

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON



COMPARACION DEL EFECTO PROTECTOR DE  
LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA  
POR ANTIGENOS SOLUBLES Y,  
PARTICULADOS DE  
*Nocardia brasiliensis*

M.C. Q.C.B. LUZ ISABEL PEREZ RIVERA

Director de la tesis: Dr. Mario César Salinas C.



COMPARACION DEL EFECTO PROTECTOR DE  
LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA  
POR ANTIGENOS SOLUBLES Y  
PARTICULADOS DE  
*Nocardia brasiliensis*

TD  
QR82  
.N6  
P4  
2005  
c.1

2005



1080127296

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL NUEVO LEÓN

ESTUDIOS DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RESPUESTA INMUNE  
INDUCIDA POR ANTIGENOS SOLUBLES Y PARTICULADOS DE  
*Nocardia brasiliensis*

ELABORACIÓN DE LA TESIS

DR. MARCO ANTONIO S. CHAIJ FARRERA

DOCTORALIA YUCALBA ARCE MENDOZA

COMITÉ DE ASesorIA DEL DIRECTOR DE  
LA TESIS DE LA TESIS INDIVIDUAL INDUCIDA  
POR ANTIGENOS SOLUBLES Y  
PARTICULADOS DE

*Nocardia brasiliensis*

DR. JUAN MARCEL SOLÍS SOTO

M.C. Q.C.B. LUZ ISABEL PEREZ RIVERA

Director de la tesis: Dr. Mario César Salinas C.

Subdirector

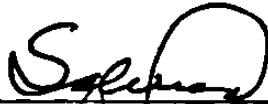
Calufo de Poyyado

TD  
QR 82  
. N6  
P4  
2005



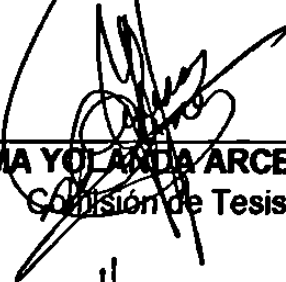
**COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RESPUESTA INMUNE  
HUMORAL INDUCIDA POR ANTÍGENOS SOLUBLES Y PARTICULADOS DE  
*Nocardia brasiliensis***

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA**  
Director de Tesis



---

**DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA**  
Comisión de Tesis



---

**DR. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO**  
Comisión de Tesis



---

**DR. OLIVERIO WELSH LOZANO**  
Comisión de Tesis



---

**DR. JUAN MANUEL SOLIS SOTO**  
Comisión de Tesis



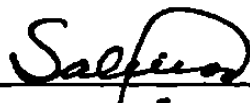
---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector  
de Estudios de Posgrado

**COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE  
LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA  
POR ANTIGENOS SOLUBLES Y  
PARTICULADOS DE  
*Nocardia brasiliensis* .**

Presentado por: MC QCB Luz Isabel Pérez Rivera

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona, con el apoyo de CONACYT (Proyecto No. F226-M y PAICYT SA 973-04).



---

Dr. Mario César Salinas Carmona

Asesor Doctoral

## DEDICATORIA

✚ A DIOS quien me dio la vida y la habilidad para cumplir mis sueños.

✚ A MIS PADRES quienes me enseñaron valores y principios  
Gracias los quiero mucho

✚ A MI ESPOSO quien ha estado a mi lado  
Dando su amor y su apoyo incondicional  
para llegar a la meta, Te amo y muchas  
gracias.

✚ A MIS HIJOS: ALBERTO

SAMUEL

IVAN

Quienes son mi gran tesoro, los quiero mucho  
y gracias por su amor.

✚ A MI FAMILIA muchas, muchas gracias



## AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por todo su apoyo y por la confianza que ha depositado en mi. Muchas gracias.
- ❖ A Dra. AYA gracias por su ejemplo de perseverar y no dar un paso atrás.
- ❖ A TODO el Personal del Departamento de Inmunología, muchas gracias.
- ❖ A Dra. Anna Velia por haberme compartido aquello que redefinió mi vida: A CRISTO gracias
- ❖ A mis grandes amigas: Paty, Ale y Alicia las quiero mucho.
- ❖ A mis compañeros de Postgrado: Lupita de la Cruz, Adrian G., Igor, Marisol, Juan Manuel, Dra. Angeles Castro, Maricela, Lulú y Julieta.
- ❖ Araceli y Lizzy muchas gracias.
- ❖ A Sr. Reynaldo y Franky por todo su apoyo muchas gracias.
- ❖ Y a todas aquellas personas que no las menciono pero que de un modo u otro me ayudaron y me alentaron, muchas gracias.
- ❖ Gracias por sus palabras de animo, por sus enseñanzas y sobre todo su ejemplo, los quiero mucho: Richard y Fonda

## INDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Portada	I
Aprobación de la tesis	II
Lugar de trabajo	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice de contenido	VI
Índice de figuras	XII
Índice de tablas	XVI
Abreviaturas y simbología	XVII
RESUMEN	XX
<b>1.- ANTECEDENTES</b>	1
<b>2.- HIPÓTESIS</b>	44
<b>3.- OBJETIVOS</b>	
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS ESPECIFICOS	46
<b>4.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
1.-Material biológico	47
1.1 Animales de experimentación	
1.2 Cepa bacteriana	
1.2.1 Obtención de la suspensión unicelular	
1.2.1.1 Determinación de UFC/ml de <i>N. brasiliensis</i>	48
1.2.1.1.1 Micrométodo de Miles y Misra	49
1.2.2 Obtención del extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i>	49
1.2.2.1 Determinación de proteínas (Bradford)	51

1.2.2.2	Análisis electroforético PAGE-SDS	52
1.2.2.3	Tinción de Coomassie	53
1.2.2.4	Tinción de plata	53
1.2.3	Obtención y purificación de antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> .	54
1.2.3.1	Obtención y purificación de P24	56
1.2.3.2	Obtención y purificación de P61	58
1.2.3.3	Obtención y purificación de Proteasa (P38)	60
1.2.3.3.1	Determinación de la actividad enzimática del extracto crudo y del filtrado de cultivo	62
1.2.3.3.2	Obtención y purificación de las proteasas intracelular (IC) y extracelular (EC).	63
1.2.3.4	Determinación de la pureza de la proteínas purificadas (P24, P61 y proteasa).	65
1.2.3.4.1	Análisis electroforético SDS-PAGE	66
1.2.3.4.2	Inmunoelctrotransferencia (Western-blot)	66
1.2.4	Obtención de antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i>	67
1.2.4.1	Bacterias deslipidizadas	67
1.2.4.2	Bacterias muertas por calor.	68
2.	Esquema de inmunización general.	68
2.1	Inmunización con antígenos solubles y particulados.	68
3.	Obtención de sueros hiperinmunes contra antígenos solubles y particulados de <i>N. brasiliensis</i> .	70
3.1	Análisis de los sueros hiperinmunes	71
3.1.1.	Determinación de los anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA).	71

3.1.2	Identificación de los isotipos de los sueros anti-antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> a partir de sueros obtenidos en el día 45.	72
4.	Efecto de la inmunización activa en el establecimiento y evolución del micetoma experimental.	73
4.1	Inmunización con antígenos solubles.	74
4.2	Inmunización con antígenos particulados.	75
4.3	Inducción del micetoma experimental	76
5.	Efecto de la inmunización pasiva en el establecimiento y evolución del micetoma experimental.	77
5.1	Transferencia Pasiva de suero hiperinmune hacia antígenos solubles y particulados de <i>N. brasiliensis</i> .	78
5.2	Inducción del micetoma experimental.	79
6.	Experimentos de Re-infecciones con <i>N. brasiliensis</i>	
6.1	Re-infección en el día 90 (I. activa día 15).	80
6.2	Re-infección en el día 90 (T. pasiva día 7).	80
6.3	Re-infecciones a tiempos cortos con <i>N. brasiliensis</i> a partir del día 15.	81
7.	Transferencia pasiva de células de bazo obtenidas de ratón inmunizado con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .	81
7.1	Obtención de las células MN (bazo).	82
7.2	Transferencia de células MN sensibilizadas.	83
7.3	Inducción del micetoma experimental.	85
8.	Determinación de las subpoblaciones de las células B en ratones BALB/c inmunizados con antígenos <i>N. brasiliensis</i>	85
8.1	Inmunización con antígenos de <i>Nocardia brasiliensis</i>	86
8.2	Obtención de las suspensiones celulares de ratones BALB/c	



inmunizados con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .	86
8.3 Caracterización de las células esplénicas, peritoneales y sanguíneas mediante citometría de flujo.	87
9. Análisis estadístico.	89
<b>5.- RESULTADOS:</b>	
1. Micetoma experimental en ratones BALB/c.	90
2.- Rendimiento obtenido de las proteínas inmunodominantes (P24 y P61) y no inmunodominante (Proteasa).	91
2.1 Patrón electroforético en PAGE-SDS de las proteínas P24, P61 y Proteasa.	92
Actividad enzimática del extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i> (Zimograma.).	93
2.1.1 Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) de las proteínas ID reveladas con suero de ratón con micetoma.	94
3. Inmunización activa con antígenos solubles y particulados.	
3.1 Determinación de IgM e IgG contra antígenos solubles.	95
Determinación de IgM e IgG contra antígenos particulados.	96
3.2 Determinación de anticuerpos IgG anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa mediante una prueba inmunoenzimática (ELISA).	97
Determinación del isotipo de los anticuerpos anti-P24, anti-P61 anti-proteasa.	98
4. Efecto de la inmunización activa con antígenos solubles en el establecimiento y evolución del micetoma experimental.	
a) Inmunización activa con antígenos solubles e infección en el día 45 post-inmunización.	99
b) Inmunización activa con antígenos solubles e infección en el día 15 post-inmunización.	100

c)	Inmunización activa con antígenos solubles e infección en el día 7 post-inmunización.	101
d)	Inmunización activa con antígenos solubles e infección en el día 3 post-inmunización.	102
5.	Efecto de la Inmunización activa con antígenos particulados en el establecimiento y evolución del micetoma experimental.	
a)	Inmunización activa con antígenos particulados e infección en el día 45 post-inmunización.	103
b)	Inmunización activa con antígenos particulados e infección en el día 15 post-inmunización.	104
c)	Inmunización activa con antígenos particulados e infección en el día 3 post-inmunización.	105
6.	Transferencia pasiva de sueros hiperinmunes contra antígenos solubles en ratón BALB/c e infectados con <i>N. brasiliensis</i>	
a)	Transferencia pasiva del suero del día 45 (dado antes de la infección).	106
b)	Transferencia pasiva de suero del día 45 (dado después de la infección).	107
c)	Transferencia pasiva de suero del día 15 (dado antes de la infección).	108
d)	Transferencia pasiva de suero del día 7 (dado antes de la infección).	109
e)	Transferencia pasiva de suero del día 3 (dado antes de la infección).	110
7.	Transferencia pasiva de suero hiperinmune contra antígenos particulados en ratones BALB/c e infectados con <i>N. brasiliensis</i>	
a)	Transferencia pasiva del suero del día 45 (dado antes de la	

infección).	111
b) Transferencia pasiva de suero del día 45 (dado después de la infección).	112
c) Transferencia pasiva de suero del día 15 (dado antes de la infección).	113
d) Transferencia pasiva de suero del día 7 (dado antes de la infección).	114
e) Transferencia pasiva de suero del día 3 (dado antes de la infección).	115
<b>8.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) obtenidas de bazo de ratones inmunizados con antígenos (ags.) de <i>N.brasiliensis</i> e infectados con <i>N. brasiliensis</i>.</b>	
a) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con ags. solubles obtenidas en el día 45 post-inmunización.	116
b) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con antígenos particulados obtenidas en el día 45 post-inmunización.	117
c) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con antígenos solubles obtenidas en el día 30.	118
d) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con antígenos particulados obtenidas en el día 30.	119
e) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con antígenos solubles obtenidas en el día 15.	120
f) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con antígenos particulados obtenidas en el día 15.	121
g) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con antígenos solubles obtenidas en el día 7.	122
h) Transferencia pasiva de células MN sensibilizadas con	

antígenos particulados obtenidas en el día 7.	123
9.- Experimentos de re-infecciones con <i>N. brasiliensis</i> en el día 90 post-infección.	
a) Re-infección en el día 90 en el experimento de inmunización activa con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> en el día 15 post-inmunización.	124
b) Re-infección en el día 90 en el experimento de inmunización pasiva con suero obtenido del día 7 post-inmunización con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .	125
b) Re-infecciones a tiempos cortos en el experimento de inmunización activa con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> en el día 15 post-inmunización.	126
10.- Análisis de las subpoblaciones de las células B1a, B1b y B-2 a partir de diferentes poblaciones celulares (sangre, células de cavidad peritoneal y células esplénicas) obtenidas de ratones BALB/c inmunizados con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .	
Citometría de células obtenidas en el día 7 post-inmunización	127
Citometría de células obtenidas en el día 15 post-inmunización.	128
Citometría de células obtenidas en el día 30 post-inmunización	129
6.- DISCUSIÓN	130
7.- CONCLUSIÓN	141
8.- PERSPECTIVAS	142
9.- BIBLIOGRAFÍA	143
10.- APENDICES	
Apéndice A: Reactivos	164



## LISTA DE FIGURAS

Página

1.- Fotografía de un micetoma por <i>N. brasiliensis</i> en el cojinete plantar de un ratón BALB/c.....	90
2.- Patrón electroforético del Extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i> PAGE-SDS 10-18% .....	92
3.- Determinación de actividad enzimática del extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i> .....	93
4.- Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot) de proteínas de <i>N. brasiliensis</i> reveladas con suero de ratón con micetoma causado por <i>N. brasiliensis</i> . .....	94
5.-Determinación de Anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa por un método inmunoenzimático (ELISA) en suero de ratón inmunizado con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 45. ....	97
6.- Inmunización activa con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> e infectados en el día 45.....	99
7.- Inmunización activa con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> e infectados en el día 15.....	100
8.- Inmunización activa con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> e infectados en el día 7.....	101
9.- Inmunización activa con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> e infectados en el día 3.....	102
10. Inmunización activa con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> e infectados en el día 45.....	103
11. Inmunización activa con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> e infectados en el día 15.....	104
12.- Inmunización activa con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> e	

infectados en el día 3.....	105
13.-Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	106
14.-Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c después de la infección.....	107
15.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 15 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	108
16.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 7 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	109
17.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 3 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	110
18.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	111
19.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c después de la infección.....	112
20.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 15 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	113
21.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 7	

y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	114
22.- Inmunización pasiva con suero de ratón inmunizado con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en el día 3 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	115
23.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 45 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	116
24.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 45 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	117
25.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 30 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	118
26.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 30 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	119
27.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 15 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	120
28.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 30 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	121
29.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos solubles de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 7 y dado a ratones BALB/c antes de la infección.....	122
30.- Transferencia pasiva de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos particulados de <i>N. brasiliensis</i> obtenidas en el día 7 y	

31.-	Efecto de la re-infección a los 90 días post-infección en los					
32.-	Efecto de la re-infección a los 90 días post-infección en los					
33.-	Efecto de las re-infecciones a diferentes tiempos en ratones					



<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
1.- Rendimiento de las proteínas solubles aisladas a partir del extracto crudo de <i>N. brasiliensis</i> .....	91
2.- Determinación de IgG e IgM anti-antígenos solubles.....	95
3.-Determinación de IgG e IgM anti-antígenos particulados.....	96
4.- Determinación de isotipos de los anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa en suero de ratón inmunizado con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> obtenido en los días 45-60.....	98
5. Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células de cavidad peritoneal a diferentes tiempos de inmunización con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .....	127
6.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células de bazo a diferentes tiempos de inmunización con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .....	128
7.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células sangre periférica a diferentes tiempos de inmunización con antígenos de <i>N. brasiliensis</i> .....	129

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍAS

BHI	Brain-Heart-Infusion
UFC	Unidades formadoras de colonia
<i>N.b.</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
S.S.	solución salina
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
ECC	Extracto crudo celular
Abs	Absorbancia
2ME	2-mercatotanol
SN	sobrenadante
Ppto.	precipitado
Vo	volumen vacío
I-D	inmunodominante
No I-D	no inmunodominante
OPD	ortho-fenilen-diamina
BMC	bacterias muertas por calor
BD	bacterias deslipidizadas
BV	bacterias vivas
AIF	adyuvante incompleto de Freund
SC	subcutánea

<b>IP</b>	<b>intraperitoneal</b>
<b>ID</b>	<b>intradérmica</b>
<b>ELISA</b>	<b>ensayo inmunoenzimático en fase sólida</b>
<b>MN</b>	<b>mononuclear</b>
<b>PE</b>	<b>phycoeritrina</b>
<b>FITC</b>	<b>isotiocianato de fluoresceína</b>
<b>CP</b>	<b>cavidad peritoneal</b>
<b>NO</b>	<b>óxido nítrico</b>
<b>ROI</b>	<b>radicales del O<sub>2</sub></b>
<b>kDa</b>	<b>kilodalton</b>
<b>µg</b>	<b>microgramos</b>
<b>µl</b>	<b>microlitro</b>
<b>mg</b>	<b>miligramo</b>
<b>ml</b>	<b>mililitro</b>
<b>mm</b>	<b>milímetro</b>
<b>M</b>	<b>molaridad</b>
<b>h</b>	<b>hora</b>
<b>min</b>	<b>minuto</b>
<b>seg</b>	<b>segundo</b>
<b>PBS</b>	<b>amortiguador salina fosfato</b>

<b>pH</b>	<b>potencial de hidrógeno</b>
<b>%T</b>	<b>porcentaje total de archilamida-bisacrilamida en el gel</b>
<b>%C</b>	<b>porcentaje de bisacrilamida en el total de archilamida</b>
<b>rpm</b>	<b>revoluciones por minuto</b>
<b>SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio</b>	
<b>TEMED</b>	<b>N,N,N',N'- Tetrametilendiamina</b>
<b>HCL</b>	<b>ácido clorhídrico</b>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>ácido sulfúrico</b>

# RESUMEN

Luz Isabel Pérez Rivera

Obtención de grado junio 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** Comparación del efecto protector de la respuesta inmune humoral inducida por antígenos solubles y particulados de *Nocardia brasiliensis*.

Número de páginas: 186

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

**Propósito y Método de Estudio:** *N. brasiliensis* es el principal agente del actinomicetoma e induce una fuerte respuesta anti-bacteriana. En este estudio se utilizó el modelo de actinomicetoma experimental en ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC 700358. Los antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) de *N. brasiliensis* se purificaron a partir de un extracto crudo y los antígenos particulados: bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas a partir de un cultivo de *N. brasiliensis* de 3 días a 37°C. La hipótesis planteada fue que la protección inducida por antígenos particulados es mayor que la de los antígenos solubles, en la prevención del establecimiento de la infección.

**Contribuciones y Conclusiones:** La Inmunización activa con antígenos solubles y particulados induce protección total cuando la infección se hizo en el día 15 post-inmunización, protección parcial cuando la infección fue en el día 45 y no hubo protección cuando la infección se hizo en los días 7 y 3. La transferencia pasiva con sueros hiperinmune obtenidos en el día 7 confiere protección total, mientras que el suero de los días 45, 15 y 3 no confieren protección. La transferencia pasiva de células mononucleares de bazo del día 7 y 15 provenientes de ratón inmunizado con antígenos de *N. brasiliensis* induce protección en un 80% de los casos. Las subpoblaciones de las células B analizadas por citometría de flujo mostraron un aumento de un 20 a 40% de células B-1a y B-2 en las células del día 7 y 15 mientras que las células del día 30 dio igual que el control. Los resultados obtenidos aportan conocimiento importante para el desarrollo de vacunas que logren prevenir el establecimiento de las infecciones causadas por *N. brasiliensis* u otros microorganismos intracelulares.

Firma del Asesor:



Dr. Mario César Salinas Carmona

## ANTECEDENTES

### HISTORIA:

El micetoma es una enfermedad la cual fue primeramente descrita por Gill en Madura en un distrito de India en 1842, de ahí el nombre de "Pie Madura". En 1846 Godfrey publicó 4 casos de una nueva entidad clínica llamada "morbus tuberculosis pedis" y en 1860 Carter llamó a esta condición "Mycetoma" describiendo su etiología fungica. En 1813 Pinoy (1) describe el micetoma producido por bacterias aeróbicas las cuales pertenecen al grupo de los actinomicetos y clasifican el micetoma producido por hongos verdaderos o eumicetoma mientras que el causado por bacterias se llama actinomicetoma. Ambos tipos de micetoma tienen hallazgos clínicos similares. El primer caso conocido de una enfermedad producida por *Nocardia* fue reportado por un veterinario francés Edmond Nocard en 1888 cuando aisló de lesiones granulomatosas en bovinos un organismo filamentosos(2).

En 1889 Trevisan creó el género *Nocardia* y el aislado de Nocard y lo llamó *Nocardia farcinica* (3). El primer caso de infección en humanos fue reportado en 1890 por Eppinger quien aisló un organismo similar aerobio ramificado, filamentosos a partir de un absceso cerebral en humanos y lo llamo *Cladothrix asteroides*, no obstante en 1896 Blanchard lo llamó *Nocardia asteroides* (4 y 5). En 1980 Gordon y Mihn

proponen y es oficialmente aceptado el nombre de *Nocardia asteroides* para la especie tipo, reemplazando a *N. farcinica*. Unos años después se designa una nueva cepa como cepa tipo en lugar de la aislada originariamente en 1888.

#### TAXONOMIA.

El Genero *Nocardia* es un grupo de bacterias de la Familia *Nocardiaceae* que pertenece al Orden de los Actinomycetales. Este grupo de bacterias tienden a formar filamentos y a ramificarse. Los actinomicetos nocardioformas descritos en la 19° edición del Manual de Bacteriología de Bergey incluye en el grupo 22 a los Géneros: *Nocardia*, *Gordona*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (5,6). La identificación y la taxonomía definitiva de los actinomicetos es compleja y los criterios quimotaxonómicos que asignan a la bacteria al género *Nocardia* incluyen:

- a) presencia de ácidos micólicos con 46 a 60 átomos de carbono (7,8)
- b) Presencia de 2,6 diaminopimelico, arabinosa y galactosa (9 )
- c) Presencia de ácido tubérculoesteárico y ácidos grasos insaturados(10)
- d) Presencia de menaquinona (11 y 12 ).



Los patrones de susceptibilidad anti-microbiana facilitan el reconocimiento de especies de *Nocardia* y se ha propuesto como un criterio taxonómico (13,14 y 15).

El orden: Actinomycetales pertenecen las siguientes familias: *Actinomycetaceae*, *Streptomycetaceae* entre otras, cuya características son: desarrollo de micelios a partir de los filamentos, mientras que otros presentan filamentos cortos como sucede con la Familia *Mycobacteriaceae*. Los filamentos al fragmentarse, toman formas cocoides o adquieren la forma de difteroides. Esta descripción es solo para indicar la gran variedad de microorganismos considerados en este orden.

Se ha propuesto que *Nocardia asteroides* es un taxón heterogéneo el cual probablemente consiste de varios subtipos de especies (16).

El género *Nocardia* se encuentra relacionada filogénicamente con otros actinomicetos que contienen ácidos micólicos, tales géneros son: *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Gordona*, *Tsukumurella*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (17).

## MORFOLOGIA

Las bacterias del género *Nocardia* fueron reconocidas y diferenciadas en base a su morfología celular. Hay descritas más de 30

especies del género *Nocardia* aunque en la actualidad solo 11 especies son validas las cuales forman hifas extensamente ramificadas las cuales a menudo se fragmentan in situ o por disrupción mecánica dando origen a elementos cocoidales o bacilares. Las hifas aereales están presentes en las especies de *Nocardia* con un complejo no definido de filamentos que pueden fragmentarse a elementos bacilares o cocoidales. En contraste la hifas aéreas no están presentes en bacterias que pertenecen al género *Gordona*, *Rhodococcus* o *Tsukumarella*.(18,19)

La extensión de los filamentos y la uniformidad de la fragmentación depende de las condiciones del cultivo. Las bacterias del género *Nocardia* crecen a una temperatura de 37°C en medios convencionales como agar Saboureaud dando origen a colonias rugosas secas cuyo color varía de blanco al naranja dependiendo de la composición del medio y de las condiciones del cultivo.

La información en la apariencia microscópica de las especies de *Nocardia* es importante. Las microcolonias del agente etiológico en el tejido se llaman granos o gránulos, cuyo color y morfología es importante porque tanto hongos como bacterias causantes de micetoma producen granos o gránulos de color característico. Por ejemplo, gránulos blancos son producidos por el complejo *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. cavie*(20). El micetoma causado por hongos o

eumicetoma por ejemplo: *Acremonium kiliense*, *A. falciforme*, *A. recifei*, son microorganismos que producen gránulos de color blanco (21,22). En cambio los gránulos rojos son típicamente producidos por *Actinomadura pelletieri* y los granos negros por *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea* y *Exophiala jeanselmi*.

### ESTRUCTURA DE LAS NOCARDIAS:

Las *Nocardias* son catalasa positiva y la composición química de su envoltura es útil en la diferenciación de géneros que se semejan a la *Nocardia*. La estructura básica de la pared celular de las *Nocardias* después de la extracción de lípidos libres, la componen péptidos sensibles a proteasas, pigmentos y polisacáridos neutros: en general se componen de tres elementos igual que el que está presente en las micobacterias:

a) Peptidoglicano, b) arabinogalactana y c) Ácidos micólicos (23).

**A) Peptidoglicano.-** Forma parte de la pared rígida que poseen todos los actinomicetos y rodea a la membrana citoplásmica. En la mayoría de las cepas de *N. asteroides*, el peptidoglicano representa solamente el 20-25% del total de la masa de la pared celular (24,25), no obstante en ciertas etapas de crecimiento (fase estacionaria) en

algunas cepas de *Nocardia* constituye el 45% de la pared celular. Las cadenas de polisacárido del peptidoglicano son de tipo común, formado por moléculas alternadas de N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetil-D-murámico, unidas por medio de un enlace glucosídico  $\alpha$ -1,4. Sin embargo se pueden presentar algunas estructuras atípicas como en el caso de *Nocardia*, donde el ácido N-acetil-murámico puede estar substituido por el ácido N-glicolil-murámico. La pared celular que presenta pertenece al tipo IV de la categoría I de los actinomicetos, en esta categoría se agrupan las bacterias que tienen una pared celular rara, que consiste de un peptidoglicano que contienen ácido meso-diaminopimelico (meso-DAP) y un polímero de arabinosa-galactosa (tipo IV) y N-glicolilmurámico ácido. La capa de peptidoglicano de la *Nocardia* spp es del tipo A1 $\alpha$  al cual contiene meso-A2pm como ácido diamino y ácido murámico en la forma N-glicosilada.

**B) Arabinogalactana y Arabinomanana.**- Es la fracción polisacárida de la pared celular la cual es rica en arabinosa y galactosa. La arabinogalactana es un polisacárido que está constituido por subunidades de  $\beta$ 1-4-galactopiranososa y  $\alpha$ 1-5 arabinofuranosa. Aproximadamente un residuo de cada 10 arabinosas está esterificado a un ácido micólico por medio del hidroxilo 5' de la

arabinosa terminal. La arabinomanana es un polisacárido de localización esencialmente citoplásmica, constituido de una cadena lineal de  $\alpha$ 1-6 manana y de residuos  $\alpha$ 1-5 arabinofuranosa. Algunos residuos de arabinosa de esta arabinogalactana están esterificados con una molécula de ácido micólico y por lo tanto forman un complejo grande de peptidoglicano-arabinogalactana-micolato (26,27)

**C) Acidos Nocardomicólicos.-** La envoltura de la pared también contiene ácidos micólicos los cuales están ligados al peptidoglicano por medio de la arabinogalactana. Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados,  $\beta$ -hidroxilados similares a los encontrados en bacterias pertenecientes a los Géneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* (28). El número de átomos de carbono en la cadena del ácido micólico varía de C<sub>20</sub> a C<sub>36</sub> en el Genero *Corynebacterium*, C<sub>60</sub> a C<sub>90</sub> en el Genero *Mycobacterium* y C<sub>36</sub> a C<sub>66</sub> en las especies de *Nocardia* y *Rhodococcus* (29,30). El patrón de los ácidos micólicos analizados por HPLC y CCF bi-dimensional es útil en la diferenciación e identificación de los ácidos micólicos presentes en la bacteria. *Nocardia brasiliensis* que contiene 44 a 64 átomos de carbono y presenta mas de 3 dobles enlaces, con una cadena principal que puede o no estar saturada

(mono, di o trietilénica) y que por pirólisis libera ésteres de 12 a 18 átomos de carbono. Los ácidos micólicos poli-insaturados (2 dobles ligaduras) con cadenas hidrocarbonadas largas (C<sub>54</sub>,C<sub>56</sub>) se encuentran de manera preponderante en la fase logarítmica de crecimiento de *Nocardia*(31), Durante la fase estacionaria se encuentran principalmente ácidos micólicos saturados (o con pocas dobles ligaduras) y de cadena mas corta(C<sub>53</sub>). El ácido micólico C<sub>54,3</sub> (cadena de 54 átomos de carbono y 3 dobles ligaduras) parece estar asociado a la virulencia de *N. asteroides* (32). Tanto el tamaño como el grado de insaturación de las cadenas de los ácidos micólicos (número de dobles enlaces) dentro de la pared celular en *Nocardia asteroides* son dependientes de la etapa de crecimiento y son afectadas por la temperatura de crecimiento. Esos cambios parecen corresponder a diferencias en la toxicidad y virulencia (33 ).

El rango de contenido de G + C del DNA es de 64-72 M% (23). Un criterio adicional que puede permitir la rápida diferenciación de las especies de *Nocardia* de otros Actinomicetos depende de la resistencia a la lisozima a diferencia de *N. amarae* , todas las *Nocardias* crecen en un medio suplementado con lisozima, asi como *Rhodococcus*, *Actinomadura* y *Streptomyces*(34).

Las *Nocardias* se caracterizan por ser microorganismos Gram positivos, aerobios que en estado temprano de crecimiento muestran células ramificadas y filamentosas. Las células pleomórficas son comunes en cultivos viejos caracterizados por fragmentos filamentosos bacilares o cocoidales (35). Algunas cepas son ácido alcohol resistente que crecen en medios simples dando crecimientos de colonias opacas o pigmentadas que pueden dar apariencia lisa , rugosa , pastosa o dura.

Las *Nocardias* son microorganismos cuyo habitat natural es generalmente el suelo y constituyen el 25% del total de la biomasa de todos los actinomicetos. Estos actinomicetos tal vez sean el grupo de bacterias con más trascendencia para la vida del hombre en vista de los innumerables procesos biológicos en los cuales participan. Las *Nocardias* pueden crecer en muy diversos sustratos orgánicos y en rangos de temperatura muy amplios y utilizar tanto el nitrógeno orgánico como inorgánico; la mayoría son sensibles al pH ácido pero los favorecen los medios ligeramente alcalinos. Estos microorganismos pueden vivir desde la superficie de la tierra hasta profundidades cercanas a los dos metros. Por una parte producen la descomposición de residuos vegetales y animales sobre todo en zonas tropicales. En un estudio de aislamiento de *Nocardia* a partir de suelos del Estado de Morelos (México) encontraron que el 35.27% corresponde a especies de *Nocardia*



patógenas; de estas *Nocardia brasiliensis* se aisló en la mayor frecuencia 20.83% y *N. asteroides* en un 8.33% mientras que *N. caviae* de 6.11%. La frecuencia de especies de *Nocardia* aisladas de diferentes tipos de suelo de México, la mas abundante fue en las tierras de cultivo de caña de azúcar (15.83%) en relación a otros tipos de tierra ( 36) y *Nocardia brasiliensis* fue la especie mas abundante en todos los casos. Se considera que los suelos, sobre todo de zonas tropicales son el reservorio natural de los agentes de micetoma actinomicótico.

Las infecciones causadas por *N. brasiliensis* ocurren de manera accidental por inoculación del microorganismo en la piel y el tejido subcutáneo a través de espinas, productos vegetales especialmente en el área de las extremidades, también puede presentarse en la cara posterior del tórax por la costumbre de algunas personas de cargar leña (37). Las infecciones por *Nocardia* en humanos y en otros animales han sido ampliamente reconocidas, siendo patógenas todas las especies aisladas de muestras tomadas de suelo de muchas partes del mundo. Recientemente Uzcategui M. (38) recolectó muestras de tierra de la zona norte de Nuevo León (Cerralvo, N.L.) obtenidas de diferentes lugares, con el fin de aislar e identificar bacterias del género *Nocardia*, en tal estudio encontró que la frecuencia de *Nocardia* fue mas abundante en las tierras de cultivo de caña de azúcar y en tierra donde esta cultivada el

maguey. Dentro del género *Nocardia* se han descrito 18 especies oficialmente aceptadas, de las que se reconocen 11 como patógenas para el hombre: *Nocardia asteroides sensu stricto* (tipo I y tipo VI), *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidiscaviarum*, complejo *Nocardia transvalensis* (*N. asteroides* tipo IV, *sensu stricto*, nuevo taxón I y II), *N. pseudobrasiliensis*, *N. brevicatena*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia abscesos* y *N. veterana*, siendo las seis primeras especies las que causan infección en el hombre con mayor frecuencia. Existen diferentes tipos de infecciones producidos por dichos microorganismos por ejemplo (39):

A.- Nocardiosis pulmonar

B.- Nocardiosis sistémica

C.- Nocardiosis del SNC

D.- Nocardiosis extrapulmonar

E.- Nocardiosis cutánea, subcutánea y linfocutánea

F.- ACTINOMICETOMA

Estas infecciones son de naturaleza supurativa y tienden a localizarse a nivel de piel y tejidos subyacentes o en pulmón (20,40). *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal del actinomicetoma en México (41), la cual es una enfermedad infecciosa crónica de la piel y tejido

celular subcutáneo que en ocasiones puede extenderse al músculo, a los huesos y a los órganos adyacentes. (1,42).

El actinomicetoma o micetoma actinomicótico causado por *Nocardia brasiliensis* tiende a afectar en forma más predominante a grupos de personas entre los 20 a los 40 años de edad en una proporción hombre: mujer 5:1. Las ocupaciones predominantes fueron las de los agricultores (60.2%) y las amas de casa (21.3%) quienes realizan también labores en el campo. La frecuencia por agentes etiológicos reveló que el 97.8% fue del tipo actinomicetoma (causado por actinomicetos) y 2.2 % del tipo eumicetoma (causado por hongos o eumicetos). *Nocardia brasiliensis* fue la especie más frecuente con un 86.6% seguida de *Actinomadura madurae* (10.2%) (20,42).

#### DESCRIPCIÓN CLÍNICA DEL ACTINOMICETOMA POR *N. brasiliensis*.

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*. Esta enfermedad comúnmente progresiva, permanece activa durante la vida del individuo causando tal daño que puede incluso requerir amputación del miembro afectado (20). Esto es

debido a que no responden fácilmente a la quimioterapia y produce un debilitamiento significativo del paciente

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica que se caracteriza por una inflamación persistente, con áreas de abscesos múltiples que se abren y drenan un material seropurulento en donde pueden encontrarse microcolonias del agente causal llamados gránulos o granos macroscópicamente visible, de tamaño cercano a un mm de diámetro y colores variables y células inflamatorias rodeando colonias microscópicas del organismo infectante (18). El estudio histológico de la lesión muestra infiltración de PMN (neutrófilos) y mononucleares (linfocitos y macrófagos) al igual que fibroblastos que circunscriben la lesión. Dichos granos son acúmulos del agente causal los cuales son expulsados a través de uno o varios tractos sinuosos presentes en la lesión.

El micetoma a menudo empieza como un nódulo indoloro que se desarrolla en el sitio de daño y crece en tamaño y puede eventualmente convertirse en purulento y necrótico. La pus puede ser descargada a través de tractos sinusoides que se forman y durante el desarrollo progresivo de las lesiones ocurre la formación de múltiples nódulos secundarios y tractos sinusoidales que drenan un exudado seroso el cual contiene pus con abundantes bacterias. Los gránulos representan

pequeñas colonias del agente infeccioso rodeado por masas de células inflamatorias(18). Usualmente el micetoma permanece localizado, pero a veces se extiende por diseminación a órganos adyacentes. Con el tiempo la infección involucra tanto al músculo como hueso ocurriendo una osteomielitis destructiva (20). Una vez establecida esas lesiones tienden a ser progresivas y en un periodo de años tienden a no responder a la quimioterapia y puede resultar de un significativo debilitamiento del paciente.

El periodo de incubación del micetoma no es claro ya que el rango puede ser desde unos pocos meses a varios años y en la mayoría de los pacientes, las lesiones son indoloras. Cualquier sitio del cuerpo puede ser afectado pero los sitios más comunes en orden de frecuencia son los pies (70%), donde el pie izquierdo es afectado más que el derecho, en la parte dorsal más que en la superficie plantar, las manos (12%), brazo, piernas, rodilla, cabeza y cuello. Otros sitios raros pueden ser afectados incluyen la mandíbulas, pared abdominal y huesos faciales entre otros (20).

El micetoma es una enfermedad social que puede ser prevenida si se da la información adecuada, también cabe mencionar que es importante proporcionar educación sanitaria a los granjeros y campesinos que incluya

como protegerse del daño con tierra contaminada y pedazos de astilla contaminados con este microorganismo.

### POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA EN BACTERIAS DEL GÉNERO Nocardia.-

Los mecanismos de virulencia de este microorganismos no están muy claros . Se conoce que estos microorganismos intracelulares facultativos entre los cuales estan: *Mycobacterium tuberculosis* y *Nocardia brasiliensis* tienen mecanismos efectivos que ayudan a los gérmenes a evadir la respuesta inmune y previenen su destrucción dentro de las células que los fagocitan. Por ejemplo se ha mencionado como posibles mecanismos de virulencia (18):

a) Inhibición la fusión fagosoma-lisosoma.- Los mecanismos responsables de la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma no están claros, sin embargo la aparente habilidad de la Nocardia a inhibir la fusión esta asociada con la virulencia relativa. Existen estudios hechos con *N. asteroides* cepa GUH-2 donde se demostró que la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma era debido en parte a la presencia de la  $\alpha$ -trehalosa-6-6 dimicolato (TDM) en la pared celular(20).

b) La catalasa y su papel en los mecanismos de virulencia.- La catalasa juega un papel importante en los mecanismos microbicidas. En estudios hechos

por Torres-López en su tesis doctoral. (42), demostró que la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 tratada con un mutágeno, dio origen a una cepa deficiente en actividad de catalasa, que no indujo micetoma experimental al infectar a ratones BALB/c con dicha bacteria. Posteriormente en otros experimentos realizados por Torres-López, donde introdujeron el gen que codifica para catalasa de *M. tuberculosis* en la cepa de *Nocardia brasiliensis* (catalasa negativa), dió origen a una cepa *N. brasiliensis* catalasa positiva. En dichos experimentos lograron restituir la actividad de catalasa pero no la capacidad de inducir el micetoma experimental. Esto al parecer llevó a la conclusión que la catalasa no es un factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental en ratones BALB/c.

c) Bloqueo de la acidificación fagosomal.- Después de la ingestión de la mayoría de las bacterias y otras partículas por la células fagocíticas, suele rápidamente disminuir el pH a 5, de hecho estudios realizados con *N. asteroides* (GUH-2) se ha demostrado que pierde la viabilidad a pH de 5 sobre un período de 50 horas. Black y cols (43) estudiaron el efecto de *Nocardia spp* en el pH fagosomal en macrófagos murinos y ellos observaron que la ingestión de *Nocardia asteroides* GUH-2 viva o muerta, el pH fagosomal permanece arriba de 7 por 2 horas. Por otro lado la cepa no patógena de *N.asteroides* ATCC 19247 solamente bloquea la acidificación, mientras que *Saccharomyces spp* el pH



disminuye aproximadamente a 5.0. Al parecer unos componentes de la cepa GUH-2 de *N. asteroides* bloquean o neutralizan la acidificación de los fagosomas en los macrófagos murinos. Sin embargo no está claro si esta sustancia es la misma que inhibe la fusión fagosoma-lizosoma. En cualquier evento, la habilidad para bloquear la acidificación es probablemente un mecanismo importante para la supervivencia intracelular de *N. asteroides* dentro de los macrófagos.

#### MECANISMOS DE DEFENSA DEL HUESPED:

Para la defensa del huésped contra las infecciones por microorganismos intracelulares entre ellos *Nocardia*, se ha propuesto como esenciales tanto los efectores de la resistencia innata como los de la inmunidad adquirida específica. (18).

#### RESPUESTA INNATA.-

La piel constituye la principal barrera física contra *Nocardia*, al parecer estos microorganismos son incapaces de desarrollar infecciones cutánea y subcutánea sin ruptura de la integridad de la piel. Se conoce que el moco secretado en las superficies internas del cuerpo bloquea la adherencia de estos microorganismos a las células epiteliales y por lo tanto las bacterias al ser atrapadas son eliminadas por acción de los cilios de las células epiteliales. La barrera química tales como los: fluidos

corporales como el sudor, lágrimas, saliva, secreciones nasales y orina proporcionan una acción de lavado y fuente de diversos productos microbicidas. Una vez que los microorganismos rompen las barreras físicas y químicas del cuerpo se encuentran con los fagocitos profesionales (PMN) y los macrófagos. Si bien las Nocardias son fagocitadas con relativa facilidad no siempre son destruidas (18), y consecuentemente puede desarrollarse especialmente dentro de los macrófagos. A medida que este proceso avanza se establece una respuesta inflamatoria con infiltración de PMNs, macrófagos y linfocitos.

Los monocitos y los macrófagos: Los macrófagos están presentes en todos los tejidos del cuerpo donde fagocitan a patógenos (43). Esta población de células fagocíticas incluyen los monocitos en circulación, histiocitos en tejidos, células de la microglia en el cerebro, células de Kupffer en el hígado y los macrófagos en cavidades serosas y órganos linfoides. Estas células tienen gránulos similares a los del neutrófilo aunque no tan abundante. Los monocitos y macrófagos son reconocidos por su morfología, su habilidad a adherirse a superficie de vidrio o plástico, propiedad fagocítica y la presencia del marcador CD14 (Mac-2) en su superficie. Todas las células fagocíticas tienen receptores en la membrana celular que reconocen una variedad de moléculas: Receptores

para Fc de la IgG, complemento, interferón, TNF y receptores que reconocen patrones moleculares presentes en bacterias Gram + o - (TLRs) (44). Los macrófagos son también células blanco para una multitud de diversos patógenos que tienen en común un requerimiento obligado de un ambiente intracelular en el cual se replican (45). La fagocitosis de los microorganismos patógenos por medio del macrófago inicia la respuesta inmune innata y luego continúa la respuesta adquirida. Para discriminar entre agentes infecciosos y moléculas propias, los macrófagos involucran un número de receptores fagocíticos o de reconocimiento de patrones moleculares de los patógenos tal como los TLRs los cuales reconocen y se unen al patógeno. Se generan señales que inducen la polimerización de proteínas como la actina dentro de la membrana donde fue el sitio de contacto. Existen otros tipos de receptores presentes en estas células tales: colectinas, receptores de complemento etc. (46).

Agentes infecciosos intracelulares tales como la *M. tuberculosis*, *Legionella pneumophila* y *Salmonella typhimurium* entran al macrófago y modifican la maduración vacuolar en una manera que favorece su sobrevivencia (47).

La eliminación de los microorganismos intracelulares depende de varios factores tanto del hospedero como del agente patógeno (48).

En un estudio realizado *in vitro* por Davis y cols. (49) utilizaron macrófagos peritoneales de ratón y *N. asteroides*. En dicho experimento se observó que estos microorganismos eran fagocitados fácilmente, disminuyendo drásticamente el número de bacterias ingeridas durante los primeros doce días, sin embargo fue seguido por un aumento en el número de las mismas, a los 16 días aproximadamente. El examen microscópico reveló que solo unos cuantos microorganismos fueron capaces de sobrevivir intercelularmente en un estado alterado (formas L) (50,51,52,53). Esto fue corroborado posteriormente por Beaman y Smathers (54) empleando para su estudio macrófagos alveolares de conejo. Por otro lado *N. asteroides* resultó ser citotóxica para los macrófagos peritoneales de cobayo (55). No obstante algunas de las cepas virulentas llegaron a ser destruidas por la formación de células gigantes multinucleadas (51). Beaman observó que las cepas virulentas de *N. asteroides* son capaces de crecer dentro de los macrófagos alveolares de conejo. Sin embargo esta proliferación intracelular era inhibida sin llegar a ser destruida al utilizar células bacterianas en fase de crecimiento estacionaria y solo apareció un retardo temporal en el crecimiento al usar bacterias en su fase logarítmica. Sin embargo al opsonizar con un suero específico anti-*Nocardia asteroides* a los microorganismos, se incrementó la inactivación de las bacterias en fase

logarítmica, pero no las que se encontraban en la fase estacionaria (48,52,53). Al parecer la activación de los macrófagos es una condición necesaria para la protección contra *N. asteroides* y *N. brasiliensis* (54,56).

Los macrófagos podrían activar los mecanismos antimicrobianos dependientes e independientes de oxígeno y otras funciones accesorias. Existen evidencias que en la infección intracelular puede resultar una disfunción del macrófago esto ha sido reportado para diversos microorganismos intracelulares como *Leishmania*, *Micobacteria* y virus de la inmunodeficiencia humana (57). Entre esos mecanismos que contribuyen a la disfunción del macrófago durante la infección intracelular son las siguientes: 1) disminución en la transcripción del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, 2) disminución de la fagocitosis y 3) disminución de la actividad microbicida (58).

Por otro lado Krick y colaboradores (59) y Melendro en México propusieron que la inmunidad no específica mediada por macrófagos confieren resistencia cruzada en ratones infectados con gérmenes intracelulares como la *Listeria monocytogenes* o *Toxoplasma gondii* (60).

Folb y cols. en 1977 (61) describieron la llamada “lesión brasiliensis” la cual consiste en una infiltración tisular de macrófagos vacuolados de aspecto espumoso, alrededor de microcolonias del agente causal (*N. brasiliensis*), en cambio estas células no se hicieron presentes en las lesiones producidas en ratones infectados con *Nocardia asteroides*.

Por otra parte se sabe que macrófagos de distintos sitios anatómicos difieren en sus interacciones con *Nocardia*. Se conoce que células de Kupffer de ratones no inmunizados muestran capacidad menor para la fusión fagosoma-lisosoma y permite el crecimiento de cepas de *Nocardia* de virulencia mayor e intermedia, en tanto que los macrófagos de peritoneo y de bazo muestran capacidad mayor para fagocitar las células microbianas para la fusión fagosoma-lisosoma (18).

#### Polimorfonucleares :

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son los mas abundantes leucocitos y comprenden alrededor de las 2/3 partes de los leucocitos de sangre periférica y juegan un papel importante en la inmunidad innata así como en el desarrollo de la inmunidad adquirida. Los neutrófilos (PMN) son los componentes celulares más importantes en la destrucción bacteriana. Son las células blancas con un núcleo segmentado o en

banda y con abundantes gránulos citoplásmico con su morfología característica y con marcadores CD67. Los gránulos de los PMN son de 2 tipos: Los gránulos primarios (azurofilico) los que son característicos de neutrófilos inmaduros o muy jóvenes. Estos contienen NADPH Oxidasa, defensinas, proteasas (catpsina), lisozima y en forma característica la mieloperoxidasa. Recientemente se ha visto que las defensinas y otros péptidos pre-almacenados en estos gránulos son atractantes para los monocitos, células dendríticas y células T, apoyando la hipótesis de que la liberación de los péptidos granulares podrían ser el enlace entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida (62). Los gránulos secundarios o específicos: son los mas grandes y abundantes y son más característicos de granulocitos maduros y contienen lisozima y cofactores oxidasa NADPH, lactoferrina y B12.

Los PMN neutrófilos de sangre periférica, aunque fagocitan fácilmente células de Nocardia, no matan a las bacterias, incluso las cepas virulentas crecen dentro de estas células huésped. De ahí que se ha sugerido que los PMN retardan el crecimiento de la 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, ion hidroxilo, oxígeno singulete y peróxido de hidrógeno).



Estudios hechos por Conlan y cols. (63,64,65) demostraron que el crecimiento de la *Listeria monocytogenes* en el hígado durante las primeras 24 horas estaba asociada con la acumulación de una número grande de neutrófilos en el sitio infeccioso y a su vez con la presencia de *L. monocytogenes* en ese sitio. La rápida eliminación de los patógenos bacterianos de sangre periférica y la subsiguiente eliminación de ese patógeno del hígado es generalmente atribuida a los macrófagos. Se ha visto que el porcentaje de los neutrófilos aumenta rápidamente seguido después de una inoculación vía IV del microorganismo alcanzando un máximo a las 2 horas post-infección y entonces el declinamiento va acompañado con la eliminación de la bacteria (66). Filice y cols encontraron que MN y PMN de individuos normales fueron capaces de destruir el 90% de la *L. monocytogenes* y *St. aureos* en las primeras horas de incubación, no obstante el número de bacterias viables que se encontraron después de las 4 horas fue solamente el 10 y 21% respectivamente (67). Estas células fagocíticas eliminan la mayor parte de los microorganismos a través de las vías dependientes e independientes de oxígeno (68).

Existen evidencias publicadas donde las células con función lítica son las responsables de lisis temprana de hepatocitos infectados con *Listeria* en ratones los cuales fueron depletados de células NK o

células thy 1.2 CD4+ CD8+ (69). Hay también evidencia donde el neutrófilo contribuye a la defensa de algunas etapas de la infección (70). Trabajos realizados por Verdrengh y cols. (71,72), estudiaron el papel de los neutrófilos en una septicemia experimental y artritis séptica inducida por *S. aureus* y observaron que aquellos pacientes neutropénicos o que tienen un defecto en la función de los PMN congénito o adquirido son más susceptibles a la infección con este patógeno. El papel esencial de los PMN en un modelo experimental de artritis séptica inducida por *St. aureus* fue recientemente confirmada por depleción de los granulocitos en el ratón antes de establecer la infección.

Conlan y cols. 1997 (73) observaron que ratones depletados de neutrófilos después del tratamiento con anticuerpo anti-granulocito RB6-8C5 exhiben una capacidad reducida de la actividad anti-microbiana y como consecuencia hay un aumento de la *Listeria* extracelular recuperada en el hígado a las 6 hrs. postinfección, de manera similar un ratón tratado con este mismo anticuerpo exhibe una capacidad reducida a eliminar otros microorganismos como *E. coli*, *St. aureus* y *Klebsiella pneumoniae* inoculada por vía IV .

Estudios hechos con *N. asteroides* mediante técnicas de quimioluminiscencia demostraron que dicha bacteria es capaz de resistir los mecanismos bactericidas de la célula inflamatoria, al parecer por

presentar esta última un estallido respiratorio menos intenso, cosa contraria se observó en *Candida albicans* (55).

Las células de *Nocardia* no son parásitos intracelulares facultativos de los PMN pero sí del macrófago, aparentemente los neutrófilos desempeñan un papel importante en la resistencia al retardar el crecimiento de la bacteria, esto es al permitir el desarrollo de una respuesta inmune celular adecuada (67).

Al parecer la resistencia del microorganismo a los mecanismos bactericidas tanto de los macrófagos como de los PMN puede deberse a lo siguiente:

- ❖ Incremento en los niveles de catalasa y de superóxido dismutasa bacterianos.
- ❖ Disminución en la actividad de las enzimas lisosomales.
- ❖ Bloqueo en la acidificación del fagosoma.
- ❖ Cambios constantes, estructurales y bioquímicos de la envoltura bacteriana, entre los que se encuentra el efecto tóxico del factor cuerda (dimicolato de trehalosa) ya que inhibe la fusión de las membranas dependientes de calcio (74).

**RECEPTORES TOLL-LIKE.-** En una infección bacteriana ocurre la activación de la respuesta inmune innata, aunque las bacterias difieren en la composición de su pared celular, la reacción del huésped da por

resultado la inducción de citocinas y otros mediadores inflamatorios (75). El mecanismo exacto de la activación inmune por bacterias Gram positivas no es claro, estudios recientes de la activación inmune involucra a una familia de proteínas Toll las cuales parecen ser las responsables del reconocimiento específico de patrones moleculares de patógenos. Las proteínas Toll o Toll like receptor (TLR) están presentes en las células del sistema inmune innato reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) presentes en la superficie de los patógenos tales como LPS (bacterias Gram negativas) o peptidoglucanos o ácidos lipoteicoicos (Gram positivas), virus, hongos y *Mycoplasma* (76). Estas moléculas son altamente conservadas a través de la evolución y han sido implicadas en la defensa innata hacia la mayoría de patógenos. Durante la unión con su ligando los TLR reclutan moléculas adaptadoras a sus dominios de señalamiento intracelular provocando la activación de varias cinasas, NF- $\kappa$ B y la regulación directa de los genes de la respuesta inmune (77) Hasta la fecha se han identificado 12 miembros de la familia de los TLRs en mamíferos. (78). Recientemente los TLRs fueron clonados e identificados (TLR1-10) como moléculas transductoras de señales involucradas en la defensa inmune innata (44), principalmente los TLR2 y TLR4 están implicados en el reconocimiento de varios componentes bacterianos. El TLR4 está

involucrado en el reconocimiento de LPS de bacterias Gram negativas y ácidos lipoteitoicos presentes en bacterias Gram positivas, mientras que el TLR2 reconoce peptidoglicanos de bacterias gram-positiva, zymosan y varias lipoproteínas bacterianas (44). Los TLRs están presentes en la superficie de diferentes células entre ellas el macrófago. Cuando los TLRs reconocen su ligando específico por ejemplo (TLR4 reconoce LPS) se produce una señal que activa vía de transducción y da como resultado la transcripción de genes con la consiguiente producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 e IL-12). La reciente identificación del TLR2 como un receptor transductor de señal para la lipoproteína bacteriana provoca la translocación nuclear del factor de transcripción inflamatorio NFκB provee un mecanismo para la iniciación y modificación de eventos inflamatorios. En estudios realizados por Wooten M.R. y cols en 2002 (79) sugiere que el TLR2 juega un papel crucial en la defensa del huésped hacia *Borrelia burgdorferi* y utilizaron ratones deficientes del TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>). Tales ratones fueron infectados con dicho microorganismo y los hallazgos indicaron una falla en el control de los niveles de espiroquetas en los tejidos, esto no es debido a un defecto en la respuesta inmune adquirida, ya que la respuesta inmune humoral fue normal comparada al ratón TLR2<sup>+/-</sup>, al igual que el cambio de IgM a IgG fue normal. También se observó una respuesta

inflamatoria aumentada comparada al ratón control. Al parecer todo apunta que el TLR2 juega un papel crucial en la defensa innata del huésped, así como la respuesta inflamatoria, mientras que la respuesta Inmune humoral puede ocurrir en ausencia del TLR2.

**CÉLULAS NK.-** Son importantes en la defensa en contra de infecciones virales y malignos aunque también juega un papel importante en la defensa en contra de microorganismos intracelulares. Las células NK se semejan a los linfocitos, pero morfológicamente son mas grandes y granulares de ahí que se llaman linfocitos granulares largos (LGL). Los gránulos contienen proteínas citolíticas tal como la perforina. La célula NK tienen receptores de baja afinidad Fc (III) (CD16) por medio del cual interactúan con las células recubiertas de anticuerpo y causan su muerte, también tiene receptores para la IL-2 e IFN (la interacción con esas citocinas provoca su activación) Las células NK al igual que los neutrófilos son considerados componentes de la defensa innata. Las célula NK son célula móviles que continuamente se están produciendo en medula ósea se liberan hacia el torrente sanguíneo de donde por extravasación pueden dirigirse a sitios de inflamación y colonización microbiana. Existe evidencia convincente que las células NK juegan un papel importante en la defensa temprana en contra de microorganismos intracelulares entre los cuales esta la *Listeria monocytogenes*, ya que

producen IFN- $\gamma$  (80). Bancroft y cols. 1993 (81) observaron que en ratones con SCID (inmunodeficiencia severa combinada) que no tienen ni células T ni células B, presentaban alta resistencia a la *Listeria*. Otras células aparte de las células T producen IFN $\gamma$  son las células NK, por ello ratones con SCID tratados con anti-NK fueron incapaces de producir IFN- $\gamma$ . De ahí que ratones tratados con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  y posteriormente retados con la *Listeria monocytogenes* muerta por calor, presentaron una exacerbación de la infección por *Listeria monocytogenes* (82), todo esto apoyando que niveles altos de resistencia anti-*Listeria* expresado en ratones con SCID es mediado por las células NK vía secreción IFN- $\gamma$  en respuesta a la *Listeria* muerta por calor requiriendo la presencia de IL-12 y del TNF- $\alpha$  los cuales son secretados por el macrófago.

Los ratones atímicos, se ha observado que expresan altos niveles de resistencia contra la *Listeria monocytogenes* (83). No obstante un ratón atímico infectado crónicamente adquiere una capacidad para rápidamente inactivar una infección con *Listeria* letal por vía IV. Este hallazgo puede ser modificado cuando se trata al ratón con anticuerpo anti-Thy1.2, sugiriendo que la resistencia adquirida esta basada en función a las células NK Thy 1.2. Estas células son capaces de resolver lentamente la infección en ratones depletados de CD4 y células CD8.

Definitivamente la función protectora de las células NK se expresa en las infecciones con *Listeria* en tejidos linfoides y no linfoides, porque en esos sitios discretos que la *Listeria* necesita ser ingerida y destruida por los macrófagos, después ellos son activados aumentando su capacidad microbicida por el IFN- $\gamma$ . No obstante en esos sitios donde el macrófago infectado con la *Listeria* donde esta célula secreta IL-12 y TNF- $\alpha$  que sirve para activar células NK a secretar IFN- $\gamma$ .

**CÉLULAS B.-** Existen varias subpoblaciones de células B y son requeridas en la eliminación de los microorganismos en la respuesta innata, sin embargo el papel específico de las diferentes subpoblaciones de células B en el proceso de eliminación de los microorganismos no está todavía definido. Las células B residen en la madurez como un grupo heterogéneo y se localiza en los folículos (FO) la cual comprende la mayoría de las células B totales en el cuerpo y recirculan entre las células de los folículos linfoides ricos en células B, mientras que las células de la zona marginal (MZ) son extrafoliculares y están localizadas en la zona marginal del bazo(84,85). Las células B MZ y FO colectivamente comprenden las células B2 o convencionales, sin embargo existen las células B1 las cuales son más abundantes en cavidad peritoneal y pleural y pueden ser subdivididas en B1a (CD5+) y B1b (CD5-). Las células B1a y B MZ son buenas respondedoras a antígenos



TI y recientemente se ha visto que estas células llevan a cabo una respuesta de manera coordinada hacia los antígenos particulados (TI). Finalmente ambas células llevan a cabo una rápida respuesta de tipo IgM, lo cual sugiere que la IgM juega un papel importante en este proceso de eliminación del microorganismo en la primera etapa de la respuesta inmune (86). Las células B1a expresan CD5, CD43 y mIgM(alta), IgD (baja) y CD23 (bajo) y CD45 (bajo) y están presentes en cavidad peritoneal y es ahí donde expresan también CD11b. Estas células producen anticuerpos tipo IgM los cuales reaccionan con antígenos CHO bacterianos y/o autoantígenos. Las células B-1 están relativamente poco frecuente en bazo de un ratón adulto en la mayoría de las cepas de ratones y son generadas exclusivamente a partir de precursores fetales mientras que médula ósea produce solamente las células B2 las cuales tienen una vida corta a diferencia de las células B-1 peritoneales las cuales tienen una vida mas prolongada y tienen un mecanismo que preserva tolerante a las células autoreactivas.

#### **INMUNIDAD ADQUIRIDA ANTI-NOCARDIA:**

**Inmunidad celular.-** La respuesta inmune celular anti-*Nocardia brasiliensis* ha sido demostrada durante la infección por este microorganismo. Esta respuesta se hace evidente in vivo por la reacción de hipersensibilidad tardía, y respuesta proliferativa a antígenos

inmunodominantes de *N. brasiliensis* así como la formación de granulomas

La inmunidad celular se ha considerado un mecanismo esencial para la defensa contra la infección por microorganismos intracelulares (*Mycobacteria*, *Corynebacteria*, *Nocardia*) y algunos parásitos tales como *Leishmania* o *Legionella* (87). Deem y Beaman (88) publicaron que los ratones atímicos inyectados con bacterias vivas de cultivos *N. brasiliensis* y *N. asteroides*, morían el 100% a los 28 días después de la inoculación, en cambio los ratones con el mismo fondo genético pero inmunocompetentes, no se morían en este lapso, concluyendo que la presencia del timo y de la respuesta inmune celular son fundamentales en la resistencia a estos microorganismos.

Deem y Beaman (89) observaron que ratones desnudos “nude” (deficientes de células T funcionales) eran mas susceptibles a la infección crónica por *Nocardia asteroides* inducida por inyección vía IV comparado con el ratón heterocigoto (Nu/+) cuyas células T son funcionales. Igualmente si se infectaban ratones desnudos “nude” en el cojinete plantar con *N. asteroides* GUH-2, desarrollaban una infección sistémica y morían a las 4 semanas, con menos inflamación en el cojinete plantar, mientras que los ratones heterocigotos (Nu/+), desarrollaban lesiones locales extensas en el cojinete plantar, pero no

morían. Esto indica que al parecer las células T son esenciales para una adecuada respuesta del huésped en contra de una inyección letal con la cepa virulenta de *N. asteroides*.

También en otros estudios utilizando *N. cavie* inyectada por varias rutas, tanto a ratones normales como a ratones atímicos, los ratones atímicos fueron mas susceptibles a la inyección letal después de la administración intranasal comparado con los ratones heterocigotos (Nu/+). No obstante el micetoma crónico causado por *N. cavie*, ocurre mas comúnmente en los ratones inmunocompetentes, donde las formas L de *N. cavie* son comunes, mientras que en los ratones desnudos no se aislaron dichas formas. (90).

El papel de las células T en las infecciones por Nocardia es a través de la activación primaria del macrófago y la estimulación de la respuesta inmune celular. Incluso se ha observado que los linfocitos T están involucrados directamente en la muerte de *N. asteroides* (91). Deem y cols. encontraron que una población enriquecida de linfocitos sensibilizados con Nocardia, pero no los linfocitos no sensibilizados, matan a las bacterias (*N. asteroides*) y no a *Rothia dentocariosa*. Incluso la lisis de linfocitos con anticuerpos anti-Thy 1.2 mas complemento, elimina la propiedad de matar a la Nocardia.

Es importante hacer notar que la patogénesis de la infección por *N. brasiliensis* está poco comprendida, ya que muchos de los experimentos han sido realizados con otras *Nocardias* como *N. asteroides*.

**Inmunidad humoral.-** En cuanto a la inmunidad humoral generada contra la infección experimental por *N. brasiliensis* existen pocas evidencias que demuestran un papel importante en la resistencia a esta infección. Los estudios que se han realizado han sido con *N. asteroides* tales como el realizado por Beaman y Maslan en 1978 (92), en donde el ratón recibió ciclofosfamida 72 hrs. antes de la infección, los resultados obtenidos fueron que dramáticamente aumentaron en susceptibilidad del huésped a la infección por *Nocardia* utilizando cepas menos virulentas (ATCC 10905 y 14759) que la cepa GUH-2. La ciclofosfamida es un agente citotóxico que puede afectar la función de los linfocitos B. Posteriormente Beaman y cols. en 1982 (93) utilizando cepas de ratones deficientes en células B CBD2/F1 (CBA/N X DBA/2) infectados con *N. asteroides* GUH-2 por diferentes rutas observaron que los machos F1 los cuales son incapaces de producir anticuerpos específicos para *Nocardia*, sin embargo no fueron más susceptibles a la infección que las hembras que tienen sus células B normales. Ratones machos o hembras preinmunizados que expresan una respuesta inmune celular normal

fueron igualmente capaces de eliminar a *N. asteroides* de glándulas adrenales, cerebro, riñón, hígado, pulmón y bazo. Por lo tanto el requerimiento de las células B funcionales en la resistencia del huésped a la infección por *Nocardia* no fue tan importante como el requerimiento de las células T funcionales.

En el mismo año Rico G., Ochoa y L. Ortiz-Ortiz (94) encontraron que la transferencia de anticuerpos específicos contra *Nocardia* en ratones inmunológicamente normales y a ratones deficientes en células T (tinectomizados, letalmente irradiados y reconstituidos con células de médula ósea depletadas de células T [células B]), no protegen al ratón del desarrollo del micetoma después de infectar al ratón en el cojinete plantar con *N. brasiliensis* viva.

La transferencia pasiva de anticuerpos o inyectar *Nocardias* sensibilizadas con anticuerpos aumenta la severidad de los síntomas subsecuentes (94). Los resultados observados fueron similares a los reportados con la *Listeria monocytogenes* (95).

En otros experimentos (96), los ratones fueron irradiados y reconstituidos con células de bazo, pero depletados de células B por lo tanto carece de la habilidad de formar anticuerpos contra antígenos de *Nocardia*, no obstante esos ratones tienen una respuesta de hipersensibilidad tardía positiva al extracto de *Nocardia* y fueron

efectivos en controlar la infección por *Nocardia* que aquellos ratones que estaban depletados de células T.

Recientemente Coutinho A. y cols (97) y Salinas-Carmona y cols. (98) identificaron inmunoglobulinas de los isotipos M, G y A tanto en la infección experimental en animales como en la infección en humanos. Otros autores identificaron inmunoglobulina y complemento en tejidos de ratones infectados con *N. brasiliensis* a las 2 semanas y en suero a los 30-45 días post-infección (99).

Beaman y McNeil (18, 100) encontraron que los títulos altos de anticuerpos que aparecen en la recuperación de una infección o después de una 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.

Aunque existen estudios en donde los anticuerpos purificados para antígenos definidos de superficie celular parecen ser protectores para el huésped: *in vitro* IgG policlonal (conejo) con actividad neutralizante hacia SOD de *Nocardia*, incrementó en los PMN la muerte de células virulentas de *N. asteroides* incluso IgM monoclonal de ratón con actividad neutralizante transferido en forma pasiva aumentó la

capacidad de los ratones para retardar el crecimiento de la bacteria (91,99)

Contrario a las evidencias y opiniones sobre la respuesta inmune humoral y la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de nocardiosis y del micetoma, las evidencias 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 micetomas (18,100).

En conclusión podemos resumir que la literatura revisada define con dudas la participación de los anticuerpos y de los linfocitos B en la resistencia a la infección por *N. brasiliensis*. Existe la idea de que los anticuerpos no juegan un papel importante, incluso que su existencia perjudica al huésped en el caso de infecciones por *N. asteroides* (96).

#### RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD A LAS INFECCIONES POR MICROORGANISMOS INTRACELULARES:

Natovitz y cols. (101) han propuesto que la estimulación de las células Th1 se asocia con la resistencia, en cambio una estimulación de las células Th2 se relaciona con la progresión de la enfermedad o gravedad de las lesiones. También sugieren que la resistencia y la susceptibilidad depende del balance entre las 2 subpoblaciones.

Sin embargo en estudios realizados con *Listeria monocytogenes* (87), la resolución de la enfermedad no depende ni de las células CD4+ o células CD8+, ya que en ratones knockout (deficiente de MHC clase I y II) son esencialmente incapaces de generar células TCD8 o células TCD4 y sin embargo estos ratones fueron capaces de resolver la infección primaria contra *Listeria*, al parecer son las células T $\lambda$  $\delta$ . Esto podría explicar porque ratones desnudos “nude” o ratones con SCID no resuelve la enfermedad pero permanece crónica, una posible explicación es que la respuesta inmune celular necesita para la resolución completa de la infección de la inmunidad innata. Es posible que la susceptibilidad o la resistencia este determinada por la función de la células NK (80).

Estudios hechos por Kaufmann y cols. (102) encontraron que las células T CD4+ juegan un papel clave en la resistencia contra la infección por *M. tuberculosis*, y al depletar las células T CD4+ en un ratón al cual posteriormente se le inyecta con *M. tuberculosis* o BCG (*M. bovis*) se observó que la enfermedad se exacerba. Sin embargo en la infección por *N. brasiliensis* no queda claro donde reside la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad.

**INMUNOPROTECCIÓN CONTRA LAS INFECCIONES POR PATÓGENOS INTRACELULARES:**



La protección inmune la podemos ver en el caso de ciertas enfermedades bacterianas toxígenas (103) , donde el anticuerpo dirigido contra las toxinas proteínicas tiene un efecto protector y en presencia de complemento neutraliza la infección por ejemplo en la infecciones causadas por: *C. Tetani*, *C. botulinum*, *Vibrio colera*, *C. diphtheria* . Este mismo fenómeno es observado en enfermedades causadas por bacterias encapsuladas por ejemplo: *St. pneumonie*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonie*, *Neisseria meningitidis* y en enfermedades virales virus (hepatitis, influenza).

En enfermedades causados por microorganismos intracelulares (*M. tuberculosis*, *L.pneumophila*, *L. donovani*) (46,104,105) se ha concluido que la inmunización con proteínas extracelulares inmunodominantes induce una inmunoprotección contra la enfermedad. En el caso de la infección causada por *Nocardia brasiliensis* no se conoce mucho en cuanto a la inmunoprotección.

En años recientes Blander y Horwitz (104) publicaron sus hallazgos de protección inmune inducida con la inmunización activa con proteínas extracelulares de *Legionella pneumophila* . Horwitz y cols. en 1995 (46) extendieron sus observaciones a un modelo animal de infección con *M. tuberculosis* y propusieron que también la inmunización con una proteína extracelular era capaz de inducir

protección contra esta enfermedad. Resultados similares fueron observados con *Leishmania donovani* (105) así también como con *Candida albicans* (106) específicamente con la proteína P43 donde anticuerpos generados en contra esta proteína evita la aparición de candidiasis sistémica después de la infección con dosis subletal y letal de dicho microorganismos en ratones BALB/c.

En el caso de las infecciones causadas por bacterias intracelulares, específicamente en el caso de las infecciones causada por *Nocardia brasiliensis*, recientemente encontramos (98) evidencias en las cuales anticuerpos IgM juega un papel protector en la infección causada por este microorganismos, sin embargo existen estudios realizados desde 1992 por Salinas-Carmona y cols. (107) donde lograron identificar unas proteínas inmunodominantes (P24-P26 y P61) a partir de un extracto crudo de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 registrada en el ATCC 700358, tales proteínas fueron reconocidas solamente por los sueros de los pacientes con micetoma (W-B) y no por sueros de pacientes con tuberculosis y lepra. ( 108)

En ese mismo año Salinas-Carmona y cols. lograron inducir el micetoma experimental en modelos de ratones BALB/c infectándolos con *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358) (109). Posteriormente fue posible determinar que de las proteínas inmunodominantes la proteína

P61(110) y una proteína con actividad caseinolítica (P38) son extracelulares ya que se identificaron en el filtrado de cultivo, mientras que la P24 solamente se encuentra en el extracto proteico. Experimentos realizados por Salinas-Carmona y Torres-López (111) de transferencia pasiva de sueros hiperinmunes provenientes de ratones BALB/c inmunizados con bacterias muertas por calor a ratones BALB/c los cuales fueron posteriormente infectados con *N. brasiliensis*, los resultados mostraron **protección parcial** en el establecimiento experimental del micetoma en dichos ratones. Mas tarde Licón-Trillo y Salinas-Carmona (112) hicieron experimentos de transferencia pasiva de sueros hiper-inmunes provenientes de ratones inmunizados con extracto crudo de *N. brasiliensis* obtenidos a diferentes tiempos post-inmunización (30, 60, 90 y 120 días) y transferidos a otros ratones BALB/c los cuales posteriormente fueron infectados con *N. brasiliensis* para inducir el micetoma experimental. Los resultados obtenidos con la transferencia de sueros de 90 y 120 días fue que ninguno de los ratones que recibieron tales sueros quedaron protegidos ya que todos los animales desarrollaron micetoma, mientras que los resultados obtenidos con la **transferencia de los sueros de los días 30 y 60 fue una protección parcial**. Al analizar la presencia de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* por medio de ELISA (113), los sueros 90 y 120 días

presentaron título alto de anticuerpos (clase IgG) mientras que los sueros del día 30 y 60 post-inmunización se detectaron pocos anticuerpos de clase IgG. Si bien la protección conferida en los sueros del día 30 y 60 post-inmunización no es debida a los anticuerpos clase IgG, ¿que factor sérico es el responsable de tal protección? No lo sabemos, es algo que es producido en los primeros días de la infección.

# HIPÓTESIS

La Protección inducida por Antígenos  
Particulados de *N. brasiliensis* es  
mayor que la de los Antígenos  
Solubles

# **OBJETIVO GENERAL**

**COMPARAR LA PROTECCIÓN  
DE LA RESPUESTA INMUNE  
INDUCIDA POR ANTIGENOS  
SOLUBLES Y PARTICULADOS  
DE *N. brasiliensis***

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Determinar los anticuerpos inducidos por inmunización con antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) y particulados (bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas) de *N. brasiliensis*.**
  
- 2.- Evaluar el efecto protector de la respuesta inmune humoral y celular inducida por antígenos solubles y particulados en el establecimiento y evolución del micetoma por *N. brasiliensis*.**
  
- 3.- Analizar las subpoblaciones de células B-1a, B-1b y B-2 peritoneales, sanguíneas y esplénicas a diferentes tiempos de inmunización con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* mediante citometría de flujo.**

## **MATERIAL Y METODOS**

### **1.- MATERIAL BIOLÓGICO.**

**1.1 Animales de experimentación.-** Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c hembras y machos de 12 a 14 semanas de edad con un peso promedio de 20 g. Esta cepa fue gentilmente donada por el Dr. Hanson de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda Ma) en 1982 la cual ha sido mantenida en el bioterio del Departamento de Inmunología a una temperatura de 24°C en jaulas de acrílico de 37 cm x 15.5 cm en una relación de 8 animales por caja.

Todos los animales fueron alimentados *ad limitum* con agua y nutricubos para roedores.

**1.2.- Cepa bacteriana.-** La bacteria *N. brasiliensis* que se utilizó en este estudio se obtuvo a partir de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1 la cual se aisló de una lesión de un paciente con micetoma en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José E. González (U.A.N.L.) la cual posteriormente fue registrada en el ATCC por Dr. Salinas-Carmona con el número 700358.

#### **1.2.1.- Obtención de la suspensión unicelular.**

A partir de la cepa *N. brasiliensis* con una asa bacteriológica se tomó pequeño acúmulo de colonias las cuales se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. el cual se le agregó 30 ml de medio de cultivo



infusión cerebro-corazón (BHI) previamente esterilizado (121°C/15min/15 lb). Posteriormente se incubó a 37°C con agitación durante 48-72 hrs. (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/precision Scientific).

Las colonias hidratadas se colocaron en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) con tapón de rosca donde se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 min. Posteriormente después de decantar el sobrenadante, la masa bacteriana se lavó con solución salina fisiológica estéril (S.S.) y después se se tritularon las bacterias con un agitador de vidrio y posteriormente en el homogenizador Potter-Evelham la suspensión bacteriana fue disgregada. De la suspensión bacteriana obtenida previamente se tomaron 0.2ml y se inocularon matraces Erlenmeyer de 1 o 2 litros conteniendo cada uno 150 ml de medio de cultivo BHI estéril. Con la masa bacteriana obtenida se aislaron las proteínas inmunodominantes (P24 y P61) y la proteasa. Este mismo inóculo se utilizó para infectar a ratones BALB/c para inducir el micetoma experimental para llevar a cabo esto se realizó primero una cuenta bacteriana (UFC) utilizando el método de Miles y Misra y vertido en placa.

**1.2.1.1- Determinación de UFC /ml de *Nocardia brasiliensis*.  
(114,115)**

De la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* fue necesario determinar el número de UFC/ml para posteriormente ajustar a una concentración de  $10 \times 10^6$ /ml UFC/ml y después infectar en el cojinete plantar a los ratones BALB/c.

**1.2.1.1.1.-Micrométodo de Miles y Misra.** Para conocer las UFC/ml que contiene el inóculo de *N. brasiliensis*, se utilizó el método de vertido en placa el cual se pipeteó 1ml de diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000 de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* e inmediatamente se vertió 10 ml del medio de cultivo Agar-BHI estéril fundido previamente y enfriado hasta 40°C. Inmediatamente se mezclaron agitando en forma circular las placas y después de que solidificó el medio de cultivo en las placas, se colocaron hacia abajo y se incubaron a 37°C por 3 días. El número de colonias de cada placa se contó con la ayuda de un cuenta-colonias (Québec Darfield Colony Counter, Reichert-Jung) y la cantidad de UFC/ml se determinó por multiplicación del número promedio de colonias que crecieron en una superficie de un  $\text{cm}^2$  por el área de la placa utilizada.

#### **1.2.2- Obtención del Extracto celular crudo de *Nocardia brasiliensis*.**

Se utilizó 0.2 ml de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* y se inocularon 40 matraces Erlenmeyer de 1 o 2 ltos. Cada uno conteniendo 150 ml de medio de cultivo BHI previamente esterilizado. Se incubaron

a 37°C por 1 semana sin agitación (108). Posteriormente se recolectó, la masa bacteriana de cada matraz la cual se lavó con agua destilada estéril, mientras que el filtrado de cultivo se recolectó en otro recipiente con el fin de identificar proteínas extracelulares de *Nocardia brasiliensis* (P61 y proteasa).

La masa bacteriana se deslipidizó con una mezcla de etanol:éter en diferentes proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 y los sobrenadantes obtenidos se colocaron en otros recipientes mientras que la masa bacteriana deslipidizada se dejó en un refractario de vidrio por 18 hrs. bajo una campana de extracción hasta que se evaporó en su totalidad el solvente.

Después la masa bacteriana seca se trituró con polvo de vidrio utilizando un mortero de porcelana y después las bacterias trituradas se vaciaron a un matraz Erlenmeyer al cual se le agregó buffer de extracción (Tris-HCL 0.1M y acetato de magnesio 0.1M) y se dejó agitando a 4°C por 18 hrs. Al siguiente día la mezcla se centrifugó a 3,200 rpm/30 min y el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 14,000 rpm por 30 min.

El sobrenadante obtenido se dializó utilizando membranas con un poro de exclusión de 10,000 daltons por 18 hrs. contra agua destilada y al término de la diálisis se tomó una alícuota de 1 ml a la cual se le determinó proteínas por el método de Bradford (116), y después se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gradiente en condiciones

desnaturalizantes por medio del cual se obtuvo el patrón electroforético de las proteínas presentes en el extracto celular crudo de *N. brasiliensis* (ECC). El resto del ECC se colocó en viales de vidrio con 15 ml cada uno y después se liofilizó con el fin de conservar las muestras a 4°C (109).

#### **1.2.2.1.- Determinación de proteínas (Método de Bradford) (116).**

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford, utilizando como estándar de proteínas la albúmina sérica bovina (Sigma). Se preparó una solución 1 mg/ml de ABS disuelta en agua bi-distilada, a partir de esta solución se hizo una dilución 1:50 y se prepararon los diferentes estándares (2 a 18 µg/ml) cuyo volumen final fue de 500µl y posteriormente se le agregó 500µl del reactivo de Bradford. Después de incubar las muestras por 30 min a temperatura ambiente estas se leyeron a 595 nm. Con las lecturas obtenidas de los estándares se graficaron los resultados en absorbancia (Abs) contra concentración de las proteínas. Las muestras problema fueron diluidas (1:10, 1:50 o 1:100) y se tomaron 500 µl de muestra y se les añadió 500 µl del reactivo de Bradford. La lectura obtenida (Abs) se graficó en la curva de calibración y de ese modo se obtuvo la concentración de proteínas presentes en la muestra.

### **1.2.2.2.-Análisis del patrón electroforético SDS-PAGE 8-18% del extracto celular crudo de *N. brasiliensis***

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (117) con las siguientes modificaciones:

Se utilizó un gel concentrador al 5%T, 2.7%C y el gel de separación en gradiente 10-18%T, 2.7%C; para la realización del gel se utilizó el equipo de electroforesis mini-Protean II (BIO RAD) con ayuda del formador de gradiente BIO RAD modelo 385. Los geles se pre-corrieron a 50 volts por 20 minutos (fuente de poder BIO RAD modelo 1000/500).

Como amortiguador de corrimiento se utilizó un buffer Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3 (reactivos Sigma).

Las muestras de E.C. de *N. brasiliensis* se separaron electroforéticamente (PAGE-SDS) y la concentración proteica que se utilizó fue de 25µg de proteína/30µl/carril. La muestra problema se mezcló con el buffer de muestra 4X en una proporción de 3:1 conteniendo Tris-HCL 0.125M pH 6.8, 2% de dodecil-sulfato de sodio (SDS) y 5% de 2-mercaptoetanol (2ME), 10% de sacarosa y azul de bromofenol. Los volúmenes de las muestras fue de 40µl y luego se sometieron a ebullición 2 min antes de ser colocadas en los carriles del gel concentrador. Los marcadores de peso molecular que se utilizaron se reconstituyeron de acuerdo al instructivo [(albúmina sérica bovina (PM

66,000), albúmina de huevo (PM 45,000), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (PM 36,000), anhidrasa carbónica (PM 29,000), tripsinógeno (PM 24,000) y lactoalbúmina (PM 14,000)]. Los marcadores se sometieron a ebullición 1 minuto y después se colocaron al igual que las muestras en los carriles del gel concentrador. Después el gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis el cual contenía el amortiguador de corrimiento (Tris-HCL y Glicina). La electroforesis se realizó a 80 volts durante 1 hora y luego el voltaje se aumentó a 150 volts por 3.5 horas.

#### **1.2.2.3 Tinción de Coomassie.**

Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de tinción (azul de Coomassie R (Sigma) al 0.1% p/v en metanol, 40% v/v, ácido acético, 10% v/v), durante 30 minutos en movimiento suave y después se destiñó utilizando una solución destiñidora (metanol 40%, ácido acético 10%v/v) en cantidad suficiente para eliminar el exceso del colorante.

#### **1.2.2.4.- Tinción con nitrato de plata.**

Al término de la electroforesis, el gel se sumergió en una solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acético glacial 12% v/v) durante 20 minutos. Después se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno, con una sol. de lavado (etanol 10% v/v, ácido acético glacial 5% v/v). Luego se colocó el gel en una solución oxidante (dicromato de potasio 3.4 mM,

ácido nítrico 3.22 mM) por 5 min y el gel se lavó con agua destilada, 3 veces de 10 min cada uno. Posteriormente el gel se sumergió en una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$  12mM en agua) inicialmente durante 5 min. Y finalmente para observar las bandas proteicas se utilizó una solución de revelado (carbonato de sodio 2% y formol) y la reacción se detuvo con ácido clorhídrico 1 N.

### **1.2.3.- Obtención y purificación de antígenos solubles de *N. brasiliensis*. (108).**

Los antígenos solubles que se obtuvieron a partir de ECC fueron:

proteína inmunodominantes P24, proteína P61 y la proteasa (P38).

Para la obtención y purificación de estas proteínas se necesitaron 100 mg de muestra liofilizada (100 mg) de extracto crudo celular el cual se reconstituyó en 12 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1M ajustada a un pH de 7.2 a 7.4

El siguiente esquema de purificación fue solamente para la obtención de la P24 y la P61.

Primeramente se realizó :

**A) Precipitación proteica del extracto crudo de *N. brasiliensis* :** La precipitación de proteínas se llevó a cabo mediante la utilización de sulfato de amonio al 50% para obtener un precipitado y un sobrenadante.

**B) Obtención de la proteína P24 a partir del sobrenadante (SN):** El extracto crudo de *N. brasiliensis* después de que se precipitaron las proteínas con sulfato de amonio, se centrifugó y se obtuvieron 2 fases: el sobrenadante (contiene la P24) y un precipitado (contiene la P61). A partir del SN se obtuvo la proteína P24 y para llevar a cabo esto se procedió a separar las diferentes proteínas mediante cromatografía de filtración en Gel con sephadex G-100.

**C) Obtención de la proteína P61 a partir del precipitado (Ppto):**

La proteína P61 se obtuvo a partir del precipitado obtenido después de la precipitación del ECC con sulfato de amonio y después se separó electroforéticamente utilizando un gel preparativo 12% sin SDS de 3 mm de grosor y por elución mecánica se obtuvo la proteína P61. Una vez terminado el corrimiento de las proteínas, se cortaron tiras de 30 a 50 mm de ancho tanto de las orillas como del centro del gel mientras que el resto del gel se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  y después se tiñó con azul de Coomassie. Una vez que se conoce la posición exacta de la proteína se procedió a obtener la proteína del resto del gel y por elución mecánica con agua destilada se obtuvo la proteína p61 del gel. Los eluidos se colocaron en viales los cuales se liofilizaron y a partir de estas muestras se realizaron electroforesis analíticas en gradiente 8-18% para determinar la pureza de la proteína P61 (117).



### **1.2.3.1- Obtención y purificación de la proteína P24.-**

#### **A) Precipitación con sulfato de amonio 50% del extracto celular de *N. brasiliensis*.(108)**

Se utilizaron 100 mg de proteína del extracto crudo de *N. brasiliensis* disuelta en 12 ml de PBS a los cuales se le añadieron 12 ml de sulfato de amonio saturada ajustada a pH 7.2. La precipitación de proteína se realizó en frío y se añadió el sulfato de amonio gota a gota y en agitación suave. La mezcla se centrifugó a 3200 rpm por 30 min . El SN se utilizó para la purificación de P24 mientras que el precipitado se utilizó para la obtención de P61. Para la obtención de P24, el SN obtenido se dializó contra solución salina isotónica, hasta que se eliminó el sulfato de amonio presente en el ECC de *N. brasiliensis* precipitado con la sal. Los días que se dializaron dependió de la cantidad de sulfato de amonio presente en el líquido de diálisis. La manera de saber fue mediante la prueba de cloruro de bario la cual consistió en mezclar 2 a 3 ml de líquido de diálisis y una o 2 gotas de cloruro de bario saturado. Después de que dializó el SN se le determinó proteínas (método de Bradford) y finalmente se liofilizó colocando 15 ml del SN dializado por vial. El SN dializado y liofilizado se resuspendió en un ml de PBS 0.1 M pH 7.2 y se incubó 2 horas a 37°C con DNAasa I, utilizando 1 µg de enzima por mg de proteína (DNAasa I, EC de páncreas bovino Sigma). Terminada la

digestión con DNAasa, la muestra se centrifugó a 3200 rpm por 5 min y el SN se dializó contra agua, por 24 horas a 4°C, después se mezcló con glicerol (concentración final de 5% v/v Sigma). Finalmente se centrifugó a 3200 rpm por 5 min y se colocó en una columna de vidrio (Wheaton) empacada con Sephadex G-100 y equilibrada con buffer fosfato-salina pH 7.2 y ajustada a un flujo de 0.5 ml por minuto.

### **B) Cromatografía de filtración en gel con sephadex G-100**

Se utilizó una columna de vidrio (Wheaton S.P.) de 23 cm de largo por 2.5 cm de diámetro interno, misma que se empaquetó con una matriz de sephadex G-100 hidratada en PBS 0.1 M pH 7.4 mantenida a 4°C. Para determinar el volúmen vacío (V<sub>0</sub>) de la columna se pasó a través de ella la dextrana azul (1mg en 1 ml de PBS) la cual se eluyó con PBS pH 7.4 a razón de 0.5 ml por minuto. Después se pasaron a través de la columna las proteínas de PM conocido (Marcadores de Peso Molecular SIGMA)

<b>MARCADOR</b>	<b>PM</b>	<b>RECONSTITUIR</b>
Citocromo C	16 kDa	2mg/ml PBS
Anhidrasa Carbónica	29 kDa	3mg/ml PBS
Albúmina Sérica Bovina	66 kDa	5mg/ml PBS

Cada marcador proteico se pasó a través de la columna por separado y se eluyeron con PBS 0.1 M pH 7.4 a una velocidad de flujo de 0.5 ml por minuto a una temperatura de 4°C. Se recolectaron fracciones de 2 ml, las cuales se les determinó lo siguiente:

1) Concentración de proteínas mediante la absorbancia a 280 nm (Beckman DU-6). Con los resultados obtenidos se realizó el perfil de elución para cada proteína utilizada.

La muestra liofilizada (SN dializado y liofilizado) se reconstituyó en PBS y posteriormente se aplicó a la columna de sephadex. Se utilizó como buffer de elución el buffer salina-fosfato. La elución de las proteínas se realizó a una temperatura de 4°C y se recolectaron fracciones de 2 ml a las cuales se les realizó lo siguiente:

- 1) Determinación de proteínas (Bradford) y absorbancia a 280 nm (Beckman DU-6).
- 2) Electroforesis SDS-PAGE 8-18% para determinar la presencia de la P24.

Una vez localizada las proteínas de interés, en este caso la proteína P24, las fracciones se liofilizaron.

### **1.2.3.2.- Obtención y purificación de la proteína P61.(110)**

**A) Electroforesis preparativa al 12% con SDS.**

Para aislar la proteína por elución mecánica se procedió a preparar un gel 12% c/SDS utilizando los moldes del equipo de electroforesis Protean (BIORAD), cuyos geles son de un grosor de 4mm. El buffer de muestra que se utilizó fue el buffer Tris-HCL, SDS sacarosa y 2-mercaptoetanol (4X)) y el buffer de corrimiento que se utilizó fue el buffer glicina 192mm, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v pH 8.3 (concentrado 2X) (Sigma). La concentración proteica que se colocó fue de 3 mg/gel. Una vez colocada la muestra en el carril correspondiente, el corrimiento electroforético que se aplicó fue de 100 volts (voltaje constante) utilizando una fuente poder (BIORAD Modelo 1000/500) cuando la muestra estaba en el gel concentrador (5%T, 2.7%C) y una vez que la proteína entro en el gel de corrimiento ( 12%T, 2.7%C) el voltaje se aumentó a 150 volts. Una vez terminada la electroforesis, se procedió a cortar tanto las orillas del gel como de la parte del centro del gel (aproximadamente 0.5 cm de ancho). El resto del gel se cubrió con un plástico (Kleenpack) y este se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se identificó la banda de interés. Con el fin de identificar la proteína P61 en el gel, se procedió a cortar las orillas del gel (laterales y central) los cuales se introdujeron en el colorante de azul de Coomassie y después de 30 min de tinción se procedió a desteñir dichos geles utilizando la solución

destañadora (metanol 40% y ácido acético 10%). Posteriormente se procedió a realizar elución mecánica de la proteína P61.

### **B) Elución mecánica de la proteína P61.**

Una vez que se localizó la posición de la banda de interés ( P61) se procedió a extraer del gel el cual estaba guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  a partir del cual se cortó el gel en la posición donde se localizó la banda de interés (P61). Después de cortado el gel, los pedazos del gel se colocaron en un tubo de 50 ml (Falcon) al cual se le agregó agua bidestilada y se dejó toda la noche en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  y al siguiente día se centrifugó y el SN se colocó en tubo cónico de 50 ml (Falcon), este procedimiento se repitió 2 veces más . Los eluidos recolectados se juntaron y se les determinó proteínas (método de Bradford) y el resto se colocó en un vial para posteriormente liofilizar. Una vez liofilizado la muestra se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Finalmente se realizó una electroforesis en SDS-PAGE analítico en gradiente 8-18% para determinar la pureza de las banda proteicas aisladas y purificadas.

### **1.2.3.3. Obtención y purificación antígeno no inmunodominante (proteasa P38)**

Para la obtención de la proteasa en mayor cantidad se utilizó un medio de cultivo a base de peptonas (120) en el cual se ha visto que la *Nocardia brasiliensis* crece en cantidad abundante (10 veces mas en cuanto masa

bacteriana) y 4 veces mas en cuanto a concentración de proteasa. Y algo mas interesante que se observó es que se produce proteasa extracelular (filtrado de cultivo). Para llevar a cabo esto se preparó medio de cultivo a base de peptonas según las indicaciones de Catalina-Rivas y se agregó a cada matraz 180 ml del medio de cultivo (matraz erlenmeyer de 1 o 2 ltos), preparando finalmente 40 matraces por cosecha. El medio de cultivo se ajustó a pH 7.4 antes de ser esterilizado a 120°C/10 min. y se inocularon con 0.5 ml de una suspensión unicelular de *N. brasiliensis* y luego se incubaron a 37°C sin agitación por una semana. Después se obtuvo la masa bacteriana de *N. brasiliensis* utilizando un sistema de filtración con vacío de modo que recuperamos por un lado la masa bacteriana y al mismo tiempo el filtrado de cultivo el cual se colocó en frascos de 3.5 ltos. Después la masa bacteriana se lavó con S.S y se deslipidizó con una solución de eter:etanol en diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 3:1) y finalmente la masa bacteriana se colocó en un recipiente de vidrio dentro de una campana de extracción hasta que la masa bacteriana quedara seca. Este procedimiento se tardó 24 horas.

Por otro lado el filtrado de cultivo se dializó y se concentró al mismo tiempo utilizando un cartucho de modo que concentramos la muestra de un volumen de 6 ltos a un volumen de 100 o 200 ml. La proteasa IC se

obtuvo a partir de la masa bacteriana mientras que la proteasa EC se hizo a partir del filtrado de cultivo.

### **1.2.3.3.1 Determinación de la actividad enzimática del extracto crudo y del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*.**

#### **A).- Ensayo de actividad proteolítica en gel (zimograma)**

Para investigar la presencia de proteasas en el E.C. y en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*, se utilizó la técnica de zimograma utilizada por Pérez Montfort y cols (118) y modificada por Salinas y cols (119).

Gel-substrato.- Se preparó un gel de poliacrilamida al 7.5% en amortiguador tris-HCl 0.075 M pH 7.4 y NaCl 0.15M con 0.57 mg/ml de caseína.

Gel 12%. Constó de un gel lineal sin gradiente, sin SDS y sin 2ME en el cual se separaron las proteínas del ECC de *N. brasiliensis* A 150 volts por 3 hrs.

Posteriormente ambos geles se colocaron a manera de sandwich y se incubaron a 37°C por 1 hora y media y luego ambos geles se tificaron con azul de Coomassie por 30 min y después de destañaron con sol. destañadora.

Una vez que ya se destañaron ambos geles, en el gel-substrato se observaron áreas claras (sin tefir) las cuales corresponden al sitio donde las proteínas del ECC estuvo en contacto con este gel. Una vez que se ha

determinó la presencia de la proteasa en el ECC y en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* el siguiente paso fue la obtención y purificación de la proteasa y para realizar eso se utilizará la siguiente metodología:

- a) Precipitación con sulfato de amonio
- b) Electroforesis preparativa 12% sin SDS

#### **1.2.3.3.2.- Obtención y purificación de proteasa intracelular (IC) y extracelular (EC).**

##### **A) Precipitación con sulfato de amonio 50% del filtrado de cultivo y del extracto crudo de *N. brasiliensis*.**

Para la obtención de la proteasa intracelular (IC) se hizo a partir del extracto crudo celular de *N. brasiliensis* (ECC) mientras que para la obtención de la proteasa extracelular se hizo a partir del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*. Tanto el ECC como el filtrado de cultivo se precipitaron con sulfato de amonio a una concentración del 50%. El procedimiento de precipitación es igual que el antes mencionado. Una vez que se ha precipitado la muestra, se centrifugó y el SN obtenido se dializó contra agua destilada lo suficiente hasta que no haya sales en líquido de diálisis (prueba de cloruro de bario). Una vez que ya no habían sales el SN se liofilizó. Posteriormente el SN dializado y liofilizado se le determinó la actividad enzimática (zimograma) y una



vez detectada se aisló y purificó la proteasa a partir del SN mediante electroforesis preparativa y elución mecánica.

**B).-Electroforesis preparativa al 12% sin SDS y elución mecánica del sobrenadante del filtrado o extracto celular precipitado con sulfato de amonio al 50%.**

Se realizó elución mecánica de la proteasa presente en el sobrenadante del filtrado de cultivo o del extracto celular de *N. brasiliensis* (medio de peptonas), mediante una electroforesis preparativa al 12% sin SDS, para el cual se utilizó el sistema de BIORAD cuyos geles son de un grosor 4 mm. La cantidad de proteína que se utilizó para el corrimiento fue de 3 mg/0.5ml mas 0.5 ml de buffer de muestra 2X (buffer tris-HCl mas sacarosa). La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts en el gel concentrador (5%T, 2.7%C) y una vez que la proteína entró en el gel de corrimiento (12 %T, 2.7%C) el voltaje se aumentó a 150 volts. El tiempo de corrimiento fue de 4 horas aproximadamente. Una vez que se terminó el corrimiento, se cortaron las orillas del gel (laterales) y parte central de gel (centro) aproximadamente de 0.5 cm de ancho mientras que el resto del gel se cubrió con plástico (Kleenpack) y se congeló a -20°C. Las tirillas laterales y central se colocaron sobre otro gel-substrato (caseína) para llevar a cabo el zimograma de contacto, se incubaron por espacio de 1 hora y media y después se separaron ambos geles, y se tificaron con el

colorante de Coomassie y se dejaron por un tiempo y después se destiñeron con una solución de metanol 40% y ácido acético 10%. Una vez localizada la posición de las bandas que presentan actividad enzimática, se procedió a cortar el gel que estaba dentro del congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  en la posición ya determinada. El gel se cortó en la posición donde se encontró la actividad enzimática, y los pedazos de gel se colocaron en un tubo cónico de 50 ml (Falcon) al cual se le agregó 5 a 10 ml agua bi-distilada y se dejaron en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al siguiente día se centrifugó el tubo y se separó el sobrenadante obtenido el cual se colocó el eluido en otro tubo. Este procedimiento se realizó 2 veces más y los eluidos que se obtuvieron se dializaron contra agua y se liofilizaron. Al liofilizado se le hizo:

a) Determinación proteínas (Bradford) (sección 1.2.2.1)

b) Determinación actividad enzimática (Zimograma) (sección 1.2.3.3.19)

c) Electroforesis SDS-PAGE  $-18\%$  para determinar la pureza de la proteína (proteasa) (sección 1.2.2.2)

#### **1.2.3.4.- Determinar la pureza de las proteínas purificadas (P24 y P61 y Proteasa P38)**

Para determinar la pureza de las proteínas purificadas (P24, P61 y Proteasa) se hizo una electroforesis analítico en gradiente 8-18% con SDS y 2-ME y una inmunoelectrotransferencia (Western-blot) de las

proteínas purificadas reveladas con suero de ratón infectado con *N. brasiliensis*.

#### **1.2.3.4.1.- Análisis electroforético SDS-PAGE 8-18%.**

Una vez que las proteínas ID se aislaron y se purificaron el siguiente paso es determinar la pureza de dichas proteínas y para esto se realizó una electroforesis en gel PAGE en gradiente 8-18% con SDS. El gel se preparó siguiendo las instrucciones tal como esta el punto 1.2.2.2 Las muestras liofilizadas P24 y P61 se mezclaron con un buffer de muestra 4X (SDS y 2-mercaptoetanol) quedando a una concentración de 20 µg/ml/. La muestra junto con los marcadores de peso molecular (7H Sigma) se calentaron a ebullición por 2 min y luego se colocaron en sus carriles correspondientes del gel. El corrimiento de las muestras y los marcadores de PM se hizo a un voltaje de 100 volts y una vez que las bandas proteicas llegaron al gel de corrimiento el voltaje se aumentó a 150 volts. Una vez terminado el corrimiento, el gel se tiñó con azul de Coomassie y con tinción de plata.

#### **1.2.3.4.2.- Inmunoelectrotransferencia (Western-blot) de las proteínas inmunodominantes P24, P61 y proteasa.-**

Posteriormente las proteínas purificadas se separaron electroforeticamente utilizando un gel 8-18% en gradiente con SDS (sección 1.2.2.2) y después se transfirieron a papel de nitrocelulosa

utilizando la cámara de transferencia (BIORAD). Una vez transferidas las proteínas al papel de nitrocelulosa, el papel se cortó en tiras de 0.3 cm y estos fueron colocados con sueros de ratones infectados con *N. brasiliensis*. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron 1 hora a 37°C con los suero de los ratones infectados (diluidos 1:25) utilizando una cámara de acrílico (30 carriles). Después de la incubación las tiras fueron lavadas con una solución de PBS 0.1M y Tween 20 1:1000 en la misma cámara. Se hicieron 3 lavados de 10, 5 y 5 min cada uno. Después se agregaron antisueros anti-IgM o anti-IgG conjugados con peroxidasa y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente las tiras se revelaron utilizando un substrato OPD (0.1 mg) en 20 ml de PBS 0.1 M pH 7.4 al cual se agregó peróxido de hidrógeno y la positividad de la prueba depende de la aparición de bandas cafés a los largo de la tira.

#### **1.2.4.- Obtención de antígenos particulados de *N. brasiliensis*.**

##### **1.2.4.1.- Bacterias deslipidizadas.**

La suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis* fue sometida a autoclave (NAPCO modelo 9000-D) a 121°C, 15lb/pulg<sup>2</sup> por 20min. La ausencia de viabilidad (prueba de esterilidad) se determinó mediante cultivo de muestras tratadas y control en medio BHI (caldo) a 37°C. Después la suspensión unicelular se sometió a una extracción sucesiva

con etanol:éter etílico 1:1, 1:2 y 1:3; se dejó secando a temperatura ambiente.

#### **1.2.4.2. Bacterias muertas por calor.**

A partir de un cultivo de *N. brasiliensis* en medio BHI de 3 días a 37°C la bacteria se homogeneizó utilizando un Potter-Evelham y se ajustó a una concentración de  $10 \times 10^6$ /ml (sección 1.2.1.1) y después se sometió a una temperatura 121°C/15 min 15 libras de presión

## **2.- ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN GENERAL.**

Para la realización de estos experimentos se utilizó un esquema que ha sido determinado en el Departamento de Inmunología. Se utilizaron 5 grupos de 10 animales, mas el grupo control dando un total de 60 animales.

**2.1.-Inmunización con antígenos solubles (antígeno P24, P61 y proteasa) y antígenos particulados (bacterias deslipidizadas y bacterias muertas por calor) para la obtención del suero hiperinmune del día 45, 15, 7 y 3 post-inmunización.**

Para la obtención de sueros hiper-inmunes contra los antígenos solubles anti-p24, anti-P61 y anti-Proteasa y contra los antígenos particulados (Bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas ) se utilizó el siguiente esquema:

1. Inmunización con antígenos de *N. brasiliensis* (solubles o particulados)
2. Sangraron a los animales a partir del plexo retroorbitario a diferentes tiempos de inmunización (45d, 15d, 7d y 3d).

**A) Esquema de inmunización para la obtención de suero hiperinmune contra antígenos solubles y particulados del día 45 al 60.:**

Para la obtención del suero del día 45 se realizaron 3 inmunizaciones con intervalos de 15 días entre cada una tal como se muestra a continuación.

**Se realizó el siguiente esquema de inmunización:**

1ª Inmunización .-Vía SC en el cojinete plantar, utilizando una concentración del antígeno 20µg/50µl s.s./50µl AIF (Día 0)

2ª Inmunización .- Vía SC en el lomo, utilizando una concentración de antígeno de 15µg/50µl s.s./50µl AIF (Día 15 post-infección)

3ª Inmunización .- Vía SC en el lomo, utilizando una concentración de antígeno de 15µg/50µl s.s./50µl AIF (Día 30 post-infección)

Para los antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) la dosis de antígeno fue de 20 15 y 15µg/ 50µl mas 50 µl de AIF (suero hiperinmune del día 45)

En el caso de los antígenos particulados: BD y BMC la dosis que se

aplicó será la equivalente a  $10 \times 10^6$  bacterias /ml. Serán 3 dosis en el caso del suero hiperinmune del día 45 .

**B) .-Esquema de inmunización para la obtención de suero hiperinmune contra antígenos solubles y particulados del día 15, 7 y 3 post-inmunización:**

**El esquema de inmunización fue el siguiente:**

Para la obtención de los sueros hiperinmunes del día 15, 7 y 3 solamente fue una sola dosis de inmunización  $20 \mu\text{g}$  de proteína/  $50 \mu\text{l}$  mas  $50 \mu\text{l}$  de AIF. En el caso de los antígenos particulados: BD y BMC fue una sola dosis la que se aplicó la cual fue la equivalente a  $10 \times 10^6$  bacterias /ml.

### **3.- OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES CONTRA ANTÍGENOS SOLUBLES Y PARTICULADOS DE *N. brasiliensis*.-**

Para la obtención del suero hiper-inmune del día 45, se realizaron 3 inmunizaciones con antígenos solubles y particulados y después todos los animales se sangraron a partir del plexo retroorbitario, Para la obtención del suero hiperinmune del día 15, 7 y 3 se realizó una sola inmunización y después los animales fueron sangrados a partir del plexo retroorbitario hasta que finalmente se sangraron a morir a través de punción cardiaca.

El suero obtenido se filtró por  $0.22 \mu\text{m}$  y se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Finalmente se hizo la mezcla de los sueros homólogos obtenidos

con el fin de determinar su volumen y posteriormente se determinó el título de anticuerpos anti-antígeno específico mediante un ensayo de ELISA.

### **3.1.- Análisis de los sueros hiperinmunes.**

Una vez que se recolectaron los sueros hiperinmunes contra los antígenos solubles y antígenos particulados, la determinación de anticuerpos tipo IgG o IgM se hizo a través de una técnica inmunoenzimática en fase sólida (ELISA) (113).

#### **3.1.1 Determinación de anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa por una técnica inmunoenzimática(ELISA).**

Para la detección de anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa se utilizó la técnica inmunoenzimática (ELISA) la cual fue desarrollada por Salinas-Carmona y S. Casillas (113) estandarizada solamente para determinar anticuerpos anti-P24. De acuerdo a esta técnica se utilizaron los mismos parámetros para realizar la determinación de anti-P61 y anti-proteasa. La concentración proteica del antígeno fue de 0.5µg/200µl/pozo. Se usaron placas de poliestireno de 96 pozos fondo plano de 300µl de capacidad, marca Costar (EIA-RIA). Los antígenos que se usaron en los ensayos fueron las proteínas P24, P61 y proteasa respectivamente a partir de la cual se agregó a cada pozo 0.5µg en 200µl de amortiguador de acetatos pH 5, se dejó a 4°C toda la noche y al



siguiente día se lavó la placa 3 veces de 10 minutos con una solución lavadora (PBS 0.1M pH 7.2-Tween 1.1000 ) Después se bloquearon los pozos de la placa con 200 µl de leche descremada (Sveltes 3%) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después se lavaron los pozos con solución de lavado (3 lavados de 10 minutos cada uno) y después se agregó 200µl del suero del ratón (diluido a 1:50) y se incubó. Después se lavaron los pozos con solución de lavado (3 lavados de 5 min cada uno) y luego se agregó 200µl del conjugado (antisuero anti-ratón IgM o IgG conjugado con peroxidasa Sigma ). Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y después se lavaron los pozos con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos). Finalmente para identificar la reacción antígeno anticuerpo se agregó una solución de substrato/cromógeno (peróxido de hidrógeno y OPD) a un volumen de 160µl/pozo y se incubó por 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente. La reacción se da por terminada al agregar 40µl/pozo de ácido sulfúrico 1N. El resultado se obtuvo en unidades de absorbancia a 492 nm (DIAMEDÍX BP-96 MICROASSAY Reader) Como controles se usaron sueros de ratones con micetoma (control positivo) y ratones no inmunizados (control negativo).

**3.1.2.- Identificación del isotipo de los sueros anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa (ELISA) obtenidos en el día 45 postinmunización.**

Para la identificación del isotipo de los sueros anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa, se utilizó la misma técnica de ELISA mencionada anteriormente excepto en el paso que después del 1er anticuerpo (muestra de suero de ratón) se le agregaron los antisueros anti-ratón(anti- IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, anti-cadenas  $\kappa$  y anti-cadenas  $\lambda$ ) en forma individual, este anticuerpo no estará conjugado por lo tanto se le agregó un antisuero policlonal anti-ratón conjugado con peroxidasa y por último la solución de revelado (peróxido de hidrógeno y el OPD). Todos los pozos se leyeron a una longitud de onda de 492 nm.

#### **4.-EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN ACTIVA EN EL ESTABLECIMIENTO Y EVOLUCIÓN DEL MICETOMA EXPERIMENTAL.**

Para estudiar el efecto de la inmunización activa contra antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* en el establecimiento y evolución del micetoma experimental en ratones BALB/c, se realizaron varios experimentos los cuales se hicieron a diferentes tiempos de la infección: Esto consistió en 2 etapas

1º. Inmunización con los antígenos solubles o particulados a ratones BALB/c, siendo un total de 5 antígenos por cada experimento.

2º Infección con *N. brasiliensis* viva después de la inmunización a diferentes tiempos (45, 30, 15, 5 y 3 día). Los ratones se infectaron con

*N. brasiliensis*  $10 \times 10^6$ /ml (0.1 ml) en el cojinete plantar con el propósito de inducir micetoma experimental.

**Exp.#1 Infección con *N. brasiliensis* en el Día 45 postinmunización**

**Exp.#2 Infección con *N. brasiliensis* en el Día 15 post-inmunización**

**Exp.#3 Infección con *N. brasiliensis* en el Día 7 postinmunización**

**Exp # 4 Infección con *N. brasiliensis* en el Día 3 postinmunización.**

#### **4.1.-Inmunización activa con los antígenos solubles.:**

Para la realización de los experimento # 1 al 4 se utilizaron por cada experimento, 5 grupos de 10 ratones (1 antígeno por grupo). Se utilizaron 3 antígenos solubles dando un total de 30 ratones mas los controles positivo y negativo dando un total de 50 ratones por experimento. El esquema de inmunización para cada experimento fué igual al utilizado en las secciones: (2.1 A y 2.1 B)

Grupo 1.- antígeno P24

Grupo 2.- antígeno P61

Grupo 3.- antígeno proteasa

Grupo 4 *N. brasiliensis* viva (control positivo de infección) ) 0.1 ml de una sus pensión bacteriana de *N. brasiliensis* ajustada a  $10 \times 10^6$ /

Grupo 5.- AIF (control negativo)

Después de las inmunizaciones se pasó a la 2ª parte del experimento.

Todos los ratones se sangraron en el día 0,15,40, 45, 60, 75, 90 y 120

días post infección. Todos los sueros fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En los sueros obtenidos se analizaron el título anticuerpos específico de antígeno mediante un ensayo de ELISA.

#### **4.2.- Inmunización activa con los antígenos particulados de *N. brasiliensis***

Se utilizaron 10 ratones por grupo, lo cual da un total de 50 ratones por experimento. El esquema de inmunización para cada antígeno fue igual al utilizado en la sección : (2.3).

Grupo 1.- Bacterias deslipidizadas 20, 15 y 15 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$

Grupo 2.- Bacterias muertas por calor (equivalente  $10 \times 10^6/\text{ml}$ )

Grupo 3.- Control negativo (AIF) 0.1 ml

Grupo 4.- control de infección (control positivo) 0.1 ml de una suspensión bacteriana de *N. brasiliensis* ajustada a  $10 \times 10^6/\text{ml}$

En los grupos 1 y 2 el antígeno se mezcló v/v con AIF.

Después de las inmunizaciones se paso a la 2ª parte del experimento.

Todos los ratones se sangraron a partir del plexo retroorbitario el día 0, 15, 40, 45, 60, 75, 90 y 120 días post-inmunización . Todos los sueros se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En los sueros obtenidos se analizaron el título anticuerpos anti- antígeno específico (ELISA)

**4.3.- Inducción del Micetoma experimental en animales previamente inmunizados con los antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis*.**

Después de las inmunizaciones con los antígenos de *N. brasiliensis*. los animales fueron infectados a diferentes tiempos de inmunización:

Exp. #1 Los animales fueron infectados en el día 45 post-inmunización.

Exp. #2 Los animales fueron infectados en el día 15 post-inmunización.

Exp. #3 Los animales fueron infectados en el día 7 post-inmunización.

Exp. #4 Los animales fueron infectados en el día 3 post-inmunización.

Después de ser infectados con una suspensión de *N. brasiliensis* cuya concentración fue de  $10 \times 10^6 / 1\text{ml}$ , se inyectó 0.1 ml en el cojinete plantar y cada 10 días se midió la inflamación del cojinete plantar utilizando el vernier y también los ratones fueron sangrados a diferentes tiempos a partir del plexo retroorbitario. Los sueros se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Todos los resultados obtenidos de las mediciones de los cojinetes plantar de los ratones infectados se analizaron estadísticamente utilizando una Prueba de *T* student y los valores que se graficaron representan la media y la desviación estándar de 10 valores obtenidos por grupo. Los resultados obtenidos en milímetros de inflamación se graficaron colocando en el eje de la Y (mm de inflamación) mientras que en el eje

de la X los días post- infección y de ese modo veremos en forma representativa el efecto de la inmunización activa con los antígenos solubles o particulados y en el establecimiento y evolución del micetoma experimental en ratones BALB/c.

## **5.- EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN PASIVA EN EL ESTABLECIMIENTO Y EVOLUCIÓN DEL MICETOMA EXPERIMENTAL.**

Para estudiar el efecto de la inmunización pasiva de antisueros anti-antígenos solubles y particulados en el establecimiento y evolución del micetoma experimental, se realizaron experimentos de transferencia pasiva de antisueros contra antígenos de *N. brasiliensis* obtenidos de ratones los cuales fueron previamente inmunizados con antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) o con los antígenos particulados (BD y BMC) de *N. brasiliensis* y sangrados a diferentes días post-inmunización. Los experimentos de transferencia pasiva constó de 2 partes:

- 1.- Transferencia pasiva de los antisueros obtenidos de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* (Donadores) a otros grupos de ratones (Receptores)
- 2.- Infección con *N. brasiliensis* vivas a los ratones (Receptores)

### **5.1-Transferencia pasiva del suero hiperinmune obtenido a diferentes tiempos.**

Estos experimentos se realizaron de la siguiente manera:

Se utilizaron 3 antisueros anti-antígenos solubles y 2 antisueros anti-antígenos particulados obtenidos a diferentes tiempos de inmunización (45d antes, y 45 d después, 15,7 y 3 días postinmunización) lo cual significa que cada antisuero fue obtenido en 5 tiempos diferentes de inmunización y son 5 antígenos lo cual da un total de 25 antisueros (sección 2.1). Aparte el control positivo el cual corresponde al grupo de ratones que recibió suero de ratón con micetoma y el control negativo al grupo de ratones que recibió suero de ratones no inmunizado. Cada grupo de ratones recibió un solo antisuero de modo que fueron 27 grupos de ratones y cada grupo constó de 10 ratones dando un total de 270 ratones. . Solamente los antisueros anti-antígenos solubles o particulados obtenidos en el día 45 se estudió el efecto de la transferencia pasiva transferidos 72, 48 y 24 hrs antes de la infección y después 72, 48 y 24 hrs de la infección.

El resto de los sueros hiperinmunes dirigidos contra los antígenos solubles y antígenos particulados obtenidos en los días 15, 5 y 3 solamente se dieron antes de la infección. Todos los sueros hiperinmunes anti-antígenos solubles y anti-antígenos particulados antes

de ser transferidos, se filtraron con filtro 0.22µm y se inyectaron vía intraperitoneal (IP) en un volumen 0.1 ml/ ratón.

Solamente a los grupos de los ratones que recibirán el suero hiperinmune (45d) antes de la infección se realizó de la siguiente manera:

1 dosis diaria por 3 días consecutivos, antes de la infección lo cual corresponde a 72, 48 y 24 hrs antes de la infección.

A los grupos de los ratones que recibieron el suero el suero hiperinmune (45d) después de la infección se realizó de la siguiente manera:

1 dosis diaria por 3 días consecutivos después de la infección, lo cual corresponderá a las 24,48 y 72 hrs después de la infección.

**5.2.- Inducción del Micetoma experimental con *N. brasiliensis*. en ratones (receptores) que recibieron el suero hiperinmune (día 45, 15, 7 y 3).**

Después de que los ratones (Receptores) recibieron el suero hiperinmune: día 45 (antes), 45 (después) 30, 15 7 y 3 , todos los animales se infectaron con  $10 \times 10^6$  bacterias/ml (0.1ml) en el cojinete plantar por vía SC. Posteriormente se les midió la inflamación del cojinete plantar utilizando un vernier cada 5 o 10 días por un período de 90 días. Los resultados se graficaron tal como se mencionó en la sección 4.3.



Después de que los ratones fueron infectados todos los ratones se sangraron cada 15 días del plexo retroorbitario y el suero obtenido se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente determinar el título de anticuerpo anti-P24 (ELISA).

## **6.-EXPERIMENTOS DE RE-INFECCIÓN CON *N. brasiliensis*.**

**6.1.- Reinfeción con *N. brasiliensis* en el día 90 post-infección en los ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* e infectados en el día 15 post-inmunización.**

De los experimentos de inmunización activa con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* e infección en el día 15 post-inmunización, todos los animales fueron re infectados en el día 90 post-infección utilizando 0.1 ml de una suspensión de  $10 \times 10^6/\text{ml}$  en el cojinete plantar. A todos los animales se les midió la inflamación 45 días mas y los resultados se graficaron mm de inflamación contra días de infección (sección 4.2).

**6.2.- Re-infección con *N. brasiliensis* en el día 90 post-infección en los ratones que recibieron suero hiperinmune contra antígenos de *N. brasiliensis* obtenido en el día 7 post-inmunización e infectados con *N. brasiliensis*.**

De los experimentos de inmunización pasiva con suero hiperinmune del día 7 dirigido contra antígenos de *N. brasiliensis* el cual fue transferido a

ratones BALB/c los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*. Posteriormente los ratones se re infectaron en el día 90 post-infección con una suspensión de *N. brasiliensis* ajustada a  $10 \times 10^6$ /ml infectando por vía subcutánea en el cojinete plantar 0.1 ml. Después de la reinfección todos los animales se les midió la inflamación por 45 días y los resultados se graficaron mm de inflamación contra días de infección (sección 4.2).

### **6.3.- Re-infecciones a tiempos cortos con *N. brasiliensis* en ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* a partir del día 15 post-inmunización.**

Se utilizaron 7 grupos de 5 ratones cada uno los cuales se inmunizaron con antígenos de *N. brasiliensis* y en el día 15 todos se infectaron con *N. brasiliensis* en el cojinete plantar, posteriormente a los 15 días 1 grupo se re infectó con *N. brasiliensis* y 15 días mas tarde (30 día) otro grupo e re infectó con *N. brasiliensis*, después a los 15 días (45d) otro grupo se re infectó con *N. brasiliensis* y finalmente a los 60 días post-infección otro grupo se re infectó con *N. brasiliensis*. A todos los animales se les midió la inflamación 45 días mas y los resultados se graficaron mm de inflamación contra días de infección (sección 4.2)

## **7.- EFECTO DE LA TRANSFERENCIA PASIVA DE CELULAS DE BAZO OBTENIDAS DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS SOLUBLES Y PARTICULADOS DE *N. brasiliensis*.**

Los experimentos de transferencia pasiva de células consistieron en 3 etapas:

- 1) Obtención de células de bazo (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles (p24, P61 y proteasa) y antígenos particulados (B. deslipidizadas y BMC). A este grupo de ratones se le llamó DONADORES de células MN.
- 2) Transferencia pasiva de células de bazo vía IP a otros grupos de ratones (RECEPTORES).
- 3) Inducción del micetoma experimental en los ratones que recibieron las células de bazo (receptores) mediante la infección con *N. brasiliensis* viva en el cojinete plantar.

**7.1.- Obtención de células mononucleares de bazo de ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* (donadores) a diferentes tiempos 45, 30, 15 y 7 días post-inmunización.**

Para realizar estos experimentos se utilizaron 10 ratones por grupo/antígeno siendo en total (3 antígenos solubles y 2 antígenos particulados) dando un total de ratones de 50 ratones los cuales a

diferentes tiempos (45, 30, 15 y 7), fueron sacrificados y se les extrajo el bazo en condiciones de esterilidad. El bazo una vez extraído se colocó en una placa de petri estéril el cual contenía 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 estéril y dentro de una campana de flujo laminar se procedió a extraer las células de bazo por perfusión del órgano y posteriormente se maceró el tejido utilizando una malla de acero inoxidable. Una vez terminada la extracción de las células al medio de cultivo, el líquido se pasó a un tubo de 15 ml (Falcon estéril) y las células se lavaron con medio de cultivo RPMI-1640 estéril 3 veces y al final se resuspendió en 6 ml. Posteriormente en otro tubo de 15 ml estéril se le agregó 3 ml de Ficoll-Diatrizoato de sodio y los 6 ml de la suspensión de células del bazo el cual se centrifugó a 1,200 rpm por 30 min. Y con una pipeta pasteur estéril se obtuvo el anillo de la interfase en el cual están presentes las células mononucleares. Posteriormente después de 3 lavados con RPMI-1640 estéril, las células se resuspendieron 1 ml a partir del cual se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer y de ese modo las células se ajustaron a una concentración de 100,000 células/0.1 ml/ratón.

**7.2.- Transferencia de células mononucleares de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* obtenidas a diferentes tiempos 45, 30, 15 y 7 días a ratones BALB/c (receptores)**

Se utilizaron 10 ratones por grupo los cuales recibieron vía IP las células mononucleares (100,000 cel/0.1 ml) obtenidas de bazo de ratones inmunizados con antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) y particulados (BMC y BD) los cuales fueron sacrificados a diferentes tiempos:

**RECEPTORES:**

- 1) Ratones que recibieron las células MN obtenidos de ratones (D) inmunizados con antígenos solubles o particulados del día 45 post-inmunización dados antes o después de la infección (total de 10 grupos).
- 2) Ratones que recibieron MN obtenidos de ratones inmunizados con antígenos solubles o particulados del día 30 post-inmunización. (total de 5 grupos)
- 3) Ratones que recibieron MN obtenidos de ratones inmunizados con antígenos solubles o particulados del día 15 post-inmunización. (total de 5 grupos)
- 4) Ratones que recibieron MN obtenidos de ratones inmunizados con antígenos solubles o particulados del día 7 post-inmunización (total de 5 grupos).

Después de que los ratones recibieron las células MN a una concentración de 100,000 /0.1 ml /ratón, todos los ratones fueron infectados con  $10 \times 10^6$ /ml (sección 1.2.1.1) inyectando 0.1 ml via SC en el cojinete plantar. En total fueron 35 grupos de 10 ratones dando un

total de 350 ratones mas el control positivo y negativo lo cual da un total de 370 ratones.

**7.3.-Inducción del micetoma experimental en los ratones ( R ) los cuales recibirán células MN obtenidas a diferentes tiempos de los ratones (Donadores) inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis*.**

Después de que los diferentes grupos de ratones BALB/c (receptores) recibieron las células mononucleares del día 45, 30, 15 y 7, los ratones se infectaron con *N. brasiliensis* viva  $10 \times 10^6 / 0.1$  ml en el cojinete plantar. Después de que fueron infectados se midió la inflamación utilizando un vernier. Los resultados se graficaron en mm de inflamación contra días de infección (sección 4.3).

**8.- DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B EN RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON *N. brasiliensis* .**

Para realizar este experimento se utilizaron células de ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis*.

Las poblaciones celulares que se usaron fueron: células de cavidad peritoneal, células de bazo y células de sangre periférica. Las subpoblaciones de las células B que se cuantificaron fueron: B-1 a, B-1b y B-2.

Dicho experimento constó de varias etapas etapas:

- 1) Inmunización con antígenos solubles y particulados.
- 2) Obtención de las poblaciones celulares a diferentes tiempos de inmunización (30, 15 y 7d)
- 3) Análisis de las subpoblaciones de las células B por medio de citometría de flujo utilizando antisueros marcados con PE e FITC.

**8.1 Inmunización con antígenos de *N. brasiliensis* en ratones BALB/c y obtención de las células a diferentes tiempos de inmunización (30, 15 y 7D).**

Se utilizaron 3 grupos de ratones de 5 cada grupo los cuales fueron inmunizados con Gpo1: P61 (20µg/0.1 ml), Gpo. 2: proteasa (20µg/0.1 ml) y Gpo. 3: bacterias muertas por calor (1.0X10<sup>6</sup>/0.1 ml). A diferentes tiempos de inmunización (30, 15 y 7 días) los ratones se sacrificaron vía dislocación cervical y se obtuvieron las siguientes poblaciones celulares:

**8.2.- Obtención de las suspensiones celulares en ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis***

Después de que se sacrificó al ratón por dislocación cervical, se realizó lo siguiente:

- 1° Se les extrajo sangre a través de punción cardiaca (células de sangre periférica)
- 2° Se les inyectó 5 ml de medio de cultivo en la cavidad peritoneal y después de 5 minutos se removieron las células peritoneales.

3° Se les extrajo el bazo y este se colocó en una caja de petri el cual contenía medio de cultivo y por perfusión y maceración del tejido se obtuvieron las células esplénicas.

### **8.3.- Caracterización de las células esplénicas, peritoneales y sanguíneas mediante citometría de flujo.**

Los antisueros que se utilizaron para identificar las subpoblaciones B-1 a, B-1b y B-2 fueron aquellos que reconocen ciertas proteínas de superficie por ejemplo:

CD19: esta presente en todas las células B

CD11 (Mac-1), CD45R y CD5: presente en células B-1

CD23: presente en cel. B-2

La diferencia entre las células B-1 a y B-1b es que la B-1 a son CD5+ y B-1 b es CD5-.

Se utilizaron los siguientes conjugados:

1.- Anticuerpo monoclonal anti-ratón CD11b (Mac-1) R-PE (BD557397)

2.- Anticuerpo monoclonal anti-ratón CD 45R/B220 R-PE (BD 553089)

3.- Anticuerpo monoclonal anti-ratón CD5 (Ly-1) R-PE (BD 553022)

4.- Anticuerpo monoclonal anti-ratón CD23 (R-PE) (BD 553139)

5.- Anticuerpo monoclonal anti-ratón CD19 (FITC) (BD 557398)

Todos los conjugados se utilizaron en un volumen de 2µl



Por cada ratón fueron 3 suspensiones celulares(CP, bazo y Sangre) y por cada suspensión se utilizaron 4 anticuerpos monoclonales. De modo que fueron por grupo/antígeno 5 ratones y por cada ratón 12 tubos lo cual da un total de 60 tubos por grupo/antígeno

El procedimiento que se utilizó fue el siguiente:

Se utilizó 50  $\mu$ l de muestra (sangre, lavado peritoneal o suspensión de células de bazo) y se le añadió 2  $\mu$ l del conjugado .

Tubo #1 células de CP + conjugado 1 + conjugado 5

Tubo #2 células de CP + conjugado 2+ conjugado 5

Tubo #3 células de CP + conjugado 3+ conjugado 5

Tubo #4 células de CP + conjugado 4+ conjugado 5

Después las muestras se incubaron en oscuridad por 10 min y terminada la incubación se les añadió a todos los tubos 1 ml de solución de lisis (1:10) y se volvió a incubar 3 min. en oscuridad. Una vez terminada la incubación todos las muestras se lavaron con PBS 0.1M y se centrifugaron a 1,200rpm/5 min. Posteriormente se les añadió 1 ml de PBS 0.1 M más 100  $\mu$ l de formaldehído 1:10 en PBS.

Después los tubos se guardaron a 4°C y cubiertos con papel aluminio.

Los tubos se leyeron en el citómetro de flujo (118) y ajustaron a 3000 eventos. Los resultados se analizaron estadísticamente de modo que cada

valor obtenido (% de células marcadas) representa la media y desviación estándar de 5 ratones/grupo /antígeno/población celular.

## **9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Todos los experimentos de inmunización activa y pasiva en ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles o particulados, los cuales posteriormente fueron infectados con *N. brasiliensis* en el cojinete plantar, los animales fueron evaluados clínicamente y se les midió la inflamación del cojinete plantar utilizando un vernier. Las lecturas obtenidas en milímetros fueron utilizadas para graficar los resultados. Todas las lecturas obtenidas fueron analizadas estadísticamente mediante la prueba *T* student y cada punto de la gráfica equivale a la media y desviación estándar de 10 ratones por grupo. Se considera estadísticamente significativa cuando el valor de *P* inferior a 0.05.

En el caso del análisis estadístico de los resultados obtenidos en el análisis de las subpoblaciones de células B mediante citometría de flujo los resultados obtenidos corresponden al % de células identificadas con los diferentes antiseros y cada valor mostrado en las tablas corresponden a la media y desviación estándar de 5 ratones /grupo/antígeno/población celular analizada.

## RESULTADOS

### 1.- Micetoma experimental en ratones BALB/c.-

Se utilizaron ratones BALB/c para reproducir el modelo de micetoma experimental causado por *N. brasiliensis*. En la figura 1 se muestran la inflamación del cojinete plantar infectado con *N. brasiliensis* a diferentes tiempos: día 0 (A), día 15 (B) y 30 días (C)

