

101 2



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
Zaragoza**

**ESTIMULACION LINFOCITARIA EN ANIMALES  
INFECTADOS CON Nocardia brasiliensis**

**T E S I S**

**Presentada por:**

**GRACIELA MARIA EUGENIA LETECHIPIA VALLEJO**

**Para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1981**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

Introducción	1
Micotoma	
Agentes etiológicos	
<u>Nocardia brasiliensis</u>	
Respuesta Inmune	
Respuesta Inmune Celular	
Respuesta Inmune Humoral	
Macrófagos	
Fundamento del Tema	9
Intervención de la respuesta inmune en infecciones por <u>Nocardia</u>	
I Hipersensibilidad retardada a anti- genos de <u>Nocardia</u>	
II Respuesta inmune en infecciones por <u>Nocardia brasiliensis</u>	
Planteamiento del Problema	15
Objetivo	15
Hipótesis	16

## Materiales y Métodos

17

Animales de experimentación

Nocardia brasiliensis

Composición y preparación del medio de cultivo PBY

Solución salina balanceada

Medio de cultivo para células de bazo

Preparación de Concanavalina A

Preparación de Lipopolisacárido

Líquido de Centelleo

Cultivo de Nocardia brasiliensis para la preparación de antígeno

Preparación del antígeno citoplasmático purificado de Nocardia brasiliensis --

(AgNb)

Infección de los animales

Evaluación de la infección

Estimulación linfocitaria

Prueba cutánea

Análisis estadístico

## Resultados

29

Cinética de la infección

Estimulación linfocitaria en ratones -  
infectados con Nocardia brasiliensis  
Mezcla de células  
Evaluación de la respuesta celular in vi  
vo en animales infectados con Nocardia -  
brasiliensis

Discusión	32
Conclusiones	40
Propuestas y Recomendaciones	42
Anexo	46
Estimulación linfocitaria	
Bibliografía	52
Tablas y Figuras	68

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

El micetoma es una infección crónica que se caracteriza -- por la presencia de lesiones localizadas, indoloras y supu rantes que involucran tejido cutáneo, subcutáneo y oseo. - Las secreciones son de tipo purulento o serosanguinolento en las cuales pueden encontrarse gránulos pigmentados de - diversos colores. Estos gránulos son microcolonias del - agente causal (1, 2). El edema, fibrosis y destrucción del hueso provoca la deformación de la extremidad afectada. Ex perimentalmente se ha observado que la amputación es espon tánea (3). La infección no se disemina a otras partes del cuerpo. Puede presentarse la muerte por infección bacteria na secundaria (4). Esta enfermedad es de distribución mun dial principalmente en aquellas zonas de clima tropical y subtropical. Se ha observado una mayor incidencia en Améri ca Central y del Sur, India y Africa Tropical (5, 6). Este padecimiento afecta principalmente a individuos de edad me dia (20-50 años) y es de 3 a 5 veces más frecuente en hom bres que en mujeres (1, 5). Todas las razas son igualmente susceptibles (1, 5). En cuanto a ocupación, es característi co de campesinos que no utilizan zapatos al realizar sus - labores (1, 5). Aproximadamente el 60% de los casos de mi cetoma en el mundo es debido a bacterias (micetoma actino-

micótico) y el resto a hongos (micetoma eumicótico o Pie - de Madura) (1). Los actinomicetos junto con las micobacterias y otros géneros constituyen el orden Actinomycetales. Se han reconocido nueve especies de actinomicetos responsables del micetoma actinomicótico. Tres forman parte al género Nocardia: asteroides, brasilensis y caviae dos al género Streptomyces: somaliensis y paraguayensis; dos al género Actinomadura: madurae y palletierii y dos al género Actinomyces: bovis e israelii (7 - 10). Todos son habitantes del suelo y penetran a los tejidos del pie descalzo y de la pierna posiblemente después de traumatismos. La pared del tórax se infecta por los costales contaminados con tierra y que son llevados sobre el hombro. El abdomen y -- los brazos son otras regiones que también resultan infectadas (4).

Los microorganismos del género Nocardia, son aerobios, crecen con facilidad a diferentes temperaturas y en medios relativamente simples (7). En México, Nocardia brasilensis, es el responsable del 94% de los casos de micetoma (11). En las lesiones los gránulos de N. brasilensis son blancos o blanco amarillento (1, 2). Cuando crecen en agar, las colonias de N. brasilensis son rugosas con una superficie - - aterciopelada debida a la existencia de micelios aereos ru

dimentarios. El crecimiento en medio líquido origina habitualmente la formación de una película superficial seca y cerosa. Al microscopio se observan como filamentos finos - que se fragmentan en formas bacilares. Es una bacteria --- Gram positiva y ácidoalcoholresistente (7 - 9).

#### RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune protege al organismo de infecciones -- causadas por bacterias, hongos, virus y otros agentes patógenos. También desarrolla mecanismos de vigilancia responsables del reconocimiento y destrucción de células alteradas del propio individuo. Gracias a este sistema se evita el desarrollo de tumores (12). Es importante señalar que - la respuesta inmune mantiene un estado de tolerancia hacia los antígenos propios e interviene en el rechazo de injertos (13, 14). En ocasiones la respuesta inmune puede causar daño al organismo, tal es el caso de los fenómenos de hipersensibilidad y autoinmunidad (15 - 17).

El sistema inmune se ha dividido en dos grandes partes: la respuesta inmune humoral (RIH) y la respuesta inmune celular (RIC). En la primera, intervienen linfocitos B, mientras que la segunda esta mediada por linfocitos T. Sin embargo esta división ha sido considerada artificial por mu-



chas razones, entre otras porque se ha demostrado la interdependencia que existe entre ambos tipos de respuesta (18-20).

#### RESPUESTA INMUNE CELULAR

Todos los linfocitos provienen de células primordiales de la médula ósea (13); a medida que emergen de este sitio, una proporción considerable de ellos penetra al timo. Una vez en el timo, estas células sufren diversos cambios funcionales y en las propiedades de su superficie, por influencia hormonal. Al salir estas células del timo reciben el nombre de linfocitos T o linfocitos derivados del timo. Los linfocitos T presentan sobre sus membranas antígenos característicos. En linfocitos T de ratón se han demostrado la presencia del antígeno theta, antígeno T1 y antígeno Ly (21). Los linfocitos T humanos tienen la propiedad de formar rosetas con los eritrocitos de carnero y por este medio son identificados los linfocitos humanos (22). Los linfocitos T se dividen en diferentes subpoblaciones, cada una de las cuales presentan distintas funciones y antígenos de superficie. Existe una población de linfocitos T supresores que intervienen en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en el control de reacciones de hipersens-

sibilidad tradía y en la limitación de la respuesta de anticuerpos a antígenos timo dependientes, timo independientes y alergénos (23, 24). Por el contrario, los linfocitos T cooperadores, son requeridos como células auxiliares que estimulan a los linfocitos B para que se diferencien en células productoras de anticuerpos (18 - 20). Otra de las manifestaciones de la RIC es llevada a cabo por el linfocito T citotóxico. Esta función consiste en destruir a la "célula blanco" contra la cual ha sido sensibilizado. La "célula blanco" puede ser, por ejemplo, una bacteria, una célula de un tejido injertado, o una célula del propio organismo en el caso de las enfermedades autoinmunes. El linfocito T citotóxico cumple su función, ya sea por contacto directo con dicha célula, o mediante una sustancia tóxica para esta última (25, 26). Por último, los linfocitos T --efectores, defienden al organismo contra el antígeno, mediante la síntesis y secreción de una serie de sustancias nombradas por Dumonde, linfocinas (27). Las linfocinas son sustancias que median la RIC, al mismo tiempo que la amplifican. Dentro de las más importantes se encuentran, el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF); factor activador de los macrófagos (MAF), factor de transferencia, capaz de sensibilizar linfocitos aún no activa--

dos; linfoxina, con efecto citotóxico; factor mitogénico linfocitario e interferón (27 - 36).

#### RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Las células que intervienen en la RIH se denominan linfocitos B. Estos linfocitos se derivan de la médula ósea. En las aves la maduración de estas células depende de un órgano linfóide situado en la parte posterior del intestino y denominado Bursa de Fabricio. En los mamíferos, las placas de Peyer, las amígdalas y el apéndice parecen representar el equivalente de la Bursa de Fabricio (13). Los linfocitos B poseen en su membrana receptores para el antígeno de tipo inmunoglobulina (37). El antígeno se combina con los receptores del linfocito B específico para el antígeno, y una vez combinados emigran hacia un polo de la célula y -- por endocitosis penetran al citoplasma del linfocito (38). El linfocito B al ser activado de esta manera sufre también un gran cambio metabólico, se multiplica y posteriormente se transforma en célula plasmática productora de anticuerpos (13). La vía de activación del linfocito B varía dependiendo del tipo de antígeno del que se trate. Si el antígeno es timo independiente, es decir, aquel cuyos determinantes antígenicos se repiten periódicamente, la acti

vación se efectúa al combinarse los receptores del linfocito B a dicho antígeno (20). Pero, si se trata de un antígeno tipo dependiente en el cual los determinantes antigénicos están dispersos por toda la molécula, la activación -- del linfocito B está mediada por el linfocito T y el macrófago (20).

#### MACROFAGOS

Los fagocitos mononucleares provienen de células precursoras de la médula ósea. Estas células en sangre reciben el nombre de monocitos. Al pasar a los tejidos se conocen como macrófagos tisulares o histiocitos, aunque también pueden recibir otros nombres según sea el tejido donde se localicen (39). Los macrófagos constituyen una importante barrera inespecífica de protección para el huésped. Estas células fagocitan y digieren hongos, bacterias y células tumorales. Además el macrófago participa en forma muy importante en la inducción de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Se ha comprobado experimentalmente que procesan de cierto modo al antígeno para posteriormente presentarlo a las células inmunocompetentes. En realidad la mayoría de los antígenos llegan al sistema inmunitario gracias a la fagocitosis del antígeno por el macrófago (40).

Ciertos anticuerpos, clasificados funcionalmente como opsoninas, aumentan la velocidad con que son fagocitados las bacterias y otros agentes infectantes. La opsonina se combina por medio de la porción Fab con los antígenos superficiales de la bacteria. La porción Fc de la molécula, se adhiere a los receptores para Fc que posee el fagocito sobre su membrana. En esta forma la opsonina sirve como un puente entre la bacteria y el fagocito (39, 40).

La necesidad de cooperación entre macrófagos, linfocitos T y linfocitos B en la respuesta inmune, ha sido reconocida desde hace tiempo, aunque los mecanismos involucrados en estas interacciones no se conocen perfectamente (18).

## FUNDAMENTO DEL TEMA

Intervención de la respuesta inmune en infecciones  
por Nocardia

I      Hipersensibilidad retardada a antígenos de Nocardia. Desde 1928 se ha intentado producir un antígeno de Nocardia adecuado para efectuar una prueba cutánea que sirva para el diagnóstico, pronóstico y epidemiología de infecciones por microorganismos de este género. Area Leao (41) utilizó un filtrado de cultivo de Actinomyces bovis para realizar una prueba cutánea en pacientes con micetoma, obteniendo resultados positivos. Posteriormente Lacaz da Silva (41) preparó un antígeno derivado de 26 especies de actinomycetes, y lo probó en un paciente infectado por N. brasiliensis. La prueba resultó negativa. Se ensayaron otros antígenos de Nocardia que indujeron resultados variables en la prueba cutánea (42-44). Por este motivo se han preparado antígenos con un grado mayor de pureza. González Ochoa y cols. (11, 45) aislaron un polisacárido crudo de N. brasiliensis que indujo en humanos una reacción de hipersensibilidad tardía específica.

Ortiz-Ortiz y cols (46 - 49) demostraron la existencia de hi

persensibilidad tardía in vivo e in vitro en cobayos infectados con N. brasiliensis o N. asteroides. Para ello emplearon, proteínas ribosomales, antígeno citoplasmático purificado (AgNb y AgNa, respectivamente) y polisacáridos provenientes de ambos microorganismos. Estos antígenos presentaron una intensa reacción en animales infectados con el microorganismo homólogo que permitía diferenciarla de una débil reacción cruzada.

Ortiz-Ortiz y Bojalil (47) realizaron estudios diagnósticos y epidemiológicos en humanos empleando los antígenos AgNb y AgNa. Demostraron que en zonas donde se había aislado N. brasiliensis del suelo (zonas endémicas) presentaron reactividad al AgNb. En pacientes infectados con Nocardia hicieron pruebas cutáneas con ambos antígenos. Encontraron reacciones cruzadas, pero fué mayor la respuesta en pacientes infectados con el microorganismo homólogo. Además, al ensayarlo en pacientes con tuberculosis, lepra o individuos sanos, la respuesta fué menor o nula, a pesar de la relación filogenética que existe entre los géneros Mycobacterium y Nocardia.

II Respuesta inmune en infecciones por Nocardia brasili-

liensis.

Se han realizado estudios en humanos para determinar el papel que desempeña la respuesta inmune en la infección. González Ochoa y cols. (11) observaron que aquellos pacientes con lesiones graves perdían su capacidad de responder a la prueba cutánea inducida con un polisacárido crudo de N. brasiliensis. Por el contrario, cuando las condiciones del paciente mejoraron, la reactividad cutánea reapareció (11). En otros estudios, Bojalil y Zamora (50) demostraron la presencia de precipitinas en pacientes con micetoma causado -- por N. brasiliensis, utilizando para ello polisacárido específico aislado del mismo microorganismo.

El primer modelo experimental fué diseñado por González - - Ochoa (51) Eligió al ratón como animal de experimentación y la infección se llevó a cabo inoculando el cojinete plantar -- con  $2 \times 10^8$  bacterias suspendidas en adyuvante incompleto -- de Freund. Teniendo como base este modelo, se han efectuado diversos estudios para determinar la participación de la -- respuesta inmune tanto humoral como celular en infecciones con N. brasiliensis.

Melendro y cols. (52) utilizaron Listeria monocytogenes pa-



ra estudiar la cinética de aparición y persistencia de la - resistencia antimicrobiana originada en ratones infectados con N. brasiliensis. Observaron que la actividad microbicida de los macrófagos se ve aumentada en ratones infectados con este microorganismo. En esta infección experimental se evaluó la RIC por medio de pruebas de hipersensibilidad tardía con el AgNb. Los resultados que obtuvieron indican que la respuesta celular llegó a un máximo aproximadamente a - los 25 días de infección, mientras que la dimensión del micetoma fué mínima. Posteriormente esta relación se invirtió es decir, el tumor aumentó de tamaño progresivamente y la - reactividad celular disminuyó. Al cuantificar anticuerpos - en el animal infectado observaron que el nivel de éstos aumentó progresivamente desde el día 15 hasta alcanzar un título máximo a los 45 días de infección. (52). Este trabajo indica la importancia de la RIC, ya que mientras esta se en - cuentra en una fase óptima, el micetoma es controlado. Por el contrario, la RIH y el tamaño del micetoma progresan si - multáneamente.

En otro trabajo (3), ratones B<sup>a</sup> y ratones normales fueron - infectados con N. brasiliensis. Los resultados muestran que la respuesta de tipo celular juega un papel definitivo en es-

ta infección, ya que aquellos animales desprovistos de linfocitos T (ratones B) presentaron un mayor daño, llegando en algunos casos a la amputación espontánea del miembro afectado. En este trabajo también se estudió la participación de la RIH en la infección. Se administraron anticuerpos anti N. brasiliensis o mezcla de bacterias opsonizadas y anticuerpos a ratones B. Este tratamiento no indujo la disminución de la infección, por el contrario, en los animales que recibieron cualquiera de los tratamientos con anticuerpo, pudo observarse que la evolución del micetoma fué más rápida que la observada en los testigos, y que además, el número de amputaciones fué también mayor. Por lo tanto este trabajo sugiere que el anticuerpo facilita la infección.

Por otro lado, Jiménez y cols. (53) demostraron que la inmunización con N. brasiliensis es capaz de proteger a ratones frente a un desafío con el microorganismo homólogo, mejorando su respuesta celular, sin encontrar cambios importantes en los títulos de anticuerpos.

En infecciones más recientes, el modelo experimental se modificó. Conde (54) inoculó bacterias viables, suspendidas -

en solución salina isotónica. El empleo de solución salina fué con el objeto de hacer más parecido el modelo experimental a los casos reales de infección. La presencia de anticuerpos solo fué detectada hasta los 50 días y en títulos no mayores de 1:16, por medio de la técnica de hemaglutinación pasiva.

\* Animales timectomizados, irradiados a 850 rads y reconstituidos con células de médula ósea, previamente tratadas con suero citotóxico para linfocitos T en presencia de complemento.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta celular en infecciones producidas por N. brasiliensis desempeña un papel muy importante en el control de la enfermedad. Los antecedentes señalan que el máximo de reactividad celular conllevó a la reducción del micetoma. Sin embargo, posterior a este período, se observó una disminución considerable de la respuesta celular. Esto ocasionó el aumento en tamaño del micetoma con el consecuente empeoramiento del animal de experimentación. En las infecciones inducidas con bacterias suspendidas en solución salina, la RIH, medida por el nivel de anticuerpos circulantes, se encontró muy baja.

De lo anterior se puede pensar que en infecciones experimentales con N. brasiliensis, tanto la respuesta inmune humoral como celular, no se encuentran en las condiciones óptimas de reactividad.

## OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo, es conocer el estado funcional de los linfocitos T y B a lo largo de la infección experimental con N. brasiliensis.

La RIC es medida in vivo por medio de pruebas de hipersen-

sibilidad tardía con el AgNb.

La reactividad de los linfocitos T y B es estudiada in vitro por medio de la técnica de estimulación linfocitaria. Los mitógenos elegidos para este fin, son Concanavalina A para linfocitos T y lipopolisacárido de Escherichia coli para linfocitos B.

#### HIPOTESIS

Dado que al parecer existe un estado inmune hiporreactivo durante la infección con N. brasiliensis, es de suponer -- que mediante la técnica de estimulación linfocitaria se detecte algún defecto en los linfocitos. Es posible que a semejanza de otras infecciones, se demuestre un estado de -- inhibición de la respuesta a la estimulación con mitógenos (55 - 57).

### MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION: Se utilizaron ratones de un mismo sexo de la cepa BALB/C de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico cubiertas con rejillas de acero inoxidable y se alimentaron con purina. (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua ad libitum.

NOCARDIA BRASILIENSIS: Se utilizó la cepa UPHG-24 mantenida en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, mediante pases en medio de cultivo líquido y sólido. Los medios utilizados fueron Infusión de Cerebro y Corazón (ICC) y el medio de Proskauer y Beck modificado por Youmas y Carlson (PBY) (58) cuya composición se describe abajo:

#### COMPOSICION Y PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO PBY:

L - asparagina	5.0000 g
Citrato de sodio dihidratado	0.6176 g
Cloruro de magnesio hexahidratado	0.1974 g
Fosfato monobásico de potasio	5.0000 g
Sulfato de potasio	0.5000 g
Glicerol	50 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Las sales se disolvieron por separado, se mezclaron y en -

seguida se agregó el glicerol. Posteriormente se ajustó el pH a 6.8 con bicarbonato de sodio. Se distribuyeron 1000 ml del medio en matraces Erlenmeyer de 2 litros y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

**SOLUCION SALINA BALANCEADA: (SSB)**

**SOLUCION I**

D glucosa o dextrosa	10.000 g
Fosfato monobásico de potasio anhidro	0.600 g
Fosfato dibásico de sodio anhidro	1.850 g
Rojo de fenol	0.010 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Las sales se disolvieron por separado, se mezclaron y en seguida se aforó a 1000 ml con agua destilada.

**SOLUCION II**

Cloruro de calcio dihidratado	1.860 g
Cloruro de potasio	4.000 g
Cloruro de sodio	80.000 g
Cloruro de magnesio	2.000 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	2.000 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Se preparó de la misma forma que la solución I.

Solución de trabajo:

A 100 ml de la solución I se le agregaron aproximadamente 100 ml de agua destilada; a esta mezcla se le añadieron -- 100 ml de la solución II y finalmente se aforó con agua -- destilada a 1000 ml.

A la solución de trabajo se le añadieron 10 U de heparina sódica por mililitro de solución. Posteriormente se esterilizó por filtración Millipore con membranas de 0.45 u. Antes de emplearse, se adicionó 1 ml de mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomina con 10,000 U y 10,000 ug respectivamente) por cada 100 ml de solución de trabajo.

MEDIO DE CULTIVO PARA CELULAS DE BAZO: Se eligió el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island New York U.S.A. cat. No. H-18) adicionado con 2 g de bicarbonato de sodio por litro. Se esterilizó por filtración Millipore con membranas de 0.45 u y se almacenó a una temperatura de 4°C. - En el momento de emplearse, se enriqueció al 1% con soluciones de aminoácidos no indispensables, 100 x (Gibco, - - Grand Island N.Y. U.S.A. Cat. No. 114), piruvato de sodio, 100 x (Gibco, Grand Island, N.Y. U.S.A. Cat. No. 136) y -- mezcla de penicilina y estreptomina con 10,000 U y - - -



10,000 ug/ml respectivamente; al 0.1% con solución de L - glutamina 200 mM (Gibco, Grand Island N.Y. U.S.A. Cat. No. 503). y al 5% con suero fetal bovino (Gibco, Grand Island N.Y. U.S.S. Cat. No. 614).

PREPARACION DE CONCANAVALINA A: A un tubo que contenía 10 ml de una solución de cloruro de sodio 6.1 M, se agregaron 0.200 g de Concanavalina A (Sigma Chemical Co. Cat. No. -- 2010). Se centrifugó a 330 x g durante 15 min a 4°C - sin descartar el sobrenadante, el mismo tubo se centrifugó nuevamente a 3000 x g durante 90 min. a 4°C. El sobrenadante que se obtuvo se esterilizó por filtración Millipore con membranas de 0.45 u. Se tomó, una alícuota, estérilmente, y se preparó una dilución 1:100 en solución de hidróxido de sodio 1 N. la dilución se leyó en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a una longitud de onda de 280 nm. La concentración de proteína se calculó considerando que una Densidad Óptica de 1.5 equivale a 1 mg de proteína por mililitro de solución.

PREPARACION DE LIPOPOLISACARIDO: Se pesaron 0.200 g de lipopolisacárido de Escherichia coli serotipo O111; B4 (Difco laboratories, Detroit, Mi.) que se disolvieron en 200 -

ml de solución salina isotónica (SSI). la solución se esterilizó por exposición a una lámpara de luz ultravioleta, - por un período de 20 min. a una distancia de 25 cm.

LIQUIDO DE CENTELLEO:

PPO (2, 5, difeniloxazole scintillations grade) 12.00 g

POPOP (Bis-2, 5-pehniloxazolylbenzene 1.200 g

Los reactivos se adicionaron a tres litros de tolueno. Para disolverse, se agitó por lo menos durante 3 hrs.

CULTIVO DE NOCARDIA BRASILIENSIS PARA LA PREPARACION DE ANTIGENO: La bacteria se cultivó en matraces Erlenmeyer de 2 litros que contenían 1000 ml PBV cada uno. Se incubaron a 37°C por un período aproximado de 30 días.

PREPARACION DEL ANTIGENO CITOPASMATICO PURIFICADO DE NOCARDIA BRASILIENSIS (AgNb): El método que se siguió para la preparación del antígeno fue el descrito por Ortiz-Ortiz (48). La película de crecimiento de Nocardia Brasiliensis cosechó y se homogeneizó en mortero; se eliminaron los lípidos con acetona (3 veces) y después con una mezcla de etanol - éter etílico (1:1) hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente. La bacteria se dejó secar a temperatu-

ra ambiente dentro de una campana de extracción, se trituro finamente y se suspendió en una solución amortiguadora de tris-hidroximetilaminometano (TRIS) 0.01 M, pH 7.4, la cual contenía 0.01 M de acetato de magnesio. La suspensión se hizo en una proporción aproximada de 50 g de bacterias por cada 200 ml de la solución amortiguadora. Esta suspensión se procesó en un homogenizador, después se pasó a un fraccionador de células Sorvall Ribi (modelo RF-1), y se sometió a presiones de 15,000 a 30,000 lb/pulg<sup>2</sup>. Posteriormente se agregó desoxi-ribonucleasa (Sigma Chemical Co.) a una concentración de 2 ug/ml y se dejó reposar por toda la noche a 4°C. A fin de separar las células completas, las paredes y los desechos celulares, la suspensión celular se centrifugó a 3020x g por 15 min. El sobrenadante se centrifugó secuencialmente a 12,000 x g durante 30 min.; 48,000 x g por 15 min. y por último a 144,000 x g por 3 hrs., para eliminar la mayor parte de ácido desoxirribonucleico -- (DNA) altamente polimerizado y los ribosomas. El sobrenadante que resultó de la última centrifugación es el AgNb; éste se dializó contra agua destilada durante una semana - (tres cambios diarios en un volumen aproximado de 2 litros) se liofilizó y se almacenó en congelador a - 20°C. Para su uso, el AgNb se resuspendió en SSI, se esterilizó

por filtración Millipore con membranas de 0.45  $\mu$  y se le determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry (59).

INFECCION DE LOS ANIMALES: El proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

PREPARACION DEL INOCULO: Se sembraron matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían aproximadamente 250 ml de medio de cultivo. Estos fueron incubados durante siete días, en agitación constante (2000 rpm) y a una temperatura de 37°C. Cumplido el período de incubación, el contenido de los matraces se transfirió a botellas de 250 ml, y se centrifugó a 330 x g durante 15 min. a 4°C, el sobrenadante se desechó y el sedimento se depositó en un mortero, y en frío se homogenizó durante 10 min. La suspensión resultante se coleccionó en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Para eliminar los grumos de mayor tamaño, se centrifugó a 100 x g durante 15 min. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se transfirió a nuevos tubos, los cuales se centrifugaron a 330 x g durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 2 ml de SSI estéril. De esta suspensión se tomó una alícuota con la que se hizo una dilución 1:100. Esta dilución se leyó en espectrofotómetro (Baush & Lomb) a una longitud de onda de 500 nm. Con

siderando que una Densidad Optica de 0.14 equivale a  $4 \times 10^6$  bacterias, se calculó la concentración teórica de bacterias de la suspensión. La infección de los animales se llevó a cabo cuando la concentración de bacterias de la suspensión fuera igual o mayor a  $2 \times 10^9$  bacterias/ml.

**INOCULACION DE LOS ANIMALES:** Para la infección de los animales éstos se dividieron en dos grupos, cuya diferencia radicó en la dosis infectante. Los dos grupos de ratones se infectaron en el cojinote plantar, inyectando 0.05 ml de la suspensión, ó de una dilución 1:10 a partir de ésta, respectivamente. El grupo control estuvo constituido por ratones sanos de la misma cepa y edad que se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los ratones infectados.

- **VIABILIDAD DEL INOCULO:** A partir de la suspensión que se utilizó para la infección se prepararon dos diluciones que contenían aproximadamente  $1 \times 10^4$  bacterias/ml y  $1 \times 10^3$  bacterias/ml respectivamente. Se sembraron por duplicado 0.1 ml de cada una de estas diluciones en medio de cultivo sólido. Las cajas se incubaron durante una semana a  $37^\circ\text{C}$  y se contó el número de colonias que se habían desarrollado. Lo anterior se hizo para conocer el número de microorganismos viables que fueron inoculados al ratón.

**EVALUACION DE LA INFECCION:** Semanalmente se midió el grosor

del cojinete plantar infectado, con un microcalibrador - -  
(The L. S. Starret Co. A thol Mass).

ESTIMULACION LINFOCITARIA: La técnica se llevó a cabo en -  
condiciones de esterilidad.

- PREPARACION DE LA SUSPENSION DE CELULAS: Se sacrificaron  
los ratones por dislocación cervical. El bazo se extrajo -  
asépticamente y se colocó en 5 ml de SSB, en una caja de -  
Petri desechable de 60 x 15 mm (Lux, Scientific Co. Newbu-  
ry Park Calif. U.S.A. Cat. No. 5226). Con pinzas de disec-  
ción de punta roma, esterilizadas a la flama, el bazo se -  
disgregó suavemente. La suspensión de células obtenida, se  
transfirió a tubos estériles desechables de 17 x 100 mm --  
(Falcon, Oxnard Calif. U.S.A. Cat. No. 2057). Se dejaron -  
reposar sobre hielo durante 10 minutos para que las partí-  
culas gruesas sedimentaran. El sobrenadante que contenía -  
las células se transfirió a otro tubo. Las células se lava-  
ron con SSB estéril dos veces, centrifugando a 250 x g por  
10 minutos a 4°C. El paquete de células que resultó se sus-  
pendió en 2 ml de medio de cultivo enriquecido. De la sus-  
pensión anterior se tomó una alícuota para cuantificar el  
número de leucocitos por mililitro por el método de Turk,  
haciendo un control de visibilidad de las células por el mé

todo de exclusión de azul tripano (60). Se ajustó el número de células a una concentración de  $5 \times 10^6$  células viables por mililitro.

- CULTIVO Y ESTIMULACION LINFOCITARIA: El cultivo se llevó a cabo en placas Falcon para microcultivo (Cat. 3040 Falcon). Las células de animales controles e infectados se cultivaron en un volumen final de 0.2 ml que contenían  $5 \times 10^5$  células. Los cultivos se hicieron por cuadruplicado en presencia de:

- a) Medio RPMI 1640 enriquecido, como testigo.
- b) Concanavalina A a una concentración de 0.2 ug por cultivo.
- c) Lipopolisacárido de E. coli a una concentración de 10 ug por cultivo.

Las placas para microcultivo se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de 72 hrs.

Los cultivos se marcaron 18 a 20 horas antes de cumplido el periodo de incubación con 1 uCi de timidina tritiada (<sup>3</sup>HTdR) (NET-027, New England Nuclear Ill. con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol) Las células se cosecharon automáticamente y los filtros se secaron por exposición a una lámpara de rayo infrarrojos. Una vez secos los filtros se depositaron en frascos viales que contenían 3 ml de li-

quido de centelleo y se contaron en un aparato Mark III -- (Amershan/Searle Co. Ill.).

MEZCLA DE CELULAS: Se cultivó la mezcla de células de animales infectados y de animales testigos, cada uno contribuyó con  $2.5 \times 10^5$  células. Además, se cultivaron por separado pozos testigo que contenían  $2.5 \times 10^5$  células, tanto de los animales infectados como de los animales testigos. Estos cultivos fueron estimulados y procesados de manera similar a los cultivos anteriores. Los datos obtenidos de la mezcla de células se compararon con la sumatoria de los -- cultivos testigos.

PRUEBA CUTANEA: El AgNb se preparó a una concentración de 1 mg/ml en SSI estéril. Para realizar la prueba cutánea -- (PC) se inyectó 0.05 ml del antígeno en el cojinete plantar del ratón. Para valorar la PC se midió el grosor del -- cojinete con un microcalibrador (Mitutoyo, Mfg. Co. Ltd., No. 2412, Japón), previamente a la inoculación y a las 24 horas después de la inoculación del antígeno. La PC de hipersensibilidad tardía, se consideró positiva cuando existió una diferencia estadísticamente significativa entre la lectura de los animales infectados y animales testigos a -- las 24 horas.



ANALISIS ESTADISTICO: Para determinar la homogeneidad de la varianca en los grupos estudiados, se utilizó la prueba de Fisher (61). Para estimar la significancia se utilizó la prueba de t de Student en el caso de que las varianzas resultaran homogéneas (61). Cuando las varianzas fueron heterogéneas la significancia se determinó por la prueba U de Mann-Whitney (62).

## RESULTADOS

### CINETICA DE LA INFECCION

La infección fué evaluada por medio de la medición periódica del grosor del cojinete plantar infectado. En la figura 1 se muestra el aumento en el grosor del cojinete plantar infectado con respecto al tiempo de infección. los animales infectados con N. brasiliensis, presentaron un aumento considerable a los 10 días de la inoculación. Posteriormente se observó una disminución progresiva que alcanzó un mínimo a los 30 días. Después de este periodo la infección se mantuvo estable.

### ESTIMULACION LINFOCITARIA EN RATONES INFECTADOS CON NOCARDIA BRASILIENSIS.

El estado funcional de los linfocitos fué evaluado periódicamente mediante la técnica de estimulación linfocitaria.

Respuesta de células de bazo de ratones infectados a la estimulación con Concanavalina A.

Los linfocitos provenientes de animales infectados y animales testigos fueron estimulados con 0.2 ug de Concanavalina A por cultivo a diferentes intervalos de la infección.

Los resultados indican que durante los primeros días de infección los linfocitos de animales infectados muestran una incorporación de  $^3\text{HTdr}$  similar a la de los linfocitos de animales testigo. (tabla 1). A partir de la cuarta semana de infección se observó una disminución significativa de la respuesta a la estimulación con Concanavalina A en los linfocitos de los animales infectados (Tabla 1).

En infecciones inducidas con altas concentraciones de microorganismos ( $10^7$ ) se observó una inhibición a la estimulación con Con A continua.

Respuesta de linfocitos de ratones infectados a la estimulación con lipopolisacárido de E. coli

Se estudió la funcionalidad de los linfocitos B de ratones infectados y ratones testigo a diferentes intervalos de la infección; para ello se empleó 20 ug de lipopolisacárido de E. coli por cultivo. Los resultados señalan una inhibición significativa de la respuesta a LPS en los linfocitos de animales infectados desde la cuarta semana de infección (Tabla 2).

En infecciones con dosis altas ( $10^7$ ) se obtuvo una inhibi-

ción duradera y que aumentó en grado de significancia con respecto al tiempo. (Tabla 2 y 3). La respuesta a LPS es inestable a dosis bajas de microorganismos (Tabla 3). En la tabla 4 se muestra el promedio de inhibición a la respuesta a LPS obtenida de tres experimentos efectuados con una dosis media de  $2.66 \times 10^7$  bacterias. Esta inhibición es persistente y estable.

#### MEZCLA DE CELULAS

En cuanto a los cultivos de mezcla de células, solo se observó en algunas fechas que la presencia de las células de ratones infectados disminuyeron la respuesta a la estimulación con mitógenos de las células de ratones testigo (Tablas 5 y 6).

#### Evaluación de la respuesta celular in vivo en animales infectados con *Nocardia brasiliensis*.

La respuesta celular se evaluó in vivo por medio de intradermorreacción; para ello se empleó el AgNb. En la figura II se observa que la hipersensibilidad de tipo tardío fue positiva durante los primeros días de infección y posteriormente se volvió negativa.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican -- que los linfocitos provenientes de animales infectados con Nocardia brasiliensis muestran una incorporación de  $^3\text{HTdR}$  significativamente menor a la de los animales normales, -- cuando ambos fueron estimulados con mitógenos. Lo anterior hace suponer que la funcionalidad de los linfocitos de animales infectados se encuentra disminuida inespecíficamente. Esta inhibición de la respuesta a mitógenos siguió cierto patrón. Se demostró que el estado inmunocompetente de los linfocitos B y T del ratón infectado se encontró similar a el de los animales testigo a los pocos días de infección. En algunas infecciones la respuesta a LPS descendió en los primeros días y poco después apareció disminuida la respuesta a Con A.

Al relacionar la cinética de la infección con los resultados de estimulación linfocitaria (fig. 1 y tablas 1 y 2), se observó lo siguiente: El descenso progresivo en la tumorcación corresponde al período en el cual los linfocitos se encuentran funcionalmente normales. Cuando los linfocitos presentaron una inhibición de la respuesta a la estimula--

ción con mitógenos, el grosor del cojinete plantar se mantuvo estable durante esta etapa.

A semejanza de los resultados obtenidos con Con A, la respuesta de tipo tardío al AgNb fué positiva en los primeros días de infección (fig. II y Tabla 1). Después se tornó negativa coincidiendo este período con la fase de inhibición a la respuesta a Con A. De lo anterior se concluye que el estado inmune a los animales infectados con N. brasiliensis no solo se encuentra afectado en cuanto a la respuesta al AgNb (respuesta específica) sino también se observa una modificación en la respuesta a la estimulación con mitógenos (respuesta inespecífica). Es importante mencionar que la cinética de ambos tipos de respuesta es similar.

Aparentemente existe cierta relación entre la respuesta a la estimulación con mitógenos y la dosis infectante. Parece ser que una dosis elevada de microorganismos ( $10^7$ ) indujo una inhibición en la respuesta a LPS estable (tablas 3 y 4). Cuando se emplearon dosis menores la inhibición a -- LPS fué muy inestable (tabla 3).

En este trabajo el cultivo de la mezcla de células de ani-

males infectados y animales testigo sugieren la participación de células supresoras como responsables del estado -- inhibitorio (tablas 5 y 6).

Por lo tanto, el presente trabajo supone la existencia de diferentes etapas a lo largo de la infección:

En la primera etapa se demostró por intradermo reacción y estimulación linfocitaria que la funcionalidad de los linfocitos T y B, se mantuvo dentro de los límites normales, mientras que la infección presentó un descenso progresivo. En la segunda etapa ambos tipos de respuesta decayeron significativamente y en este período el tamaño del micetoma se mantuvo estable.

Haciendo un análisis de los resultados, se observan tres aspectos importantes:

- 1º Inhibición de la respuesta a la estimulación con mitógenos.
  
- 2º Influencia de la dosis de bacterias inoculadas en la respuesta a la estimulación con mitógenos.

- 3º Estabilidad del granuloma en el periodo en el que los linfocitos presentan una respuesta disminuida a la estimulación con mitógenos.

Cada uno de estos aspectos será discutido a continuación:

1º Inhibición de la respuesta a la estimulación con - mitógenos. La inhibición de la respuesta a Concanavalina A y Lipopolisacárido de E. coli en animales infectados con - N. brasiliensis puede deberse a: i) Presencia de células - supresoras (o sus productos) que provoquen una inhibición de la respuesta a mitógenos. ii) La bacteria o alguno de sus productos como responsables de este estado de inhibición. iii) Expansión policlonal inducida por el microorganismo.

El método empleado para demostrar la presencia de células supresoras consiste en cultivar la mezcla de linfocitos de animales infectados y animales testigo. Sin en el animal - infectado se han generado células supresoras, estas provocan una inhibición de la respuesta a mitógenos por parte - de los linfocitos de animales testigo. En diversas parasitosis ha sido demostrada la participación de células supre - soras. Estudios realizados por Jawardena y cols (55) y Ra-



mos y cols (63) han encontrado que las células de bazo de ratones infectados con Trypanosoma brucei y T cruzi respectivamente, son capaces de inhibir in vitro la producción de células formadoras de anticuerpo y la estimulación por mitógenos de linfocitos T y B de animales normales. En infecciones producidas por Histoplasma capsulatum (56) se sugiere la existencia de una población inmunoreguladora. La respuesta inmune de tipo celular de ratones con histoplasmosis se encuentra inhibida entre la primera y tercera semana de la infección. Para la octava semana cuando ha sido resuelta se aprecia la participación de una población cooperadora, ya que el estado inmunosuprimido desaparece. En esquistosomiasis producida en rata (57) se observa que al inicio de la infección existe una respuesta de proliferación significativa al antígeno de Schistosoma mansoni así como una hipersensibilidad cutánea de tipo tardío al mismo. Sin embargo, entre la cuarta y séptima semanas de infección, ambas respuestas disminuyeron. Al buscar un motivo de esta reducción se demostró únicamente a los 35 días de infección, la participación de células supresoras.

Como lo muestran las tablas 5 y 6, en el presente trabajo se sugiere la participación de células supresoras. Sin em-

bargo estas solo fueron demostradas en algunas ocasiones. La presencia de células supresoras demostrada in vitro podría ser el motivo de el estado inmune deficiente que se aprecia en los animales infectados con N. brasiliensis.

Es posible que la bacteria o alguno de sus productos sean los responsables de el estado de inhibición a la respuesta a mitógenos. Quizá el patógeno induzca la inhibición de la respuesta inmune para evitar ser atacado y de esta forma permanecer indefinidamente en el huésped. Como se sabe el micetoma es una infección de tipo crónico y por lo tanto el agente causal permanece por un período prolongado. En lo que respecta a infecciones producidas por N. brasiliensis es posible que esta y/o alguno de sus productos generen un estado inmune deficiente. En esquistosomiasis ha sido demostrada esta hipótesis. Camus y cols (57) demostraron que un extracto de S. mansoni inhibió la respuesta de proliferación de linfocitos tanto al antígeno de S. mansoni como a mitógenos.

La inhibición de la respuesta a mitógenos también puede deberse a la expansión policlonal. Se ha demostrado que algunos parásitos segregan sustancias con propiedades mitogé-

nicas (64-66). Estas sustancias también son conocidas como activadores policlonales de linfocitos B, ya que pueden estimularlos directa e inespecíficamente a proliferar. Esto podría ocasionar un agotamiento de clonas trayendo como consecuencia la falta de participación de los linfocitos B en la respuesta inmune y por lo tanto la aparición de un estado hiporreactivo. Ortiz-Ortiz y cols (65) y López y cols (66) demostraron que un extracto de N. brasiliensis activa inespecíficamente linfocitos B de ratón.

En el presente trabajo, los resultados señalan una inhibición de la respuesta a LPS desde los 11 días de infección en algunos experimentos. Esto sugiere que algunas sustancias segregadas por la bacteria ocasionaran una expansión policlonal, y por este motivo se observara una falta de respuesta a LPS.

2º Influencia de la dosis de bacterias inoculadas en la respuesta a la estimulación con mitógenos. Otro aspecto interesante de este trabajo, es la influencia de la dosis de bacterias en la respuesta a LPS. Una dosis elevada de microorganismos provocó una inhibición perdurable a la estimulación por LPS.

En otras infecciones se ha observado esta misma relación - (55, 56, 67). Artz y Bullock (56) supusieron que un mayor estímulo antigénico activa de cierto modo mecanismos reguladores de la respuesta inmune. Esta actividad inhibitoria puede explicarse como un mecanismo de protección para el huésped. Es decir, en el caso de que la respuesta inmune no tuviera control, se provocaría una gran necrosis del tejido como consecuencia de la defensa contra un elevado número de microorganismos.

3<sup>a</sup> Estabilidad del granuloma en el período en el que los linfocitos presentan una respuesta disminuida a la estimulación con mitógenos. Es interesante señalar que el grosor del cojinote plantar infectado se mantuvo estable durante la etapa en que la funcionalidad de los linfocitos se encontró limitada. Este resultado difiere con el encontrado en la infección experimental inducida con bacterias suspendidas en adyuvante (52). En este trabajo, la RIC evaluada por intradermorreacción, llegó a un máximo aproximadamente a los 25 días de infección, mientras que la dimensión del micetoma fue mínima. Posteriormente la RIC disminuyó y el micetoma aumentó de tamaño considerablemente.

Posiblemente en el presente trabajo suceda algo similar a lo reportado por Chensue y cols (68). Es decir, al existir una inhibición inespecífica de los linfocitos, no hay -- una producción adecuada de linfocinas y por lo tanto se -- evita que el granuloma progrese. Otra explicación que se -- podría dar es la siguiente: es posible que el responsable de controlar el micetoma sea el macrófago, ya que como se ha demostrado los macrófagos de los animales infectados -- con N. brasiliensis observan un aumento de actividad fagocítica y digestiva a los 25 días de infección y se mantienen funcionalmente normales a lo largo de ésta (52, 69).

En tuberculosis hay evidencias que indican que los macrófagos son activados principalmente en donde se localiza el - bacilo. El macrófago se activa bajo el estímulo del bacilo y sus productos. Esta activación se acompaña de una disminución en el número de bacilos presentes (70, 71).

Por lo tanto queda demostrado que en cierto período de la infección los linfocitos de ratones infectados con N. brasiliensis se encuentran funcionalmente deficientes. Falta aún por demostrar cual es el verdadero mecanismo responsable de esta alteración.

## CONCLUSIONES

- Se demostró, que los linfocitos de ratones infectados con N. brasiliensis, de manera similar a otras infecciones, presentan un estado de inhibición hacia la respuesta a la estimulación con mitógenos.
  
- La funcionalidad de los linfocitos provenientes de ratones infectados con N. brasiliensis se encuentra disminuida inespecíficamente con respecto a los animales testigo, durante algunas etapas de la infección.
  
- Este estado de inhibición de la respuesta a mitógenos se aprecia primero en los linfocitos B y posteriormente en los linfocitos T.
  
- Los resultados demuestran que dosis infectantes elevadas, inducen un estado persistente de inhibición a la respuesta a mitógenos.
  
- Los resultados de estimulación linfocitaria empleando Con canavalina A se correlacionan bien con los resultados de la prueba de hipersensibilidad tardía con el AgNb. Es decir, la respuesta inespecífica (Con A) y la específica (AgNb) solo

fueron positivas en los primeros días de la infección y después de tornaron negativas a lo largo de la infección.

- El descenso progresivo en la tumoración corresponde al período en el cual los linfocitos de ratones infectados se encuentran funcionalmente normales.

## PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Se demostró que los linfocitos de animales infectados con N. brasiliensis presentan un funcionamiento anormal en - - cierta etapa de la infección. Sin embargo, aún queda por - demostrar el o los mecanismos responsables de esta alteración. A continuación se proponen diversas alternativas a - seguir para alcanzar este objetivo.

Suponiendo que se trate de una población supresora, sería interesante caracterizarla. Para ello, las diversas subpoblaciones (linfocitos T, B y macrófagos provenientes de -- animales infectados) se purifican en base a sus propieda-- des y posteriormente cada una de estas subpoblaciones se - cultivan en presencia de células de animales normales. Si-- multáneamente se preparan cultivos testigo, y todos son so-- metidos a la estimulación con mitógenos. Por los resulta-- dos se detecta cual de estas subpoblaciones tiene un efec-- to supresor sobre las células normales. De este modo, se - identifica la población responsable. Es probable que la -- inhibición de la respuesta a mitógenos esté dada por algún producto de la célula supresora que se encuentre en el sue-- ro del animal infectado. Para probar esta posibilidad, las



células de animales normales se cultivan en presencia de suero de animales infectados, y se estimulan con mitógenos apropiados. Si existe un factor supresor en el suero, la respuesta de las células de los animales normales se encontrará disminuida.

También se sugirió en la discusión de los resultados la posibilidad de que la bacteria o alguno de sus productos fueran los responsables de este estado de inhibición. En este caso, se cultivan células de animales normales en presencia de bacterias o el sobrenadante de un cultivo de las mismas. Otra posibilidad es cultivar células de animales normales en presencia de bacterias muertas. Esto último es con el objeto de descartar definitivamente la posibilidad de que algún producto del metabolismo bacteriano sea el causante del efecto supresor. Los cultivos así preparados se someten a la técnica de estimulación linfocitaria con los mitógenos adecuados.

En la discusión de los resultados también se habló de la posibilidad de una expansión policlonal. Para demostrar esto se pueden seguir diversas alternativas. Una de ellas es preparar cultivos de células de animales normales con o --

sin bacterias. Si la bacteria tiene un efecto mitogénico - sobre los linfocitos de animales normales, estos presentarán una incorporación de  $^3\text{HTdr}$  superior a la de los cultivos testigo.

Otra alternativa a seguir es hacer un ensayo de células -- formadoras de anticuerpo en animales infectados con N. brasiliensis. Si existe una expansión policlonal el número de placas hemolíticas se verá disminuido en cierto período de la infección con respecto a las obtenidas de los animales testigo.

Como se mencionó en la introducción, N. brasiliensis tiene la característica de crecer en forma de pequeños grumos al cultivarse en un medio líquido. Esto dificulta en cierto grado el procedimiento para infectar a los animales, ya -- que debe emplearse un inóculo homogéneo tanto en concentración como en consistencia. Por este motivo, el inóculo se prepara homogenizando en mortero la película de crecimiento de la bacteria. Este método ofrece diversas dificultades. Entre ellas, hay un mayor riesgo de contaminación, el proceso es largo y tedioso, además la excesiva manipulación de la bacteria probablemente ocasione una disminución

de la viabilidad de ésta. Para resolver este problema, se pueden seguir las siguientes alternativas: Modificar el me dio de cultivo de tal manera que la bacteria se desarrolle homogéneamente, es decir, que se evite la formación de - - agregados. Otra posibilidad es separar por centrifugación los grumos de crecimiento y utilizar el sobrenadante. Este se centrifugaría a una velocidad apropiada para recuperar las bacterias y emplearlas para la inoculación. Sin embargo, es probable que por este método no se alcance la concentración adecuada de bacterias.

Otra manera de mejorar el método de preparación del inóculo, sería empleando un homogenizador automático. De esta forma, se ahorraría tiempo, además de facilitar el proceso aunque aún persistiría el riesgo de contaminación y la posibilidad de disminuir en mayor grado la viabilidad del -- inóculo.

de la viabilidad de ésta. Para resolver este problema, se pueden seguir las siguientes alternativas: Modificar el me dio de cultivo de tal manera que la bacteria se desarrolle homogéneamente, es decir, que se evite la formación de - - agregados. Otra posibilidad es separar por centrifugación los grumos de crecimiento y utilizar el sobrenadante. Este se centrifugaría a una velocidad apropiada para recuperar las bacterias y emplearlas para la inoculación. Sin embargo, es probable que por este método no se alcance la concentración adecuada de bacterias.

Otra manera de mejorar el método de preparación del inóculo, sería empleando un homogenizador automático. De esta forma, se ahorraría tiempo, además de facilitar el proceso aunque aún persistiría el riesgo de contaminación y la posibilidad de disminuir en mayor grado la viabilidad del -- inóculo.

A N E X O  
ESTIMULACION LINFOCITARIA

**INTRODUCCION:**

La actividad o estimulación linfocitaria (EL) es una técnica que mide la capacidad funcional de los linfocitos para proliferar como respuesta a la inducción por antígenos o mitógenos (72 - 75).

En 1960 Nowel (76) descubrió que la fitohemaglutinina PHA transformaba los linfocitos en linfoblastos proliferantes. Desde entonces la EL inducida por mitógenos o antígenos ha sido una técnica ampliamente usada en diversos campos de la Biología.

La EL es un medio práctico para evaluar deficiencias inmunológicas adquiridas o de origen genético (77). También puede ser empleada para vigilar los efectos de diversas quimioterapias (78 - 82). Peavy y cols. (78) descubrieron por medio de esta técnica, que un fármaco empleado para el tratamiento de infecciones virales en humanos, (ribavirin) suprime hasta en un 90% la respuesta linfoproliferativa normal. Asimismo, Hersch y Oppenheim, (79) demostraron una disminución de la respuesta a mitógenos en pacientes con enfermedades -

oculares y malignas que habfan recibido quimioterapia. Otros estudios realizados por Oppenheim (80, 81) y Aisenberg (82) indican que en diversos síndromes, los pacientes muestran una EL disminuida.

#### METODOLOGIA:

Para obtener resultados óptimos en el uso de la EL es necesario trabajar en condiciones estrictas de esterilidad; además es de suma importancia establecer las condiciones de trabajo como la cinética del cultivo, la densidad celular, el medio de cultivo, los estimulantes a emplear y las concentraciones de los mismos, y el tipo de material para el cultivo. También es importante cultivar células de sujetos normales al mismo tiempo que de sujetos experimentales como control.

Los linfocitos humanos son purificados a partir de sangre periférica heparinizada, por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque. En el caso de que los linfocitos provengan de órganos linfoides, las suspensiones celulares se preparan disgregando suavemente a los mismos, y separando los desechos celulares (83).

La suspensión de células se ajusta a una concentración aproximada a  $1 \times 10^6$  linfocitos. Si la concentración de células es muy elevada o muy baja, la respuesta al estimulante no es la óptima. Los cultivos son hechos por triplicado o cuadruplicado en tubos de ensayo (macroensayo) o placas para microcultivo (microensayo). Los medios de cultivo usualmente empleados son el medio mínimo esencial Eagle y el medio RPMI 1640 suplementado con 5 a 20% de suero, ya sea homólogo o heterólogo. Los estimulantes (mitógenos o antígenos) se añaden a la concentración previamente establecida. Los cultivos así preparados se incuban por lo general durante 2 a 4 días. Cuando se emplean mitógenos poco potentes o antígenos se requieren de 5 a 7 días de incubación. Los linfocitos se incuban en atmósfera húmeda suplementada con 5% de  $\text{CO}_2$  para mantener el pH apropiado a los cultivos.

La velocidad de síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA) fue calculada originalmente por evaluación morfológica del porcentaje de linfoblastos presentes en el cultivo. Sin embargo este método ha dejado de emplearse debido a la variabilidad de los resultados (74).

La gran utilidad y amplio uso de la estimulación linfocita-

ria ha sido posible por el desarrollo de ensayos cuantitativos de incorporación de radioisótopos. Los isótopos más empleados son la timidina marcada con tritio o carbono 14 para determinar la síntesis de DNA. Algunos investigadores utilizan  $^{125}\text{I}$ -5-yodo desoxiuridina. También la transformación se puede evaluar determinando la incorporación de aminoácidos radioactivos durante la síntesis de proteínas. Sin embargo este último método es menos sensible. Los cultivos son marcados de 4 a 18 horas antes de ser cosechados. Anteriormente las células eran cosechadas por métodos laboriosos. Actualmente el empleo de máquinas cosechadoras automáticas facilita el procesamiento de los cultivos, además de obtenerse resultados más reproducibles. Estas máquinas aspiran y lavan las células sobre filtros de fibra de vidrio. Estos filtros tienen la propiedad de retener macromoléculas, entre ellas el DNA, y permitir el paso de moléculas pequeñas. Los filtros se secan a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, se colocan en viales, se les adiciona el líquido de centelleo y finalmente se cuentan en un contador de centelleo, para determinar la radioactividad incorporada a el DNA, expresada en cuentas por minuto (cpm).

Los datos se expresan de la siguiente manera: se dividen --



las cpm del cultivo estimulado entre las cpm del cultivo -- control, lo cual proporciona un cociente comunmente referido como el indice de estimulación. Otro método frecuentemente empleado consiste en obtener el promedio de las cpm de cada uno de los grupos a analizar. Posteriormente los datos se someten a un análisis estadístico adecuado para determinar si existe alguna diferencia significativa entre -- los grupos estudiados. Comunmente se emplean las pruebas estadísticas t de Student o U de Mann Withney.

#### ESTIMULANTES ESPECIFICOS E INESPECIFICOS PARA LINFOCITOS:

Existe una serie de estimulantes que se emplean para evaluar la reactividad linfocitaria. Los estimulantes inespecíficos son los mitógenos ya que ellos estimulan de 60 a 90% de los linfocitos de sujetos normales, ya sea adultos o recién nacidos. Los antígenos solo estimulan los linfocitos - específicos de sujetos previamente sensibilizados. Por esta razón el porcentaje de linfocitos estimulados es muy bajo.

Se piensa que los estimulantes se unen a receptores presentes en la superficie de los linfocitos. Subsecuentemente, - ellos activan a los linfocitos para así provocar su transformación. Los estimulantes se caracterizan por el tipo de

población que activan. Estos pueden estimular solo a los --  
linfocitos T ó a los linfocitos B.

Los mitógenos comunmente empleados son fitohemaglutinina --  
(PHA, 5 ug/ml) y Concanavalina A (ConA, 10 ug/ml) ambos son  
mitógenos para linfocitos T, y el mitógeno fitolaca america  
na (PHA) que estimula tanto linfocitos T como B. Desgracia-  
damente los mitógenos más conocidos para linfocitos B muri-  
nos, tales como endotoxinas y anticuerpos antiimmunoglobuli  
nas, no son estimulantes potentes para linfocitos B humanos.

Los antígenos comunmente empleados son el derivado protefni  
co purificado (PPD), estreptolisina O, un extracto de Candi  
da albicans y el toxoide tetánico. En general los sujetos -  
normales muestran concordancia entre los resultados de las  
pruebas cutáneas de hipersensibilidad tardía y la activa- -  
ción linfocitaria inducida por antígenos o mitógenos para -  
linfocitos T (80). Una vez que ha sido activado el linfoci-  
to T por el estimulante apropiado, este sintetiza y segrega  
una serie de linfocinas, entre ellas el factor mitogénico,  
que induce la transformación de otros linfocitos aún no es-  
timulados.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Rippon J. W. Medical Micology. 1a. ed. Ed. por W. B. Saunders Co. Philadelphia U.S.A., pags. 48-61, 1974.
- 2.- Macotela-Ruiz E., Mariat F. Sur la production de mycetomas experimentaux par Nocardia brasiliensis et Nocardia asteroides. Bull. Soc. Path. exot. 54:46-54, - 1963.
- 3.- Rico M.G.R. y Ochoa R.R. Papel de la respuesta inmune celular y humoral en infecciones producidas por Nocardia brasiliensis. Tesis de licenciatura Facultad de - ciencias U.N.A.M., 1977.
- 4.- Braude A. I. Otras micosis profundas. En: Medicina Interna de Harrison, Tomo I 5a. ed. Ed. por Thorn G. W., Adams R.D., Braunwald E., Isselbacher K.J. y Petersdorf R.G. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F. - - pags. 1118-1121, 1979.
- 5.- Mariat P. Sur la distribution Geographique et la repartition des agents de mycetomes. Bull. Soc. Path. -

exot. 56: 35-45, 1963.

- 6.- González-Ochoa A. y Sandoval M. Aislamiento de Nocardia brasiliensis y asteroides a partir de suelos. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 20:147-151, 1960.
- 7.- Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H. S. y Wood W.B. Tratado de Microbiología. 1a ed. Ed. Salvat Editores, Barcelona España. Pags. 886-897, 1977.
- 8.- Gordon, M.A. Aerobic pathogenic Actinomycetaceae. Manual of Clinical Microbiology. 2a. ed. Ed. por Lenette E. H. Spaulding E. H. y Truant J. P. American Society for Microbiology, Washington D. D. pags. 175- 188, 1974.
- 9.- Rippon J.W. Micología Médica: Hongos y actinomicetos patógenos. En: Tratado de Microbiología, 20a. ed. Ed. por Burrows W. Editorial Interamericana México, D.F., pags. 597-611, 1974.
- 10.- Tood, Sanford, Davison. Clinical Diagnosis management by laboratory methods. 16 ed. Ed. por Bernard, H.W.B. Saunders co. Publishing Philadelphia. pags. 1672-1721,

1979.

- 11.- González-Ochoa A., Shibayama H., Félix D. y Anaya M. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Reprinted from Experta Médica international Congress, Series No. 55, pags. 542-551, 1962.
- 12.- Currie G.A. El cáncer y la respuesta inmunológica. 1a ed. Ed. por El Manual Moderno. págs. 31-65, 1975.
- 13.- Cooper M. D. y Lawton A. R. The development of the immune system, Sci. Am. 230:58-71, 1974.
- 14.- Gordon B.L. Lo esencial de la Immunología. 2a. ed. Ed. El Manual Moderno. págs. 6-15, 1975.
- 15.- Cohen S. y McCluskey R.T. Delayed hypersensitivity. - En: Principles of Immunology. Ed. por Rose N.R., Milgrom F. y van Oss C. J. Macmillan publishing Co. págs. 189-204, 1973.
- 16.- Whick G., Kite S. H. y Witebsky E. spontaneous tyroditis in the obese strain of chickens. J. Immunol. --

104:54-62, 1970.

- 17.- Horowitz S., Borcharding W., Morthy A. V. y Chesney R. Induction of suppressor T-cells in Systemic Lupus Erythematosus by Thymosin and cultured thymic epithelium. Science, 197:999-1001, 1977.
- 18.- Mitchel G.F. y Miller J.F.A.P. Cell-to-cell interaction in the immune response II The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128:821-852, 1968.
- 19.- Miller J.F.A.P. y Mitchel G.F. Cell-to-cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128:801-820, 1968.
- 20.- Marchalonis J.J. Cooperación celular en las respuestas inmunitarias. En: Manual de Inmunología Clínica. 1a ed. Ed. por: Fudenberg H.H., Stites D.P., Caldwell J.L. y Wells V.J. Editorial El Manual Moderno, págs.

92-102, 1968.

- 21.- Warner N.L. Membrane Immunoglobulins and antigen receptors on B and T lymphocytes, *Adv. Immunol.* 19:67-200, 1974.
- 22.- Douglas S.D. Células que intervienen en las respuestas inmunitarias. En: *Manual de Inmunología Clínica*. 1a ed. Ed. por Fudenberg H. H., Stites D.P., Caldwell J.L. y Wells V.J. Editorial El Manual Moderno, págs. 74-91, 1968.
- 23.- Basten A., Miller J.F.A.P., Sprent J. y Cheers C. - - Cell-to-cell interaction in the immune response. X. - T-cell-dependent suppression in tolerant mice. J. - - *Exp. Med.* 140:190-217, 1974.
- 24.- Ramos C. Células supresoras. Revisión Predoctoral. E. N.C.B., I.P.N., 1979.
- 25.- Kite J.H. Lysis and Cytotoxicity. En: *Principles of Immunology*. Ed. por Rose N.R., Milgrom F y van Oss C. J. Macmillan Publishing Co. Págs. 56-92, 1973.

- 26.- Rosenau W. Target cell destruction. Fed. Proc. 27: -- 35-38, 1968.
- 27.- Dumonde D.C., Wolstencroft R.A., Panayi G.S., Matthew M. Morley J. y Howson W.T. "Lymphokines" Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. Nature. 224:38-42, 1969.
- 28.- Bloom, B. R., Bennet B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type hypersensitivity. -- Science. 153:80-82, 1966.
- 29.- David J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid -- cell-antigen interaction. Pathol. 56:73-77, 1968.
- 30.- Granger G.A., Shacks S.J., William T.N. y Kolb W.P. - Lymphocyte in vitro cytotoxicity. Specific release of - lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. Nature 221:1155-1157, 1969.
- 31.- George M. y Vaughan S. H. In vitro cell migration hypersensitivity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111:514- -



521, 1962.

- 32.- Remold H.G. y Mednis A.D. Two migration inhibitory -- factors differ in density and suceptibility to neuraminidase and proteinases. *J. Immunol.* 122:1920-1925, 1979.
- 33.- Rutenberg W.D., Khalide U.A., Rosen F.S. y Merler E. Purification and biochemical characterization of human lymphocyte mitogenic factor (LMF). *J. Immunol.* -- 122:723-727, 1979.
- 34.- Valentine F.T., Lawrence Y.S. Lymphocyte stimulation: Transfer of cellular bypersensitivity to antigen in vitro. *Science.* 165:1014-1016, 1969.
- 35.- Wahl S.M., Wilton J.M., Rosenstreich D.L. y Oppenheim J.J. The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lymphocytes. *J. Immunol.* 114:1296-1301, 1975.
- 36.- Ward P.H. y David J.R. A leucotactic factor produced by sensitized lymphocytes. *Fed. Proc.* 28:630-635, - -

1969.

- 37.- Pernis B., Fornis L. y Amante L. Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. *J. Exp. Med.* -- 132:1001-1017, 1970.
- 38.- Unanue E. Cellular events following binding of antigen to lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 77:1-17, 1974.
- 39.- Drutz D.J. Inmunidad e Infección. En: Manual de Inmunología Clínica. 1a ed. Ed. por: Fudenberg H. H., Stites D.P., Caldwell J.L. y Wells V.J. Editorial El Manual Moderno, págs. 92-102, 1968.
- 40.- van Oss C. J. Phagocytosis. En: Principles of Immunology. Ed. por Rose N.R., Milgrom F y van Oss C. J. -- Macmillan Publishing Co. págs. 93-102, 1973.
- 41.- Ortiz-ortiz L., Contreras M.F. y Bojalil L.F. Delayed hypersensitivity to Nocardia antigens. En: The Biology of the Nocardiae. (Goodfellow M., Brownell G.H. y Serrano J. editores) págs. 418-428, Academic Press -- New York.

- 42.- Bojalil L.F. y Zamora A. Precipitin and skin test in the diagnosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis. Proc. Soc. Exp. Biol. 113:40-43, 1963.
- 43.- Bojalil L.F. y Ortiz-Ortiz L. Propiedades alergicas de algunos componentes somaticos de Nocardia. Rev. -- Lat-Amer. Microbiol. 15:23-28, 1973.
- 44.- Bojalil L.F. y Magnusson M. Specificity of skin reactions of human to Nocardia sensitins. Am. Rev. Resp. Dis. 88:409, 1963.
- 45.- González-Ochoa A y Baranda F. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por Nocardia brasiliensis. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 13:189-197, 1953.
- 46.- Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. y Contreras M.F. Delayed hypersensitivity to polysaccharides from Nocardia. J. Immunol. 108:1409-1413, 1972.
- 47.- Ortiz-Ortiz L. y Bojalil L.F. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of Nocardia organisms as a --

means of diagnosis and epidemiological study of Nocardia infections. Clin Exp. Immunol. 12:225-229, 1972.

- 48.- Ortiz-Ortiz L., Contreras M.F. y Bojalil L.F. Cito- - plasmic antigens from Nocardia eliciting a specific delayed hypersensitivity. Infec. Immun. 5:879-882, -- 1972.
- 49.- Ortiz-Ortiz L., Contreras M.F. y Bojalil L.F. The - - assay of delayed hypersensitivity to ribosomal pro- - tein from Nocardia. Sabouraudia 10:147-151, 1972.
- 50.- Bojalil L.F. y Zamora A. Precipitin and skin test in the dignosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis. proc. Soc. Exp. Biol. 113:40-43, 1963.
- 51.- González-Ochoa, A. Micetoma por Nocardia brasiliensis Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 22:15-24, 1962.
- 52.- Melendro E.I., Contreras M.F., Jiménez C., García-May nez A. M. y Ortiz-Ortiz L. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis in mice: Cross-protect ion against Listeria monocytogenes Int. Archs. Aller

gy appl. Immun. 57:74-81, 1978.

- 53.- Jiménez C., Melendro E.I., González-Mendoza A., García A.M., Martínez A. y Ortiz-Ortiz L. Resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice immunized - - with either Nocardia or BCG. Mycopathol. 70:117-122, 1980.
- 54.- Conde Bonfil Ma del C. Regulación de la respuesta in mune en animales infectados con Nocardia brasiliensis. Tesis de Maestría. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C.C.H., U.N.A.M., 1980.
- 55.- Jawardena A.N. y Waksman B. H. Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. Nature. 265:539-541, 1977.
- 56.- Artz R.P. y Bullock W.E. Immunoregulatory responses - in Experimental disseminated histoplasmosis. Depression of T-cells dependent and T-effectors responses by activation of splenic suppressors cells. Infect. Immun. 23:893-902, 1979.
- 57.- Camus D., Dessaint J.P., Fischer E. y Capron A. Non-

specific cellular unresponsiveness in rat schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 9:341-344, 1979.

- 58.- Youmas G.P. y Karlson A.G. Streptomycin sensitivity of tubercle bacilli; studies on recently isolated tubercle bacilli and the development of resistance to streptomycin in vivo. *Am. Rev. Tuberc.* 55:529-535, -- 1974.
- 59.- Lowry O.V.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. y Randal R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- 60.- Boyse E.A., Old L.V. y Chourolinkov I. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Meth. Med. Res.* -- 10.39, 1964.
- 61.- Fisher R.H. Statistical methods for research workers. Oliver y Boyd, Edinburgo, 1934.
- 62.- Mann H.B. y Whitney D.R. A test of whether one of two random variables is statistically larger than the -- others. *Ann. Math. Statist.* 18:50, 1947.

- 63.- Ramos C. Schadtler-Sewon I. y Ortiz-Ortiz L. Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi-infected mice. *J. Immunol.* 122:1243-1247, 1976.
- 64.- Esuruoso G.O. The demonstration in vitro of the mitogenic effects of trypanosoma antigen on the spleen ---- cells of normal athymic and cyclophosphamide-treated mice. *Clin. Exp. Immunol.* 23:314-317, 1976.
- 65.- Ortiz-Ortiz, L. Parks D.E., López J.S. y Weigle W.O. B-lymphocyte activation with an extract of Nocardia - brasilensis. *Infect. Immun.* 25:627-634, 1979.
- 66.- López J.S., Ramos C., Willms K., Sealey M., Ortiz-Ortiz L. B lymphocyte stimulation by parasitic organism. En: Molecules, cells and parasites in Immunology. Academic Press, Ind. 1980.
- 67.- Bullock W.E., Carlson E.M. y Gershon R. K. The evolution of immuno suppressive cell population in experimental mycobacterial infection. *J. Immunol.* 120:1709-1716, 1978.

- 68.- Chensue S.W., Boros D.L. y David C.S. Regulation of - granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. J. Exp. Med. 151:1399-1412, 1980.
- 69.- Del Bosque J.E.: Inmunidad Celular en ratones infectados con Nocardia brasiliensis; actividad blastogénica de células T a mitógenos y cambios funcionales en macrófagos inducidos por linfocinas. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias U.N.A.M., 1978.
- 70.- Dannenberg A.M. The local nature of immunity in Tuberculosis, illustrated histochemically in demal BCG lesions. J. Immunol. 100:931-941, 1968.
- 71.- Dannenberg A.M. Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Specificity, systemic and local nature and associated macrophage enzymes. Bacteriol. Rev. 32:85-102, 1968.
- 72.- Ling N.R. Lymphocyte stimulation. North Holland Publishing Co., 1968.
- 73.- Oppenheim J.J., Dougherty S., Chan S.P. y Baker J. --



Use of lymphocyte transformation to assess clinical disorders. En: Laboratory diagnosis of immunologic disorders. (Vyas G.N., Stites D.P., Brecher G. editores) Págs. 87-109 Grune y Stratton, 1975.

- 74.- Oppenheim J.J. y Schecter B. Lymphocyte transformation. En: Manual of Clinical Immunology. Ed. por Friedman H., American Society for Microbiology Washington D.C., U.S.A. págs. 81-94, 1976.
- 75.- Stites D.P. Métodos de laboratorio para la localización de la función inmunitaria celular. En: Manual de Inmunología Clínica. 1a. ed. Ed. por: Fudenberg H.H. Stites D.P., Cladwell J.L. y Wells V.J. Editorial El Manual Moderno, págs. 349-365, 1968.
- 76.- Nowell P.C. Phytohemagglutinin: an Initiation of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20:462-466, 1960.
- 77.- Lischner H.N., Punnet H.H. y Di George A.M. Lymphocytes in congenital absence of the thymus. Nature 214: 580-582, 1967.

- 78.- Peavy D. L., Koof W.C., Hyman D.S. y Knight V. Inhibition of lymphocyte proliferative responses by rivavirin. *Infect. Immun.* 29:583-398, 1980.
- 79.- Hersh E.M. y Oppenheim J.J. Inhibition of in vitro -- lymphocyte transformation during chemotherapy in man. *Cancer Res.* 27:98-105, 1967.
- 80.- Oppenheim J.J. Relationship of in vitro lymphocytes - transformation to delayed hypersensitivity in guinea pigs. and man. *Fed. Proc.* 27:23-28, 1968.
- 81.- Oppenheim J.J., Whang J. y Frei E. Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemic - - cells. *Blood.* 26:121-132, 1965.
- 82.- Aisenberg A.C. Quantitative stimation of the reactivity of normal and Hodgkins disease lymphocytes with thymidine 2-<sup>14</sup>C. *Nature* 205:1233-1235, 1965.
- 83.- Geha, R.S., and E. Merler Response of human thymus derived lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 4:193-199, 1974.

## TABLAS Y FIGURAS

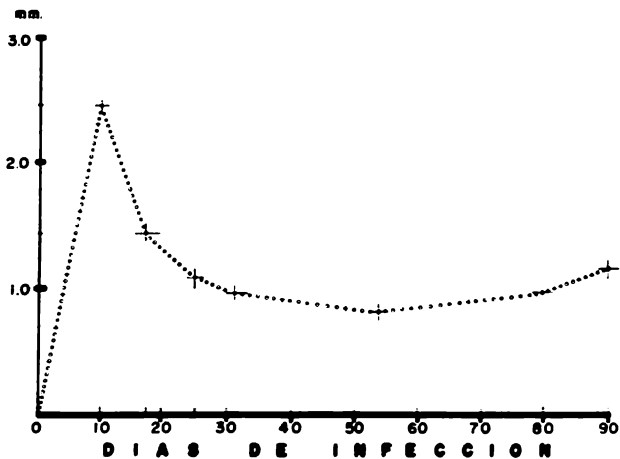
- Figura I      Cinética de la infección.
- Figura II     Prueba cutánea de hipersensibilidad tardía al AgNb.
- Tabla 1       Inhibición de la respuesta a Concanavalina A en animales infectados con  $1.6 \times 10^7$  bacterias viables.
- Tabla 2       Inhibición de la respuesta a Lipopolisacárido en animales infectados con  $1.6 \times 10^7$  bacterias viables.
- Tabla 3       Respuesta a la estimulación con Lipopolisacárido de E. coli en animales infectados con diferentes dosis de N. brasiliensis.
- Tabla 4       Inhibición de la respuesta a Lipopolisacárido de E. coli.
- Tabla 5 y 6   Efecto inhibitorio de células de bazo de anima-

les infectados con N. brasiliensis sobre la -  
respuesta a mitógenos por células normales.

**Figura 1. CINETICA DE LA INFECCION. La infección fué evaluada por medio de la medición periódica del grosor del cojinete plantar infectado.**

AUMENTO DEL GRUPO DEL COJINETE PLANTAR

### CINETICA DE LA INFECCION



CINETICA PROMEDIO DE TRES INFECCIONES

FIGURA 1

Figura 2. PRUEBA CUTANEA DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA AL Ag Nb. La respuesta celular fué evaluada in vivo por medio de intradermoreacción.

# PRUEBA CUTANEA DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA AL AgNb

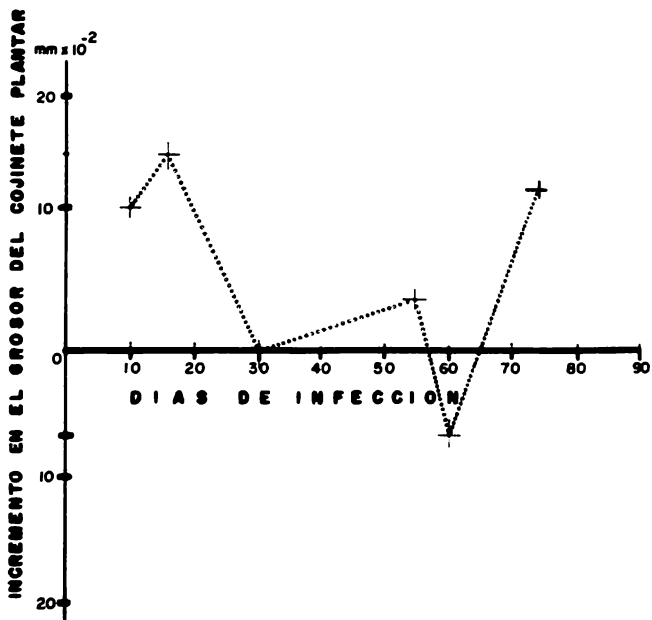


FIGURA II



**TABLA 1**  
**INHIBICION DE LA RESPUESTA A CONCAVALINA A EN ANIMALES**  
**INFECTADOS CON  $1.6 \times 10^7$  BACTERIAS VIABLES.**

IAS DE NFECCION	a	MEDIO cpm	Con A		P
			b	cpm $\pm$ e o	
4	N	1690	105327	2917	
	I	6840	179955	4426	ns
24	N	8810	202905	5535	
	I	2427	18564	574	<0.001
31	N	3180	102655	12066	
	I	1370	24050	1705	<0.05

Media de la respuesta de 3 animales controles.

Media de la respuesta de 5 animales infectados.

Respuesta normal de las células cultivadas en ausencia de mitógenos.

Respuesta de las células a Concanavalina A.

pm cuentas por minuto (media de cada grupo).

pm  $\pm$  e o Cuentas por minuto (media de cada grupo) y error estándar.

**TABLA 2**  
**INHIBICION DE LA RESPUESTA A LIPOPOLISACARIDO EN ANIMALES**  
**INFECTADOS CON  $1.6 \times 10^7$  BACTERIAS VIABLES.**

DIAS DE INFECCION	a	MEDIO cpm	b	LPS		p
				cpm	$\pm$ e e	
4	N	1690		42400	4700	
	I	6840		21316	8394	ns
24	N	8810		44260	2751	
	I	2427		9222	350	<0.01
31	N	3180		19015	635	
	I	1370		2972	525	<0.001
54	N	4397		43683	2115	
	I	3202		17852	1079	<0.001

N Media de la respuesta de 3 animales controles.

I Media de la respuesta de 5 animales infectados.

a Respuesta normal de las células cultivadas en ausencia de mitógenos.

b Respuesta de las células a Lipopolisacárido de E. coli.

cpm Cuentas por minuto (media de cada grupo).

cpm  $\pm$  e e Cuentas por minuto (media de cada grupo) y error standar.

**TABLA 3**  
**RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON LIPOPOLISACARIDO DE E. COLI**  
**EN ANIMALES INFECTADOS CON DIFERENTES DOSIS DE N. BRASILIENSIS**

DOSIS	DÍAS DE INFECCION	% RESPUESTA	% INHIBICION	P
$7 \times 10^4$	11	65.21	34.79	<0.02
	19	75.05	24.94	
	47	93.02	6.97	
$7 \times 10^5$	11	31.33	68.67	<0.001
	19	106.02		
	40	127.90		
$1.6 \times 10^6$	4	39.86	60.13	<0.005
	31	63.30	36.60	
	54	28.96	71.03	<0.001
	59	80.47	19.50	
$7 \times 10^6$	28	44.00	56.00	<0.005
	35	88.00	12.00	
$1.6 \times 10^7$	4	50.20	49.7	<0.01
	24	20.83	79.16	
	31	15.62	84.30	<0.001
	54	40.86	59.10	

El porcentaje de respuesta es el resultado de la comparación de la media de 5 animales infectados con la media de 3 animales normales.

La respuesta de los animales normales es considerada como el 100% de respuesta a mitógenos.

TABLA 4  
INHIBICION DE LA RESPUESTA A LIPOPOLISACARIDO DE E. COLI

DIAS DE INFECCION	% RESPUESTA	% INHIBICION
26	29.31	70.67
33	21.81	78.15
53	26.15	73.83

Promedio de tres experimentos efectuados con una dosis media de  $2.6 \times 10^7$  bacterias viables.

TABLA 5 y 6

EFFECTO INHIBIDOR DE CELULAS DE BAZO DE ANIMALES INFECTADOS  
CON NOCARDIA BRASILIENSIS SOBRE LA RESPUESTA A MITOGENOS -  
POR CELULAS NORMALES.

COMPOSICION DEL CULTIVO CELULAR (cels/ml)		INCORPORACION DE TIMIDINA (PROMEDIO cpm)	PORCENTAJE DE INHIBICION
NORMAL	INFECTADO	LPS	%
2.5 x 10 <sup>6</sup>		70 160	
	2.5 x 10 <sup>6</sup>	32 920	53
5 x 10 <sup>6</sup>		94 095	
	5 x 10 <sup>6</sup>	37 537	60
2.5 x 10 <sup>6</sup>	2.5 x 10 <sup>6</sup>	51 410	50

Dosis infectante: 7.5 x 10<sup>6</sup> bacterias/ratón.

Días de infección: 11

Composición del cultivo: células provenientes de 3 animales normales y 5 animales infectados.

TABLE 5 y 6  
(CONTINUACION)

EFFECTO INHIBIDOR DE CELULAS DE BAZO DE ANIMALES INFECTADOS  
CON NOCARDIA BRASILIENSIS SOBRE LA RESPUESTA A MITOGENOS -  
POR CELULAS NORMALES.

COMPOSICION DEL CULTIVO CELULAR (cels/ml)	INCORPORACION DE TIMIDINA (PROMEDIO cpm)		PORCENTAJE DE INHIBICION	
	NORMAL	INFECTADO		Con A
2.5 x 10 <sup>6</sup>			88 050	
		1.5 x 10 <sup>6</sup>	26 677	70
5 x 10 <sup>6</sup>			132 685	
		5 x 10 <sup>6</sup>	61 162	54
2.5 x 10 <sup>6</sup>		2.5 x 10 <sup>6</sup>	64 268	49

Dosis infectante: 7 x 10<sup>5</sup> bacterias/ratón.

Días de infección: 40

Composición del cultivo celular: células provenientes de 3  
animales normales y 5 ani  
males infectados.