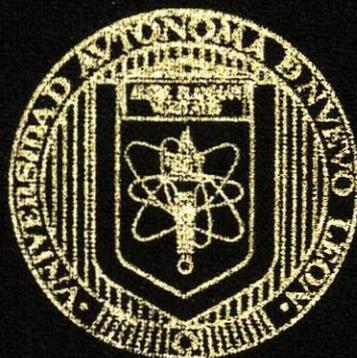


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



"EL EFECTO DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR
IgM CONTRA *Listeria monocytogenes* Y *Salmonella enterica*
SEROVAR TYPHIMURIUM EN EL ESTABLECIMIENTO
DEL MICETOMA EXPERIMENTAL POR
Nocardia brasiliensis"

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

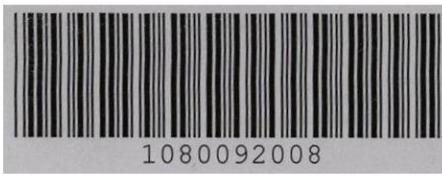
PRESENTA:

OFELIA SANCHEZ SALINAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. NOVIEMBRE 2006

92

TL
QR185
.4
.S26
2005
c.1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



*"EL EFECTO DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR IgM CONTRA *Listeria monocytogenes* Y *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHIMURIUM EN EL ESTABLECIMIENTO DEL MICETOMA EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis*"*

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

OFELIA SANCHEZ SALINAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. NOVIEMBRE 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



“El efecto de la respuesta inmune mediada por IgM contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el establecimiento del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*”

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

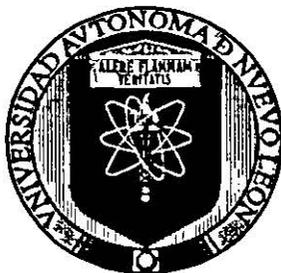
PRESENTA:

Ofelia Sánchez Salinas

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

Noviembre del 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



“El efecto de la respuesta inmune mediada por IgM contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el establecimiento del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*”

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA:
Ofelia Sánchez Salinas

COMITÉ DE TESIS

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales

Presidente

M.C. Leonardo Castillo León

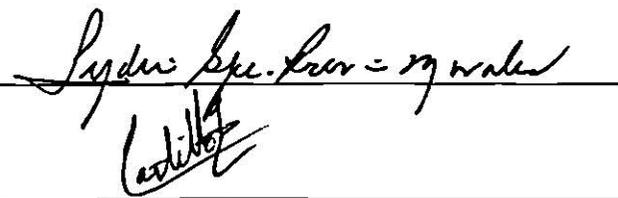
Secretario

M.C. José Luis Méndez

Vocal

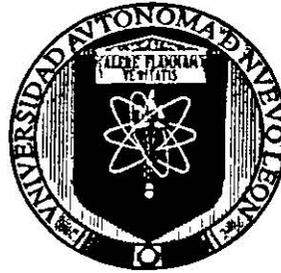
M.C. Ma. Esther Treviño H.

Suplente





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



“El efecto de la respuesta inmune mediada por IgM contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el establecimiento del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*”

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA:

Ofelia Sánchez Salinas

Dr. Mario César Salinas Carmona
Director Externo

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Director Interno




DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia: a mis padres Miguel y Manuela, y a mi hermana Cecy. Gracias por su amor, apoyo y comprensión.

Papi y Mami: gracias de todo corazón por haberme dado la vida, por todos y cada uno de los minutos que me han dedicado, por su esfuerzo, por sus ganas de superarse y de sacarnos adelante, porque nunca se rindieron aún en los momentos difíciles, por su protección, por sus cuidados, por todas las oportunidades que a mi hermana y a mí nos han brindado.

Gracias porque nunca han sido para nosotras unos padres impositivos, sino todo lo contrario; para mí son los mejores amigos, en quienes he podido confiar siempre, a quienes he podido acudir en todo momento y en cualquier situación. Los admiro tanto porque han sabido romper esquemas, ya que procediendo de una generación completamente distinta a la nuestra han sabido dejar atrás ciertas ideas, limitaciones o ataduras con las cuales muchas generaciones como la de sus padres cargaron. Les agradezco que siempre hayan sido sinceros, que en todo momento nos hayan hablado claro y nos hayan enseñado a conocer opciones y tomar decisiones.

En cuanto a la oportunidad que me han dado de estudiar una carrera universitaria, quiero que sepan que estaré por ello siempre agradecida. La etapa de mi vida como estudiante de la U.A.N.L. definitivamente me ha marcado y definido en gran medida. La libertad que ustedes me dieron de elegir lo que quise estudiar es invaluable, gracias por apoyar y fomentar mi interés en la ciencia y junto conmigo haber aprendido a ignorar esas ideas con las cuales la sociedad aún tiene estigmatizadas a las carreras como la que yo escogí... creo que al final dedicarle mi tiempo a bichos y ratoncitos no fue tan malo ¿verdad? Gracias infinitas por darme el apoyo y el valor de separarme de ustedes por primera vez y salir del país para poder vivir la que sin duda ha sido una de las mejores y más enriquecedoras experiencias de toda mi vida.

Cecy: gracias por ser mi hermana y mi amiga más sincera. Sé que soy difícil, que muchas veces te he herido, que tal vez no he sido la mejor hermana que quisieras haber tenido, pero lo soy. Tal vez no tengas idea de lo importante que eres para mí y yo no tengo palabras para expresarlo solo puedo decirte que te amo y sin tí mi vida sería bastante difícil. Gracias hermanita por tu paciencia, por tu tiempo, por los consejos, por escucharme, por tolerarme, por las peleas, por los abrazos, por las risas y las de cocodrilo también. Cuando miro un poco hacia atrás me doy cuenta que tanto en mi pasado como en el presente has estado tú como mi compañera de juegos, de cuarto, de aventuras y de sueños, y espero que siempre sea así. Siempre te admiraré por ser la niña más valiente que he conocido, porque aunque tu vida tal vez haya sido un poco más difícil que la mía, has podido salir adelante y seguir tu camino para luchar por tus ideales.

A ustedes tres, las personas más importantes de mi vida... les dedico de todo corazón éste trabajo y cada uno de mis logros, porque sin ustedes nada de esto podría haber sido posible... con todo mi corazón... LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por la maravillosa oportunidad de vivir, por su amor, por las personas que ha puesto en mi camino, por todas y cada una de las experiencias que Él me ha hecho vivir.
- A mis estrellas en el cielo: Ángel Sánchez, Ofelia García, Adela Carmona y Cari Quintanilla (q.e.p.d.)... gracias por su amor y bendiciones.
- A mis Padres y mi Hermana: por su amor, apoyo, comprensión y paciencia durante ésta y todas las etapas de mi vida. No tengo forma de expresar mi agradecimiento y todo lo que ustedes significan para mí. Gracias por creer en mí... los amo.
- A Ale Calderón: por darme la oportunidad de formar parte de tu vida, por todos y cada uno de los momentos que hemos compartido, gracias de corazón... i.l.d.
- A mi abuelo Mariano Salinas y todos mis familiares: gracias por estar siempre presentes en mi vida.
- A mis amigas y amigos: por su tiempo, dedicación y amor con que han alimentado nuestra amistad, creo que no es necesario escribir sus nombres ya que están escritos en mi corazón... los quiero mucho.
- A mis compañeros y maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas con quienes tuve la oportunidad de convivir durante éstos años de estudio, gracias por su apoyo.
- Al Dr. Mario César Salinas por darme la oportunidad de ser parte de su excelente equipo de trabajo, por su apoyo y consejos. Para Ud. toda mi admiración, cariño y respeto por el gran hombre y profesionista que es.
- A la Dra. Lydia Rivera por todo su apoyo desde que nos conocimos en sexto semestre hasta los últimos días como su alumna y en todo lo concerniente a la tesis, gracias porque más que una maestra siempre trató de ser nuestra amiga.
- A mis queridísimas amigas y asesoras la Dra. Isa Pérez y Q.F.B. Ale Gallegos, no tengo palabras para agradecerles todo lo que en estos meses hicieron por mí. Gracias por escucharme, apoyarme y aconsejarme... siempre estarán en mi corazón.
- A los becarios del Laboratorio de Inmunología Celular: Ale, Blanca y Kame gracias por su apoyo y amistad incondicionales... p.a.l.p.n. Así como a todos y cada uno de los miembros del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina quienes me apoyaron y auxiliaron con la mejor disposición durante mi estancia.

Al Dr. Marco Vinicio Gómez por su asesoría en la parte estadística del presente estudio.

ÍNDICE GENERAL

| <u>Contenido</u> | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| • Portada..... | I |
| • Aprobación por el comité de tesis..... | II |
| • Aprobación del director externo e interno..... | III |
| • Lugar de trabajo..... | IV |
| • Dedicatoria..... | V |
| • Agradecimientos..... | VI |
| • Índice general..... | VII |
| • Índice de figuras y tablas..... | VIII |
| • Lista de abreviaturas y simbología..... | IX |
| • INTRODUCCIÓN | 1-3 |
| • ANTECEDENTES | |
| 1) <i>Nocardia brasiliensis</i> | |
| 1.1 Etiología..... | 4 |
| 1.2 Patogenia..... | 5 |
| 2) Inmunoprotección contra las infecciones por patógenos intracelulares..... | 6 |
| 2.1 Inmunoprotección contra <i>Listeria monocytogenes</i> | 7-10 |
| 2.2 Inmunoprotección contra <i>Salmonella</i> | 11-13 |
| 2.3 Inmunoprotección contra <i>Nocardia brasiliensis</i> | 14-17 |
| • HIPÓTESIS | 18 |
| • OBJETIVOS | |
| 1.1 Objetivo general..... | 19 |
| 1.2 Objetivos específicos..... | 20 |
| • MATERIAL Y METODOLOGÍA | |
| 1. Material biológico..... | 21-22 |
| 2. Esquema de inmunización general..... | 23 |

| | |
|---|-------|
| 3. Obtención y análisis de sueros hiperinmunes contra antígenos particulados de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium y <i>Nocardia brasiliensis</i> | 23-24 |
| 4. Efecto de la inmunización activa y pasiva en el establecimiento y evolución de la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> | 25 |
| 5. Evaluación del efecto neutralizante de los sueros de ratones BALB/c inmunizados con bacterias muertas por calor con <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Nocardia brasiliensis</i> sobre cultivos bacterianos de dichos microorganismos..... | 26 |
| | |
| ● RESULTADOS | |
| 1. Determinación de IgM total y específica de antígeno mediante Nefelometría y técnica inmunoenzimática (ELISA)..... | 27-28 |
| 2. Evaluación de los sueros obtenidos en los días 0, 7, 15 y 60 post-inmunización de ratones BALB/c inmunizados con BMC de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>N. brasiliensis</i> sobre cultivos bacterianos de dichos microorganismos..... | |
| 2.1 Efecto del suero del microorganismo sobre su propio cultivo..... | 29-34 |
| 2.2 Efecto del suero del microorganismo sobre cultivos de los otros microorganismos..... | 35-37 |
| 3. Evaluación del efecto protector de la inmunización activa y pasiva inducida por antígenos particulados de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>N. brasiliensis</i> en el establecimiento y evolución de la infección por <i>N. brasiliensis</i> en ratones BALB/c..... | 38-44 |
| 4. Análisis estadístico..... | 45-48 |
| | |
| ● DISCUSIÓN | 49-53 |
| ● CONCLUSIONES | 54 |
| ● PERSPECTIVAS | 55 |
| ● LITERATURA CITADA | 56-62 |
| ● APÉNDICE | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Página

Contenido

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Valores de IgM total y específica de los sueros obtenidos a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de <i>S. typhimurium</i> , <i>S. typhimurium</i> GFP, <i>L. monocytogenes</i> y <i>N. brasiliensis</i> | 27 |
| Figura 1.1. Determinación de IgM total (nefelometría) en sueros de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares..... | 28 |
| Figura 1.2. Determinación de IgM específica (ELISA) en sueros de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares..... | 28 |
| Tabla 2.1. Efecto <i>in vitro</i> del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares (sobre su propio cultivo)..... | 29 |
| Tabla 2.2. Efecto <i>in vitro</i> del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares (sobre su propio cultivo)..... | 30 |
| Figura 2.1.1. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de <i>Salmonella typhimurium</i> GFP sobre su propio cultivo..... | 31 |
| Figura 2.1.2. Figura 2.1.2. Evaluación del efecto del suero activado (izquierda) e inactivado (derecha) obtenido a diferentes tiempos (días 0, 7, 15 y 60) de ratones inmunizados con BMC de <i>Salmonella typhimurium</i> GFP (Sf) sobre su propio cultivo (método de Miles y Misra)..... | 31 |
| Figura 2.1.3. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de <i>Salmonella typhimurium</i> sobre su propio cultivo..... | 32 |
| Figura 2.1.4. Evaluación del efecto del suero activado (izquierda) e inactivado (derecha) obtenido a diferentes tiempos (días 0, 7, 15 y 60) de ratones inmunizados con BMC de <i>Salmonella typhimurium</i> (St) sobre su propio cultivo (método de Miles y Misra)..... | 32 |
| Figura 2.1.5 Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de <i>Listeria monocytogenes</i> sobre su propio cultivo..... | 33 |
| Figura 2.1.6. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de <i>Nocardia brasiliensis</i> sobre su propio cultivo..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Figura 2.1.7. Evaluación del efecto del suero activado (arriba) e inactivado (abajo) obtenido a diferentes tiempos (días 0, 7, 15 y 60) de ratones inmunizados con BMC de <i>Nocardia brasiliensis</i> (Nb) sobre su propio cultivo (método de Miles y Misra)..... | 34 |
| Tabla 2.3. Efecto del suero obtenido de ratones inmunizados con BMC de <i>S. typhimurium</i> (ST), <i>S. typhimurium</i> GFP (SF), <i>L. monocytogenes</i> (LM) y <i>N. brasiliensis</i> (NB) sobre el cultivo de los demás microorganismos (efecto cruzado)..... | 35 |
| Tabla 2.4. Efecto del suero obtenido de ratones inmunizados con BMC de <i>S. typhimurium</i> (ST), <i>S. typhimurium</i> GFP (SF), <i>L. monocytogenes</i> (LM) y <i>N. brasiliensis</i> (NB) sobre el cultivo de los demás microorganismos (efecto cruzado)..... | 35 |
| Figura 2.2.1. Efecto neutralizante del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de <i>Salmonella typhimurium</i> | 36 |
| Figura 2.2.2. Efecto neutralizante del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de <i>Salmonella typhimurium</i> GFP... | 36 |
| Figura 2.2.3. Efecto del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> | 37 |
| Figura 2.2.4. Efecto del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 37 |
| Figura 3.1. Medición de la inflamación..... | 38 |
| Figura 3.2. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de <i>Salmonella typhimurium</i> en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c..... | 39 |
| Figura 3.3. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de <i>Salmonella typhimurium</i> (grupo de 20 ratones)..... | 39 |
| Figura 3.4. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de <i>Salmonella typhimurium</i> GFP en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c..... | 40 |
| Figura 3.5. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de <i>Salmonella typhimurium</i> GFP | 40 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 3.6. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de <i>Listeria monocytogenes</i> en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c..... | 41 |
| Figura 3.7. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de <i>Listeria monocytogenes</i> | 41 |
| Figura 3.8. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de <i>Nocardia brasiliensis</i> en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c. | 42 |
| Figura 3.9. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 42 |
| Figura 3.10. Efecto del suero obtenido el día 7 de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c..... | 43 |
| Figura 3.11. Etapas del desarrollo del micetoma experimental..... | 44 |
| Tabla 4.1. Estadísticas descriptivas y resultado de la prueba de Kolmogorov – Smirnov para normalidad..... | 45 |
| Tabla 4.2. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis..... | 46 |
| Figura 4.1. Gráfica de variabilidad de las mediciones..... | 47 |
| Tabla 4.3. Medias y medianas de la inflamación del cojinete plantar (mm) por bacteria o grupo y día de medición..... | 47 |
| Tabla 4.4. Valores de p obtenidos al aplicar la prueba U de Mann – Whitney, por período de medición..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS y SIMBOLOGÍAS

| | |
|-------|---|
| Abs | absorbancia |
| BCG | bacilo Calmette-Guerin |
| BHI | Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro Corazón) |
| BMC | bacterias muertas por calor |
| DTH | delayed type hypersensitivity (hipersensibilidad retardada) |
| ELISA | ensayo inmunoenzimático en fase sólida |
| hr(s) | hora(s) |
| IFN | interferón |
| IgM | inmunoglobulina M |
| LLO | listeriolisina O |
| Lm | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Lma | suero activado de <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Lmi | suero inactivado de <i>Listeria monocytogenes</i> |
| µg | microgramo(s) |
| µl | microlitro(s) |
| mAb | monoclonal antibody (anticuerpo monoclonal) |
| mg | miligramo(s) |
| ml | mililitro(s) |
| mm | milímetro(s) |
| Mtb | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| M | molaridad |
| min | minuto (s) |
| MN | mononucleares |
| Nb | <i>Nocardia brasiliensis</i> |
| Nba | suero activado de <i>Nocardia brasiliensis</i> |
| Nbi | suero inactivado de <i>Nocardia brasiliensis</i> |
| nm | nanómetros |
| PBS | amortiguador salina fosfato |
| pH | potencial de hidrógeno |

| | |
|------|--|
| PMN | polimorfonucleares |
| seg | segundo(s) |
| Se | <i>Salmonella enteriditis</i> |
| St | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| Sta | suero activado de <i>Salmonella typhimurium</i> |
| Sti | suero inactivado de <i>Salmonella typhimurium</i> |
| Stf | <i>Salmonella typhimurium</i> Fluorescente |
| Stfa | suero activado de <i>Salmonella typhimurium</i> Fluorescente |
| Stfi | suero inactivado de <i>Salmonella typhimurium</i> Fluorescente |
| SF | <i>Salmonella typhimurium</i> Fluorescente |
| ST | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| SNC | sistema nervioso central |
| S.S. | solución salina |
| SDS | duodecil sulfato de sodio |
| UFC | unidades formadoras de colonia |

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son bacterias que abundan en el suelo en donde degradan productos orgánicos de origen vegetal y animal, un número reducido de estos microbios producen enfermedad en el hombre y en algunos animales. En este grupo de gérmenes se encuentran las bacterias del género *Nocardia*, entre las que producen patología humana se incluyen la *N. asteroides* que produce la enfermedad sistémica llamada Nocardiosis, la *N. brasiliensis* que generalmente produce la enfermedad localizada llamada actinomicetoma y con menor frecuencia la *N. otitidiscaviarum*, *cavie* y *pseudobrasiliensis*. Quizás los más grandes retos para el diagnóstico de infecciones por bacterias del género *Nocardia* son que las enfermedades que producen son muy variadas, no específicas y sobre todo que se piensa poco en ellas como agentes productores de infecciones. En los últimos años el número de infecciones por estas bacterias se ha incrementado especialmente en personas con un sistema inmune comprometido como los enfermos transplantados que reciben inmunosupresores, en personas con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, etc.

Por su parte *Listeria monocytogenes* ha sido desde hace mucho tiempo un gran problema de salud pública. Después de una serie de brotes en los años 80's algunas medidas fueron tomadas para reducir la contaminación de alimentos y aparentemente este patógeno fue controlado. Sin embargo, en la actualidad se han presentado un gran número de casos demostrando que ésta bacteria aún es un riesgo significativo para la salud. Esto se debe en parte a que la *L. monocytogenes* es ubicua en la naturaleza y además tiene la capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración. Su naturaleza es muy virulenta y presenta una tasa de mortalidad de más del 20%, mucho mayor en comparación a la tasa de mortalidad por salmonelosis (0.04%), aún cuando la intoxicación alimentaria por salmonelosis representa el mayor número de casos (500 veces mayor al número de intoxicaciones alimentarias por *L. monocytogenes*).

Las infecciones por *Salmonella* son aún en la actualidad un problema de salud pública a nivel mundial. Las especies de *Salmonella enterica* comprenden un grupo de microorganismos patógenos para los humanos y otros animales.

En humanos, la ingestión de algunas especies de *Salmonella* (serovares) provocan infección en el intestino delgado, así como gastroenteritis. Un pequeño número de serovares de este microorganismo pueden causar infección sistémica y fiebre entérica. La fiebre tifoidea en humanos, causada por *S. typhi*, es el prototipo de dicha enfermedad. Sin tratamiento, *S. typhi* representa un gran problema de salud para los humanos, y en los países en vías de desarrollo la fiebre tifoidea es aún una importante causa de morbilidad y mortalidad. La infección en ratones con *Salmonella typhimurium* causa infección sistémica que se asemeja en gran medida a la fiebre tifoidea en humanos.

Como podemos ver los tres microorganismos anteriormente descritos son bacterias intracelulares y patógenas para el ser humano. En el caso de *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* tenemos en la actualidad grandes problemas en la salud pública debido a su alta tasa de morbilidad, siendo dos de los enteropatógenos que se presentan con mayor frecuencia. Por su parte, *N. brasiliensis* nos enfrenta a serios problemas en el área de diagnóstico y tratamiento, siendo un microorganismo que rara vez es considerado como productor de enfermedades; sin embargo es un problema real y cada vez más frecuente en países en vías de desarrollo como México.

Hasta hace muy poco tiempo múltiples estudios habían demostrado que la defensa más importante contra los microorganismos intracelulares estaba dada por la inmunidad celular (7, 22, 36). En muchas ocasiones se reportó que la inmunidad humoral no era de utilidad en éstas infecciones e incluso en algunos casos las empeoraba (44). Sin embargo, en los últimos años algunos experimentos han abierto otro panorama en lo que a defensa contra patógenos intracelulares respecta, proponiendo que es posible que la inmunidad humoral juegue un papel importante en el caso de algunas bacterias patógenas como las utilizadas en el presente estudio (56). Recientemente se publicó que anticuerpos del isotipo IgM inducidos en forma activa o en inmunidad pasiva contra *N. brasiliensis* protegían completamente contra la infección experimental en ratones BALB/c.

Los anticuerpos del isotipo IgM se producen como respuesta contra antígenos T independientes, pero también en la respuesta a la primoinfección o en la primera inmunización contra un antígeno T dependiente, en este último caso después ocurre un cambio (switch) hacia IgG, dejando memoria inmunológica, esta característica es la base del éxito de la vacunación ampliamente utilizada en todo el siglo pasado. En cambio los antígenos T independientes no inducen memoria y siempre inducen respuestas del isotipo IgM. Los primeros anticuerpos IgM que aparecen solo unos días después de la infección o inmunización son de afinidad muy baja y en general poli reactivos a diferencia de los anticuerpos también IgM que aparecen después de estos, su especificidad es mayor y su poli reactividad menor, ahora sabemos que estos dos tipos de IgM son producidos por células B diferentes (45, 61, 63).

El objetivo de este trabajo, fue investigar la importancia de la inmunidad humoral en la protección contra tres microorganismos intracelulares patógenos para el ser humano, específicamente si los anticuerpos IgM anti-*L. monocytogenes* y anti-*Salmonella enterica* serovar Typhimurium protegen contra el micetoma inducido por *N. brasiliensis* en ratones BALB/ c.

ANTECEDENTES

1) *Nocardia brasiliensis*.

1.1 Etiología del actinomicetoma

El género *Nocardia* es un grupo de bacterias de la Familia *Nocardiaceae* perteneciente al Orden de los *Actinomycetales*. Este grupo de bacterias tienden a formar filamentos y a ramificarse. Los actinomicetos nocardioformes descritos en la 19° edición del Manual de Bacteriología de Bergey incluye en el grupo 22 a los Géneros: *Nocardia*, *Gordona*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (Sandoval-Trujillo 1993, Alshamaony y col. 1976).

Las *Nocardias* se caracterizan por ser microorganismos Gram-positivos, aerobios, que en estado temprano de crecimiento muestran células ramificadas y filamentosas. Las células pleomórficas son comunes en cultivos viejos caracterizados por fragmentos filamentosos bacilares o cocoidales. Algunas cepas son ácido-alcohol resistentes que crecen en medios simples, dando colonias opacas o pigmentadas que pueden dar apariencia lisa, rugosa, pastosa o dura (López Martínez y col., 1992).

El hábitat natural de estos microorganismos es generalmente el suelo y constituyen el 25% del total de la biomasa de todos los actinomicetos. Estos actinomicetos tal vez sean el grupo de bacterias con más trascendencia para la vida del hombre en vista de los innumerables procesos biológicos en los que participan. Las *Nocardias* pueden crecer en muy diversos sustratos orgánicos y en rangos de temperatura muy amplios, además de utilizar tanto el nitrógeno orgánico como el inorgánico; la mayoría son sensibles al pH ácido pero los favorecen los medios ligeramente alcalinos. Estos microorganismos pueden vivir desde la superficie de la tierra hasta profundidades cercanas a los dos metros y producen la descomposición de residuos vegetales y animales (González- Ochoa, 1960).

En cuanto a la frecuencia de especies de *Nocardia* aisladas de diferentes tipos de suelo en México, la más abundante fue en las tierras de cultivo de caña de azúcar (15.83%) en relación a otros tipos de tierra y *Nocardia brasiliensis* fue la especie más abundante en todos los casos (González- Ochoa 1960). Por lo cual se considera que los suelos, sobre todo en las zonas tropicales son el reservorio natural de los agentes de micetoma actinomicótico.

1.2 Patogenia de las infecciones por actinomicetos.

Existen diferentes tipos de infecciones producidas por actinomicetos por ejemplo:

- a) Nocardiosis pulmonar,
- b) Nocardiosis sistémica,
- c) Nocardiosis del SNC,
- d) Nocardiosis extrapulmonar,
- e) Nocardiosis cutánea, subcutánea y linfocutánea y
- f) **Actinomicetoma** (Mahgoub y col., 1973).

El micetoma es una enfermedad la cual fue primeramente descrita por Gill en Madura en un distrito de la India en 1842, de ahí el nombre de “Pie de Madura”. Es una enfermedad granulomatosa crónica que se caracteriza por una inflamación persistente, con áreas de abscesos múltiples que se abren y drenan un material seropurulento en donde pueden encontrarse microcolonias del agente causal llamados gránulos o granos macroscópicamente visibles, de tamaño cercano a 1mm de diámetro y colores variables con células inflamatorias rodeando colonias microscópicas del organismo infectante. El estudio histológico de la lesión muestra infiltración de PMN (neutrófilos) y MN (linfocitos y macrófagos) al igual que fibroblastos que circunscriben la lesión. Dichos granos son acúmulos del agente causal los cuales son expulsados a través de uno o varios tractos sinuosos presentes en la lesión (Beaman y col., 1995).

Estas infecciones son de naturaleza supurativa y tienden a localizarse a nivel de piel y tejidos subyacentes o en pulmón (Welsh y col. 1994, López- Martínez y col. 1992). *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal del actinomicetoma en México (Sandoval- Trujillo, 1993).

El actinomicetoma o micetoma actinomicótico causado por *N. brasiliensis* tiende a afectar en forma más predominante a grupos de personas entre los 20 a los 40 años de edad en una proporción hombre: mujer 5:1. Las ocupaciones predominantes fueron las de los agricultores (60.2%) y las amas de casa (21.3%) quienes realizan también labores en el campo (Welsh y col., 1994).

2) **Inmunoprotección contra las infecciones por patógenos intracelulares.**

La inmunidad contra las infecciones bacterianas se logra mediante anticuerpos, a menos que las bacterias sean capaces de crecer dentro de las células, caso en el que la hipersensibilidad de tipo retardada adquiere gran importancia (Kuby, 2004).

En el caso de ciertas enfermedades bacterianas toxígenas (Rollenhagen y col. 2004) podemos ver que la protección inmune se manifiesta por medio de anticuerpos dirigidos contra las toxinas proteínicas, los cuales tienen un efecto protector y en presencia de complemento neutralizan la infección, por ejemplo en las infecciones causadas por *C. tetani*, *C. botulinum*, *Vibrio colera*, *C. diphtheria*. Éste mismo fenómeno es observado en enfermedades causadas por bacterias encapsuladas como *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y en enfermedades virales tales como la hepatitis o la influenza.

Desde el año de 1962 en estudios realizados por Mackaness, se encontró que especies intracelulares tales como *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium* y *Listeria* son capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos peritoneales de ratón (Mackaness 1962). Por lo cual se ha visto que en las bacterias intracelulares como las antes mencionadas, es la respuesta inmune celular la que juega un papel importante en la protección contra la enfermedad (Badovinac P.V. y col 2000, Guo- Fu y col., 2004).

2.1 Inmunoprotección contra *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram-positiva no formadora de esporas que es ubicua en la naturaleza. Es un patógeno facultativo capaz de causar enfermedad en animales domésticos, salvajes y humanos (Grange, 1996). Dado que es entero-invasiva, infecta naturalmente por la vía oral desde la cual puede causar un amplio espectro de enfermedades desde enteritis localizadas, hasta una infección diseminada que puede involucrar cualquiera o todos los órganos mayores incluyendo el cerebro (Grange 1996, Bloom y col. 1992).

El modelo en ratón de la listeriosis fue descrito por Mackaness hace más de 40 años, donde se analizaron los mecanismos de la inmunidad antibacteriana adquirida que no depende de la producción de anticuerpos sino del desarrollo de la hipersensibilidad tardía (DTH) a antígenos bacterianos. En éste estudio se estableció que después de una infección la población bacteriana aumenta en el bazo y el hígado durante los 3 primeros días y que, en el cuarto día post-infección, el ratón desarrolla hipersensibilidad a los antígenos de *Listeria* y el crecimiento de la bacteria cesa. Se encontró que éste período de absoluta resistencia a *Listeria* duraba por 3 semanas, después de las cuales el animal permanece hipersensible a la *Listeria* pero es incapaz de resistir a una dosis de *L. monocytogenes* (Mackaness, 1962).

Osebold y col. intentaron sin éxito transferir resistencia pasiva con suero contra *Listeria monocytogenes* en un modelo murino de listeriosis (Osebold y Sawyer, 1957).

Posteriormente en el año de 1964 se realizaron experimentos con la intención de transferir pasivamente resistencia adquirida a *L. monocytogenes* utilizando para ello ratones de la cepa Swiss-Webster, basándose en ensayos realizados con anterioridad por Rowley y col. donde se demostró que la resistencia adquirida de ratones a ciertos patógenos entéricos era debida a anticuerpos específicos los cuales están presentes no solo en el suero sino también unidos a las células. Sin embargo, los estudios con *L. monocytogenes* resultaron negativos para la presencia de un anticuerpo protector en el suero o en las células de animales inmunizados de diversas maneras (Miki y Mackaness, 1964).

Años más tarde en 1977, Kearns y Hinrichs reprodujeron los resultados que Mackaness obtuviera en 1962, añadiendo algunos ensayos tratando de explorar la posibilidad de que otras preparaciones antigénicas fuesen efectivas en el establecimiento de la inmunidad a *Listeria*. Para ello utilizaron cepas avirulentas y cultivos de éste microorganismo tratados con formalina, obteniendo como resultado que ninguno de los dos anteriores inmunógenos eran efectivos en el desarrollo de la resistencia adquirida contra *Listeria monocytogenes* (Kearns y Hinrichs, 1977).

La protección cruzada contra *Listeria monocytogenes* fue observada en un estudio en el cual se observó que el crecimiento de éste patógeno en el hígado y bazo de ratones infectados con *Nocardia*, era restringido de una manera más efectiva que en ratones no infectados. El desarrollo de hipersensibilidad retardada al antígeno de *Nocardia* fue correlacionado al incremento de la resistencia a *Listeria*, sugiriendo que ambas propiedades son la consecuencia de un mismo evento inmunológico (Melendro y col., 1978).

Ésta misma protección cruzada fue observada años antes por Krick en sus estudios de resistencia a la infección con *Nocardia asteroides*, donde un grupo de ratones que recibieron macrófagos de ratones previamente inmunizados con células viables de éste patógeno resistieron a la infección con *L. monocytogenes* (Krick y Remington, 1975).

En estudios realizados por Filice y col. se encontró que MN y PMN de individuos normales fueron capaces de destruir el 90% de la *L. monocytogenes* y *S. aureus* en las primeras horas de incubación, no obstante el número de bacterias viables que se encontraron después de las 4 horas fue solamente el 10 y 21% respectivamente (Filice y col. 1980). Estas células fagocíticas eliminan la mayor parte de los microorganismos a través de las vías dependientes e independientes de oxígeno (Simon y Sheagren 1971).

En el año de 1987, Akira y col. encontraron que la transferencia de suero inmune de ratones infectados con *L. monocytogenes* aumentó significativamente la resistencia a esta bacteria, ayudando a la eliminación de la misma en el bazo y disminuyendo la mortalidad en ratones de la cepa C3/H.

Sin embargo se encontró mediante diversas técnicas (ELISA y Sepharosa anti-Ig), que éste factor sérico no era una inmunoglobulina (Akira y col., 1987).

Nakane y cols. encontraron por medio de ensayos inmunoenzimáticos y técnicas inmunohistoquímicas que el IFN- γ endógeno era producido en ratones en los primeros días (del 1 al 4) de la infección con *L. monocytogenes* y no tardíamente como había sido reportado con anterioridad por Gessner y col. (Nakane y col., 1990).

Estudios hechos por Conlan y col., demostraron que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en el hígado durante las primeras 24 horas, estaba asociada con la acumulación de un número grande de neutrófilos en el sitio infeccioso y a su vez con la presencia de *L. monocytogenes* en ese sitio (Conlan y col., 1991 y 1992).

La inmunidad asociada con la DTH es referida como inmunidad celular, y se cree que este tipo de inmunidad constituye la principal defensa contra infecciones causadas por bacterias intracelulares, contrario a las bacterias patógenas extracelulares, porque es conocido que la DTH se genera en respuesta a la listeriosis en ratón.

Por esta razón la listeriosis en ratón podría servir como un modelo para estudiar la inmunidad hacia enfermedades tales como salmonelosis, brucelosis y tuberculosis las cuales son causadas por bacterias patógenas intracelulares. La inmunidad adquirida de estas infecciones está también asociada con la adquisición de un estado de hipersensibilidad tardía que el huésped es capaz de expresar en una reacción inflamatoria en el sitio de la inyección del antígeno bacteriano a las 24 horas, en contraste con el estado de hipersensibilidad inmediata que es mediada por anticuerpos, en el cual el huésped es capaz de dar una reacción entre 1 a 3 horas en respuesta a la inyección del antígeno bacteriano.

Se sabe que la DTH puede ser transferida de animales sensibilizados a animales no sensibilizados con células linfoides pero no con suero, mientras que la hipersensibilidad inmediata es transferida con suero (Gregory y col., 1996).

La rápida eliminación de los patógenos bacterianos de sangre periférica y la subsiguiente eliminación de ese patógeno del hígado es generalmente atribuida a los macrófagos. Se ha visto que el porcentaje de neutrófilos aumenta rápidamente seguido después de una inoculación vía intravenosa del microorganismo alcanzando un máximo a las 2 horas post-infección y entonces el declinamiento va acompañado con la eliminación de la bacteria (Gregory y col., 1996).

La importancia de los macrófagos en la expresión de la resistencia adquirida contra una segunda infección con *Listeria monocytogenes* fue estudiada en ratones por Samsom y cols.

Ellos eliminaron selectivamente los macrófagos residentes del hígado y bazo mediante una inyección de liposomas con diclorometileno difosfonato, sin afectar la cantidad de otras células como granulocitos, monocitos o linfocitos de sangre periférica ni su migración al sitio de inflamación. En el día 3 después de la infección secundaria, el número de microorganismos en el hígado y bazo de los ratones tratados con ésta inyección de liposomas era cuatro veces mayor que en los ratones control (cuyos macrófagos no fueron eliminados). De esta manera se concluyó que los macrófagos son requeridos para la expresión de la resistencia adquirida contra *L. monocytogenes* (Samsom y col., 1996).

Edelson y Unanue reportaron que el tratamiento de ratones con un anticuerpo monoclonal (mAb) contra listeriolisina O (LLO) toxina formadora de poros de *L. monocytogenes*, confería resistencia contra este microorganismo intracelular. Los macrófagos infectados en presencia del mAb anti-LLO mostraron una reducción significativa en el crecimiento intracelular de *Listeria*. El mAb anti-LLO no opsonizó *Listeria* pero, actuó dentro de los macrófagos para neutralizar la LLO (Edelson y Unanue, 2001). En el 2002 Sashinami y col. encontraron que las células dendríticas de bazo de ratones infectados con *L. monocytogenes* in vivo, funcionaron como inmunógeno efectivo con el cual es posible inducir inmunidad específica de antígeno (Sashinami y col., 2002).

2.2 Inmunoprotección contra *Salmonella*.

Las especies de *Salmonella* son bacilos anaerobios facultativos, Gram negativos, flagelados y están caracterizados por sus antígenos O, H y Vi. Existen más de 1800 serovares conocidos, los cuales son considerados como subespecies.

Las infecciones por *Salmonella* continúan siendo importantes para la salud mundial (Clare y col., 2003).Prácticamente todas las especies de *Salmonella* son patógenas para las personas, una de ellas *S. typhi*, causa la grave enfermedad humana que es la fiebre tifoidea, y otro pequeño número de especies transmitidas por los alimentos o por animales domésticos a humanos causan gastroenteritis. *Salmonella typhimurium* es la causa más común de salmonelosis en los seres humanos (Brock, 1998).

Los primeros experimentos concernientes a la transferencia pasiva de resistencia adquirida a patógenos entéricos fueron realizados en el año de 1964 por Jenkin y col. Ellos encontraron que en el modelo de fiebre tifoidea en ratones, en el cual ocurre el parasitismo intracelular, la resistencia adquirida dependía de la producción de anticuerpos específicos los cuales presentaron una marcada tendencia a ser adsorbidos a la superficie de las células hospederas (Jenkin y Rowles, 1964).

En el año de 1972 se estudió la inmunidad a la infección por *Salmonella typhimurium*, mediante la caracterización de sus antígenos en la protección activa por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida. En este estudio se encontró que los microorganismos viables inducían la mejor protección, utilizando también fracciones subcelulares de las cuales los ribosomas fueron el mejor inmunógeno. Los antígenos con bajas cantidades de proteínas no indujeron protección, así como los antígenos con altas concentraciones de proteína (Houchens y Wright, 1972).

Posteriormente se realizaron experimentos utilizando ratones de la cepa Swiss, los cuales fueron inmunizados con bacterias muertas con acetona de *Salmonella typhosa*, *S. typhimurium* e híbridos de *Salmonella typhimurium* virulentos para ratones. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios sugieren que los antígenos de *Salmonella* utilizados, son importantes en la protección contra la infección por éste microorganismo (Diena y col., 1974).

En 1984 se estudió la inmunoprotección contra *S. typhimurium* por medio de diversas vacunas combinadas de éste microorganismo con mutantes S y R de *Salmonella* así como *E. coli*, lipopolisacáridos y otros componentes celulares (Schlecht, 1984).

Killion y Morrison inmunizaron ratones de la cepa C3H/HeJ con complejos de Lipopolisacárido (LPS) –Proteína asociada a Lípido A (LPA), previo a la infección con una dosis letal de *Salmonella typhimurium*. Sus resultados demostraron que estos ratones hipersensibles a *Salmonella* fueron efectivamente protegidos contra varias dosis letales 100 y 50%, mientras que el grupo inmunizado solamente con LPS mostró menos protección (Killion y Morrison, 1986).

Estudios de protección pasiva de calves contra la infección experimental con *Salmonella typhimurium* fueron realizados, encontrando que al vacunar un grupo de vacas con *S. typhimurium* muertas por formalina aproximadamente 7 semanas y 2 semanas antes del parto, se confería protección a sus crías al ser sometidos a una dosis de éste patógeno aún cuando las crías habían consumido calostro de sus madres durante solo 48 hrs (Jones y col., 1988).

La mayoría de la *Salmonella* está localizada dentro de los fagocitos en los granulomas de hígado y bazo (Richter-Dahlfas, 1997). En trabajos realizados con *Salmonella* se encontró que el crecimiento de esta bacteria solamente es controlado por el sistema retículo endotelial en ratones y es llevado a cabo por el gen *Nramp-1* expresado por los macrófagos (Lang y col. 1997).

Cano y col. encontraron que *Salmonella typhimurium* posee reguladores de los factores de virulencia, los cuales están involucrados en una respuesta diseñada para atenuar la tasa de crecimiento intracelular en células no fagocíticas. Esta respuesta de atenuación del crecimiento va acompañada de funciones que aseguran la viabilidad de la bacteria (Cano y col., 2001).

El modelo de ratón de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ha facilitado un mejor entendimiento de los mecanismos de patogénesis y de inmunidad que están involucrados en la infección, que puedan acercarse más al tratamiento y al desarrollo de vacunas contra la salmonelosis en humanos y animales (Simon y Clare 2003).

Recientemente Okamura y col. estudiaron la respuesta diferencial de los macrófagos en las infecciones provocadas por *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) y Typhimurium (ST) en el cual determinaron fagocitosis bacteriana.

Ellos encontraron que los macrófagos fagocitan en un porcentaje similar a SE y ST en presencia o ausencia de IFN-gamma, también se encontró que el número de SE vivos estaba significativamente reducido comparado con ST en presencia o ausencia de IFN-gamma, además de incrementarse la necrosis de los macrófagos en la presencia de IFN-gamma y ST. Existen reportes donde se ha visto que la infección por *Salmonella* actúa sinérgicamente con IFN-gamma en la inducción de la producción de óxido nítrico (Okamura y col., 2005).

2.3 Inmunoprotección contra *Nocardia brasiliensis*.

En el caso de la infección causada por *Nocardia brasiliensis* no se conoce mucho en cuanto a la inmunoprotección.

Los primeros experimentos relacionados con la inmunoprotección contra actinomicetos fueron realizados con *Nocardia asteroides* en 1975, en donde observaron la resistencia a la infección por este microorganismo en ratones previamente inmunizados con células viables de *N. asteroides*. En este estudio no pudo transferirse la resistencia por medio de suero o células de bazo procedentes de ratones donadores inmunizados. Además, se encontró que un grupo de ratones que recibieron macrófagos de ratones inmunizados con *N. asteroides* eran resistentes a la infección con *L. monocytogenes* (Krick y Remington, 1975).

En 1980, Melendro y col. estudiaron la resistencia a la infección con *Nocardia brasiliensis* en ratones inmunizados con células viables o muertas de la bacteria y con BCG. Después de 20 días de la inoculación, los ratones presentaron una resistencia significativa a la infección en comparación con los ratones no infectados o no inmunizados. El grado de resistencia parecía estar correlacionado con la respuesta de hipersensibilidad tardía en los animales vacunados. Los niveles de anticuerpos para *Nocardia* eran muy similares en el grupo tratado con *Nocardia* o con BCG, indicando que éstos no juegan un papel muy importante en la resistencia a la infección por *N. brasiliensis* (Ximénez y col., 1980).

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

Resultados similares fueron observados con *Leishmania donovani* (Blander y Horwitz 1991) así como también con *Candida albicans* (Tavares y col. 2003) específicamente con la proteína P43 donde anticuerpos generados contra esta proteína evitan la aparición de candidiasis sistémica después de la infección con dosis subletal y letal de dicho microorganismo en ratones de BALB/c.

En el caso de las infecciones causadas por bacterias intracelulares, específicamente en el caso de las infecciones causadas por *Nocardia brasiliensis*, recientemente se encontraron evidencias de que los anticuerpos IgM juegan un papel protector en la infección causada por este microorganismo (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera 2004). Sin embargo, existen estudios realizados desde 1992 por Salinas-Carmona y col. donde se identificaron algunas proteínas inmunodominantes (P24, P26 y P61) a partir de un extracto crudo de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 registrada en el ATCC 700358 (Salinas-Carmona y col. 1992). Tales proteínas fueron reconocidas solamente por los sueros de los pacientes con micetoma y no por sueros de pacientes con tuberculosis y lepra (Vera-Cabrera y col. 1992).

Además Salinas-Carmona y col. lograron inducir el micetoma experimental en modelos de ratones BALB/c infectándolos con *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358) (Salinas-Carmona y col. 1999).

Posteriormente fue posible determinar que de las proteínas inmunodominantes, la proteína P61 y la proteína P38 con actividad caseinolítica son extracelulares, ya que se identificaron en el filtrado de cultivo mientras que la P24 solamente se encuentra en el extracto proteico. En experimentos de transferencia pasiva de sueros hiper-inmunes provenientes de ratones BALB/c inmunizados con bacterias muertas por calor a ratones BALB/c posteriormente infectados con *N. brasiliensis*, los resultados mostraron protección parcial en el establecimiento experimental del micetoma en dichos ratones (Salinas-Carmona, Torres-López 1996).

Más tarde se hicieron experimentos de transferencia pasiva de sueros hiper-inmunes provenientes de ratones inmunizados con extracto crudo de *N. brasiliensis* obtenidos a diferentes tiempos post-inmunización (30, 60, 90 y 120 días) y transferidos a otros ratones BALB/c los cuales posteriormente fueron infectados con *N. brasiliensis* para inducir el micetoma experimental. Los resultados obtenidos con la transferencia de sueros de 90 y 120 días fue que ninguno de los ratones que recibieron tales sueros quedaron protegidos ya que todos los animales desarrollaron micetoma, mientras que los resultados con la transferencia de los sueros de los días 30 y 60 mostraron una protección parcial (Licón-Trillo, Castro-Corona y Salinas-Carmona 2003).

Al analizar la presencia de anticuerpos anti- *N. brasiliensis* por medio de ELISA, los sueros de los 90 y 120 días presentaron título alto de anticuerpos clase IgG mientras que en los sueros del día 30 y 60 post-inmunización se detectaron pocos anticuerpos de clase IgG (Salinas-Carmona y col. 1993).

Para la defensa del huésped contra las infecciones por microorganismos intracelulares entre ellos *Nocardia*, se han propuesto como esenciales tanto los efectores de la resistencia innata como los de la inmunidad adquirida específica (Beaman y col. 1995).

Existen trabajos con microorganismos intracelulares entre los cuales están *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia* entre otros, los cuales han concluido que es la respuesta inmune celular la que tiene un papel importante en la protección contra la enfermedad, mientras que el papel que juega la respuesta inmune humoral al parecer no es importante, hay quienes han reportado que mas que ayudar empeoran las lesiones (Ortiz-Ortiz y col. 1984).

Sin embargo, recientemente en experimentos de inmunización activa y pasiva con antígenos de *N. brasiliensis* se encontró que solamente en el suero y las células obtenidas en los primeros días de la inmunización existe un efecto protector lo cual evita el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera 2004).

Tales resultados indican que la respuesta inmune mediada por IgM sí juega un papel importante en la protección contra las enfermedades causadas por microorganismos en este caso por *Nocardia brasiliensis*.

Existen otros trabajos realizados con virus y bacterias tales como *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* y *Nocardia brasiliensis*, donde se ha visto que la respuesta inmune innata juega un papel importante en el establecimiento de la enfermedad (Zinsser).

La protección observada en los trabajos realizados por Salinas-Carmona y col. es al parecer debida a IgM producida en los primeros días de la respuesta inmune. Tales resultados mostraron que existen dos picos en la producción de la IgM a los 7 y 15 días de la inmunización. Se sabe que la IgM producida en los primeros días de la respuesta inmune innata no es específica (poli reactiva) y es producida por una subpoblación de células B1a, mientras que la IgM específica de antígeno es producida por otra subpoblación.

Sin embargo, aún no se conoce si la protección observada en los primeros días es debida a la IgM polireactiva o a la IgM específica.

HIPÓTESIS

Los anticuerpos IgM inducidos por antígenos particulados de *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium previenen de manera inespecífica el establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la protección y la especificidad *in vivo* e *in vitro* de los anticuerpos IgM inducidos por diferentes microorganismos intracelulares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inmunizar a ratones BALB/c con bacterias muertas por calor con diferentes microorganismos intracelulares: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (cepas SL3261 y SL3261 piEGFP) y *Nocardia brasiliensis*.
2. Obtener los sueros de los animales inmunizados a diferentes tiempos: 0, 7, 15 y 30 días post- inmunización.
3. Determinar IgM total y específica de antígeno mediante nefelometría y técnica inmunoenzimática (ELISA).
4. Evaluar la actividad neutralizante de los sueros previamente obtenidos en los días 0, 7, 15 y 60 post- inmunización de ratones BALB/c inmunizados con bacterias muertas por calor con los microorganismos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis* sobre cultivos bacterianos de dichos microorganismos.
 - 4.1 Determinar dicha actividad en forma directa, evaluando el efecto del suero del microorganismo sobre el cultivo del mismo para el caso de los cuatro microorganismos.
 - 4.2 Realizar la determinación de la actividad neutralizante en forma cruzada, evaluando el efecto de los diferentes sueros obtenidos sobre cada uno de los cultivos.
5. Evaluar el efecto protector de la inmunización activa y pasiva inducida por antígenos particulados de los diferentes microorganismos en el establecimiento y evolución de la infección por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

1. Material biológico.

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

1.2 Cepas bacterianas.

- a) *Listeria monocytogenes*.
- b) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepas SL3261-piEGFP y SL3261.
- c) *Nocardia brasiliensis* cepa ATCC 700358 (HUJEG-1).

Las cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (SL3261-piEGFP y SL3261) fueron gentilmente donadas por el Dr. César González Bonilla. La cepa de *Listeria monocytogenes* fue donada por la Dra. Alma Yolanda Arce del Laboratorio de Inmunoinfectología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina U.A.N.L. La cepa de *N. brasiliensis* ATCC 700358 (HUJEG-1) se aisló de un paciente con micetoma en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, fue identificada por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y confirmada por June Brown del Laboratorio de Actinomicetos del Center for Disease Control (CDC, Atlanta). Esta cepa de referencia está depositada en la Colección Americana de Células Tipo (ATCC # 700358) y se mantiene en cultivos en agar Sabouraud.

1.2.1 Obtención de la suspensión unicelular.

Nocardia brasiliensis fue cultivada en medio BHI por 3 días a 37°C y posteriormente se dividió en alícuotas que fueron conservadas a -70°C en leche descremada al 2%.

1.2.1.1 **Determinación de la dosis infectante en UFC/ ml de *Nocardia brasiliensis*.**

Fue necesario determinar el número de UFC/ ml de la suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis*, para posteriormente ajustar a una concentración de 10×10^6 UFC/ ml y después infectar con 0.1 ml en el cojinete plantar a los ratones BALB/c.

1.2.1.1.1. **Micrométodo de Miles y Misra para cuantificar unidades formadoras de colonias.**

Para conocer las UFC/ ml que contenía el inóculo de *Nocardia brasiliensis*, se utilizó el método de vertido en placa en el cual se pipetó 1ml de diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 y 1:100 000 de la suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis* e inmediatamente se vertieron 10 ml del medio de cultivo Agar-BHI estéril previamente fundido y enfriado hasta 40°C.

Inmediatamente se mezclaron agitando en forma circular las placas y después de que el medio de cultivo solidificó en las placas, se colocaron hacia abajo y se incubaron a 37°C por 3 días.

El número de colonias de cada placa se contó con la ayuda de un cuenta-colonias (Québec Darfield Colony Counter, Reichter- Jung) y la cantidad de UFC/ ml se determinó por multiplicación del número promedio de colonias que crecieron en una superficie de un cm^2 por el área de la placa utilizada.

1.3 **Obtención de antígenos particulados de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis*.**

1.3.1 Bacterias muertas por calor.

Listeria monocytogenes, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fueron sometidas a 60°C por 1 hora, después se lavaron 2 veces con Buffer Salina- Fosfato (PBS). *Nocardia brasiliensis* se sometió a 121°C por 15 minutos y posteriormente se lavó 2 veces con Buffer Salina- Fosfato (PBS).

2. Esquema de inmunización general.

Para la realización de estos experimentos se utilizó un esquema que ha sido determinado en el Departamento de Inmunología. Se utilizaron 3 grupos de 10 animales, más un grupo de control dando un total de 40 ratones BALB/ c.

3. Obtención de sueros hiperinmunes contra antígenos particulados de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis*.

Para la obtención del suero hiper- inmune de los días 0,7, 15 y 60 días, se realizó una sola inmunización con antígenos particulados (BMC) y después se sangraron todos los animales a partir del plexo retroorbitario. El suero obtenido se filtró por 0.22 μ m y se congeló a -20°C hasta su uso. Finalmente se hizo la mezcla de los sueros homólogos obtenidos con el fin de determinar su volumen.

3.1 Análisis de los sueros hiper- inmunes.

Una vez recolectados los sueros hiper-inmunes contra los antígenos particulados, se determinaron los anticuerpos tipo IgM total y específico de antígenos.

3.1.1 Determinación de anticuerpos IgM total.

Mediante una técnica de nefelometría con rayos láser se determinaron los anticuerpos IgM totales en los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con antígenos particulados provenientes de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhimurium* GFP y *Nocardia brasiliensis*. Para la realización de esta técnica se utilizaron cubetas de poliestireno a las cuales se agregaron 200 μ l de los sueros problemas diluidos 1:5 y posteriormente se les agregó 100 μ l del antisuero anti- IgM (SIGMA) dilución 1: 10. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 min y se leyeron utilizando un Nefelómetro (Behring). Las lecturas resultantes se obtuvieron en voltios.

3.1.2 Determinación de IgM específica de antígeno.

Para la determinación de la IgM específica de antígeno se realizó una prueba inmunoenzimática (ELISA), para la cual se utilizaron los parámetros ya establecidos en una técnica de ELISA previamente estandarizada para la determinación de anticuerpos contra antígenos de *N. brasiliensis* (Salinas-Carmona y col.1993). Además se estandarizaron dos nuevas técnicas de ELISA para determinar anticuerpos contra antígenos de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.

Para ello utilizamos placas de poliestireno de fondo plano (Costar) con 96 pozos y básicamente seguimos la metodología originalmente descrita por Engvall y Perlmann con algunas modificaciones adaptadas en nuestro laboratorio y publicadas previamente. El extracto proteico en concentración de 0.2 g por micropozo, disueltas en amortiguador de acetatos pH 5 se dejó en incubación a 4°C durante toda la noche; después se realizaron 5 lavados con una solución de salina y fosfatos pH 7.2 en presencia del detergente Tween 20, diluído 1:1,000. Los pozos se bloquearon luego con una solución de leche descremada al 5% en salina-fosfatos y se volvió a lavar con la solución antes mencionada. Los sueros de personas sanas se diluyeron 1:500 y se incubaron a 37°C por una hora. Después se agregaron 200µl de un conjugado comercial de peroxidasa con anti-inmunoglobulina G humana y de nuevo se incubó por una hora a 37°C. Luego de lavar la placa de nuevo, se agregó una mezcla de sustrato cromógeno compuesta de peróxido de hidrógeno y O-fenilendiamina (Sigma). La reacción se terminó con ácido sulfúrico 1N y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 492 nanómetros (PMQ3 Zeiss). El mismo procedimiento se utilizó para los cuatro microorganismos (*N. brasiliensis*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *S. typhimurium* GFP).

4. Efecto de la inmunización activa y pasiva en el establecimiento y evolución de la infección por *Nocardia brasiliensis*.

4.1 Inmunización activa.

Para estudiar el efecto de la inmunización activa se utilizaron bacterias muertas por calor (BMC) de los siguientes microorganismos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis* a ratones BALB/c.

4.2 Inmunización pasiva.

Para el estudio del efecto de la inmunización pasiva de antisueros anti- antígenos particulados en el establecimiento y evolución de la infección con *Nocardia brasiliensis*, se realizaron experimentos de transferencia pasiva de antisueros contra antígenos de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis*, obtenidos de ratones previamente inmunizados con antígenos particulados (BMC) de los mismos microorganismos. Los sueros que se utilizaron para este experimento fueron los obtenidos en los días 0, 7, 15 y 60 post- inmunización.

Este experimento constó de dos etapas:

- 1) Transferencia pasiva de los antisueros obtenidos de ratones inmunizados con antígenos de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis* (donadores) a otro grupo de ratones (receptores).
- 2) Infección con *Nocardia brasiliensis*.

5. Evaluación del efecto neutralizante de los sueros de ratones BALB/c inmunizados con bacterias muertas por calor con *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Nocardia brasiliensis* sobre cultivos bacterianos de dichos microorganismos.

A partir de un cultivo en placa de *N. brasiliensis* se tomó una asada la cual fue inoculada en un matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 30 ml de caldo BHI en condiciones de esterilidad, el cultivo se dejará 3 días a una temperatura de 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se lavó el cultivo con solución salina y se homogenizó utilizando un potter Evelham para tomar 1 ml del inóculo y realizar diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000) en tubos conteniendo solución salina. Se tomó 1 ml de cada una de las diluciones para verterla cada una en una caja de Petri a la cual posteriormente se le añadieron 10 ml de medio Agar- BHI, las placas se colocaron en incubación a 37°C por aproximadamente 3 días, todo fue realizado en condiciones de esterilidad. Ya crecidos los cultivos se contó el número de UFC/ml, y se seleccionó la dilución que dio una cuenta deseable (entre 30 y 300 colonias).

Posteriormente se vació la dilución seleccionada en tubos Eppendorf y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos, después se tiró el sobrenadante y se agregó 1 ml del suero tomado a diferentes tiempos (0, 7, 15 y 30 días), teniendo siempre un control al cual se le añadió solamente solución salina. Estos tubos se incubaron por 30 minutos a 37°C y posteriormente fueron centrifugados a 10 000 rpm por 10 minutos, después se realizaron dos lavados en solución salina y se resuspendieron en 1 ml de la misma. Posteriormente se vació la suspensión bacteriana en nuevas placas de Petri agregando 10 ml de medio Agar-BHI para incubar por 1 o 2 días a 37°C y finalmente, con la ayuda de un cuenta-colonias (Québec Darfield Colony Counter, Reichter- Jung), se contó la cantidad de UFC/ml la cual fue obtenida por multiplicación del número promedio de colonias que crecieron en una superficie de un cm² por el área de la placa utilizada, determinando así el efecto neutralizante de los sueros.

RESULTADOS

1. Determinación de IgM total y específica de antígeno mediante Nefelometría y técnica inmunoenzimática (ELISA).

Los ratones fueron inmunizados con 0.5 ml de una suspensión celular de BMC conteniendo 3.36×10^{14} UFC/ml de *Salmonella typhimurium* GFP, 5.31×10^{14} UFC/ml de *Salmonella typhimurium*, 1.66×10^{10} UFC/ml de *Nocardia brasiliensis* y 6.43×10^{14} UFC/ml de *Listeria monocytogenes*. Para la determinación de IgM total en los sueros obtenidos de ratones inmunizados con BMC de los diferentes microorganismos utilizados en nuestro estudio, realizamos una técnica nefelométrica y en el caso de la IgM específica se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 1.

| Microorganismo/ suero día | IgM total (Volts) | IgM específica (nm Abs) |
|------------------------------|----------------------|----------------------------|
| St0 | 3.28 | 1.243 |
| St7 | 1.32 | 1.472 |
| St15 | 0.89 | 1.607 |
| St60 | 2.24 | 0.033 |
| StF0 | 2.68 | 1.699 |
| StF7 | 0.57 | 1.927 |
| StF15 | 2.62 | 1.86 |
| StF60 | 1.08 | 1.88 |
| Lm0 | 2.71 | 1.702 |
| Lm7 | 0.96 | 1.049 |
| Lm15 | 1.13 | 2.637 |
| Lm60 | 3.27 | 2.866 |
| Nb0 | 4 | 1.1 |
| Nb7 | 1.22 | 1.67 |
| Nb15 | 5.7 | 1.644 |
| Nb60 | 5.87 | 1.019 |

Tabla 1. Valores de IgM total y específica de los sueros obtenidos a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de *S. typhimurium*, *S. typhimurium* GFP, *L. monocytogenes* y *N. brasiliensis*. Los valores más altos de cada grupo están resaltados.

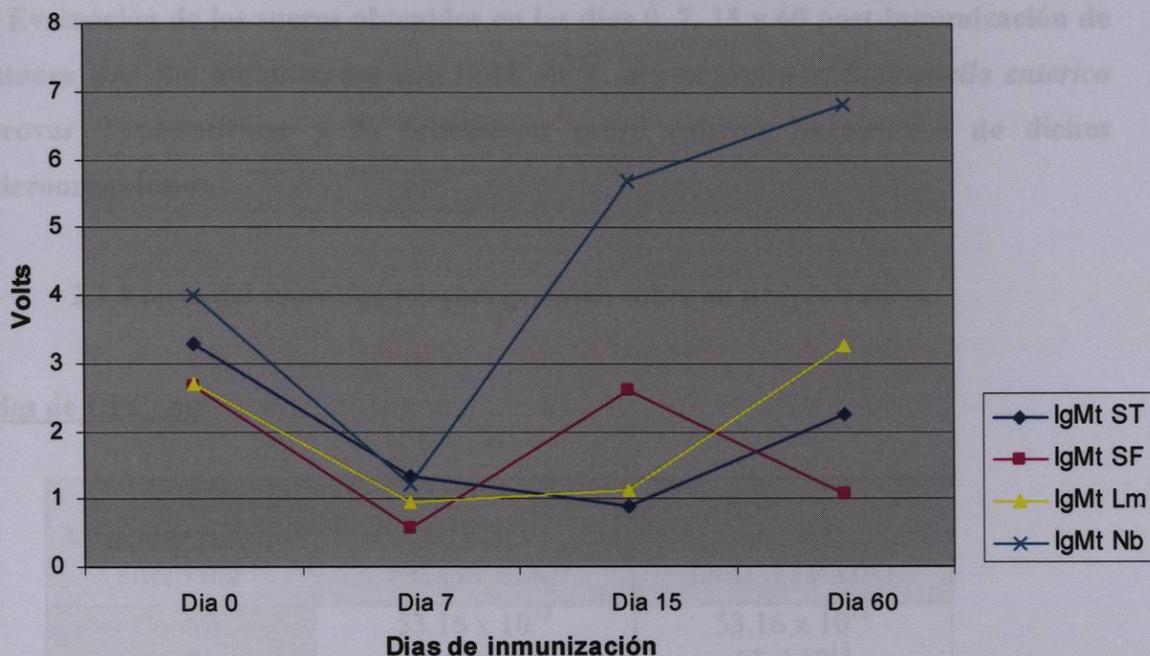


Figura 1.1. Determinación de IgM total (nefelometría) en sueros de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares.

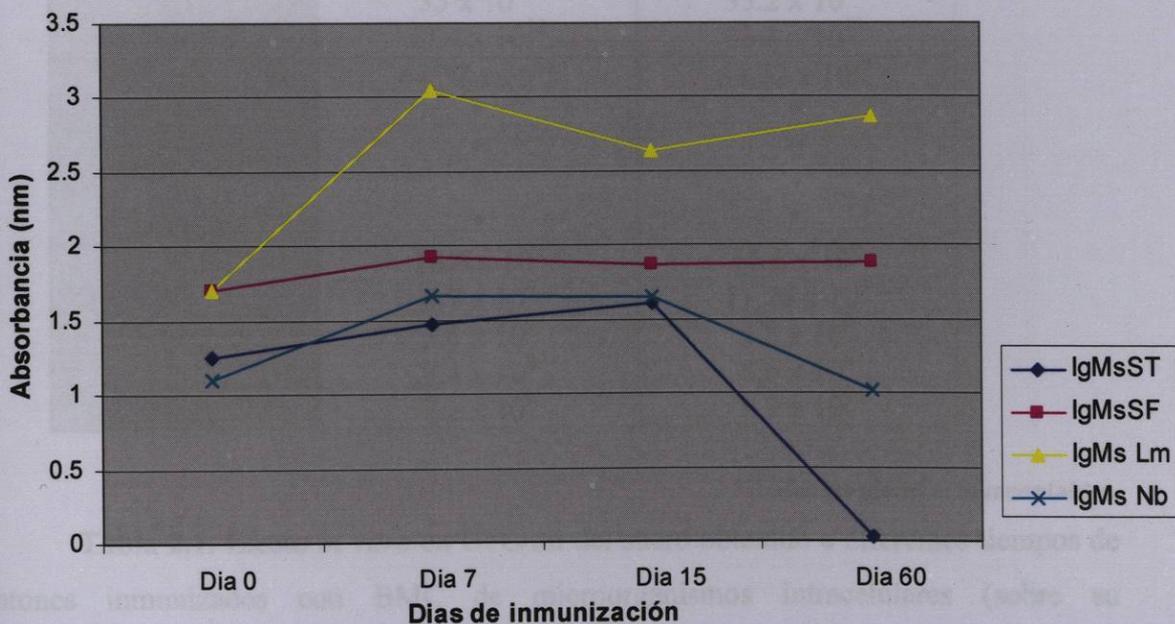


Figura 1.2. Determinación de IgM específica (ELISA) en sueros de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares.

2. Evaluación de los sueros obtenidos en los días 0, 7, 15 y 60 post-inmunización de ratones BALB/c inmunizados con BMC de *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *N. brasiliensis* sobre cultivos bacterianos de dichos microorganismos.

2.1 Efecto del suero del microorganismo sobre su propio cultivo.

Cantidades de UFC/ ml

| Microorganismo/ suero día | SUERO ACTIVADO | SUERO INACTIVADO |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Control | 53.16 x 10 ¹³ | 53.16 x 10 ¹³ |
| St0 | 78.5 x 10 ¹³ | 61 x 10 ¹³ |
| St7 | 41.2 x 10 ¹³ | 49.7 x 10 ¹³ |
| St15 | 87.2 x 10 ¹³ | 37.7 x 10 ¹³ |
| St60 | 58.8 x 10 ¹³ | 52.4 x 10 ¹³ |
| Control | 33.6 x 10 ¹³ | 33.6 x 10 ¹³ |
| Sf0 | 36.9 x 10 ¹³ | 41.9 x 10 ¹³ |
| Sf7 | 27.7 x 10 ¹³ | 22.6 x 10 ¹³ |
| Sf15 | 35 x 10 ¹³ | 33.2 x 10 ¹³ |
| Sf60 | 27.4 x 10 ¹³ | 33.8 x 10 ¹³ |
| Control | 64.32 x 10 ¹³ | 64.32 x 10 ¹³ |
| Lm0 | * | * |
| Lm7 | * | * |
| Lm15 | * | * |
| Lm60 | * | * |
| Control | 16.6 x 10 ⁹ | 16.6 x 10 ⁹ |
| Nb0 | 6.7 x 10 ⁹ | 11.28 x 10 ⁹ |
| Nb7 | 3.6 x 10 ⁹ | 4.8 x 10 ⁹ |
| Nb15 | 7.4 x 10 ⁹ | 8.6 x 10 ⁹ |
| Nb60 | 7.2 x 10 ⁹ | 8.9 x 10 ⁹ |

* Todas las placas eran **incontables**.

Tabla 2.1. Efecto *in vitro* en UFC/ml del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares (sobre su propio cultivo).

Porcentajes de inhibición

| Microorganismo/ suero día | SUERO ACTIVADO | SUERO INACTIVADO |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| St0 | 0 % | 0 % |
| St7 | 23 % | 7 % |
| St15 | 0 % | 30 % |
| St60 | 0 % | 2 % |
| Sf0 | 0 % | 0 % |
| Sf7 | 18 % | 33 % |
| Sf15 | 0 % | 2 % |
| Sf60 | 19 % | 0 % |
| Lm0 | 0 % | 0 % |
| Lm7 | 0 % | 0 % |
| Lm15 | 0 % | 0 % |
| Lm60 | 0 % | 0 % |
| Nb0 | 60 % | 33 % |
| Nb7 | 79 % | 72 % |
| Nb15 | 56 % | 49 % |
| Nb60 | 57 % | 47 % |

Tabla 2.2. Efecto *in vitro* en porcentajes, del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares (sobre su propio cultivo).

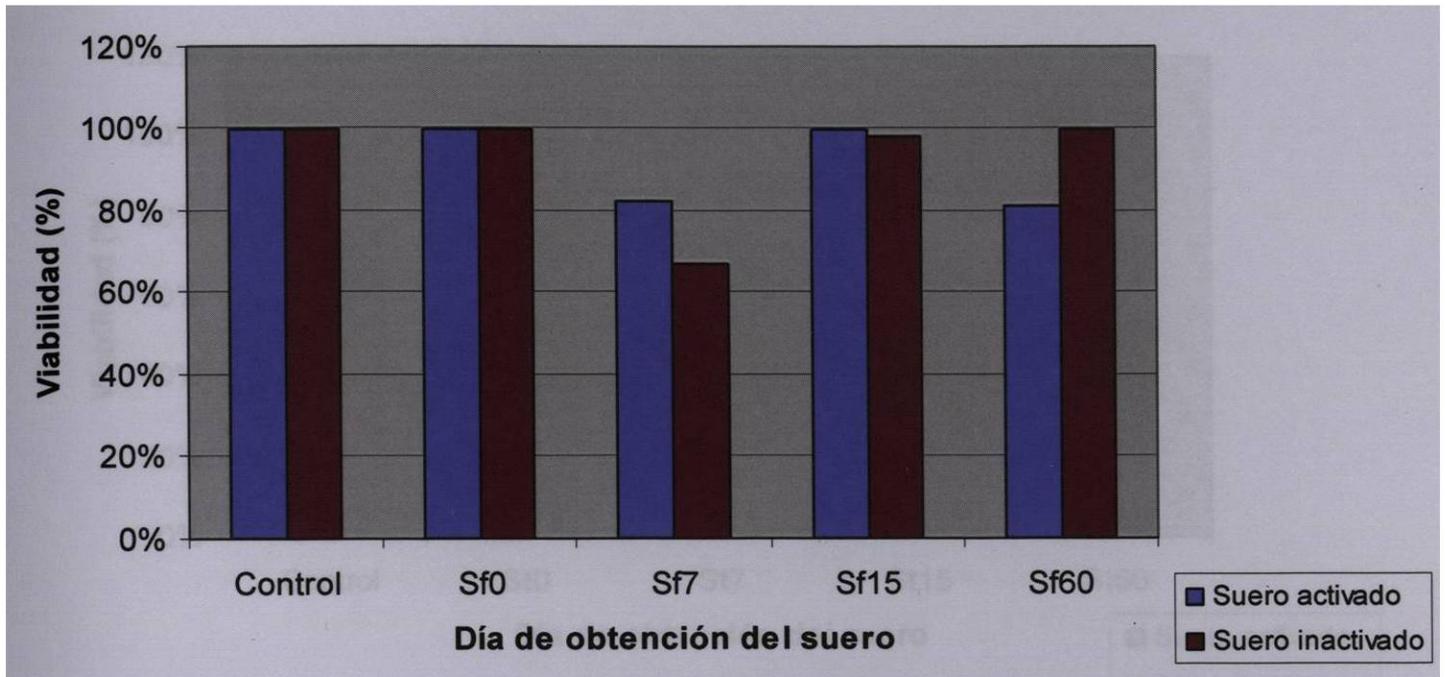


Figura 2.1.1. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de *Salmonella typhimurium* GFP (Sf) sobre su propio cultivo.

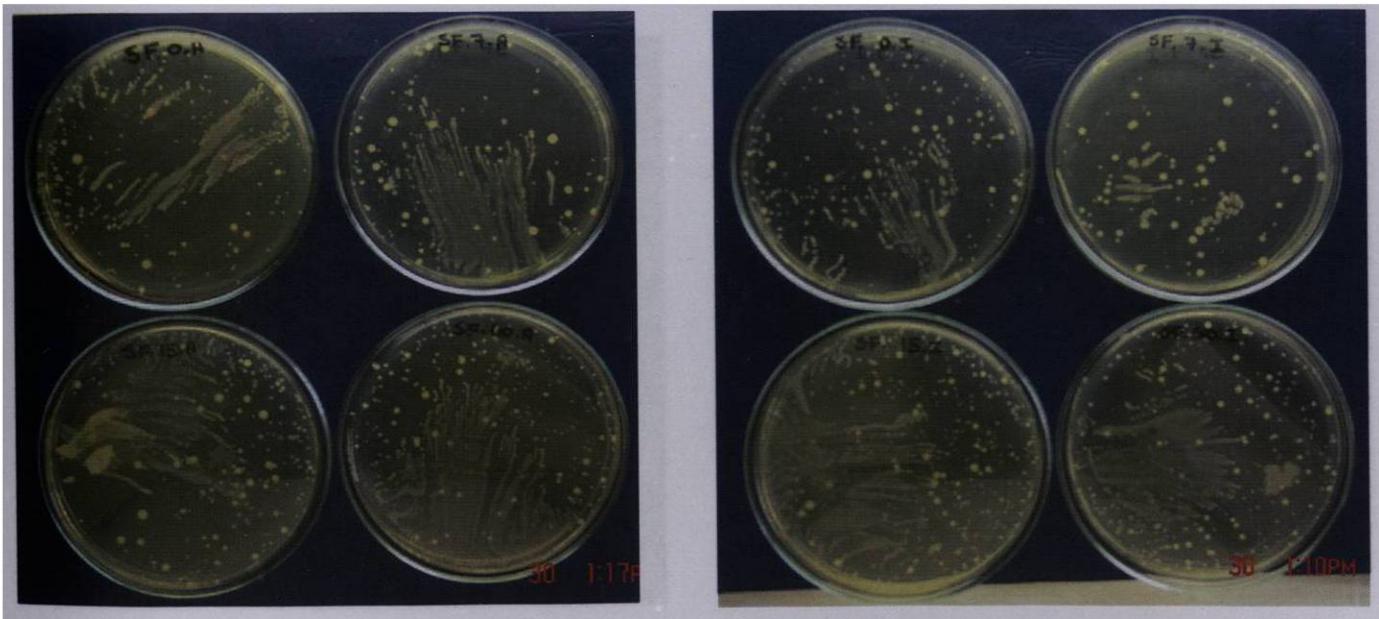


Figura 2.1.2. Evaluación del efecto del suero activado (izquierda) e inactivado (derecha) obtenido a diferentes tiempos (días 0, 7, 15 y 60) de ratones inmunizados con BMC de *Salmonella typhimurium* GFP (Sf) sobre su propio cultivo (método de Miles y Misra).

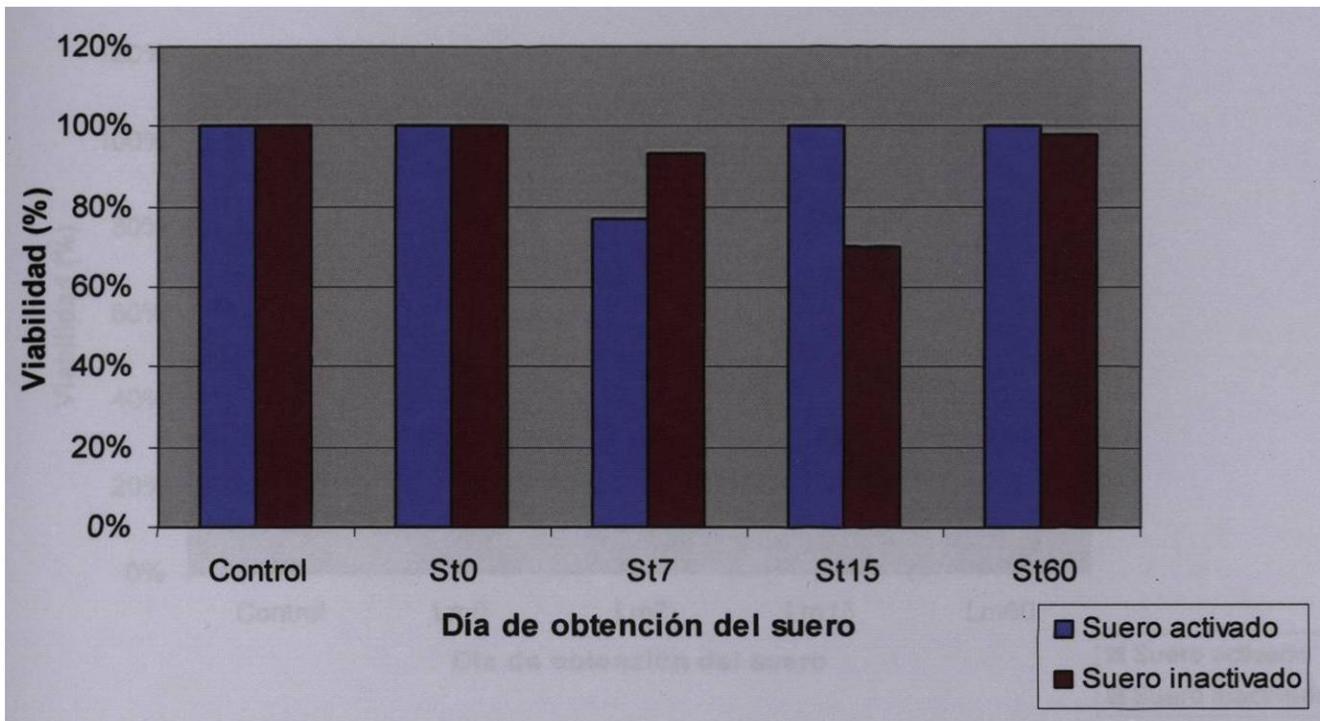


Figura 2.1.3. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de *Salmonella typhimurium* (St) sobre su propio cultivo.

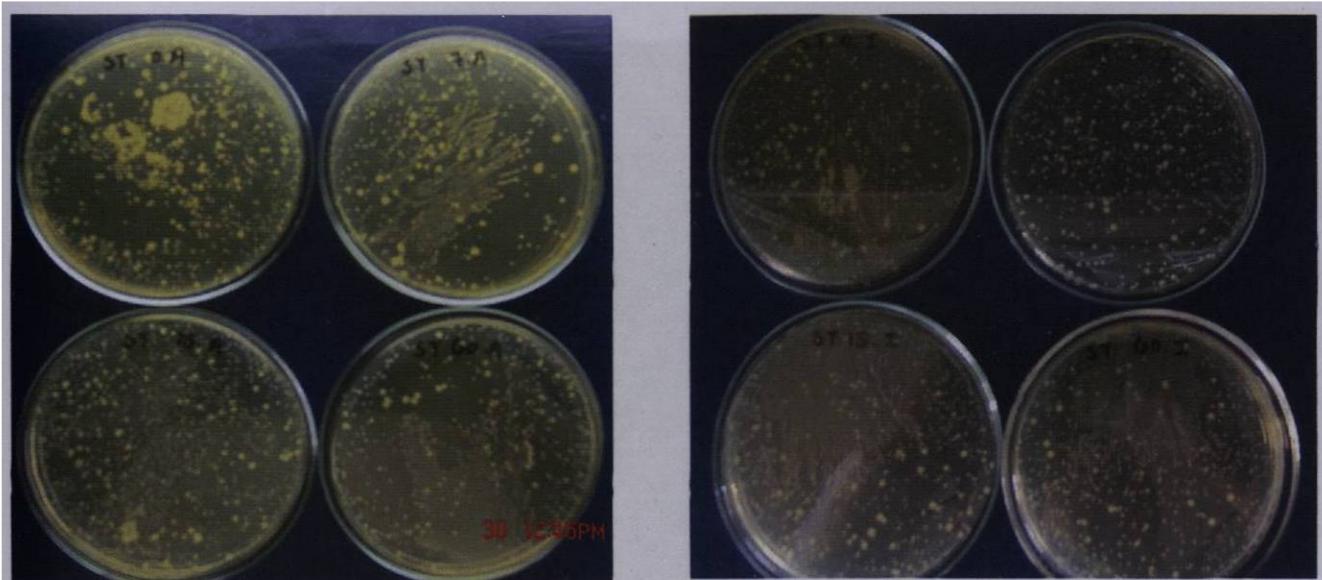


Figura 2.1.4. Evaluación del efecto del suero activado (izquierda) e inactivado (derecha) obtenido a diferentes tiempos (días 0, 7, 15 y 60) de ratones inmunizados con BMC de *Salmonella typhimurium* (St) sobre su propio cultivo (método de Miles y Misra).

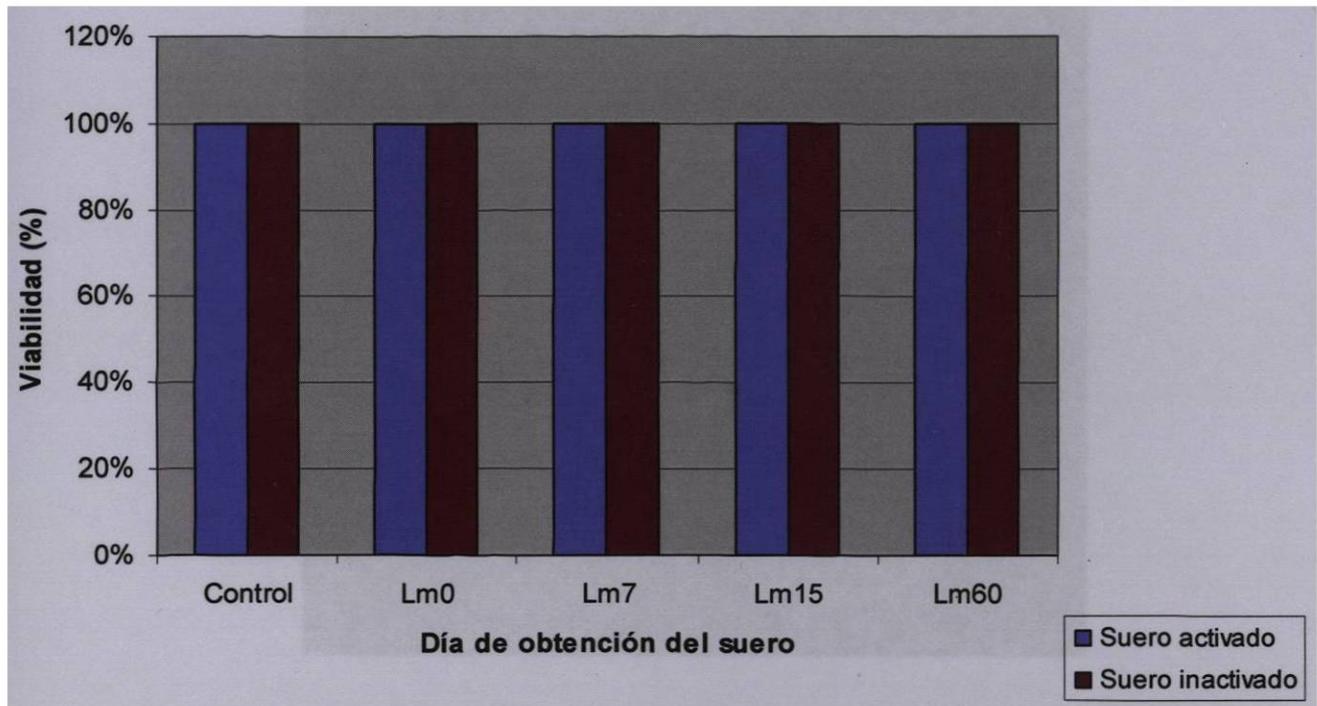


Figura 2.1.5. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de *Listeria monocytogenes* (Lm) sobre su propio cultivo.

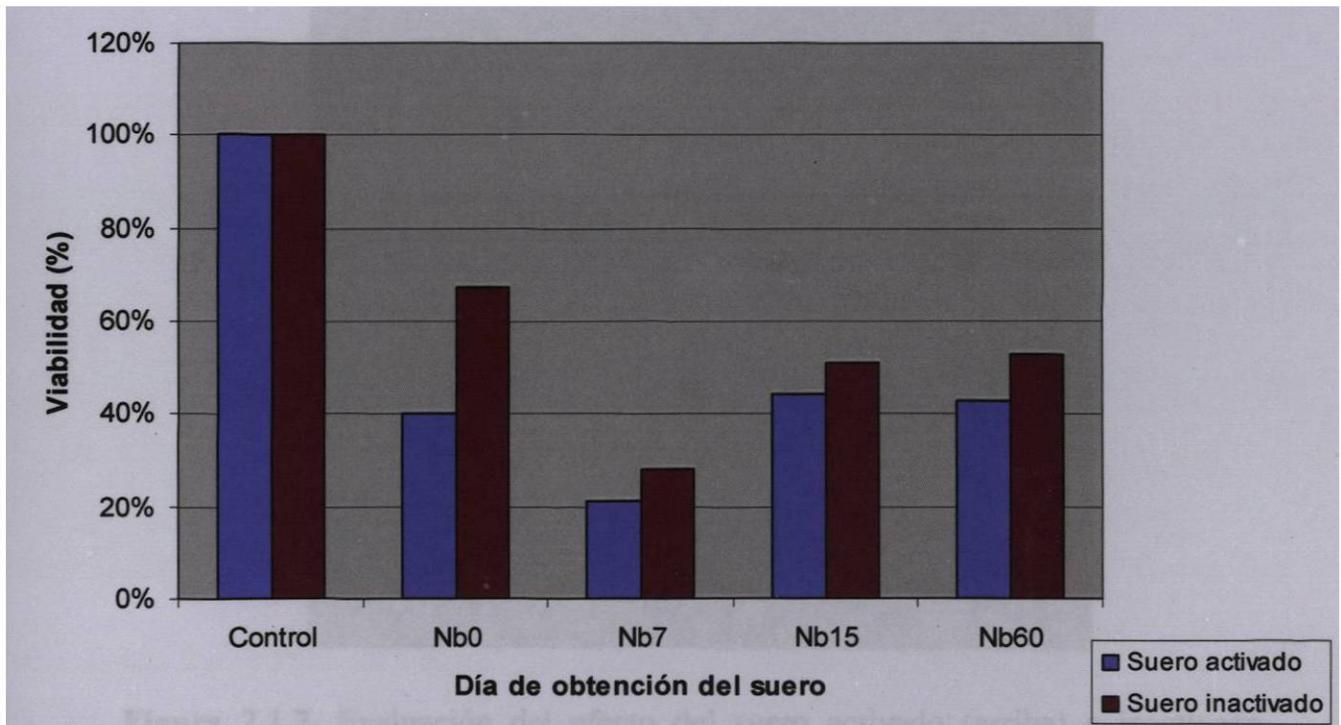


Figura 2.1.6. Efecto del suero obtenido a diferentes tiempos de ratones inmunizados con BMC de *Nocardia brasiliensis* (Nb) sobre su propio cultivo.

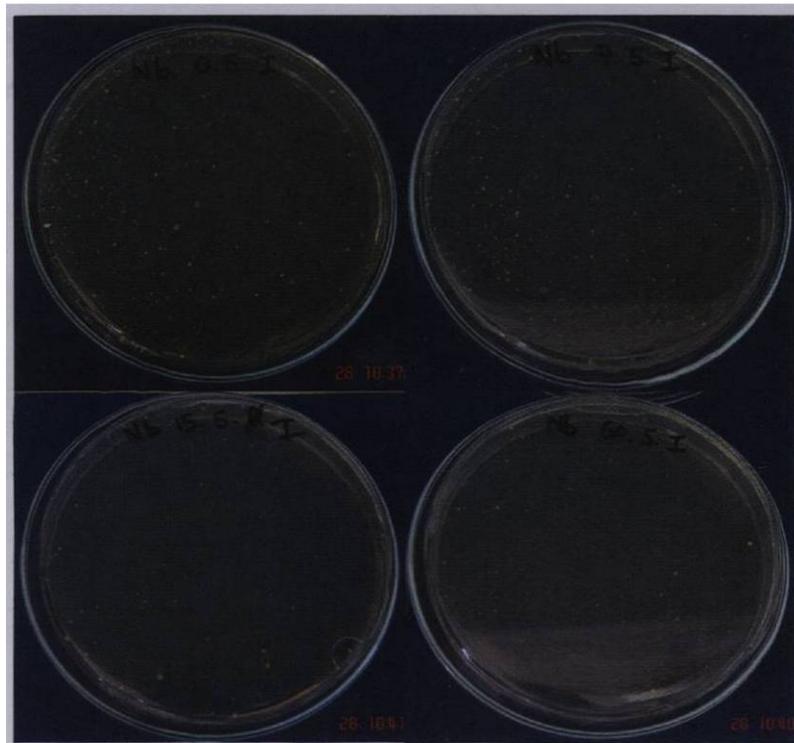
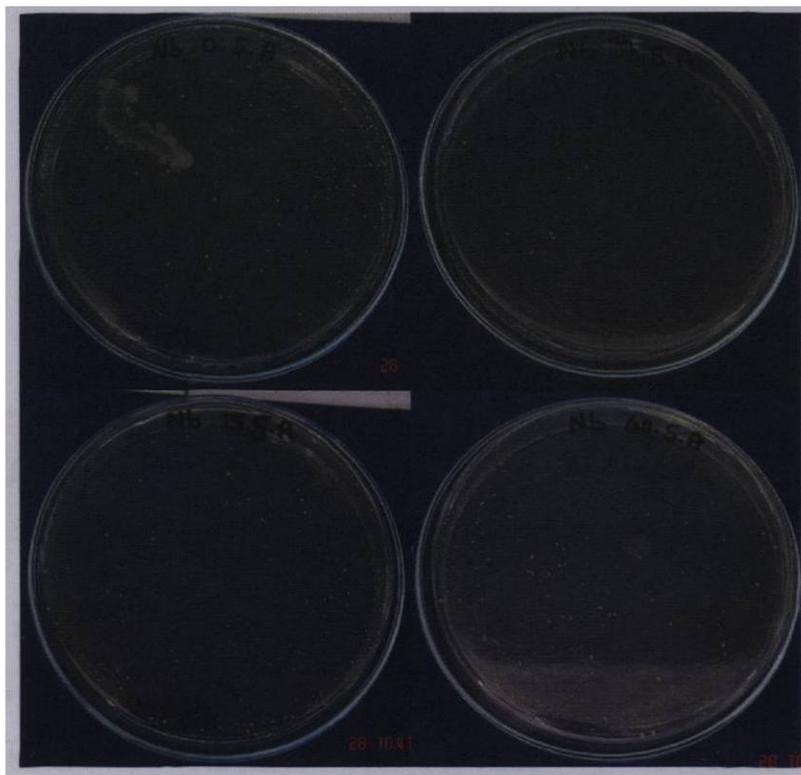


Figura 2.1.7. Evaluación del efecto del suero activado (arriba) e inactivado (abajo) obtenido a diferentes tiempos (días 0, 7, 15 y 60) de ratones inmunizados con BMC de *Nocardia brasiliensis* (Nb) sobre su propio cultivo (método de Miles y Misra).

2.2 Efecto del suero del microorganismo sobre cultivos de los otros microorganismos.

Cantidades de UFC/ml

| Microorganismo | CONTROL | Suero ST (UFC/ml) | Suero SF (UFC/ml) | Suero Nb (UFC/ml) | Suero Lm (UFC/ml) |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ST | 15.36 x10 ¹³ | 4.8 x10 ¹³ | 8.16 x10 ¹³ | 14.4 x10 ¹³ | 11.76 x10 ¹³ |
| SF | 41.2 x10 ¹³ | 23.28 x10 ¹³ | 16.56 x10 ¹³ | 25.44 x10 ¹³ | 37.92 x10 ¹³ |
| Nb | 41.36 x10 ¹³ | 33.92 x10 ¹³ | 37.68 x10 ¹³ | 13.52 x10 ¹³ | 3.92 x10 ¹³ |
| Lm | No hubo inhibición |

Tabla 2.3. Efecto en UFC/ ml del suero obtenido de ratones inmunizados con BMC de *S. typhimurium* (ST), *S. typhimurium* GFP (SF), *L. monocytogenes* (LM) y *N. brasiliensis* (NB) sobre el cultivo de los demás microorganismos (efecto cruzado).

Porcentajes de inhibición

| Microorganismo | Suero ST | Suero SF | Suero Nb | Suero Lm |
|----------------|----------|----------|----------|----------|
| ST | 68.75% | 46.87 | 6.25% | 23.39% |
| SF | 43.5% | 59.81% | 38.3% | 8% |
| Nb | 17.99% | 8.9% | 67.4% | 90.53% |
| Lm | 0% | 0% | 0% | 0% |

Tabla 2.4. Efecto en porcentajes, del suero obtenido de ratones inmunizados con BMC de *S. typhimurium* (ST), *S. typhimurium* GFP (SF), *L. monocytogenes* (Lm) y *N. brasiliensis* (Nb) sobre el cultivo de los demás microorganismos (efecto cruzado).

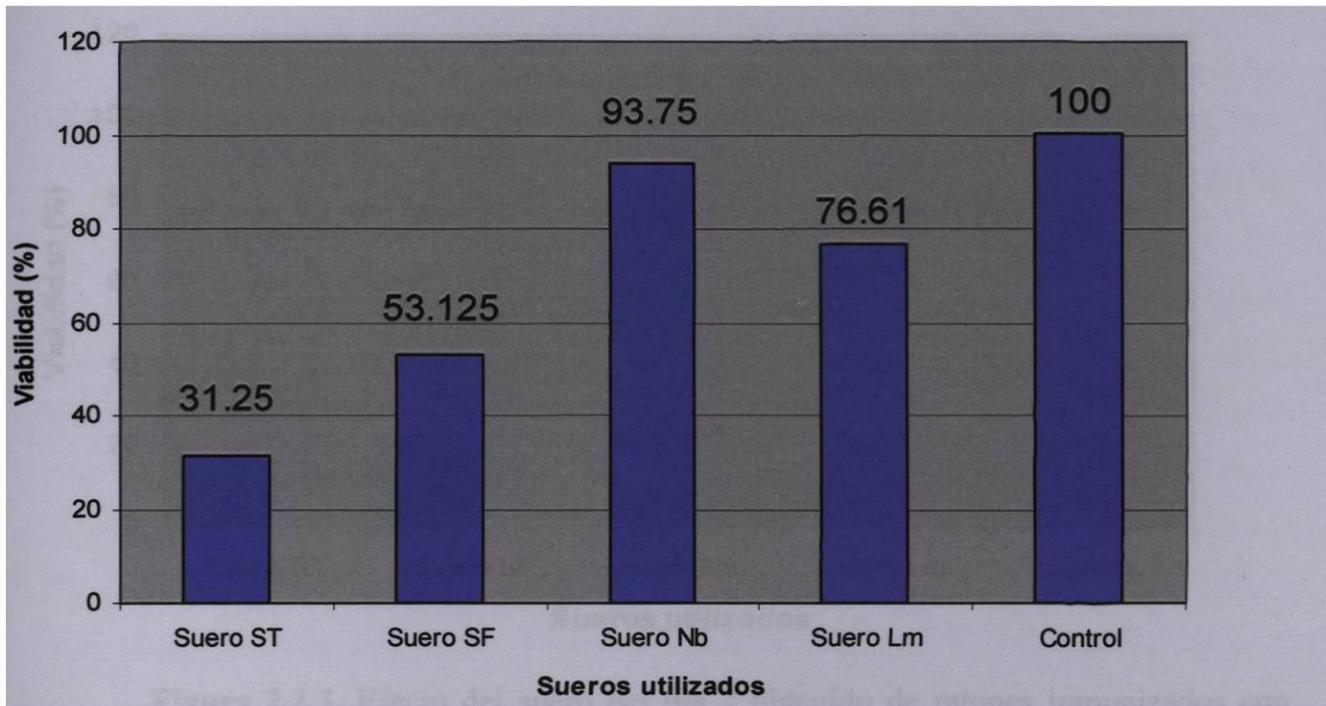


Figura 2.2.1. Efecto neutralizante del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de *Salmonella typhimurium*.

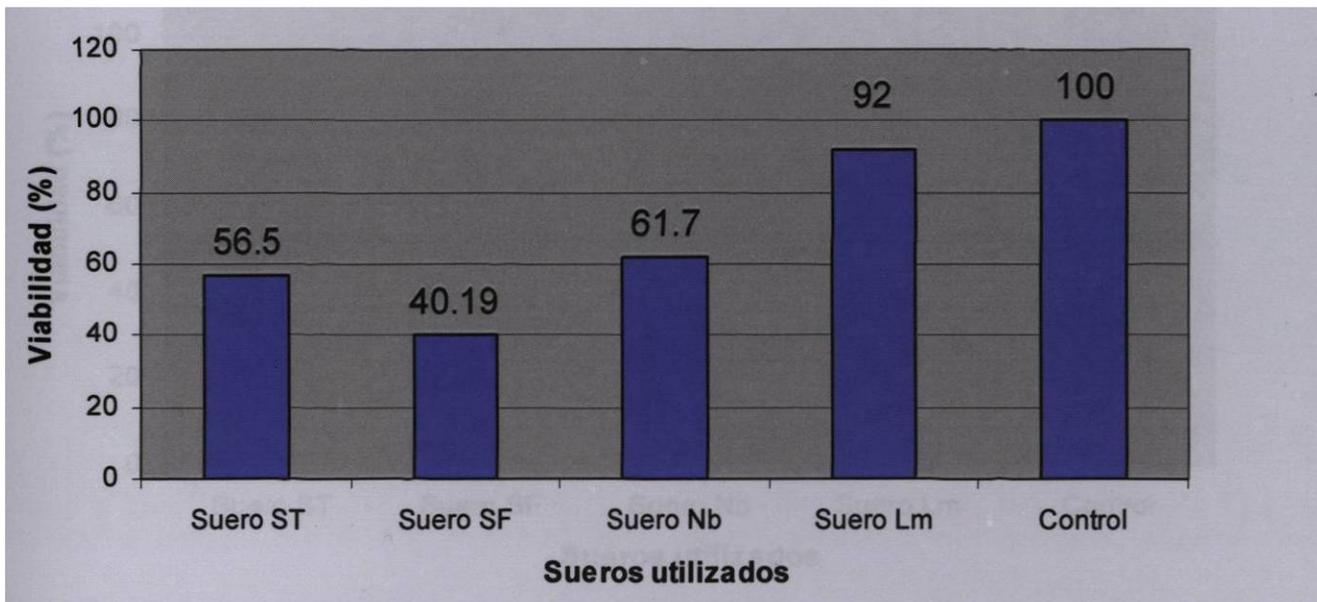


Figura 2.2.2. Efecto neutralizante del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de *Salmonella typhimurium* GFP.



Figura 2.2.3. Efecto del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de *Listeria monocytogenes*.

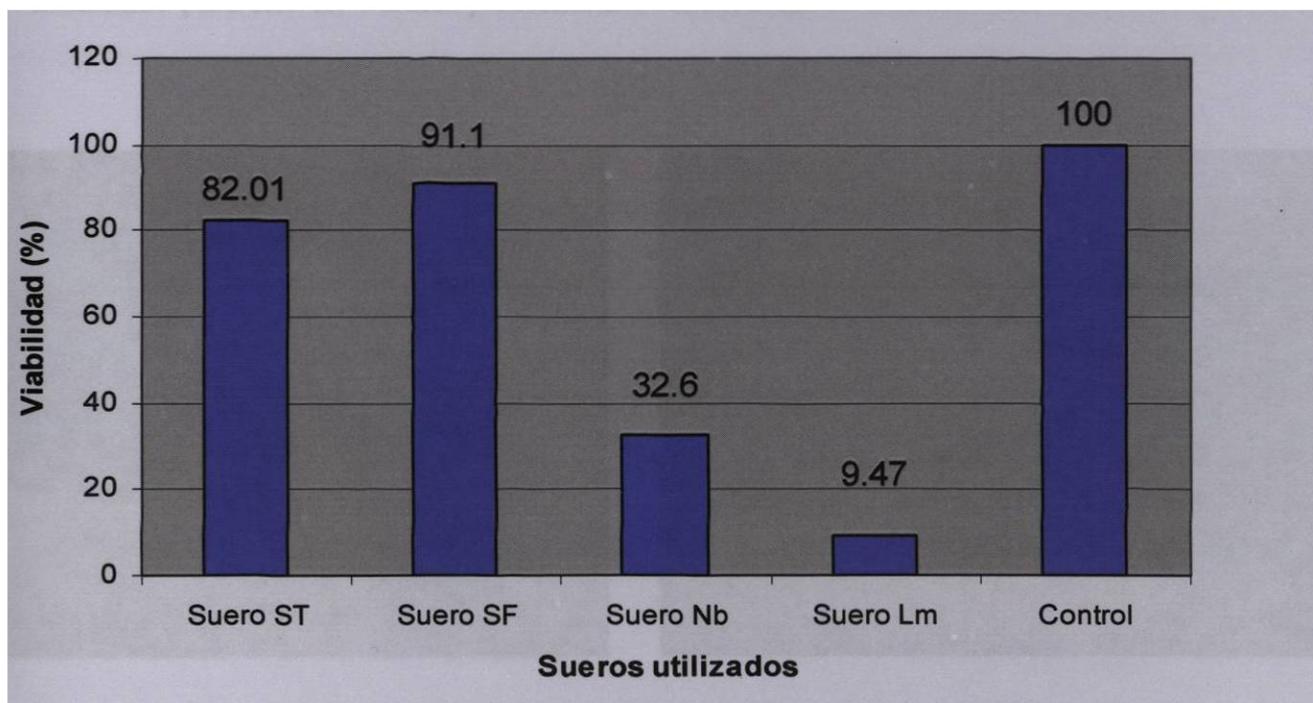


Figura 2.2.4. Efecto del suero del día 7 obtenido de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares sobre el cultivo de *Nocardia brasiliensis*.

3. Evaluación del efecto protector de la inmunización activa y pasiva inducida por antígenos particulados de *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *N. brasiliensis* en el establecimiento y evolución de la infección por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c.

Los ratones BALB/c utilizados en este ensayo fueron separados en grupos de 5 ratones c/u. Cada grupo fue tratado con el suero obtenido en días diferentes (día 0, 7, 15 y 60) por lo cual tuvimos cuatro grupos de ratones por cada microorganismo (N = 20), además del grupo control el cual no recibió tratamiento alguno, teniendo un total de 85 ratones para este experimento. Todos los ratones fueron inmunizados intraperitonealmente con 0.1 ml de suero, e infectados en el cojinete plantar con 0.1 ml de una suspensión bacteriana de *N. brasiliensis* equivalente a 10×10^6 UFC/ml.

El efecto protector de los sueros fue evaluado mediante la medición de la inflamación dorso plantar y plantar transversal del pie infectado cada 5 días, utilizando para ello un Vernier y obteniendo las medidas en milímetros.

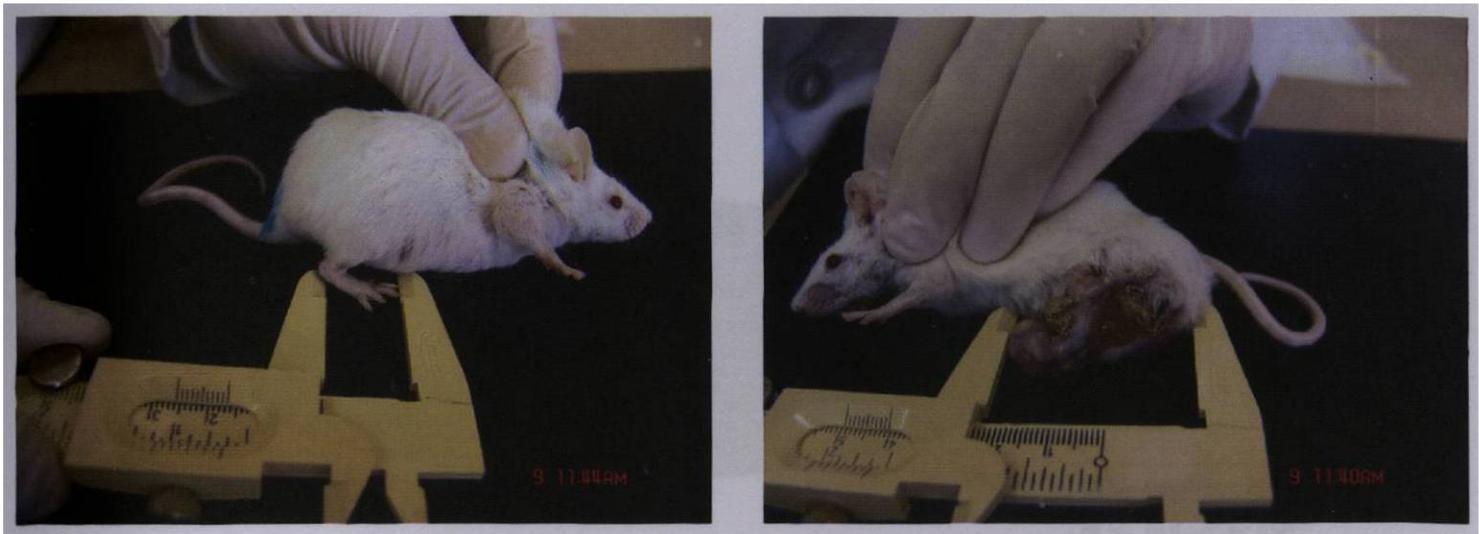


Figura 3.1. Medición de la inflamación.

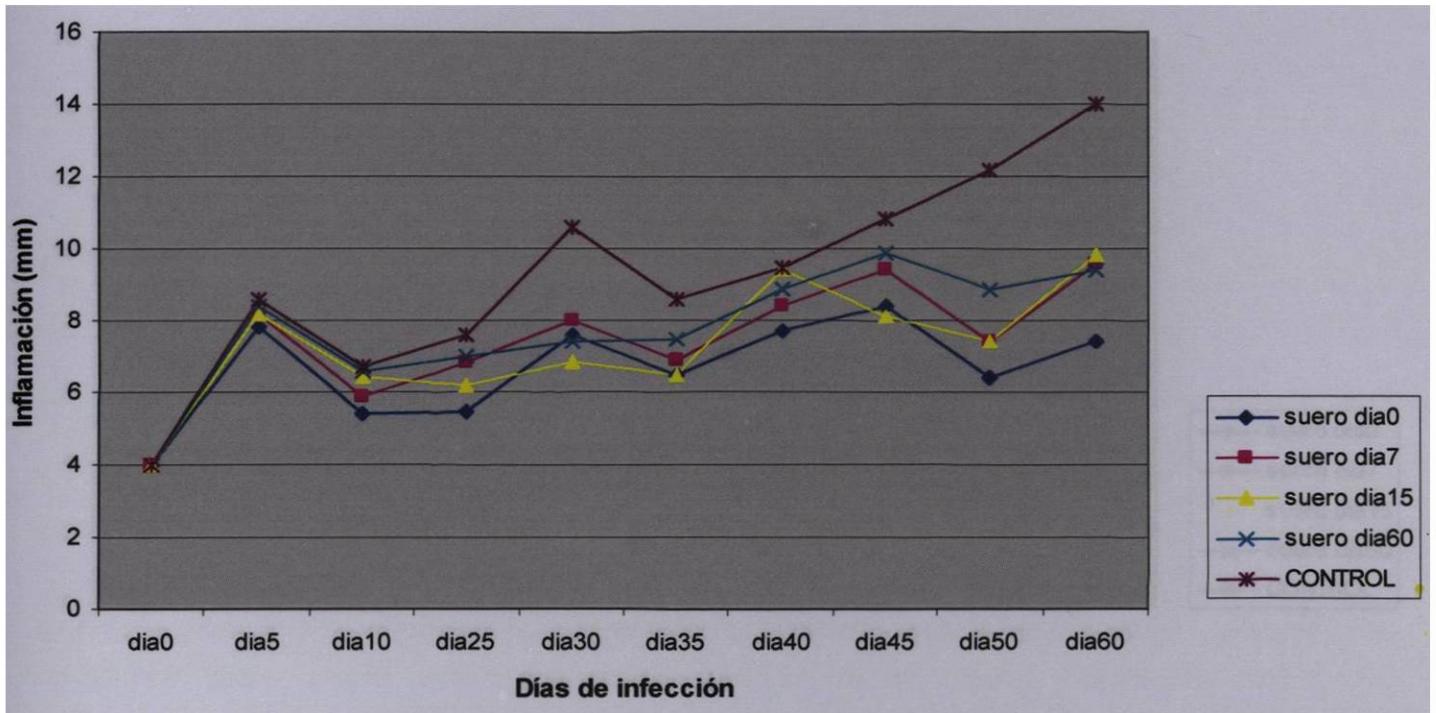


Figura 3.2. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de *Salmonella typhimurium* en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c.

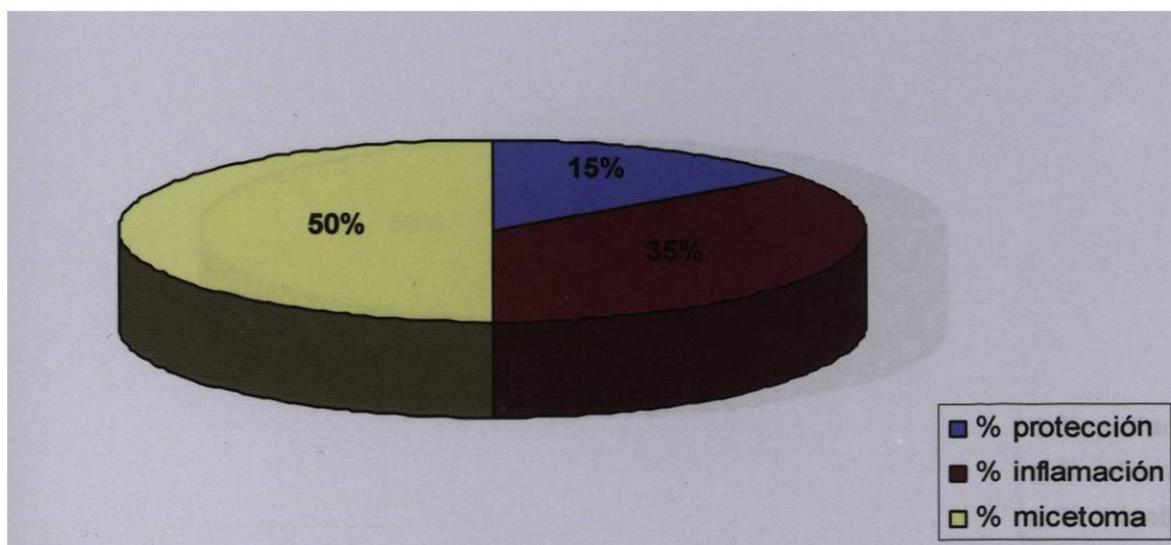


Figura 3.3. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de *Salmonella typhimurium* (grupo de 20 ratones).

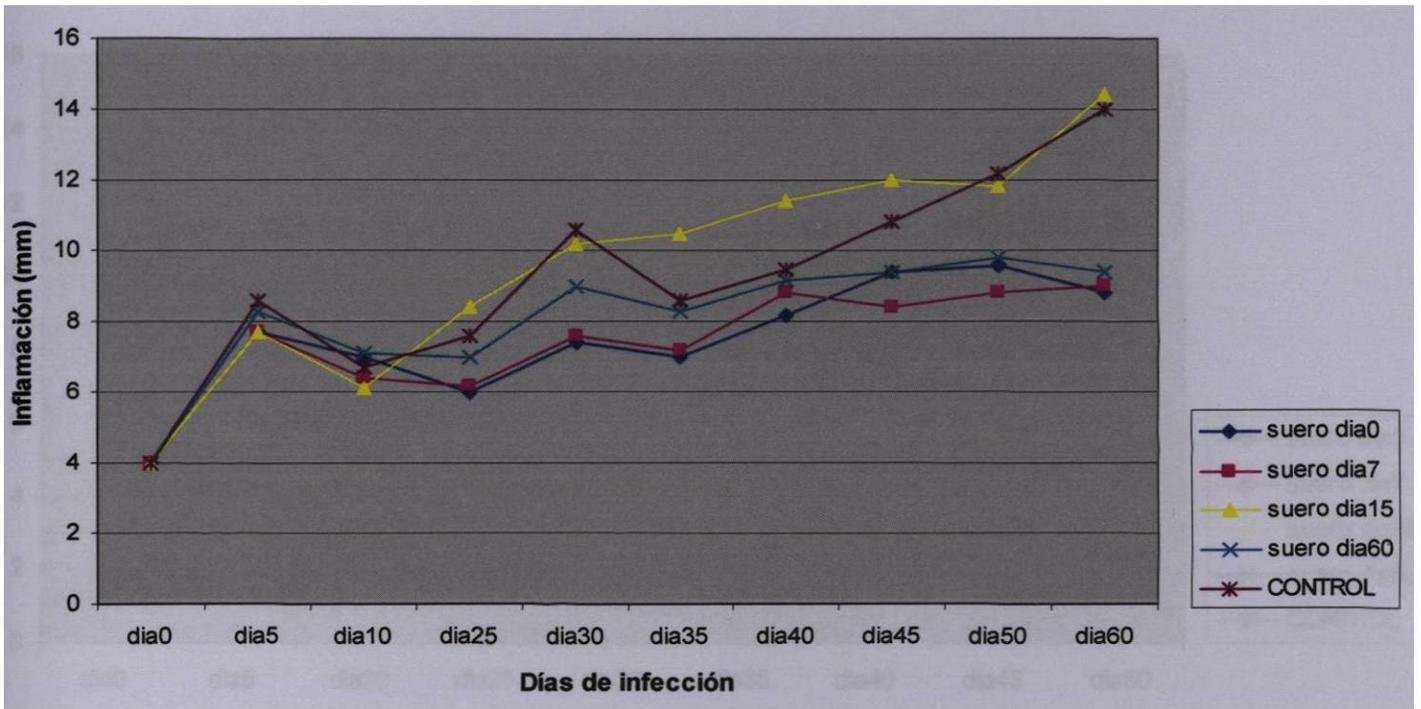


Figura 3.4. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de *Salmonella typhimurium* GFP en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c.

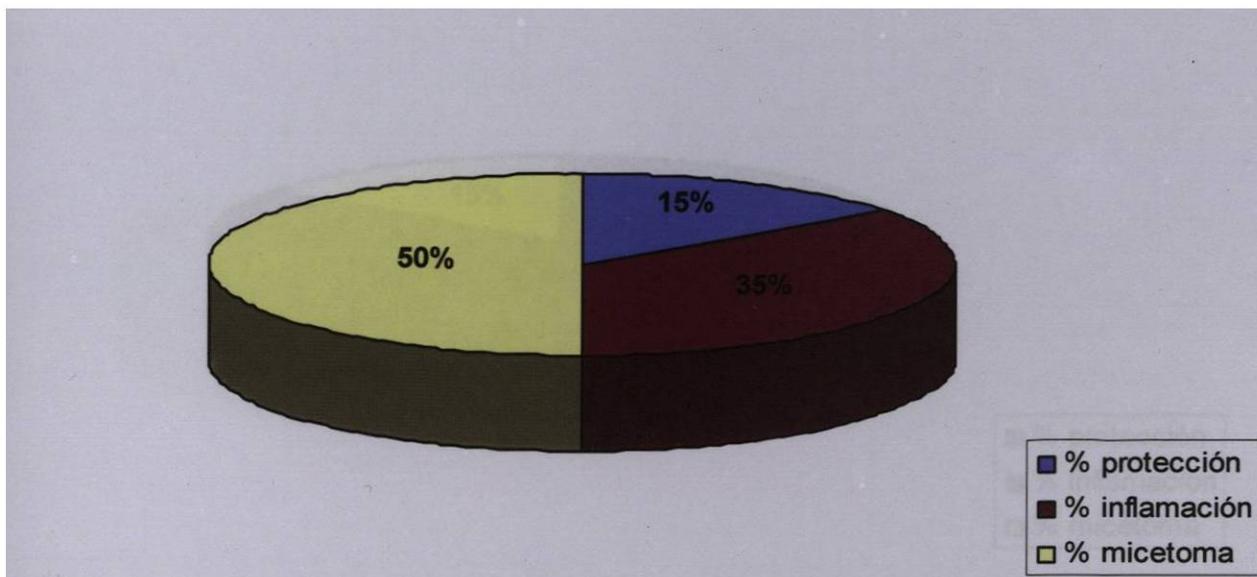


Figura 3.5. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de *Salmonella typhimurium* GFP (grupo de 20 ratones).

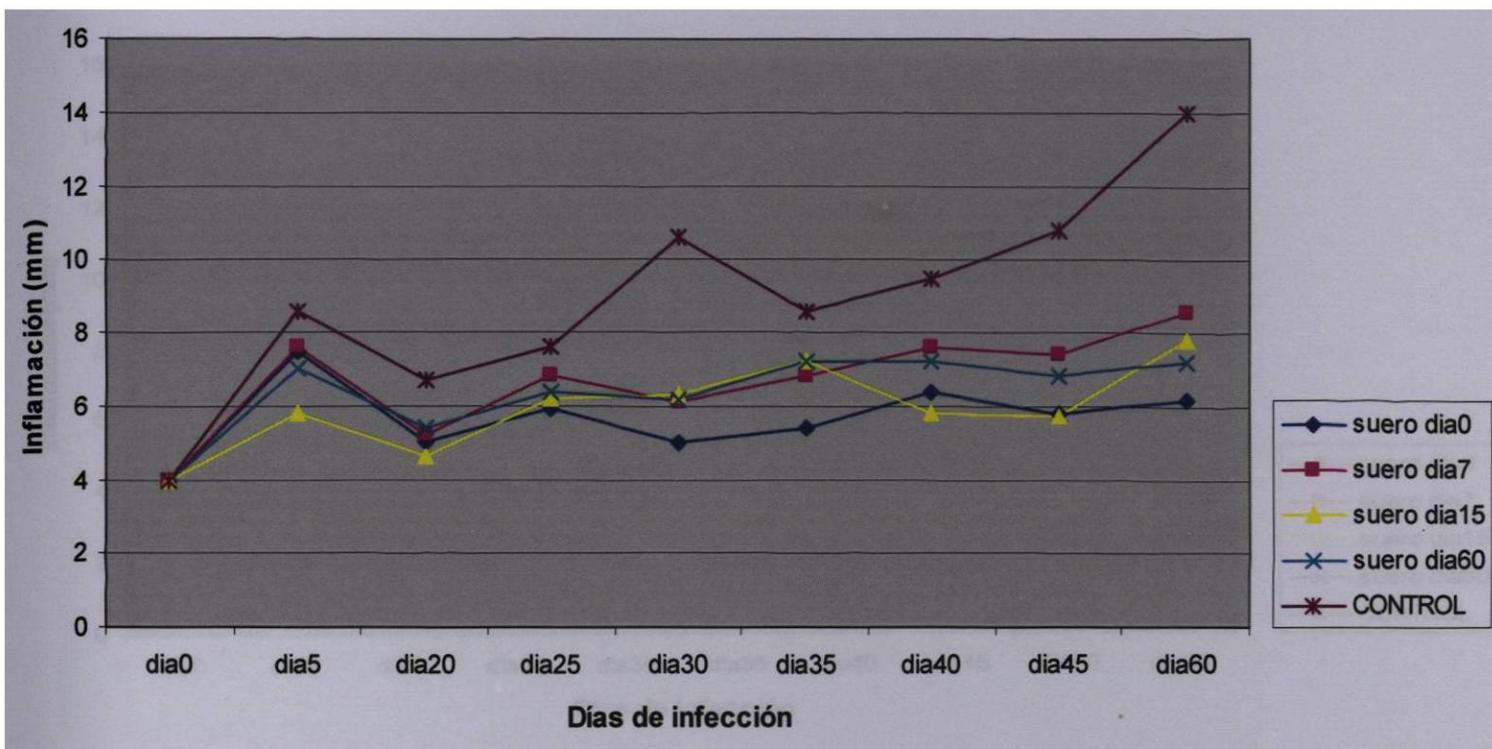


Figura 3.6. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de *Listeria monocytogenes* en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c.

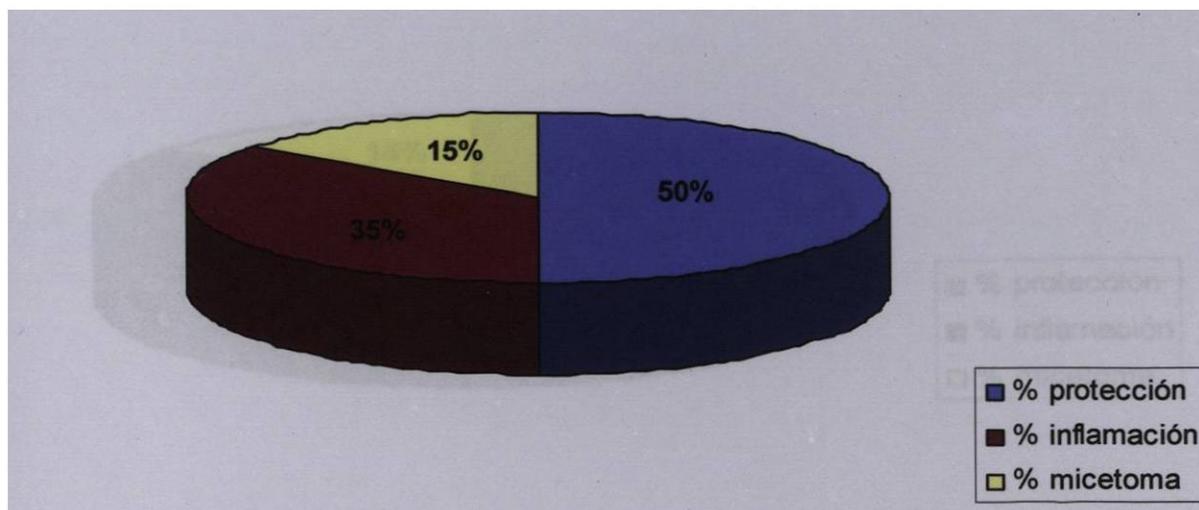


Figura 3.7. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de *Listeria monocytogenes* (grupo de 20 ratones).

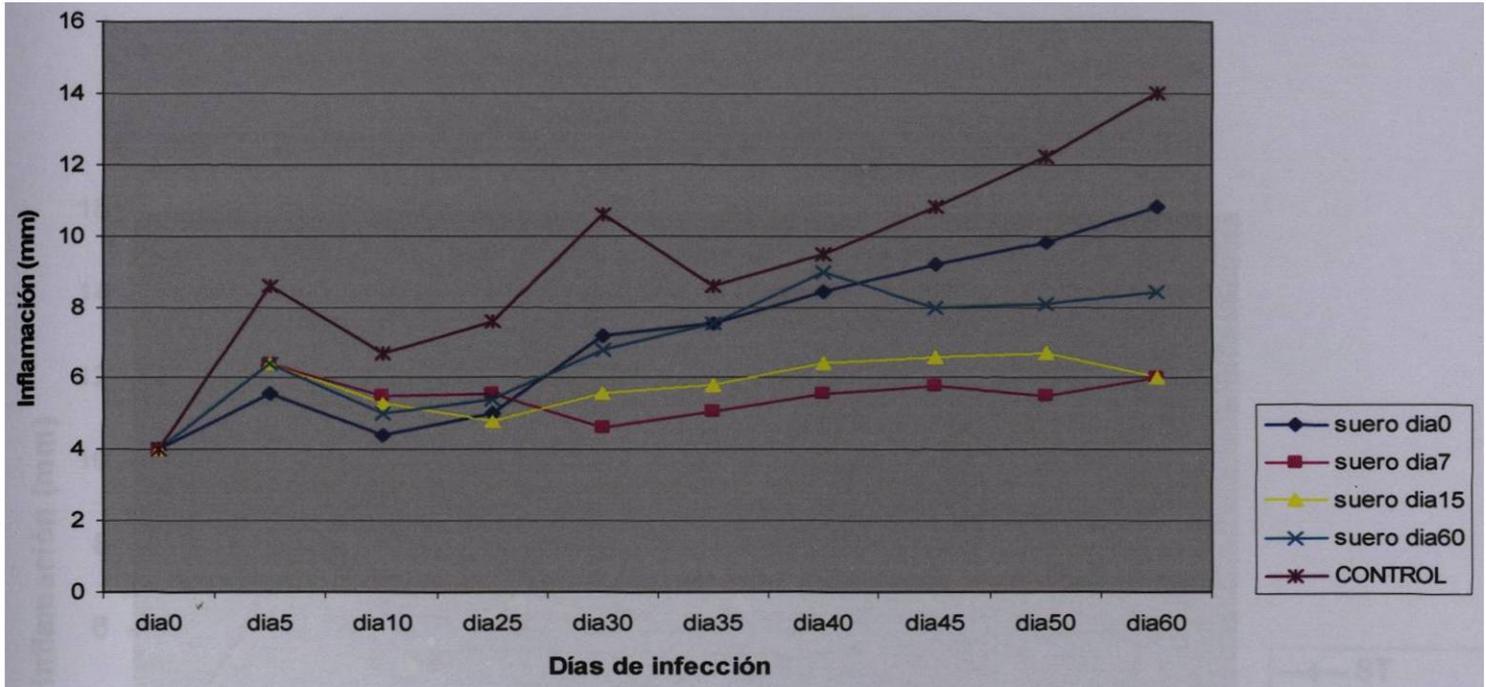


Figura 3.8. Efecto de la inmunización pasiva con Ag particulados de *Nocardia brasiliensis* en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c.

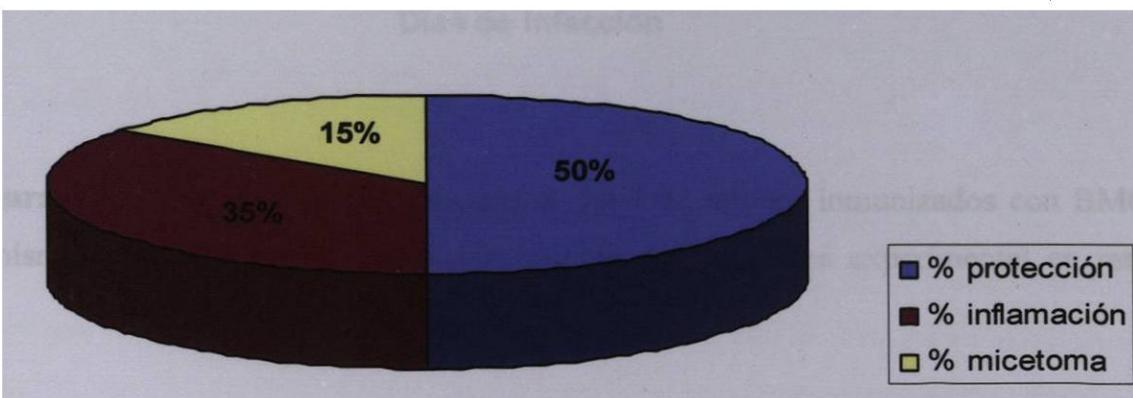


Figura 3.9. Protección contra el establecimiento del micetoma experimental por el suero de ratones inmunizados con BMC de *Nocardia brasiliensis* (grupo de 20 ratones).

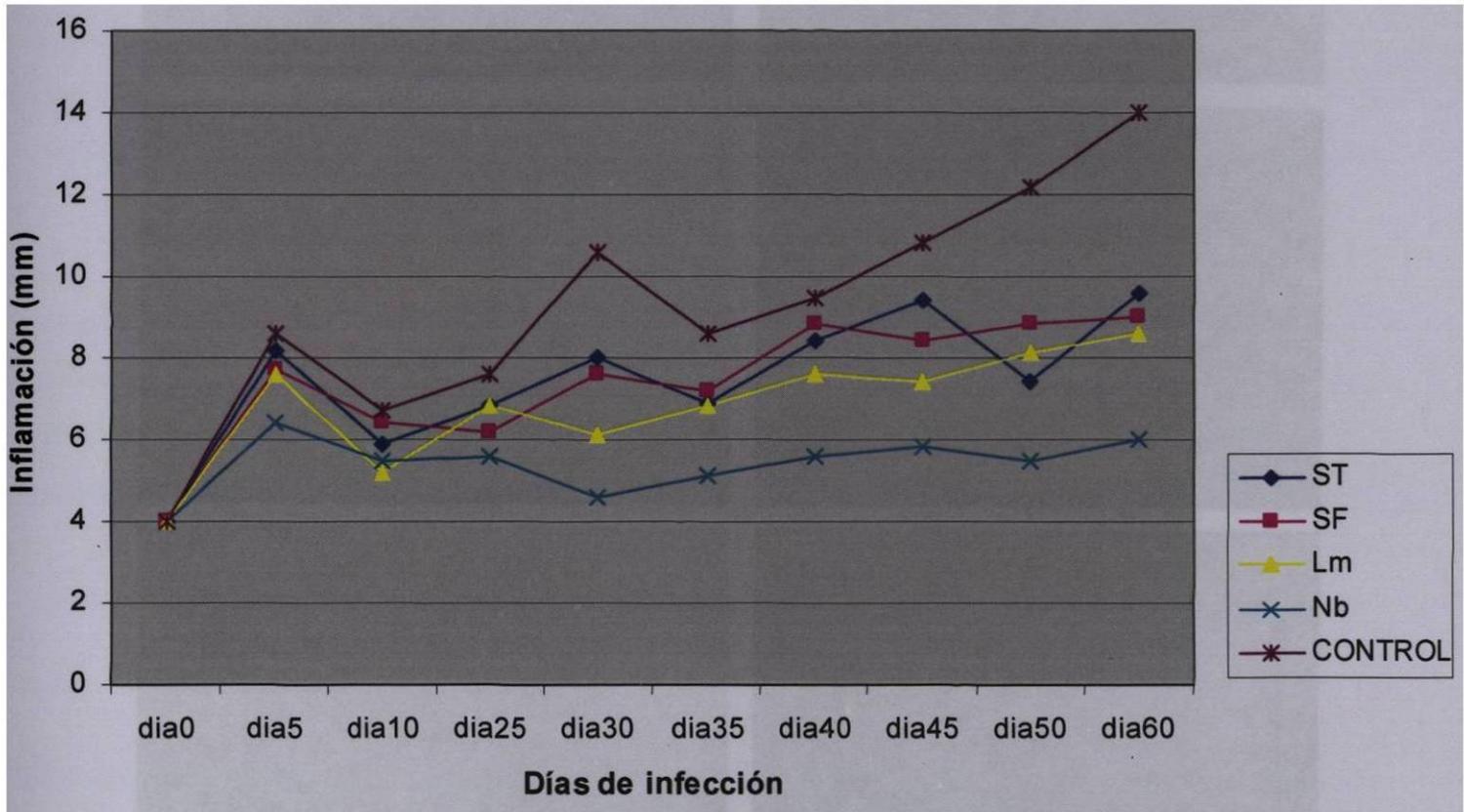


Figura 3.10. Efecto del suero obtenido el día 7 de ratones inmunizados con BMC de microorganismos intracelulares en el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c.



Figura 3.11. *Etapas del desarrollo del micetoma experimental.*

En estas imágenes se pueden observar las distintas fases en el establecimiento del micetoma experimental. Iniciando con inflamación en los primeros días después de la infección, pasando por la descamación y aparición de abscesos que contienen material seropurulento, hasta llegar a la lesión típica del micetoma en la cual se presenta una excesiva inflamación así como extensas áreas de necrosis.

4. Análisis estadístico.

Todos los experimentos de inmunización activa y pasiva en ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles o particulados, los cuales posteriormente fueron infectados con *N. brasiliensis* en el cojinete plantar, se evaluaron clínicamente y se midió la inflamación del cojinete plantar utilizando un Vernier. Las lecturas obtenidas en milímetros fueron utilizadas para graficar los resultados, donde cada punto de la gráfica equivale a la media de 5 ratones por grupo.

Las lecturas obtenidas fueron analizadas estadísticamente, primero mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (o prueba K-S) la cual se utiliza para verificar si una distribución muestral se ajusta o no a una distribución teórica especificada. La hipótesis de distribución normal se contrastó con esta prueba (K-S) y dependiendo del resultado, se seleccionó la prueba estadística a utilizar en el procesamiento posterior de nuestros datos.

Los resultados de la prueba de K-S, para normalidad se presentan en la tabla 4.1, en donde se observa que en cuatro de los ocho períodos en donde se midió la variable respuesta, no se tiene distribución normal (valor de $p < .05$). Por lo tanto, se utilizó estadística no paramétrica o de libre distribución para contrastar las hipótesis de interés. Es necesario aclarar que la medición del día 0 no se incluyó en el análisis debido a que no presentó variabilidad, siendo la constante 4 milímetros.

Tabla 4.1. Estadísticas descriptivas y resultado de la prueba de Kolmogorov – Smirnov para normalidad (n = 85)

| Variable | Media | Mediana | Desviación Estándar | Valor Mínimo | Valor Máximo | K-S Zcal | Valor de p |
|----------|-------|---------|---------------------|--------------|--------------|----------|------------|
| dia5 | 7.371 | 7 | 1.81619 | 4 | 15 | 1.16 | .135 |
| dia25 | 6.282 | 6 | 1.63563 | 4 | 11 | 2.53 | .001 |
| dia30 | 7.200 | 7 | 2.44609 | 4 | 15 | 1.35 | .051 |
| dia35 | 7.147 | 7 | 2.21980 | 3 | 13.5 | 1.44 | .032 |
| dia40 | 8.112 | 8 | 2.33169 | 1 | 15 | 1.20 | .112 |
| dia45 | 8.300 | 8 | 2.71482 | 1 | 15 | 1.53 | .018 |
| dia60 | 8.988 | 8 | 3.44858 | 4 | 19 | 1.52 | .020 |

En cada período, del día 5 al día 60, se efectuó la prueba de Kruskal – Wallis para probar la hipótesis nula de igualdad de parámetros de centralidad en los cinco grupos o bacterias. Los resultados de dichos contrastes se presentan en la Tabla 4.2, en donde se observa que solamente en la medición efectuada en el día 35, no se presentó significancia estadística ($\alpha = .05$). Por lo que se procedió a efectuar comparaciones múltiples por pares de grupos o bacterias.

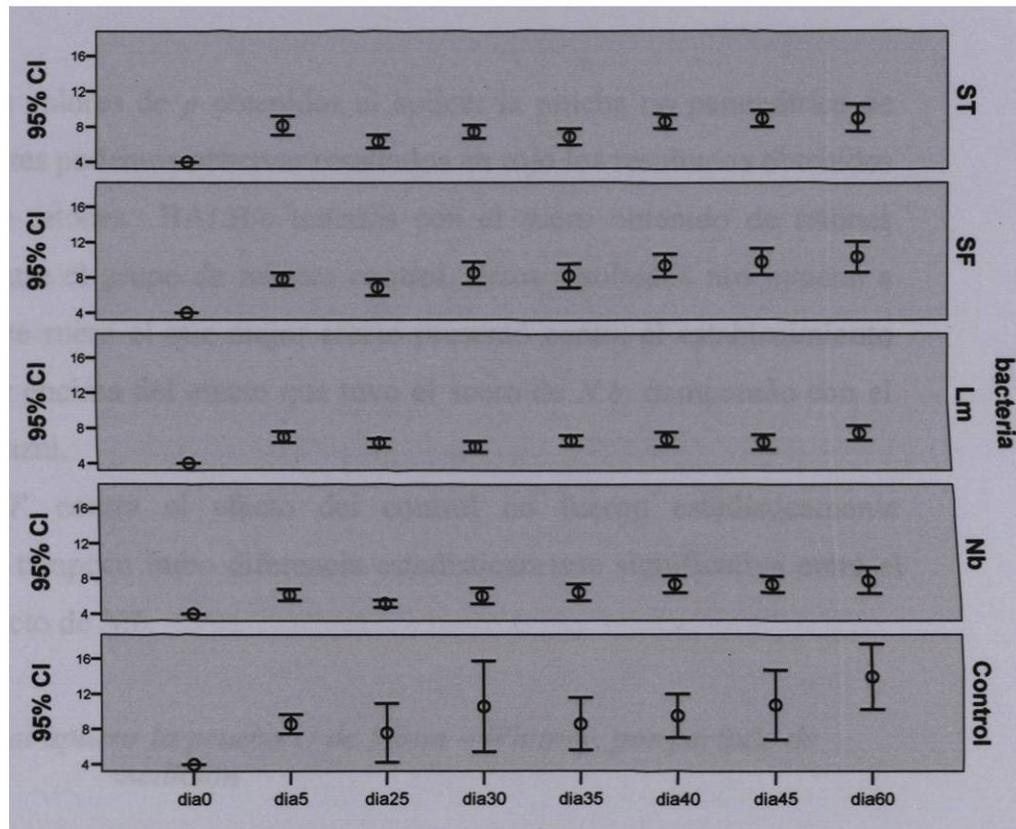
Tabla 4.2 Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis

| Variable | día 5 | día 25 | día 30 | día 35 | día 40 | día 45 | día 60 |
|--------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Chi-Cuadrada | 18.22 | 16.09 | 24.62 | 7.91 | 17.84 | 23.27 | 18.59 |
| G de l | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Valor de p. | .001 | .003 | .001 | 0.095 | .001 | .001 | .001 |

En nuestro caso la prueba no paramétrica elegida fue la prueba U de Mann-Whitney, para comparar un resultado ordinal (que en este caso serían las mediciones de patas cada cierto período de tiempo) entre dos muestras independientes (las cuales en este caso serían el grupo control comparado contra cada uno de los grupos de ratones problemas o inmunizados con sueros obtenidos previamente de ratones inmunizados con BMC de *L.m.*, *N.b.*, *S.T.* o *S.F.*; o bien comparación de dos diferentes grupos tratados).

Se consideró que los resultados eran estadísticamente significativos cuando el valor de era menor a 0.05.

Figura 4.1 En ésta gráfica se muestran los grupos divididos por microorganismo, y se compara la variabilidad de acuerdo al día en el cual se tomaron las mediciones. Observamos que en el grupo control fue donde más diferencia hubo, y en los grupos de *L.m.* y *N.b.* fue donde menos.



En la tabla 4.3 se presentan las medias y las medianas muestrales de los cinco grupos, en cada período o día de medición. En esta tabla se observa que el grupo Control es el que tiene el peor comportamiento seguido por *S.F.*, contrastando con el desempeño mostrado por *L.m.* y *N.b.*

Tabla 4.3 Medias y medianas de la inflamación del cojinete plantar (mm), por bacteria o grupo y día de medición

| | día 0 | día5 | día25 | día30 | día35 | día40 | día45 | día60 |
|-----------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Medias | | | | | | | | |
| Control | 4 | 8.60 | 7.60 | 10.60 | 8.60 | 9.50 | 10.80 | 14.00 |
| Nb | 4 | 6.20 | 5.20 | 6.05 | 6.48 | 7.35 | 7.40 | 7.80 |
| Lm | 4 | 6.98 | 6.33 | 5.90 | 6.65 | 6.75 | 6.43 | 7.45 |
| SF | 4 | 7.85 | 6.90 | 8.55 | 8.25 | 9.40 | 9.80 | 10.40 |
| ST | 4 | 8.15 | 6.38 | 7.45 | 6.85 | 8.60 | 8.95 | 9.05 |
| Total | 4 | 7.37 | 6.28 | 7.20 | 7.15 | 8.11 | 8.30 | 8.99 |
| Medianas | | | | | | | | |
| Control | 4 | 9.0 | 6.0 | 9.0 | 8.0 | 9.0 | 10.0 | 15.0 |
| Nb | 4 | 6.3 | 5.0 | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 7.0 | 6.5 |
| Lm | 4 | 7.0 | 6.0 | 5.3 | 6.5 | 7.0 | 6.5 | 7.0 |
| SF | 4 | 8.0 | 6.0 | 8.5 | 8.8 | 10.0 | 9.5 | 10.0 |
| ST | 4 | 8.0 | 6.0 | 7.0 | 6.8 | 8.3 | 9.0 | 8.5 |
| Total | 4 | 7.0 | 6.0 | 7.0 | 7.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |

La tabla 4.4 nos muestra los valores de p obtenidos al aplicar la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Como datos relevantes podemos observar resaltados en rojo los resultados obtenidos al comparar el efecto un grupo de ratones BALB/c tratados con el suero obtenido de ratones inmunizados con BMC de *L.m.* contra el grupo de ratones control. Estos resultados nos ayudan a confirmar que efectivamente fue éste suero el que mejor efecto presentó contra el establecimiento del micetoma experimental, aún por encima del efecto que tuvo el suero de *N.b.* comparado con el control cuyos valores se resaltan en azul.

Los valores de *S.F.* y *S.T.* contra el efecto del control no fueron estadísticamente significativos. Cabe mencionar que tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa entre el efecto de *L.m.* comparado con el efecto de *N.b.*

Tabla 4.4 Valores de p obtenidos al aplicar la prueba *U* de Mann – Whitney, por período de medición

| Grupos comparados | día5 | día25 | día30 | día40 | día45 | día60 |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>L.m.</i> vs Control | .010 | .530 | .003 | .004 | .002 | .000 |
| <i>N.b.</i> vs Control | .003 | .035 | .010 | .042 | .015 | .002 |
| <i>S.F.</i> vs Control | .148 | .717 | .408 | .869 | .530 | .060 |
| <i>S.T.</i> vs Control | .408 | .530 | .112 | .408 | .243 | .006 |
| <i>L.m.</i> vs <i>S.T.</i> | .860 | .968 | .002 | .001 | .000 | .114 |
| <i>L.m.</i> vs <i>S.F.</i> | .076 | .512 | .000 | .003 | .001 | .007 |
| <i>N.b.</i> vs <i>L.m.</i> | .096 | .001 | .820 | .799 | .253 | .841 |
| <i>N.b.</i> vs <i>S.T.</i> | .003 | .006 | .007 | .28 | .006 | .102 |
| <i>N.b.</i> vs <i>S.F.</i> | .001 | .001 | .001 | .020 | .020 | .015 |
| <i>S.F.</i> vs <i>S.T.</i> | .799 | .495 | .201 | .301 | .478 | .242 |

DISCUSIÓN

Las infecciones por microorganismos intracelulares han representado desde tiempos inmemoriales un problema muy importante de salud pública en muchos países, especialmente en los países en vías de desarrollo como el nuestro, en donde aún en la actualidad y pese a los grandes avances científicos y tecnológicos se siguen padeciendo múltiples enfermedades producidas por ellos.

La respuesta inmune en las infecciones por microorganismos intracelulares es una serie de eventos biológicos que depende de varios factores presentes tanto en el agente infeccioso como en el hospedero. Por mucho tiempo se ha aceptado que la respuesta inmune celular juega el papel más importante en la protección contra las infecciones por microorganismos intracelulares, mientras que la respuesta inmune humoral dada por los anticuerpos al parecer no juega un papel importante en la protección contra éstos microorganismos.

Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo demuestran claramente que la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización pasiva utilizando antígenos particulados de microorganismos intracelulares tales como *Nocardia brasiliensis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella typhimurium* GFP; fueron capaces de prevenir en ratones BALB/c en diferentes porcentajes el desarrollo del micetoma experimental causado por *Nocardia brasiliensis*.

Nuestros resultados difieren de los reportados en múltiples ocasiones en los cuales se sostiene que es la inmunidad celular la encargada de la protección contra microorganismos intracelulares.

En el caso de *Listeria monocytogenes*, se han reportado estudios desde 1957 en los cuales se intentó sin éxito transferir pasivamente la resistencia a la infección contra éste microorganismo en un modelo murino (43). Posteriormente en la década de 1960 éstos resultados fueron reproducidos por Mackaness en diversos experimentos en los cuales se encontró que el suero y las células de animales inmunizados con *L. monocytogenes* carecía de anticuerpos protectores contra éste patógeno (35,36). De igual manera Kearns y Hinrichs en 1977 obtuvieron los mismos resultados que Mackaness (28), y así fue durante la década siguiente hasta que en 1987 se encontró que la transferencia de suero inmune de ratones infectados con *L. monocytogenes* aumentó significativamente la resistencia a esta bacteria, ayudando a la eliminación de la misma en el bazo y disminuyendo la mortalidad en un modelo murino. Sin embargo en estudios posteriores se encontró que éste factor sérico no era una inmunoglobulina (1). La mayoría de los ensayos realizados posteriormente se dedicaron a estudiar los mecanismos de la inmunidad celular por los cuales se confería protección contra éste patógeno intracelular, atribuyendo ésta protección en gran parte a la acción de los macrófagos (11, 12, 21, 54). Melendro y col. en 1978, observaron anteriormente la protección cruzada contra *Listeria monocytogenes* en un estudio en el cual se encontró que el crecimiento de éste patógeno en el hígado y bazo de ratones infectados con *Nocardia*, era restringido de una manera más efectiva que en ratones no infectados. El desarrollo de hipersensibilidad retardada al antígeno de *Nocardia* fue correlacionado al incremento de la resistencia a *Listeria*, sugiriendo que ambas propiedades son la consecuencia de un mismo evento inmunológico (38).

En el presente estudio pudimos comprobar que la inmunización pasiva con BMC de *Listeria monocytogenes* confiere protección contra el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c, incluso en el mismo porcentaje que la protección observada en ratones inmunizados con BMC de *Nocardia brasiliensis*.

Los resultados obtenidos en el modelo murino fueron comparados con los resultados obtenidos *in vitro* por medio del método de Miles y Misra, donde se encontró también que todos los sueros utilizados en el ensayo (días 0, 7, 15 y 60), indujeron protección contra el establecimiento del micetoma hasta en un 50% observando un mayor porcentaje de protección en el suero obtenido de los días 0 y 15.

Sin embargo, al probar el suero obtenido del día 7 post-inmunización con BMC de *L. monocytogenes* contra su propio cultivo en placa, encontramos que no se inhibió su crecimiento, así como tampoco hubo inhibición al utilizar los sueros de los ratones inmunizados con los demás microorganismos utilizados (*S. typhimurium*, *S. typhimurium* GFP y *N. brasiliensis*). Por lo cual suponemos que de *Listeria monocytogenes* tiene capacidad inmunogénica. En años recientes se ha reportado que las citocinas inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón gamma (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1) e IL-6 son producidas en ratones después de la infección con *Listeria monocytogenes*. Por medio de diversos anticuerpos neutralizantes específicos de citocinas, se ha demostrado que varias de estas citocinas endógenas juegan un papel importante en la protección del hospedero en la etapa temprana de la infección (24, 65); lo cual podría explicarnos la protección observada *in vivo* en el modelo murino para el establecimiento del micetoma experimental.

En el caso de *Nocardia brasiliensis*, los resultados obtenidos a partir de diversos experimentos a través del tiempo han sugerido la poca participación de las células B en la infección por este microorganismo. Sin embargo, después de varios estudios, Salinas y col. encontraron que solamente en el suero y las células obtenidas en los primeros días de la inmunización existe un efecto protector lo cual evita el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c. Éstos resultados nos indican que la respuesta inmune innata sí juega un papel importante en la protección contra *N. brasiliensis* (48, 49, 50, 51, 52,53).

Los resultados presentados en éste trabajo coinciden con los obtenidos anteriormente por Salinas y col. (53). Además, tal y como se mencionó anteriormente, el porcentaje de protección obtenido en ratones inmunizados con BMC de *N. brasiliensis* contra el establecimiento del micetoma experimental fue igual al que presentó el grupo de ratones inmunizados con BMC de *L. monocytogenes*.

Sin embargo, para el caso de inmunización con antígenos particulados de *N. brasiliensis* el mayor porcentaje de protección fue observado en el grupo de ratones inmunizados con el suero obtenido en el día 7 post-inmunización, tal y como lo describieron anteriormente en sus experimentos Salinas y col. (53), aunque también los sueros del día 0, 15 y 60 confirieron cierta protección contra el desarrollo del micetoma. Además de éstos ensayos, se realizaron también conteos en placa para evaluar el efecto inhibitorio del suero anti- *N. brasiliensis* sobre su propio cultivo corroborando los resultados obtenidos *in vivo*, y también se probó el efecto de los sueros obtenidos del día 7 post-inmunización con BMC de *S. typhimurium*, *S. typhimurium* GFP y *L. monocytogenes*, en donde pudimos observar que los sueros de ratones inmunizados con *Salmonellas* no presentaron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de *N. brasiliensis*, no así para el caso del suero de *L. monocytogenes* en donde encontramos hasta un 90% de inhibición del crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en placa, superando incluso el porcentaje de inhibición causado por el suero de *N. brasiliensis* sobre su propio cultivo (aproximadamente 70%).

En el caso de *Salmonella typhimurium* ya se había descrito en diversos estudios la importancia de la inmunización pasiva con diversas vacunas como bacterias muertas por diferentes técnicas (bacterias muertas por acetona o formalina), así como diversas fracciones subcelulares en la protección contra la infección por éste microorganismo (14, 25, 27, 58). Sin embargo en los últimos años la mayor parte de los experimentos realizados se han enfocado en el estudio del papel que juegan los macrófagos en la infección por éste patógeno intracelular (9, 32, 41).

En éste estudio realizamos ensayos *in vivo* e *in vitro* para conocer el efecto de los antisueros de *S. typhimurium* y *S. typhimurium* GFP en la infección por *N. brasiliensis*, encontrando que aunque hubo cierto porcentaje de protección (aproximadamente 15%) éste no fue realmente significativo en comparación del porcentaje de inhibición del establecimiento de micetoma (50%). Éste porcentaje de protección observado puede ser debido a la IgM polirreactiva presente en los primeros días de una infección. Como su nombre lo indica, ésta inmunoglobulina es capaz de reaccionar con una gran cantidad de antígenos y es inespecífica.

También pudimos corroborar que la inmunización pasiva con BMC de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella typhimurium* GFP, es efectiva en la inhibición del crecimiento del mismo *in vitro* al realizar cuentas bacterianas en placa, obteniendo un 69% de inhibición para ST y un 43.5% de inhibición para SF. Al probar la capacidad de inhibición del suero obtenido el día 7 post-inmunización con BMC de *L. monocytogenes* y *N. brasiliensis* sobre cultivos bacterianos de *S. typhimurium* y *S. typhimurium* GFP, observamos que el efecto inhibitorio no fue realmente significativo para ninguna de las *Salmonellas*.

Para el caso del suero del día 0 obtenido de ratones inmunizados con BMC de los cuatro microorganismos utilizados en el presente estudio, pudimos observar que hubo tanto cierta protección en el establecimiento del micetoma experimental como inhibición del crecimiento en placa. Los animales mostraron un título alto de IgM inespecífica de antígeno medida por nefelometría, pero su IgM específica de antígeno fue baja. Podría ser que la razón por la cual la IgM inespecífica de antígeno se encontró alta es debido a la inmunización de los ratones con agentes ambientales.

Los mecanismos por los cuales los anticuerpos IgM específicos de antígenos previenen el crecimiento en placa de los microorganismos utilizados en el presente estudio, pueden estar directamente relacionados con su capacidad para atrapar a las bacterias y activar el sistema de complemento. Aunque en nuestros experimentos encontramos que éste efecto no es necesariamente dependiente del complemento, ya que no se observó una diferencia significativa en la inhibición del crecimiento *in vivo* de los microorganismos al inactivar los antisueros mediante calor a 56°C por 30 min.

Es necesario realizar más estudios para esclarecer los mecanismos exactos que intervienen en la protección mediada por IgM inducida por antígenos. Ésta información será de gran utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas que protejan contra otros patógenos intracelulares.

CONCLUSIONES

1. Se encontró que en el ensayo de evaluación de la actividad neutralizante de sueros obtenidos de ratones inmunizados con BMC de *S. typhimurium*, *S. typhimurium* GFP y *N. brasiliensis*, el mayor porcentaje de inhibición *in vitro* está dado por su suero homólogo. Observándose además un porcentaje bajo de inhibición del crecimiento *in vitro* conferido por los otros microorganismos (*S. typhimurium*, *S. typhimurium* GFP, *N. brasiliensis* y/o *L. monocytogenes*).
2. En el mismo ensayo pero utilizando *L. monocytogenes*, no se observó inhibición *in vitro* en el crecimiento de éste microorganismo al tratarlo con su suero homólogo; además ningún suero de los otros microorganismos utilizados pudo inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.
3. La inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhimurium* GFP, *Nocardia brasiliensis* y *Listeria monocytogenes* confieren protección parcial contra establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c.
4. El suero obtenido de ratones inmunizados con BMC de *L. monocytogenes*, confiere el mismo porcentaje de protección contra el establecimiento del micetoma experimental que el suero de *N. brasiliensis*.
5. La protección observada en nuestros experimentos podría ser debida a algún factor que se produce en los primeros días después de la infección; por ejemplo: IgM, citocinas, etc.
6. De acuerdo al análisis estadístico los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el presente estudio son estadísticamente significativos, y pudimos comprobar que nuestra hipótesis inicial es verdadera demostrando que en efecto los anticuerpos IgM inducidos por antígenos particulados de *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium previenen (en diferentes porcentajes) de manera parcial e inespecífica el establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c.

PERSPECTIVAS

- Debido a la información obtenida a partir de éste trabajo, será necesario abrir una nueva línea de investigación enfocada al estudio de los elementos responsables de la protección cruzada presentada por *L. monocytogenes* en el establecimiento del micetoma experimental por *N. brasiliensis*. Éstas líneas podrían estar enfocadas al estudio de IgM, citocinas o la estructura de *L. monocytogenes*, cuyos componentes estén jugando un papel importante en el desarrollo o la inducción de una fuerte respuesta inmune la cual confiere protección no observada con los otros microorganismos incluso con *Nocardia*.
- Además será necesario y útil el establecimiento de líneas celulares productoras de IgM anti-microorganismos intracelulares y determinar su eficiencia en el tratamiento de enfermedades infecciosas.
- Los resultados obtenidos a partir de este estudio aportan conocimiento importante al campo de la seroterapia y al desarrollo de nuevas vacunas que logren prevenir el establecimiento de las infecciones por *N. brasiliensis* así como por otros microorganismos intracelulares.

LITERATURA CITADA

1. Akira Yamada, Kunisuke Himeno, Seiji Nakamura, Ikuo Kawamura and Kikuo Nomoto. 1987. Transfer of resistance to primary infection of *Listeria monocytogenes* and early induction of delayed hypersensitivity by sera from *L. monocytogenes*- infected mice. *Inf. and Imm.* **55**: 3078-3084.
2. Alshamaony L., Goodfellow M., Minnikin D. 1976. Free mycolic acids as a criteria in the classification of *Nocardia* and *Rhodocroux* complex. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 188- 199.
3. Beaman D. L., Saubolle M.A., Wallace R.J. 1995. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia* and other aerobic actinomycetes of medical importance. *Manual of Clinical Microbiology*. Pp 329- 399. P.R. Murray 6th ed ASM Press. Washington D.C.
4. Blander S.J., Horwitz M.G. 1989. Vaccination with the major secretory protein of *Legionella pneumophila* induce cell- mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires disease. *J. Exp. Med.*; **169**: 691- 705.
5. Blander S.J., Horwitz M.A. 1991. Vaccination with the major secretory protein of *Legionella* induces humoral and cell- mediated immune responses and protective immunity across different serogroups of *Legionella pneumophila* and different species of *Legionella*. *J. Immunol.*; **147**: 285- 291.
6. Bloom B.R., Murray C.J. 1992. Tuberculosis: Commentary on reemergent killer. *Science.* **257**: 1055- 1064.
7. Badovinac VP., Harty J.T. 2000. Adaptative immunity and enhanced CD8⁺T cell response to *Listeria monocytogenes* in the absence of perforin and IFN- γ ¹. *Journal of Immunology*.
8. Brock. 1998. *Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Editorial Prentice Hall. Pp. 155- 157, 973, 974.
9. Cano David A., Martínez-Moya Marina, Pucciarelli Graciela M. Groisman Eduardo A., Csadesu Joseph and García del Portillo Francisco. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Inf. and Imm.* **69**: 6463-6474.

10. Clare S., Goldin R., Hale C., Aspinall R., Simmons C., Mastroeni P., Dougan G. 2003. Intracellular adhesion molecule 1 plays a key role in acquired immunity to Salmonellosis. *Infect. and Immun.*; **71**: 5881- 5891.
11. Conlan J.W., North R.J. 1991. Neutrophils mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.*; **174**: 741- 744.
12. Conlan J.W., North R.J. 1992. Roles of *Listeria monocytogenes* virulence factors in survival: virulence factors distinct from listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil- mediated host defense mechanism. *Infect. and Immun.*; **60**: 951- 957.
13. Datta Sandip K., Okamoto Sharon, Hayashi Tomoko, Shin S. Samuel, Mihajlov Ivan, Fermina Agnes, Guiney Donald G., Fierer Joshua and Raz Eyal. 2006. Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immunity*. **25**: 143-152.
14. Diena B.B., Baron L.S., Johnson E. M., Wallace R. and Ashton F. E. 1974. Role of typhoid antigens in protection and pathogenicity for mice. *Inf. and Imm.* **9**: 1102-1104.
15. Doyle M. Ellin. 2001. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. FRI Briefings.
16. Edelson Brian T. and Unanue Emil R. 2001. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity*. **14**: 503-512.
17. Engvall E, Perlmann P. 1972. Enzyme linked immunoabsorbent assay, ELISA. **109**:129-135
18. Filice G.A., Beaman B.L., Krick J.A. 1980. Effect of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*. Failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J. Infect. Dis.*; **142**: 432- 438.
19. González Ochoa. 1960. Isolation of *Nocardia brasiliensis* and *asteroides* from soils. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Sep* **20**: 147- 151.
20. Grange J.M. 1996. *Mycobacteria and Human Disease*, Second edition. London.
21. Gregory S.H., Sagnimeni A.J., Wing F.J. 1996. Bacteria in the blood stream are trapped in the liver and killed by PMN Gram (+) neutrophils. *J. Immunol.* **157**: 2514.

22. Guo Fu, Odilia L.C. Wijburg, Paul U. Cameron, Jasón D. Price, Richard A. Strugnell. 2004. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of dendritic cells leads to functionally increased expression of the macrophage- derived chemokine. *Inf and Immun.* **73**: 1714- 1722.
23. Hay R.I., Mahgoub E.S. Lean G. 1992. Mycetoma. *J. Med. Vet. Mycol.*; **1**: 41- 49.
24. Heise Mark T. and Virgin Herbert W. 1994. The T-cell-independent role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *Journal of Virology.* **69**: 904-909.
25. Horwitz M.A., Lee B.W.E., Dillon B.J. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with a major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 1530- 1534.
26. Houchens David P. and Wright George L. Jr. 1972. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection: characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis. *Inf. and Imm.* **7**: 507-511.
27. Jenkin, C.R., Rowley, D., and Auzins, I. 1964. The basis for immunity to mouse typhoid. I. The carrier state. *Australian J. Exp. Biol. and Med.* **42**, 215.
28. Jones P.W., Collins P. and Aitken M.M. 1988. Passive protection of calves against experimental infection with *Salmonella typhimurium*. *The Veterinary Record*, **123**: 536-541.
29. Kearns, Robert J. and Hinrichs, David J. 1977. Kinetics and maintenance of acquired resistance in mice to *Listeria monocytogenes*. *Inf. and Imm.* **16**: 923-927.
30. Killion James W. and Morrison David C. 1986. Protection of C3H/ HeJ mice from lethal *Salmonella typhimurium* LT2 infection by immunization with lipopolysaccharide – lipid A associated protein complexes. *Inf. and Imm.* **54**: 1-8.
31. Krick J. A. and Remington J. S. 1975. Resistance to infection with *Nocardia asteroides*.
32. Kuby Janis, Goldsby Richard A., Kindt Thomas J., Osborne Barbara A. 2004. *Inmunología*. Quinta edición. Editorial McGraw Hill. Pp. 418- 420.
33. Lang T.E., Prina, Sibthorpe D., Blackwell J.M. 1997. *Nramp* transfection transfers Ity/ Lsh/ Bcg- related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect. Immun.* **65**: 380- 386.

34. Licón- Trillo A., Castro- Corona M.A., Salinas-Carmona M.C. 2003. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *Imm. and Med. Microb.* **37**: 37-44.
35. López M.R., Méndez T.R., Lavalle P.O., Welsh O., Saúl A., Ruiz E.M. 1992. Epidemiología del micetoma en México: 2105 casos. *Gaceta Médica México.* **128**: 177- 181.
36. Mackaness G.B. 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.*; **116**: 381- 406.
37. Mackaness G.B., Hill W.C. 1969. The effect of anti- lymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection. *J. Exp. Med.*; **116**: 381- 406.
38. Mahgoub E.S., Murray I.G. 1973. Mycetoma. London: William Hernemann. 76- 115.
39. Melendro EI, Contreras MF, Ximénez C, García-Maynez AM, Ortiz-Ortiz L. 1978. Changes in host resistance caused by *Nocardia brasiliensis* in mice: cross-protection against *Listeria monocytogenes*. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **57**(1):74–81.
40. Miki K., Mackaness G.B. 1964. The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 93-103.
41. Molinero Luis M. 2001. Comparación de un resultado de tipo ordinal entre dos muestras independientes. <http://www.seh-lelha.org/mannw.htm>.
42. Nakane Akio, Numata Akihiko, Asano Misako, Kohanawa Masashi, Chen Yu and Minagawa Tomonori. 1990. Evidence that endogenous gamma interferon is produced early in *Listeria monocytogenes* infection. *Inf. and Imm.* **58**: 2386-2388.
43. Okamura M., Lillehoj E.P. 2005. Differential responses to macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet. Immunol. Immunopathol.*; **15**: 325- 327.
44. Ortiz- Ortiz L., Melendro E.I., Conde C. 1984. Host- parasite relationship in infections due to *Nocardia brasiliensis*. Pp. 119- 133.
45. Osebold, J.W. and Sawyer, M.T. 1957. Immunization studies on listeriosis in mice. *J. Immunol.* **78**, 262.
46. Paciorkowski, Schultz and Rajan. 2003. Primed peritoneal b lymphocytes are sufficient to transfer protection against *Brugia pahangi* infection in mice. *Inf. and Imm.* **71**: 1370- 1378.

47. Pérez- Rivera L.I. 2005. Comparación del efecto protector de la respuesta inmune humoral inducida por antígenos solubles y particulados de *Nocardia brasiliensis*. Tesis doctoral. U.A.N.L.
48. Richter- Dahlfas A., Buchan A.M., Brintay. 1997. Murine studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellular inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J. Exp. Med.*; **186**: 569- 580.
49. Rogers H.W., Unanue E.R. 1973. Neutrophils are involved in accute nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.*; **61**: 5090- 5096.
50. Rollenhagen C., Sôrensen M., Rizos K., Hurvitz R., Bumann D. 2004. Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen. *PNAS*. **24**: 8739- 8744.
51. Salinas- Carmona M.C., Vera L., Welsh O., Rodríguez M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* in man. *ZBL Bact.*; **276**: 390- 397.
52. Salinas- Carmona M.C., Torres- López. 1996. Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Ann N.Y. Acad. Sci.*; **797**: 263- 265.
53. Salinas- Carmona M.C., Welsh O., Casillas S.M. 1993. Enzyme- linked immunoabsorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiol.* **31**(11): 2901- 2903.
54. Salinas- Carmona M.C., Torres- López E., Ramos A.I., Licón- Trillo A., González- Spencer D. 1999. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity.* **67**: 2428- 2432.
55. Salinas- Carmona M.C., Pérez- Rivera L.I., Torres- López E. 2003. Isolation and purification of the immunodominant antigen P61 from *Nocardia brasiliensis* culture infiltrate. *J. Mycol. Med.*; **13**: 117- 121.
56. Salinas- Carmona M.C., Pérez- Rivera I. 2004. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* **72**: 5597- 5604.
57. Samsom Janneke N., Annema Akke, Groeneveld Paul H. P., van Rooijen Nico, Langermans Jan A. M. and van Furth Ralph. 1996. Elimination of resident macrophages from the livers and spleens of immune mice impairs acquired resistance against a secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Inf. and Imm.* **65**: 986-993.

58. Sandoval- Trujillo H. 1993. "Actinomicetos". Editorial Universidad Autónoma Metropolitana. Pp. 345- 432.
59. Sashinami Hiroshi, Nakane Akio, Iwakura Yoichiro and Sasaki Mutuso. 2002. Effective induction of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* by immunizing mice with in vivo- infected dendritic cells. *Inf. and Imm.* **71**: 117-125.
60. Schaal K.P., Beaman B.L. 1984. Clinical significance of actinomycetes. Pp. 389-424.
61. Schlecht S. 1984. Protection against experimental *Salmonella typhimurium* infection in mice. Immunostimulating activity of heterologous Salmonella S-forms, R-mutants, lipopolysaccharides and muramyl dipeptide in vaccines combined with *S. typhimurium*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* **257**(3):414-25.
62. Shapiro-Shelef and Calame. 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nature.* **5**: 230-243.
63. Simon H.B., Sheagren J.N. 1971. Cellular immunity in vitro T- immunologically mediated enhancement of macrophage bactericidal capacity. *J. Exp. Med.* **133**: 1377- 1389.
64. Song and Cerny. 2005. Functional heterogeneity of marginal zone b cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a t-dependent antigen. *Journal of Experimental Medicine.* **198**: 1923-1935.
65. Tavares D., Ferreira P., Arala- Chaves M. 2003. Increased resistance in BLB/c mice to reinfection with *Candida albicans* is due to immunoneutralization of a virulence-associated immunomodulatory protein. *Microbiology;* **149**: 333- 339.
66. Torres- López E. 2001. La actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en el micetoma experimental. Tesis doctoral. U.A.N.L.
67. Vera- Cabrera L., Salinas- Carmona M.C., Welsh O. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.;* **30** (5): 1183- 1188.
68. Welsh O., Salinas- Carmona M.C., Rodríguez M.A., in Hoeprich P.D., Jordan M.C., Ronald A.R. (Eds). 1994. *Infectious Disease J.B.*, Lippincott Company Philadelphia. Pp. 1402- 1404.

69. Ximénez C, Melendro EI, González-Mendoza A, García AM, Martínez A, Ortiz-Ortiz L. 1980. Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathologia*. **70**(2):117–122.
70. Xiong Huabao, Kawamura Ikuo, Nishibori Takekai and Mitsuyama Masao. 1994. Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in virulence. *Inf. and Imm.* **62**: 3649-3654.
71. Zinsser. *Microbiología*. 20° edición. Ed. Panamericana. Pp. 91- 92.

ÁPENDICE

- **Agar/ caldo BHI**

| | |
|--------------------------|---------|
| Infusión cerebro corazón | 37 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Hemina (0.1%) | 5 ml |
| Vitamina K1 (1%) | 0.05 ml |
| Agar | 15.0 g |
| Cisteína | 2 ml |

- **Buffer acetatos**

Solución A (ácido acético 0.2M): disolver 11.55 ml de ácido acético glacial en agua destilada completando 1 litro.

Solución B (acetato de sodio 0.2 M): disolver 27.2 g de acetato de sodio (3 H₂O) en agua destilada completando 1 litro.

- **Buffer fosfatos**

Solución A (NaH₂PO₄ 0.2 M): disolver 27.6 g de NaH₂PO₄ · H₂O en agua destilada, completando un litro.

Solución B (Na₂HPO₄ 0,2 M): 53.65 g de Na₂HPO₄ · 7 H₂O se disuelven en agua destilada, llevando el volumen final a 1 litro.

- **Tween 20**

Monolaurato de polioxietilen sorbitan.

- **Leche descremada 5%**

| | |
|----------------|-------|
| Leche en polvo | 5 g |
| Agua destilada | 95 ml |

- **Solución salina 0.85%**

| | |
|----------------|---------|
| NaCl | 8.5 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

