



ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
EN EL ESTABLECIMIENTO Y RESOLUCION
DE LA INFECCION EXPERIMENTAL POR
NOCARDIA BRASILIENSIS EN RATONES

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

PRESENTA:

ERNESTO TORRES LOPEZ

MONTERREY, N. L. FEBRERO DE 1996



**Estudio de la Respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución de la
infección experimental por *Nocardia brasiliensis* en ratones**

Por

Ernesto Torres López

Tesis presentada a la

Facultad de Medicina

de la

Universidad Autónoma de Nuevo León

como requisito parcial para

la obtención del grado de

Maestro en Ciencias

con Especialidad en Inmunología

Monterrey, N.L. Febrero de 1995.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN EL ESTABLECIMIENTO
Y RESOLUCION DEL MICETOMA EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis*
EN RATONES

Presentado por : ERNESTO TORRES LOPEZ



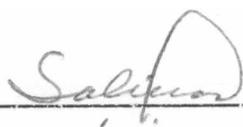
Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona . Apoyado parcialmente por CONACYT.

COMISION DE TESIS

NOMBRE

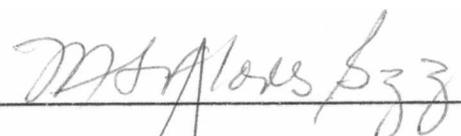
FIRMA

Dr. Mario César Salinas Carmona



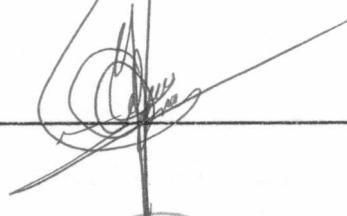
A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Salinas', written above a horizontal line.

Dra. María del Socorro Flores de Castañeda



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'M. Flores', written above a horizontal line.

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Alma Arce', written above a horizontal line.

Dr. Gerardo Velazco Castañón



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Gerardo Velazco', written above a horizontal line.

Dra. Nohemi Waksman de Torres

DEDICATORIA

El tiempo, esfuerzo y empeño que desborde en la realización de este trabajo, se lo brindo con todo amor a la Sra. Carmen Degollado Vda. de López. Por haberme enseñado el valor del trabajo, la constancia y su responsabilidad.

Gracias Abuelita

AG RADECIM LENTOS

A Dios nuestro Señor:

Por darme la oportunidad de seguir este camino y poder terminar en vida este anhelo.

A mis Padres:

Sr. Juan Torres Garnica y Sra. María Elena López Degollado, en memoria a ellos que siguieron el llamado de Dios, les doy las gracias por haber generado con su infinito amor mi existencia.

A mi abuelita:

Sra. Carmen Degollado Vda. de López por ser para mi el ejemplo universal de un ser humano lleno de experiencia y sabiduría.

A mis hermanos:

Carmen, Isabel, Carlos, José, Elena, Norma, Luis y Consuelo por ser como son.

A mi amigo:

Juan Pablo López Sánchez quien ha compartido conmigo éxitos y fracasos sin doblegar su amistad.

Al Dr. Mario Cesar Salinas Carmona por su ayuda intelectual y facilitarme el camino para realizar esta tesis.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza por su apoyo y atención brindadas para realizarme en el campo de la inmunología.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda por ser una excelente amiga.

Al Dr. Daniel González Spencer por su fina cooperación en el desarrollo de la sección histopatológica de este trabajo.

Al Dr. Francisco Hernández Battres por su apoyo en la realización de los cortes histológicos para este trabajo.

A todos mis compañeros de trabajo del departamento de Inmunología.

I N D I C E

INDICE DE CUADROS —■

INDICE DE FIGURAS —

INDICE DE TABLAS -----

INTRODUCCION

HIPOTESIS -----

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECIFICOS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS -----

DISCUSION -----

CONCLUSIONES -----

I N D I C E

	Pag-
RESUMEN	92
BIBLIOGRAFIA	94
APENDICE A. (ABREVIATURAS Y SIGNOS)	101
APENDICE B. (MATERIAL Y METODOS)	104

/;k

'**>ü „

< i

ú

z\ 1
:0\i r,
k-1. 'í

•ii

P §r.

INDICE DE CUADROS

dro # 1.- Registro de la evolución clínica del micetoma en ratones del 7-70 día post-infección.

dro # 2.- Registro de la evolución clínica del micetoma en ratones del 80-200 día post-infección.

ro # 3.- Resumen de la evolución clínica del micetoma experimental en ratones.

jiro # 4.- Resultados de los efectos de los sueros hiperinmunes en el establecimiento de la infección experimental en Balb/c

ro # 5.- Resultados de los efectos de los sueros hiperinmunes en la resolución del micetoma experimental en Balb/c

INDICE DE FIGURAS

Contenido	Pag
figura #1.- Cojinete plantar de Balb/c y C57BL/6	41
Figura # 2.- Cojinete plantar de CBA/N y DBA/2	42
figura #3.- Cojinete plantar de F1 (CBA/N X DBA/2) hembra y macho	43
kuia # 4.- Cojinete plantar de Balb/c a los 7 días post-infección	44
Figura # 5.- Cojinete plantar de Balb/c a los 28 días post-infección	45
Figura # 6.- Cojinete plantar de Balb/c a los 45 días post-infección	46
Figura # 7.- Cojinete plantar de Balb/c a los 90 días post-infección	47
Figura # 8.- Electroforesis del extracto proteico de N- <u>brasiliensis</u> , en gel de poliacrilainida, para la determinación de antígenos inmunodominantes.	53
Figura # 9.- Ininunoelectrotransferencia de sueros de ratón Balb/c.	54
Figura #10.- Ininunoelectrotransferencia de sueros de ratón C57BL/6.	55
ura #11.- Ininunoelectrotransferencia de sueros de ratón DBA/2.	56





Contenido	Pag.
figura #12.- Inmunoelectrotransferencia de sueros de ratón CBA/N.	57
figura #13.- Inmunoelectrotransferencia de sueros de ratón F1 (CBA/N X DBA/2).	58
figura #14.- Inmunoelectrotransferencia de sueros de ratón F1 (CBA/N X DBA/2).	59
figura #15.- Resumen y comparación de los W.B. de todos los sueros de los ratones en estudio.	60
figura #16.- Identificación de isotipo por W.B.	62
figura #17.- Electroforesis del extracto proteico de <i>N. brasiliensis</i> , para el aislamiento de los antígenos inmunodominantes.	64
figura #18.- Sección histológica de ratón Balb/c sano.	82
figura #19.- Sección histológica de ratón Balb/c, 7 días post-infección al 40X.	83
figura #20.- Sección histológica de ratón Balb/c, 7 días post-infección al 40X.	84
figura #21.- Sección histológica de ratón Balb/c, 14 días post-infección al 40X.	86

ib -.
U



Contenido

Pag.

Figura #22.- Sección histológica de ratón Balb/c, 25 días post-infección al 40X.

87

Figura #23.- Sección histológica de ratón Balb/c, 90 días post-infección al 10X.

88

#24.- Sección histológica de ratón Balb/c, 90 días post-infección al 40X.

89

Figura #25.- Inmunoelectrotransferencia de sueros hiperinmunes utilizados en transferencia pasiva.

94

i
.*> «*•), di 1 i

Cu, !" 1

1 2 •; r I

i! lí I

1 Sí t á
i M I

1)
ti

•Ál m JI

INDICE DE TABLAS

atenido	Pag.
labia # 1. Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 en ratones Balb/c.	100
labia # 2. Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de ratones C57BL/6.	100
labia # 3. Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de ratones DBA/2.	100
labia # 4. Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de ratones CBA/N.	100
labia # 5. Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de ratones F1 (CBA/NxDBA/2)	100
labia # 6. Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de ratones F1 (CBA/NxDBA/2) <i>cr</i>	100

v|
J I*

■ ' ' i iy⁴

5 i

!



I N T R O D U C C I O N

El Micetoma conocido inicialmente como “pie de Madura” fue encontrado en el Servicio Médico de Madras en la Armada Británica de la India en 1842 (35) ; es una infección crónica *le* la piel con múltiples fistulas exudativas y aspecto tumoral en manos y pies. El Micetoma presenta una amplia distribución en el mundo, encontrándose más frecuentemente en las zonas localizadas entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio.

En Africa se presenta en los países de Sudán, Senegal y Somalia. En Asia ,la India es el país en el cual se ha reportado un alto número de casos (4,5,11 y 13), específicamente en la ciudad de Bombay.

En América se encuentra distribuido principalmente en los países de centroamérica, Colombia, Brasil, Venezuela y México. En nuestro país se han descrito casos en todos los estados predominando principalmente en Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, México, Michoacán, Oaxaca y Nuevo León (7,13 y 27).

El término Micetoma fue utilizado en 1860 por Vandyke Cárter para nombrar esta enfermedad, en México el primer médico mexicano en describirla fue Cicero en 1912 (35).

fc.jfl,

<
'la;
'ti;CAPILLA AL...
...

Existen aproximadamente 26 agentes causantes de Micetoma entre los cuales los fúngicos (hongos verdaderos) y los actinomicetos (bacterias aeróbicas) son los más frecuentemente aislados. De los géneros Noardia y Actinomadura las especies patógenas más comunes son *N. brasiliensis* , *N. asteroides* . *N. cavie* . *Actinomadura madurae* , *A- pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*. los cuales en conjunto constituyen cerca del 98 % del total de las bacterias causantes de Micetoma (4,5,11,28,29 y 35).

El grupo de especies bacterianas incluidas en el género Noardia se encuentra estrechamente relacionado con varios géneros de actinomicetos que contienen ácidos-micólicos tales como *Corynebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (12 y 24).

Las Nocardias producen diferentes enfermedades en el hombre por un lado el micetoma que afecta piel y tejido subcutáneo y por otro la nocardiosis que se manifiesta en forma generalizada o diseminada preferencialmente en el cerebro (1), esta última se presenta principalmente en pacientes con enfermedades metabólicas (45), inmunosuprimidos por trasplantes y enfermos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)(1), lo cual nos sugiere que un estado de inmunodeficiencia o inmunosupresión favorece el establecimiento y desarrollo de la infección por *N. asteroides*. Actualmente existe tratamiento que favorecen la resolución de la infección de microorganismos causantes de nocardiosis o micetoma (48 y 49).

La *N. brasiliensis*. es un actinomiceto Gram positivo , no móvil, filamentoso, parcialmente ácido-alcohol resistente; aeróbico, saprófito que se encuentra en suelos cálidos y secos (47), crece en medios de cultivo convencionales (agar Sabouraud) a temperaturas de 37°C

(en un rango de 10-50°C) y un pH de 7.5, sus colonias son apiladas rugosas y amarillentas, en cultivos viejos las colonias toman un color café rojizo. En ocasiones las colonias presentan un desarrollo voluminoso , de color blanco con grandes filamentos, los cuales al microscopio se distribuyen en formas bacilares y cocoidales, semejantes a las del género *Mycobacterium* o *Corynebacterium*.

N. brasiliensis tiene la propiedad de fermentar algunos azúcares (por ej. D-arabinosa, D-ífructuosa, glucosa, glicerol, manitol, mañosa, sorbitol y trealosa) así como de hidrolizar proteínas y sus derivados (por ej. la esculina, gelatina, caseína, guanina, hipoxantina, creatina, tirosina y urea), esto es sin producción de gas (40).

Las infecciones causadas por microorganismos del género *Nocardia* suelen ser de difícil diagnóstico; en el caso de micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis* este análisis es lento, ya que se confirma con la elaboración de un cultivo y caracterización del agente causal, lo que requiere de aproximadamente dos a tres semanas de incubación. Salinas y col, en 1992 reportaron que existen 3 proteínas inmunodominantes en un ensayo de inmunoelectrotransferencia (Western-blot), la p10, p26 y p24. Vera, Salinas y Welsh aislaron de las tres proteínas inmunodominantes de *N. brasiliensis* ; la p24 y p26 con las cuales los mismos autores desarrollaron un método inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico rápido, específico y reproducible de la presencia de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* en pacientes con micetoma.

N. brasiliensis es una bacteria facultativa intracelular capaz de sobrevivir y continuar su crecimiento dentro o fuera de las células polimorfonucleares o macrófagos; ha propuesto que estos microorganismos son capaces de evadir la respuesta inmune no específica (macrófagos), por medio de la inhibición de la fusión fago-lisosoma en las células que fagocitaron dicho microorganismo (9 y 10). Este fenómeno se ha observado en otras lesiones causadas por bacterias del género Mycobacterium (46). En el caso de H. leprae se ha observado que estas bacterias se encuentran provistas de una cubierta resistente a la acción de las enzimas localizadas en los lisosomas; por lo cual pueden salir del fagosoma [permanecer dentro del citoplasma de la célula].

Los mecanismos de patogenicidad y de resistencia a la infección por N. brasiliensis no son bien conocidos, Salinas y cols, (38) reportaron la presencia de un grupo de proteínas con actividad caseolítica que podrían estar involucrados en el mecanismo de daño o contribuir a la virulencia en la infección por R. brasiliensis. Sin embargo los estudios previos en la literatura se encuentran dirigidos principalmente a esclarecer los mecanismos involucrados en la infección ocasionada por N. asteroides.

Folb y cols, (9) en 1976, establecieron un modelo experimental de Micetoma con ratones blancos Swiss infectados con R. asteroides y N. brasiliensis con adyuvante incompleto de Freund.

En este estudio se describió la histopatología de las lesiones producidas por las Nocardias y se demostró que la típica lesión producida por R. brasiliensis, se caracteriza por la presencia de microorganismos que son rodeados por macrófagos vacuolados, histiocitos y una capa externa de fibroblastos recubiertos por material hialino. A esta lesión encontrada en ratones infectados con N. brasiliensis se le denominó "lesión tipo brasiliensis". En cambio los ratones infectados

nN.asteroides presentaron lesiones similares pero con ausencia de microorganismos intracelulares macrófagos y ausencia de material hialino en la periferia de la lesión. Esta lesión fue referida no “lesión tipo asteroides”.

La importancia de la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T fue demostrada Folb y col, en 1977 (10) ellos publicaron el desarrollo de micetoma en un modelo experimental de ratones infectados con N. asteroides y N. brasiliensis respectivamente . Dichos autores utilizaron ratones inmunocompetentes (Balb/c , C57BL/6 y C3LI) y ratones atímicos (nu+ , C57BL/nu+ y C3h/nu+) , los cuales fueron infectados con bacterias vivas ; estos investigadores observaron que el porcentaje de mortalidad para los ratones atímicos fue del 100% a los 28 días de la infección , a diferencia de los ratones inmunocompetentes donde se observó mortalidad. Estos mismos autores encontraron que a pesar de utilizar cepas de ratones con diferente fondo genético no hubo diferencias en los hallazgos histopatológicos de lesiones con ambas bacterias . Deém y col, en 1982 (6) también realizaron estudios que demostraron la participación de LT en la resistencia a la infección con N.asteroides y también demostraron que la capacidad de los LT reactivos a N. asteroides puede ser transferida a ratones atímicos, al mismo tiempo los LT pueden activar a los macrófagos in vitro. El aumento de la resistencia a la infección en ratones atímicos reconstituidos con LT apoya la importancia de estas células en la defensa del huésped contra la infección por N. asteroides.

Melendro y col, en 1978 (30) propusieron un posible mecanismo no específico de resistencia a N. brasiliensis relacionado con la presencia de otros microorganismos . En este estudio se utilizó una cepa de Listeria monocytogenes (L.monocytogenes) que fue administrada en dosis sub-letal en ratones previamente infectados con N.brasiliensis para evaluar a diferentes

tiempos la desaparición bacteriana en el torrente sanguíneo . Ellos encontraron que después de las 24 horas , se inició la disminución del número de bacterias en sangre, alcanzando un pico máximo a los 25 días post-infección con *L. monocytogenes*. Por otro lado los macrófagos peritoneales activados de un ratón infectado con *N. brasiliensis* , en presencia de extracto celular de *N. brasiliensis* y bacteria (*L.monocytogenes*) , favorece la disminución gradual de *L. monocvtogenes* en relación al tiempo. Este grupo de experimentos sugieren que existe un posible aumento en la activación de algunos mecanismos bactericidas del macrófago que favorece la resistencia contra microorganismos relacionados con *N. brasiliensis*. Krick y col., 1975 (21) observaron que los macrófagos peritoneales de ratones infectados con *Kasteroides* , al ser transferidos a ratones sanos, les conferían resistencia contra *L.monocytogenes* y de igual forma los macrófagos de ratones infectados con *L. monocytogenes* o *Toxoplasma gondii* conferían resistencia al reto con *N.asteroides*.

Existen varios modelos experimentales de micetoma en ratones, con diferentes agentes causales , el más conocido es el reportado por González-Ochoa (14) . En este modelo los ratones se infectaron con bacterias cuantificadas por peso seco y los resultados no son reproducibles. Zlotnik y col, (51) en 1980 observaron que la infección puede reproducirse con un inóculo de bacterias vivas (1×10^7 unidades formadoras de colonias) y no por peso en masa seca de bacterias, además evaluaron Zlotnik y col, diferentes vías de infección (intraperitoneal, intradérmica y sub-cutánea); y que la mejor vía de infección es vía sub-cutánea en cojinete plantar .

Beaman y col, en 1982 (2) evaluaron el papel del linfocito B (LB) en la resistencia a la infección con *N. asteroides* en ratones $F_1(CBA/N \times DBA/2)$, y (deficientes en LB).

Demostraron que existían niveles muy bajos de IgM e IgG3 como resultado del defecto en LB para proliferar en presencia de mitógenos (43) , pero con respuesta inmune por LT normal. La infección clínica no fue más grave en que en . Con estos datos los autores sugieren que la presencia de anticuerpos no participan en la resistencia a la infección con N. asteroides .En 1982 Rico y col, (35) estudiaron, en ratones inmunocompetentes y atímicos , el efecto de la transferencia pasiva de suero anti-N.brasiliensis en el desarrollo de micetoma . Ellos observaron que la transferencia no confería protección en ningún grupo de ratones; por el contrario los anticuerpos favorecían la infección y agravaron el daño óseo , a diferencia de los ratones que no recibieron suero . En 1984 I loward y otros investigadores (16,17,18,19 y 25) reportaron la no participación de los anticuerpos en la protección de cepas Balb/c, altamente susceptibles a la infección con Leishmania trópica (L.mayor 1 , aún en trasferencia pasiva de altas dosis de suero hiperinmune y de aplicación de fracciones isotópicas (anticuerpos específicos), específicas para L. trópica. Estos trabajos sugieren que la participación de los anticuerpos no es importante en la resistencia a la infección por EL asteroides. N.brasiliensis , L. mayor y otros patógenos intracelulares relacionados.

El papel de la repuesta inmune celular mediada por LT , no ha sido esclarecida en forma definitiva en cambio algunos mecanismos de la respuesta inmune no específica mediados por macrófagos parece ser relavante .A pesar de la información acerca del papel de los anticuerpos mencionados en los párrafos anteriores , no se aclara su papel en el establecimiento ni en la resolucón de la infección experimental por Nocardias . En conjunto según los autores citados sugieren , primero , que los anticuerpos anti-Nocardia asteroides no juegan un papel importante en la protección, segundo ,la presencia de anticuerpos anti-Nocardia asteroides adquiridos por inmunización activa o por transferencia adoptiva empeoraron las lesiones .En el presente trabajo se quieren determinar las condiciones y la historia natural del micetoma

experimental por Nocardia brasiliensis en diferentes cepas de ratones (inmunocompetentes e inmunodeficientes) . También se pretende estudiar el papel de los anticuerpos anti-í adquiridos por inmunización activa y transferencia pasiva en el establecimiento y en la resolución del micetoma experimental.

H I P O T E S I S

La respuesta inmune humoral evita el establecimiento y contribuye a la resolución del
Micetoma experimental por Nocardia brasiliensis en ratones.

O B J E T I V O G E N E R A L

Estudiar la respuesta de anticuerpos en el establecimiento y resolución del micetoma experimental por Nocardia brasiliensis en ratones.

O B J E T I V O S E S P E C I F I C O S

Identificar por inmunoelectrotransferencia (western-blot) los antígenos inmunodominantes de EE brasiliensis ; antes, durante y en la resolución del micetoma experimental.

Estudiar y cuantificar los anticuerpos anti-N. brasiliensis , por un método inmunoenzimático (E.L.I.S.A.), en un modelo experimental de micetoma por N- brasiliensis , en el establecimiento y resolución de la infección.

Identificar el isotipo del anticuerpo anti-N. brasiliensis presente en el establecimiento y la resolución de la infección.

Evaluar el papel que juegan los anticuerpos anti-N.brasiliensis en experimentos de transferencia adoptiva en ratones Balb/c.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1, ANIMALES DE EXPERIMENTACION :

Se utilizaron dos cepas de ratones inmunocompetentes, Balb/c y C57BL/6; otros con una alteración en linfocitos B, CBA/N (41,42 y 43); una cepa con alteración en macrófagos, DBA/2 y los F, (CBA/N X DBA/2) y obtenidos de la cruce entre CBA/N y DBA/2. Se seleccionaron grupos de 10 ratones, cada grupo de ratones fueron posteriormente subagrupados en 5 ratones en cada jaula. La edad promedio de los ratones fue de 10 semanas (en un rango de 9 a 12 semanas de edad) y su peso fue de un rango de 25 a 35 gr, se mantuvieron con alimento purina , agua estéril y suplementos vitamínicos.

2 C E P A BACTERIANA :

Se utilizó una cepa bacteriana de Nocardia brasiliensis , aislada de una lesión de micetoma en un paciente atendido en el Departamento de Dermatología del Llospital Universitario “Dr. José Eleutcrio González “, de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) a cargo del Dr. Oliverio Welsh Lozano. La identificación de N. brasiliensis se realizó por medios convencionales en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la supervisión de Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla y se confirmó por el Dr. Libero Ajello en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta Georgia en E.U.A., actualmente esta cepa bacteriana es referida como Nocardia brasiliensis cepa HUJEG-1, y es mantenida por resiembra en medio de cultivo de agar Sabourad.

PREPARACION DEL INOCULO PARA RATONES :

Para obtener una suspensión unicelular de bacterias de *N. brasiliensis*, se requirió una incubación con fragmentos de colonias bacterianas en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) estéril, a 37° C por 48 hr., en baño de agua y agitación a 300 revoluciones por minuto (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific). Posteriormente la masa bacteriana se lavó tres veces con solución salina estéril 0.85 % de NaCl y se centrifugó a 1,500 r.p.m. Después de los lavados las bacterias se resuspendieron en 3 mL, de salina estéril y se disgregaron con un agitador de vidrio y eventualmente homogenizadas en un homogenizador de vidrio Potter-Elvehjem (Wheaton SP) . De la suspensión bacteriana obtenida se utilizó 0.5 mL para inocular, cuatro matraces Erlenmeyer de 125 mL, 30 mL de Bill estéril cada uno y se incubaron a 37°C en agitación por 48 hrs. Al terminar los dos períodos de incubación, las células bacterianas se lavaron tres veces con salina estéril y se resuspendieron en 10 mL., de salina estéril . Como control de suspensión unicelular se tomó una muestra de células bacterianas mezcladas con KOH al 10% y se observó al microscopio.

CUANTIFICACION DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) :

Para obtener masa bacteriana, se prepararon 4 matraces Erlenmeyer de 1,000 mL, conteniendo de 160 a 175 mL. de BHI estéril en cada uno. Estos últimos se inocularon con 0.5 a 1.0 mL, del inóculo primario de *N. brasiliensis* y se incubaron a 37°C por una semana en crecimiento estacionario. De este cultivo se determinaron las U.F.C. de *N. brasiliensis* , por la técnica de dilución seriada en placa con agar-BHI (33). Para esto en condiciones de esterilidad se prepararon diluciones seriadas en s.s.e, logaritmo base 10 (del 1 al 10) de

[N. brasiliensis. de cada una de las diluciones se tomó 1 mL, y se colocaron en cajas de Petri le inmediatamente se aplicó agar Sabourad a una temperatura de 40 a 45°C mezclando en forma

- giratoria homogenizando la suspensión bacteriana en el agar . Las placas se incubaron a 37°C
- por 48 hrs y finalmente se contaron las UFC en un contador, reportando los valores en UFC/ImL , y tomando como referencia los valores ya reportados en la literatura (50).

D), OBTENCION DHL EXTRACTO CELULAR SEMIPIJRIFICADO DE N.brasiliensis

A partir de la suspensión celular obtenida de N.brasiliensis. inoculamos 40 matraces erlenmeyer de 1 y 2 litros, conteniendo 160 y 170 mL de medio de cultivo, caldo BHI, a cada matraz se le agregó de 0.5 a LO mL de la suspensión bacteriana. Los cultivos se incubaron a 37°C por una semana, en crecimiento estacionario. Al término del tiempo, las bacterias crecieron en la superficie, tomando un color amarillento, se recolectó toda la masa bacteriana en un solo matraz con solución salina estéril y caliente (40-45°C), las muestras fueron transferidas a frascos de centrifuga (Autoclear polycarbonate centrifuge bottle ,Beckman No.

416250-1L) y centrifugadas a 1,800 rpm (centrifuga Beckman TJ-6) por 7 min. Este proceso c lavado se repitió de tres a cuatro veces para eliminar el exceso de medio de cultivo.

Posteriormente la masa bacteriana fue desengrasada con una mezcla de etanolcéter sucesivamente con tres relaciones 1 : 1 , 1:2 y 1:3, este último se realizó en repetidas ocasiones hasta que

cesaparació el color amarillo. Al finalizar el proceso de desengrasado la masa bacteriana se dejó en un cristizador en reposo , para secado total y ocasionalmente se utilizó bomba de vacío (46). Las bacterias secas fueron trituradas con polvo de vidrio (Pyrex) en un mortero de porcelana por una hora y media y se agregó un amortiguador tris-HCl 0.01M con acetato de magnesio 0.01 M la mezcla se agitó 12 hrs. 4°C , transfiriéndose posteriormente a tubos

de 50 mL y se centrifugó a 1,500 rpm por 30 min, el precipitado fue eliminado y el sobrenadante fue ultracentrifugado a 144,000 r.p.m/3 hr. De este proceso el sobrenadante se transfirió a membranas de diálisis con poro de exclusión molecular de 12,000 a 14,000 daltones (Sigma 250-90), la muestra se dializó contra agua trideslilada por 12 hrs, el dializado se almacenó en frascos de vidrio para posteriormente liofilizarlos (Freeze Mobile Virtis). Para determinar el contenido de bandas proteicas del extracto celular de NL. brasiliensis se procedió a realizar electroforesis en gel de poliacrilatnida en condiciones desnaturalizantes en gradiente 8.75-18% con SDS (SIGMA) y la concentración de proteínas se determinaron por el método de Bradford

3).

ANALISIS ELI .C f ROLORL I ICO DEL EXTRACTO CELULAR DE N.brasiliensis
EN CONDICIONHS DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

a- Preparación de geles:

Para realizar el corrimiento electroforético del extracto celular de N- brasiliensis y comparar los patrones con los previamente establecidos (37,38,39 y 47) Se prepararon los siguientes geles de poliacrilatnida con dodecilsulfato de sodio (SDS) en gradiente.

Gel de empaquetamiento al 5 % T,2.7 C, pll 6.8, el gel se realizó mezclando las siguientes

soluciones:

Solución patrón de acrilamida-bisacrilamida

30% T , 2.7 C	1.300 mL
Agua tridestilada	0.100 mL
Amortiguador tris-HCl pH 6.8.....	1.250 mL
SDS al 10 %.....	0.100 mL
Persulfato de amonio al 10 %.....	0.050 mL
TEMED.....	0.010 mL

Gel de corrimiento con poliacrilamida y SDS, sin gradiente al 12% T, 2.7 C, pH 8.8

preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

Solución patrón de acrilamida-bisacrilamida.....	4.000 mL
Agua tridestilada.....	4.600 mL
Amortiguador tris-HCl pH 8.8.....	1.250 mL
SDS al 10%.....	0.100 mL
Persulfato de amonio al 10%	0.050 mL
TEMED.....	0.005 mL

Gel de corrimiento para gradiente 8.75%-18% T, pH 8.8. Este gel se preparó con el uso de un formador de gradiente modelo 385 (Bio-Rad No. de cat. 165-2000) de 2 columnas conectadas a una bomba peristáltica. En este gradiente se utilizaron las siguientes soluciones:

	Columna A	Columna B
Solución patrón de acril- bisacrilamida 30% T .	2.040 mL	4.197 mL
Agua tridestilada	3.060 mL	0.645 mL
Amortiguador tris-HCl pH 8.8	1.320 mL	1.320 mL
SDS al 10 %	0.069 mL	0.069 mL
Glicerol al 50%	0.480 mL	0.740 mL
Persulfato de amonio al 10 %	0.025 mL	0.025 mL
TEMED	0.003 mL	0.003 mL

17, ELECTROFORESIS DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis:

a).- El método utilizado para el análisis electroforético del extracto celular fue de acuerdo al sistema amortiguador discontinuo de Laemmli (23) en geles planos. Utilizamos un gel «entrador al 5% T, pH 6.8 y un gel separador en gradiente al 8.75% - 18% T, pH 8.8. Este gel se precorrió 30 min a 50 volts y posteriormente se aplicó una muestra de extracto celular de N. brasiliensis alternando el corrimiento con una muestra de marcadores de peso molecular conocido (Sigma 7L), disueltos en amortiguador (tris-HCl 0.5M, SDS 4 %, 10 % de 2ME y 0.2% de azul de bromofenol pH 6.8) en relación 1:4, las muestras fueron calentadas por un minuto en baño de agua hirviendo, aplicando 25 µg de muestra en cada carril (0.8cm) de corrimiento. La mezcla utilizada de marcadores de peso molecular conocido en este análisis fueron: 66kDa albúmina sérica bovina, 45kDa albúmina de huevo, 36kDa {liceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 29kDa anhidrasa carbónica y 14kDa alfa-lactoalbúmina. En el corrimiento electroforético utilizamos un amortiguador compuesto de Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y 0.1% de SDS pH 8.3, disueltos en agua tridestilada.

El corrimiento se realizó a 150 volts (fuente poder LKB Modelo 2197) hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la cámara de corrimiento (polo negativo).

b).- Tinción de geles:

Para evidenciar la presencia de bandas protéicas se utilizaron la tinción con azul de Coomassie y la tinción con nitrato de plata.

1) ,- Tinción con azul de Coomassie: Los geles fueron colocados en una cámara de vidrio conteniendo una solución al 0.1% de azul de Coomassie en metanol-ácido acético (4:1) por un tiempo de 30 min. Para quitar el exceso de colorante se utilizó una mezcla de metanol 10% y ácido acético 10% como solución desteñidora.

2) .- Tinción con nitrato de plata: Para revelar un mayor número de bandas de proteínas posterior al corrimiento electroforético usamos el método descrito por Merrill (31), que consiste en;

a- El gel se dejó inmerso en solución fijadora para tinción de nitrato de plata: 30 min
(50% metanol, 12% ácido acético).

b- Se lavaron tres veces con solución lavadora 10 min c/u (10% metanol, 5% ácido acético).

c.- Posteriormente se dejó en solución oxidante (dicromato de potasio 0.099% , 0.2 % ácido nítrico).

I ji- Se lavó tres veces con agua tridestilada 10 min c/u.

I t| El gel se dejó en solución de nitrato de plata al 0.012 M; 5 min en presencia de luz intensa y 25 min en luz normal.

[■ Finalmente: se reveló con una solución que contenía, carbonato de sodio 0.28 M y 0.5 mL de formol por cada litro de solución de carbonatas . La reacción se detuvo con ácido acético al 1% en agua bidestilada .Posteriormente los geles se transfirieron a cámaras con agua destilada por dos días antes de ser secados (Ephoretac , Gel Dryer).

11, INDUCCION DEL MICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES :

Para producir el micetoma utilizamos la vía subcutánea (cojinete plantar) con dosis de 1 mL., de suspensión bacteriana conteniendo 1×10^7 UFC/mL, sin adyuvante. Antes de llevar a cabo la infección bacteriana a cada grupo de ratones se les tomó una muestra de sangre por punción del plexo oftálmico posterior, obteniendo el suero por centrifugación y éacenando las muestras en congelación (-70°C), esta muestra fue referida cómo T_0 (muestra ni tiempo cero). Posteriormente los tiempos de sangrado de igual manera fueron tomados los tiempos de 7 (T_7), 14 (T_{14}), 28 (T_{28}), 45 (T_{45}), 60 (T_{60}), 80 (T_{80}), 90 (T_{90}) y 160 (T_{160}) días post-infección con *N.brasiliensis*. En cada tiempo de sangrado se obtuvieron cinco muestras líricas de aproximadamente un mililitro cada una , de las seis cepas de ratones .

I?, CRITERIOS DI-, EVALUACION MACROSCOPICA

DEL MICETOMA EXPERIMENTAL :

Establecimos una clasificación para evaluar el micetoma de acuerdo a los criterios clínicos

I de la siguiente manera:

- a. - Cuando la inflamación fué mayor de 5 mm se calificó con una cruz (+).
- b. - Cuando a este dato clínico se sumaron la aparición de focos ulcerativos y microabcesos se calificó con dos cruces (++) .
- c. - Inflamación , úlceras y gránulos purulentos se calificó con tres cruces (+++).
- d. - La presencia de necrosis sumada a los datos clínicos anteriores y/o mutilación del miembro inferior se calificó con cuatro cruces (++++).

10 EVALUACION MICROSCOPICA DEL MICETOMA EXPERIMENTAL EN

RATONES Balb/c

Trabajamos con un grupo de 15 ratones que fueron infectados con una dosis de 1×10^7 CFU/mL en 0.1 mL de bacterias vivas. Se amputaron tres patas (1 pata por ratón) al azar en diferentes tiempos de la infección; a los siete (T_7), catorce (T_{14}), veintiocho (T_{28}) y a los noventa días (T_w) post-inlección. Cada una de las muestras fue fijada en forinol al 10 % hasta su proceso histológico. Las muestras fueron teñidas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la U.A.N.L. bajo la asesoría del Dr. Francisco Hernández Batres , por la técnica de Hematoxilina y Eosina (H-E) . El análisis histopatológico fue realizado en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la asesoría del Dr. Daniel González Spencer.

DETERMINACION DE ANTIGENOS INMUNODOMINANTES DE *N. brasiliensis*
EN RATONES

i- Inmunoelectrotransferencia (Western-blot) :

Se preparó un gel de poliacrilamida en gradiente 8.75-18 % de T, 2.7 de C, como gel de corrimiento y un gel de concentración al 5% de T y 2.5 de C. En este análisis utilizamos el peine (Bio-Rad No. cat. 165-1232) de 13 cm de largo y 0.75 mm de grosor; por otro extremo del gel se adaptó un peine con dos carriles de 0.8 cm cada uno para correr alternativamente el extracto celular de *N. brasiliensis* con marcadores de peso molecular (7L Sigma). El gel se corrió en las condiciones descritas anteriormente y se transfirió a papel de nitrocelulosa (PNC) (Bio-

No. cat. 162-0115), con un poro de 0.45 micras. La transferencia de proteínas se llevó a cabo en amortiguador tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, a pH 8.3 y un voltaje constante de 240 volts (0.6 a 0.8 Amp) durante 90 min. Para el corrimiento se utilizó un sistema de enfriamiento (LKB 2209 multitemp) . Posterior al tiempo de corrimiento el PNC fue bloqueado con solución gelatina de pescado (Fluka Liquid Gelatin, Norland Products) disuelta

en solución salina amortiguada (PBS) pH 7.4, 60 min a 37° C. Posteriormente se realizaron tres lavados con gelatina al 0.3 % en PBS-tween 20 (1:1000) y el papel de nitrocelulosa (PNC) se cortó en tirillas de 0.4 cm , las tirillas se colocaron en una cámara de incubación (Bio-

No. de cat. 170-4037). Las tirillas de PNC se incubaron con los sueros de ratón diluidos 1:50 (en solución gelatina 1.5% en PBS con Tween 20 1:1000), en cuarto frío a 4°C por 5-18 hrs, con una hora de agitación final. Después , las tirillas se lavaron 4 veces con solución de lavado, posteriormente se incubaron 2 hrs a temperatura ambiente inmersas en un antisuero de ratón conjugado (anti-IgG totales , anti-IgG específica y anti-IgM específica de ratón) a una peroxidasa y diluido 1:1000 (Sigma No. A-0412) en solución de lavado. Las tiras fueron lavadas al terminar el tiempo y se revelaron con una solución sustrato que contenía 20 mg

Fig. 9

Fig. 9

Se 3,3 diaminobencidina (tetraclorhidrato) al 0.05 % en PBS como cromógeno y 186.6 μ l de H_2O_2 al 30% como sustrato. La mezcla se calentó a 35-40°C. Cuando las bandas proteicas de transferencia fueron evidentes, la reacción se detuvo con HCL 1N. Las tiras finalmente fueron lavadas con agua tridestilada y se dejaron secar para su análisis.

12.- AISLAMIENTO Y SEMIPURIFICACION DE LAS PROTEINAS

INMUNODOMINANTES DE R brasiliensis EN RATON :

I a.- Precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación del extracto celular de *R. brasiliensis*. En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 100 mg de proteínas del extracto celular, determinados por el método de Lowry (26), en 12 mL de PBS. El mismo volumen de sulfato de amonio fue mezclado utilizando un embudo de separación y lentamente se dejó caer gota a gota el sulfato de amonio; el proceso de precipitación se llevó a cabo a 4°C en agitación suave y constante. La mezcla turbia fue transferida a un tubo y centrifugada a 3,500 rpm por 30 min, el precipitado se resuspendió en un volumen de 5 mL en PBS. Ambos sobrenadante como precipitado fueron dializados en membranas de diálisis contra solución salina 0.85% hasta eliminar el exceso de sulfato de amonio, comprobamos la eliminación de sal con la reacción de precipitación con el cloruro de bario saturado. La presencia de proteínas en el sobrenadante y el precipitado fue analizada por gel en gradiente 8.75-18 % de T con SDS, determinando al mismo tiempo la concentración de proteínas por el método de Bradford (3). El sobrenadante previamente liofilizado fue resuspendido en 1ml de PBS y fue tratado con 150 μ l de desoxiribonucleasa I por dos horas a 37°C, la mezcla se centrifugó a 3,200 rpm por 5 min y se dializó contra agua tridestilada durante 24h.

b.- Filtración en gel (Sephadex G-lüO) para semipurificar los antígenos inmunodominantes

I de R brasiliensis:

En este procedimiento se utilizó una columna de vidrio (Wheaton Scientific 265134) I de 30 cm de largo y 2.2 cin de diámetro interno. El Sephadex G-100 se hidrató 24 hrs en I agua tridestilada con dos cambios y se empaquetó en la columna a un flujo de 1.0 mi por I minuto, cambiando el agua por PBS para eluir. La calibración de la columna se realizó con Iüextran azul (1 mg/mL en PBS) para determinar el volumen vacío (Vo), posteriormente se Ieluyeron por la columna dos marcadores de peso molecular conocido anhidrasa carbónica de 29 kDa y alcohol deshidrogenasa de 150 kDa a una concentración de 1 mg/mL en PBS respectivamente. Los valores de absorbancia a 280 nm fueron grallcados en un papel milimétrico (absorbancia en ordenadas y volumen de elución en abscisas) . Al igual que los marcadores se eluyó en la columna una muestra de 1 mi del sobrenadante conteniendo 5% de glicerol, centrifugada a 3,200 rpm por un minuto. El volumen de elución fue graficado contra los valores | de absorbancia de cada una de las fracciones. Las fracciones fueron analizadas en gel de gradiente 8.75-18% de T , y las fracciones que contienen las proteínas de 26-24 kDa fueron liofilizadas y almacenadas a -70° C hasta su utilización.

S

13 .- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI- R brasiliensis ÜE RATON POR

EL METODO INMIJNOENZIMATICO (ELISA) :

a.- Unión de las proteínas inmunodominantes p26

y p24 kDa de R brasiliensis en placas de poliestireno.

Se utilizaron placas de poliestireno con fondo en "U" (Costar EIA-RIA/plates cat. N° 3590), para cada pozo de la placa se utilizaron 0.5 g de proteína en 0.2 ml de amortiguador de acetatos pH 5. Las placas con las proteínas se dejaron 24 h a 4°C, posteriormente se lavaron tres veces con PBS. Las placas de poliestireno con las proteínas unidas fueron utilizadas como soporte para llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, de la siguiente forma:

- b. - Las placas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS Tween 20, 1:1000 (solución bloqueadora) e incubadas a 37°C por 2h.
- c. - Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 1:1000 a temperatura ambiente.
- d. - Los sueros de ratón analizados fueron previamente evaluados en diferentes diluciones (1:25, 1:50, 1:100 y 1:500) para determinar la dilución ideal, por lo tanto se diluyeron 1:50 en solución bloqueadora, colocando 100 μ l de suero problema en cada pozo posteriormente se dejó incubando a 37°C por 1h.
- e. - Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 1:1000.
- f. - En cada uno de los pozos utilizados se agregaron 100 μ l de antisuero conjugado con peroxidasa .En este ensayo se utilizaron diferentes antisueros específicos , contra la fracción gamma del suero de ratón (anti-mouse polyvalente immunoglobulinas, Sigma No. A-0412) , contra la cadena específica de IgM de ratón (anti-mouse IgM -chain specific, Sigma No.A-8786) y contra la molécula completa de IgG de ratón (anti-mouse IgG, Sigma No. A-2028), cada uno de los antisueros fueron trabajados individualmente en pozos diferentes y fueron aplicados en la dilución 1:1000 en solución bloqueadora

Las placas fueron incubadas a 37°C por 1h.

j- Posteriormente se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 1:1000.

i- La reacción antígeno-anticuerpo fue revelada con 160 µl de una solución cromógeno-substrato que contenía 0.01 g de OPD (ortofenilendiamina dihidroclorada) y 3 µl de peróxido de hidrógeno al 30%, ambos disueltos en 25 mL de amortiguador citratos pH5, esta solución se preparó en el momento de su uso en frasco obscuro.

i- La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 1N.

La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro (DIA - MEX BP-96 Microassay Reader) a 492 nm de longitud de onda.

Como controles negativos se utilizaron 100 µl de PBS-Tween 20 1:1000, por un lado) por otro se utilizó solución bloqueadora respectivamente, el control positivo utilizado fue suero de un paciente con micetoma (conocido) diluido 1:500 en solución bloqueadora y revelado con anti-IgG humana conjugada a la peroxidasa (anti-human IgG gamma-chain specific ,Sigma No. A-8419), el patrón de anticuerpos de este suero fue analizado previamente mediante inmunoelectrotransferencia y ELISA (36). Las lecturas de densidades ópticas obtenidas para cada uno de los sueros de cada una de las cepas de ratón infectados , fueron graficadas en [contra los tiempos del proceso infeccioso en X .

I- TRANSFERENCIA PASIVA DE INMUNIDAD HUMORAL

i- Obtención de suero de ratón curado espontáneamente de micetoma (SRC) : Los ratones *i* sobrevivieron y resolvieron la infección después de 200 días post-infección a *N. brasiliensis* ron sangrados por punción del plexo oftálmico posterior ; la sangre de 7 ratones obtenida (centrifugada a 3000 rpm por 5 min, y los sueros recuperados fueron mezclados y filtrados ■ membranas de 0.45 μ m. Posteriormente se inactivó a 56°C por 30 min y se guardó en refrigeración hasta su uso .Se determinó la concentración de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* ir la técnica de ELISA , desarrollada en este trabajo .

Obtención de suero hiperinmune de ratón (SRH) anti-*N. brasiliensis* muerta por calor :

Cuarenta ratones fueron inmunizados con una suspensión de *N. brasiliensis* muertas por calor, la cantidad de bacterias fue establecida previamente por la técnica de dilución en placa en este caso fue de 1.8×10^8 UFC/mL , las inmunizaciones fueron aplicadas con el siguiente protocolo ; 50 μ l de la suspensión por vía subcutánea (cojinete plantar), 7 días después fueron inmunizados con la misma dosis por la misma vía posteriormente al 28° día se reinmunizaron con la misma dosis por vía intramuscular , siete días después fueron sangrados todos por punción (I plexo oftálmico posterior, utilizando pipeta Pasteur. La sangre fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos y los sueros fueron mezclados y esterilizados por filtración en membranas de 0.45 μ m por último la mezcla de sueros se inactivó a 56°C por 30 min y se congeló a temperatura de -70°C hasta su uso . Se cuantificaron anticuerpos anti-*N. brasiliensis* por ELISA .

c. - Obtención de suero hiperinmune de conejo (SCH) anti-N.brasiliensis muerta por calor :

Dos conejos de seis meses de edad fueron seleccionados y previamente sangrados. El antígeno utilizado fue el mismo con el cual se obtuvo el suero hiperinmune de ratones , solo que en este caso se utilizo 1 mL de la suspensión de bacterias muertas emulsificadas con 1 mL de Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) y aplicado por vía intradérmica; siete días después se reinmunizarón con la misma dosis y la misma vía . Catorce días después de la primoinmunización se reinmunizaron con 1 mL de la suspensión bacteriana diluida 1:10 en s.s.e. y se inyectó por vía intramuscular ; esta última dosis se repitió catorce días más tarde por la misma vía y siete días después se sangraron los conejos ; el suero fue recolectado esterilizado e inactivado por calor . Se determinaron anticuerpos anti-N brasiliensis por la técnica de ELISA.

d. - Obtención de suero de conejo anti-Extracto celular de N.brasiliensis (SCE) :

Dos conejos de seis meses de edad fueron inmunizados por vía intradérmica con 10 mg de proteína del extracto celular de N. brasiliensis , disueltos en 1 mL de s.s.e. y emulsificados con el mismo volumen de AIF. Posteriormente los conejos recibieron dos reinmunizaciones más 20 y 40 días después de la primera inmunización por vía intradérmica e intraperitoneal respectivamente; siete días después los conejos fueron sangrados y el suero recolectado fué esterilizado por Filtración e inactivado por calor . Se determinaron anticuerpos anti-N brasiliensis por la técnica de ELISA.

15- EFFECTO DE LOS SUEROS HIPERINMUNES EN EL ESTABLECIMIENTO Y RESOLUCION DEL MICETOMA EXPERIMENTAL POR EL *brasiliensis* EN RATONES Balb/c.

1- Efecto de los sueros hiperinmunes en el establecimiento de la infección :

Se trabajó en grupos de seis ratones Balb/c para cada uno de los cuatro sueros a probar ; los ratones utilizados tenían un promedio de 10 semanas de edad y un peso en el rango de 25 a 35g, previamente se sangraron para determinar la presencia de anticuerpos anti-*H. brasiliensis* . Todos los ratones recibieron una dosis de 0.1 mL de bacterias vivas (1.7×10^7 UFC/mL) por vía subcutánea .Cada grupo de seis ratones recibió una inyección de 0.1 mL de suero hiperinmune por vía intramuscular . Estas dosis fueron repetidas al 3º , 6º , 9º y 12º día de la post-infección , un grupo extra de seis ratones fueron infectados e inyectados con s.s.e. como control en el desarrollo de micetoma . El desarrollo de micetoma fue observado por 45 días y evaluado por los criterios macroscópicos previamente mencionados .

1- Efecto de los sueros hiperinmunes en la resolución del micetoma experimental por *H. brasiliensis*:

Se utilizaron cinco grupos de 6 ratones ; todos los ratones fueron previamente infectados con *H. brasiliensis* con la dosis antes mencionada y 90 días después fueron inyectados intramuscularmente (I.M.) con 0.1 mL a cada grupo del siguiente antisuero : a) suero de ratón murino espontáneamente de micetoma , b) suero de ratón inmunizado con *H. brasiliensis* muerta por calor, c) suero de conejo hiperinmune (inmunizado con *H. brasiliensis* muerta por calor), d) suero de conejo anti-extracto celular de *H. brasiliensis* y e) solución salina estéril (control).

El efecto de los sueros lúe observado por 28 días y evaluado por los criterios macroscópicos previamente establecidos.

RESULTADOS

EVOLUCION CLINICA DEL MICETOMA EXPERIMENTAL

Los resultados macroscópicos del desarrollo en el micetoma experimental por *N. brasiliensis* se encuentran ilustrados en la fig. # 1 para los ratones Balb/c (a) y 57BL/6 (b); estas dos cepas de ratones inmunocompetentes mostraron un desarrollo más rápido a la micetoma que las cepas de ratones ilustradas en la fig.#2 y fig.#3 ; que corresponden a las cepas de ratones CBA/N (a) y DBA/2 (b) y ratones F1(CBA/N X DBA/2)9 (a) y (b) . Un ejemplo de micetoma en ratón Balb/c al séptimo día post-infección se muestra en la fig. #4 . En general las cepas de ratones inmunocompetentes presentaron datos clínicos de infección bacteriana entre el 14 y 28 día post-infección , los signos de curación espontánea se presentaron entre 150 y 200 día post-infección . Este efecto no se observó en el resto de las cepas de ratones , ya que el tiempo de establecimiento fue más prolongado y se presentó hasta el día 45 para CBA/N , F1 (CBA/N X DBA/2) 9 y O' ; para los ratones DBA/2 se presentó hasta el 90 día post-infección .

La historia natural de la infección fue evaluada macroscópicamente a diferentes tiempos, a partir del séptimo día y se muestra en el cuadro # 1 para las diferentes cepas de ratones hasta el día 70 de la post-infección y en el cuadro #2 se representa la evaluación macroscópica a partir del día 80 hasta el día 200 post-infección . Un resumen de la evolución macroscópica del micetoma experimental por *N. brasiliensis* se muestra en el cuadro # 3 .

RESULTADOS

• EVOLUCION CLINICA DLL MICETOMA EXPERIMENTAL

Los resultados macroscópicos del desarrollo en el micetoma experimental por brasiliensis se encuentran ilustrados en la fig. # 1 para los ratones Balb/c (a) y 57BL/6 (b) ; estas dos cepas de ratones inmunocompetentes mostraron un desarrollo más rápido del micetoma que las cepas de ratones ilustradas en la fig.#2 y fig.#3 ; que corresponden a cepas de ratones CBA/N (a) y DBA/2 (b) y ratones F1(CBA/N X DBA/2)9 (a) y (b) . Un ejemplo de micetoma en ratón Balb/c al séptimo día post-infección se muestra en la fig. #4 . En general las cepas de ratones inmunocompetentes presentaron datos clínicos de infección bacteriana entre el 14 y 28 día post-infección , los signos de curación espontánea se presentaron entre 150 y 200 día post-infección . Este efecto no se observó en el resto de las cepas de ratones , ya que el tiempo de establecimiento fue más prolongado y se presentó hasta el día 45 para CBA/N , F, (CBA/N X DBA/2) V y *Cf* ; para los ratones DBA/2 se presentó hasta el 90 día post-infección .

La historia natural de la infección fue evaluada macroscópicamente a diferentes tiempos, a partir del séptimo día y se muestra en el cuadro # 1 para las diferentes cepas de ratones hasta el día 70 de la post-infección y en el cuadro #2 se representa la evaluación macroscópica a partir del día 80 hasta el día 200 post-infección . Un resumen de la evolución macroscópica del micetoma experimental por N. brasiliensis se muestra en el cuadro # 3 .

En algunos ratones Balb/c fue evidente el daño óseo (fig.#5 y #6) , los cuales presentaron mutilación de los dedos y parte del cojinete plantar aunado a un proceso inflamatorio agudo (fig.#5), un ejemplo de micetoma ampliamente desarrollado (“micetoma florido”) al 90 día post-infección, se muestra en la lig. #7 .En este estadio se presenta una masa amorfa que se caracteriza macroscópicamente por aumento de volumen del cojinete plantar , presencia de abscesos y fístulas activas .

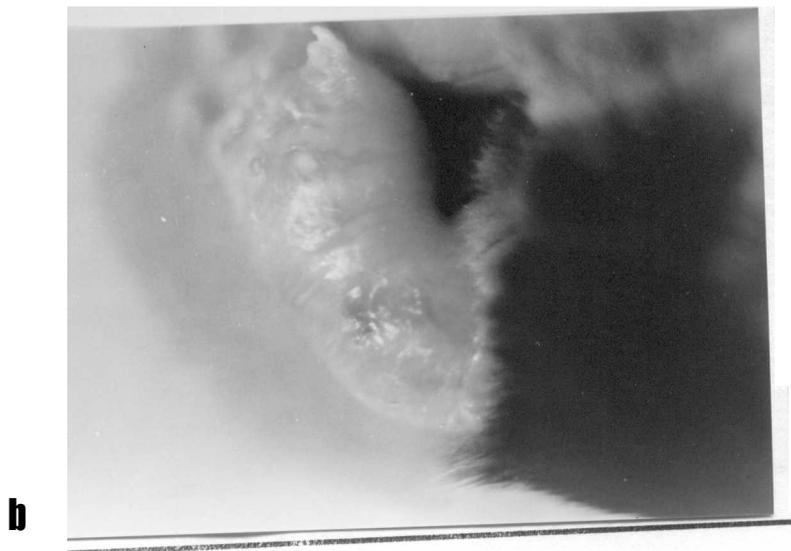


Figura # 1 •- Cojinete plantar de ratón Balb/c (a, y C57BL/6(b) con proceso inflamatorio inducido por *M. brasiliensis* vivas a los 14 días post-infección.

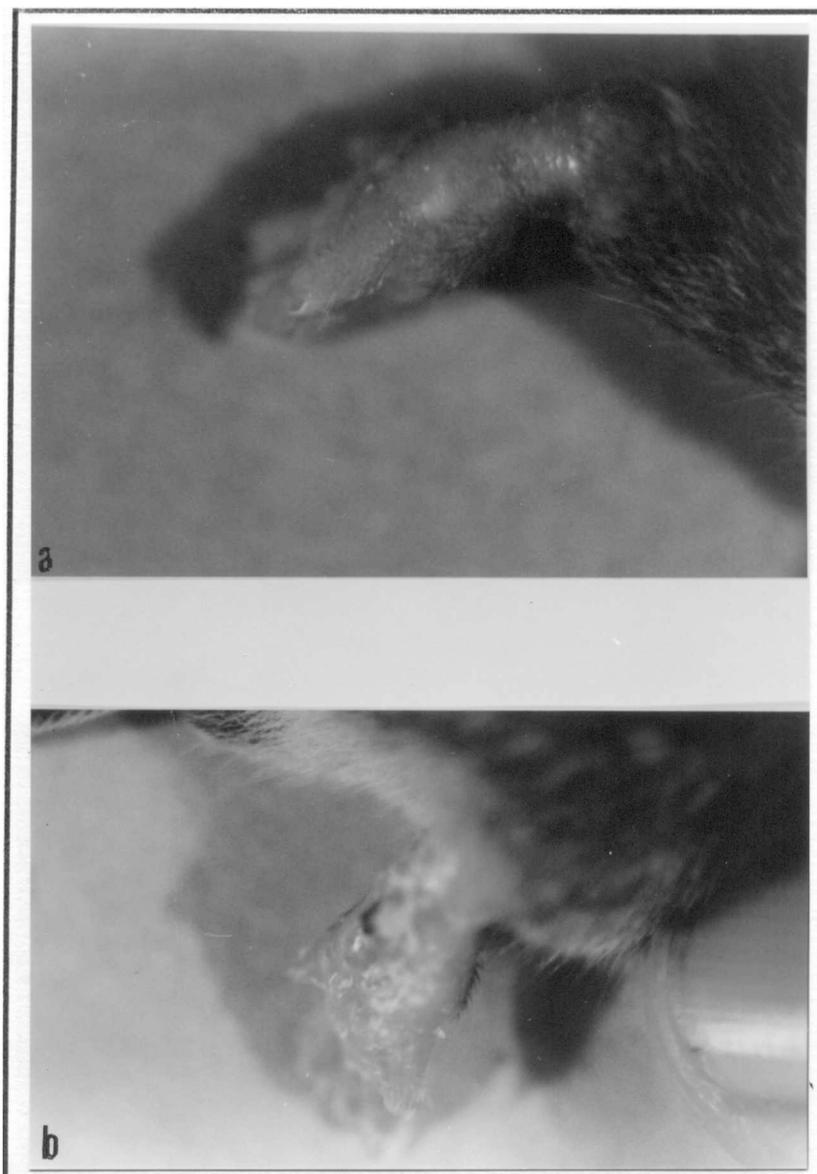


Figura # 2.- Cojinete plantar de ratones CBA/N (a) y DBA/2 (b) con proceso inflamatorio inducido por *N. brasiliensis* vivas a los 14 días post-infección .

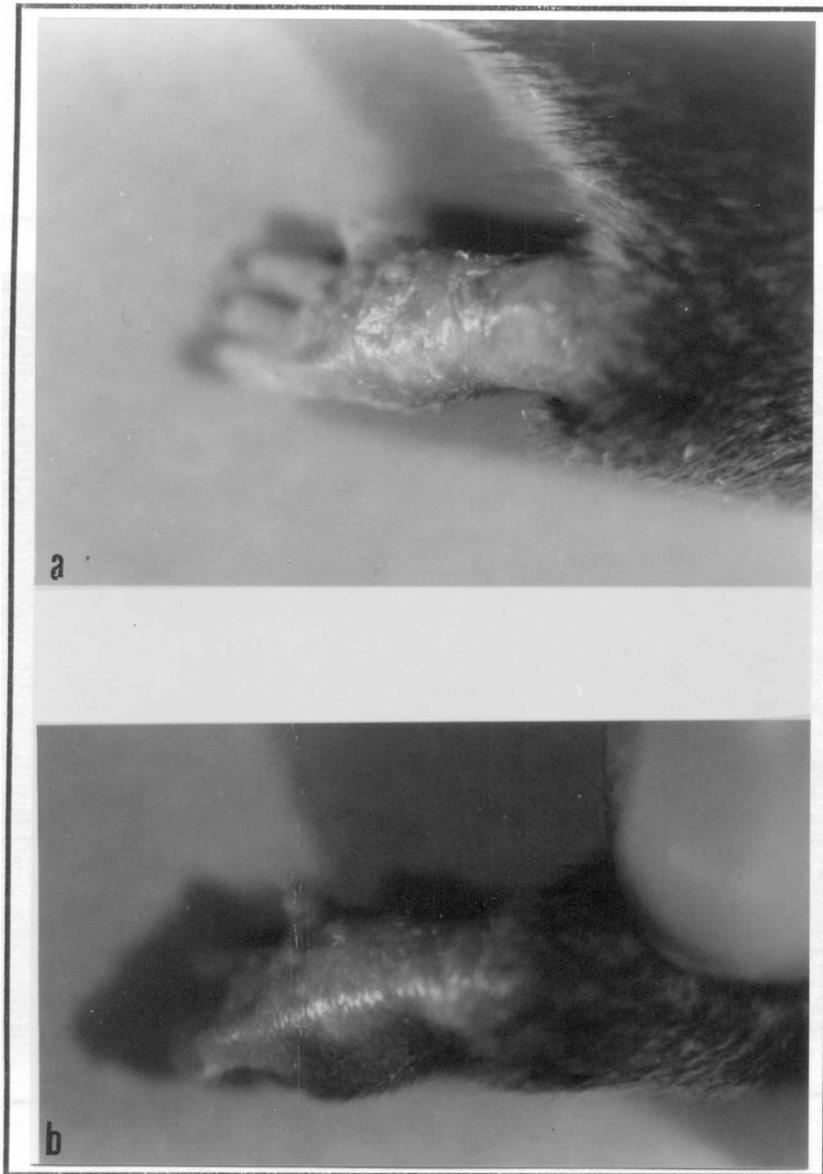


Figura #3.- Cojinete plantar de ratones híbridos (CBA X DBA) F1 hembra (a) y (CBA X DBA) F1 machos (b) con proceso inflamatorio inducido por *N. brasiliensis* a los 14 días post-infección .



Figura #4 .- Cojinete plantar de un ratón Balb/c a los siete días post-infección con N. brasiliensis que muestra algunos abscesos y el proceso inflamatorio.



Figura #5.- Ejemplo de un proceso inflamatorio intenso en ratón Balb/c que fué infectado
M. brasilensis 28 días post-infección.



Figura # 6 Cojinete plantar de ratón Balb/c infectado con *N- brasiliensis* en el cual se observa 45 días después , un micetoma con inflamación y destrucción del cojinete plantar y dedos .

i

I'
j

i



Figura # 7.- Ratón Balb/c infectado con ü. brasiliensis con un micetoma a los 90 días post-inyección. Se hace notar , el aumento de volumen , la destrucción tisular y fistulas activas .

**LA EVOLUCION CLINICA DEL MICETOMA EXPERIMENTAL
POR *Nocardia brasillensis* EN RATONES**

	Tiempo en días					
	7	14	28	45	60	70
Cepas ni urinas						
Balb/c	++	++++	++++	++++	++++	++++
C57BL/6	++	++++	++++	++++	++++	++++
DBA/2	++	++	+++	++	++	++
CBA/N	++	+++	+++	+++	+++	+++
(CBA X DBA) Fi Hem.	++	+++	+++	+++	++++	++++
(CBA X DBA) F1 Macho	++	+++	+++	+++	++++	++++
Valor de n= 10	por grupo					

Cuadro # 1 Registro de la evolución clínica del micetoma experimental en diferentes rasas de ratones del 7 al día 70 de la infección .La evaluación se llevó a cabo utilizando criterios previamente establecidos en este trabajo .

**LA EVOLUCION CLINICA DEL MICETOMA EXPERIMENTAL
POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES ,**

CEPAS M URINAS	Tiempo en días					
	80	90	120	150	170	200
Balb/c	++++	++++	+++	+++	+++	++
C57BL/6	++++	++++	+++	+++	++	+
DBA/2	++	+++	++++	++++	++++	++++
CBA/N	+++	+++	+++	+++	++++	++++
(CBA X DBA)						
F1 Hembra	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(CBA X DBA)						
F1 Macho	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Valor de n = 10 por grupo.

Cuadro # 2.- Registro de la evolución clínica del micetoma experimental en diferentes las de ratones a partir del día 80 al día 200 de evolución de la infección. La aluación se llevo acabo utilizando los criterios previamente establecidos.

f',

i



**RESUMEN DE LA EVOLUCION CLINICA DEL MICETOMA
EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES**

Cepas murinas	Tiempo en días					
	7	14	28	90	150	200
Balb/c	+ +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ +
C57BL/6	+ +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+
DBA/2	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + + +
CBA/N	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + + +
(CBA X DBA)						
F1 Hembra	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + + +	+ + + +
(CBA X DBA)						
F1 Macho	+ +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + + +

Valor de n= 10 por grupo

Cuadro # 3.- Resumen de la evaluación clínica del micetoma experimental en diferentes cepas de ratones de acuerdo a los tiempos de establecimiento y resolución de la infección en ratones inmunocompetentes así como de los F/CBA/N X DBA/2) 9 y *Cf*, con dismunción

IDENTIFICACION DE ANTIGENOS INMUNODOMINANTES POR WESTERN-BLOT

El patrón electroforético de bandas protéicas obtenido del extracto celular de *N. brasiliensis* se muestra en la fig. # 8 . El análisis de W.B. para las cada una de las cepas de ratones se llevo a cabo en diferentes tiempos de la infección . Para la cepa de ratones alb/c que se representa en la figura #9 , la p61 de *N.brasiliensis* fué identificada por todos los sueros de ratones a partir del día 7 de la infección, hasta el día 163 que fué el último tiempo de análisis . La p36 fué evidente a partir del día 45 post-infección y se mantuvo hasta el día 80 , disminuyendo su expresión al día 90 , para posteriormente presentarse al día 163. La p26 se manifestó a partir del día 45° y se mantuvo hasta el día 163°, cabe notar que esta proteína aumentó la intensidad de la banda a mayor gravedad de la infección . La p24 se presentó a partir del día 45 y se mantuvo hasta el día 80, al igual que la p26 es directamente proporcional a la gravedad de la infección . En este análisis se determinaron otras proteínas inmunodominantes como p66, p63, p36, p20 y p 14 . Este grupo de proteínas fueron eventualmente detectadas durante el tiempo de gravedad de la infección . En la fig.#9 representa diferentes tiempos (7,60,90 y 163 días post-infección) de análisis en los sueros de ratón alb/c por W.B. los cuales revelaron los antígenos inmunodominantes de *N.brasiliensis* para esta cepa . Los ratones C57BL/6 mostraron un patrón de respuesta que se resume en la inmunoelectrotransferencia de la figura # 10 . En las figuras # 11,12,13 y 14 se muestran las inmunoelectrotransferencias del resto de las cepas de ratones utilizadas correspondientes a los ratones señalados en pie de figura. En el resumen comparativo mostrado en la figura # 15 se observa que la p61 fue reconocida por todas las cepas de ratones excepto por DBA/2 que fue débilmente positivo . Todas las cepas de ratones incluyendo las híbridas reconocieron p26 y p24 excepto CBA/N que dieron un reconocimiento débil . Los ratones DBA/2 mostraron un

movimiento intenso para las proteínas p45, p36 y p35 que también fue evidente en los híbridos

(CBA/N X DBA/2) **9** en cambio el F₁ (CBA/N X DBA/2) **Cf** los CBA/N y los

7BL/6 no reaccionan con estos antígenos y los ratones Balb/c lo hicieron débilmente .

«conocimiento intenso para las proteínas p45,p36 y p35 que también fué evidente en los híbridos f(CBA/N X DBA/2) **9** en cambio el F₁ (CBA/N X DBA/2) **Cf** los CBA/N y los C57BL/6 no reaccionan con estos antígenos y los ratones Balb/c lo hicieron débilmente .

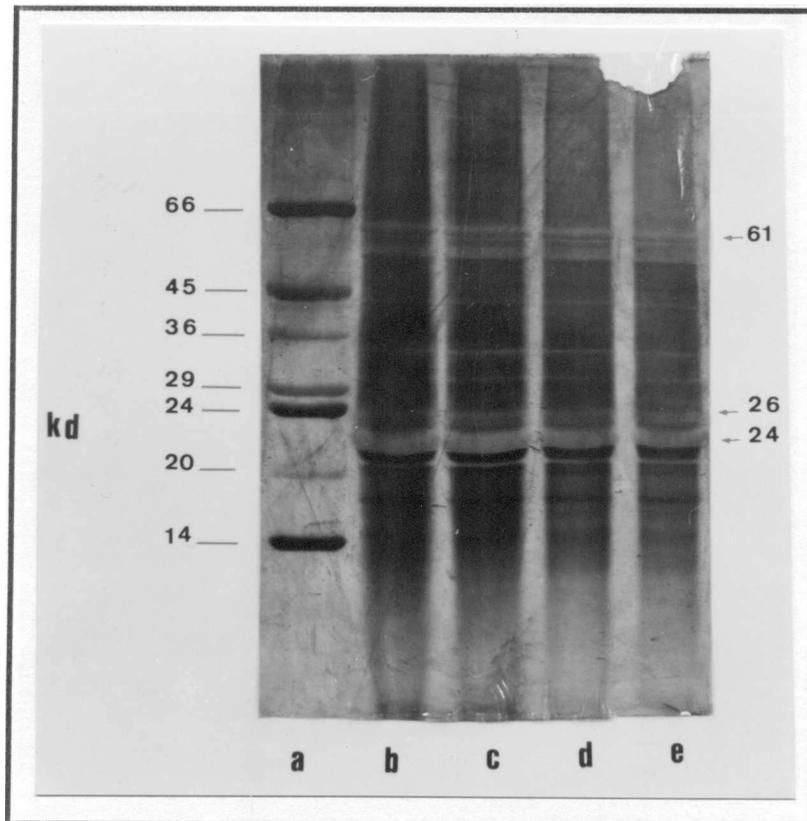


Figura # 8.- Electroforesis del extracto celular de *N. brasiliensis* en gel de poliacrilamida con gradiente 8.25-18 % de acrilamida-bisacrilamida , revelado con tinción de plata y tontastado con Coomasie ; a) control de peso molecular conocido (7L) , b, c, d y e representan corrimientos de extracto celular de *N. brasiliensis* a 200 ,100 , 50 y 25 pg de proteína respectivamente.

Figura # 9.- Inmunoelectrotransferencia (Western-blot) de los sueros de ratón
b/c infectados ; (a) 7 día, (b) 6U día , (c) 90 día , (d) 163 día post-infección
N. brasiliensis .

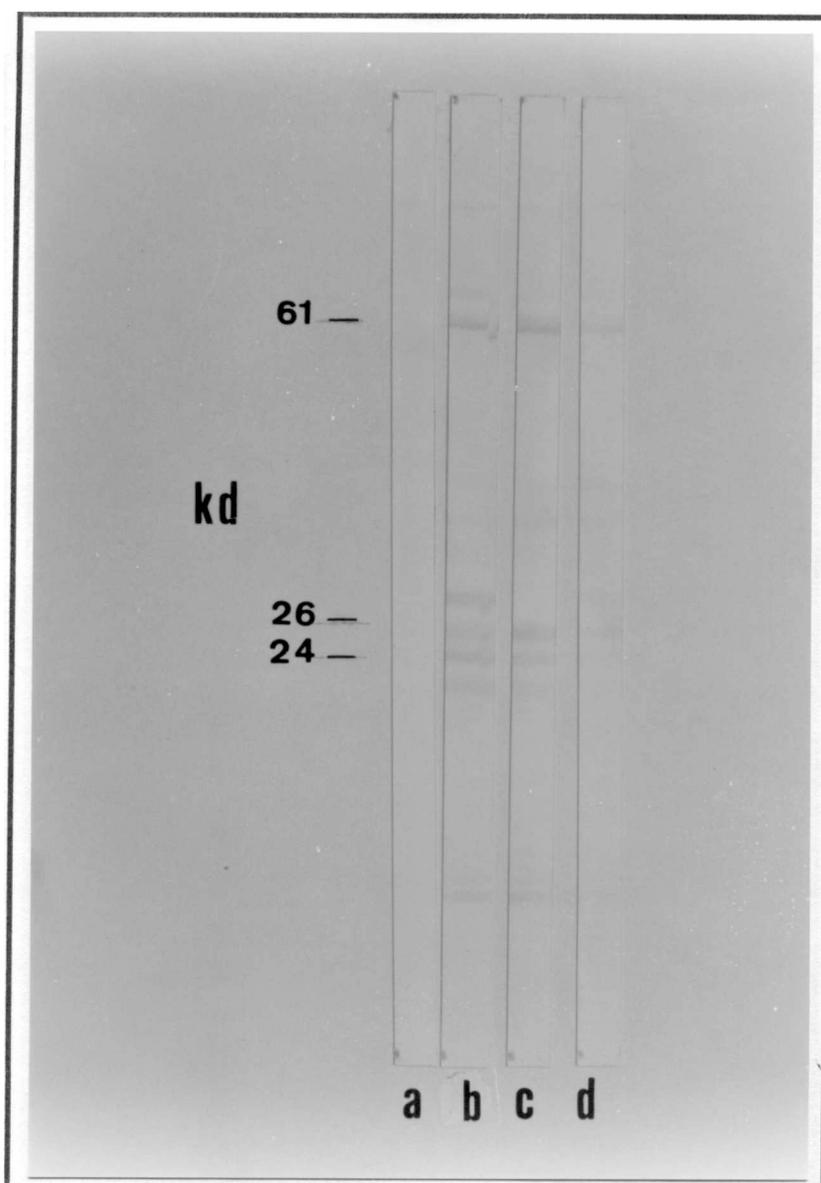


Figura # 10 Inmunoelectrotranslencia (Western-blot) con sueros de ratón 57BL/6 : (a) 7 día, (b) 60 día , (c) 90 día y (d) 163 día post-infección con

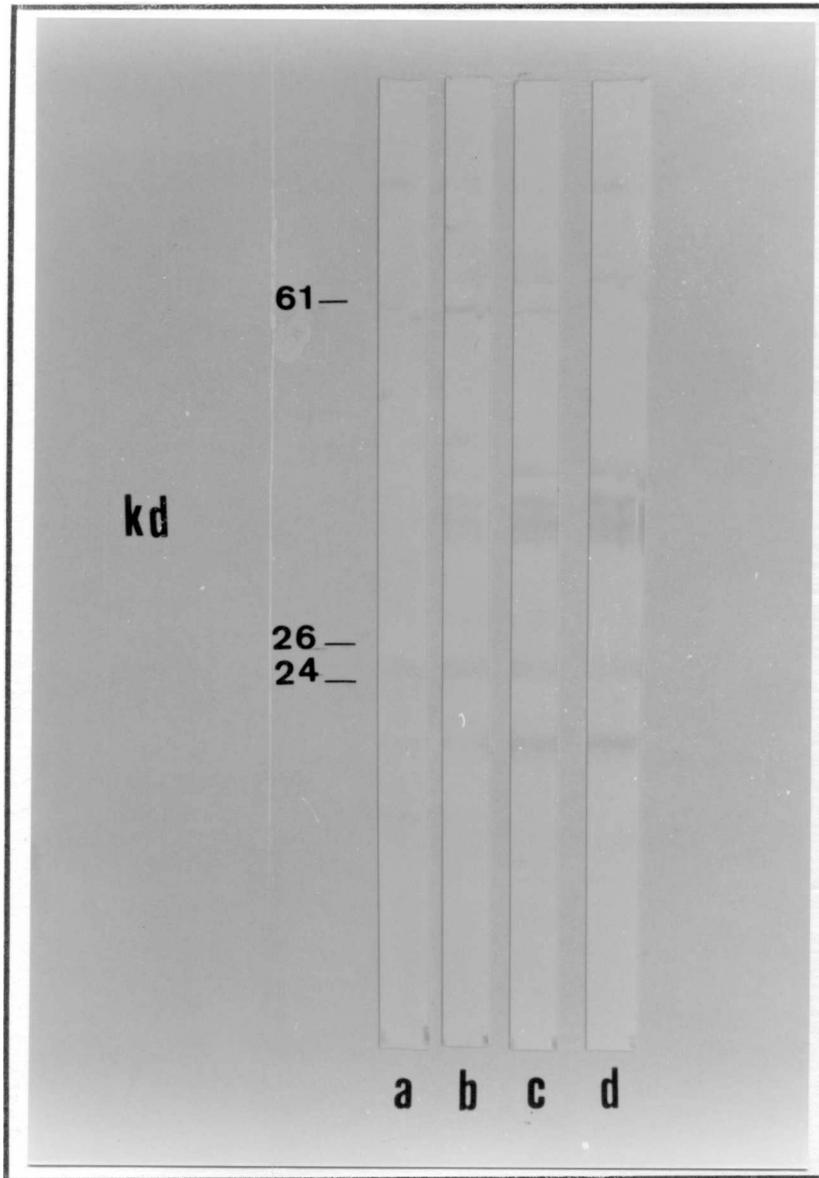


Figura # 1 1 . - Inmunoelectrotransferencia (W.B.) en sueros de ratón DBA/2 :
7 día , (b) 60 día , (c) 90 día y (d) 163 día post-infección con brasiliensis .

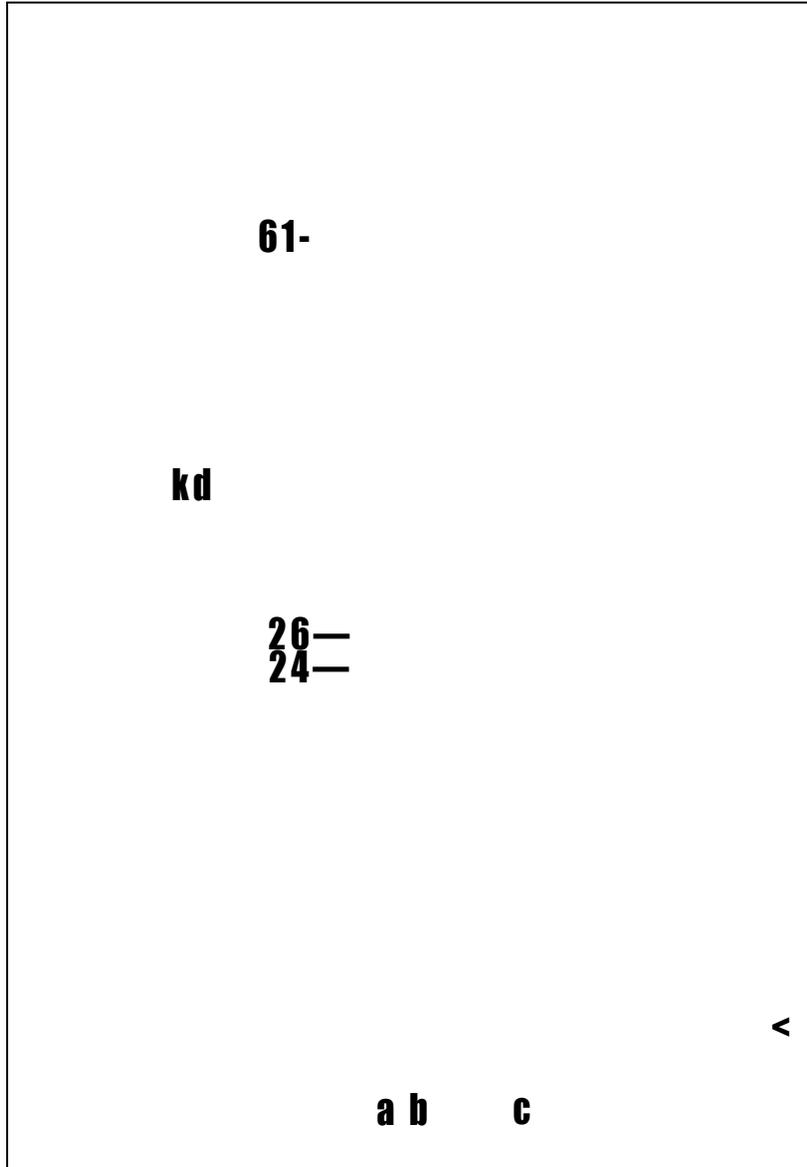


Figura # 12 Inmunoelectrotransferencia (W.B.) en sueros de ratón CBA/N
a) 7 día , (b) 60 día y (c) 163 día post-infección con N- brasiliensis .

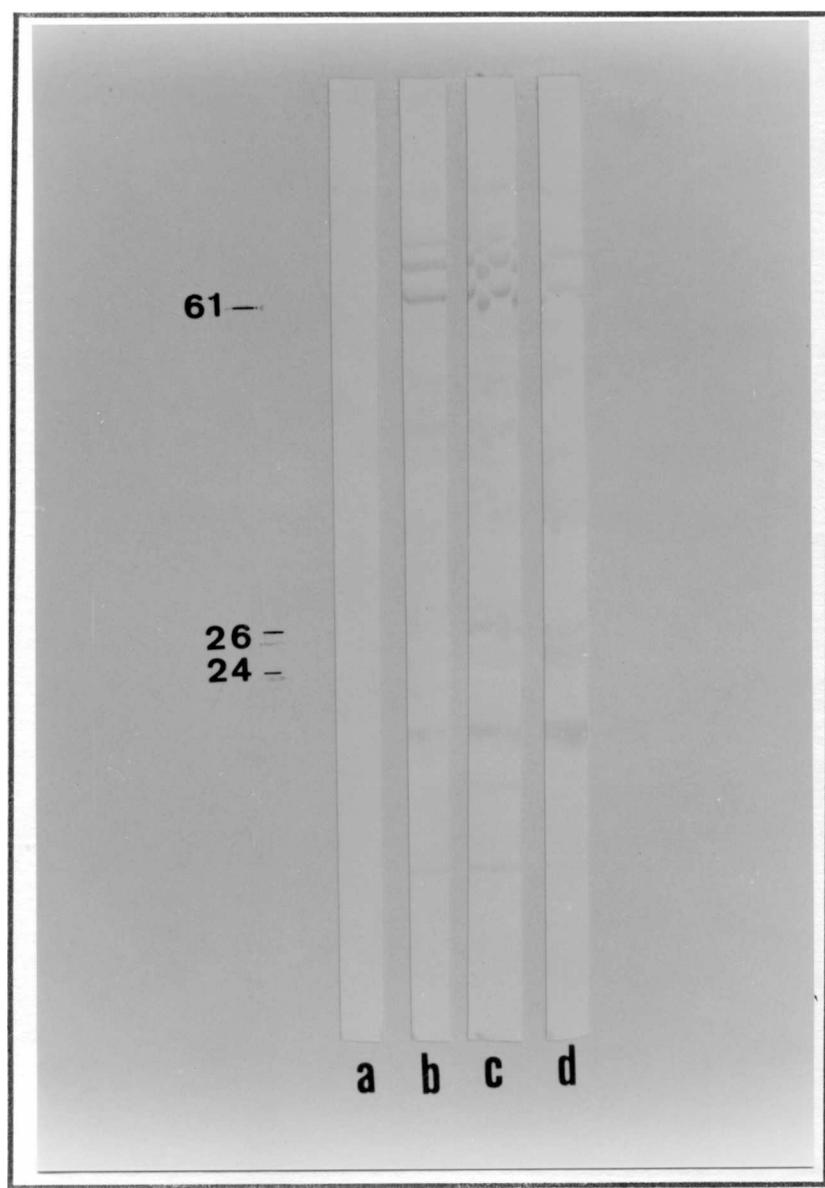


Figura # 13.- Inmunoelectrotransferencia de sueros de ratón F1(CBA XDBA)9
i) 7 día , (b) 60 día , (c) 90 y (d) 163 día post-infección con N -brasilensis .

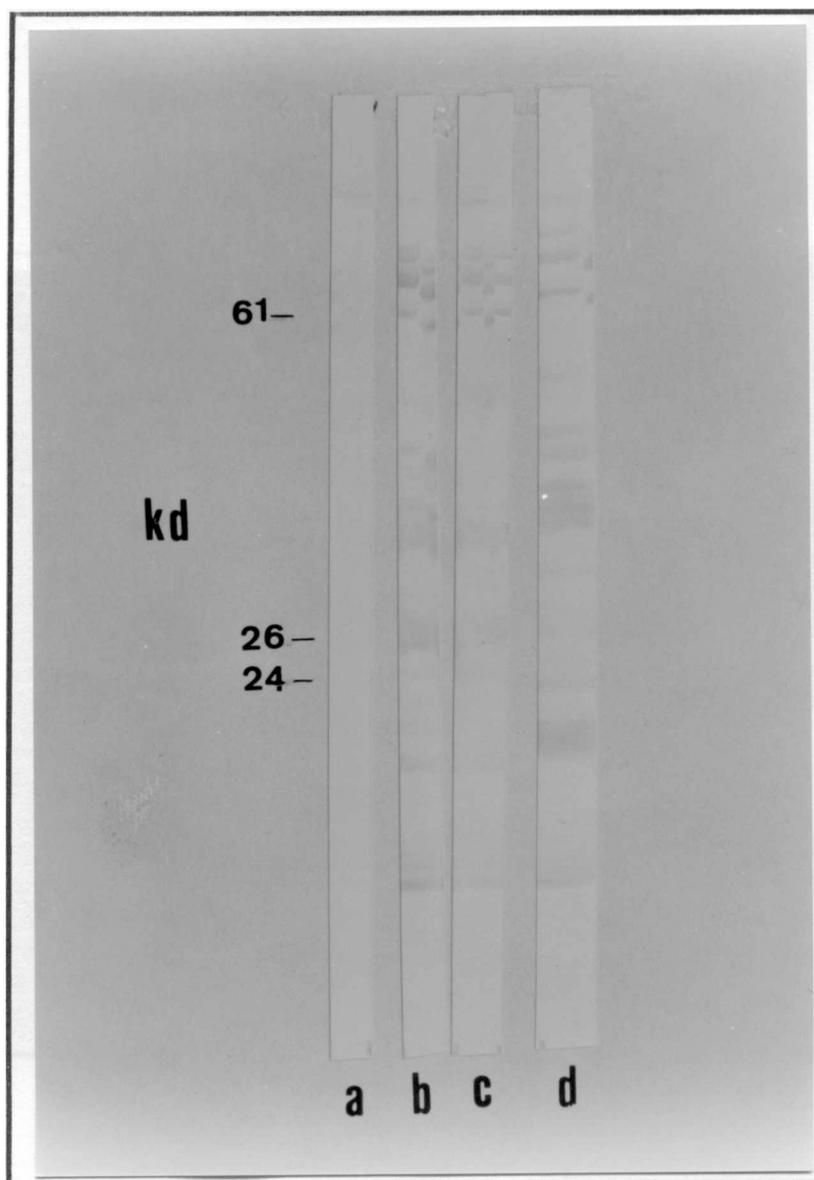


Figura # 14 .-Inmunoelectrotransferencia (W.B.) en sueros de ratón Fj(CBA X DBA)0> :
(a) 7 día ,(b) 60 día , (e) 90 día y (d) 163 día post-infección con N- brasilensis .

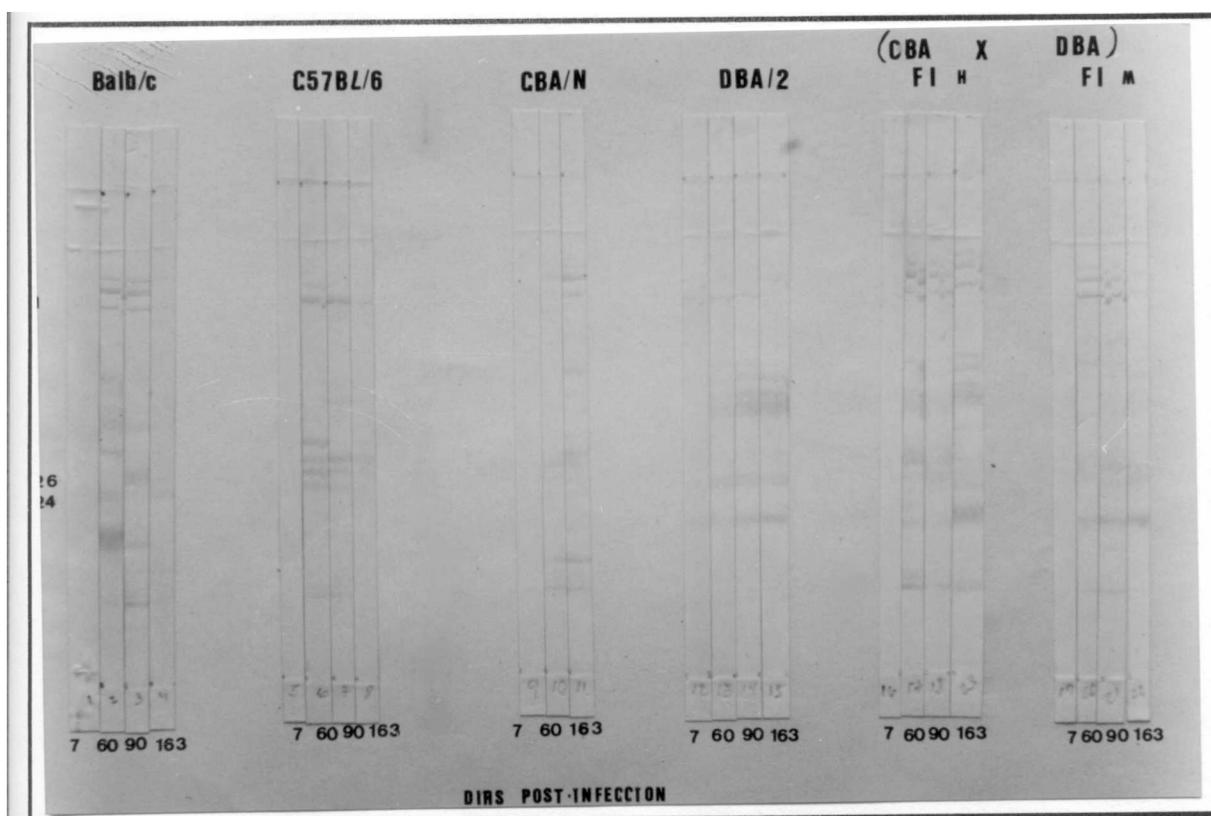


Figura # 15.- Resumen comparativo de un experimento típico de las inmunoelectrotransferencias obtenidas con los sueros de ratones utilizados en este trabajo .

1020091279

■I- IDENTIFICACION DEL ISOTIPO POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

El análisis para identificar el isotipo de anticuerpo anti-p26 y anti-p24 por inmunoelectrotransferencia en los sueros de ratón Balb/c a los 45 días post-infección , reveló ausencia de IgM y no de IgG , representados en la figura # 16 .



a b

Figura #16 Immunoelectrotransferencia del suero de ratón Balb/c , que revela el sotipo presente a los 45 días del proceso infeccioso por N. brasiliensis . En a se muestra γ M y en b IgG.

IV.- OBTENCION DE LAS PROTEINAS INMUNODOMINANTES p26 Y p24 DE

N. brasiliensis .

Una vez que identificamos los antígenos inmunodominantes, los semipurificamos por métodos fisicoquímicos previamente descritos en el laboratorio de Inmunología (37 , 38 , 39). Los resultados se muestran en la figura # 17 ,en donde se muestran las proteínas que fueron obtenidas; a y f los marcadores de peso molecular , el extracto proteico utilizado se muestra en los carriles b,e y h .En el carril c se muestra el resultado de la proteínas precipitadas con sulfato de amonio al 50 % de saturación en donde se encuentran p26 y p24 , a partir de donde se purifican estas dos proteínas en el tamiz molecular . En el carril d se observa el sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio y en los tres carriles marcados con g se observa una banda intensa que corresponde a p26 y p24 obtenidos después del volumen de elución en Sephadex G-100.

IV.- OBTENCION DE LAS PROTEINAS INMUNODOMINANTES p26 Y p24 DE

N. brasiliensis .

Una vez que identificamos los antígenos inmunodominantes, los semipurificamos por métodos fisicoquímicos previamente descritos en el laboratorio de Inmunología (37 , 38 , 39). Los resultados se muestran en la figura # 17 ,en donde se muestran las proteínas que fueron obtenidas; a y f los marcadores de peso molecular , el extracto proteico utilizado muestra en los carriles b,e y h .En el carril c se muestra el resultado de la proteínas precipitadas con sulfato de amonio al 50 % de saturación en donde se encuentran p26 y p24 , a partir de donde se purifican estas dos proteínas en el tamiz molecular . En el carril d se observa el sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio y en los tres carriles marcados con g se observa una banda intensa que corresponde a p26 y p24 obtenidos después del volumen de elución en Sephadex G-100.



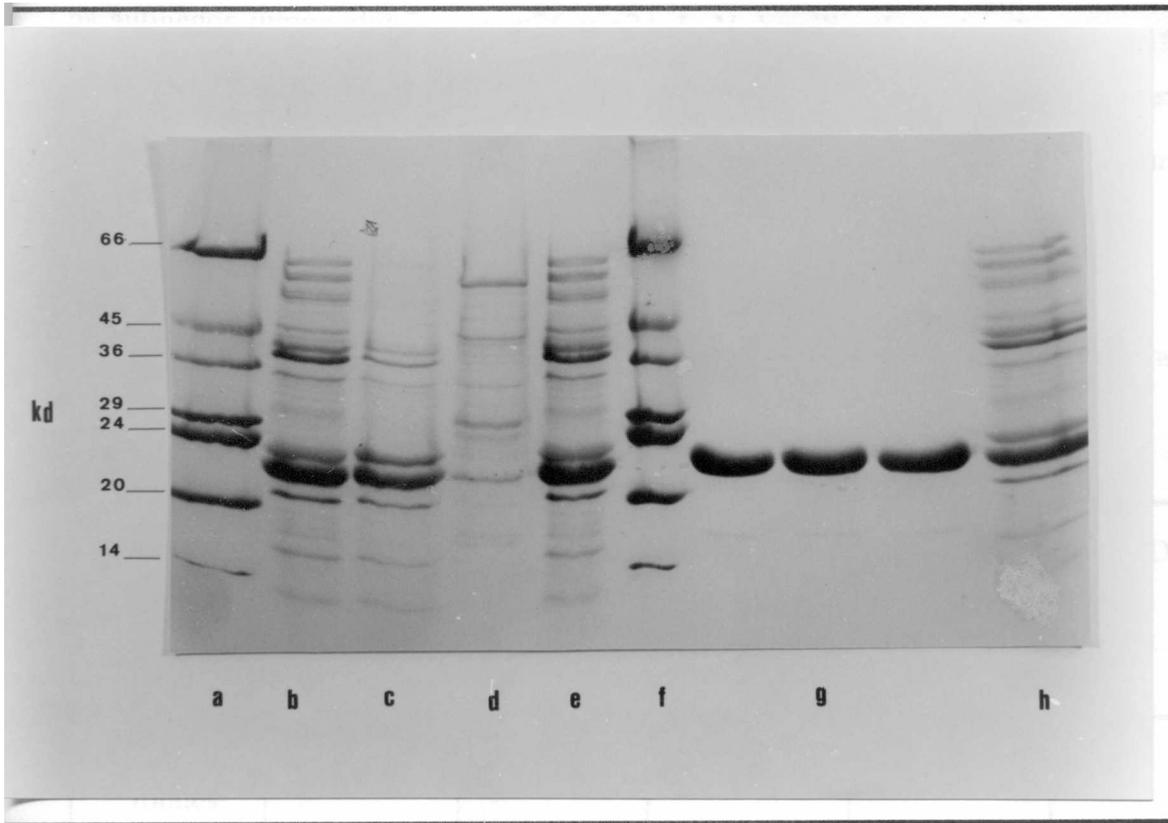


Figura # 17.- Electroforesis de proteínas de *N. brasiliensis* en un gel de poliacrilamida SDS en gradiente 8.75-18 , teñido con Coomassie :

s

a y f marcadores de peso molecular .

b,c y h extracto proteico total de *N. brasiliensis* .

c proteínas precipitadas con sulfato de amonio .

d sobrenadante de la precipitación .

g p26 y p24 obtenidas en la columna con sephadex G100.

Resultados de la determinación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de H- brasiliensis por ELISA en ratones :

Los antígenos inmunodominantes p26 y p24 de N. brasiliensis se incubaron en placas de poliestireno y mediante la técnica de ELISA se cuantificó el título de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 en el suero de ratones a diferentes tiempos de la infección. Las lecturas de OD obtenidas fueron las siguientes :

Tabla # 1.- Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 en cinco sueros de ratones infectados por el método de ELISA.

As st-in- cción	DO	DS	DO	DS	DO	-----\ DS
	Ig's totales		IgM		IgG	
	0.052	0.042	0.063	0.050	0.015	0.007
	0.085	0.034	0.193	0.070	0.078	0.080
	0.128	0.044	0.211	0.140	0.152	0.113
	0.485	0.060	0.217	0.070	0.823	0.647
	0.870	0.570	0.187	0.060	0.965	0.591
	0.802	0.570	0.178	0.048	0.891	0.659
	0.784	0.470	0.168	0.054	1.089	0.378
	0.717	0.173	0.130	0.076	0.986	0.305
3	1.264	0.036	0.144	0.050	1.148	0.053

i- Resultados de la determinación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de N- brasiliensis

por ELISA en ratones :

Los antígenos inmunodominantes p26 y p24 de N. brasiliensis se incubaron en placas de poliestireno y mediante la técnica de ELISA se cuantificó el título de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 en el suero de ratones a diferentes tiempos de la infección .Las lecturas de)0 obtenidas fueron las siguientes :

Tabla # L- Cuantificación de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 en cinco sueros de ratones 3alb/c por el método de ELISA.

Días post-infección	DO	DS	DO	DS	DO	DS
	Ig's totales		IgM		IgG	
	0.052	0.042	0.063	0.050	0.015	0.007
	0.085	0.034	0.193	0.070	0.078	0.080
11	0.128	0.044	0.211	0.140	0.152	0.113
8	0.485	0.060	0.217	0.070	0.823	0.647
15	0.870	0.570	0.187	0.060	0.965	0.591
0	0.802	0.570	0.178	0.048	0.891	0.659
0	0.784	0.470	0.168	0.054	1.089	0.378
0	0.717	0.173	0.130	0.076	0.986	0.305
63	1.264	0.036	0.144	0.050	1.148	0.053

y

labia # 2.- Cuantificación de anticuerpos anti-p24 y p26 en cinco sueros de ratones

C57BL/6 por el método de E.L.I.S.A.

Días post-infección	DO	DS	DO	DS	DO	DS \
	Ig's totales		IgM		IgG	
1	0.088	0.052	0.024	0.037	0.023	0.016
7	0.050	0.049	0.105	0.030	0.060	0.009
14	0.555	0.269	0.194	0.069	0.586	0.651
28	0.782	0.391	0.150	0.059	0.875	0.487
15	1.077	0.373	0.219	0.084	1.044	0.533
50	1.031	0.382	0.246	0.157	0.984	0.533
SO	1.072	0.216	0.168	0.049	0.877	0.484
70	1.341	0.066	0.192	0.086-	1.352	0.060
163	1.312	0.113	0.088	0.059	1.081	0.060

Tabla # 3 . - Cuantificación de anticuerpos anti-p24 y anti-p26 en cinco sueros de ratones

BA/2 por el método de E.L.I.S.A.

as st-in- tión	DO	DS	DO	DS	DO	DS
	Ig's totales		Ig M		Ig G	
	0.022	0.020	0.065	0.039	0.026	0.029
	0.078	0.091	0.084	0.066	0.055	0.090
	0.131	0.060	0.145	0.104	0.141	0.162
	0.805	0.366	0.143	0.087	1.005	0.488
	0.505	0.297	0.138	0.110	0.852	0.453
	0.285	0.074	0.183	0.096	0.389	0.014
	0.401	0.067	0.180	0.061	0.643	0.334
	0.560	0.244	0.065	0.013	1.082	0.284
	0.512	0.570	0.101	0.120	0.393	0.526^

1 Tabla # 4 .- Cuantificación de anticuerpos anti-p24 y anti-p26 en cinco sueros de ratones

CBA/N por el método de E.L.I.S.A.

<i>f</i> ----- Días post-in- fección	DO	DS	DO	DS	DO	-----\ DS
	Ig's totales		Ig M		Ig G	
0	0.089	0.062	0.115	0.132	0.077	0.102
7	0.012	0.006	0.067	0.067	0.026	0.026
14	0.296	0.257	0.184	0.113	0.460	0.560
28	0.818	0.330	0.119	0.084	1.184	0.190
15	1.102	0.204	0.117	0.101	1.290	0.112
60	1.066	0.219	0.142	0.091	1.226	0.122
80	1.086	0.027	0.149	0.018	1.193	0.034
90	1.126	0.313	0.064	0.011	1.173	0.337
1°	1.426	0.112	0.098	0.098	1.329	0.087^

lia # 5.- Cuantificación de anticuerpos anti-p24 y anti-p26 en cinco sueros de ratones

M/N X DBA/2) 9 , por el método de ELISA.

•in- ión	DO	DS	DO	DS	DO	-----V DS
	Ig totales		IgM		IgG	
	0.042	0.057	0.006	0.009	0.046	0.060
	0.173	0.180	0.135	0.122	0.158	0.181
	0.296	0.189	0.162	0.068	0.364	0.333
	0.983	0.288	0.156	0.049	1.222	0.130
	1.130	0.110	0.212	0.043	1.303	0.049
	1.135	0.176	0.214	0.070	1.253	0.035
	1.053	0.193	0.226	0.067	1.176	0.167
	0.973	0.203	0.229	0.024	1.136	0.133
	1.414	0.033	0.202	0.084	1.220	0.087^

6.- Cuantificación de anticuerpos anti-p24 Y anti-n26 en cinco sueros, de ratones.

UBA/N X DBA/2) O* , por el método de ELISA.

n st-in- ción	DO ^	DS 1	DO ^	DS ^	DO '	DS \
	Ig's totales		IgM		IgG	
	0.013	0.007	0.002	0.002	0.006	0.014
	0.033	0.023	0.043	0.026	0.001	0.002
	0.185	0.154	0.044	0.039	0.225	0.220
	0.533	0.100	0.036	0.029	0.577	0.148
	1.052	0.299	0.044	0.019	1.175	0.137
	1.319	0.113	0.055	0.019	1.275	0.107
	1.043	0.150	0.061	0.029	1.259	0.186
	1.074	0.147	0.110	0.051	1.229	0.091
!	1.331	0.054	0.063	0.088	1.191	0.167

Tabla # 6.- Cuantificación de anticuerpos anti-p24 y anti-p26 en cinco sueros de ratones

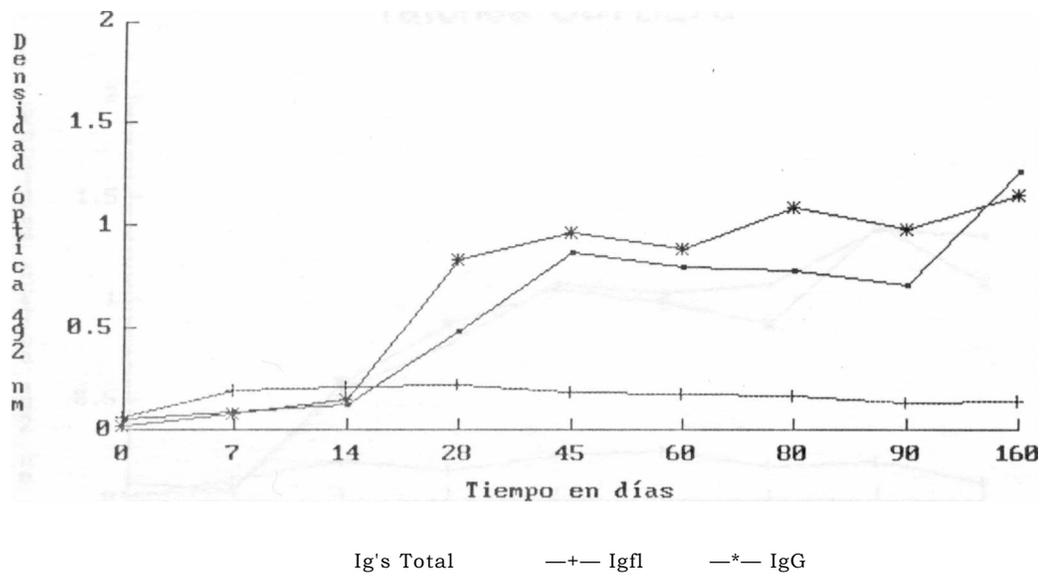
$I(CBA/N \times DBA/2) O^*$, por el método de ELISA.

lías ost-in- icción	DO	DS	DO	DS	DO	DS
	Ig's totales		IgM		IgG	
1	0.013	0.007	0.002	0.002	0.006	0.014
■	0.033	0.023	0.043	0.026	0.001	0.002
r	0.185	0.154	0.044	0.039	0.225	0.220
1	0.533	0.100	0.036	0.029	0.577	0.148
115	1.052	0.299	0.044	0.019	1.175	0.137
1	1.319	0.113	0.055	0.019	1.275	0.107
9°	1.043	0.150	0.061	0.029	1.259	0.186
lo	1.074	0.147	0.110	0.051	1.229	0.091
■63	1.331	0.054	0.063	0.088	1.191	0.167 [^]

Los valores de absorbancias corresponden a la media de cinco absorbancias que a su vez corresponden a cada suero de un grupo de cinco ratones . La concentración total de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 , así como su isotipo se muestra en las gráficas de la #1 a la #6 para Balb/c , C57BL/6 , CBA/N , DBA/2 , F1(CBA/N X DBA2) **9** *il* F1 (CBA/N X BDA/2) O* respectivamente . En las gráficas #7 y #8 se muestra los **!** resúmenes de la determinación de anticuerpos totales, IgM e IgG anti-p26 y anti-p24 de

¹N. brasiliensis .

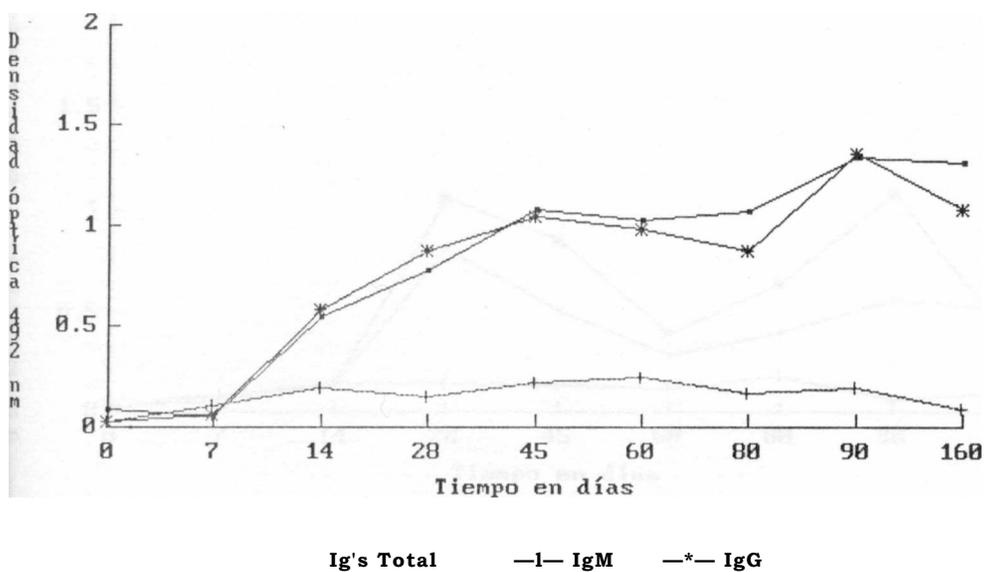
Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N.brasiliensis* en ratones Balb/c



valor de 5 por grupo

Gráfica # 1 Determinación de anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 de *N. brasiliensis* en ratones Balb/c a diferentes tiempos de la infección por *N. brasiliensis*. (*) representa el valor de anticuerpos totales, (-) representa el valor de IgG y (+) el valor de IgM. La \bar{Y} corresponde a la media de cinco valores de DO. El máximo de \bar{Y} es de 1.264 D.O.

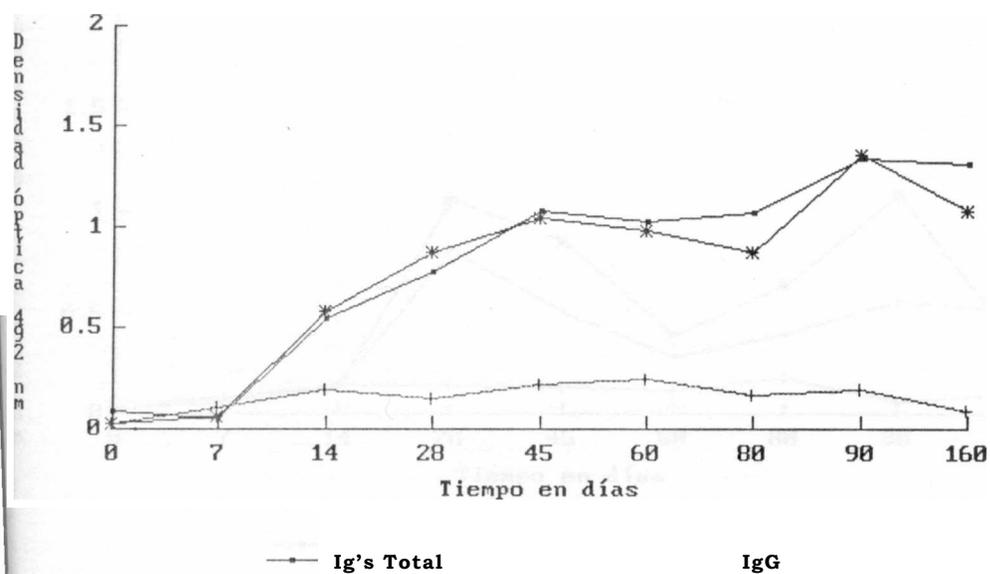
Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N.brasiliensis* en ratones C57BL/6



r de n= 5 por grupo

gráfica # 2 - Determinación de anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 de *N. brasiliensis* C57BL/6 a diferentes tiempos de la infección por *N. brasiliensis*. (*) representa anticuerpos totales, (-) representa el valor de IgG y (+) el valor de IgM. La r responde a la media de cinco DO. El máximo de Y es de 1.341 DO.

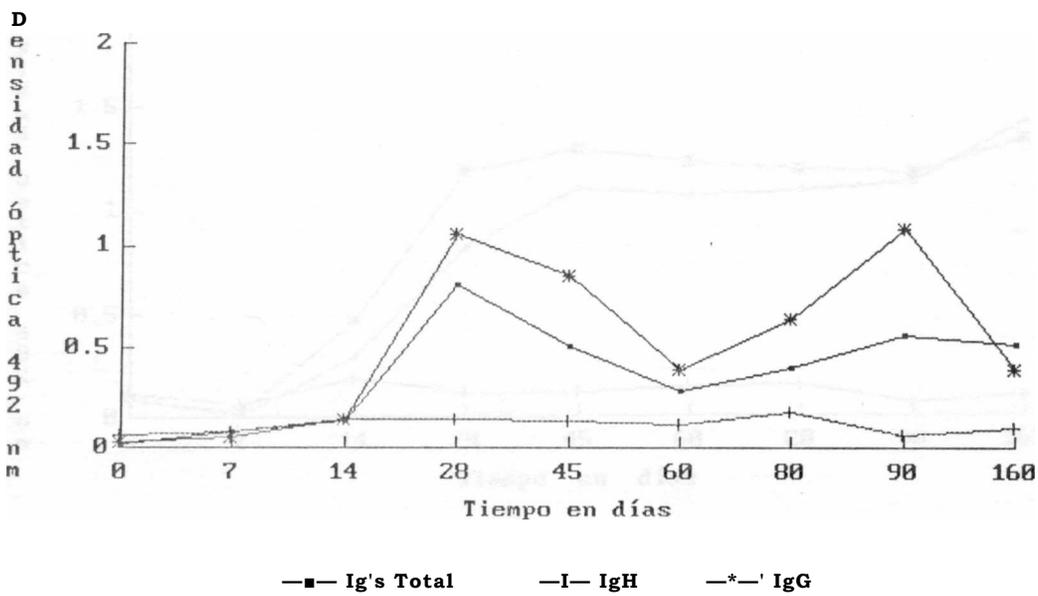
Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N.brasiliensis* en ratones C57BL/6



or de n= 5 por grupo

grafica # 2.- Determinación de anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 de *N.brasiliensis* en ratones C57BL/6 a diferentes tiempos de la infección por *N.brasiliensis*. (*) representa el valor de anticuerpos totales, (-) representa el valor de IgG y (+) el valor de IgM. La Y corresponde a la media de cinco DO. El máximo de Y es de 1.341 DO.

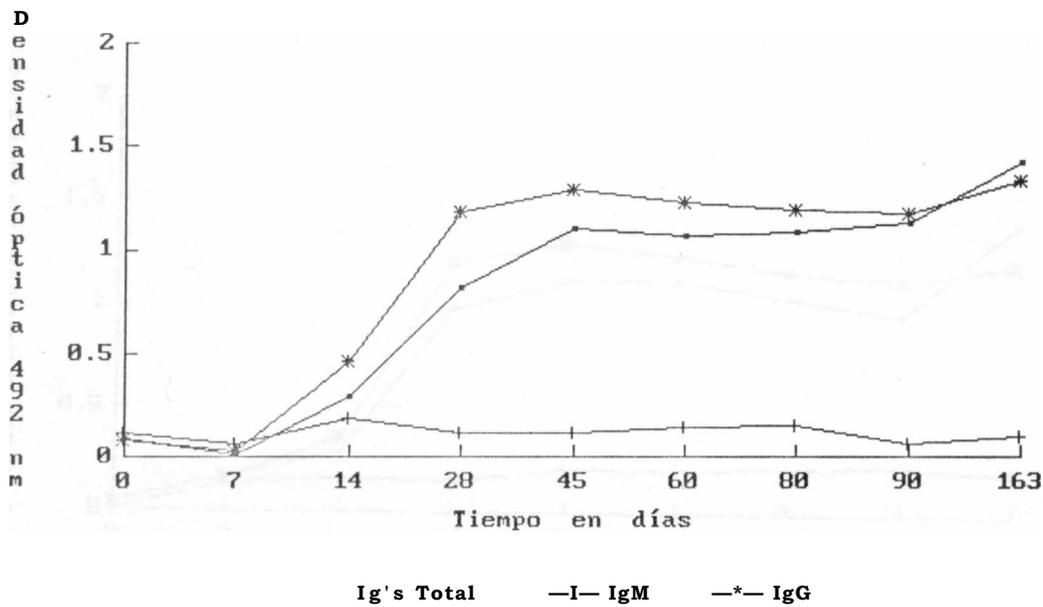
Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N.brasiliensis* en ratones DBA/2



Valor de n= 5 por grupo

Gráfica #3 .- Determinación de anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 de *N[- brasiliensis* ratones DBA/2 a diferentes tiempos de la infección por *N.brasiliensis*. (*) representa el valor anticuerpos totales , (-) representa el valor de IgG y (+) representa el de IgM . La ca corresponde a la media de cinco DO. El máximo de *Y* es de 1.082 DO .

Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N.brasiliensis* en ratones CBA/N



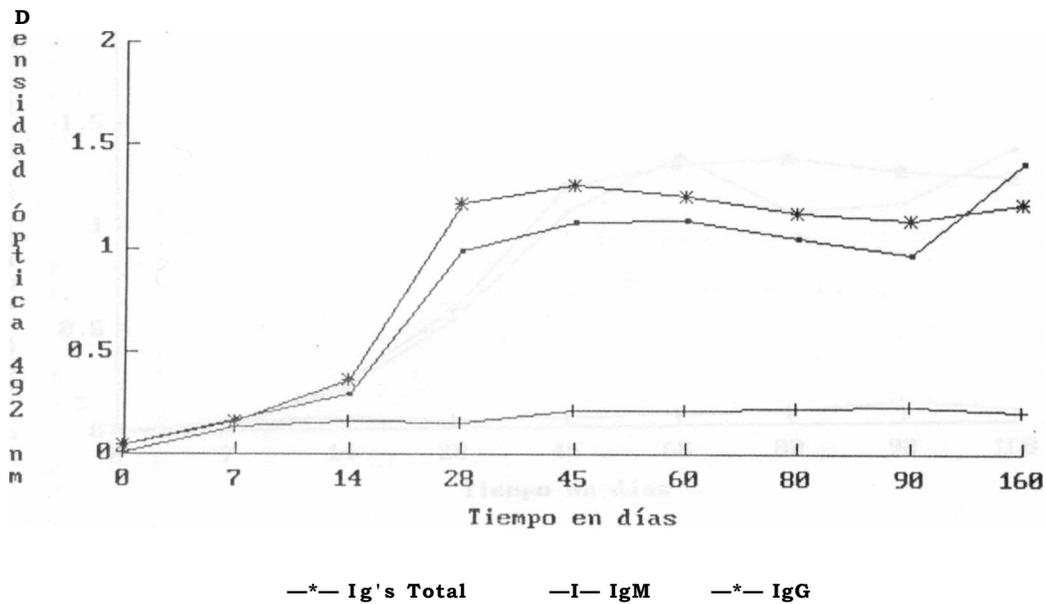
Valor de n= 5 por grupo

Gráfica # 4.- Determinación de anticuerpos séricos anti-26 anti-p24 de *brasiliensis* en ratones CBA/N a diferentes tiempos de la infección por *N.brasiliensis*.

) representa el valor de anticuerpos totales , (-) representa el valor de IgG y (+) representa de IgM. La gráfica corresponde a la media de cinco DO . El máximo de Y es de 1.426

0.

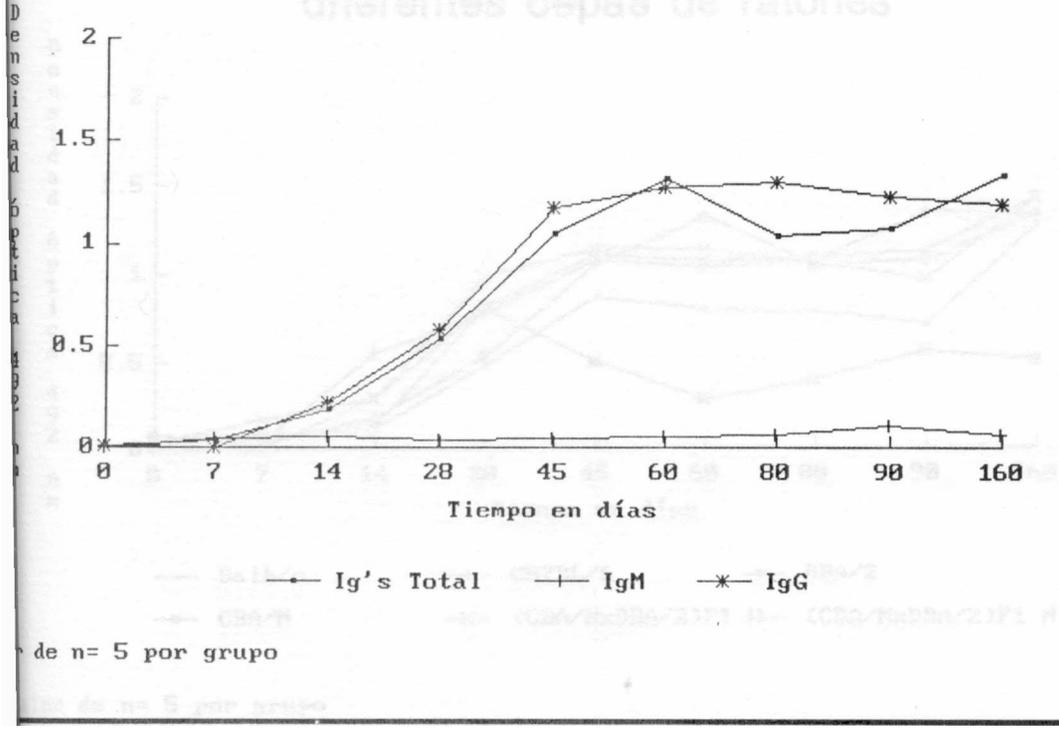
Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N. brasiliensis* en ratones F1(CBA/N X DBA/2) Hembra



Valor de n= 5 por grupo

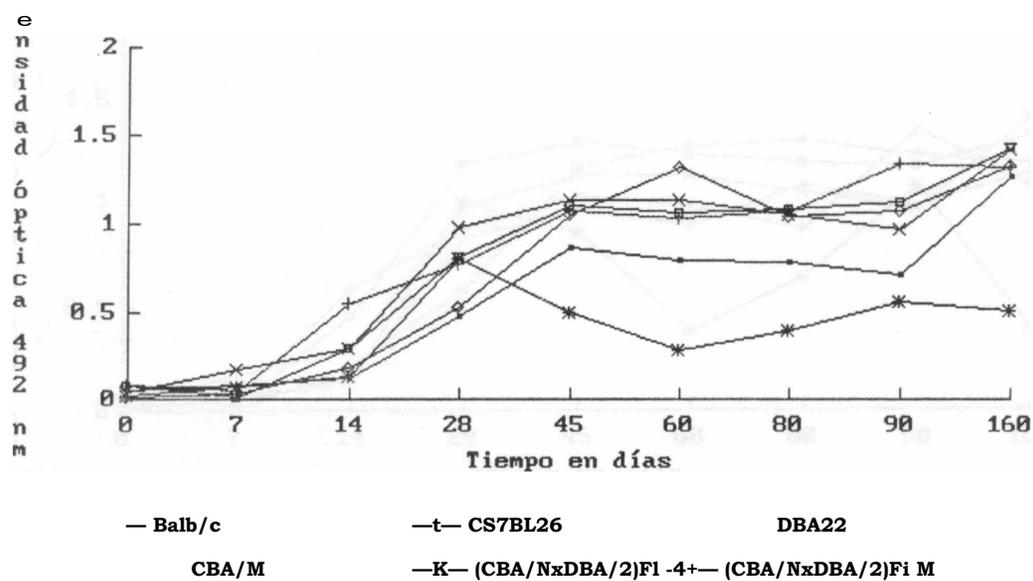
Gráfica # 5.- Determinación de anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 de *N. brasiliensis* en ratones F₁ (CBA X DBA) 9 a diferentes tiempos de la infección por *N. brasiliensis*. (*) representa el valor de anticuerpos totales, (-) representa el valor de IgM y (+) el valor de IgG. La gráfica corresponde a la media de cinco DO. El máximo de Y es de 1.414 DO.

Determinación de Anticuerpos Dirigidos
 Contra p24 y p26 de *N.brasiliensis* en
 ratones F1(CBA/N X DBA/2) Macho en
 diferentes cepas de ratones



gráfica # 6.- Determinación de anticuerpos séricos anti-p26 y anti p24 de *N. brasiliensis* en ratones F1 (CBA X DBA) CX* a diferentes tiempos de la infección por *N.brasiliensis*. (*) \bar{Y} el valor de anticuerpos totales, (-) representa el valor de IgG y (+) el valor de IgM. La gráfica corresponde a la media de cinco DO. El máximo de \bar{Y} es de 1.331 DO.

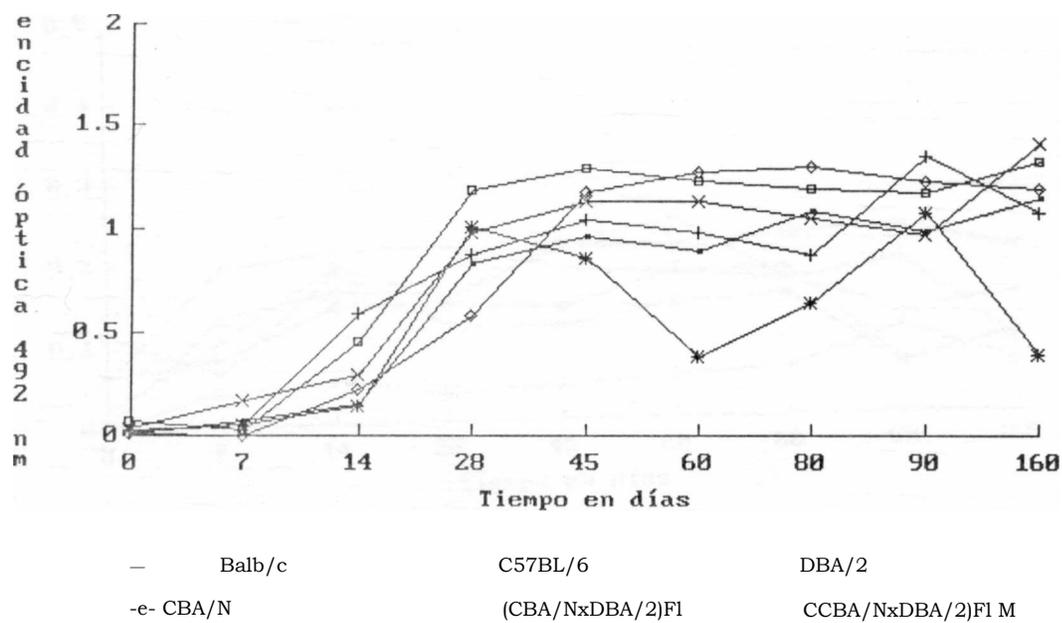
Determinación de Anticuerpos Dirigidos Contra p24 y p26 de *N. brasiliensis* en diferentes cepas de ratones



Valor de n= 5 por grupo

Gráfica # 7.- Comparación de valores de DO obtenidos en la determinación de anticuerpos totales, para cada grupo de ratones en el proceso infeccioso por *N. brasiliensis*. El máximo de Y es de 1.426 DO.

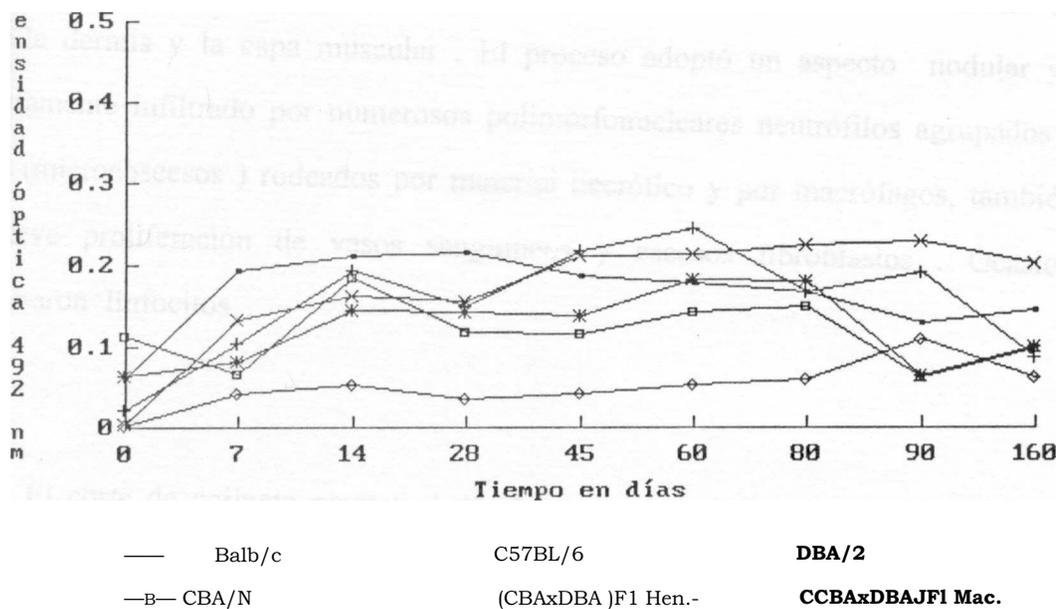
Isotipo IgG de ratones para p24 y p26 de *Nocardia brasiliensis*



Ualor de n= 5 por grupo

Gráfica # 8.- DO y su comparación en la determinación de anticuerpos IgG totales específicos para p26 y p24 de *N.brasiliensis* , para cada grupo de ratones en diferentes tiempos del proceso infeccioso por *N.brasiliensis* . El máximo de Y es 1.352 DO.

Isotipo IgM de ratones para p24 y p26 de *Nocardia brasiliensis*



¡Valor de n= 5 por grupo

Gráfica # 9.- Comparación de DO obtenidas en la determinación de anticuerpos IgM específicos para *N. brasiliensis* totales, para cada grupo de cepas de ratones en el proceso infeccioso por *N. brasiliensis*. El máximo de *Y* es de 0.246 DO.

RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCOPICO EN EL MICETOMA POR

N.brasiliensis.

Paralelamente a este trabajo se realizó una serie de cortes histológicos en cojinete plantar ratones Balb/c con micetoma, en la figura # 18 se muestra un corte de cojinete plantar un ratón Balb/c antes de ser infectado . A diferentes tiempos de la infección , los resultados nidos al día 7 (figura #19) post-infección mostró un proceso inflamatorio agudo situado e la dermis y la capa muscular . El proceso adoptó un aspecto nodular y se encontró lusamente infiltrado por numerosos polimorfonucleares neutrófilos agrupados en pequeños s (microabscesos) rodeados por material necrótico y por macrófagos, también se observó leve proliferación de vasos sanguíneos y escasos fibroblastos . Ocasionalmente se ntraron linfocitos .

El corte de cojinete plantar al día 14, mostrado en la figura # 20 , post-infección fue ejante al anterior solo que disminuyó la proporción de polimorfonucleares y se observaron os microabscesos , aumento en mononucleares y tejido fibrovascular .

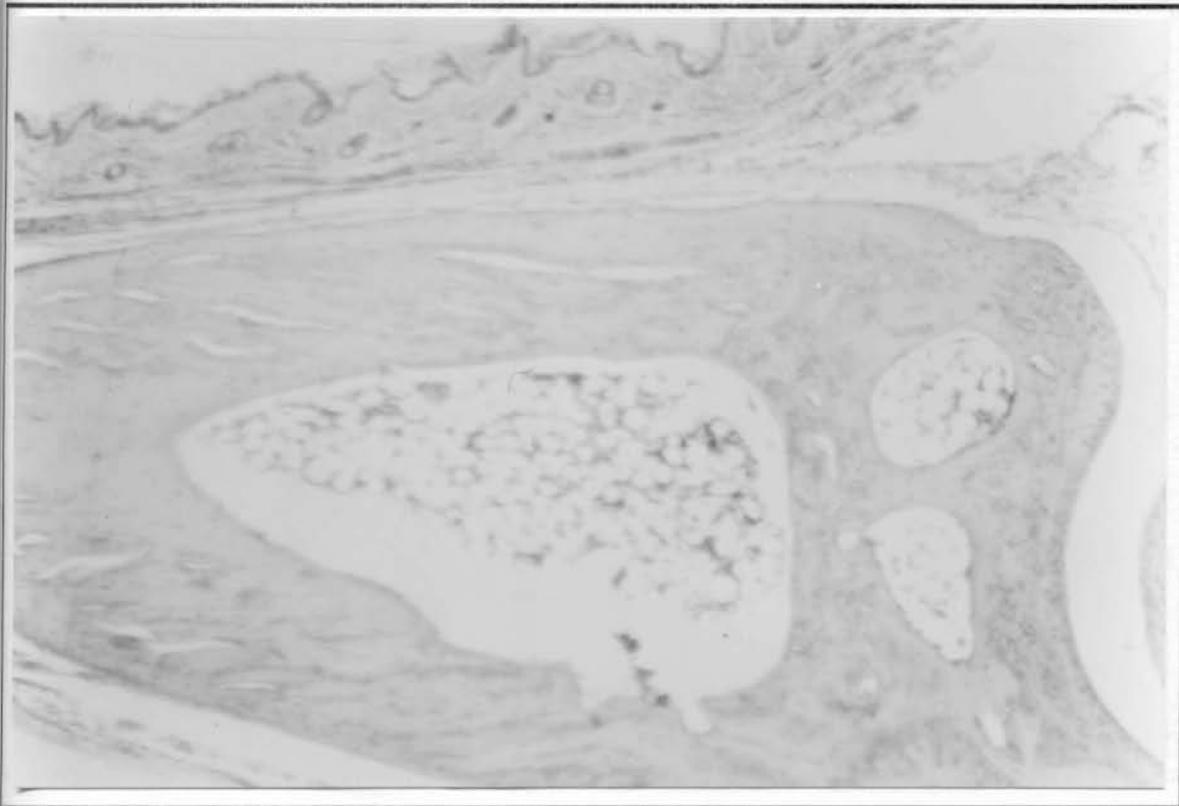


Figura # 18.- Sección histológica (40X) de cojinete plantar de un ratón Balb/c no afectado .

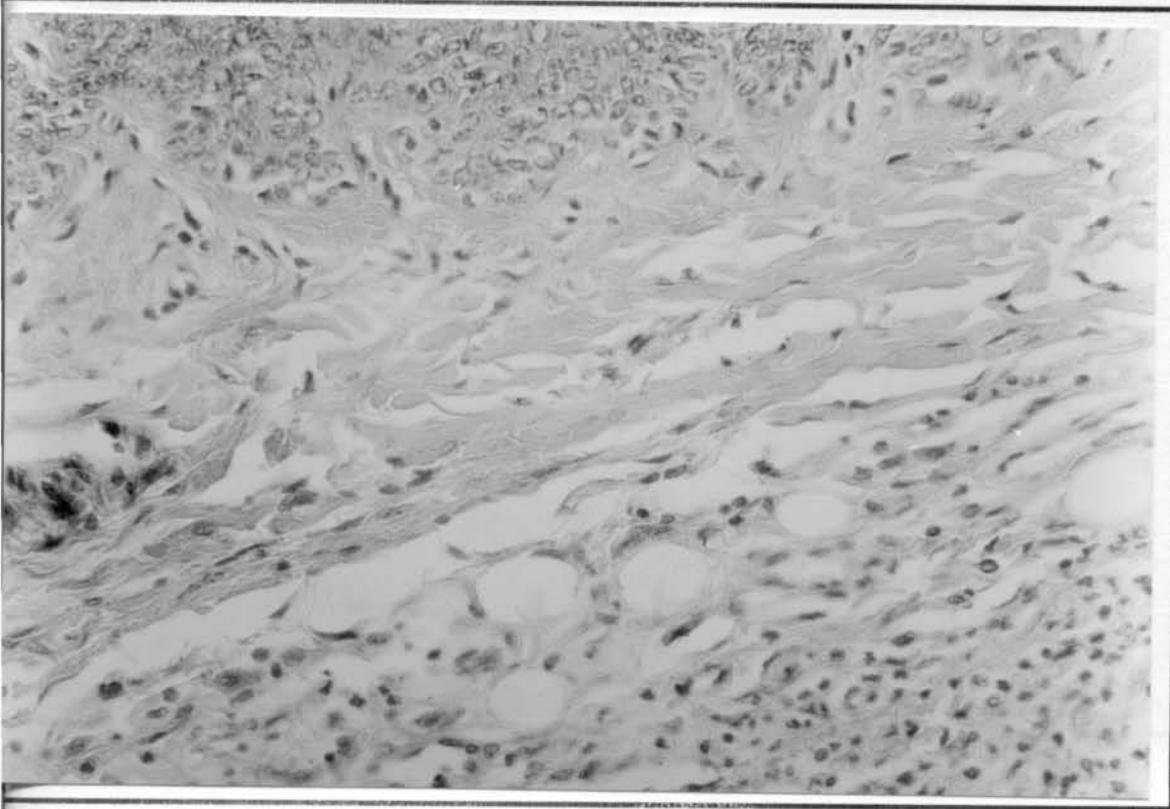


Figura # 19.- Sección histológica (40X) de cojinete plantar de un ratón Balb/c que muestra un proceso inflamatorio agudo situado entre la dermis (porción superior) y la túnica albuginea (porción inferior), inducida por la *N. brasiliensis* siete días post-infección.



Figura # 20.- Sección histológica (10X) de cojinete plantar de ratón Balb/c que muestra Dceso agudo con aspecto nodular e infiltrado por numerosos polimorfonucleares filo, agrupados en pequeños focos (escasos microabcesos) , rodeados por células fágicas, 14 días post-infección con N.brasiliensis .

Veinticinco días después de la infección , se observó un proceso inflamatorio mixto en la dermis , la hipodermis y el paquete neuromuscular ; los elementos infiltrantes son las células (mononucleares y polimorfonucleares) en la dermis y en el paquete neuromuscular siendo los mononucleares linfocitos y células plasmáticas. Además se observan algunos histiocitos espumosos . Vease la figura #21.

En una sección de cojinete plantar a los noventa días después de la infección experimental se observa un extenso proceso inflamatorio y reparador de los tejidos blandos , este proceso se caracteriza por la presencia de múltiples microabscesos revestidos por tejido fibroso adentro de los cuales aparecen estructuras hematofílicas basófilas de forma arriñonada con numerosas clavas periféricas eosinófilas que descansan sobre una matriz finamente filamentosa . En algunas ocasiones presenta rarefacción central que toman la forma anular . Estas inclusiones corresponden a granulos de *N. brasiliensis* y se encuentran profusamente rodeados por una reacción polimorfonuclear . Es interesante que en la periferia aparecen células de probable origen monocítico de gran tamaño cuyo citoplasma es claro y finamente granular y de aspecto vacuolado . Rodeando los microabscesos aparecen una marcada reacción angio y fibroblástica . Los septos de contención que se encuentra infiltrada por elementos inflamatorios . Vease figura # 22 y 23.

Veinticinco días después de la infección , se observó un proceso inflamatorio mixto afecta la dermis , la hipodermis y el paquete neuromuscular ; los elementos infiltratorios mixtos (mononucleares y polimorfonucleares) en la dermis y en el paquete neuromuscular (dominando los mononucleares siendo estas linfocitos y células plasmáticas. Además se tiraron algunos histiocitos espumosos . Vease la figura #21.

La sección de cojinete plantar a los noventa días después de la infección experimental mostró un extenso proceso inflamatorio y reparador de los tejidos blandos , este proceso se caracterizó por la presencia de múltiples microabscesos revestidos por tejido fibroso adentro de los cuales aparecen estructuras hematofílicas basófilas de forma arrionada con numerosas diminutas clavos periféricas eosinófilas que descansan sobre una matriz finamente filamentosa de las cuales en ocasiones presenta rarefacción central que toman la forma anular . Estas estructuras corresponden a granulos de *N. brasiliensis* y se encuentran profusamente rodeados por una reacción polimorfonuclear . Es interesante que en la periferia aparecen células de probable origen histiocítico de gran tamaño cuyo citoplasma es claro y finamente granular y de aspecto espumoso . Rodeando los microabscesos aparecen una marcada reacción angio y fibroblástica en forma de septos de contención que se encuentra infiltrada por elementos inflamatorios . Vease figura # 22 y 23.

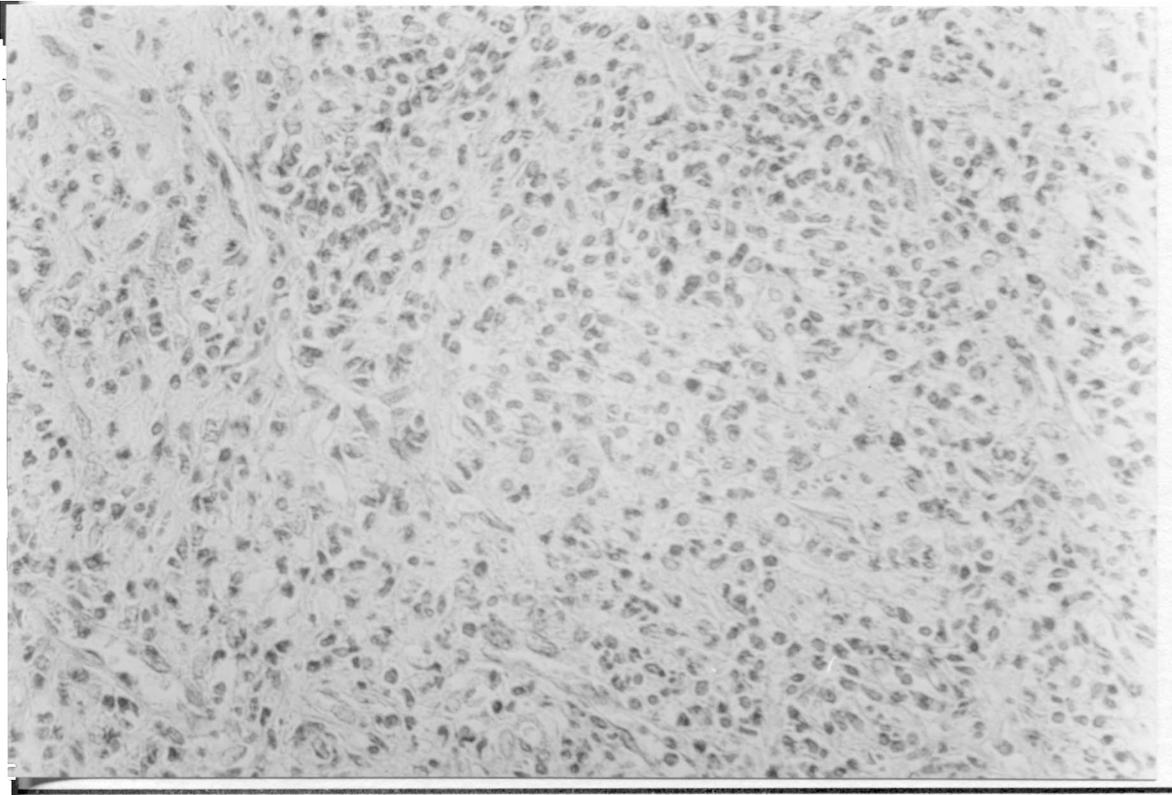


Figura # 21 . - Sección histológica (40X) de cojinete plantar de ratón Balb/c al día 14

Infección con *N. brasiliensis* que muestra un proceso más proliferativo, con un aumento
de las fibras de colágeno , vasos sanguíneos y una abundante cantidad de monocitos y linfocitos
y células plasmáticas .

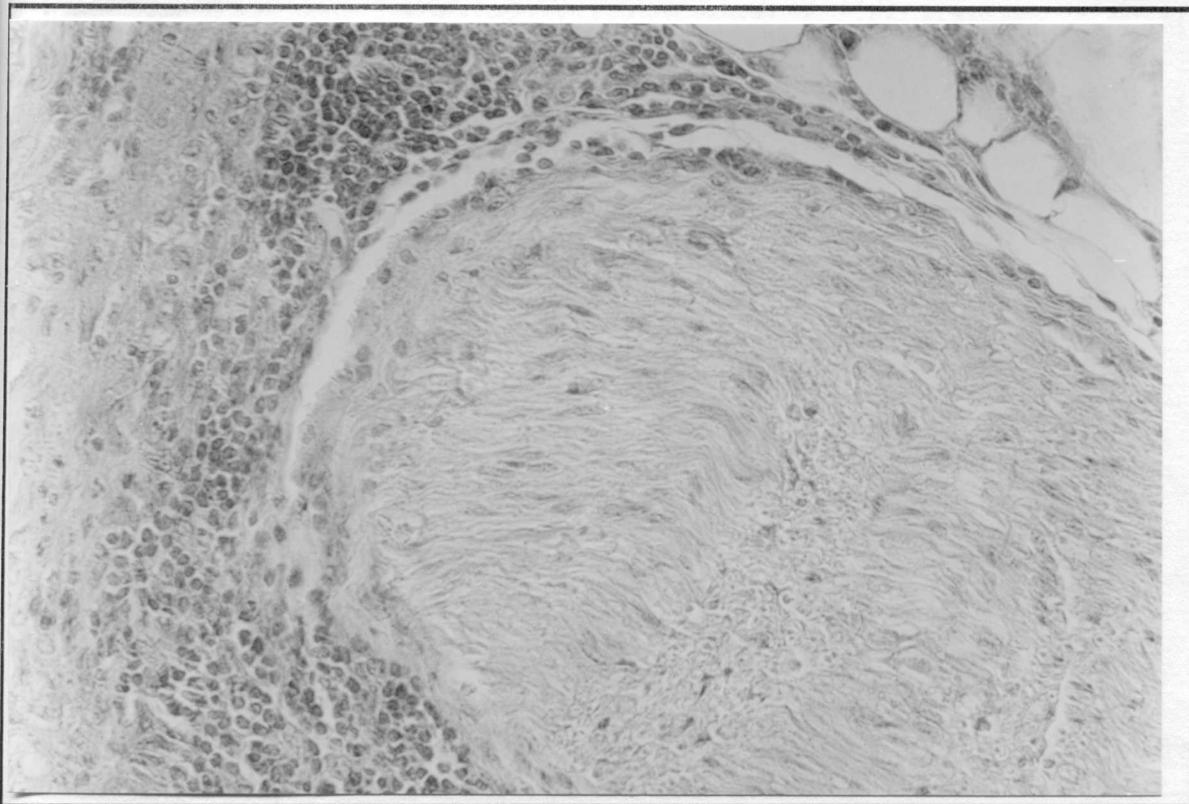


Figura # 22.- Sección histológica (40X) de cojinete plantar que muestra un proceso mixto (agudo y crónico) y afecta la dérinis , hipodérmis y el paquete neuromuscular, las células (presentes en esta etapa son principalmente monocitos y polimorfonucleares , este proceso apareció al 25 día post-inlección con *N. brasiliensis* .

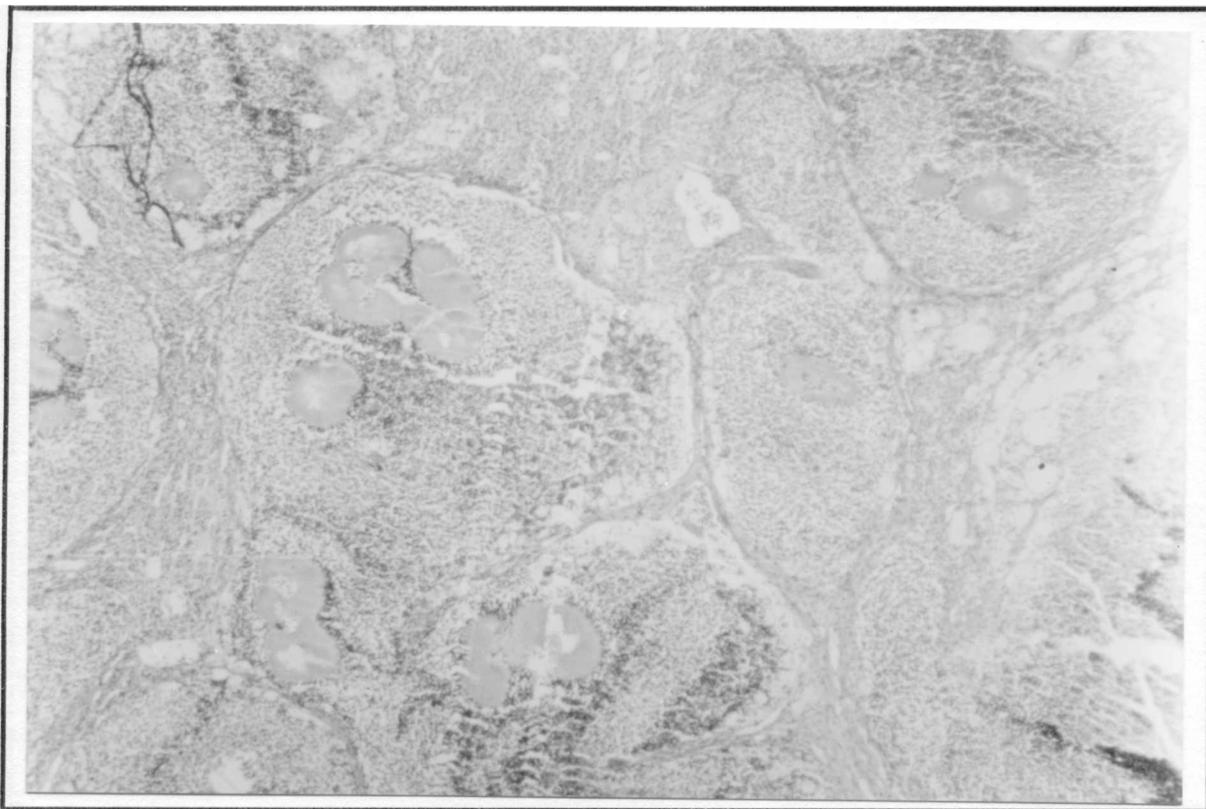


Figura # 23.-Sección histológica vista a 10X de cojinete plantar de un ratón Balb/c al 90 día post-infección con *N. brasiliensis* , este corte muestra una lesión florida que se caracteriza por la presencia de microabscesos revestido por tejido fibroso, Lesión brasiliensis (ver descripción en resultados) .

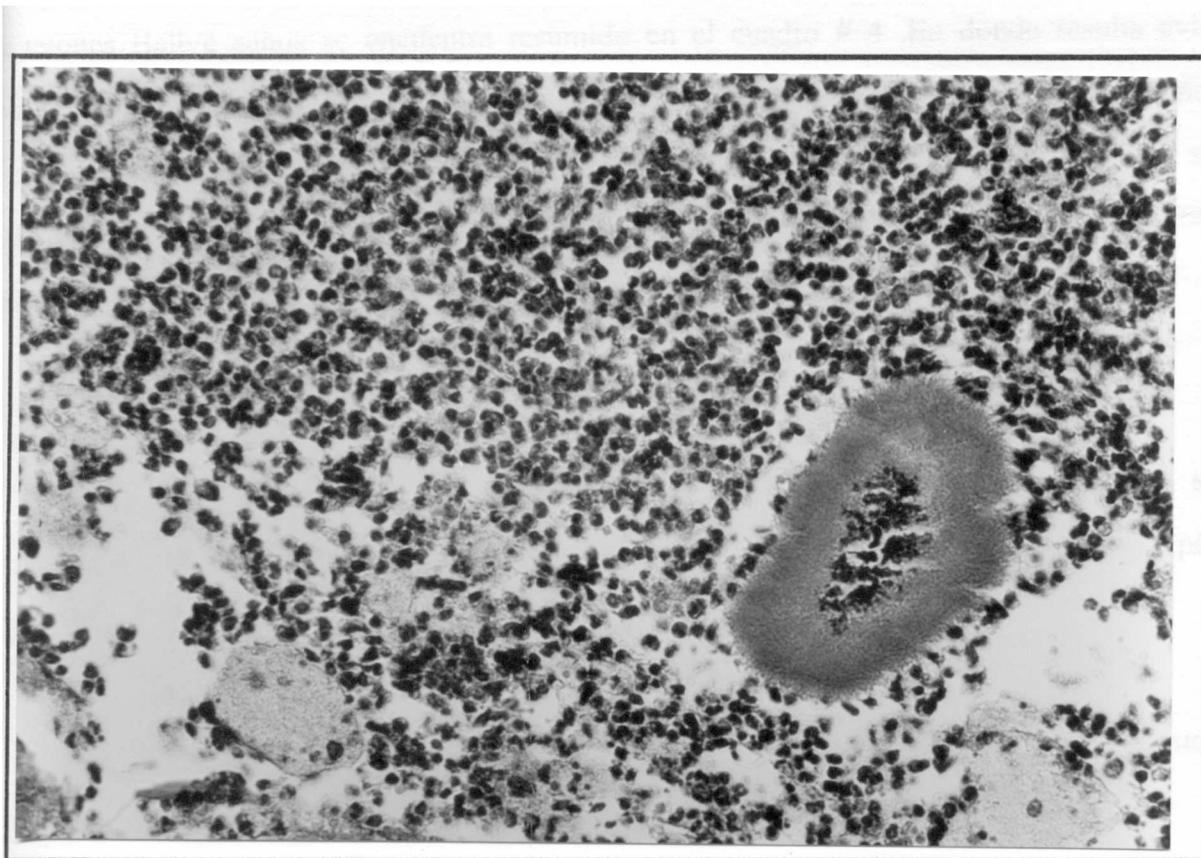


Figura # 24.- Sección histológica de cojinete plantar a los 90 días post-infección con brasiliensis vista a 40X que muestra la presencia de células gigantes y las microcolonias eadas de un material hialino, además de un infiltrado celular constituido principalmente macrófagos.

fI- TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE INMUNIDAD HUMORAL ANTI-

N.brasiliensis EN RATONES Balb/c.

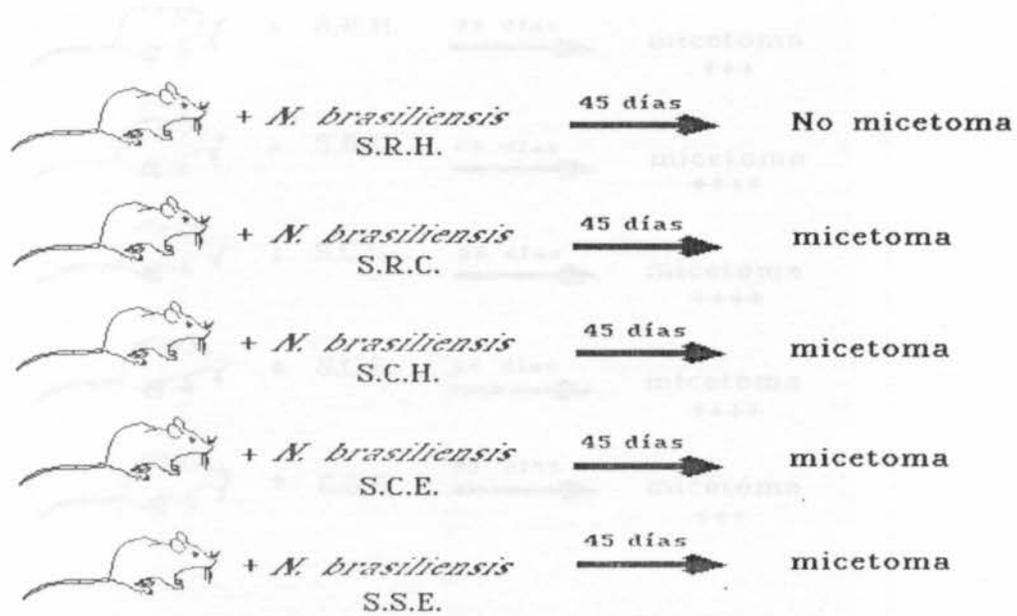
Los resultados de los experimentos de transferencia de inmunidad humoral para evaluar los sueros hiperinmunes en el establecimiento de la infección experimental por N. brasiliensis en ratones Balb/c sanos se encuentra resumido en el cuadro # 4. En donde resulta evidente que solo el suero de ratón hiperinmune obtenido de la inmunización con bacterias muertas fue capaz de prevenir el desarrollo de micetoma. Para evaluar el efecto de los sueros hiperinmunes en la resolución del micetoma encontramos que ninguno de los sueros probados fue capaz de curar o mejorar una lesión establecida de micetoma experimental.

Las concentraciones de anticuerpos anti-p26 y anti-p24 presentes en los sueros hiperinmunes fueron determinados por el método de ELISA, que fue descrito en páginas anteriores, los resultados fueron los siguientes:

- a. - Suero de ratón inmunizado con N- brasiliensis muerta por calor, dió una DO de 1.532.
- b. - Suero de ratones curados espontáneamente a los 300 días de haber sido infectado y además desarrollaron micetoma por N. brasiliensis, dió una DO de 1.072.
- c. - Suero de conejo inmunizado con N. brasiliensis muertas por calor obtenido por protocolo de inmunización (ver material y métodos), dió una DO de 1.333.

- d.- Suero de conejo inmunizado con extracto celular de *N. brasiliensis* (ver material y métodos) , dió una DO de 1.411

Los sueros también fueron estudiados por W.B. y los resultados se representan en la figura # 25, en donde a) es un suero de ratón inmunizado con *N. brasiliensis* muerta por calor , b) suero de ratón curado espontáneamente de micetoma , c) suero de conejo inmunizado con bL *brasiliensis* muerta por calor y d) suero de conejo inmunizado con extracto celular de *N.brasiliensis*. Las diferencias de los antígenos inmunodominantes identificados por cada uno de los sueros estudiados en transferencia de inmunidad humoral ,se representan en las diferencias de bandas encontradas entre las proteínas de 60 a 50 kDa , 40 y 30 kDa y las menores de 20 kDa , en c) y d) la presencia de estas bandas protéicas es mayor que en a) y b) .



Cuadro # 4.- Resultados de los experimentos de transferencia adoptiva de inmunidad

oral para evaluar su efecto en el establecimiento de la infección por *N.brasiliensis* en es Balb/c sanos . El valor de n=4 por grupo .



+ S.R.H. 28 días	micetoma +++
+ S.R.C. 28 días	micetoma ++++
+ S.C.H. 28 días	micetoma ++++
+ S.C.E. 28 días	micetoma +++ +
+ S.S.E. 28 días	micetoma +++

Cuadro #5.- Resultados de los experimentos de transferencia adoptiva de inmunidad al con anticuerpos anti-N. brasiliensis para evaluar su efecto sobre la resolución de la **ión** por N. brasiliensis en ratones Balb/c que previamente desarrollaron micetoma . El de n=6 por grupo.

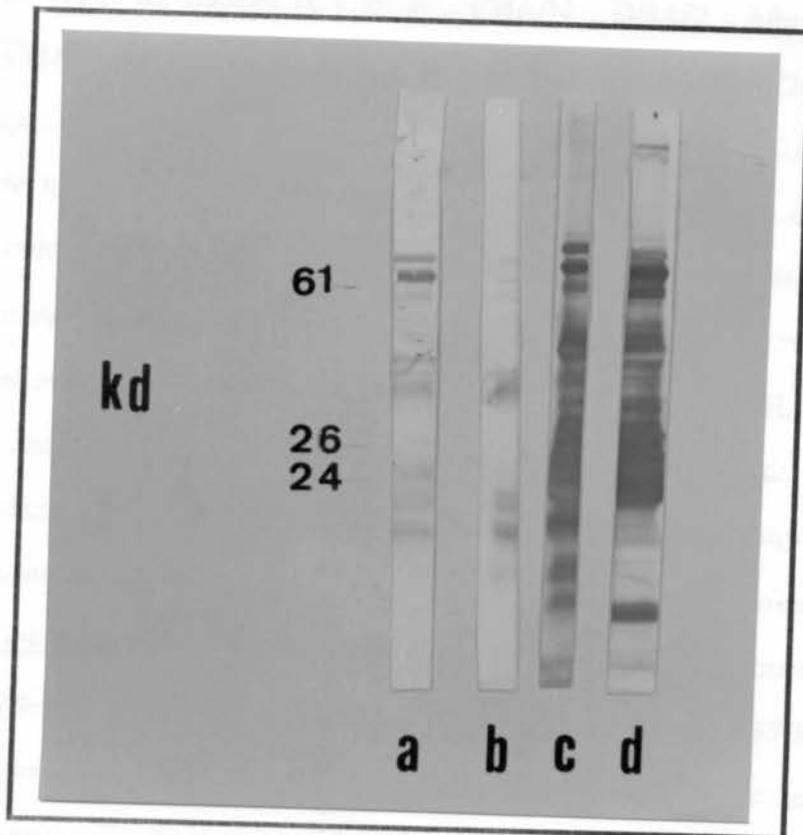


Figura # 25.- Immunoelectrotransferencia de los sueros utilizados en los experimentos de transferencia adoptiva de inmunidad humoral. El antígeno transferido en el gel de poliacrilamida es un extracto proteico celular de *N. brasiliensis*. Ver página 88.

DISCUSION

En esta tesis desarrollamos en primera instancia el micetoma experimental en ratones Balb/c y en otras cepas de ratones (C57BL/6 , CBA/N , DBA/2 , híbridos de F, (CBA X DBA) \mathcal{O} yF, (CBA X DBA) \mathcal{O}). Como anteriormente lo describieron Zlotnik (51) y Beaman (2) todas las cepas de ratones utilizadas , a excepción de la cepa DBA/2 ,el tiempo de establecimiento de la infección experimental por *N. brasiliensis* fluctuó entre el 14 y 28 día post-infección y coincidió con el aumento de anticuerpos séricos determinados por el método de ELISA . El tiempo de resolución espontánea se presentó entre los 150 y 200 días . Solo se presentó en las cepas de ratones inmunocompetentes, Balb/c y C57BL/6 . El resto de las cepas de ratones incluidas la infección experimental no se resolvió (más de 12 meses); por lo contrario el índice de mortalidad fue del 100 %. Una observación importante fue que en la cepa de ratones Balb/c tres ratones (30 %) murieron por peritonitis causada por *tüebssiella pneumonie* , confirmada por técnicas de rutina en el Laboratorio de Bacteriología le la Facultad de Medicina U.A.N.L.; en cambio en la cepa de ratones C57BL/6 no se observo mortalidad. Esto nos hace pensar que la *N- brasiliensis* pudiera ser la responsable del establecimiento de otros microorganismos, efecto que sería consecuencia de una inmunodeficiencia celular , humoral o la combinación de estas. Este hallazgo merece una investigación posterior [ue incluya el papel de la fagocitosis de macrófagos y polimorfonucleares .

Los resultados obtenidos por inmunoelectrotransferencia nos revelaron la presencia de una amplia gama de antígenos inmunodominantes en cada una de las cepas de ratones en estudio [el patrón común de reconocimiento incluyó las proteínas de 61,000, 26,000 y 24,000 daltons ; estos hallazgos coinciden con la reportadas previamente por Salinas y col. (39) para

humanos . Cabe mencionar que la cepa de ratones híbrida F, (CBA X DBA) 9 reaccionó con un número mayor de bandas que las demás cepas de ratones. Sin embargo esto no se relaciono con protección ya que todos los animales fallecieron . Otra observación importante es que la intensidad de las bandas para cada una de las identificadas por los sueros correspondientes de cada cepa de ratón, correlacionó en forma directamente proporcional con la gravedad de la infección y la intensidad de las bandas fué disminuyendo en las cepas

munocompetentes

reconocimiento

l,p26 y p24 disminuyó a partir del día 163 post-infección y coincidió ahora con la resolución espontánea del micetoma. Por otro lado las cepas de ratones CBA/N , DBA/2 y las cepas híbridas, Finque mostraron intensas bandas en la inmunoelectrotransferencia durante las etapas más graves de la infección nunca mostraron resolución espontánea como en el caso de los amunocompetentes .

Los modelos experimentales para micetoma por EL brasiliensis a la fecha son escasos (creemos que la participación de la respuesta inmune humoral no han sido explorada en forma adecuada. Nosotros aplicamos para el análisis de suero de ratones el método de ELISA para)determinación de anticuerpos de ratón dirigidos contra los antígenos de N. brasiliensis como i reportaron previamente Salinas y col.(37) para sueros humanos . Sin embargo en sueros de ratones solo modificamos las diluciones de la muestra (1:50) y las diluciones de los conjugados a la peroxidasa, para cuantificar los anticuerpos anti-N.brasiliensis.

Las lecturas en DO por el método de inmunoenzimático fueron graficados contra el tiempo de evolución de la infección , revelaron que a mayor tiempo de la infección mayor la concentración de anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 ; la aparición de los anticuerpos se

I inició entre el 7 y 14 día post-infección y se mantuvieron en concentraciones altas . Las I concentraciones de anticuerpos totales anti-p26 y anti-p24 correspondieron a las concentraciones I de anticuerpos del isotipo IgG y no de IgM específicos . Esta observación nos sugiere que I la respuesta de anticuerpos es contra antígenos Timo dependientes, los cuales requieren de la I participación de la inmunidad celular (LT) para la síntesis de anticuerpos .

Los estudios de los cortes histológicos de la lesión espontáneas del micetoma en ratones Balb/c , nos revelaron el desarrollo de microabscesos a partir del 28 día. La células predominantes fueron PMN y macrófagos así como la presencia de material hialino rodeando los microabscesos y de células gigantes espumosas . Tal como fué reportado por otros autores (10) .

En los experimentos de transferencia adoptiva de inmunidad humoral se observó que el suero de ratón hiperinmune obtenido por inmunización con N. brasiliensis muertas por calor, produjo un efecto protector en el establecimiento de la infección por N- brasiliensis en ratones Balb/c . Sin embargo es importante señalar que este mismo suero no contribuyó a la resolución de un micetoma establecido .En contraste que los sueros de ratones que se curaron espontáneamente de micetoma no fueron capaces de conferir protección . Creemos que la concentración de anticuerpos protectores no haya sido la adecuada , de hecho la concentración *k* anticuerpos anti-p26 y anti-p24 en el suero de estos ratones dió la lectura de DO más baja (1.072) como se señalo en páginas anteriores. Tal vez por esto no contribuyeron en ningún beneficio en los animales receptores . En cambio estos anticuerpos protectores sí están presentes n los sueros hiperinmunes de los ratones inmunizados con bacterias muertas por calor . El lorqué la presencia de anticuerpos protectores en un suero y no en otro, requiere de otro trabajo

de investigación más amplio .

El suero hiperinmune de ratón inmunizado con bacterias muertas por calor , así como el suero de ratones que se curaron espontáneamente de micetoma , reaccionaron con 9 bandas proteicas de *N. brasiliensis* , en cambio los sueros hiperinmunes de conejo reconocieron más de 15 proteínas y la intensidad de su reconocimiento fué superior, todos los sueros homólogos y heterólogos contenían anticuerpos contra los antígenos inmunodominantes (p61, p26 y p24) y sin embargo los sueros heterologos no fueron capaces de conferir protección .

El efecto de los sueros heterólogos hiperinmunes anti-*N.brasiliensis* no fue el esperado , por el contrario , aparentemente dieron el efecto reportado por Guadalupe-Rico y col. (35) ; es decir, agravaron la infección . El determinar si fueran los anticuerpos los que favorecieron la infección o si algun(os) componente(s) que están presentes en el suero requiere de estudios adicionales para explicar el mecanismo por el cual se agrava la infección, por un lado y por otro la falta de efecto protector de un suero hiperinmune obtenido en forma similar al suero de ratones que confirió protección . La transferencia de sueros hiperinmunes incluye la presencia de otros factores séricos como interleucinas, interferones , otros isotipos de anticuerpos , que también tienen efecto anti-infeccioso . Es necesario realizar experimentos adicionales para el aislamiento y semipurificación de anticuerpos protectores exclusivamente , haciendo uso de métodos físico-químicos y purificación de gamma globulina de sueros de ratón hiperinmune que serán motivo de otros trabajos.

CONCLUSIONES

Con el método de inmunoelectrotransferencia (Western-blot) encontramos que los antígenos inmunodominantes en común de las cuatro cepas de ratones y dos híbridas que utilizamos ; fueron las proteínas designadas según peso molecular como p61 ,p26 y p24 ,
| án embargo otras proteínas fueron reconocidas con diferentes intensidades por diferentes

bpas.

El isotipo predominante de los anticuerpos anti-p26 y anti-p24 de N-l
en todas las cepas estudiadas.

El micetoma experimental se estableció entre los días 14 y 28 post-infección y se
solvió después del día 150 , en ratones inmunocompetentes. En cambio las otras cepas
incluidas no resolvieron espontáneamente la infección y murieron después de 300 días de la
infección experimental.

Los anticuerpos séricos anti-p26 y anti-p24 se detectaron al día 14 post-infección
en todas las cepas de ratones y se mantuvo a concentraciones elevadas hasta los 200 días
en las que se llevó el análisis.

5. - El suero de ratones inmunizados con N. brasiliensis muerta por calor evitó el establecimiento de la infección en ratones Balb/c. Estos mismos sueros no tuvieron efecto protector en ratones con micetoma establecido.

6. - El suero de ratones que se curaron espontáneamente de micetoma no evitó el establecimiento ni resolvió la infección experimental.

7. - El suero heterólogo (conejo) no confirió protección y por el contrario agravó la infección experimental.

8. - Nuestros hallazgos apoyan parcialmente la hipótesis, de que los anticuerpos evitan el establecimiento de la infección, pero no tienen efecto protector en una infección establecida.

R E S U M E N

El Micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que se desarrolla en piel y tejido subcutáneo. *N. brasiliensis* es el agente causal más frecuentemente aislado de los casos en México. Los estudios realizados para investigar los mecanismos inmunopatológicos involucrados en el Micetoma por *N. brasiliensis* sugieren que la respuesta no específica (macrófagos) y específica (Linfocitos T) son los responsables de la resistencia a la infección (8,9,10,15,18,21,27,30-50). Por otro lado algunos trabajos apoyan la falta de participación de la respuesta humoral (anticuerpos), incluso algunos autores afirman que los anticuerpos favorecen y agravan la infección (34,35).

El objetivo de esta tesis es conocer el papel que juegan los anticuerpos en el establecimiento y en la resolución de la infección experimental por *H. brasiliensis* en un modelo de roedores. Para alcanzar este objetivo infectamos con *N. brasiliensis* diferentes cepas de ratones Balb/c, C57BL/6, DBA/2, CBA/N, los machos O* y hembras 9 de la cruce de CBA/N DBA/2). El Micetoma se desarrolló totalmente a los 28 días post-infección. Se realizaron más de sangre a diferentes tiempos y los sueros fueron analizados por inmunoelectrotransferencia (Western-blot) para identificar los antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis* en las diferentes cepas de ratones.

Los antígenos inmunodominantes resultaron ser los mismos que en humanos (p24 y p6) en todas las cepas de ratones. Después aislamos estas proteínas y desarrollamos una prueba inmunoenzimática (ELISA) para cuantificar los anticuerpos totales anti-bf *brasiliensis*.

Posteriormente investigamos el isotipo de los anticuerpos formados y encontramos que las concentraciones de IgM fueron bajas en la mayoría de las cepas estudiadas, interesantemente los ratones CBA/N, mostraron concentraciones todavía más bajas. Las concentraciones de γ G, fueron evidentes a partir de día 14 post-infección para todas las cepas estudiadas.

Las observaciones macroscópicas para estudiar la historia natural de la infección la resolución de Micetoma por *N. brasiliensis* en las diferentes cepas, nos demostraron que en los ratones con disfunción de linfocitos B (LB) (CBA/N y los F₁(CBA/N X DBA/2), se estableció y no hubo resolución de la infección. Por otro lado los ratones inmunocompetentes (Balb/c y C57BL/6) tardaron de 14 a 28 días para desarrollar la infección la resolvieron en un 90-100%. La resolución espontánea de la infección se presentó cerca de los 200 días post-infección. En cambio los ratones de cepas deficientes en LB y los híbridos obtenidos del cruzamiento de CBA/N con DBA/2 O* y 9 no resolvieron la infección.

La transferencia del suero obtenido de ratones inmunizados con Nocardias muertas por evitaron el establecimiento de *N. brasiliensis* en ratones Balb/c, sin embargo este mismo suero no presentó efectos curativos en ratones Balb/c con micetoma. Por otro lado el suero de ratones que se **curaron** espontáneamente de micetoma, el suero de conejo con anticuerpos anti-*N. brasiliensis* (muerta por calor) y el suero de conejo con anticuerpos anti-extracto celular de *N. brasiliensis*, no presentaron efectos protectores ni resolvieron el micetoma experimental de *N. brasiliensis*.

BIBLIOGRAFIA

- Adair, J.C., A.C. Beck., R.I. Apfelbaum., J.R. Barninger. 1987. Nocardial cerebral abscess in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Neurol. 44:548-550.
- Beaman, B.L., M.E. Gershwin, A. Ahmed, S.M. Scates and R.L. Deem. 1982. Responses of CBA/N X DBA/F1 mice to Nocardia asteroides. Infect. Immun. 35:111-116 .
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding . Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Clyde, M.C. 1964. Los hongos y el hombre . 2ª ed. Ed. Interamericana 155 .
- Divo, A. 1977 . Microbiología médica . 3ª ed. Ed. Interamericana . 377-380 .
- Deem, R.L., B.L. Beaman and M.E. Gershwin. 1982 : Adoptive transfer of immunity to Nocardia asteroides in mice. Infect. Immun. 38:3:914-920.
- Ellner, J.J., A. Morrissey. 1990. Tropical and Geographical Medicine. 2ª ed. Ed. Mc.Graw Hill. Cap. 109:975-981.
- Felice, C.A. , Beaman, B.L. 1980: Effects of human neutrophils and monocytes on Nocardia asteroides . 1. Inf. Dis. 131:665-672.
- Eoib, IM. R. Jal fe and G. Altman. 1976. Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis infection in mice . Infect. and Immun. 13:1490-1496.

Folb,P.I.,A.Timme and Horowitz.1977 . Nocardia infection in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains . Infect. and immun. 18:459-466.

Gebhardt,P.L. 1972 . Microbiología . 4ª ed. Ed. Interamericana . 338-339.

Goodfellow,M., J.Zakrzewska-Czerwinska.,E.G. Thomas., M. Morda'ski., A.C. Ward, and A.L. James. 1991. Polyfasic Taxonomic study of the genera Gordona and Tsukamurella including the description of Tsukamurella wratislaviensis sp. nov. Zbl. Bakt. 275:162-178.

González-üchoa, A. 1975. Geografía de micosis profundas. Rev.Inv. Salud Publica (México). 35:85-96.

González-Ochoa,A. y I7.Baranda. 1953. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicosico por Nocardia brasiliensis .Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Iropicales . lomo XIII . 189-198 .

González-üchoa,A.,11.Shibayama.D.Félix and M.Anaya.1962 . Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 55:542-551.

Gupta, R.,V.Pancholi,V.K.Vinayak and G.K. Khuller. 1985. Immunological responses to protein, carbohydrates and lipid fraction of Nocardia asteroides in mice . J.Med. Microbiol. 20:263-274.

Gupta, R., V. Panolioli, V.K. Vinayak and G.K. Klniller. 1985. Protective immunity to systemic nocardiosis in mice immunized with cell extrae antigens of Nocardia

asteroides . Med. Microbiol. Immunol. 174:157-166.

Howard, J.G., F.Y. Liew, C.Hale, and S. Nicklin . 1984. II. Further characterization of the protective immunity against fatal Leishmania trópica infection induced by irradiated promastigotes. 132:450-455.

Liew, F.Y., J.G. Howard , and C. Hale. 1984. III. Protection against fatal Leishma nja trópica infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt 1+2- T cells that do not mediate cutaneous D I H. 132:456-461.

Johnstone, T. and R. Thorpe. 1985 . Polyacrylamida gel techniques . Immunochemistry in Practice . Blackwell Scientific Publications. Chapter 7 , p. 141.

Kriek, J. and J.S. Remington 1975. Resistance to infection with Nocardia asteroides . J. Infect. Dis. 131:665-672.

Kenneth, S.W. and A.F.Mahmound. 1984. Tropical and geographical medicine . I^a ed. Ld. Me. Graw Hill. 934-941.

Laemlii, U.K. 1970 . Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage 14. Nature 227:680-685.

Lechavalier, H.A., N.S. Mair, and M.E. Sharpeand. 1986 . Bergey's Manual of Systemic Bacteriology . I^{na}ed. The Willams and Wilkins . 2:1458.

Liew, F.Y. 1992. Induction, Regulation and Function of T-cell Subset in Leishmaniasis. Chem. Immunol. Basel. Karger. 54:117-135.

Lowry , O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr. and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent . J. Biol. Chem. 193:265-275.

Mahgoub, H.S. 1978. Experimental infection of athymic nude New Zealand mice , nude strain with mycetoma agents. Sabourdia. 16:211-216.

Mahgoub, E.S. and I.G. Murray. 1973. Mycetoma . Heinemann, London.

Mariat, F.,P. Destombes and G. Segretain. 1977. The mycetomas: Clinical features , pathology, ethiology and epidemiology . Contrib. Microb. Immunol. 4:1-39.

Melendro, E.I., M.F. Contreras, C.Ximencz, A.M.García and L.Ortiz-Ortiz. 1978. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis in mice: cross protection against Listeria monocytogenes .Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 57:74-81.

Merril,C.R., D.Goldman, S.A. Scdman, and M.M. Ebert . 1981. Ultrasensitive silver stain for protein in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science. 211:1437-1438.

Mtiller, I., I. Pedrazzini, J.P. Farrell, and J.Louis. Ann Rev. Immunol. 7:561-578.

Myrvik-Pearsall-Weiser:Bacteriología y Micología Médicas Ed. Interamericana: Cap. #2 pp 35-36.1977.

34. - Ortiz-Ortiz, L., D.E. Parks , J.Sullivan López , and W.O. Weigle. 1979. B-Lymphocyte activation with an extract of Nocardia brasiliensis . Inf. and Immun. 25:627-634.
35. - Rico, G., R.Ochoa, A.Oliva, A González-Mendoza, S.M. Walker, and L. Ortiz-Ortiz . 1982. Enhanced resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice depleted of antigen specific B-cells. J. Immunol. 129:1688-1693.
36. - Rippon,J.W. 1982. Mycetoma. Medical mycology : the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. The W.B. Saunders Co. Philadelphia. Chapter 5, p. 79-114.
37. - Salinas-Carmona M.C.,S.M. Casillas, and O. Welsh. 1992. An ELISA for serological diagnosis of Nocardia brasiliensis in clinical correlation of mycetoma infection . in press.
38. - Salinas-Carmona M.C., L.I.Pérez, O. Welsh, M. Rodríguez, and M.G. Rinaldi.1992. Identification of intracellular proteases from Nocardia brasiliensis. J. Mycol. Méd, 2:183-188.
39. - Salinas-Carmona, M.C.,L. Vera, O. Welsh, and M.A. Rodríguez. 1992. Antibody response to Nocardia brasiliensis antigens in man. Zbl. Bakt. 276:390-397.
- 40.- Serrano J.A. y Sandoval A.H. 1992: Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos .
Universidad de los Andes , Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico, Consejo de Publicaciones Mérida-Venezuela .

Scher, I. 1982. CBA/N Immune defective mice; Evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed. Immunological Rev. 64:117-136.

Sher, I., A.D. Steinberg, A.K. Berning, and W.E. Paul. 1975. X-linked B-lymphocyte immune defect in CBA/N mice: II. Studies of the mechanisms underlying the immune defect. J. of Exper. Med. 142:637-650.

Shultz, L.D. and C.L. Sidman. 1987. Genetically determined murine models of immunodeficiency. Ann. Rev. 5:367-403.

Sykes, G and F.A. Skinner 1973. Actinomycetales: characteristics and practical importance. Academic Press London New York.

Stevens, D.A., A.C. Pier, B.L. Beaman, P.A. Morozumi, Lovett, and E.T. Houang. 1981. Laboratory evaluation of an outbreak of nocardiosis in immunocompromised hosts. Amer. J. Med. 71:928-934.

Ishikawa, M. 1970. Relationship between Mycobacterium and Nocardia. Jap. J. Microbiol. 14:187-195.

Vera-Cabrera, L., M.C. Salinas-Carmona, O. Welsh, and M. A. Rodríguez. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from Nocardia brasiliensis. J. Clin. Microbiol. 30:1183-1188.

Welsh, O. 1991. Mycetoma: Current concepts in treatment. Inter. J. of Dermato. 30:387-

Welsh, O., E. Saucedo, J. González, and J. Ocampo. 1987 . Amikacin alone and in combination with trimethoprim sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:443-448.

Ximenez, C., E.I. Melendro, A. González-Mendoza, A.M. García, A. Martínez, and L. Ortiz-Ortiz. 1980 Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathology.* 70:117-122.

Zlotnik, II. and R.H. Buckley, 1980. Experimental production of actinomycetoma in Balb/c mice. *Inf. and Immun.* 29:1141- 1145.

APENDICE A: ABREVIATURAS Y SIGNOS

ABREVIATURAS

AIF	Adyuvante incompleto de Freud
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CAT.	Catálogo
CDC	Cluster Differentiation Celular
C	Grados centígrados
CMII	Complejo Mayor de I listocompatibilidad
c/u	Cada uno
DO	Densidad Optica
DS	Desviación Estándar
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Eg	Micro gramos
h	lloras
II-E	1 lematoxilina-Eosina
Ig's	Inmunoglobulinas
kDa	Kilodaltons
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
pL	Micro litros
M	Molar
2ME	2-Mercapto etanol
min	Minutos
mL	mililitros
mg	miligramos
N	normal

nm	nanómetros
No.	Número
OPD	Ortofenilendiamina
PBS	Buffer-salina-fosfatos
PCN	Papel de nitrocelulosa
SDS	Dodesil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
S.R.C.	Suero de ratón que se curo espontáneamente de micetoma
S.R.H.	Suero de ratón hiperinmune , obtenido por inmunización con bacterias muertas por calor
S.C.H.	Suero de conejo hiperinmune, inmunizado con bacterias muertas por calor
S.C.E.	Suero de conejo anti-extracto proteico de N. brasiliensis
S.S.E.	Solución salina estéril
TEMED	N,N,N',N',Tetrametilendiamina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
W.B.	Western-Blot (inmuno-electrotransferencia de proteínas)

SIGNOS

hembra 9

macho O*

miera fl

APENDICE *ii*: MATERIAL Y METODOS

Acrilamida 30 % T , 2.7 % C :

Acrilamida 29.2 g

Bis-acrilamida 0.8 g

Disolver en 80 ml de agua tridestilada , dejando agitando la muestra por 12-18 h a 4°C , posteriormente filtrar en papel Whatman y aforar a 100 ml, mezclar con amberlita por 1 h en agitación gentil por 1 h , filtrar y guardar en frasco obscuro al abrigo de la luz a 4°C .

Amortiguador para gel de corrimiento :

Tris-OH 1 M 6.055 g

Llevar a un volumen de 25 ml, en agua tridestilada y ajustar el pH 8.8-9.0 con HCl 0.1 N.

Amortiguador para gel de empaquetamiento:

Tris-OH 1 M 3.0275 g

Llevar a un volumen de 25 ml, en agua tridestilada y ajustar el pH 6.8 .

Amortiguador de corrimiento con SDS :

Glicina 1.92 M 28.80 g

Tris-OH 0.25 M 6.04 g

SDS (dodecil sulfato de sodio) 1.00 g

Llevar a un volumen de 1 litro con agua destilada , guardar a 4°C hasta su uso

Amortiguador de muestra 4X :

SDS 1 g

2	-Mercaptoetanol	1	mi.
	Sacarosa	5	g g
	Azul de Bromofenol	0.005	g

Disolver en 25 mi, de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Solución fijadora para tinción argéntica :

Metanol	50	mi
Acido acético glacial	12	mi

Llevar a un volumen de 100 mi, con agua tridestilada

Solución lavadora para tinción argéntica :

Etanol	10	mi
Acido acético glacial	5	mi

Llevar a un volumen de 100 mi con agua tridestilada

Solución oxidante :

Dicromato de potasio 0.0034 M	0.099	g
Acido nítrico 0.0032 M	0.200	mi

Llevar a un volumen de 100 mi con agua tridestilada, guardar en frasco oscuro hasta su uso .

Solución de nitrato de plata :

Nitrato de plata 0.012 M	1	g
--------------------------	---	---

Disolver en 500 mi de agua tridestilada , guardar en frasco oscuro hasta su uso.

Solución reveladora de tinción argéntica

Carbonato de sodio 0.28 M	7.41 g
Formol (formaldehído) concentrado	0.50 mi

Llevar a un volumen de 250 mi con agua tridestilada . Esta solución se prepara 10 minutos antes de su uso , no se almacena .

Solución colorante de azul de Coomasie :

Azul -de Coomasie	0.1 g
Metanol	40 mi
Acido acético	10 mi
Mezclar y llevar a un volumen de 100 mi con agua tridestilada .	

Solución desteñidora de Coomasie :

Metanol	40 mi
Acido acético	10 mi

Llevar a 100 mi con agua tridestilada .

Amortiguador salina-fosfatos (PBS 0.1 M) :

KCl	0.2 g
NaCl	8.0 g
KH ₂ P ₀₄	0.2 g
Na ₂ HP ₀₄	1.2 g

Disolver en 800 mi de agua tridestilada, ajustar el pH a 7.4 y llevar a un volumen de 1,000 mi .

Solución bloqueadora para la prueba de E.L.I.S.A

Leche descremada	5 g
Tween-20	0.1 mi

Llevar a un volumen de 100 mi con PBS 0.1 M .

Solución dilutora de antisueros para E.L.I.S.A:

Solución bloqueadora diluida 1:5 en PBS Tween-20 1:1000

Solución bloqueadora para inmunoelectrotransferencia	Western-blot :
--	----------------

Gelatina	3 mi
----------	------

PBS 0.1 M	97 mi
-----------	-------

Solución lavadora para Western-blot :

Gelatina	0.3 mi
----------	--------

Tween-20	0.010 mi
----------	----------

Llevar a un volumen de 100 mi con PBS 0.1 M pH 7.4 .

Solución reveladora para Western-blot

Pesar 20 mg de 3,3' diaminobencidina dihidroclorada y disolverla en 40 mi de PBS

0.1 M caliente (40-50°C) agregar 186.6 ul de peróxido de hidrógeno al 30 %.

Solución amortiguadora de transferencia :

Glicina	43.20 g
---------	---------

Tris-OH	9.06 g
---------	--------

Agregar 600 mi de metanol (Merck) y llevar a un volumen de 3000 mi de agua

tridcstidestilada .