**7.2.- Transferencia Pasiva de suero hiperinmune obtenidos a tiempos cortos de inmunización con antígenos particulados de *N. brasiliensis* y dados antes de la infección.**

Sin embargo aquellos ratones que recibieron suero hiperinmune obtenidos de ratones inmunizados con antígenos particulados y sangrados en el día 15 y transferidos a otros grupos de ratones. Los resultados mostraron **protección parcial** en todos los animales ya que en todos se observó que la inflamación iba en aumento por lo menos hasta los 60 días que se estuvieron evaluando **(Figura 20)**

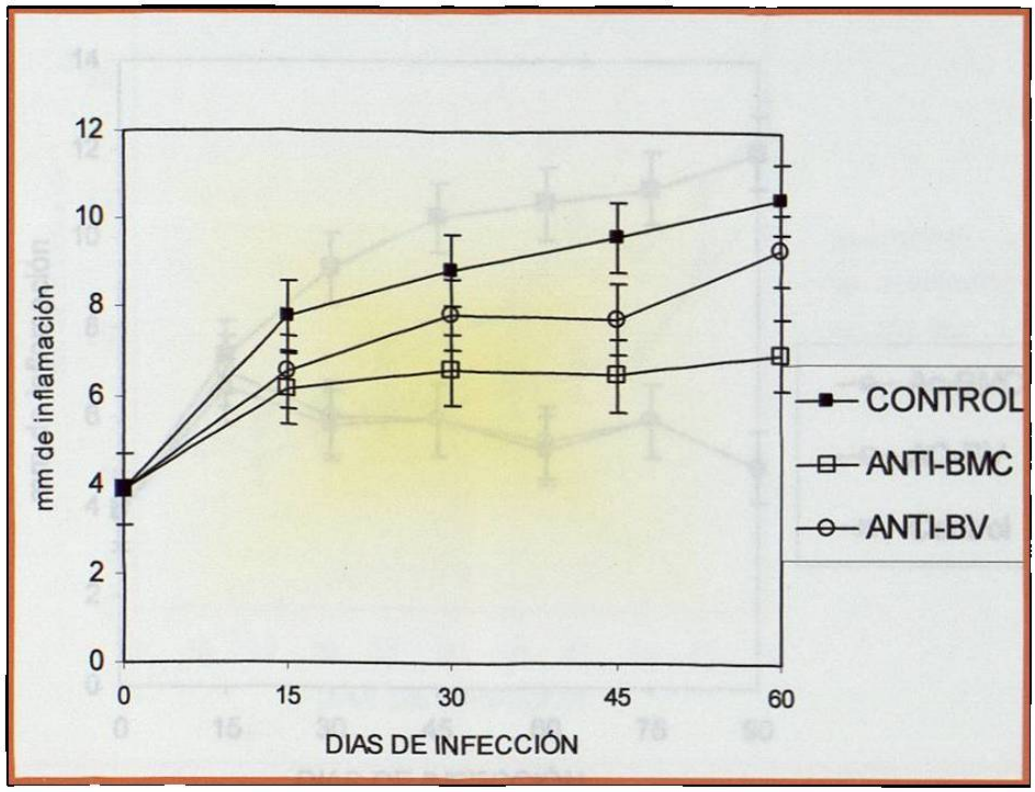


**Figura 20.**-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados y obtenidos en el **día 15** y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

Posteriormente realizamos otros experimentos de transferencia pasiva de suero hiperinmune obtenido en el día 7 post-inmunización contra antígenos particulados y luego fueron infectados con *N. brasiliensis* viva (**Figura 21**), los resultados mostraron que hubo protección total ya que ninguno de los ratones por lo menos hasta el día 90 desarrollaron micetoma. Sin embargo los ratones que recibieron el suero obtenido del día 3 (**figura 22**) ninguno quedo protegido ya que todos desarollaron micetoma.

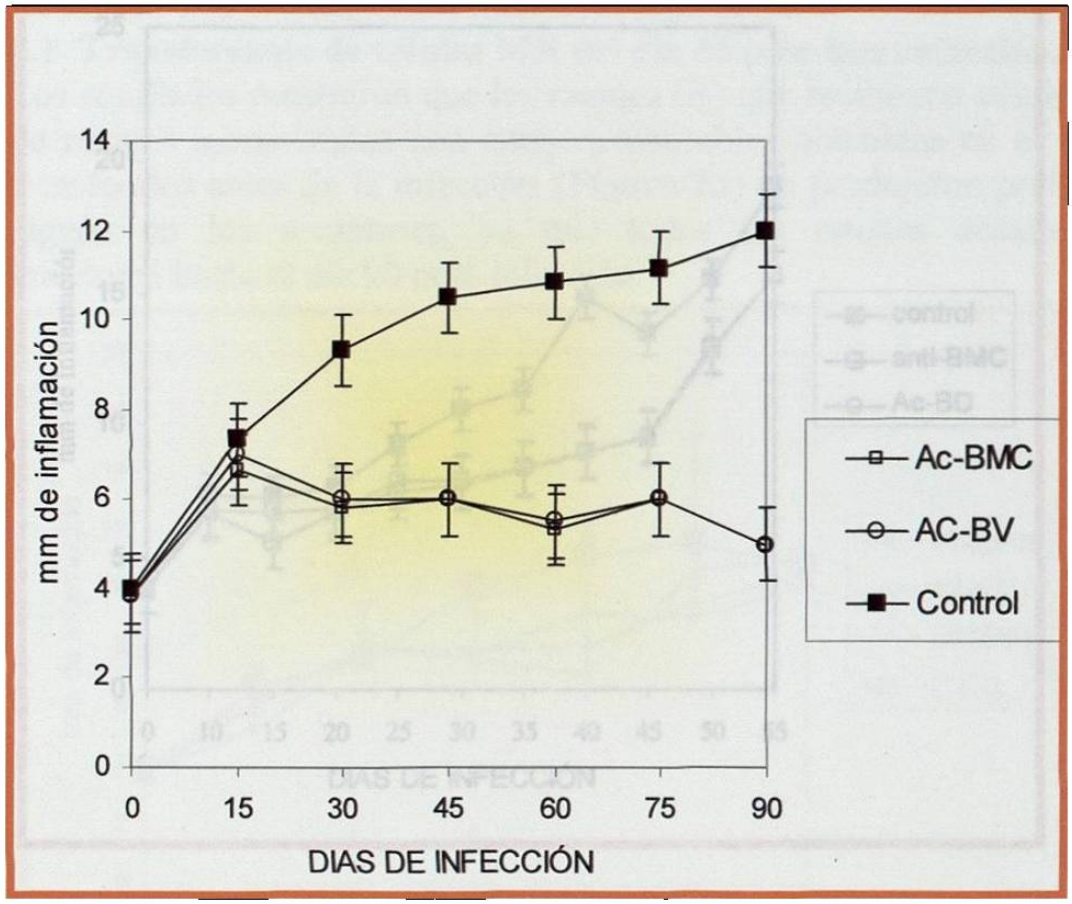


**Figura 21.**-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados y obtenido en el **día 7** y dado a ratones BALB/c **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

Sin embargo los ratones que recibieron el suero obtenido del día 3 (**figura 22**) ninguno quedo protegido ya que todos desarollaron micetoma.

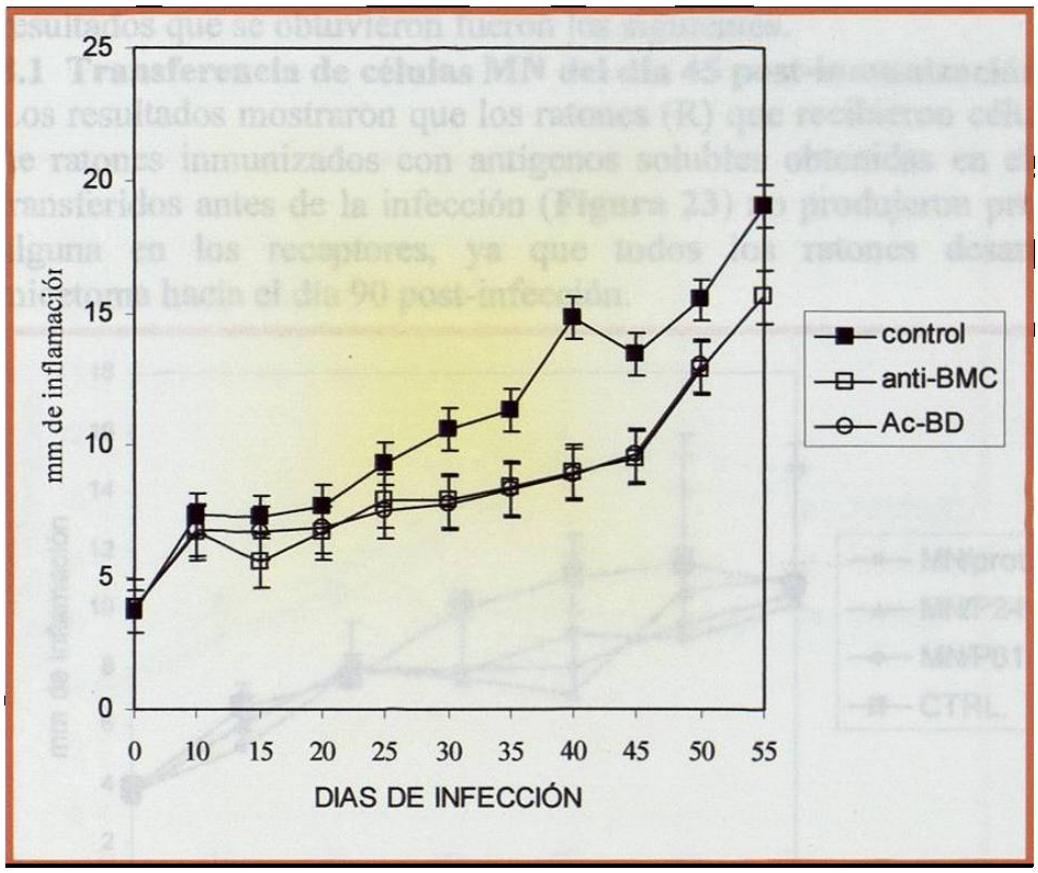


**Figura 22.**-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el **día 3** y dado a ratones BALB/c **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

**8.- Transferencia pasiva de células mononucleares obtenidas del bazo de ratones inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis***

En base a los resultados obtenidos del efecto protector en los experimentos de inmunización activa con antígenos de *N. brasiliensis* en el día 15 asi como en los experimentos de transferencia pasiva de suero hiperinmune del día 7 se realizaron experimentos de transferencia pasiva de células MN de bazo obtenidas a diferentes tiempos e inyectadas via IP a otros ratones los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes.

**8.1 Transferencia de células MN del dia 45 post-inmunización.**

Los resultados mostraron que los ratones (R) que recibieron células MN de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidas en el día 45 transferidos antes de la infección (**Figura 23**) no produjeron protección alguna en los receptores, ya que todos los ratones desarrollaron micetoma hacia el día 90 post-infección.

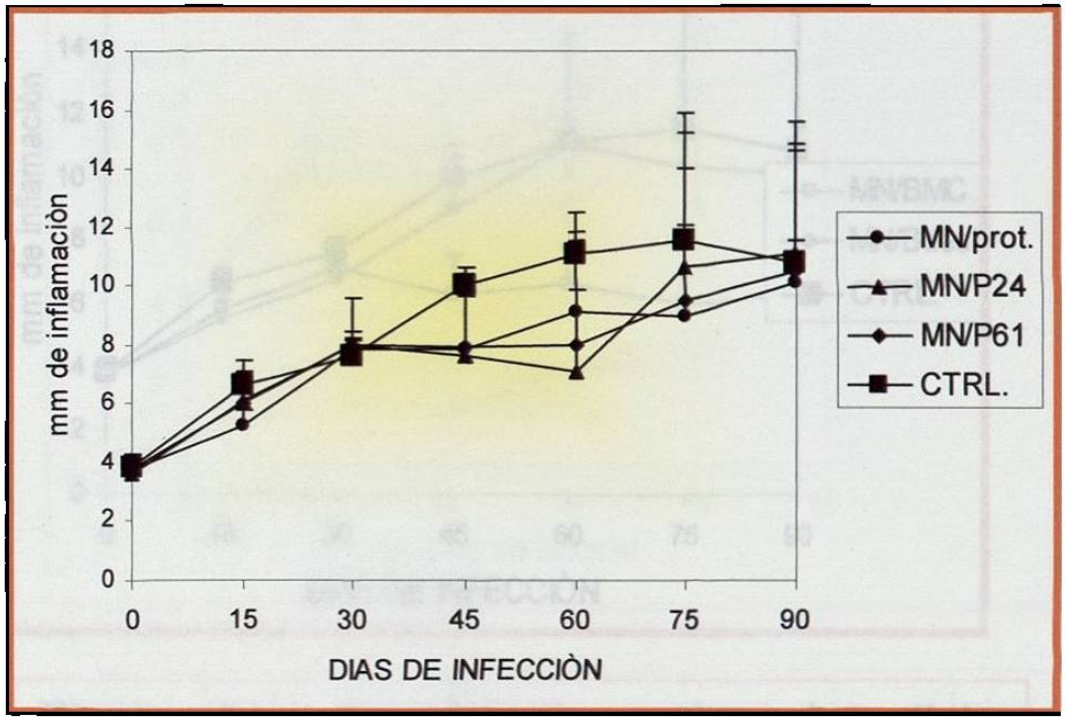


**Figura 23.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el **día 45** y dado a ratones BALB/c (receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

Sin embargo en los grupo de ratones que recibieron células mononucleares obtenidas en el día 45 a partir de animales inmunizados con antígenos particulados (bacterias deslidizadas y BMC), administrados antes de la infección. Los resultados observados mostraron un efecto protector en los ratones que recibieron células MN obtenidas de animales inmunizados con BMC, mientras que las células MN obtenidas de animales inmunizados con BD no confirieron protección ya que todos los ratones desarrollaron micetoma. (**Figura 24**).

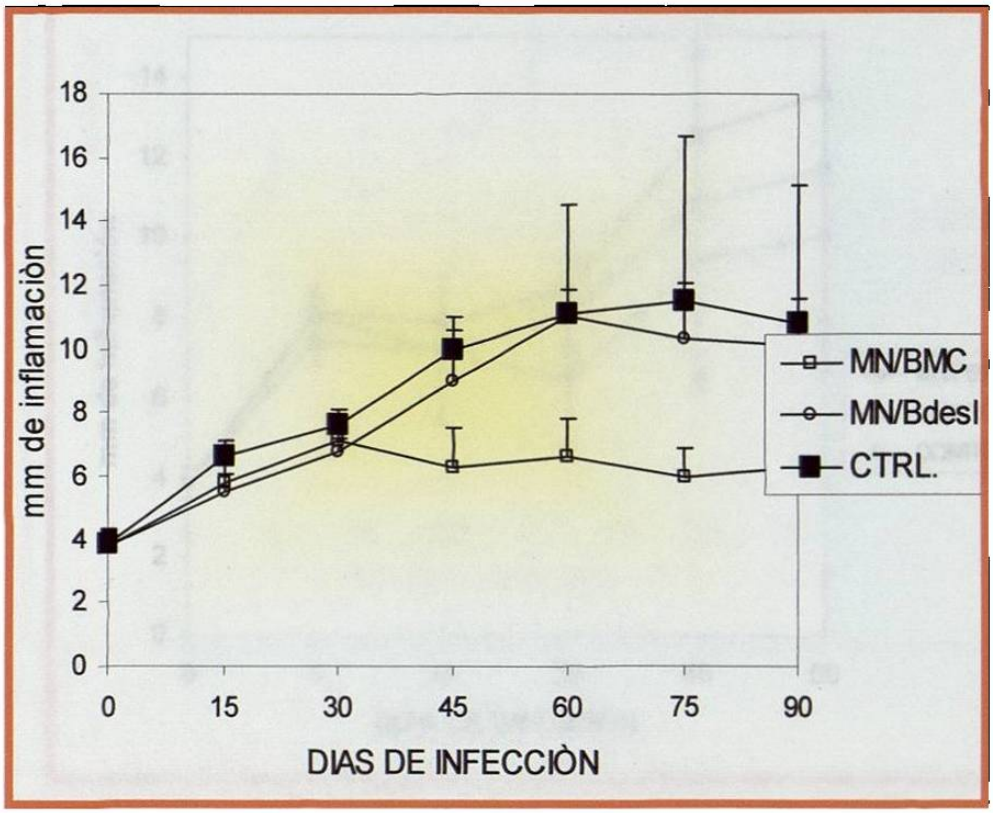


**Figura 24.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidas en el **día 45** y dado a ratones BALB/c (Receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

8.2 **Transferencia de células MN del día 30 post-inmunización**

No se observó protección contra la infección en aquellos ratones que recibieron células MN obtenidas en el día 30 provenientes de ratones inmunizados con antígenos solubles **(Figura 25)** y antígenos particulados (**Figura 26**) de *N. brasiliensis*.

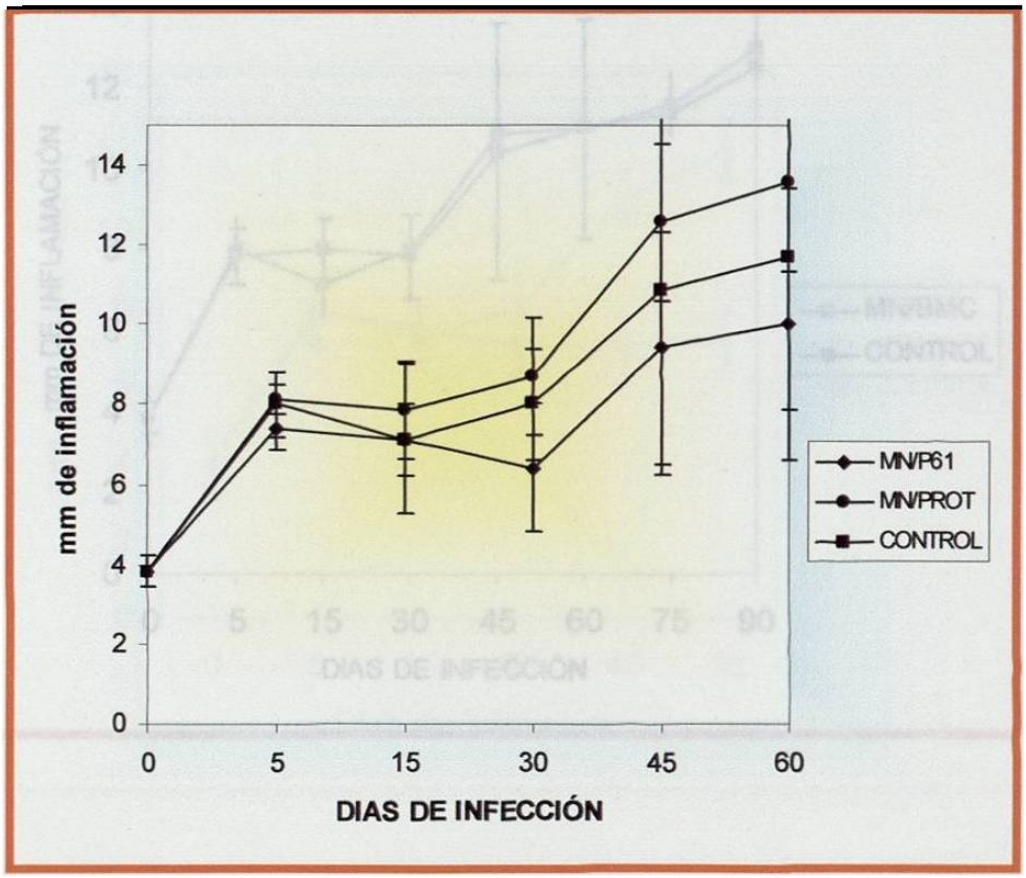


**Figura 25.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el **día 30** y dado a ratones BALB/c (receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

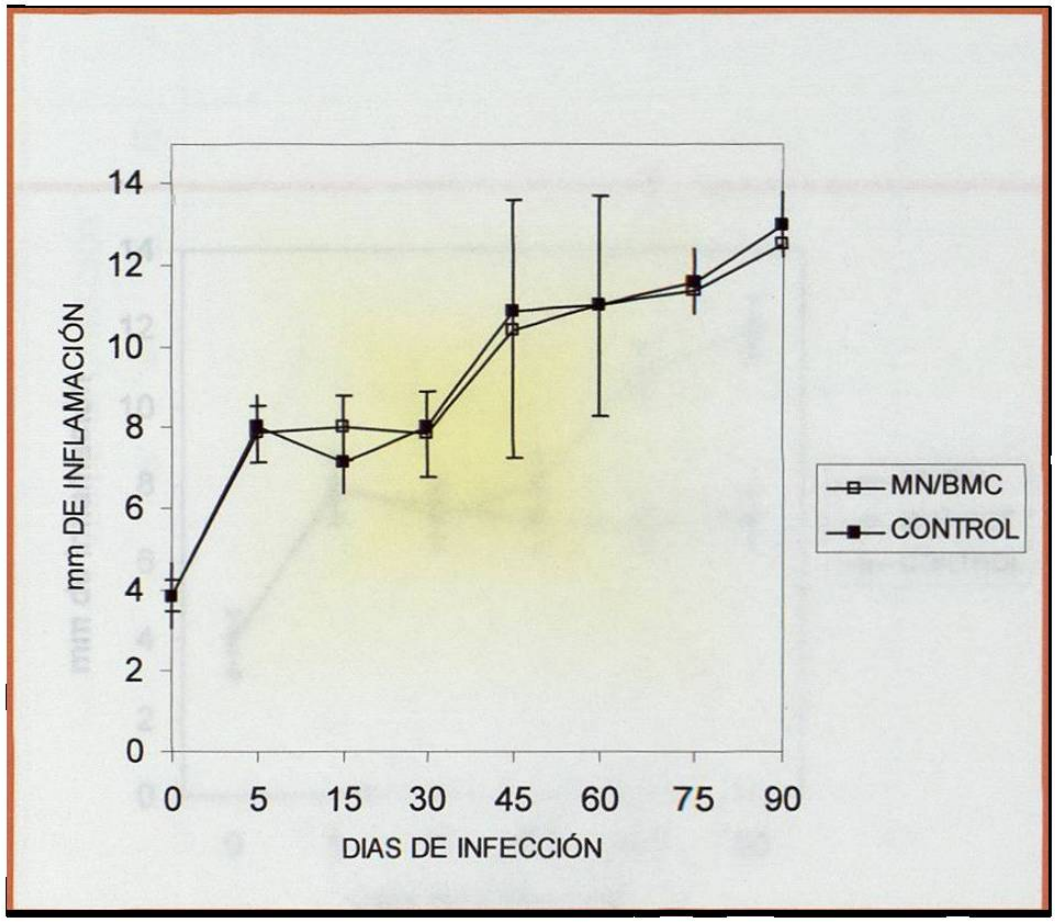


**Figura 26.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el **día 30** y dado a ratones BALB/c (receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

8.3 **Transferencia de células MN del día 15 post-inmunización.**
En las **figuras 27 y 28** se muestran los resultados obtenidos de los ratones que fueron infectados pero habían recibido vía IP las células MN obtenidas en el día 15 post-inmunización. Los resultados mostraron protección total en cuanto al establecimiento de la infección en todos los grupos de ratones.

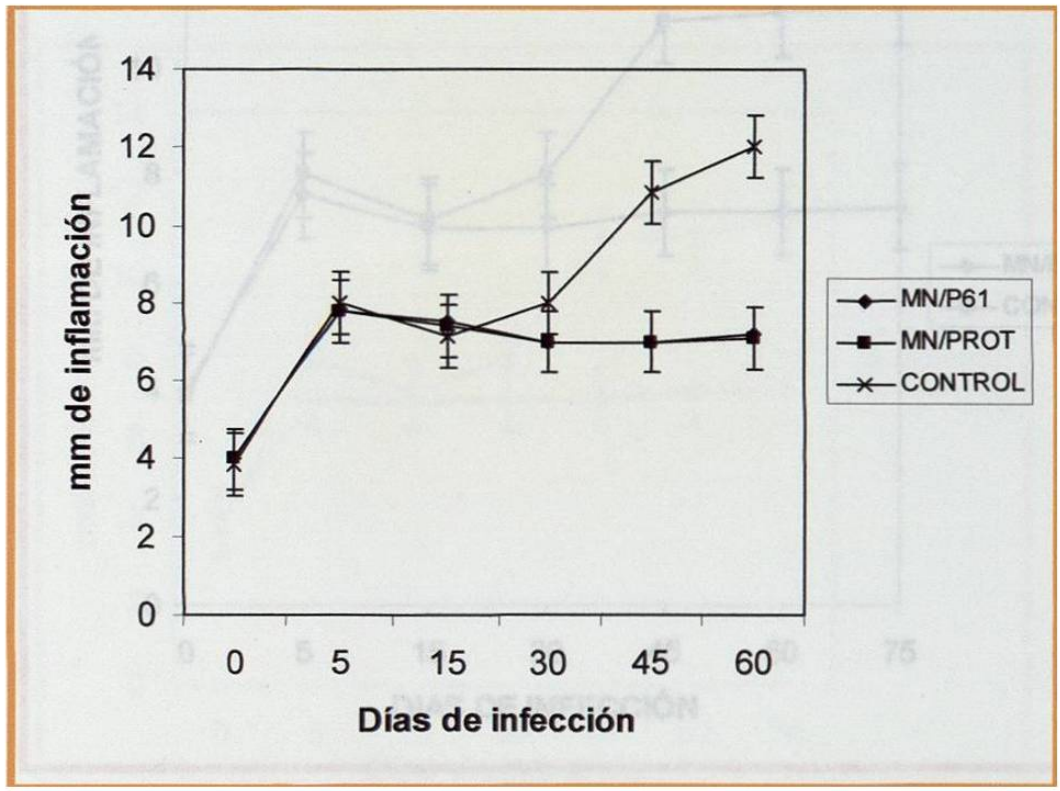


**Figura 27.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el **día 15** y dado a ratones BALB/c (receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

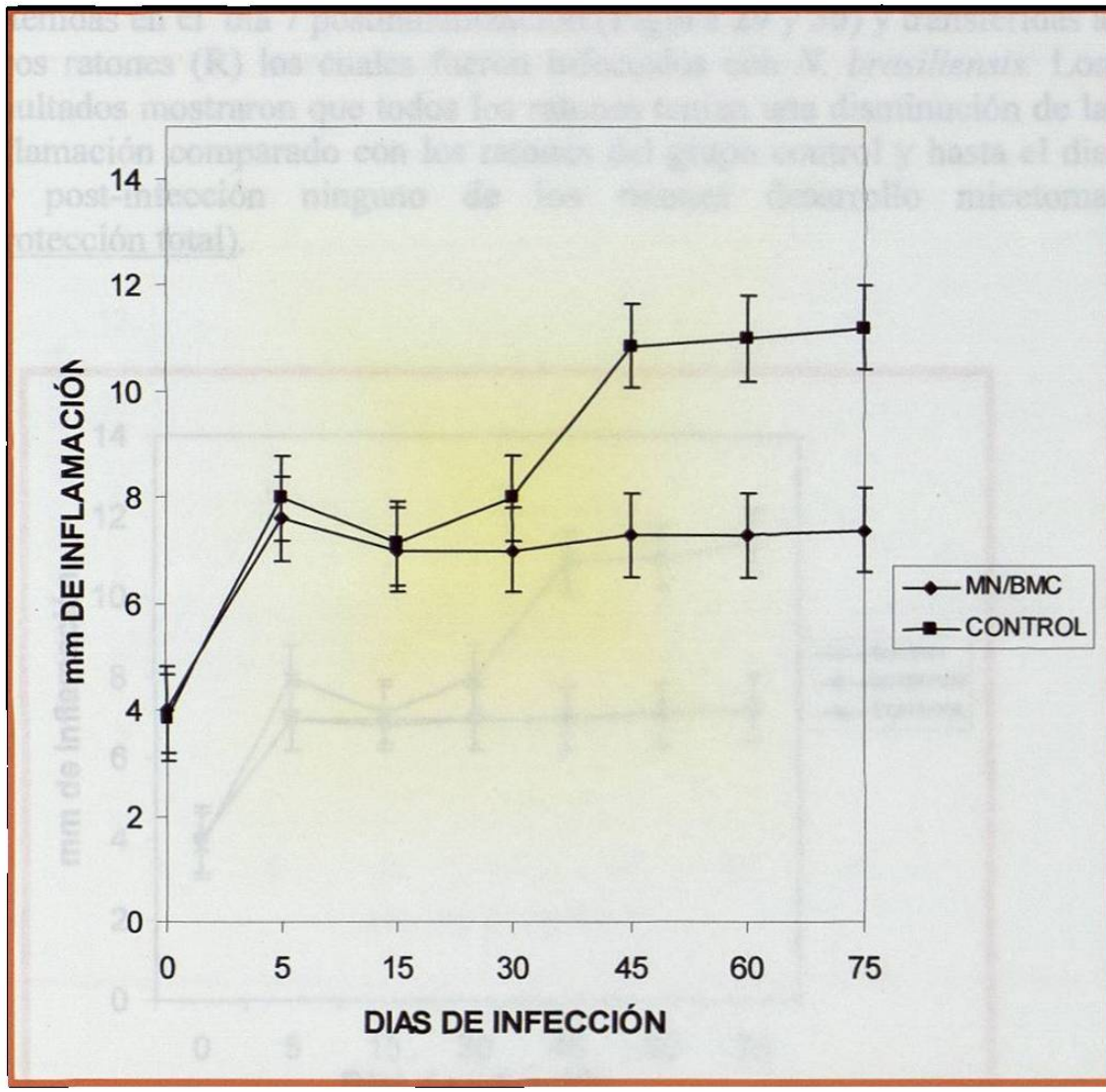


**Figura 28.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el **día 15** y dado a ratones BALB/c (Receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

**8.4 Transferencia de células MN del dia 7 post-inmunización**

Finalmente los experimentos de transferencia pasiva de células MN obtenidas en el día 7 postinmunización.(**Figura 29** y **30**) y transferidas a otros ratones (R) los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis.* Los resultados mostraron que todos los ratones tenian una disminución de la inflamación comparado con los ratones del grupo control y hasta el dia 75 post-infección ninguno de los ratones desarrollo micetoma (protección total).

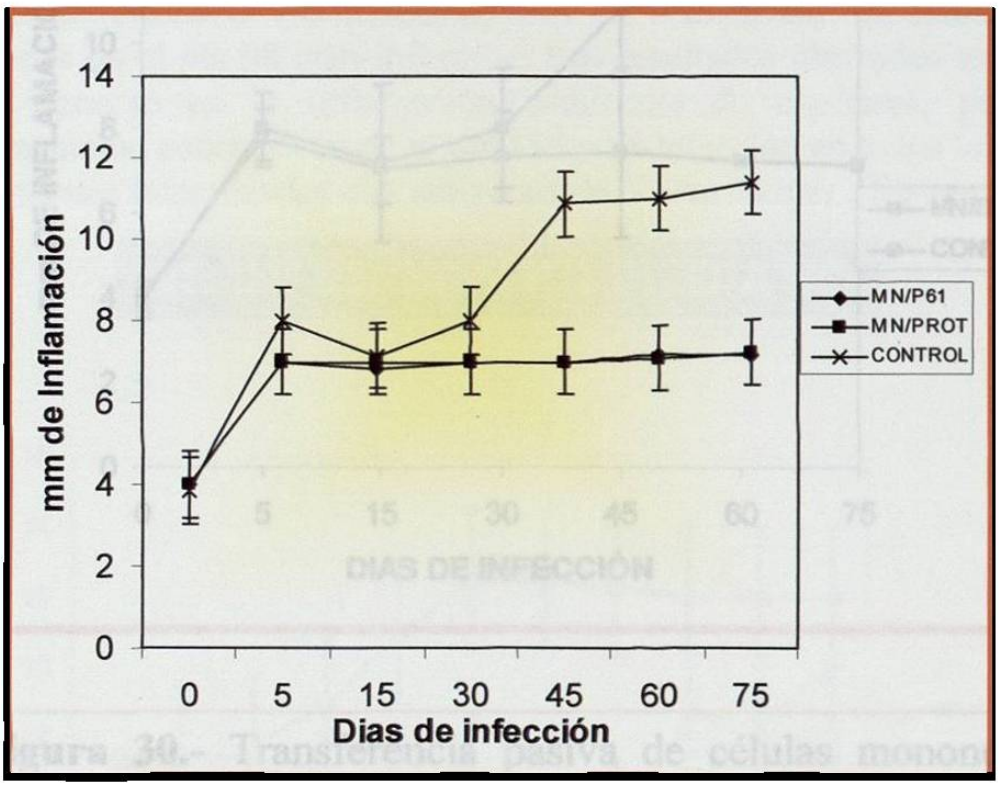


**Figura 29.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el **día 7 y** dado a ratones BALB/c (receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

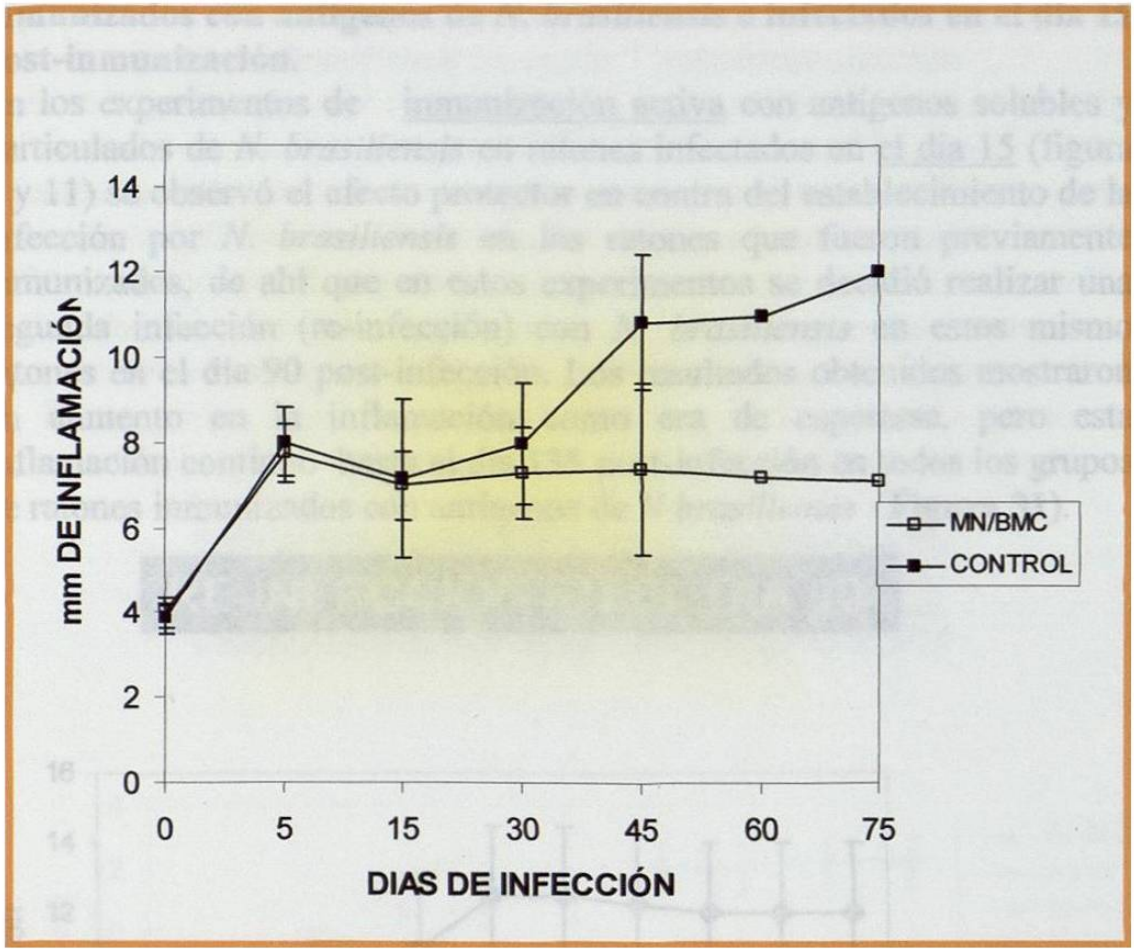


**Figura 30.-** Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el **día 7** y dado a ratones BALB/c (receptores) **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

**9.- Re-infección con *N. brasiliensis* a diferentes tiempos post-infección.**

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

En los experimentos de inmunización activa con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* en ratones infectados en el dia 15 (figura 7 y 11) se observó el efecto protector en contra del establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* en los ratones que fueron previamente inmunizados, de ahí que en estos experimentos se decidió realizar una segunda infección (re-infección) con *N. brasiliensis* en estos mismo ratones en el día 90 post-infección. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la inflamación como era de esperarse, pero esta inflamación continuó hasta el día 135 post-infección en todos los grupos de ratones inmunizados con antígenos de *N brasiliensis* .(**Figura 31**).

**RE-INFECCIÓN EN EL DÍA 90**

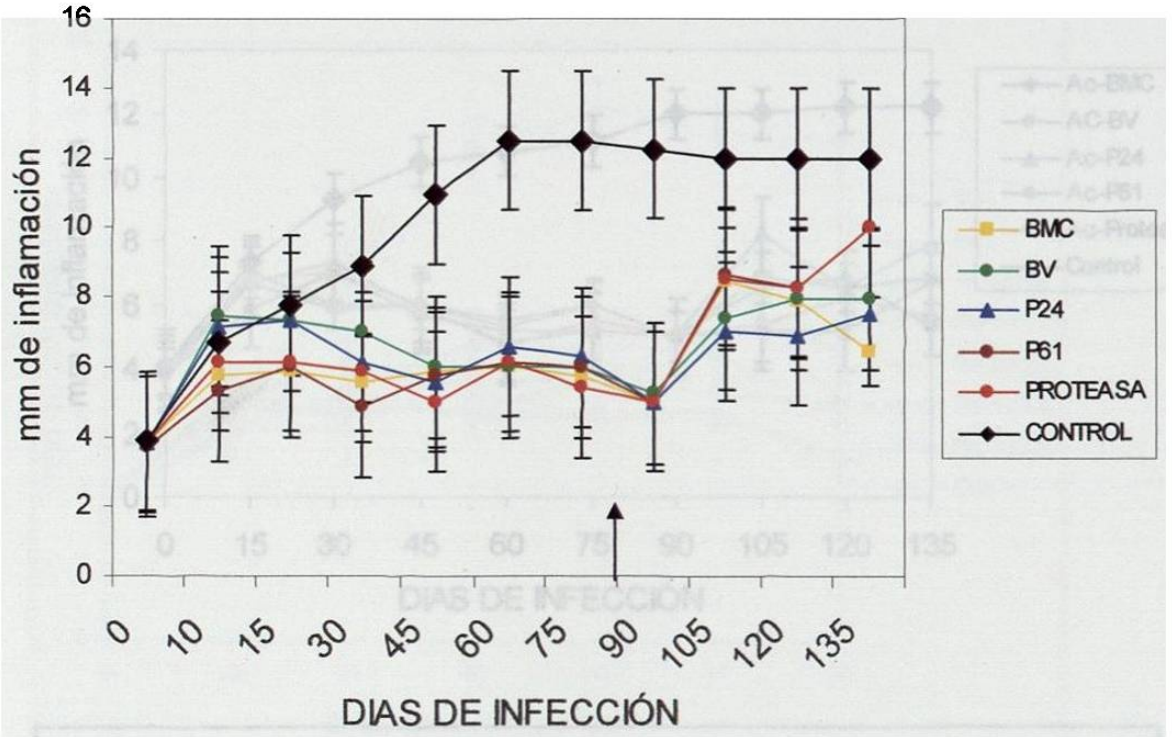


**Figura 31** .-Efecto de la **re-infección a los 90 días post-infección** en los experimentos de inmunización activa con antígenos solubles y particulados en ratones BALB/c e infectados en el día 15 post-inmunización.

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

Los resultados que se obtuvieron en estos experimentos mostraron inflamación en los grupos que recibieron suero anti-P24, BV y BMC, mientras que los grupos de ratones que recibieron suero anti-P61 y anti-proteasa la inflamación observada fue muy poca, sin embargo en el dia 135 post-infección la mayoría de los grupos mostraron poca inflamación de modo que podemos sugerir que los ratones que habian recibido previamente el suero anti- antígenos de *N. brasiliensis* obtenido del día 7 en forma pasiva previno el establecimiento de la infección en forma temporal.

**RE-INFECCIÓN EN EL DIA 90**

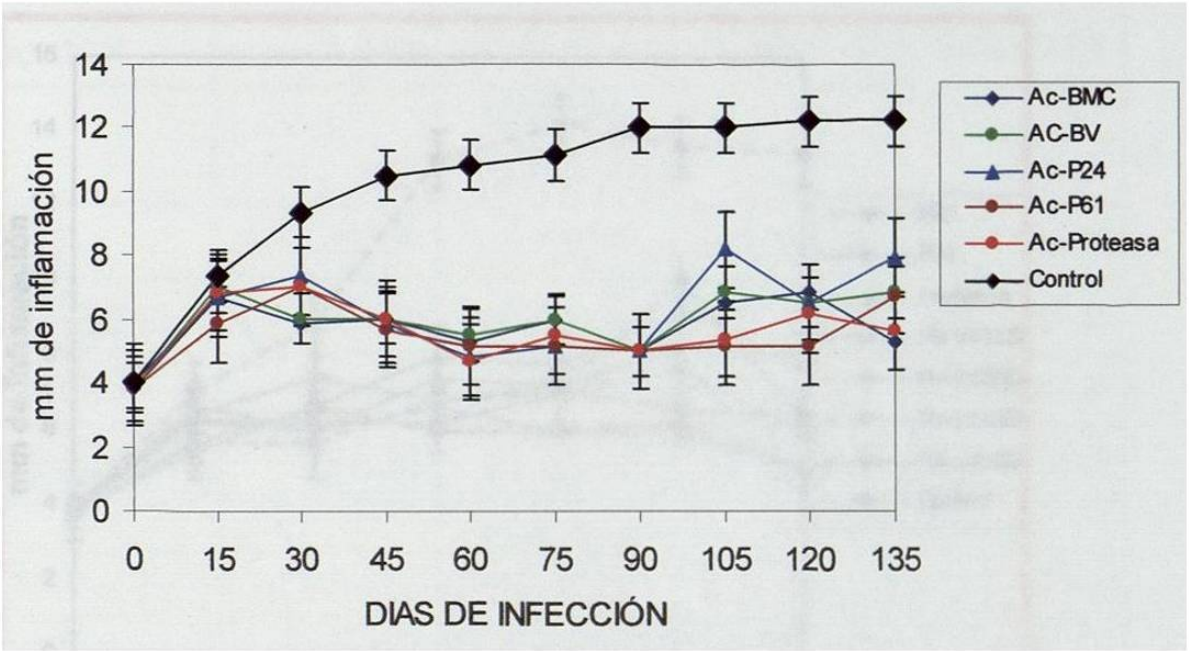


**Figura 32.-** Efecto de la **re-infección a los 90 días post- infección** en los experimentos de nmunización Pasiva con suero hiperinmune hacia antigenos solubles y particulados obtenido en el día 7 y transferidos a otros ratones los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*

**9.2.- Re-inmunización a diferentes tiempos en ratones inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N brasiliensis* e infectados en el dia en el dia 15.**

En base a los resultados obtenidos de reinfección del dia 90 se decidió realizar re-infecciones a tiempos cortos (15,30,45 y 60 dias post-infección) En este experimento los ratones después de haberlos inmunizados con antígenos solubles se re-infectaron en el día 17 y cada 15 días se re-infectaban de modo que terminamos con 3 grupos de animales inmunizados e infectados en el día 15, 1grupo de animales inmunizados y re-infectados en el día 15, 1 gpo. Animales inmunizados y Re-infectados en el día 30, 1 gpo. de inmunizados y re-infectados en el día 45 y 1 grupo de animales inmunizados y re-infectados en el día 60 y el grupo control (**Figura 33**). Los resultados mostraron que ninguno de los grupos que fueron infectados asi como los que fueron reinfectados a diferentes tiempos desarrollaron micetoma. Estos refirma que efectivamente la respuesta Inmune humoral temprana dada principalmente por IgM podría determinar la protección en contra de la infección en este modelo experimental de micetoma.

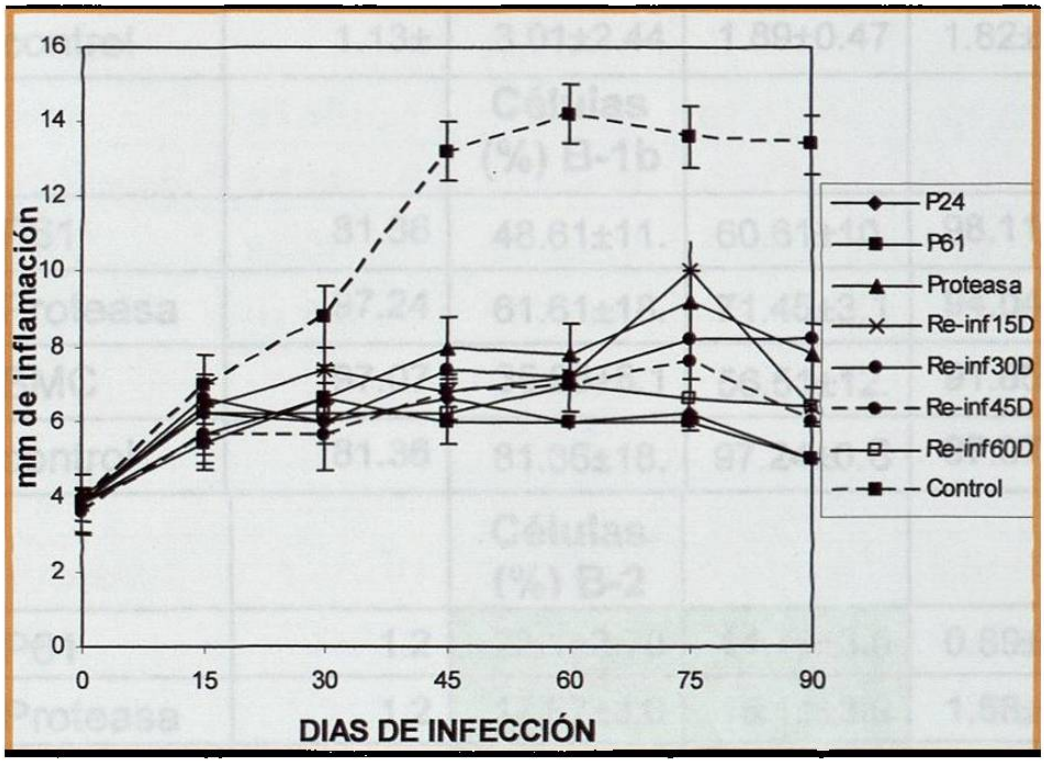


**Figura 33.- Inmunización activa con antígenos solubles e infección con *N brasiliensis* a los 7 días y re-infecciones con *N. brasiliensis* a diferentes tiempos 15,30,45,60 dias post-infección).**

**10.- Análisis de las subpoblaciones de células B-1a, B-1b y B-2 en células de cavidad peritoneal, obtenidas a diferentes tiempos de inmunización con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* (7, 15 y 30 dias post-inmunización) mediante Citometría de flujo.**

Los resultados mostrados en la **tabla 5** en cel. De cavidad peritoneal un aumento del % de las células B1a y B-2 en los días 7 y 15, mientras que se observó una disminución de las células B-1b en los mismos días.

## Tabla 5.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células de cavidad peritoneal por citometría de flujo

| ANTÍGENO | Dìa 0 | **Células (%) B-1a** Dìa 7 | Día 15 CAV. PERITONEAL | Dìa 30 |
|---|---|---|---|---|
| P61 | 3.17± | 29.28±9.4 | 24.59±9.9 | 0.91±0.01 |
| Proteasa | 1.13 | 20.71±12. | 13.43±1.7 | 4.33±0.01 |
| BMC | 1.82± | 44.18±10. | 30.52±8.9 | 5.67±0.02 |
| control | 1.13± | 3.01±2.44 | 1.89±0.47 | 1.82±0.65 |
| | | **Células (%) B-1b** | | |
| P61 | 81.36 | 48.61±11. | 60.61±10. | 98.11±0.1 |
| Proteasa | 97.24 | 61.61±18. | 71.45±3.1 | 94.04±0.0 |
| BMC | 97.07 | 35.28±8.1 | 56.51±12. | 91.65±0.4 |
| control | 81.36 | 81.36±18. | 97.24±0.8 | 97.07±1.0 |
| | | **Células (%) B-2** | | |
| P61 | 1.2 | 22.1±2.70 | 14.79±3.5 | 0.89±0.01 |
| Proteasa | 1.2 | 17.67±8.0 | 15.11±3.9 | 1.58±0.02 |
| BMC | 1.1 | 20.52±6.0 | 12.95±5.1 | 2.38±0.01 |
| control | 1.1 | 6.61±1.0 | 1.2±0.30 | 1.1±0.38 |

**10.1.- Análisis de las células B-1a , B-1b y B-2 en células esplénicas a diferentes tiempos de inmnización.**

**En** la tabla 6 se muestran los resultados del analisis de las células de bazo a diferentes tiempos de inmunización y los resultados mostraron un aumento de las células B1a y B-2 en los 3 grupos analizados en los días 7 y 15 post-inmunización, mientras que se observó una disminución del % de las células B1b en los mismos días.

**Tabla 6.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células esplénicas por citometría de flujo.**

| ANTÍGENO | | Células (%) B-1a | BAZO | |
|---|---|---|---|---|
| | Dìa 0 | Dìa 7 | Día 15 | Dìa 30 |
| P61 | 3.17±1.78 | 24.55±1 | 16.34±8.7 | 1.34±0.03 |
| Proteasa | 1.13±0.02 | 30.76±1 | 43.70±5.7 | 1.21±0.01 |
| BMC | 1.82±0.03 | 38.22±25. | 28.67±16. | 2.31±0.01 |
| control | 1.13±0.01 | 2.42±2.60 | 1.08±0.28 | 1.13±0.39 |
| | | Células (%) B-1b | | |
| P61 | 81.36±2.5 | 61.04±22. | 67.97±14. | 95.05±0. |
| Proteasa | 97.24±2.6 | 46.65±16. | 37.77±5.8 | 94.18±0.0 |
| BMC | 97.07±5.6 | 40.83±17. | 58.67±12. | 93.47±0.5 |
| control | 81.36±2.7 | 91.70±8.4 | 96.29±1.6 | 95.82±2.1 |
| | | Células (%) B-2 | | |
| P61 | 1.2±0.03 | 14.39±8.3 | 14.79±3.5 | 3.54±0.03 |
| Proteasa | 1.2±0.01 | 22.58±3.1 | 18.51±1.5 | 4.51±0.01 |
| BMC | 1.1±0.02 | 20.94±7.9 | 12.64±9.7 | 4.24±0.04 |
| control | 1.1±0.0 | 5.87±1.96 | 3.02±1.61 | 3.04±2.28 |

**10.2.-. Análisis de las células B-1a , B-1b y B-2 en el día 30 post-inmunización en diferentes poblaciones celulares.**

En la **tabla** 7 se muestran los resultados de las 3 subpoblaciones de células B presentes en células sanguíneas donde se puede observar un aumento de las células B1a y B-2 en los días 7 y 15 post-inmunización y una disminución de las células B1b en los días 7 y 15.

**Tabla 7.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células sanguíneas por citometría de flujo.**

| ANTÍGENO | | Células (%) B-1a | SANGRE P. | |
|---|---|---|---|---|
| | Dìa 0 | Dìa 7 | Día 15 | Dìa 30 |
| P61 | 3.17±1.70 | 22.35±5. | 19.16±8. | 7.42±0.02 |
| Proteasa | 1.13±0.01 | 29.57±4. | 25.76±2. | 2.61±0.01 |
| BMC | 1.82±0.02 | 32.32±6. | 22.80±12. | 6.63±0.02 |
| control | 1.13±0.01 | 2.77±1.62 | 3.30±1.28 | 3.17±1.73 |
| | | Células (%) B-1b | | |
| P61 | 81.3±0.1 | 55.60±11. | 66.46±13 | 65.57±0.1 |
| Proteasa | 97.24±1. | 55.48±6.1 | 46.86±12 | 87.4±0.11 |
| BMC | 97.07±2. | 50.00±6.8 | 66.14±13 | 87.42±0.1 |
| control | 81.36±2. | 74.71±20. | 90.92±1. | 91.52±2. |
| | | Células (%) B-2 | | |
| P61 | 1.2±0.01 | 22.36±3.5 | 14.40±6. | 26.55±0. |
| Proteasa | 1.2±0.01 | 14.94±1.7 | 24.97±10 | 9.87±0.02 |
| BMC | 1.1±0.05 | 17.67±4.4 | 10.45±4. | 5.73±0.01 |
| control | 1.1±0.06 | 6.08±3.11 | 5.38±1.41 | 5.3±1.92 |

# DISCUSIÓN

Las infecciones por microoganismos intracelulares constituyen un problema muy importante de salud pública en muchos países entre ellos México.

La respuesta inmune en las infecciones por microoganismos intracelulares es una serie de eventos biológicos que depende de varios factores tanto del agente infeccioso como del hospedero (18). Sabemos por estudios realizados anteriormente y específicamente con *N. brasiliensis* (122) que la dosis del antígeno y su naturaleza química o presentación modula la intensidad de la respuesta inmune. Por mucho tiempo se ha aceptado que la respuesta inmune celular juega un papel importante en la protección en contra de las infecciones por microganismos intracelulares (88,89), mientras que la respuesta inmune humoral dada por los anticuerpos al parecer no juega un papel imporante en la protección (90,92), incluso hay quienes llegaron a aseverar que más que ayudar agravan las lesiones(99). Tales resultados sugirieron la poca participación de las células B en la infección por este microorganismo. Los resultados presentados en este trabajo demuestran claramente que la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización activa y pasiva utilizando antígenos de *N. brasiliensis* (solubles y particulados) fueron capaces de prevenir el establecimento de

la infección por *N. brasiliensis*. Nuestros resultados difieren de aquellos reportados por Blander y Horwitz donde publicaron sus hallazgos de protección inmune inducida por imunización activa con proteínas extracelulares (MSP) de *Legionella pneumophila* (104). Horwitz y cols. (46) extendieron sus observaciones a un modelo animal de infección con *M. tuberculosis* y propusieron que la inmunización con proteínas EC es capaz de inducir protección contra esta enfermedad. Resultados similares se observaron con *Leishmania donovani* (101,106), así como con *C. albicans* específicamente con la proteina P43 la cual mediante la inmunización se logró prevenir la candidiasis sistémica en ratones BALB/c. En los experimentos de inmunización activa con la proteína inmunodominante P24 de *N. brasiliensis* la cual no se secreta al medio de cultivo (IC) al igual que la proteasa la cual se secreta en cantidades abundantes al medio de cultivo (extracelular) (120) ambas fueron igual de eficientes para inducir protección cuando los animales fueron infectados tanto en el dia 45 como en el dia 15 post-inmunización lo cual es contrario a lo que se había dicho que solamente las proteínas extracelulares de los microorganismos intracelulares confieren protección (105). Aunque existen estudios similares de transferencia pasiva de suero hiperinmune con títulos altos de IgG anti-Nocardia no fueron capaces de conferir protección (112), dichos resultados