancia a la misma longitud de onda, así que consideramos necesario determinar además, la presencia de proteínas en las fracciones previamente seleccionadas por absorbancia a 280nm. De este análisis resultó que no todas las fracciones con A_{280} contenían proteínas pero, que aquéllas positivas tanto para A_{280} como para proteínas sí contenían la fID. 5. La estandarización del procedimiento para analizar el fenotipo de los linfocitos por citometría de flujo, reveló una alta sensibilidad de las células de ratón a las condiciones del ensayo, de tal manera que consideramos útil señalar la importancia de conservar dichas condiciones particularmente cuando se va a hacer uso de la información contenida en los patrones celulares y/o se van a recuperar diferentes poblaciones celulares.

CONCLUSIONES

1. *Nocardia brasiliensis* muerta por tratamiento con radiación U.V. conserva la misma antigenicidad que la bacteria muerta por acción del calor húmedo a presión.

2. La hipótesis se confirma en algunos de los postulados y bajo ciertas condiciones:

2.1 El antígeno particulado de *Nocardia brasiliensis* sí induce mayor respuesta de anticuerpos (humoral) y de proliferación de linfocitos (celular) que el antígeno soluble, en forma dependiente de la dosis del antígeno, pero también del tiempo posterior a la inmunización y, en el caso de la respuesta linfoproliferativa también del tejido de origen de las células.

2.2 El estado físico del antígeno de *Nocardia brasiliensis*, y su concentración, influyen en la movilización diferencial de las subpoblaciones de linfocitos TCD4+, TCD8+ y BCD45R+, en forma dependiente también del tiempo post-inmunización y del origen tisular de los linfocitos.

3. Los resultados presentados en este trabajo son fuente de información para el diseño de esquemas de inmunización activa con fines profilácticos y de modulación de la respuesta inmune, que podrá llevarse a cabo una vez que se conozcan los factores de patogenicidad y/o de virulencia de *N. brasiliensis*, así como los fenómenos de inmunidad innata y de inmunidad adquirida del hospedero relacionados con el establecimiento de la infección. Así mismo queda abierta la investigación de los mecanismos de procesamiento y presentación de los diversos antígenos de *N. brasiliensis*, por una parte, y por otra su relación con los diferentes elementos moleculares y celulares que conforman la respuesta inmune contra el patógeno intracelular *N. brasiliensis*.

BIBLIOGRAFIA

1. Sandoval-Trujillo H. 1993. Actinomicetos, Microorganismos de la Luz. UAM, Xochimilco, México.
2. Beaman B.L. 1993. Nocardial Infections, en Fungal Infections and Immune Responses, editado por Murphy J.W., Friedman H., Bendinelli M. Plenum Publishing Corporation, NY.
3. Beaman B.L., Beaman L. 1994. Nocardia Species: Host-Parasite Relationships. *Clinical Microbiology Reviews* 7(2):213-264.
4. McNeil M.M., Brown J.M. 1994. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 7(3):357-417.
5. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M.C., Welsh O., Rodríguez M.A. 1992. Isolation and Purification of Two Immunodominant Antigens from *N. brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 30(5):1183-1188.
6. Pier A.C., Thurston J.R., Larsen A.B. 1968. A Diagnostic Antigen for Nocardiosis: Comparative Tests in Cattle with Nocardiosis and Mycobacteriosis. *Am J Vet Res* 29(2):397-403.
7. Beaman B.L., Saubolle M.A., Wallace R.J. 1995. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia* and Other Aerobic Actinomycetes of Medical Importance, en *Manual of Clinical Microbiology*, editado por P.R.Murray, ACM Press.
8. Wortman P.D. 1995. Concurrent Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosoi* and Actinomycetoma Caused by *Nocardia brasiliensis*. *J Am Acad Dermatol* 32:390-392.
9. Folb P.I., Jaffe R., Altmann G. 1976. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* Infections in Mice. *Infect Immunity* 13(5):1490-1496.
10. Ortiz-Ortiz L., Parks D.E., López J.S., Weigle W.O. 1979. B-Lymphocyte Activation with an Extract of *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immunity* 25(2):627-634.
11. Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F., Contreras M.F. 1972. Delayed Hypersensitivity to Polysaccharides from Nocardia. *J Immunol* 108(5):1409-1413.
12. Ortiz-Ortiz L., Contreras M.F., Bojalil L.F. 1972. Cytoplasmic Antigens from Nocardia Eliciting a Specific Delayed Hypersensitivity. *Infect Immunity* 5(6):879-882.

13. Conde C., Mancilla R., Fresán M., Ortiz-Ortiz L. 1983. Immunoglobulin and Complement in Tissues of Mice Infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immunity* **40**(3):1218-1222.
14. Salinas-Carmona M.C., Vera L., Welsh O., Rodríguez M. 1992. Antibody Response to *N. brasiliensis* Antigens in Man. *Zbl Bakt* **276**:390-397.
15. Gordon M.A., Mahgoub E.S. 1980. Immune Response to Aerobic Pathogenic Actinomycetaceae, en *Manual of Clinical Immunology*, editado por Rose N.R., Friedman H. American Society for Microbiology.
16. Small P.L.C., Ramakrishnan L., Falkow S. 1994. Remodeling Schemes of Intracellular Pathogens. *Science* **263**:637-639.
17. Ivanyi J. 1993. Infections with Intracellular Bacteria, en *Clinical Aspects of Immunology*, editado por Lachmann P.J., Peters D.K., Rosen F.S., Walport M.J. Blackwell Scientific Publications.
18. Kaufmann S.H.E. 1993. Immunity to Intracellular Bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**:129-163.
19. Ehlers S., Mielke M.E.A., Hahn H. 1994. Progress in TB Research: Robert Koch's Dilemma Revisited. *Immunol Today* **15**(1):1-4.
20. Sturgill-Koszycki Sh., Schlesinger P.H., Chakraborty P., et al. 1994. Lack of Acidification in Mycobacterium Phagosomes Produced by Exclusion of the Vesicular Proton-ATPase. *Science* **263**:678-681.
21. Beaman B.L., Black C.M., Doughty F., Beaman L.V. 1985. Role of Superoxide Dismutase and Catalase as Determinants of Pathogenicity of *N. asteroides*: Importance in Resistance to Microbicidal Activities of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infect Immunity* **47**(1):135-141.
22. Beaman L.V., Beaman B.L. 1990. Monoclonal Antibodies Demonstrate that Superoxide Dismutase Contributes to Protection of *N. asteroides* Within the Intact Host. *Infect Immunity* **58**(9):3122-3128.
23. Salinas-Carmona M.C., Welsh O., Casillas S.M. 1993. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of *N. brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. *J Clin Microbiol* **31**(11):2901-2906.
24. Torres-López E. 1995. Estudio de la Respuesta Inmune Humoral en el Establecimiento y Resolución de la Infección Experimental por *Nocardia brasiliensis* en Ratones. Tesis Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

25. González-Ochoa A., Shibayama H., Félix D., Anaya M. 1962. Immunological Aspects of Actinomycotic Mycetoma and Nocardiosis. Excerpt Med Int Congr Series 55:542-551.
26. Rico G., Ochoa R., Oliva A., González-Mendoza A., Walker Sh.M., Ortiz-Ortiz L. 1982. Enhanced Resistance to *N. brasiliensis* Infection in Mice Depleted of Antigen-Specific B Cells. J Immunol 129(4):1688-1693.
27. Bona C., Chedid L., Damais C. et al. 1975. Blast Transformation of Rabbit B-Derived Lymphocytes by a Mitogen Extracted from Nocardia. J Immunol 114(1):348-353.
28. Bona C., Broder S., Dimitriu A., Waldmann Th.A. 1979. Polyclonal Activation of Human B Lymphocytes by *Nocardia* Water Soluble Mitogen (NWSM). Immunological Rev 45:69-92.
29. Deem R.L., Beaman B.L., Gershwin M.E. 1982. Adoptive Transfer of Immunity to *Nocardia asteroides* in Nude Mice. Infect Immunity 38:914-920.
30. Ximénez C., Melendro E.I., González-Mendoza A., García A.M., Martínez A., Ortiz-Ortiz L. 1980. Resistance to *N. brasiliensis* Infection in Mice Immunized with Either Nocardia or BCG. Mycopathologia 70(2):117-122.
31. Melendro E.I., Contreras M.F., Ximénez C., García-Maynez A.M., Ortiz-Ortiz L. 1978. Changes in Host Resistance Caused by *Nocardia brasiliensis* in Mice: Cross-Protection Against *Listeria monocytogenes*. Int Archs Allergy Appl Immun 57:74-81.
32. Deem R.L., Doughty F.A., Beaman B.L. 1983. Immunologically Specific Direct T Lymphocyte-Mediated Killing of *N. asteroides*. J Immunol 130(5):2401-2406.
33. Müller Y., Pedrazzini T., Farrell J.P., Louis J. 1989. T-Cell Responses and Immunity to Experimental Infection with *Leishmania major*. Annu Rev Immunol 7:561-578.
34. Tapia F.J., Cáceres-Dittmar G., Sánchez M.A. 1994. Inadequate Epidermal Homing Leads to Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis. Immunol Today 15(4):160-165.
35. Mitchell G.F. 1984. Host-Protective Immunity and its Suppression in a Parasitic Disease: Murine Cutaneous Leishmaniasis. Immunol Today 5(8):224-226.
36. Bos J.D., Kapsenberg M.L. 1993. The Skin Immune System: Progress in Cutaneous Biology. Immunol Today 14(2):75-78.
37. Bloom B.R., Salgame P., Diamond B. 1992. Revisiting and Revising Suppressor T Cells. Immunol Today 13(4):131-135.

38. Kemeny D.M., Noble A., Holmes B.J., Diaz-Sanchez D. 1994. Immune Regulation: A New Role for the CD8+ T Cell. *Immunol Today* **15**(3):107-110.
39. Scott Ph. 1993. IL-12: Initiation Cytokine for Cell-Mediated Immunity. *Science* **260**:496-497.
40. Hsieh Ch.S., Macatonia S.E., Tripp C.S., Wolf S.F., O'Garra A., Murphy K.M. Development of TH1CD4+ T Cells Through IL-12 Produced by *Listeria*-Induced Macrophages. *Science* **260**:547-549.
41. S nik A., Vaquero C., Kolb J.P., Galhina A., Provost M.A., Sanc eau J., Catinot L., Falcoff R. 1984. Helper Activity for Antibody Synthesis Encoded by mRNA Extracted from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **119**(3):868-875.
42. Sell S., Hsu P.L. 1993. Delayed Hypersensitivity, Immune Deviation, Antigen Processing and T-Cell Subset Selection in Syphilis Pathogenesis and Vaccine Design. *Immunol Today* **14**(12):576-582.
43. Liew F.Y., Millott S., Li Y. et al. 1989. Macrophage Activation by Interferon- γ from Host Protective T Cells is Inhibited by Interleukin (IL)3 and IL4 Produced by Disease-Promoting T Cells in Leishmaniasis. *Eur J Immunol* **19**:1227-1232.
44. Liew F.Y., Li Y., Millott S. 1990. Tumor Necrosis Factor- α Synergizes with IFN- γ in Mediating Killing of *Leishmania major* Through the Induction of Nitric Oxide. *J Immunol* **145**(12):4306-4310.
45. Seder R.A., Paul W.E. 1994. Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by CD4+ T Cells. *Annu Rev Immunol* **12**:635-673.
46. Constant S.L., Bottomly K. 1997. Induction of TH1 and TH2 CD4+ T Cell Responses: the Alternative Approaches. *Annu Rev Immunol* **15**:297-322.
47. Tzianabos A.O., Onderdonk A.B., Rosner B., Cisneros R.L., Kasper D.L. 1993. Structural Features of Polysaccharides that Induce Intra-Abdominal Abscesses. *Science* **262**:416-419.
48. Constant P., Davodeau F., Peyrat M.A., Poquet Y., Puzo G., Bonneville M., Fourni  J.J. 1994. Stimulation of Human $\gamma \delta$ T Cells by Nonpeptidic Mycobacterial Ligands. *Science* **264**:267-270.
49. Goeken N.E., Eckerle M.K., Lioubin P.J., Staggs T.S. 1984. Differential Requirements for Class II MHC Antigen in Human T Cell Activation. *Transplantation* **38**(6):714-719.

50. Richard L., Forget A., Turcotte R. 1990. Biological Properties of Factors Secreted by Antigen-Reactive Suppressor Cells in Mice Infected with *Mycobacterium lepraemurium*. *Infect Immunity* **58**(11):3531-3536.
51. Stites D.P., Terr A.I. 1993. *Inmunología Básica y Clínica*, capítulos 3, 8, 58. Editorial El Manual Moderno, México.
52. Margni R.A. 1989. *Inmunología e Inmunquímica, Fundamentos*, capítulos 3,35. Editorial Médica Panamericana.
53. Leibowitz J.L., Oefinger P.E. 1985. Abortive Infection of Human Mononuclear Cells with Cytomegalovirus Induces Functional Immunosuppression *in vitro*. *Immunol Today* **6**(3):82-83.
54. Fitch F.W., McKisic M.D., Lancki D.W., Gajewski T.F. 1993. Differential Regulation of Murine T Lymphocyte Subsets. *Annu Rev Immunol* **11**:29-48.
55. Casey P.J. 1995. Protein Lipidation in Cell Signaling. *Science* **268**:221-225.
56. Good M.F. 1992. A Malaria Vaccine Strategy Based on the Induction of Cellular Immunity. *Immunol Today* **13**(4):126-130.
57. Reiner S.L., Locksley R.M. 1993. The Worm and the Protozoa: Stereotyped Responses or Distinct Antigens? *Parasitol Today* **9**(7):258-266.
58. Bach J.F. 1984. *Inmunología*, capítulos 6,10,11,20. Editorial Limusa, México.
59. Kabat E.A., Mayer M.M. 1968. *Inmunquímica Experimental*, capítulo 11. Editorial La Prensa Médica Mexicana.
60. Garvey J.S., Cremer N.E., Sussdorf D.H. 1977. *Methods in Immunology*, capítulo 47. Editorial W.A.Benjamin Inc.
61. Challacombe S.J. Systemic and Salivary Immune Responses After Oral Administration with *Streptococcus mutans* Antigens, citado en *Vacunas, Ciencia y Salud*, capítulo 3. Editado por Escobar-Gutiérrez A., Valdespino-Gómez J.L., Sepúlveda-Amor J. Secretaría de Salud, México 1992.
62. Howard Ph.L., Trainer Th.D. 1980. Antibody Production for Radioligand Assays, en *Radionuclides in Clinical Chemistry*, editorial Little, Brown and Co., Boston.
63. Kim Y.T., Siskind G.W. 1974. Studies on the Control of Antibody Synthesis: VI. Effect of Antigen Dose and Time After Immunization on Antibody Affinity and Heterogeneity in the Mouse. *Clin Exp Immunol* **17**:329.

64. Mond J., Kim Y.T., Siskind G.W. 1974. Studies on the Control of Antibody Synthesis: V. Effect of Nonspecific Modification of the Magnitude of the Immune Response on the Affinity of the Antibody Synthesized. *J Immunol* 112:1255.
65. Unanue E.R. 1981. The Regulatory Role of Macrophages in Antigenic Stimulation. *Adv Immunol* 31:1-36.
66. Prigozy Th.I., Sieling P.A., Clemens D. et al. 1997. The Mannose Receptor Delivers Lipoglycan Antigens to Endosomes for Presentation to T Cells by CD1b Molecules. *Immunity* 6:187-197.
67. Casillas-Quintana S.M. 1991. Determinación de Anticuerpos Humanos Anti-*Nocardia brasiliensis* por un Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
68. Larone D.H. 1987. Medically Important Fungi. A Guide to Identification. Elsevier Science Publishing Co., N.Y. Segunda edición, página 188.
69. Rivera-Morales L.G. 1990. Evaluación de la Fagocitosis y Digestión Intracelular por Leucocitos Polimorfonucleares de Individuos Sanos Para Dos Especies de Estafilococos Coagulasa Negativos. Tesis Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
70. Seeley H.W., VanDemark P.J. 1962. Microbes in Action, A Laboratory Manual of Microbiology. W.H.Freeman and Co., San Francisco. Segunda edición, página 22.
71. Bradford 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.
72. Avrameas S., Ternynck T. 1969. The Cross-linking of Proteins with Glutaraldehyde and Its Use for the Preparation of Immunoabsorbents, en *Handbook of Experimental Immunology*, Volume 1: Immunochemistry. D.M.Weir editor, Blackwell Scientific Publications 1978, página 10.4
73. Harlow D.L., editor. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor 1988, página 79.
74. Laemmli V.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
75. Salinas-Carmona M.C., Nussenblatt R.B., Gery I. 1982. Experimental Autoimmune Uveitis in the Athymic Nude Rat. *Eur J Immunol* 12:480-484.
76. Waithe W.I., Hirschhorn K. Lymphocyte Response to Activators, en *Handbook of Experimental Immunology*, Volume 2. D.M.Weir editor, Blackwell Scientific Publications 1978, capítulo 26.

77. Robinson J.P., editor. Phenotyping Protocol for Mouse Cells. Dual- Color Flow Cytometric Analysis of Murine Splenic B and T Lymphocytes, en Handbook of Flow Cytometry Methods. Wiley-Liss 1993.
78. Becton Dickinson. Manual of Flow Cytometry. 1994.
79. Sigma Immunochemicals. Procedure for Direct Immunofluorescent Staining of Splenocytes or Thymocytes. 1995.
80. Hadden J.W. 1994. T-Cell Adjuvants. *Int J Immunopharmac* 16(9):703-710.
81. Rodríguez-Tovar L.E. 1997. Estudio Comparativo de la Respuesta Proliferativa de Linfocitos de Ratones BALB/c Infectados o Inmunizados con Antígenos de *Nocardia brasiliensis*. Tesis Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
82. Balaji K.N., Boom W.H. 1998. Processing of *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli by Human Monocytes for CD4+ $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells: Role of Particulate Antigen. *Infect Immunity* 66(1):98-106.
83. Castro-Corona M.A. 1995. Obtención de Anticuerpos Monoclonales para Buscar a la Proteína Inmunodominante de 24 KDa en la Superficie de *Nocardia brasiliensis*. Tesis Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
84. Sercarz E.E., Lehmann P.V., Ametani A. *et al.* 1993. Dominance and Crypticity of T Cell Antigenic Determinants. *Annu Rev Immunol* 11:729-766.
85. Sato I.Y., Kobayashi K., Kasama T. *et al.* 1990. Regulation of *Mycobacterium bovis* BCG and Foreign Body Granulomas in Mice by the Bcg Gene. *Infect Immunity* 58(5):1210-1216.
86. Mombaerts P., Arnoldi J., Russ F. *et al.* 1993. Different Roles of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cells in Immunity Against an Intracellular Bacterial Pathogen. *Nature* 365:53-56.
87. Kaufmann S.H.E. 1988. CD8+ T Lymphocytes in Intracellular Microbial Infections. *Immunol Today* 9(6):168-173.
88. Pfeifer J.D., Wick M.J., Roberts R.L. *et al.* 1993. Phagocytic Processing of Bacterial Antigens for Class II MHC Presentation to T Cells. *Nature* 361:359-362.
89. Erard F., Wild M.T., Garcia-Sanz J.A., LeGros G. 1993. Switch of CD8 T Cells to Noncytolytic CD8-CD4- Cells That Make TH2 Cytokines and Help B cells. *Science* 260:1802-1805.
90. Beckman E.M., Porcelli S.A., Morita C.T. *et al.* 1994. Recognition of a Lipid Antigen by CD1-Restricted $\alpha\beta$ + T Cells. *Nature* 372:691-694.

91. Stenger S., Mazzaccaro R.J., Ujemura K. *et al.* 1997. Differential Effects of Cytolytic T Cell Subsets on Intracellular Infection. *Science* **276**:1684-1687.
92. Brenner M., Porcelli S. 1997. Antigen Presentation: A Balanced Diet. *Science* **277**:332.
93. Zeng Z.H., Castaño A.R., Segelke B.W. *et al.* 1997. Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove. *Science* **277**:339-345.
94. Deering R.A. Ultraviolet Radiation and Nucleic Acid, en *Organic Chemistry of Life, Readings from Scientific American*. W.H.Freeman 1973, capítulo 41.
95. Oster G. The Chemical Effects of Light, en *Organic Chemistry of Life, Readings from Scientific American*. W.H.Freeman 1973, capítulo 39.
96. Shechmeister I.L. Sterilization by Ultraviolet Irradiation, en *Disinfection, Sterilization and Preservation*. S.S.Block editor. Lea & Febiger 1991, capítulo 31.

LISTA DE ABREVIATURAS

A280	Absorbancia a 280 nanómetros
ASB	Albumina sérica de bovino
BCD45R	Molécula CD45R de superficie externa de membrana plasmática de linfocito B
BHI	Infusión cerebro-corazón
C	Citosina
CD	Siglas que designan moléculas de diferenciación celular, cluster of differentiation
Ci	Curie
cm	Centímetro (s)
cols.	Colaboradores
ConA	Concanavalina A
CPA	Célula presentadora de antígeno
cpm	Cuentas por minuto
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa	Enzima hidrolítica de DNA
DNP-BGG	Gamma-globulina de bovino dinitrofenilada
D.O.	Densidad óptica
E.C.	Extracto crudo
ELISA	Ensayo inmunoenzimático, enzyme linked immunosorbent assay
fID	Fracción inmunodominante
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersión de luz en el plano del haz de luz, forward scatter
GLP	Ganglio linfático poplíteo
°C	Grado(s) centígrado(s)
°N	Grados de latitud norte
°S	Grados de latitud sur
g	Gramo (s)

xg	Veces la aceleración gravitatoria
G	Guanina
HUJEG-1	Hospital Universitario José Eleuterio González, cepa 1
I.E.	Índice de estimulación
IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina (s)
IgAs	Inmunoglobulina A de secreciones
IL	Interleucina (s)
kDa	Kilodalton (es)
L	Litro (s)
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
μ Ci	Microcurie (s)
μ g	Microgramo (s)
μ l	Microlitro (s)
μ m	Micrómetro (s)
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mmol	Milimol
mM	Milimolar
M	Molar
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad, major histocompatibility complex
MM	Miles y Misra
MN	Mononucleares
n	Número de unidades de observación en una muestra
N	Normal, concentración de una solución
nm	Nanómetro (s)
np	No probado
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador salina-fosfatos
PE	Ficoeritrina

pH	Potencial de hidrogeniones
PHA	Fitohemaglutinina
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
% C	Porcentaje de bis-acrilamida en el total de acrilamida
% p/v	Porcentaje peso/volumen
% v/v	Porcentaje volumen/volumen
% T	Porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SBF	Suero bovino fetal
s.c.	Subcutánea (o)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS
SN	Sobrenadante
SOD	Superóxido dismutasa
s.s.	Solución salina
SSC	Dispersión de luz fuera del plano del haz de luz, side scatter
s.s.e.	Solución salina estéril
TCD3	Molécula CD3 de superficie externa de membrana plasmática de linfocito T
TCD4	Molécula CD4 de superficie externa de membrana plasmática de linfocito T
TCD8	Molécula CD8 de superficie externa de membrana plasmática de linfocito T
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGF	Factor transformante del crecimiento, transforming growth factor
Th1	Linfocito T cooperador subpoblación 1
Th2	Linfocito T cooperador subpoblación 2
Tris	Hidroximetil aminometano,
UFC	Unidades formadoras de colonias
U.V.	Ultravioleta
Ve	Volumen de elución

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Vo	Volumen vacío
VP	Vaciado en placa

APENDICE

1. Reactivos para la Tinción de Kinyoun.

1.1 Carbol-fucsina de Kinyoun.

- a. Se disolvieron 4g de fucsina básica (CTR) en 20ml de etanol (Merck) al 95% v/v.
- b. Se mezclaron 8ml de fenol (Baker) con 92ml de agua bidestilada.
- c. Se mezclaron a. y b.

1.2 Azul de metileno. Se disolvieron 2.5g de azul de metileno (Merck) en 100ml de etanol (Merck) al 95% v/v.

2. Reactivo de Bradford. 6.0mg de azul de Coomassie G-250 (LKB/Bromma) se disolvieron en 100ml de ácido perclórico (Merck) al 3% v/v, en agua. Se filtró y se guardó en frasco ámbar.

3. PBS 0.10M, pH 7.2-7.4. NaCl 8g, Na₂HPO₄ 1.22g, KH₂PO₄ 0.2g, KCl 0.2g, (reactivos Merck), se disolvieron, se ajustó pH y se aforó a un litro con agua.

4. Reactivos para Electroforesis.

4.1. Amortiguador para Preparar Gel de Empaquetamiento o Concentración.

Tris-HCl 1.2M, pH 6.8

4.2 Amortiguador para Preparar Gel de Corrimiento o Separación.

Tris-HCl 3.02M, pH 8.8

4.3 Amortiguador de Corrimiento, con SDS.

Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3

4.4 Amortiguador de Muestra 1x, con SDS.

En 17.5ml de Tris-OH 49mM, pH 6.75-6.80 se disolvieron 1g de SDS y 5mg

de azul de bromo-fenol, el producto se mezcló con 5ml de glicerol y se aforó a 50ml con agua. Al momento de usarse se agregó 5% v/v de 2-mercaptoetanol.

4.5 Acrilamida/bis-acrilamida 30% (acrilamida 30%T, 2.7%C).

29.2g de acrilamida y 0.8g de metilén-bis-acrilamida fueron mezclados con 70ml de agua en matraz Erlenmeyer (cubierto con papel aluminio) y sometidos a agitación suave por 12 horas a 4°C. Una vez a temperatura ambiente se aforó a 100ml con agua, se filtró por papel Whatman y se mezcló con Amberlita XAD7 (mesh 20-60) en proporción 4:1 v/v dejándose en agitación suave durante 1 hora a 4°C. Se filtró, recuperándose en frasco cubierto con papel aluminio, y se almacenó a 4°C.

4.6 Gel de Empaquetamiento o Concentración (5%T, 2.7%C), con SDS.

Acrilamida bis-acrilamida 30%	
(30%T, 2.7%C)	167 µl
Amortiguador Tris-HCl	125
pH 6.8	
Agua	660
SDS 10% p/v	10
Persulfato de amonio 10% p/v	35
TEMED	1

4.7 Gel de Corrimiento o Separación, en Gradiente 10-18%, 2.7%C.

	10%	18%
Acrilamida bis-acrilam. 30%	0.720 ml	1.293 ml
Amortiguador Tris-HCl	0.396	0.396
pH 8.8		
Glicerol 50% v/v	0.144	0.222
Agua	0.874	0.219
SDS 10% p/v	20 µl	20 µl
Persulfato de amonio 10% p/v	7	7
TEMED	1	1

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma.

5. Reactivos para la Determinación de Anticuerpos Séricos anti-ITD de *N. brasiliensis* Mediante ELISA.

5.1 Amortiguador de Acetatos pH 5.0.

- Se disolvieron en agua 0.68g de acetato de sodio anhidro (Merck) y se aforaron a 25ml.

b. Se mezclaron con agua 0.3ml de ácido acético glacial (Merck) y se aforaron a 25ml con agua.

c. Se mezclaron 17.6ml de a. y 7.4ml de b. con unos 20ml de agua, se ajustó pH a 5.0 con solución b., y se aforó a 50ml con agua.

5.2 PBS-tween. PBS 0.1M pH 7.4 se mezcló en proporción 1,000:1 v/v con tween 20 (BIO RAD).

5.3 Solución Bloqueadora al 5% p/v. Se disolvieron 5g de leche descremada (Svelty, Nestlé) en PBS-tween y se aforaron a 100ml con el mismo PBS-tween.

5.4 Antisuero Conjugado a Peroxidasa. Suero de cabra anti-inmunoglobulinas (G, A, M) de ratón, conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:1,000 v/v en solución bloqueadora al 1% .

5.5 Solución de Substrato/Cromógeno. Se preparó al momento de usarse, en frasco ámbar, disolviendo 10mg de dihidrocloruro de orto-fenilendiamina (Sigma) en 20 ml de amortiguador de citratos pH 5.0 y se añadieron 3µl de peróxido de hidrógeno al 30%.

5.5.1 Amortiguador de Citratos pH 5.0.

a. Se disolvieron 0.211g de ácido cítrico (Productos Químicos Monterrey) en 10ml de agua.

b. Se disolvieron 0.283g de Na_2HPO_4 (Merck) en 10ml de agua.

c. En tubo cónico se mezclaron 6.03ml de a. con 6.425ml de b., se ajustó pH a 5.0 (con solución b.) y se aforó a 25ml con agua. El tubo se cubrió el tubo con papel aluminio.

6. Reactivos para la Obtención de Suspensiones de Células de Bazo y de GLP de Ratones.

6.1 Medio de Cultivo para Transporte. RPMI-1640 (Sigma) o Iscove (Sigma) con HEPES y bicarbonato de sodio fue adicionado de penicilina 50 unidades/ml (Sigma), gentamicina 50µg/ml (Sigma) y estreptomina 100µg/ml (Sigma).

6.2 Medio de Cultivo para Suspensión Celular. El medio de cultivo descrito en el párrafo anterior, sin estreptomycin.

7. Reactivos para el Ensayo de Respuesta Proliferativa a Mitógenos y Antígenos, de Linfocitos de Bazo y de GLP de Ratones.

Medio para Cultivo de Células de Bazo y de GLP de Ratón. RPMI-1640 (Sigma) con HEPES y bicarbonato de sodio fue adicionado de penicilina 50 U/ml, gentamicina 50µg/ml, 2mM de L-glutamina (Sigma) y 5% v/v de suero bovino fetal (procesado en el Depto. de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL).

8. Reactivos para el Análisis de las Poblaciones de Linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y BCD45R+ de Bazo y de GLP de Ratones.

8.1 Solución de Lisis de Eritrocitos. Tris 17mM (Sigma), NH₄Cl 0.75% p/v (Merck), pH 7.2.

8.2 Anticuerpos anti-CD de Ratón, Sigma. Anticuerpos monoclonales de rata:

anti-CD3 (cadena épsilon de 25kDa) conjugado a FITC,

anti-CD4 (antígeno L3T4 de 55kDa) conjugado a PE,

anti-CD8a (antígeno de 65kDa) conjugado a FITC,

anti-CD45R (isoforma de 220kDa ó B220) conjugado a PE.

8.3 Anticuerpos Monoclonales de Rata Isotipos IgG2a y 2b Conjugados a FITC y a PE, Como Controles de Unión Inespecífica.

