UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR ANTICUERPOS Y CITOCINAS Th1 y Th2 EN RATONES MRL*lpr* INFECTADOS CON BACTERIAS O HELMINTOS

Por

MARIA GUADALUPE DE LA CRUZ GALICIA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología

Febrero, 2006

MARIA GUADALUPE DE LA CRUZ GALICIA

TD
QR185
.8
.C95
C7
2006
c.1

2006

1080128442

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR ANTICUERPOS Y CITOCINAS Th1 y Th2 EN RATONES MRL/*lpr* INFECTADOS CON BACTERIAS O HELMINTOS

Por

MARÍA GUADALUPE DE LA CRUZ GALICIA

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

Febrero, 2006

QR 185
.8
.C95
C7
2006

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

ESTUDIOS DE LA RESPUESTA INMUNE POR ANTICUERPOS Y CITOCINAS Th1 Y Th2 EN RATONES MRL/lpr INFECTADOS CON BACTERIAS O HELMINTOS

Aprobación de la Tesis:

DR. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO
Director de Tesis

DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Co-Director de Tesis

DR. CARLOS EDUARDO MEDINA DE LA GARZA
Comisión de Tesis

DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES CASTRO CORONA
Comisión de Tesis

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

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR ANTICUERPOS Y CITOCINAS Th1 y Th2 EN RATONES MRL/*lpr* INFECTADOS CON BACTERIAS O HELMINTOS

El presente trabajo fue realizado por **María Guadalupe de la Cruz Galicia** en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Garza Elizondo y la co-asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona. Apoyado parcialmente por la Universidad Autónoma de nuevo León (PAICYT).

Agradezco a CONACYT la beca- crédito otorgada.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Consuelo y Lucio, son una bendición en mi vida y una luz en mi camino.

Gracias Dios por cuidar de ellos

A MIS HERMANOS

Armando, Jesús, Lucio y Carlos por el gran cariño que nos une y por su apoyo incondicional en todo momento. Los quiero mucho

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Mario Alberto Garza Elizondo, asesor de mi tesis por haber confiado en mi para la realización del presente trabajo, gracias por esta oportunidad. Así como al Dr. Mario César Salinas Carmona por su valiosa colaboración como co-asesor, gracias por sus consejos. Al Dr. Carlos Eduardo Medina De la Garza, a la Dra. Agnes Revol de Mendoza y a la Dra. Angeles Castro Corona por sus sugerencias e interés para que esta trabajo llegara a buen término

Al Dr. Eloy Caballero Mendoza y a la Sra. Chiquis, gracias por su valiosa ayuda, sus consejos y su amistad.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoz por sus sabios consejos y su apoyo en todo momento. Gracias por sus palabras de ánimo y por su amistad.

A las doctoras Anna Velia Vázquez, Luz Isabel Pérez, y Ángeles Castro Corona, al M.C. Adrián Rosas por su valiosa amistad y apoyo incondicional en todo momento.

Al personal de los Departamentos de Inmunología, Reumatología, Patología y Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL. En especial por las secretarias Norma Sanchez y Patricia Cantú, así como por mis compañeras Irasema y Araceli, gracias por su amistad y apoyo en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la realización de mis estudios y a la Facultad de Ciencias Químicas de la UAC por esta oportunidad de realizar mis estudios de posgrado

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
1. Animales de laboratorio	24
2. Antígenos	24
3. Helmintos	24
4. Microorganismos	24
5. Preparación de los cultivos bacterianos	25
6. Preparación de los cultivos de helmintos	26
7. Obtención de Antígenos	28
8. Determinación de proteínas por el método de Bradford	29
9. Análisis del patrón electroforético de los antígenos microbianos	29
10. Tratamiento de los grupos de ratones MRL/*lpr*	31
11. Determinación de anticuerpos séricos	32
12. Determinación de citocinas	36
13. Evaluación clínica e histopatológica	38
14. Análisis estadístico	39

CONTENIDO PÁGINA

RESULTADOS 40

DISCUSIÓN 54

CONCLUSIONES 59

PERSPECTIVAS 60

BIBLIOGRAFIA 61

LISTA DE ABREVIATURAS 104

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS **PAGINA**

1. Análisis del patrón electroforético de HES, NES y del ECC de *Nocardia brasiliensis* 41
2. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Heligmosomoides polygyrus.* 42
3. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Nippostrongylus brasiliensis.* 43
4. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Nocardia brasiliensiss.* 44
5. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Staphylococcus aureus.* 45
6. Determinación de IFN-γ en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos. 46
7. Determinación de IL-4 en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos. 47
8. Evaluación clínica de la artritis en el ratón MRL/*lpr* 48
9. Histopatología de la articulación en el ratón MRL/lpr 49
10. Etapas de daño articular en la artritis del ratón MRL/*lpr* *50*

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Parásitos empleados en el tratamiento de las enfermedades Autoinmunes	17
II. Condiciones experimentales para la determinación de Ac anti-bacteria y anti-parásito	37
III. Concentración de antígenos obtenidos a partir de los helmintos y de *Nocardia brasiliensis*	40
IV. Las bacterias y los helmintos afectan la artritis espontánea en el ratón MRL/*lpr*	52

RESUMEN

María Guadalupe de la Cruz Galicia **Febrero de 2006**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR ANTICUERPOS Y CITOCINAS Th1 y Th2 EN RATONES MRL/*lpr* NFECTADOS CON BACTERIAS O HELMINTOS

Número de Páginas: 105 **Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología.**

Área de estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: La artritis reumatoide es una enfermedad crónica, degenerativa y discapacitante que afecta al 3% de la población mundial. Se ha relacionado a las infecciones microbianas como agentes desencadenantes de la enfermedad, sin embargo, estudios recientes han demostrado que la infección con helmintos podría regular los mecanismos de inflamación presentes en artritis y otras enfermedades autoinmunes. En el presente trabajo se estudió el efecto de las infecciones con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Nocardia brasiliensis*, así como con los helmintos *Nippostrongylus brasiliensis* y *Heligmososmoides polygyrus* en la evolución de la artritis en el ratón MRL/lpr. Los ratones MRL/lpr de 12 semanas de edad fueron infectados con bacterias o helmintos , y 6 semanas después evaluados en forma clínica e histopatológica. Se realizó la determinación dea nticuerpos IgG1 e IgG2a antibacteria y anti-parásitos , de citocinas Th1 (IFN-γ) y Th2 (IL-4), así como el análisis histopatológico de tejido articular. Se correlacionó el nivel de anticuerpos, la producción de citocinas y los hallazgos histopatológicos de tejido articular. Se correlacionó el nivel de anticuerpos, la producción de citocinas y los hallazgos histopatológicos con la evolución de la artritis en el ratón MRL/lpr.

Contribuciones y conclusiones: Los hallazgos encontrados muestran que los grupos de ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias presentaron principalmente una respuesta caracterizada por la producción de IgG2a e IFN-γ (asociada con una respuesta de tipo Th1 en el ratón) mientras que aquellos infectados con helmintos mostraron una respuesta por IgG1 e IL-4 (asociada con una respuesta de tipo Th2 en el ratón), el análisis histopatológico mostró que el 100% de los ratones infectados con bacterias desarrollaron artritis y presentaron en su mayoría alteraciones histopatológicas avanzadas tales como la erosión del cartílago y hueso, mientras que en aquéllos infectados con helmintos el daño histopatológico fue en menor grado (hiperplasia sinovial y erosión del cartílago), además una número menor de ratones desarrollaron artritis (70%). De lo anterior se concluye que la infección con bacterias o helmintos parece modificar la evolución de la artritis que desarrolla el ratón MRL/lpr, activando e inhibiendo respectivamente su evolución.

Dr. Mario Alberto Garza Elizondo
Director de Tesis

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente, un 20% de la población mundial se encuentra afectada por alguna enfermedad inflamatoria o autoinmune Puesto que las enfermedades autoinmunes son de etiología multifactorial, esto hace difícil identificar los eventos tempranos que desencadenan los mecanismos de autoinmunidad (Choileain, 2006).

El sistema inmune normalmente muestra tolerancia hacia los propios componentes por deleción clonal de células T autorreactivas, lo cual ocurre en el timo en el periodo perinatal y por la supresión funcional de células T y B autorreactivas en etapas posteriores del desarrollo. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ocurre una alteración en el mantenimiento de la tolerancia hacia los propios componentes, lo cual determina el establecimento de un fenómeno de autoinmunidad. La respuesta inmune, se caracteriza por la activación y expansión clonal de linfocitos autorreactivos y la producción de autoanticuerpos en contra de antígenos autólogos presentes en los tejidos propios del organismo (Kelley, 1997).

Una característica particular de las enfermedades autoinmunes, es la selectividad que ejercen los LT (linfocitos T) autorreactivos, sobre una célula, órgano o tejido en particular. Muchos de los linfocitos que poseen receptores reactivos para lo propio, son eliminados por un proceso controlado de inducción de tolerancia. Se ha estimado que, después del su paso por el timo, aproximadamente el 10% de los LT son reactivos contra lo propio (Opdenakker, 2005).

El proceso de inflamación inicial que se desencadena en las enfermedades autoinmunes, conduce a la activación subsecuente de linfocitos autorreactivos, y la constante repetición de este ciclo ocasiona un estado de inflamación crónica

permanente (Finch, 2004). Ejemplos de enfermedades autoinmunes, incluyen a la artritis reumatoide, diabetes mellitus insulina dependiente y LES (lupus eritematoso sistémica), que se caracterizan por inflamación crónica, destrucción de tejido y alteración de la función del órgano afectado (William, 2005). Si bien existen fuertes evidencias que asocian a la mayoría de las enfermedades autoinmunes con marcadores genéticos específicos, parece ser que la participación de las células Treg, juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Scheffold, 2005).

Se ha determinado que la susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes está determinada por una combinación de factores genéticos y ambientales. Diversos estudios apoyan el hecho que las infecciones microbianas desencadenan o exacerban las enfermedades autoinmunes (Bach, 2002). Se proponen dos mecanismos por los cuales los microorganismos podrían activar a los LT autoreactivos: 1) antígeno específico, lo que se explica por el mimetismo molecular (Benoist, 2001), 2) antígeno no específico, en la cual los LB al ser infectados de forma persistente por bacterias o virus, conducen a activación y proliferación policlonal (Coutelier, 1990; Yang, 1992; Sangster, 2000 y Hunziker, 2003).

Se ha propuesto que la infección crónica puede activar a LB autoreactivos de una manera significativa haciendo que se diferencien en células de memoria, que en individuos con una predisposición genética, podría armar un escenario perfecto para desencadenar el fenómeno de autoinmunidad (Soulas 2005).

POSIBLES MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE POR AGENTES INFECCIOSOS.

MIMETISMO MOLECULAR POR ANTIGENOS MICROBIANOS

El mimetismo molecular ha sido propuesto como un mecanismo patogénico que puede desencadenar autoinmunidad. Esta hipótesis se basa en evidencias experimentales, clínicas y epidemiológicas existentes que demuestran la asociación entre un agente infeccioso y una enfermedad autoinmune. La reactividad cruzada que se desarrolla entre las estructuras químicas del microbio y las propias proteínas del huésped conducen al mimetismo molecular, que para fines prácticos se define como estructuras similares compartidas por moléculas provenientes de un origen (genes) diferente (Mcken, 1992). La respuesta inmune que se desarrolla en contra de determinantes compartidos por el huésped y el microbio, pueden provocar una respuesta inmune específica hacia un tejido, la cual es capaz de provocar destrucción celular y tisular. Entre los posibles mecanismos involucrados en la respuesta inmune hacia Ag compartidos se encuentran la generación de linfocitos citotóxicos y la producción de anticuerpos (Oldstone, 1998).

Los agentes infecciosos pueden inducir un incremento en la síntesis de citocinas Th1, desencadenando la expresión de moléculas de CMH, así como la activación y co-estimulación de moléculas tales como B7.1/CD28. Se ha reportado que ciertas bacterias síntetizan superantígenos que activan selectivamente subpoblaciones de LT actuando como activadores policlonales (Conrad, 1997 y Soos, 1997).

Aunque la infección con bacterias o virus puede ser una causa directa de artritis, se ha sugerido que la enfermedad puede ocurrir cuando los Ag extraños"mimetizan"

autoantígenos presentes en las articulaciones, por su similtud en su secuencia de aminoácidos. La respuesta inmune generada en contra del patógeno, reacciona de manera cruzada con los propios componentes lo que conduce a un fenómeno de autoinmunidad. El mimetismo molecular es posible también cuando se comparten epitopes conformacionales (Rose, 2001) En AR (artritis y reumatoide), se han descrito ejemplos relacionados con el mimetismo molecular, como es el caso de una proteína de shock-térmico de *Escherichia coli,* la dnaJ, contiene una secuencia de 5 aminoácidos que es idéntica a la molécula HLA-DRB_1 , la secuencia se ha asociado con susceptibilidad hacia AR . Pacientes con AR mostraron elevadas respuesta por LT en contra de dnaJ, especialmente en el líquido sinovial. Otra proteína bacteriana que contiene una región con secuencias similares a los epitopes compartidos es la hemolisina de *Proteus mirabilis* , lo que sugiere que los pacientes con AR podrían poseer títulos elevados de Ag de Proteus (Ebringer, 1992) .

INFECCIÓN BACTERIANA

Los receptores tipo toll (TLRs), son moléculas importantes para el reconocimiento de agentes patógenos con la subsecuente activación de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a estos patógenos. Luego de un estímulo, los TLRs activan varias protein-cinasas *via* moléculas adaptadoras como MyD88, conduciendo a la activación de NFkB. La identificación de las vías de señalización TLR podrían revelar los mecanismos moleculares que inducen a la tolerancia a lo "propio" y los posibles mecanismos que desencadenarían el desarrollo de un fenómeno autoinmune.

En contraste con la inmunidad adaptativa, la inmunidad innata aparece de forma temprana durante la evolución y posee la habilidad de reconocer microorganismos patógenos. La inmunidad innata se activa de manera inmediata. Luego de contacto

con un Ag (antígeno) y controla la replicación de los microoganismos, hasta que la inmunidad adaptativa aparece. La activación de la respuesta inmune adaptativa hacia Ag propios o ambientales, puede ocasionar enfermedades autoinmunes o alérgicas. Existen evidencias que apoyan el hecho que la inmunidad innata juega un papel importante en determinar si una respuesta inmune es normal o alterada que conduzca a autoinmunidad (Toubi, 2004).

Diversos componentes bacterianos, tales como LPS, peptidoglicanos, mananos, ADN, RNA bacterianos (patrones asociados a patógenos moleculares, PAMPs) , actúan como inductores potentes de la inmunidad innata, a través de los TLRs, por lo que han sido asociados con la patogenia de enfermedades autoinmunes (Toubi, 2004; Anders[1], 2005; Christensen, 2005; Anders[2], 2005; Wu, 2006)

Por otro lado, se ha demostrado que los Ag micobacterianos, de estreptococos y de la flora intestinal son excelentes inductores de artritis en modelos animales.

En estudios realizados en ratones MRL/*lpr* que fueron inmunizados con *Nocardia brasiliensis* o *Staphylococcus aureus,* se observó que ambos grupos de ratones desarrollaron artritis; aunque los infectados con *S. aureus* desarrollaron lesiones articulares más severas como destrucción de hueso, mientras que los infectados con *Nocardia* desarrollaron como grado erosión de cartílago como grado máximo de lesión (Vázquez, 1998).

Estudios recientes han demostrado la capacidad adyuvante que poseen los lipopolisacáridos de *E. coli,* al ser inyectados intraperitonealmente en ratones DBA/IJ junto con un componente del cartílago (colágena tipo II), en la inducción de artritis autoinmune. También se ha visto que otros tipos de lipopolisacáridos de *Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* así como el lípido A de *E.*

coli, causan inflamación en las articulaciones al ser inyectadas con colágena tipo II (Yoshino, 2000).

En ciertas enfermedades autoinmunes, como la AR o el síndrome de Reiter, se cree que el estímulo continuo con Ag propios, da lugar a la fase crónica de la enfermedad. Se ha reportado que la enfermedad podría ser causada por una respuesta inmune en contra de antígenos microbianos persistentes en los tejidos blanco, lo que aumenta la posibilidad de que algunos síndromes clasificados como enfermedades autoinmunes pueden tener una etiología infecciosa crónica (Behar y Porcelli, 1995)

La persistencia o el depósito de Ag microbianos es un mecanismo por el cual los organismos patógenos pueden ocasionar una enfermedad inflamatoria crónica. Un ejemplo de este mecanismo lo es la inflamación articular que en ocasiones se desarrolla luego de infecciones no articulares. La artritis postinfecciosa es una sinovitis mediada por el depósito de Ag extraños en forma de complejos inmunes; por ejemplo la artritis asociada con hepatitis B aguda (Wands, 1975), infecciones diseminadas agudas con meningococos (Jarret, 1980) o gonococos (Goldenberg, 1983). En contraste, la artritis reactiva ocurre en una subpoblación de pacientes semanas posteriores a una diarrea bacteriana aguda (Granfors, 1992) o infecciones urogenitales por *Clamydia trachomatis* (Rahman, 1992, Silveira, 1992)

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la correlación que existe entre la infección por ciertas bacterias y el inicio del síndrome de Reiter en indivduos HLA –B27 que padecen de espondilitis anquilosante; las bacterias que han sido implicadas han sido, la *Klebsiella pneumonia, Shigella flexneri, Salmonella, and Yersinia enterocolytica* (Goverman, 1993). Ratas transgénicos (HLA-B27) que desarrollan artropatías espontáneas, no desarrollaron artropatías o solamente lesiones articulares menos

severas en aquellos animales que se desarrollaron en un ambiente libre de gérmenes (Taurog, 1994; Hammer, 1990). Por otro lado, otros investigadores plantearon la posibilidad que la molécula HLA-B27 se encuentren asociadas con un defecto en la capacidad de eliminar patógenos microbianos (Rath, 1996).

SUPERANTÍGENOS BACTERIANOS

Algunas bacterias poseen la capacidad de sintetizar superantígenos, estos superantígenos pueden activar 1 de cada 5 linfocitos, en contraste con 1 de cada 10000 leucocitos que reaccionarían ante una proteína viral o bacteriana en particular. Los superantígenos, se pueden definir como moléculas que aunadas a moléculas del CMH de clase II, estimulan a los LT a nivel de su porción variable de la cadena β (por ejemplo $TCRBV_5$, $TCRBV_8$) de los receptores para los Ag de dichas células (Quiros, 1996) . Se ha sugerido que los superantígenos estén involucrados en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes (Friedman, 1991; Johnson, 1996; Soos, 1997; Krakauer, 1999) como la AR.

VIRUS

Se sabe que los virus pueden causar inflamación en las articulaciones, como el de la rubéola, el parvovirus B19 y el arbovirus. Por otro lado también el retrovirus de la encefalomielitis-artritis, causa una enfermedad reumática crónica en las cabras; herpesvirus como el virus Epstein-Barr virus se ha asociado con una enfermedad semejante a la AR (McGuire, 1990; Kennedy-Stoskopf, 1989)

ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria de la membrana sinovial, la cual causa erosión, deformidadad y destrucción de las articulaciones; especialmente las articulaciones pequeñas de manos y pies (Feldmann, 1996; Firestein, 2005). Predomina en las mujeres en proporción de 3:1, aparece en la edad adulta o media, aunque ha sido registrada en personas de todas las edades. Se ha estimado que la prevalencia es alrededor del 1-3% de la población. La distribución geográfica de AR es mundial, sin embargo existe una baja incidencia en África rural (Silman, 1993) y una elevada prevalencia en tribus nativas americanas (Pima y los Chippewa) (Weinblatt, 2001).

Al igual que la mayoría de las enfermedades autoinmunes, se ha pensado que la AR es causada por la interacción entre factores genéticos y ambientales. Existen diversas publicaciones que apoyan este hecho, se ha estimado, que los factores genéticos participan con un 15% y los factores no genéticos les corresponde el 85% para desencadenar la AR. Los genes HLA parecen tener relevancia en la progresión de la enfermedad (Weyand, 2000).

Factores genéticos.- Existe una predisposición genética a desarrollar AR, sin embargo algunos casos ocurren de forma esporádica. Ambas formas de AR se asocian con HLA-DR4, y en un menor grado con HLA-DR1 (Feldmann, 1996; Weyand, 2000).

Agentes infecciosos.- Los agentes microbianos asociados con AR incluyen virus como el Epstein-Barr, rubéola, retrovirus, parvovirus (Wilder, 1991) y el virus de la hepatitis C (Hirohata, 1992), bacterias como micoplasma, micobacterias (Moreland, 1991) y diferentes organismos entéricos (Thompson, 1994). El peptidoglicano de la pared celular de muchas bacterias induce artritis destructiva severa crónica, semejante

a la AR, en animales de experimentación genéticamente predispuestos (Brostoff, 1994). Se ha reportado que la proteína A del *Staphylococcus aureus* de la cepa Cowan 1 es un potente estimulador de la producción de factor reumatoide (FR) en linfocitos de individuos sanos (Tar, 1985; Goldenstein, 1986). Estudios en ratones han demostrado que un factor de virulencia importante en el desarrollo de artritis séptica por *Staphylococcus aureus*, es la capacidad de la bacteria para producir superantígenos tales como la enterotoxina A-D (SEA-SED) y la toxina-1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1) (Bremell, 1995). En 1998 se reportó que ratones MRL/*lpr* que habían sido infectados con *Nocardia brasiliensis* desarrollaron artritis, y que los ratones que la desarrollaron llegaron a erosión de hueso, una etapa avanzada de lesión articular (Vazquez, 1998)

Patogenia del daño articular.- El antígeno es presentado por fagocitos a través del CMH II a los LT CD4+, que posteriormente son activados y producen linfocinas, la cuales más tarde reclutan LT CD4+, LB, PMN y estimulan la actividad de los MØ. Al mismo tiempo, factores de crecimiento para los LB, inducen su maduración y transformación a células plasmáticas. Estas células secretan FR, los cuales a su vez forman complejos inmunes que posteriormente serán fagocitados por MØ y PMN, induciendo la activación de la enfermedad. La liberación de enzimas lisozomales y la formación de intermediarios reactivos del oxígeno tales como el anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, producen erosión y destrucción de cartílago y hueso. La liberación de IL-1 y TNF ocasionan daño articular por activación de condrocitos y osteoclastos y por el reclutamiento de otras células inflamatorias (Hochberg, 2003)

Citocinas.- Las citocinas más abundantes en la articulación cuando existen erosión de cartílago y destrucción de hueso, son las monocinas, TNF-α, IL-1 e IFN-γ. La

respuesta de células T en AR ha sido clasificada como Th1, la carencia de citocinas Th2 puede contribuir a la patogenia, ya que la IL-4 e Il-13 modulan la expresión de monocinas y la producción de enzimas en el tejido sinovial *ex vivo* y pueden disminuír la inflamación del cartílago y la destrucción de hueso al ser administradas en modelos animales. Otra citocina Th1 que contribuye al desarrollo de la artritis es la IL-17, la que se ha visto participa en la degradación de cartílago y erosión de hueso (Chabaud, 1999). Se ha sugerido que la inflamación en AR está mediada por células Th1 , en contraste células Th2 y sus citocinas en particular IL-4 se encuentra muy raramente, esta dicotomía en torno a las citocinas Th1/Th2 (Romagnani, 1997; Mosmann, 1996;), ha sido ampliamente estudiada (Charlton, 1995; Brennan, 1996; Kroemer, 1996; Nicholson, 1996; Schulze-Koops, 2001; Smolen, 2001).

RATÓN MRL/lpr

Características generales.-Una de las dificultades en definir la etiología y patogenia de la AR ha sido la falta de un modelo animal adecuado. En 1982 los ratones MRL/*lpr* (usados en la patogénesis de lupus) fueron reportados por desarrollar de forma espontánea linfadenopatía masiva con hipergamaglobulinemia, presencia de autoanticuerpos (Ratkay, 1991), altos niveles de proteínas de fase aguda, glomerulonefritis (Chan, 1999; Faust, 2002; Mishra, 2003; Kikawada, 2003; Reilly, 2004; Sadanaga, 2005) y una enfermedad parecida a la AR en una etapa avanzada de la vida del ratón (Andrews, 1987; Hang, 1982; O´Sullivan, 1985; Tanaka, 1987; Tarkowski, 1987; Koopman, 1988; Tanaka, 2004). Este modelo desarrollado por Murphy y Roths es afectado por una enfermedad sistémica autoinmune (Pataki, 1985) **y además posee las siguientes características:**

Proliferación excesiva de linfocitos T, lo cual está determinado genéticamente

Presencia de factores reumatoides de isotipos IgM e IgG

Desarrollo de poliarteritis

Poliartritis clínicamente evidente de los miembros posteriores (Hang, 1982)

En los ratones MRL/lpr, la enfermedad inicia a las 8 semanas de edad con la activación policlonal de células B y la presencia de niveles séricos elevados de IgM. De las 12 a 16 semanas de edad los ratones empiezan a producir una variedad de autoanticuerpos entre los que se incluyen anticuerpos anti-dsDNA y anti-ssDNA. De las 16 a 24 semanas, los ratones desarrollan glomerulonefritis proliferativa mediada por complejos inmunes, vasculitis, artritis y linfadenopatía masiva lo que ocasiona daño renal y la muerte en el 50% de los ratones de 24 semanas de edad (Reilly, 2002) Este modelo de ratón presenta la mutación fas^{lpr}, la cual es causada por la inserción de un elemento transponible en el gen Fas lo que afecta su expresión. El producto de

Fas es un receptor de superficie celular miembro de la familia de los receptores. Al presentar la mutación recesiva lpr, el gen fas, su producto no puede transmitir adecuadamente señales que conducen a muerte celular programada. Una de las consecuencias que resultan con la disminución de la expresión de Fas en el ratón MRL/lpr es una apoptosis defectuosa de células T maduras, lo que conduce a una acumulación acelerada de células T autoreactivas (un gran número de células T atípicas CD4, CD8 dobles negativas (DN) (Xiulong, 1997; Takahashi, 1997)

Un aspecto importante de estos ratones es que desarrollan una artritis espontánea, que puede ser activada en etapas tempranas de la vida del ratón por la inyección intradérmica de A CF (Ratkay, 1994). En ratones MRL/lpr que fueron infectados con *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis* se observó artritis en el 100% de los animales en etapas más tempranas de la vida del ratón, comparado con la aparición de la enfermedad en forma espontánea, y en el 44% de ellos la enfermedad evolucionó hasta la fase de erosión de hueso; cuando los ratones fueron infectados con *Nocardia brasiliensis* también se generó artritis temprana en el 100% de los animales aunque el 10% de estos, desarrollo erosión de hueso (Vázquez, 1998).

Exámen histopatológico de las articulaciones.- Las articulaciones del tren posterior de ratonesMRL/*lpr* hembras desarrollan lesión articular semejante a la desarrollada por el humano. El exámen histopatológico de las articulaciones demuestra proliferación de células sinoviales, formación de pannus; erosión cartílago articular adyacente a las células sinoviales proliferantes y a los 6-7 meses de edad hubo destrucción del cartílago del menisco, formación de fibrocartílago y destrucción de hueso subcondral en cierta proporción de animales. También se encontraron infiltrados de linfocitos T y B en el tejido sinovial de los ratones afectados.

Citocinas y anticuerpos.- Takahashi encontró que los ratones MRL/*lpr* producían de forma espontánea niveles significativos de IgG2a e IgG3 en contraste con los niveles obtenidos de IgG1, así como la producción significativa de IFN-γ (esto asociado a una respuesta de tipo Th1 en el ratón), los que llevo a pensar que este ratón presenta una alteración en la respuesta inmune, mostrando un desbalance y predominancia de la respuesta inmune Th1 (Takahashi, 1996). Por otro lado, en este mismo año, Lemay analizó la expresión de los genes para una variedad de citocinas en el ratón MRL/*lpr* y encontró una sobre expresión de los genes para IL-1β, TNF-α e IFN-γ (Lemay, 1996)

PARÁSITOS, INMUNOREGULACIÓN Y RESPUESTA Th2

Los helmintos son un grupo de organismos multicelulares que afectan a los humanos y son una causa principal de enfermedades. Existen diversos modelos en ratones, que representan el espectro de las enfermedades infecciosas, y han sido útiles en analizar y caracterizar la respuesta inmune del huésped en respuesta hacia diversos helmintos (Gause, 2003)

La regulación de la respuesta inmune por parásitos incluye, supresión, conversión de la repuesta inmune en beneficio del patógeno. Mientras muchos microparásitos escapan del ataque inmunológico por variación antigénica o por secuestro en nichos especializados del organismo, los helmintos se exponen en los linfáticos, en la sangre o en el tracto gastrointestinal. Eventos clave entre la respuesta del parásito y el huésped es la inducción de una respuesta Th2, la activación de MØ y de CD; además de la participación de células, particularmente eosinófilos y células cebadas. La suma de todos estos efectos conduce al huésped a crear un efecto anti-inflamatorio el cual es favorable para la supervivencia del parásito (Maizels, 2004). Incluso se ha establecido una posible relación entre la desparasitación y surgimiento de enfermedades inmunológicas inflamatorias crónicas; este fenómeno se asocia con lo propuesto en la "hipótesis de la higiene", en la cual se sugiere que la falta de exposición a helmintos, incrementa el riesgo para adquirir algunas enfermedades autoinmunes que se caracterizan por inflamación crónica (Elliot, 2000; Weinstock, 2002; Yazdanbakhsh, 2002; Dunne, 2005). Se ha establecido que la infección con helmintos, que induce inflamación tipo -Th2, regula negativamente la respuesta Th1 hacia infecciones por parásitos bacterias y virus no relacionados (Kullberg, 1992; Actor, 1993; Sabin, 1996). Por ejemplo, se ha reportado la ausencia de AR en poblaciones rurales de Nigeria, para lo cual, se ha dado como posible explicación la

elevada prevalencia de infecciones y enfermedades parasitarias endémicas en estas áreas (Silman, 1993).

Las enfermedades infecciosas y particularmente las infecciones con helmintos que son endémicas en África, podrían tener efectos profundos en el sistema inmune del huésped (Bentwich, 1996). como el regular la aparición de enfermedades inflamatorias crónicas como la AR.

Elliott y colaboradores han propuesto la " hipótesis de la higiene", según la cual las condiciones de sanidad que prevalecen en los países industrializados, han ocasionando la generación de ambientes más higiénicos, favoreciendo de esta manera un menor contacto con helmintos Esta ausencia de infección con helmintos se ha asociado con un incremento en la aparición de enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn (Elliott, 2000).

Estudios en humanos y modelos animales han utilizado parásitos o sus productos como inmunoreguladores de la respuesta inflamatoria (tabla I), especialmente aplicados a enfermedades autoinmunes (Kullberg, 1992; Vella, 1992; Elliott, 2003; Summers, 2003; Elliot, 2004; Hunter, 2004; Elliot, 2005; Dunne, 2005 y Summers, 2005). Un producto de la filaria *Acanthocheilonema viteae*, la glicoproteína ES-62, ha probado ser útil como molécula inmunoreguladora, anti-inflamatoria en el tratamiento de artritis inducida en ratones; los estudios sobre infección con filarias ha mostrado que pueden modular la respuesta inmune hacia Ag heterólogos, y la capacidad de poder polarizar una respuesta Th1 a Th2 (McInnes, 2003; Goodridge, 2004 y Harnett, 2004). Por otro lado, Mattson demostró que la artritis que desarrollan las ratas DA inoculadas con colágena bovina, fue suprimida cuando fueron infectadas con *Tripanosoma brucei* (Mattson, 2000). Existen evidencias que la infección con los helmintos *Heligmosomoides polygyrus y Nippostrongylus brasiliensis,* estimulan una

respuesta por células T, específicamente Th2; la respuesta por citocinas se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5, IL-3 y en baja concentración IFN-γ (Street, 1990; Svetic 1992). A lo largo de más de una década diversos investigadores han comprobado que los helmintos desencadenan una respuesta Th2 con una producción elevada de IL-4,

Tabla I. Parásitos empleados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes

Agente o producto	Enfermedad Autoinmune
Schistosoma mansoni	DMT1, EAE y tiroiditis de Graves
Huevecillos de *S. mansoni*	DMT1, EAE, y colitis experimental
Productos solubles de *S. mansoni*	DMT1
Hymenolepis diminuta	Colitis experimental
Acanthocheilonema viteae (ES-62)	AIC
Trichuris suis	Enfermedad de Crohn´s
Heligmosomoides polygyrus	Enfermedad intestinal inflamatoria
Trichinella spiralis	Colitis experimental
Tripanosoma brucei	AIC
Streptococcus sanguinis	AIC

esto ha permitido que en la investigación con helmintos continúe con el objeto de dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales estos parásitos ejercen un efecto modulador (Urban, 1992; Urban, 1996; Finkelman, 1997, Ishikawa, 1998; Urban, 1998; Holland, 2000; Yazdanbakhsh, 2002; Zhao, 2003, Finkelman, 2004; Liu, 2004; Maizels, 2004 y Min, 2004, Weinstock, 2005).

Nemátodos, parásitos intestinales

La infección con nemátodos intestinales se ha asociado con respuestas características de una respuesta tipo Th2. Dos parásitos nemátodos intestinales que pertenecen a la superfamilia *Trichostrongyloidea, Heligmosomoide polygyrus* y *Nippostrongylus brasiliensis,* han sido ampliamente utilizados para estudiar infecciones por parásitos intesinales; la infección con estos helmintos desencadena una fuerte respuesta inmune Th2, que se manifiesta con niveles elevados de IL-4 e IL-13, eosinofilia, mastocitosis y concentraciones elevadas de IgE e IgG1 en suero (Finkelman, 1997). La infección por *Nippostrongylus brasiliensis* se elimina en aproximadamente 2 semanas luego de la inoculación, mientras que la inoculación primaria con *Heligmosomoides polygyrus* conduce a una infección crónica . En el modelo murino, la infección con *Nippostrongylus brasiliensis,* se inicia con la inoculación subcutánea del helminto en estadío L3 bajo la piel, el sitio de la infección natural (Anderson, 2000). Esta infección y patrón de migración es similar al de varios parásitos intestinales tales como el *Ancylostoma duodenale* y el *Necator americanus* .

Recientemente se ha mostrado que *Nippostrongylus brasiliensis* , desencadena una fuerte respuesta polarizada hacia Th2 en los ganglios linfáticos cervicales luego de la inyección intracutánea en la oreja, demostrando que es el parásito y no el ambiente de la mucosa es el responsable de una respuesta Th2 (Liu, 2002). La infección con

Heligmosomoides polygyrus es estrictamente entérica y ocurre después de la ingestión de la larva en estadío infectivos (L3) del suelo. De forma experimental, las larvas L3 son inoculadas vía oral y se transportan hacia la mucosa gástrica del estómago en ~ 4 horas. La magnitud y efectividad de la respuesta varia según la cepa de ratón, sin embargo parece ser que la respuesta permanece polarizada hacia una respuesta Th2 (Gause, 1997). Estudios recientes han mostrado que LT específicos para Ag no parasitarios, pueden producir IL-4 *in vivo,* cuando ratones receptores son inmunizados con el Ag y *Nippostrongylus brasiliensis,* pero no con el Ag o el parásito de manera independiente (Liu, 2002). Estos hallazgos demuestran que el parásito actúa como un adyuvante microbiano -Th2. La diferenciación de LT en células productoras de IL-4, es un paso importante en el desarrollo de una respuesta protectora para el huésped. La IL-4 actúa como mediadora de los mecanismos que participan en la eliminación del parásito, y la cual es requerida para la amplificación de las respuesta por células Th2, que también producen IL-5, IL-9 e IL-13; *in vivo,* la IL-10 no se eleva en la infección por *Heligmosomoides polygyrus* y solo se eleva ligeramente en la respuesta contra *Nippostrongylus brasiliensis* (Svetic, 1993; Finkelman, 1994). En enfermedades infecciosas, la respuesta Th2, generalmente dependen de señales coestimuladoras B7-1 - B7-2; su bloqueo durante la respuesta inmune primara contra *Heligmosomoides polygyrus,* inhibe el desarrollo de la respuesta Th2. Otra moléculas co-estimuladoras como ICOS, el ligando CD40 (CD40L) y OX40 han sido implicadas en el desarrollo de una respuesta Th2. Una respuesta Th2 efectiva, requiere de las interacciones OX40L - B7-1 – B7-2 – CD28, durante la infección por *Heligmosomoides polygyrus,* pero no para el caso de *Nippostrongylus brasiliensis* sugiriendo que este se caracteriza por inducir una respuesta Th2 y y LT productores de IL-4, en ausencia de moléculas co-estimuladoras (Gause, 2003).

Inmunidad protectora.

Las células Th2 actúan como mediadoras de la inmunidad protectora en contra de nemátodos intestinales mediante la producción de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. La IL-4 e IL-13 pueden unirse a receptores tipo-2, expresados por diversos tipos celulares no linfoides en la región entérica. Lo anterior conduce a un incremento en la permeabilidad de las células epiteliales de la mucosa, una disminución en la absorción de glucosa dependiente de sodio, y un incremento en la contracción del músculo liso, lo que podría contribuir a un microambiente hostil para el parásito, lo cual conduciría a la expulsión de los gusanos viables adultos (Shea-Donohue, 2001). La IL-5 e IL-9 también son importantes en mediar la protección de huésped en contra de los helmintos, pero parece funcionan de manera aditiva. De manera interesante, la defensa del huésped infectado por *Nippostrongylus brasiliensis*, esta mediada por IL-13 en ausencia de IL-4, sugiriendo que la respuesta Th2 puede desarrollarse en ausencia de IL-4 (Urban, 1998). La producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) que dañan al parásito y cambian el ambiente de la mucosa, facilitan el atrapamiento del parásito y contribuyen a la eliminación del mismo (Finkelman 1997). El TNF-α, podría jugar un papel importante en acelerar la expulsión del parásito, a través de su acción en las células del intestino o mediante la activación de de la respuesta Th2 (Artis, 1999).

Se ha demostrado que la infección con helmintos o sus productos, puede tener efectos anti-inflamatorios, como ya se ha reportado para una gran variedad de productos de los helmintos(tabla 1) o los helmintos mismos, aplicados en modelos animales (Dunne,2005) y en los humanos. (Elliott, 2005). El ambiente generado por los helmintos al invadir a un huésped, inducen mecanismos reguladores de la respuesta inflamatoria como la participación de LT reguladores (Treg) y la síntesis

de IIL-10 (Doetze,2000), condiciones que favorecen el desarrollo de un ambiente anti-inflamatoriro. Por lo que resulta de gran interés investigar el efecto de la infección con helmintos en un modelo animal predispuesto a desarrollar artritis.

HIPÓTESIS

La infección bacteriana acelera la artritis en el ratón MRL/lpr al inducir una respuesta Th1; en cambio la infección por helmintos disminuye dicho proceso al estimular una respuesta de tipo Th2.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la infección bacteriana y por helmintos, modifica el patrón de citocinas Th1/Th2 y con ello la evolución de la artritis en el ratón MRL/*lpr*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la producción de anticuerpos IgG1 (Th2) e IgG2a (Th1), en ratones MRL/*lpr* infectados con los helmintos (*Heligmosomoides polygyrus* o *Nippostrongylus brasiliensis*) y las bacterias (*Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*).

2. Evaluar el predominio de la respuesta Th1 o Th2 en base a la producción de IFN-γ (Th1) e IL-4 (Th2) en ratones MRL/*lpr* Infectados con los helmintos o bacterias en estudio

3. Determinar el daño histopatológico en tejido articular de ratones MRL/lpr infectados con los helmintos o bacterias en estudio

4. Evaluar el predominio de la respuesta Th1 o Th2, en base a la producción de IFN-γ (Th1) e IL-4 (Th2) y de anticuerpos IgG1 (Th2) e IgG2a (Th1), así como su relación con el agente infeccioso y la evolución de la artritis en el modelo MRL/*lpr*

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE LABORATORIO

Se utilizaron ratones hembras de 12 semanas de edad de la cepa MRL/lpr y ratones hembras y machos de 12 semanas de edad de la cepa BALB/c; ambas cepas procedentes de Laboratorios Jackson (Jackson Laboratorios Me. USA). Los ratones se alimentaron con nutricubos (Purina México) y agua destilada estéril *ad libitum.* Los ratones se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

2. ANTÍGENOS

2.1 Proteína A soluble de *Staphylococcus aureus,* cepa Cowan (Sigma)

3. HELMINTOS

3.1 *Heligmosomoides polygyrus**

3.2 *Nippostrongylus brasiliensis* *

* Helmintos donados por el Dr. Joe Urban del Dpto de Agricultura, Beltsville, Maryland.

4. MICROORGANISMOS

4.1 *Nocardia brasiliensis,* HUJEG-1, ATCC 700358

4.2 *Staphylococcus aureus,* ATCC 12598

5. PREPARACION DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS

5.1 ***Nocardia brasiliensis.*** A partir de un cultivo puro de *Nocardia brasiliensis* en agar dextrosa-Sabouraud se inoculó una asada en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de infusión cerebro corazón (BHI) y se incubó a 37°C durante 72 horas. Los cultivos se transfirieron a tubos de 50 ml y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos (centrifuga Beckman TJ-6) para recuperar la masa bacteriana, la cual se lavó con solución salina estéril 2 veces más. Las bacterias se disgregaron con un homogenizador de vidrio (Potter-Evelhem) y se resuspendieron en solución salina estéril, se dejaron sedimentar y del sobrenadante se tomó una muestra, lo cual representa la suspensión unicelular bacteriana a partir de la cual se realizaron diluciones 1:50, 1:100, 1:150 y 1:200. Se tomó lectura de la densidad óptica de cada dilución a 325 nm y los datos se extrapolaron con una curva estándar. De esta manera se preparó el incóulo para infectar al grupo de ratones MRL/*lpr* correpondiente.

5.2 ***Staphylococcus aureus***. De un cultivo puro se transfirió una asada a un medio de agar sangre por aislamiento de estría y se incubó a 37°C por 24 h. De este cultivo primario se realizó un pase a BHI y se incubó a 37°C por 18 h, a partir de este cultivo se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-7}, de las cuales se transfirió 1 ml de cada dilución respectivamente a placas de Petri. Posteriormente se adicionaron 30 ml de agar licuado y enfriado, a cada dilución y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se contó el número de UFC en las placas donde hubo un número mayor de 30 y menor de 300. De esta forma se realizó el ajuste correspondiente para preparar el inóculo necesario para infectar al grupo de ratones MRL/*lpr.*

6. PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS DE HELMINTOS

6.1 ***Heligmosomoides polygyrus y Nippostrongylus brasiliensis.*** Se mezcló en partes iguales, tierra para jardín (peat moss) y carbón activado (Sigma C-2764) adicionado con heces (homogenizadas con agua, 0.5 g heces/ml agua) de ratones previamente infectados con el parásito. Esta mezcla se colocó en una cámara húmeda, para lo cual se emplearon placas de Petri estériles adicionadas de una papel filtro humedecido en agua estéril. La recolección de larvas de los parásitos a partir de los cultivos se realizó mediante la técnica modificada de Baerman, posteriormente se realizó el conteo de larvas con un estereoscopio y se ajustaron a 200 larvas de *Heligmosomoides polygyrus* L_3 y 500 larvas de *Nippostrongylus brasiliensiens* L_3 respectivamente en 0.1 ml de solución salina estéril.

6.2 ***Nippostrongylus brasiliensis.*** El procedimiento para la obtención de larvas de *Nippostrongylus brasiliensis* fue semejante al realizado para *Heligmosomoides polygyrus,* sin embargo el conteo de larvas en este caso particular fue de 500 larvas en estadío L_3/0.1 ml de solución salina estéril.

7. OBTENCION DE ANTIGENOS

7.1 Obtención del extracto celular crudo de *Nocardia brasiliensis.* Se inocularon 400 µl de la suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis* (ver antes) a matraces Erlenmeyer de un litro, con 160 ml de BHI y se incubó a 37°C por 7 días. Posteriormente se realizó la cosecha de la biomasa en un embudo Buchner sobre papel filtro previamente pesado y esterilizado; se realizaron lavados con agua destilada estéril (40°). Se procedió a deslipidizar la biomasa suspendiendola en una mezcla de solventes etanol-éter etílico 1:1, posteriormente 1:2 y finalmente 1:3. La mezcla de solventes se agregó respectivamente a la biomasa hasta que el respectivo

extracto resultó incoloro. La biomasa se dejó secar durante 18 horas en la campana de extracción, en un cristalizador cubierto con un plástico perforado. La biomasa seca se trituró y pulverizó en un mortero estéril junto con un volumen igual de polvo de vidrio estéril durante 90 minutos. La biomasa fue mezclada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con amortiguador de extracción Tris-HCl 0.1M/Acetato de magnesio 0.1 M pH 7.4 en una relación de 15 ml de amortiguador por cada gramo de peso seco y se dejó en agitación a 4° C durante 18 horas. Posteriormente se centrifugó en tubos cónicos de 50 ml a 3500 rpm durante 30 minutos (centrifuga Beckman TJ-6), se recuperaron los sobrenadantes (extractos) y los sólidos fueron sometidos nuevamente al mismo proceso de extracción. Los extractos fueron centrifugados a 14000 rpm durante 30 minutos a 4° C. El extracto fue dializado (membrana Sigma 250-90, 12-14 Kd) contra agua por 18 horas a 4° C. Del extracto dializado se tomó una alícuota de 1 ml y se realizó la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford, el resto del extracto dializado fue colocado en viales de vidrio con 15 ml cada uno y posteriormente se liofilizó (Freeze Mobile 12 VirTis, Gardiner NY). Una vez liofilizadas las muestras se conservaron a 4° C. Se ajustó la concentración del extracto crudo de *Nocardia brasiliensis* a 0.5 mg de proteína para cada pozo de la placa de ELISA.

7.2 Obtención de la proteína A soluble de *Staphylococcus aureus*. La proteína A de Staphylococcus aureus cepa Cowan fué adquirida de la casa comercial especificada (Sigma). Esta proteína se utilizó para la determinación de Ac IgG1 e IgG2a en el suero de ratones infectados con *Staphylococcus aureus,* mediante un ensayo de ELISA. La proteína A fue preparada en amortiguador de acetatos a una concentración de 0.05 μg por pozo de la placa.

7.3 Obtención de los antígeno de excreción-secreción de *Heligmosomoides polygyrus* (HES) y *Nocardia brasiliensis* (NES). El antígeno HES fue preparado de gusanos adultos obtenidos 7 días después de inocular 200 larvas L_3 en ratones BALB/c; mientras que el antígeno NES fue preparado de gusanos adultos obtenidos 10 días después de inocular 500 larvas L_3 en ratones BALB/c Los ratones fueron sacrificados y los gusanos adultos se obtuvieron del intestino según el método de Baerman; la cosecha de los gusanos adultos se realizó colocando los intestinos de los ratones en solución salina estéril sobre una gasa colocada en un embudo de vidrio adicionado de una manguera obstruida con pinzas de disección, lo cual permitió cosechar en un lapso de 2 horas los gusanos adultos al final de la manguera. Los gusanos recolectados fueron lavados 5 veces con solución salina estéril a 37 °C y 5 veces más con RPMI 1640 (Sigma), finalmente fueron resuspendidos en RPMI 1640 adicionado de gentamicina 50 mg/ml (250 µl/500 ml RPMI, Quality Biological 120-098-030) y antibiótico-antimicótico (5 ml/500 ml RPMI, Gibco 15240-062), e incubados por 7 días a 37 °C y 5% CO_2 en placas de cultivo de 24 pozos (Costar, 3424) conteniendo 100-200 gusanos por pozo/ml. El medio de cultivo fue colectado, reemplazado cada tercer día, filtrado a través de filtro de 0.2 µm (Millipore) y almacenado a -20 °C. El antígeno HES fue preparado a partir de 500 ml de medio de cultivo obtenido de del cultivo de los parásitos, por concentrarlo de 50 – 100 veces con Amicón utilizando una membrana con límite de corte de 10 kDa. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford. Alícuotas del antígeno HES y NES fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso. Se ajustó la concentración del antígeno HES y NES en amortiguador salina fosfatos a 0.25 µg de proteína respectivamente para cada helminto por cada pozo de la placa de ELISA.

8. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

A partir de un estándar de albúmina sérica bovina (Sigma) de concentración 1 mg/ml de agua bidestilada, se realizó una dilución 1:50 (100 µl de ASB + 4.9 ml de agua destilada) y a partir de esta se prepararon diferentes concentraciones desde 2 a 18 µg/ml. A cada estándar se le adicionó un volumen igual de reactivo de Bradford. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente cada muestra fue leída en un espectrofotómetro (Beckman DU 7500) a 595 nm. Con las lecturas obtenidas de los estándares se realizó una curva estándar de calibración graficando los resultados de absorbancia en contra de la concentración correspondiente. Las muestras problema (Extracto crudo de *Nocardia brasiliensis*, HES y NES) fueron diluídas 1:10, 1:100 y 1:1000. De estas se tomó un volumen de 500 µl a las cuales se adicionó igual volumen de reactivo de Bradford y se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. La lectura obtenida para cada muestra se interpoló con la curva de calibración y de esta manera se obtuvo la concentración de proteínas presentes en la muestra (Bradford, 1976)

9. ANÁLISIS DEL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DEL EXTRACTO CELULAR CRUDO DE *N. brasiliensis*, HES y NES EN SDS-PAGE 8-18%.

9.1 Análisis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) 8-18%. Para realizar el análisis proteíco del extracto celular crudo (EC) de *Nocardia brasiliensis*, del extracto de HES y NES, se realizó mediante un procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida adicionado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970) con las siguientes variantes, se utilizó un gel concentrador al 5% T, (2.7% C) y un gel de separación en gradiente 10-18% T,

(2.7% C). Para la realización del gel se utilizó un equipo de electroforesis mini-Protean II (BIO RAD) con ayuda de un formador de gradiente (BIO RAD modelo 385). Los geles se pre-corrieron a 50 volts por espacio de 20 minutos (fuente de poder BIO RAD modelo 1000/500), el amortiguador de corrimiento utilizado fue el de Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v con un pH 8.3 (Sigma).

Las muestras del E.C. de *N. brasiliensis* se separaron electroforeticamente (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 fueron de 40μl y 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.

9.2. 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 de metanol 40%, ácido acético 10%v/v, en cantidad suficiente para eliminar el exceso del colorante.

9.3 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 ($AgNO_3$ 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.

10. TRATAMIENTO DE LOS GRUPOS DE RATONES MRL/*lpr*

10.1 Grupo control. Diez ratones sin ningún tratamiento, fueron observados durante 6 semanas y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron muestras de sangre del plexo retro orbital a los 0, 21 y 42 días posteriores al inicio de estudio.

10.2 Grupo de ratones infectados con *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*. Un grupo de diez y once ratones MRL/lpr respectivamente, de 12 semanas, fueron inyectados subcutáneamente en el dorso con 5×10^6 UFC/50 µl de *Staphylococcus aureus* o 4×10^7 UFC/50 µl de *Nocardia brasiliensis* respectivamente. Los animales inoculados fueron observados durante 6 semanas y

posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron muestras de sangre del plexo retro orbital a los 0, 21 y 42 días posteriores a la infección.

10.3 Grupo de ratones infectados con *Nippostrongylus brasiliensis* y *Heligmosomoides polygyrus*. Un grupo de diez ratones MRL/lpr, fueron infectados por vía entérica con 200 larvas de *Heligmosomoides polygyrus* y por vía subcutánea dorsal con 500 larvas de *Nippostrongylus brasiliensis* respectivamente. Los animales inoculados se observaron durante 6 semanas y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron muestras de sangre del plexo retro orbital a los 0, 21 y 42 días posteriores a la infección.

10.4 Grupo de ratones inmunizados con ACF. El ACF acelera la artirits que desarrolla el ratón MRL/*lpr,* (Ratkay, 1993) por lo que a manera de un control de la enfermedad, un grupo de 10 ratones se inocularon con 0.05 ml de ACF (modificado, con 10 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra inactivadas con calor (Difco, Detroit, Mi), y se preparó como una emulsión aceite en agua) por vía intradérmica en 2 sitios tarácicos, con aguja de 29 X 13 mms. Los animales tratados se observaron durante 6 semanas y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron muestras de sangre del plexo retro orbital a los 0, 21 y 42 días posteriores a la inmunización.

11. DETERMINACION DE ANTICUERPOS SÉRICOS

11.1 Determinación de anticuerpos IgG anti-*Nocardia brasiliensis*. Se realizó la estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para *Nocardia brasiliensis* (Tabla II).

ELISA para extracto crudo de *Nocardia brasiliensis*.- Se colocaron 0.5 μg del antígeno del extracto crudo de *Nocardia brasiliensis* en 200 μl de amortiguador de

acetatos pH 5 por cada pozo de placas de poliestireno (placas con pozos fondo plano de 300 µl de capacidad, Costar 3590), se cubrió la placa e incubó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se eliminó el contenido de los pozos por decantación y se realizaron 5 lavados con 200 µl PBS-tween 20 1:000 a temperatura ambiente. Posteriormente la placa fue bloqueada con 200 µl/pozo de solución bloqueadora (leche descremada Difco al 5% en PBS) y se incubó a 37°C por 2 horas. Enseguida se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 20 1:1000 a temperatura ambiente. Se adicionó a cada pozo 50 µl de suero de ratón diluído 1:100 con leche descremada al 5% en PBS Tween 20 1:1000 y se incubó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-tween 20 1:1000. Se agregó a cada pozo 100 µl de antisuero (anti-IgG1 o IgG2a de ratón, SouthernBiotech) conjugado a peroxidasa y diludo 1:10000 en leche descremada al 1% en PBS Tween 20 1:1000, se incubó a 37°C por 1 hora y se realizaron 5 lavados. La reacción se reveló con 80 µl de solución cromógeno-substrato (OPD, peroxidase substrate, Sigma P-9187) por pozo, incubando por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 40 µl de ácido sulfúrico IN. El resultado se obtuvo registrando la absorbancia a 492 nm (SUNRISE TECAN Microassay Reader). Como sueros control negativo se utilizaron sueros de ratones MRL/lpr de 4 semanas de edad y como suero control positivo, el suero de ratones infectados y reinfectados a los 15 días con *Nocardia brasiliensis* 4 X 10^7/50 µl UFC por vía subcutánea dorsal y sangrados 7 días posteriores a la reinfección.

11.2 Determinación de anticuerpos IgG anti-*Staphylococcus aureus*. Se realizó la estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para *Staphylococcus aureus.*

ELISA para Proteína A de *Staphylococcus aureus*. Se colocaron 0.05 μg de proteína A de Staphylococcus aureus cepa Cowan I (Sigma) en 200 μl de amortiguador de acetatos pH 5 por cada pozo de placas de poliestireno (placas con pozos fondo plano de 300 μl de capacidad, Costar 3590), se cubrió la placa e incubó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se eliminó el contenido de los pozos por decantación y se realizaron 5 lavados con 200 μl PBS-tween 20 1:000 a temperatura ambiente. Posteriormente la placa fue bloqueada con 200 μl/pozo de solución bloqueadora (leche descremada Difco al 5% en PBS) y se incubó a 37°C por 2 horas. Enseguida se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 20 1:1000 a temperatura ambiente. Se adicionó a cada pozo 100 μl de suero de ratón diluído 1:2500 con leche descremada al 5% en PBS Tween 20 1:1000 y se incubó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-tween 20 1:1000. Se agregó a cada pozo 100 μl de antisuero (anti-IgG1 e IgG2a de ratón, SouthernBiotech) conjugado a peroxidasa y diluído 1:10000 en leche descremada al 1% en PBS Tween 20 1:1000, se incubó a 37°C por 1 hora y se realizaron 5 lavados. La reacción se reveló con 100 μl de solución cromógeno-substrato (OPD, peroxidase substrate, Sigma P-9187) por pozo, incubando por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adicionar 40 μl de ácido sulfúrico IN. El resultado se obtuvo registrando la absorbancia a 492 nm (SUNRISE TECAN Microassay Reader). Como sueros control negativo se utilizaron sueros de ratones MRL/lpr de 4 semanas de edad y como suero control positivo, el suero de ratones infectados y reinfectados a los 15 días con *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) 5 X 10^6/50 μl UFC por vía subcutánea dorsal y sangrados 7 días posteriores a la reinfección.

11.3 Determinación de anticuerpos IgG anti-*Heligmosomoides polygyrus* y anti-*Nippostrongylus brasiliensis*. Se realizó la estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos para ambos helmintos . ELISA para antígenos HES y NES respectivamente. Se colocaron 0.25 μg del antígeno HES o NES, en 50 μl de amortiguador de fosfatos pH 7.4 por cada pozo de placas immulon 4 (placas con pozos fondo plano de 300 μl de capacidad, Dynatechn), se cubrió la placa e incubó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se eliminó el contenido de los pozos por decantación y se realizaron 5 lavados con 200 μl PBS-tween 20 1:000 a temperatura ambiente. Posteriormente la placa fue bloqueada con 100 μl/pozo de solución bloqueadora (leche descremada Difco al 10 % en PBS) y se incubó a 37°C por 2 horas. Enseguida se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 20 1:1000 a temperatura ambiente. Se adicionó a cada pozo 50 μl de suero de ratón infectado con *Heligmosomoides polygyrus* o con *Nippostrongylus brasiliensis* respectivamente, diluído 1:5 con leche descremada al 5% en PBS Tween 20 1:1000 y se incubó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-tween 20 1:1000. Se agregó a cada pozo 50 μl de antisuero (anti-IgG1 e IgG2a de ratón, SouthernBiotech) conjugado a peroxidasa y diluído 1:2000 en leche descremada al 1% en PBS Tween 20 1:1000, se incubó a 37°C por 1 hora y se realizaron 5 lavados. La reacción se reveló con 50 μl de solución cromógeno-substrato (OPD, peroxidase substrate, Sigma P-9187) por pozo, incubando por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adicionar 20 μl de ácido sulfúrico IN. El resultado se obtuvo registrando la absorbancia a 492 nm (Sunrise Tecan Microassay Reader). Como sueros control negativo se utilizaron sueros de ratones MRL/lpr de 4 semanas de edad y como suero control positivo respectivamente, el suero de ratones BALB/c infectados con 200 larvas de

Heligmosomoides polygyrus por vía oral, o bien, el suero de ratones BALB/c infectados con 500 larvas de *Nippostrongylus brasiliensis* por vía subcutánea y sangrados 21 días posteriores a la infección

12. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS

Se determinó la concentración en suero de IFN-γ (Th1) e IL-4 (Th2), para lo cual se utilizaron kits comerciales de la marca ENDOGEN (EM-IFN-γ y EM-IL-4 respectivamente, Ma USA)

Tabla II Condiciones óptimas para la determinación de Ac anti-bacterias y anti-helmintos por ELISA

AGENTE INFECCIOSO	CONCENTRACIóN ANTíGENO	DILUCIóN SUERO	PLACAS
Nocardia brasiliensis	0.5 µg Amortiguador de acetatos	1:5	Poliestireno Costar 3590
Staphylococcus Aureus	Proteína A 0.05 µg Amortiguador de acetatos	1:2500	Poliestireno Costar 3590
Heligmosomoides polygyrus	0.25 µg Amortiguador salina fosfatos	1:5	Poliestireno Immulon I V
Nippostrongylus brasiliensis	0.25 µg Amortiguador salina fosfatos	1:5	Poliestireno Immulon IV

13. EVALUACION CLINICA E HISTOPATOLOGICA

13.1 Evaluación clínica. Los ratones fueron evaluados por un investigador ajeno al tratamiento durante 6 semanas posteriores al mismo (ACF o las infecciónes con *Heligmosomoides polygyrus, Nippostrongylus brasiliensis, Nocardia brasiliensis* o *Staphylococcus aureus*), con el objeto de visualizar la artritis y registrarla como positiva, en caso de observar eritema e inflamación en al menos una pata anterior o posterior

13.2 Evaluación histopatológica. Al final del estudio, los ratones fueron sacrificados y el tren posterior de los ratones se fijó en formol al 10%. A las 24 h se cambió la solución de formol. La descalcificación se llevó a cabo en una solución de ácido nítrico al 10% en etanol al 70% durante 2 días. Las patas se enjuagaron en agua corriente y fueron procesadas en un Histoquinet Autotechnicon (N.Y. USA) para incluír en parafina y se hicieron cortes en un microtomo tipo Minot Spencer (N.Y. USA) de 5-7 μm de grosor. Posteriormente se hicieron tinciones con hematoxilina-eosina. Los cortes histológicos de las articulaciones se evaluaron para la presencia o ausencia de las siguientes características:

a) Sin lesión

b) Inflamación de la membrana sinovial

c) Hiperplasia de la membrana sinovial

d) Formación de pannus

e) Erosión de cartílago

f) Destrucción de hueso (Hom, 1988)

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística ($P \leq 0.05$) fue calculada mediante la prueba de χ^2 para el análisis histopatológico, y la prueba de Kruskal Wallis para el análisis de anticuerpos, citocinas (SPSS software).

RESULTADOS

1. Obtención de IECC de *Nocardia brasiliensis* y de HES y NES de los parásitos es estudio.

Para realizar la determinación de anticuerpos anti-bacteria y anti-parásito fue necesario realizar la obtención del ECC de *Nocardia brasiliensis,* y los Ag HES y NES de los helmintos en estudio. Las cantidades de proteínas obtenidas por volumen de medio de cultivo fue semejante en los tres casos, sin embargo cabe resaltar que aunque las concentraciones obtenidas son semejantes entre si, existe una mayor dificultad técnica para obtener 500 ml de cultivo de los helmintos que de Nocardia (Tabla III). Por electoforesis se pueden apreciar los diferentes patrones electroforéticos que muestran las diferentes proteínas de estos agentes patógenos (Fig 1)

Tabla III. Concentración de Ag obtenidos a partir de los helmintos y de *Nocardia brasiliensis*

AGENTE INFECCIOSO	ANTÍGENOS mg proteína/volumen cultivo
Heligmosomoides polygyrus	**1.12 mg/500 ml**
Nippostrongylus brasiliensis	**1.66 mg/500 ml**
Nocardia brasiliensis	**1.31 mg/500 ml**

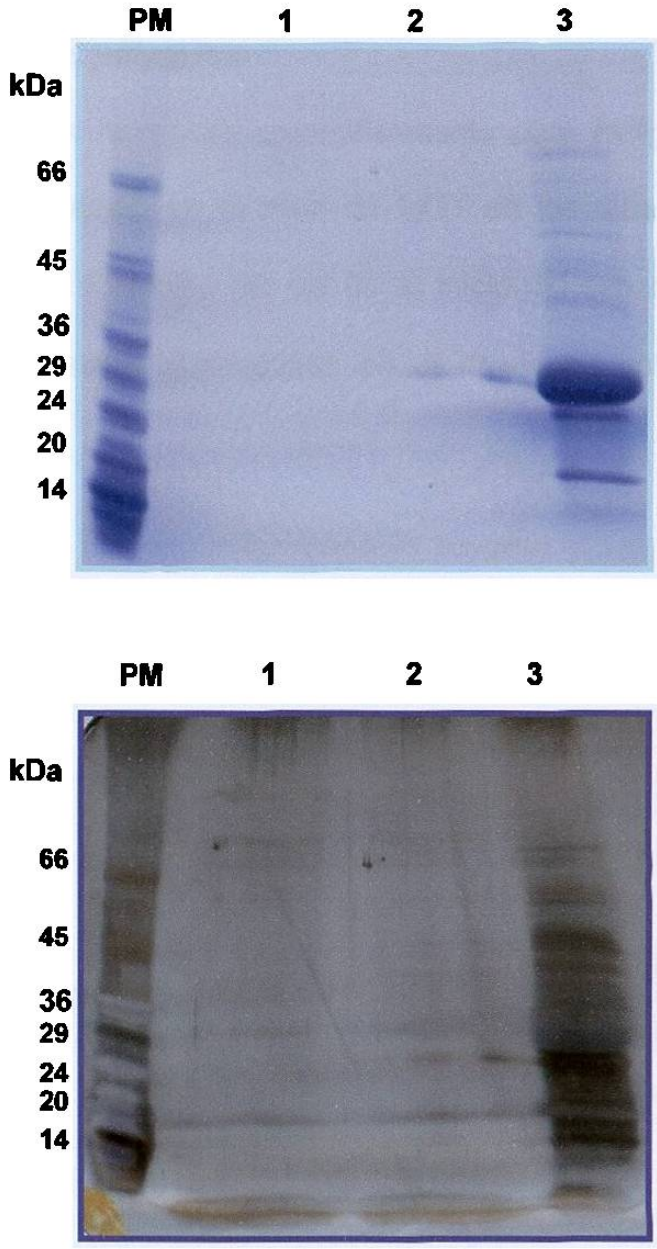

Fig 1. Análisis del patrón electroforético de HES (carril 1) y NES (carril 2) y del ECC de *Nocardia brasiliensis* (carril 3), en SDS-PAGE (Superior: tinción de Coomasie, inferior: tinción con nitrato de plata)

2. Determinación de anticuerpos en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos

Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Heligmosomoides polygyrus*

En el caso de los helmintos, específicamente para *Heligmosomoides polygyrus,* se observó un incremento en el nivel de IgG1 en los días 21 y 42, valores que son significativamente diferentes del día 0, al inicio del experimento ($P < 0.0001$), no se encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos IgG2a en los días 0, 21 y 42 (Fig. 2)

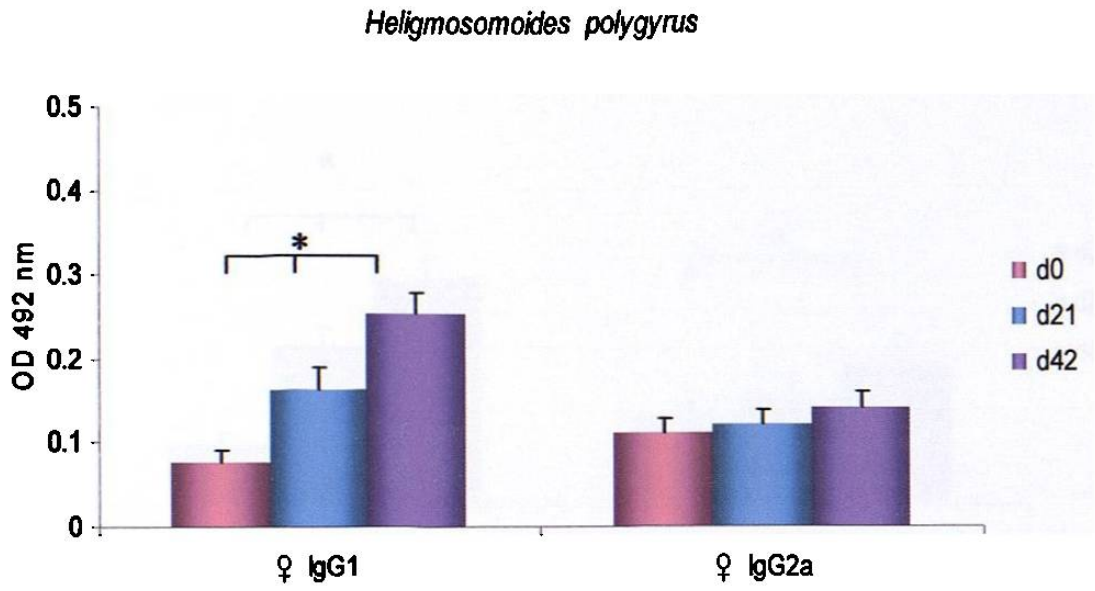

Fig 2. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Heligmosomoides polygyrus*. Ratones de 12 semanas de edad fueron infectados vía oral con 200 larvas (estadío infectivo L3) del helmito *Heligmosomoides polygyrus* Las determinaciones se realizaron con el suero de los días 0, 21 y 42 posteriores al tratamiento. Un * indica valores que muestran diferencia significativa en comparación con el día 0, al inicio del experimento ($P < 0.05$).

Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Nippostrongylus brasiliensis*

Los niveles séricos de IgG1 en ratones infectados con *Nippostrongylus brasiliensis,* se elevaron significativamente los días 21 y 42 ($P < 0.0001$); además también se observó incremento en los niveles séricos de IgG2a en el día 42 (Fig 3).

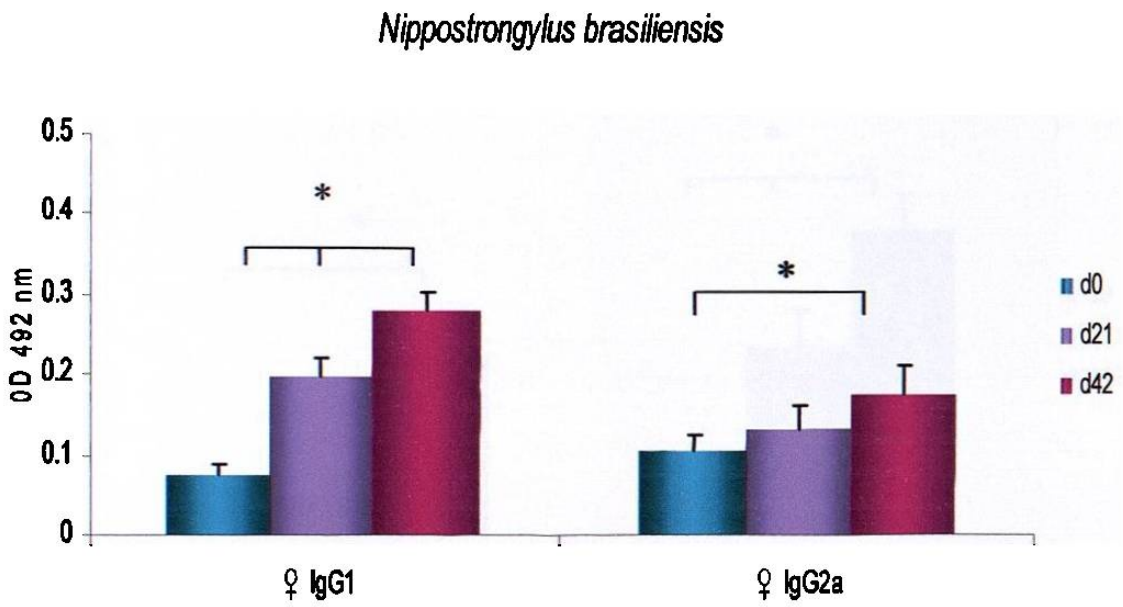

Fig 3. Determinación de anticuerposIgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Nippostrongylus brasiliensis.* Ratones de 12 semanas de edad fueron infectados vía subcutánea con 500 larvas (estadío infectivo L3) del parásito *Nippostrongylus brasiliensis.* Las determinaciones se realizaron con el suero de los días 0, 21 y 42 posteriores al tratamiento. Un * indica valores que muestran diferencia significativa en comparación con el día 0 (al inicio del experimento) ($P < 0.05$)

Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Nocardias brasiliensis*

Los ratones infectados con bacterias mostraron cambios significativos en los niveles de Ac IgG2a. En forma particular, los niveles de IgG1 para el grupo de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*, se incrementó significativamente el día 42 ($P < 0.0001$) posterior a la infección, pero no el día 21; los Ac IgG2a por su parte se incrementaron significativamente en los 21 y 42 días (Fig. 4)

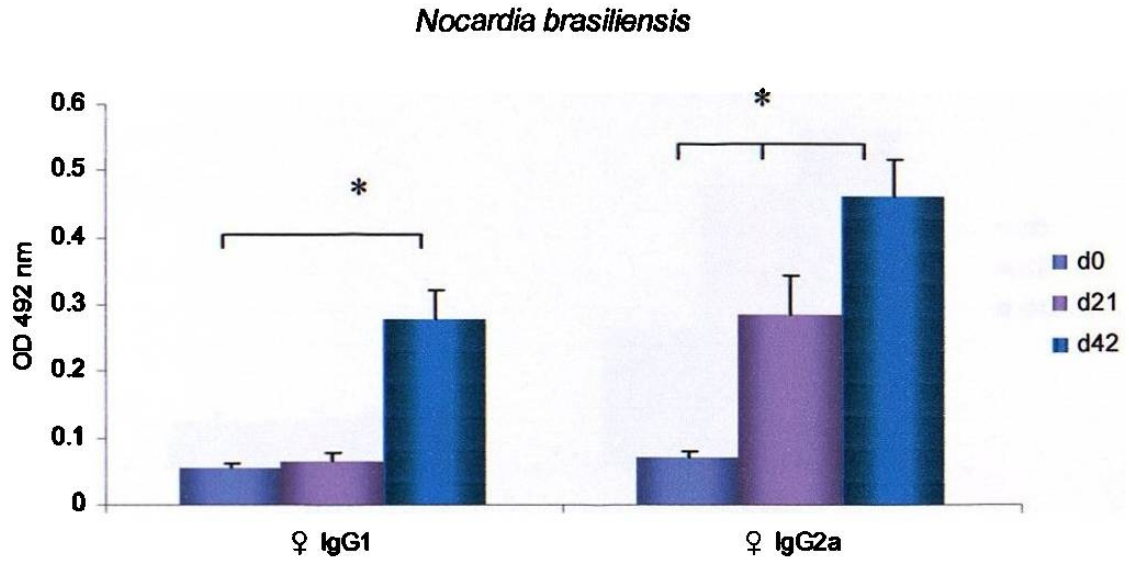

Fig 4. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Nocardia brasiliensis*. Ratones de 12 semanas de edad fueron infectados vía subcutánea con 8 x 10^8 UFC/ml de *Nocardia brasiliensis* Las determinaciones se realizaron con el suero de los días 0, 21 y 42 posteriores al tratamiento. Un * indica valores que muestran diferencia significativa en comparación con el día 0 (al inicio del experimento) ($P < 0.05$)

Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Staphylococcus aureus.*

La producción de Ac IgG2a en ratones infectados con *Staphylococcus aureus,* mostraron cambios significativos a los 21 y 42 días posteriores a la infección. No se observaron cambios para IgG1 a ningún tiempo (Fig 5)

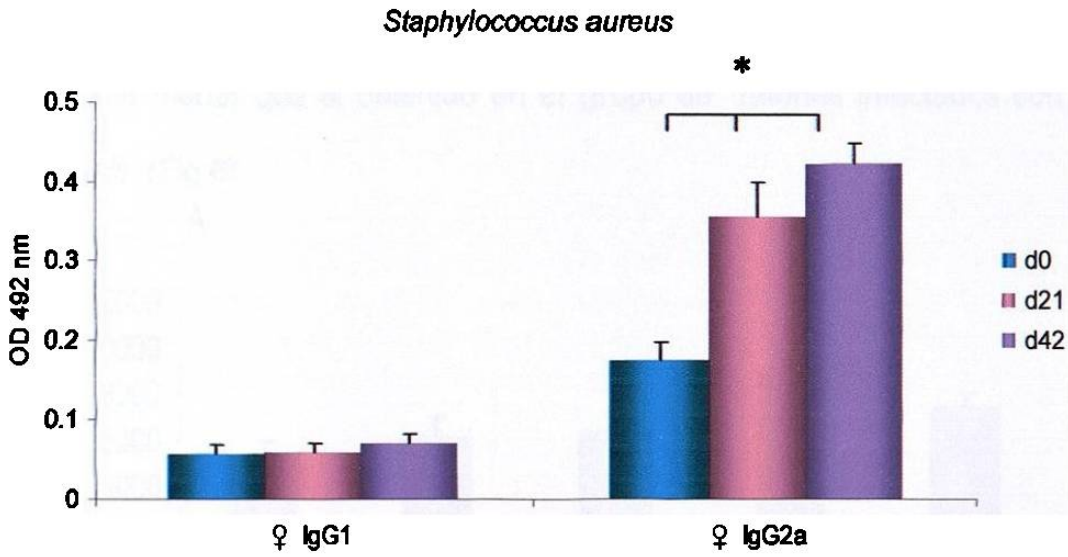

Fig 5. Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en ratones MRL/*lpr* infectados con *Staphylococcus aureus* Ratones de 12 semanas de edad fueron infectados vía subcutánea con 1 x 10^8 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* Las determinaciones se realizaron con el suero de los días 0, 21 y 42 posteriores al tratamiento. Un * indica valores que muestran diferencia significativa en comparación con el día 0 (al inicio del experimento) ($P < 0.05$)

3. Determinación de IFN-γ en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos. Se observó un incremento en la concentración de IFN-γ en todos los grupos de ratones (P< 0.0001), en comparación con el grupo control (5480 pg/ml), aunque si bien la concentración más alta, 9170 pg/ml, la obtuvo el grupo de ratones infectados con *Staphylococcus aureus, en* cambio para los infectados con *Nocardia brasiliensis* el valor promedio obtenido fue de 6479 pg/ml. Por otro lado, los valores de IFN-γ obtenidos en los ratones infectados con los helmintos *Heligmosomoides poligyrus* y *Nippostrongylus brasiliensis* fueron 7987 y 7470 pg/ml respectivamente. Para el grupo de ratones tratados con ACF el valor obtenido de 6261 pg/ml fue ligeramente menor que el obtenido en el grupo de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis.* (Fig 6)

A

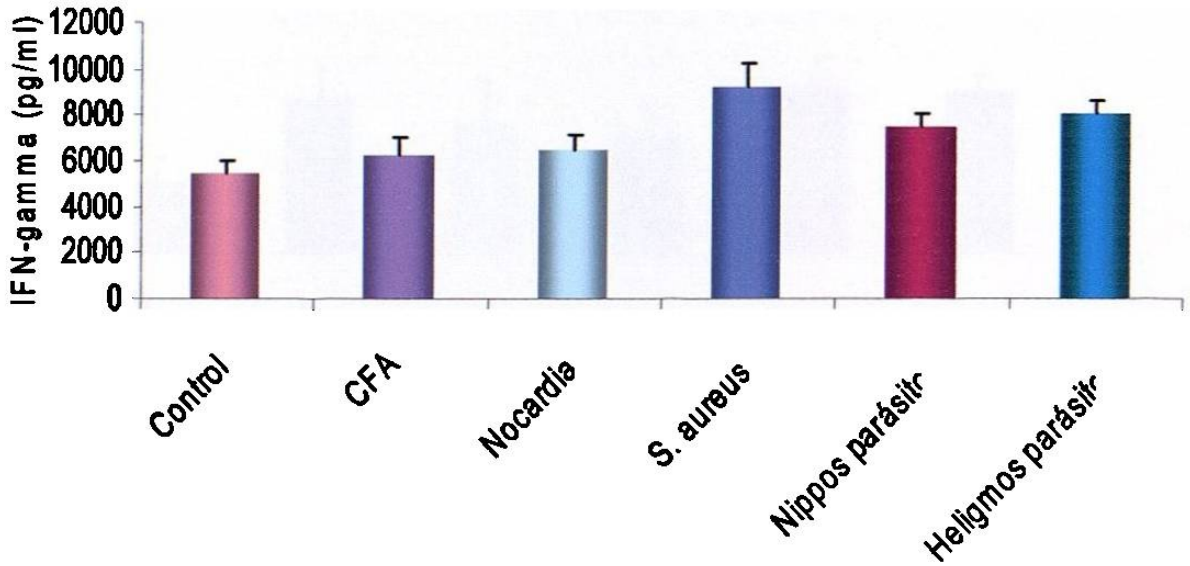

Fig 6. Determinación de IFN-γ en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos. La determinación de citocinas se realizó por una prueba de ELISA en el suero de ratones infectados con bacterias o helmintos y en los controles. Cada gráfica representa el promedio (± SE) de al menos 10 ratones. Todos los grupos muestran valores con diferencia significativa en comparación con el control negativo (P< 0.05)

4. Determinación de IL-4 en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos.

Por otro lado, la concentración de IL-4 sérica aumentó significativamente en todos los grupos de ratones en comparación con los ratones control (P<0.0001). Sin embargo, las concentraciones mas elevadas de IL-4 se produjeron en los grupos de ratones infectados con los parásitos *H.p.* y *Nippos,* 492 y 501 pg/ml respectivamente en comparación con el grupo control (223 pg/ml); y 470 pg/ml para el grupo de ratones inyectados (inmunizados) con ACF. Sin embargo los grupos de ratones infectados con las bacterias *Nocardia brasiliensis* y *Staphylococcus aureus* indujeron una menor producción de IL-4, 392 y 357 pg/ml respectivamente (Fig. 7)

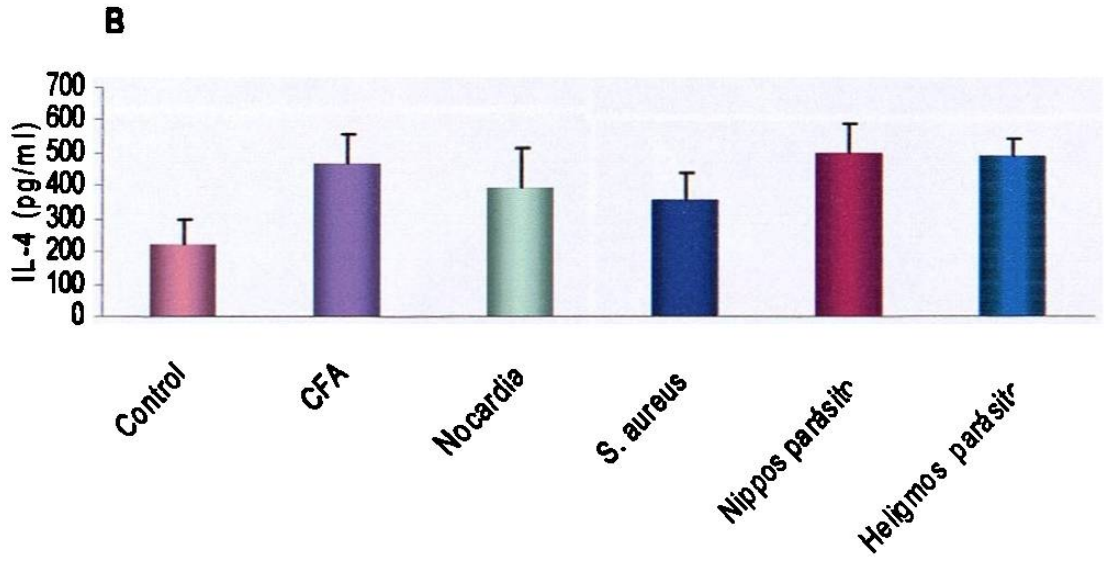

Fig 7. Determinación de IL-4 en ratones MRL/*lpr* infectados con bacterias o helmintos. La determinación de citocinas se realizó por una prueba de ELISA en el suero de ratones infectados con bacterias o helmintos y en los controles. Cada gráfica representa el promedio (± SE) de al menos 10 ratones. Todos los grupos muestran valores con diferencia significativa en comparación con el control negativo (P± 0.05)