

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA INFECCION
EXPERIMENTAL POR Nocardia brasiliensis

Tesis presentada por Q. F. B.
María de la Riva Pinal
para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas.
(Análisis Clínicos).

MEXICO, D. F.

1977



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.



QUIMICA
D. E. P. G.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la M. en C. B. Magdalena Fresan su dirección y ayuda para la realización de este trabajo, así como las valiosas indicaciones del Dr. Librado Ortiz Ortiz.

I N D I C E

Lista de tablas y figuras ---	a
Introducción -----	6
Material y Métodos -----	30
Resultados -----	41
Discusión -----	43
Bibliografía -----	47

Lista de tablas y figuras.

Tablas

- I Determinación de anticuerpos precipitantes: método de la doble difusión en gel (Ouchterlony), en el suero de animales normales e infectados con Nocardia brasiliensis a diferentes intervalos después de la infección, con este microorganismo.
- II Determinación de aglutininas anti-Nocardia brasiliensis en el suero de animales normales e infectados con Nocardia brasiliensis a diferentes intervalos después de la infección, con este microorganismo.
Hemaglutinación pasiva.

Figura

- I Cinética de la respuesta inmune mediada por células determinada por el índice de resistencia a L. monocytogenes en animales infectados con N. brasiliensis a diferentes intervalos después de la infección.
- II Cinética de la respuesta inmune humoral contra Nocardia brasiliensis en suero contra -

animales infectados con ese microorganismo a intervalos después de la infección.

III Determinación de anticuerpos anti-Nocardia brasiliensis el método de la doble difusión en agar (Ouchterlony) usando un antígeno con una concentración de **830** mg de proteína por ml.

Introducción

Las especies Nocardia, son habitantes frecuentes del suelo; siendo dos de ellas principalmente las que producen enfermedades en el hombre y animales. Entre sus características más relevantes destaca la de ser parcialmente ácido alcohol resistentes, diferenciándose del género Mycobacterium porque éste último no presenta micelio o es muy rudimentario mientras que Nocardia presenta filamentos muy bien desarrollados.

El nombre de género Nocardia, fue propuesto en 1889 por Trevisan para denominar a los actinomicetos aerobios obtenidos a partir de individuos o animales con nocardiosis, en honor a Nocard, -- quien aisló el microorganismo causante de farcinosis, agente similar al obtenido en enfermos de pseudotuberculosis (2). En vista de que estos microorganismos poseen características semejantes a las de las bacterias y a las de los hongos han sido colocados dentro del orden Actinomicetales(3)

Entre las especies capaces de producir enfermedad en el hombre se encuentran: Nocardia asteroides y Nocardia brasiliensis. Nocardia asteroides produce la nocardiosis pulmonar que es adquirida por inhalación del germen el cual se introduce a los pulmones produciendo un cuadro clínico parecido al de la tuberculosis. Nocardia brasiliensis es el agente causal del micetoma, una micosis

profunda cuyo diagnóstico es relativamente simple en donde el cuadro clínico incluye aparición de tumores, fístulas y granos que al observarse al microscopio revelan formas ácido-alcohol resistentes. La penetración del microorganismo al huésped se efectúa a través de heridas o excoriaciones en la piel (1).

Desde el punto de vista histológico, el micetoma actinomicótico es un granuloma inflamatorio crónico; este granuloma contiene granos que se les ha llamado actinomicóticos constituidos por filamentos miceliales.

Se ha observado que un gran número de personas infectadas no llegan a presentar una enfermedad clínicamente aparente y dicha infección únicamente podría ser puesta de manifiesto por la demostración de hipersensibilidad retardada a antígenos de Nocardia, que como ya se sabe es una de las manifestaciones de la inmunidad mediante células (4). Sin embargo aún no se sabe el papel que desempeñan los dos tipos de respuesta inmune -- en la resistencia a la enfermedad o en la patogenia de la misma, puesto que cuando se tiene el micetoma, rara vez se presenta la remisión y aunque se puede encontrar títulos altos de anticuerpos y además demostrar su existencia de inmunidad celular, por lo general el proceso infeccioso concluye con la amputación del miembro afectado (5).

Antecedentes.

La presencia de hipersensibilidad de tipo -- tardío a antígenos de Nocardia fue demostrada -- desde principios de este siglo. En 1928 Arêa --- Leão obtuvo una prueba cutánea positiva de un pa- ciente con micetoma usando como antígeno un fil-- trado de un cultivo clasificado como Actinomyces bovis, (6). Sin embargo, Almeida y Lacaz en 1941, (7) obtuvieron intradermorreacciones negativas en pacientes con micetoma producido por Nocardia bra siliensis, usando como antígeno, filtrados de cul- tivos de dicho actinomiceto. En 1948 Glover con un extracto libre de lípidos obtenido de un culti- vo de N. asteroides, obtuvo un resultado positivo cuando lo probó en un paciente con micetoma(8).

Se observó en muchos casos una reacción cru- zada en pacientes tuberculosos (9), y además, per- sonas infectadas por Nocardia presentaban una ma- yor susceptibilidad a un gran número de infeccio- nes en comparación con individuos sanos; esta úl- tima afirmación ha hecho pensar que este microor- ganismo afecta el sistema inmunológico.

Experimentalmente estudiando la respuesta hu- moral en ratones, se ha visto que la infección en estos animales sigue un curso semejante al que si- gue en el hombre.

Respuesta Inmune.

El origen del concepto de inmunidad es muy -

remoto y se aplicó inicialmente a los individuos. que se hallaban exentos de alguna obligación, (un servicio militar o alguna enfermedad). Tiempo -- después se usó para referirse al estado de resistencia que presenta un organismo a ciertas enfermedades.

Actualmente se considera la respuesta inmune como mecanismo de discriminación entre componentes propios y extraños del huésped en donde al re conocimiento de componentes propios se traducirá a un estado de tolerancia mientras que frente a - los componentes extraños se producirá una respues ta humoral o celular, que puede conducir a:

a) La neutralización y eliminación de los -- mismos con o sin daño para los tejidos del huésped.

b) Homeostasis; eliminación de sustancias - gastadas o células inservibles. -

c) Sobrevigilancia; control del desarrollo - de células anormales mutantes eliminando células genéticamente diferentes a las del -- huésped.

El sistema inmune está formado por varios ór ganos y tipos celulares; bazo, hígado, médula ósea, nódulos y ganglios linfáticos en los mamíferos. En las aves existe además un órgano linfoide que es la Bolsa de Fabricio responsable de la respuesta humoral.

La respuesta inmune ya sea humoral o celular

se caracteriza:

- 1) Por su especificidad.
- 2) Por ser transferible, por medio de sueros hiperinmunes o células sensibilizadas. -
- 3) Por poseer memoria.

Al introducir un inmunógeno a un organismo - por primera vez se inician una serie de procesos metabólicos celulares los cuales se relacionan - con la captación, procesamiento y modificación -- del antígeno o agente extraño, con la transferencia de la información entre células encargadas de dar la respuesta así como la proliferación y diferenciación de las células efectoras, así se induce en el organismo una respuesta primaria que dependiendo de la naturaleza del antígeno será me--diado por anticuerpos, células sensibilizadas o ambos.

Los anticuerpos no son formados de inmediato. Se observa un período de latencia en el cual el - inmunógeno es identificado como extraño y donde - es reconocido por las células que participan en la respuesta inmune. Posteriormente se inicia - la aparición de los anticuerpos.

En el hombre los anticuerpos corresponden a cinco variedades principales de proteínas (inmunglobinas) que se pueden distinguir una de otras por su tamaño, su función o su movilidad electroforética. Se designan como Ig G, Ig A, Ig M, - - Ig D, Ig E.

Las Ig G son las más abundantes de todas las inmunoglobinas, su concentración es alta, tanto fuera como dentro de los vasos; su vida media es relativamente larga (veintitrés días), pueden atravesar placenta y fijar complemento, se atribuyen a éstas la mayor parte de las funciones inmunológicas contra agentes infecciosos que presentan fase hemática incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos.

La inmunoglobulina A ocupa el segundo lugar desde el punto de vista cuantitativo; su función principal corresponde al sistema secretor externo y es producida por el tejido linfoide que reviste tubo digestivo, y las vías respiratorias y genitourinarias. En estas secreciones la inmunoglobulina A está combinada con una proteína llamada componente secretor que se encarga de proteger a la molécula contra enzimas proteolíticas, que pueden estar en esa zona. Estas inmunoglobulinas no fijan complemento.

La inmunoglobulina de tipo M es la de mayor tamaño, por lo que casi no pueden salir del espacio intravascular; se caracteriza por ser muy activa respecto a la aglutinación de partículas antigénicas como bacterias y glóbulos rojos. Fija muy eficazmente el complemento (5).

A la inmunoglobulina D no se le asigna aún - un papel biológico especial, pero se ha visto que aumenta su concentración en el suero sanguíneo en

mujeres embarazadas, principalmente en los últimos meses (10)

Respecto a la inmunoglobulina de Tipo E, sólo se encuentran huellas en el suero, son anticuerpos de tipo reagínico, pueden fijarse a la piel humana (anticuerpos homocitrópicos) iniciando reacciones alérgicas. Como la inmunoglobulina A y la E son -- producidas principalmente por mucosa de vías respi ratorias y tubo digestivo, forman parte del siste ma secretor externo de anticuerpos. En individuos con trastornos inmunológicos que presentan una - sensibilidad poco común a las infecciones se ha ob servado una deficiencia simultánea de estas dos in munoglobulinas.

Estructura de las inmunoglobulinas

La clasificación de estas inmunoglobulinas es tá basada en particularidades antigénicas y estruc turales. Las moléculas de inmunoglobulinas G están formadas por 2 pares de cadenas polipeptídicas uni das entre sí por enlaces disulfuro; dos de esas ca denas son pequeñas y tienen un peso molecular de 22,000 y se llaman cadenas ligeras, las otras dos presentan un peso molecular de 55,000 y constitu yen las cadenas pesadas. Cada molécula de immuno globulina posee dos cadenas pesadas idénticas y - dos cadenas ligeras idénticas también (II).

La cadena pesada es responsable de las dife rencias antigénicas que se observan de una clase a otra, así como también residen en ellas las di ferentes actividades biológicas que presentan las

distintas clases. Hay dos tipos diferentes de cadenas ligeras denominadas kappa y, lambda. En cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas, -- pueden encontrarse ambos tipos de cadenas ligeras -- teniendo por lo tanto diez posibles combinaciones de cadenas ligeras y pesadas.

Esta estructura básica de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso. Las inmunoglobulinas M. son pentámeros, y cada uno de los cinco elementos que forman el pentámero está -- unido a los demás por enlaces disulfuro.

La inmunoglobulina A y en ocasiones la G forman polímeros en el suero por efecto de enlaces -- covalentes en donde dos monómeros de globulina A se encuentran unidos por el componente secretor -- por enlaces covalentes.

Las inmunoglobulinas que aparecen más temprano, tanto en la evolución filogenética como en la escala ontogenética y en la respuesta humoral son de tipo Ig M (19 S); posteriormente se detectan anticuerpos de tipo Ig G (7 S).

Los anticuerpos formados por células plasmáticas, las cuales se originan de los llamados linfocitos B o derivados de médula ósea. En la respuesta inmune primaria los linfocitos T (derivados del timo) y los linfocitos B, son capaces de reconocer al antígeno y ocasionando como resultado final, la diferenciación de estos últimos, dando origen a células formadoras de anticuerpos; parte de dichas --

células persiste en el organismo como células de memoria. Así en el segundo contacto con ese antígeno, estas células responden más rápidamente y por lo tanto la fase de latencia disminuye alcanzándose los niveles máximos de anticuerpos en menos tiempo; además el título de los mismos aumenta en comparación con la respuesta primaria, - (respuesta secundaria o anamnésica (5)).

Pero si el organismo llega a tener un segundo contacto con ese antígeno, el título de anticuerpos disminuye en tal forma que no es posible detectar la presencia de los mismos, sin embargo las células de memoria pueden sobrevivir por muchos años.

La respuesta puede ser de dos clases: Una mediada por factores séricos (inmunoglobulinas) y 6 la otra mediada por células.

Para identificar los órganos y estirpes celulares involucrados en la respuesta inmune, fueron necesarios un sinnúmero de observaciones y experimentos.

En 1951 se encontró un paciente que sufría agamaglobulinemia el cual tenía cuadros de infecciones recurrentes; al morir se encontró que tenía un tinoma, por lo que empezaron a realizar experimentos con diferentes animales de laboratorio los cuales fueron tinectomizados sin encontrar relación alguna con la respuesta inmune (12).

Glick y colaboradores en 1956 (13) quitaron

la bolsa de Fabricio a pollos recién nacidos, las inyectaron lisados de Salmonella typhi y observaron que esas aves bursectomizadas no presentaban capacidad para la formación de anticuerpos. Otros investigadores observaron que la bursectomía no afectaba las reacciones de rechazo y que los animales así tratados no desarrollaban tumores y sí respondían a PPD (Derivado Proteínico purificado de Mycobacterium tuberculosis).

Warner en 1962(14) Mueller y colaboradores - en 1960 (15), confirmaron estos resultados en estudios de inhibición hormonal del desarrollo de la bolsa de Fabricio.

Al ver que la bursectomía hecha en el período neonatal, tenía tal efecto, se pensó en practicar la timectomía en esta fase del desarrollo y observar resultados.

Aspinall y colaboradores en 1963 (16), observaron que el rechazo de injertos en los pollos -- era retardado cuando estos eran timectomizados en etapa neonatal.

En 1966 Cooper y colaboradores hicieron experimentos con animales de laboratorio a los cuales timectomizaron en estado neonatal y encontraron - que en ellos el título de anticuerpos era bajo, - que había una frecuencia elevada de tumores y que no rechazaban injertos ni respondían a PPD, además demostraron la influencia de la Bolsa de Fabricio en la respuesta inmune hormonal mediada --

por anticuerpos (17).

Posteriormente Good y colaboradores (19-20) describieron en humanos cuadros clínicos en donde estaba ausente la inmunidad humoral o la inmunidad celular; encontraron casos de agamaglobulinemia congénita recesiva ligado al sexo (tipo Bruttow), en la cual no hay respuesta de tipo humoral y la inmunidad celular no presenta alteraciones. En pacientes con el síndrome de Di George -- (aplasia congénita de timo), encontraron que la inmunidad celular estaba ausente mientras que la producción de anticuerpos se presenta ligeramente disminuída.

Waksman y colaboradores en 1962 (21) observaron en ratones timectomizados que sólo ciertas áreas de tejidos linfoides carecían de linfocitos estos sitios correspondían a las áreas de timo dependientes; mientras que otras áreas contenían folículos, centros germinativos y células plasmáticas no estaban afectadas. Estos estudios fueron confirmados por Parrot y colaboradores (22) en 1966 y apoyaban los primeramente descritos por Cooper.

Ya definida la participación del timo y la Bolsa de Fabricio en la respuesta inmune (en mamíferos se cree que el equivalente de este órgano puede ser el apéndice ileocecal, las placas de Pe yer, las amígdalas), quedaba por investigar cuáles eran los tipos celulares encargados de la res

puesta inmune.

Claman y colaboradores en 1966 (23) usaron ratones irradiados letalmente los cuales fueron reconstituidos con linfocitos derivados de timo y médula ósea. Estos animales inoculados con antígeno, fueron capaces de dar una respuesta humoral normal; sin embargo, esta respuesta no se observó en ratones que también habían sido irradiados de la misma manera, pero que sólo habían sido reconstituidos con un solo tipo de células.

Davies y colaboradores en 1967 (24) y Mitchell y Miller en 1968 (25) demostraron en sus importantes experimentos que los anticuerpos eran producidos por las células derivadas de médula ósea en el ratón (equivalente a la Bolsa de Fabricio en las aves), pero que era necesaria la participación de los linfocitos derivados del timo para la síntesis de dichos anticuerpos.

La colaboración de los linfocitos del timo T y los derivados de médula ósea (B) se conoce como cooperación celular. Con ciertos antígenos no es necesaria esta cooperación ya que en algunos animales timectomizados dan una respuesta inmune humoral normal. Esos antígenos fueron estudiados por Anderson y Blomgren en 1971 (27) quienes trabajaron con el lipopolisacárido de E. coli; por Feldmann y Basten en 1971 (28), quienes estudiaron las respuestas a flagelina polimerizada y por Howard y colaboradores en 1972 (26) usando el po-

lisacárido de neumococo. A estos antígenos que no requieren la presencia del timo para inducir la respuesta inmune se les llamó timo independiente, y a los antígenos que necesitan la presencia del timo para desencadenar la respuesta inmune se les llama antígenos timo dependientes.

Nossal y Ada en 1971 (28) Schwartz y colaboradores en 1970 (30) y Unanue en 1968 (31) observaron que además de los linfocitos era necesaria la presencia de los macrófagos para dar respuesta inmune. Storb y Wieser (32) en 1968, demostraron que estas células no sintetizaban anticuerpos.

Fishman y Adler (33), en 1965 empezaron a investigar cómo intervenían los macrófagos en la respuesta inmune. A los macrófagos expuestos previamente al antígeno los sometieron a ultrasonificación rompiendo de esta manera las células y obteniendo diferentes fracciones de ella, inocularon animales inmunológicamente vírgenes al antígeno, demostraron que únicamente una fracción que contenía ácido ribonucleico (ARN) era capaz de producir respuesta inmune.

Askonas y Rhodes en 1965 (34) repitieron el experimento encontrando que el ácido ribonucleico (ARN) del macrófago que activaba a los linfocitos para la síntesis de anticuerpos conservaba unidos pequeños fragmentos del antígeno en su forma natural, por lo que llamaron super antígeno al complejo antígeno-RNA.

Carrel e Igebristsen en 1912 (35), trataron de obtener anticuerpos "in vitro", pero fracasaron; así también Ludcke (37). Estudios posteriores que permitieron el mantenimiento de órganos y células en cultivo usando medios adecuados permiten que la inmunología avance en esta área, particularmente porque se pudieron identificar y separar diferentes tipos celulares, (macrófagos, linfocitos T, linfocitos B) y que permitió además usar fragmentos de órganos en el estudio de la síntesis de anticuerpos "in vitro". Stevens y Mackenna en 1958 (36), Fishman en 1961 (38), Mishell y Dutton en 1967 (39) y Moisiert en 1967 (40) encontraron que en cultivos celulares los anticuerpos aparecían el segundo día después del contacto con el antígeno, alcanzaban título máximo a los cuatro a cinco días y disminuían posteriormente.

Jerne y Nordin en 1963 (42,43) desarrollaron un método que permitió medir la respuesta inmune-hormonal a través de la determinación de células formadoras de anticuerpos.

Determinación de anticuerpos

La respuesta inmune humoral a un inmunógeno tiene como resultado la aparición de anticuerpos circulantes que pertenecen a una o varias de las cinco clases de inmunoglobulinas.

El tipo de ensayo que se utiliza para identificar los anticuerpos depende menos del anticuer-

po producido que de la variedad física y química del antígeno problema. Los antígenos solubles al combinarse "in vitro" con su anticuerpo específico dan lugar a una precipitación; donde los -- complejos antígeno-anticuerpo forman finas masas insolubles. Los mismos antígenos, unidos en forma natural o artificial a partículas tales como bacterias, glóbulos rojos, latex o bentonita, -- dan lugar a acúmulos burdos; en este caso se habla de aglutinación.

Hasta cierto punto, la precipitación y la aglutinación pueden considerarse manifestaciones de la misma interacción antígeno-anticuerpo; la principal diferencia es la forma física del antígeno de prueba. En ambos casos, tiene lugar una unión química reversible en dos etapas. En la -- primera etapa, los anticuerpos del suero inmune -- reaccionan con los determinantes antigénicos espe cíficos de la molécula del antígeno. Dicha combi nación depende de varios factores como pH, fuerza iónica, y temperatura. La unión antígeno anti- -- cuerpo se mantiene por virtud de fuerzas electro_ táticas, tales como las de Van der Waals, Coulombicos o puentes de hidrógeno. Cuando esta reac-- ción llega al equilibrio, empieza la segunda etapa o formación de un enrejado.

Al igual que la primera, la segunda etapa de la reacción es específica; así los dos sitios de recepción del antígeno sobre las moléculas diva-

lentes de anticuerpo son iguales. Un anticuerpo de una especificidad dada sólo puede combinarse con el antígeno correspondiente.

Durante la precipitación, el antígeno es una molécula soluble. Por lo tanto, debe formarse una red bastante grande antes de que pueda verse el agregado. Para elaborar una red de magnitud suficiente para que se precipite se requiere de un -- gran número de moléculas de anticuerpos. En cam-- bio, durante la aglutinación, el antígeno forma parte de una partícula insoluble grande, como el glóbulo rojo o una bacteria, y en ella se requiere de un número reducido de moléculas para una agregación visible. Esto le da a la aglutinación una mayor sensibilidad para determinar la presencia de anticuerpos.

Si se mezclan cantidades crecientes de antígeno soluble con una cantidad constante de anti-- cuerpos, y se mide cuantitativamente el precipita-- do resultante, se observa una relación dosis-res-- puesta. En un principio no se forma precipitado, al aumentar la cantidad de antígeno, el precipita-- do se va haciendo mayor, hasta llegar a un máximo. Si se añade más antígeno, la cantidad de precipi-- tado disminuye hasta finalmente desaparecer. Esta curva se puede dividir en tres zonas. En la prime-- ra etapa de la reacción, existe un exceso relati-- vo de anticuerpos, aparecen así complejos forma-- dos por una molécula de anticuerpo y dos mo--

lécúlas de antígeno las cuales no tienen tamaño suficientemente grande para precipitar.

En la zona de equivalencia, las concentraciones de antígeno y anticuerpo son óptimas por lo que la precipitación es máxima. Las moléculas -- multivalentes de antígeno están firmemente sujetas por moléculas divalentes de anticuerpo en una red tridimensional.

En la zona de exceso de antígeno la formación de precipitado es escasa, ya que estas condiciones, el anticuerpo es insuficiente para combinarse con un exceso de antígeno formándose complejos entre varias moléculas de antígeno y unas -- cuantas de anticuerpo que tampoco son suficientemente grandes para precipitar.

Los ensayos de precipitación para determinar la presencia de anticuerpo se realizan también en medios de agar. Uno de los métodos más usados es el método de Ouchterlony (doble difusión). Se realiza en gel y se lleva a cabo de la siguiente manera: Se cortan varios pozos en el gel y se ponen los antígenos en uno de ellos y anticuerpos en -- los otros. Se incuban las placas. Los antígenos y los anticuerpos difunden desde los pozos y su -- interacción da lugar a líneas de precipitación en el agar.

La reacción de precipitación en agar es una técnica analítica muy útil para la identificación de antígenos o anticuerpos.

Esta técnica permite comparar directamente -
varios antígenos con un antisuero o viceversa.-

A medida que el antígeno y el anticuerpo di
funden y se unen, en la zona de proporción óptima
se producirá una banda en el agar entre la dos ca
vidades.

Si un antisuero que contiene anticuerpos con
tra diversos antígenos se coloca en el orificio
central, y la mezcla de antígenos se coloca en --
los orificios circundantes, aparecerán bandas cuyo
número y características proporcionarán una esti-
mación de los diversos sistemas antígeno-anticuerpo
del sistema en estudio.

Si dos pozos de antígeno se colocan simétricamente
respecto a un pozo que contiene antisuero,
es posible reconocer tres variedades fundamen-
tales de reacción (fig. II). Difieren físicamente
por la manera en que se unen los dos arcos de pre
cipitado formados por los distintos antígenos.

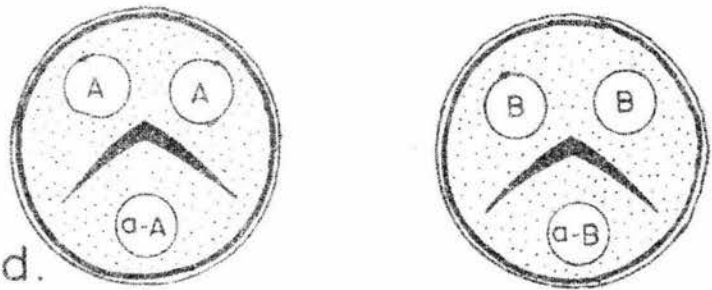
Los nombres que se siguen, para clasificar-
los tres tipos de reacción, deben emplearse en
su sentido serológico, y no químico. En una reac
ción de identidad, los dos arcos de precipitación
se confunden, dando un arco único; esto significa
que el antisuero no permite distinguir un antígeno
de otro.

En las reacciones de no identidad, las lí--
neas se cruzan completamente; sabemos entonces --
que los dos antígenos reaccionan con dos anticuerpo

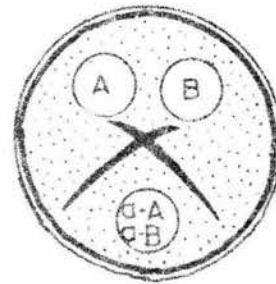
pos completamente distintos. Tanto el segundo antígeno como el segundo anticuerpo atraviesan el primer precipitado, producido por el primer sistema antígeno-anticuerpo. En las relaciones de identidad parcial, en las cuales un antígeno presenta una reacción cruzada con el otro, sin ser idéntico serológicamente, se observa una zona de cruce con espalón.

Las reacciones de aglutinación pueden verse modificadas por ciertas consideraciones fisicoquímicas debidas al tamaño de las partículas a su carga electrostática, o a la naturaleza inmunológica de los anticuerpos.

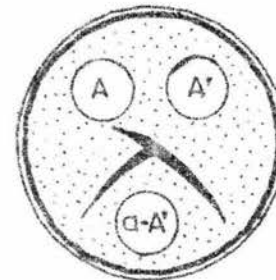
Durante la aglutinación, la primera etapa de la unión inicial antígeno-anticuerpo depende de la fuerza iónica, el pH y la temperatura. La segunda, o sea la formación del agregado exige que se venza la repulsión electrostática entre las partículas antigénicas. Durante la aglutinación de los glóbulos rojos, por ejemplo, cuyos determinantes antigénicos pueden encontrarse en depresiones profundas de la superficie celular, los anticuerpos se unen firmemente a dichas determinantes antigénicas del glóbulo formándose una red cuando la valencia libre del anticuerpo se fija a un antígeno de una célula vecina. Si las células están separadas por fuerza de repulsión, el extremo libre de la molécula de anticuerpo no se acerca bastante al antígeno para establecer una unión



Reacción de identidad.



Reacción de no identidad.



Reacción de
identidad parcial.

A=Antígeno A.

B=Antígeno B.

A=Antígeno A, más otros
determinantes.

a-A=anti-A.

a-B=anti-B.

a-A'=anti-A.

Esquema de tres tipos de reacciones de doble difusión

(Método de Ouchterlony) (II).

más firme. Se puede vencer las fuerzas de repulsión mediante métodos físicos que obligan a las células a unirse mediante centrifugación o sedimentación. (El rechazo se debe a que los eritrocitos tienen la misma carga) (44).

En la aglutinación encontramos tres formas:

Aglutinación directa.

Hemaglutinación directa.

Hemaglutinación indirecta o pasiva.

Aglutinación directa.- Unión de un antígeno particulado con su anticuerpo con la formación de grumos.

Hemaglutinación directa.- El anticuerpo reacciona directamente contra el antígeno eritrocítico.

Hemaglutinación indirecta o pasiva.- El anticuerpo actúa sobre una partícula soluble que ha sido unida a glóbulos rojos. Como las pruebas de aglutinación son muy sensibles para determinar la presencia de anticuerpos, (su sensibilidad es de 10 a 400 veces mayor que la prueba de precipitación), se utilizan ampliamente como pruebas diagnósticas. La reacción se lleva a cabo cubriendo con una capa de antígeno soluble una partícula insoluble que puede ser poliestireno, latex bentonita o glóbulo rojo.

Los antígenos de tipo polisacárido se fijan fácilmente a la superficie de glóbulos rojos no tratados por ejemplo: los polisacáridos específi-

cos de ciertas bacterias se adhieren a los eritrocitos y se utilizan como antígenos de prueba para la identificación de anticuerpos, (44). También se fijan sustancias protéicas a glóbulos rojos -- previamente tratados con soluciones de ácido tánico. También ciertos antígenos pueden fijarse a los glóbulos rojos mediante un enlace químico(45). En este trabajo se usaron glóbulos rojos tratados con glutaraldehído.

Objetivo de la Investigación.

El presente estudio pretendió elucidar alguna de las incógnitas surgidas como resultado de otros trabajos realizados en el mismo laboratorio acerca de la evolución de la respuesta inmune celular en los animales infectados con N. brasiliensis.

En estos trabajos se habían obtenido resultados valiosos con respecto a varios aspectos de la respuesta inmune en la infección producida por N. brasiliensis. Así la respuesta inmune celular fue determinada por la intradermorreacción con un extracto citoplásmico purificado (4), los resultados indicaron que frente a los antígenos homólogos la reacción fue más específica que cuando se usaron los extractos citoplásmicos heterólogos apoyando el hecho de que la prueba cutánea puede ser de utilidad en el diagnóstico. Por otro lado la migración de macrófagos obtenidos de cobayos sensibilizados con alguna de las dos cepas de No-

cardia usadas, (N. brasiliensis y N. asteroides)— fue inhibida tanto en presencia del antígeno homólogo como del antígeno heterólogo; sin embargo la inhibición con el antígeno homólogo fue significativamente mayor (53-55).

En otros estudios, ratones infectados con -- Nocardia brasiliensis mostraron que el tumor aumenta rápidamente de tamaño en los primeros días después de la infección, seguido de una reducción del mismo que llega al mínimo alrededor del día - 25. La reducción de un micetoma coincide con el máximo de reactividad celular determinada por la observación de un aumento en la actividad fagocita y en la capacidad de digestión intracelular de los macrófagos de los animales infectados con Nocardia brasiliensis con respecto a los macrófagos de los animales normales. Esta activación de las células obtenidas de los animales infectados es -- posiblemente debida al desarrollo de inmunidad celular (56). Posteriormente se observa una disminución de la respuesta celular.

El abatimiento de la reactividad celular demostrado por la prueba cutánea o por la prueba de activación de macrófagos, puede deberse a varios motivos entre ellos una supresión generalizada de la respuesta inmune celular. Por otro lado el fenómeno observado puede deberse a una inmunosupresión específica como la desensibilización producida por la persistencia del antígeno en los teji-

dos del animal infectado; así también la disminución de la reactividad celular pueda ser consecuencia de un fenómeno de facilitación inmunológica.

También se investigó en ratones infectados por este mismo microorganismo la respuesta inmune humoral frente a un antígeno no relacionado, encontrándose que su respuesta inmune era normal. Su comportamiento fue igual que los controles -- por lo que se concluye que la infección de Nocardia brasiliensis no afecta la respuesta inmune humoral (48).

Estos resultados nos hicieron considerar la posibilidad de que la respuesta inmune humoral pudiera estar interfiriendo con los mecanismos de la respuesta inmune celular.

El objetivo de este trabajo era el estudiar la cinética de la reacción inmune humoral. Su conocimiento puede ser de utilidad en la evaluación de la disminución de la respuesta inmune celular observada en los trabajos ya mencionados.

Con este objeto, la respuesta humoral fue estudiada por los métodos de precipitación en gel y la hemaglutinación pasiva.

MATERIAL Y METODOS

Animales.-- Se usaron ratones machos y hembras de la cepa Carworth Farm (CFI) con un peso promedio de 18-22g, mantenidos en el bioterio a una temperatura de 16°a 20°C en jaulas de plástico con tapa de acero con una dieta a base de agua y Purina (Purina de México, S. A. de C. V.) Al hacer la distribución en las jaulas se tuvo cuidado que en cada una se pusieran ratones del mismo sexo. Para la obtención de suero anti-Nocardia brasiliensis se utilizaron dos conejos de 3.5 a 4 -- kg. de peso.

Distribución de ratones.

Para su distribución los animales se pesaron y posteriormente se distribuyeron en diferentes grupos, procurando que el peso de los animales estuviera balanceado. Para ello se hizo la distribución en orden decreciente o creciente de peso, como lo muestra la siguiente tabla:

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Peso	Peso	Peso	Peso
20 g	19 g	18 g	18 g
17 g	17 g	17 g	17 g
17 g	17 g	17 g	17 g
16 g	16 g	16 g	16 g
$\bar{x} = 17.5g$	$\bar{x} = 17.25g$	$\bar{x} = 17.25g$	$\bar{x} = 17.25 g.$

Cepas.

Para la obtención del antígeno y para la infección se usó Nocardia brasiliensis HG-24 (n.b.)

mantenida por pases sucesivos en medio Proskawer-
y Beck, como se ha decrito previamente (55).

Medios de cultivo.

La Nocardia brasiliensis se cultivó en me--
dio de Proskawer y Beck, modificado por Youmans -
y Karlson (46), cuya fórmula es la siguiente.

Asparragina	25.00	g
Fosfato monobásico de potasio	25.00	g
Sulfato de potasio	2.50	g
Citrato de magnesio	7.50	g
Glicerol	250,00	ml
Agua destilada c.b.p.	5000.00	ml

Preparación

Disolver, por separado, cada una de las sales mezclar y agregar al último el glicerol, ajustar el pH a 6.8 con hidróxido de sodio.

Esterilizar a 110° durante 10 minutos.

Obtención del cultivo.

La cepa conservada en medio de Sabraud-Dextrosa-Agar, se siembra en medio sintético de PBY contenido en tubos de ensayo. Se incuban estos durante 6 - 8 días a 37°C . Posteriormente cada tubo sirve como inóculo para un matraz Erlenmeyer de 1 lt. conteniendo 300 ml de PBY estéril; se incuban 21 días a 37°C en condiciones estacionarias.

Cosecha.

Las células fueron separadas del medio de cultivo por filtración empleando un embudo de Buchner y papel filtro estéril, con objeto de eliminar las sales del medio de cultivo, la suspensión obtenida se lavó con agua destilada, calentada a 50°C .

Desengrasado.

El paquete celular se colocó con una espátula en un matraz Erlenmeyer y se agregó una mezcla de acetona-metanol (3:1), se mezcló agitando usando aproximadamente 250 ml de esta mezcla por cada 20 g de células, se dejan 8 a 10 horas a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se le cambia la mezcla. Este procedimiento se repitió varias-

veces hasta obtener un sobrenadante transparente. Una vez lavado y desengrasado se secó al vacío y se suspendió en una solución amortiguadora de --- tris-hidroximetil aminometano (TRIS) 0.01M, pH7.4 conteniendo 0.01 M de acetato de magnesio y 2 microgramos por milímetro de desoxirribonucleasa. - Las células en suspensión fueron homogeneizada y rotas en una prensa celular. (Sorval Ribi fraccionator, modelo RF-1) a una presión de 15,000 a --- 30,000 psi. La masa celular obtenida se dejó durante la noche a 4⁰ C, posteriormente fue centrifugado por segunda vez a 12,100xg por 30 minutos y posteriormente a 48,200 xg durante 15 minutos; -- con objeto de eliminar los ribosomas y el DNA que está áltamente polimerizado, fue sometido a ultra centrifugación a 144,000 xg durante 3 horas. El sobrenadante obtenido se dializó contra agua destilada y luego se liofilizó y se midió el contenido protéico por el método de Lowry y colaborado - res (47).

Preparación del suero control positivo anti-Nocardia brasiliensis.

Para la obtención de este suero se utilizaron dos conejos de 3.5 a 4.0 kg de peso.

Se puso Nocardia brasiliensis, (1 g) viva se ca en un vaso de precipitado de 100 ml de plástico y se añadió la solución salina, (5 ml) y adyuvante incompleto de Freund (5 ml) y se homogeneizó hasta tener una mezcla uniforme.

Calendario de inmunizaciones.

La inoculación se hizo 3 veces en el cojinete plantar, y dos veces más en diferentes partes del cuerpo; estas cinco inoculaciones se hicieron a intervalos de una semana y con una dosis de 5 mg de Nocardia brasiliensis cada vez.

Después de 15 días de la última inoculación se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca. Estos sueros se usaron como controles positivos de antisuero. Los sueros obtenidos se colocaron en tubos de rosca y se congelaron.

Preparación del suero control positivo anti-Nocardia brasiliensis en ratones .

Para las inmunizaciones de ratones se usó el mismo antígeno. La inoculación se hizo tres veces en el cojinete plantar variándose éste, y estas tres inoculaciones se hicieron a intervalos de una semana con dosis de 5 mg de Nocardia brasiliensis cada vez. Al cabo de 15 días se sangraron, los sueros obtenidos se colocaron en tubos de rosca y se congelaron.

Preparación de gamma globulina de ratón anti Nocardia Brasiliensis.

La globulina gamma fue obtenida por precipitación del suero de ratón anti-Nocardia brasiliensis, con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50). La precipitación se llevó a cabo 3 veces, posteriormente se dializó el precipitado con una solución amortiguadora de boratos de pH 8.4/

Cinética de la respuesta humoral en ratones infectados con *N. brasiliensis*.

Se inocularon 75 ratones en el cojante plantar con una dosis de 5 mg de *N. Brasiliensis* viva, suspendida en adyuvante incompleto de Freund, y cada cinco días se sangraron cinco ratones.

Extracción de sangre de los ratones. El sangrado se efectuó cortando la arteria axilar y la sangre se colectó con pipeta Pasteur en tubos de ensayo. Se dejó que formara coágulo a temperatura ambiente por 3 horas y se centrifugó a 1,500 r.p.m. durante 30 minutos. Posteriormente se separó el paquete globular y el suero se guardó en tubos de rosca al congelador. De esta misma manera se sangraron los ratones restantes obteniendo suero de ratones infectados de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 días después de la infección.

Material empleado en las reacciones de precipitación.

Gel para inmunodifusión. (49)

Agarosa	10.00 g
Barbital sódico	7.935 g
Solución de HCl 0.1 N.	115.00 ml
Agua c,b,p,	1000.00 ml
Ph	8.2

Se usó merthiolate como conservador.

Se depositaron 2.5 ml de agarosa, - - - - -

en cada caja petri limpia y desengrasada y se dejaron solidificar. Posteriormente se hicieron pozos cilíndricos de 0.6 mm de diámetro dejando un cm de distancia entre centro y periferia. El fondo de los depósitos cilíndricos se selló con una gota de agar diluido (0,1 ml de agarosa en 10 ml de solución amortiguadora).

Las cajas de Petri se guardaron en una caja de plástico que en el fondo tenía compresas húmedas para proporcionar humedad a las cajas, conservándolas a 4° C.

Técnica. Los antígenos se colocaron en la hoquedad central y los sueros en las hoquedades de la periferia, siguiendo el sentido de las manecillas del reloj identificando la muestra No. 1 por medio de un orificio pequeño que se hizo con un capilar.(49).

Condiciones de precipitación.

El antígeno se probó en distintas concentraciones hasta obtener una banda central. Una vez colocados el antígeno y los sueros se incubaron a una temperatura ambiente en cámara húmeda durante 48 horas. Se observaron cada 24 horas. La lectura donde se observó mejor definición de las bandas de precipitación fue a las 48 horas.

Material empleado en la hemaglutinación.

Antígeno.

Se usó el mismo antígeno que para el método de precipitación con una concentración de 4.2 -

mg/ml la cual fue determinada por el método de Lowry y sus colaboradores. (47)

Sueros.

Los mismos usados en el método de precipitación correspondientes a los ratones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 -- días de infectados.

La sangre se conservó en la solución de Alsever estéril (v/v) cuya fórmula es la siguiente:

Eritrocitos de carnero.

Solución de Alsever

Dextrosa	20.50 g
Citrato de sodio	8.00 g
Acido cítrico	0.55 g
Cloruro de Sodio	4.20 g

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

Se tuvo cuidado de agitar la sangre conforme caía al matraz para evitar la formación de coágulos (50).

Se guardó a temperatura de 4°C. Antes de ser usados los eritrocitos se dejaron reposar durante 72 a 96 horas a partir de su extracción. La solución se usó durante 2 a 3 semanas.

Solución amortiguadora para la hemaglutinación. (PBS-HA6.8)

Solución amortiguadora (PBS-6.8) 99.00 ml

Suero normal de conejo inactivado y absorbido en eritrocitos de carnero.

1.00 ml

Solución de glutaraldehido

Solución de glutaraldehido al 20% 1.00 ml

Agua destilada c.b.p. 20.00 ml

Todos estos sueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos y posteriormente fueron absorbidos con eritrocitos de carnero previamente lavados -- tres veces en solución salina isotónica, usando -- una proporción de 1 ml de suero por 0,1 ml de eritrocitos de carnero. La muestra se incubó a 37°C durante una hora; transcurrido ese tiempo, los sueros se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 30 minutos y se separaron con pipeta Pasteur. Los sueros se mantuvieron congelados.

Técnica de acoplamiento del antígeno, usando una solución de glutaraldehido al 1%.

1.- Se lavaron los eritrocitos de carnero -- 3 veces con (PBS) un amortiguador de fosfatos isotónico de pH 6.8.

2.- Se hizo una suspensión de células al 10% en PBS.

3.- Se preparó una solución de glutaraldehido al 1% en agua destilada.

4.- Se puso 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos al 10% y se centrifugó.

5.- Se eliminó el sobrenadante y se adicionó sobre los eritrocitos 1 ml del antígeno de Nocardia brasiliensis, a una concentración de 4.2 mg/ml; se añadió 0.1 ml de solución de glutaraldehido al 1%.

6.- Se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente.

7.- Se centrifugaron las células a 1500 r.p.m. por 10 minutos.

8.- Se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación a 1500 r.p.m. por 10 minutos (51).

Se suspendieron las células a una concentración final de 2.5%, con (PBS-HA6.8) solución amortiguadora de fosfatos isotónica con suero de conejo inactivado al 1%, de pH 6.8.

Hemaqlutinación indirecta (52)

1.- Con pipeta graduada se puso en las excavaciones de la placa 0.05 ml PBS-HA-6.8.

2.- Con pipeta graduada se puso en la primera excavación 0.05 ml de suero inactivado y absorbido con eritrocitos de carnero, el cual se fue pasando a las siguientes excavaciones con una asa de microdilución. En esta forma se obtiene una dilución del suero de 1:2 en las siguientes 1:4, 1:8, 1:16; 1:32, etc.

3) Con una pipeta de gota graduada de 0.025 ml se tomó la suspensión de eritrocitos sensibilizados con el antígeno al 2.5% y se puso una gota en cada excavación.

4) Se agitó un minuto con movimientos vibratorios.

5) Se cubrió la placa con cinta adhesiva para evitar la evaporación y se dejó a 4°C por 24 horas.

6) Se leyeron las placas de reacción observando el fondo de las mismas con ayuda de un espejo de aumento. Se tomó como título la dilución - más alta del suero que aglutinó.

Controles

a) Control positivo del sistema: Se utilizó una gamma globulina hiperinmune de ratón.

b) Control negativo del sistema: Suero normal de ratón.

c) Control negativo del antígeno: Eritrocitos sensibilizados con el antígeno pero sin suero.

d) Control negativo de eritrocitos tratados con glutaraldehído:
Sin antígeno y sin suero.

e) Control negativo de eritrocitos: Eritrocitos en solución PBS-HA-6.8. sin glutaraldehído, - sin antígeno y sin suero.

Interpretación de resultados

Reacción de aglutinación positiva.- Anillo - de células que rodean una película difusa de células aglutinadas.

Reacción de aglutinación negativa.- Un anillo compacto de células.

Resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboraron los planteamientos con respecto a la sensibilidad de las técnicas de precipitación y hemaglutinación, ya que con la técnica de precipitación obtuvimos resultados positivos en suero de ratones infectados a partir del día 25 después de la infección mientras que con la técnica de hemaglutinación obtuvimos títulos significativos de anticuerpos anti-Nocardia brasiliensis a partir del día 20 después de la infección.

Como podemos observar en la tabla I, a partir del día 25 después de la infección, se observaron bandas de precipitación en el suero de ratones infectados cuando se ensayaron contra un antígeno conteniendo 500 mg/ml de proteína, y desde el día 35 después de la infección cuando, se utilizó un antígeno conteniendo 830 mg/ml de proteína. Las bandas de precipitación se mantuvieron durante el tiempo que duró el experimento frente al antígeno menos concentrado, mientras que con el antígeno más concentrado, sólo se observó hasta el día 50.

La aglutinación pasiva (tabla II) mostró los siguientes resultados: a partir del día 20 después de la infección los sueros de los ratones infectados fueron capaces de aglutinar, a un título de 1:32 los eritrocitos de carnero cubiertos con

el antígeno de Nocardia brasiliensis. El título -
obtenido en esa fecha fue duplicado a los 25 días
de la infección y cuadruplicado desde el día 30,
manteniéndose con ligeros cambios hasta el final-
del experimento.

Discusión

Durante el curso de la infección experimental en ratones con Nocardia brasiliensis la respuesta inmune celular puede ser detectada quince días después de la administración de la dosis infectante. Los animales presentan un máximo de reactividad alrededor del día 25 después de la infección; a partir de este momento dicha reactividad disminuye paulatinamente. El máximo de reactividad celular coincide con una disminución del tamaño del micetoma el cual posteriormente progresa hasta llegar en la mayoría de los casos a la amputación del miembro afectado.

La evolución de la respuesta inmune celular a Nocardia brasiliensis en ratones ha sido determinada a través de diferentes estudios previos a este trabajo (54, 55, 56, 60). En ellos se han utilizado diferentes diseños de los cuales es interesante mencionar el referente a la determinación de la resistencia a Listeria monocytogenes en animales infectados con N. brasiliensis. Se ha demostrado que la resistencia a L. monocytogenes se correlaciona con un aumento en la capacidad microbicida de los macrofagos (58). Aparentemente la activación de los macrofagos se presenta como consecuencia de la liberación de ciertas sustancias (linfocinas) por linfocitos inmunológicamente comprometidos (células

sensibilizadas) (57). Es interesante hacer notar que aunque la liberación de estas sustancias depende de una interacción entre células sensibilizadas y el antígeno específico, su actividad posterior sobre los macrófagos no presenta esta característica ya que los macrófagos activados pueden fagocitar y digerir más eficientemente que los normales cualquier microorganismo intracelular igual o diferente al que ocasionó su activación (58). En otras palabras no existen evidencias de que la actividad microbicida de estos macrófagos involucre algún mecanismo inmunológicamente específico (59).

Los estudios de inmunidad celular mostraron que 15 días después de la infección con N. brasiliensis hay un aumento significativo en la resistencia a L. monocytogenes en comparación a la observada en animales normales. La medición de la resistencia a L. monocytogenes se llevó a cabo de terminando el número de bacterias en el bazo e hígado de animales infectados y normales, 5 minutos y 24 horas después de la inoculación por vía intravenosa de una suspensión de L. monocytogenes.

A los cinco minutos no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, más que en el día 25 después de la infección. En cambio a las 24 horas se observó que la eliminación de L. monocytogenes en los animales infectados

fue mucho más eficiente que en los animales normales.

El índice de resistencia a L. monocytogenes se determinó comparando los resultados obtenidos en ambos grupos a los diferentes tiempos estudiados (Fig. 1) (60).

El abatimiento de la respuesta inmune celular observado en los animales infectados es muy interesante, es posible que la presencia de microorganismo en los tejidos del animal funcione como un estímulo constante para el sistema inmuno-competente del mismo. A diferencia de lo que ocurre cuando se utilizan microorganismos muertos.

Sin embargo, lo que se encuentra es que a pesar de la persistencia del actinomiceto en la lesión (lo cual ha sido demostrado aislándolo hasta 3 ó 4 meses después de la infección), la reactividad celular de los animales infectados se abate progresivamente. Una posible explicación sería la de un estado de desensibilización por exceso de antígeno. Sin embargo, podría haber otras explicaciones como la participación de anticuerpos específicos contra Nocardia que puedan suprimir la respuesta inmune celular.

Estas consideraciones nos estimularon a investigar la evolución de la respuesta inmune humoral en los animales infectados con el microorganismo mencionado. Utilizando la prueba de hemaglutinación pasiva y de precipitación en gel (método

de Ouchterlony) detectamos la presencia de anticuerpos a partir de los días 20, 25 después de la infección. El título máximo de anticuerpos alcanzó a partir del día 30 y persistió hasta el día 45 después de la infección. Posteriormente se observó un ligero descenso en el título manteniéndose en estas condiciones hasta el día 70. Es interesante hacer notar que el tiempo en el cual los títulos de anticuerpos se encuentran más elevados coincide con el período en el que la respuesta inmune celular se abate progresivamente. Esto sugiere que el anticuerpo pueda estar regulando la respuesta inmune celular, como se ha demostrado en otros sistemas (61); es decir, en ausencia del anticuerpo se expresa la inmunidad celular, mientras que en su presencia se abate.

La incapacidad de los animales a eliminar Nocardia en presencia de títulos elevados de anticuerpos sugiere la posibilidad de que estén actuando además como facilitadores, impidiendo el reconocimiento de las bacterias recubiertas con el anticuerpo por los linfocitos sensibilizados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Burrows, 1970. Tratado de Microbiología. Interamericana, S.A. México.
- 2.- Nocard, E. 1888. Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe connue sous le nom de farcin. Ann Inst. Pasteur. 2: 293.
- 3.- Lechevalier, H.A. y Lechevalier, M.P. 1970. A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. En The Actinomycetales. H. Prause y Gustaf Fisher, (eds.) Jena p. 393-405.
- 4.- Ortiz-Ortiz, L., y Bojalil, L.F. 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extrats of Nocardia organisms as means of diagnosis and epidemiological study of Nocardia infection. Clin. Exp. Immunol. 12: 225.
- 5) Good, R.A. y Park, B.H. 1974. Principles of Modern Immunobiology. Lea & Febiger. Philadelphia.
- 6) Aerêa Leão, A.E. 1928. L'intradermo-reaction dans l'actinomyose. Reaction Specifique de la peace avec le filtrat de culture d' Actinomyces bovis. Comp. rend. Soc. Biol.
- 7) Almeida, F. y Lacaz S.S. 1941. Etudios sobre Actinomyces brasiliensis (Lindenberg, 1909 An Fac. Med. Univ. Sao Paolo. 17: 577.

- 8) Glover, R.P., Herrel, W.E. Heilman, F.R. y -- Pfuetze, K.H. 1948. Nocardiasis, Nocardia Asteroides infection simulating pulmonary tuberculosis. J.A.M.A. 136: 172.
- 9) Bojalil, L.F. y Magnusson. 1963. Specificity of skin reactions of humans to Nocardia - - - sensitins. Amer. Rev. Resp. Dis. 88:409.
- 10) Gómez-Estrada, H. Comunicación personal.
- 11) Bellanti, J.R. 1972. Inmunología. Interamericana, México.
- 12) Good, R.A., y Vargo, R.L. 1956. A clinical - and experimental study of agammaglobulinaemia. Lancet, 73: 224.
- 13) Glick. B. Chang, T.S. y Jaap, R.G. 1956. The bursa of Fabricius and antibody production,-- Poultry Sci, 35: 224.
- 14) Warner, N.L. y Szenberg. A. 1968. The immunological responsiveness Aust. J. Exp. Biol. -- Med. Sci. 40: 373.
- 15) Mueller., A.P. Wolfe, H.R. y Meyer, R.K. 1960. Precipitin production in chickens. XXI Antibody production in bursectomised chickens and - in chickens injected with 19-nortestosterone on the fifth day of incubacion. J. Immunol. 85: 172.
- 16) Aspinall, R. L., Meyer, R.K.; Graetzer, M.A.- y Wolfe, H.R. 1963. Effect of thymectomy and bursetomy on the survival of skin homografts in chickens. J. Immunol. 90: 872.

- 17) Cooper, M.D.; Peterson, R.D.A.; South, M.A. y Godd, R.A. 1966. The functions of the thymus and bursa sistem in chicken. J. Exp. Med. -- 123: 75.
- 18) Jankovic, B.D. y Isvanesky, M. 1963. Experimental allergic encephalomyelitis in thymectomised, bursetomised and normal chickens. - Int. Arch. Allergy. 23: 188.
- 19) Good, R.A.; Peterson, R.D.A.; Perey, D.Y.; - Finstad, J., y Cooper, M.D. 1968. The immunological deficiency diseases of man: consideration of some question asked by these patients with an attempt at clasification. - En Immunologic Deficiency Diseases in Man. D. Bergsma y R. A. Good. (Eds.) National Fundation, March of Dimes White Plains, N.Y.p.17.
- 20) Good, R.A.; Biggars, W.D. y Park B.H. 1971.- Immunodeficiency disease of man. En Progres in immunology, B. Amos, (Ed.) Academic Press. N.Y. p. 17.
- 21) Waksman, B.H.; Arnason, B.G. y Jankovic, B.D. 1962. Role of the thymus in immune reactions in rats. III Changes in the lymphoid organs of thymectomised rats, J. Exp. Med. 116: 187
- 22) Parrots, D.M.V.; De Sousa, M., y East, J. 1966 Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomised mice. II. Exp. Med. 123: 191.
- 23) Claman, H.N.; Chaperon, E.A., y Trip lett, R.-

- F. 1966. Thymus marrow combinations synergism in antibody production, Proc. Soc. Exp. Biol. 112: 1167.
- 24) Davies, A.J.S.; Leuchars, E.; Wallis, V.; Mardhan, R., y Elliot, E.V. 1967. The failure or thymus-derived cells to make antibody. Transplantation. 5: 22.
- 25) Mitchell, G.F. y Miller, J.F.A.P. 1968. 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. 1128: 821.
- 26) Howard, J.G.; Chistie, G.H.; Courtenay, B.M. y Biozzi, G. 1972. Studies on immunological paralysis. VIII. Pneumococcal polysaccharide toleranca and immunity differences between the Biozzi high and low responder lines. Europ. J. Immunol. 2: 269.
- 27) Anderson, B., y Blomgren, H. 1971. Evidence for thymus-independent humoral antibody production in mice against polyvinyl pyrrolidone and E. Coli lipopolysaccharide. Cell. Immunol. 2: 411.
- 28) Feldman, M., y Basten, A. 1971. The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. J. Exp. Med. 134: 103.
- 29) Nosal, G.J.V. y Ada, G.L. 1971. Antigens, Lym

- phoid Cells and the Immune Response. Academic Press. N.Y.
- 30) Schwartz R.S.; Ryder, R.J.W. y Gottlieb, A.A.- 1970. Macrophages and antibody synthesis -- Progr. Allergy. 14: 81.
 - 31) Unanue, E. 1968. Properties and some uses of anti-macrophage antibodies. Nature 218:36.
 - 32) Storb, V., y Weise, R.S. 1968. Kinetics of mouse spleen cell population during the immune response. J. Reticuloendothel. Soc. 5:81
 - 33) Fishman, M.; Adler., F.L.; van Rood, J.J., y Binet, J.L. 1965. Macrophage involvement in antibody formation in vitro. En the reticuloendothelial system. Reticuloendothelial Soc. Nissha Kyoto. p. 228.
 - 34) Askonas, B.A., y Rhodes, J.M. 1965. Immunogenicity of antigencontaining ribonucleic acid. Preparations from macrophages. Nature - 205:470.
 - 35) Carrel, A., y Engebristen, R. 1912. The production of antibodies by tissues living outside of the organism. J. Exp. Med. 15:287.
 - 36) Stevens, K.M. y Mackenna, J.M. 1958. Studies on antibody synthesis initiated in vitro. J. Exp. Med. 107:293.
 - 37) Ludke, H. 1912. Ueber antikörperbildung in Kulturen lebender Körperzellen Klin Wochschr 22:1034
 - 38) Fishman, M. 1961. Antibody formation in vitro.

J. Exp. Med. 114:: 837.

- R.L. y Dutton, R.W. 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures -- from normal mice. J. Exp. Med. 126: 423.
- 40) Moiser, D.E. 1967. A requirement for two-cell types for antibody formation in vitro. - - - Science 518: 1573.
- 41) Rowle, D.A. 1950. The effect of splenectomy on the formation of circulating antibody in the adult male albino rat. J. Immunol. 64: - 289.
- 42) Jerne, N.K., Nordin, A.A. y Henry, C. 1963. - The agar plaque technique for recognizing an antibody producing cells. En Cell-bound antibodies B. Amos y H. Koprowski (eds.) Wistar Inst. Press. Philadelphia. p,109.
- 43) Jerne, N.K. y Nordin, A. 1963. A plaque formation in agar bay single antibody producing cells, Science 140: 405.
- 44) Kabat, E.A. 1968. Inmunoquímica Experimental. (2da. Ed.) Prensa Médica Mexicana. México.
- 45) Barret, J. T. 1972. Inmunología. (1a. Ed.) - Interamericana. México,
- 46) Youmans, G.P. y Karlson, A.G. 1947. Streptomycin sensitivity of tubercle bacilli. Studies on recently isolated tubercle bacilli - and the development of resistance a streptomycin in vivo. Am. Rev. Tuber. 55: 529.

- 47) Lowry, O.H.; Rosebraugh, N.J.; Farr, A.L., y Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265
- 48) Ortega-Pierres, M.G. 1975. Efecto de la infección experimental en ratones con Nocardia brasiliensis, sobre la respuesta inmune humoral primaria a eritrocitos de burro. Tesis profesional.
- 49) Ouchterlony, O. 1949. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26: 407.
- 50) Campbell, D.; Garvey, J., Cremmen, N. y Sussdorf, D. 1963. *Methods in immunology*. W. A. Benjamin, Inc. New York.
- 51) Avrameas, S. 1974. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and - - - antibodies. *Immunochemistry*. 6: 305.
- 52) Kagan, G.I. 1972. *Manual Techniques*, Center for Disease Control Atlanta, Georgia U.S.A.
- 53) Ortiz-Ortiz, L. Contreras, M.F. y Bojalil, L.F. 1972. Cytoplasmic antigens from Nocardia eliciting a specific delayed hypersensitivity *Infect. Immun.* 5: 147.
- 54) Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M.F. y Bojalil, L.F. 1972. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal proteins from Nocardia. *Sabourandia* 10: 147.

- 55) Ortiz-Ortiz, L. Bojalil, L.F. y Contreras, M.F.-
1971. Delayed y persensitivity to polysaccha-
rides from Nocardia. J. Immunol. 108: 1409.
- 56) Ortiz-Ortiz L.; Contreras M.F.; Melendro, E.
y Bojalil, L.F. 1974. Inmunidad celular en in-
fecciones producidas por Nocardia. Proceedings
of the First International Conference of No--
cardia. Mérida, Venezuela.
- 57) Lane, F.C. y E.R. Unanue. 1972. Requirement -
of thymus T lymphocytes for resistance in lis
teriosis. J. Exp. Med. 135: 1104.
- 58) Mackaness, G.B. 1964. The immunological basis
of acquired cellular resistance. J. Exp. Med.
120: 105.
- 59) Blanden, R.V.; Lefford, M.J. and Mackanese --
G. B. 1969. The host response to Calmette-Gué-
rin Bacillus infection in mice. J. Exp.-
Med. 129: 1079.
- 60) Ortiz-Ortiz, L.; Contreras, F.M. y Bojalil, L.
F. 1976. Delayed hypersensitivity to Nocardia
antigens. En the biology of the nocardiae, M.
Goodfellow, G.H. Brownell y J.A. Serra o (eds)
Academic Press. London p. 418.
- 61- Lagrange, P.H. G.B. Mackaness y T.E. Miller, --
1974. Potention of T-cell mediated immunity-
by selective supression of antibody formation
with cyclophosphamide. J. Exp. Med. 139: -
1529.

TABLA I

Determinación de anticuerpos precipitantes anti-Nocardia brasiliensis por el método de la doble difusión en gel (Ouchterlony), en el suero de animales normales o infectados con Nocardia Brasiliensis, a diferentes intervalos después de la infección con este microorganismo.

Suero de ratones infectados Concentraciones del antígeno

Días	* 500 mg/ml	830 mg/ml
5	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
25	Positivo	Negativo
30	Positivo	Negativo
35	Positivo	Positivo
40	Positivo	Positivo
45	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo
55	Positivo	Negativo
60	Positivo	Negativo
65	Positivo	Negativo
70	Positivo	Negativo
75	Positivo	Negativo

* Concentración de proteína determinada por el método de Lowry y col. (47)

TABLA II

Determinación de aglutininas anti-Nocardia - brasilensis en el suero de animales normales e infectados con Nocardia brasiliensis, a diferentes intervalos después de la infección con este microorganismo.

Suero de ratones infectados (días)	Título
5	Negativo
10	Negativo
15	Negativo
20	1 : 32
25	1 : 64
30	1 : 128
35	1 : 128
40	1 : 128
45	1 : 128
50	1 : 128
55	1 : 64
60	1 : 64
65	1 : 64
70	1 : 64
75	1 : 32

Figura I

Evolución de la respuesta inmune celular en donde se grafican los índices de resistencia en función del tiempo de infección. (tomado de la referencia 56).

Figura II

Resultados obtenidos usando la técnica de hemaglutinación pasiva, en donde se grafican diluciones del suero de animales infectados contra tiempo después a la infección. Se observa que a los 20 días se detecta anticuerpos a una dilución 1:32 a los 25 días del título aumenta a 1:64 a los 30 días aumenta 1:128, a partir de este momento se mantiene el mismo título hasta los 50 días, para descender a los 55 días y mantenerse a este nivel durante el resto del experimento.

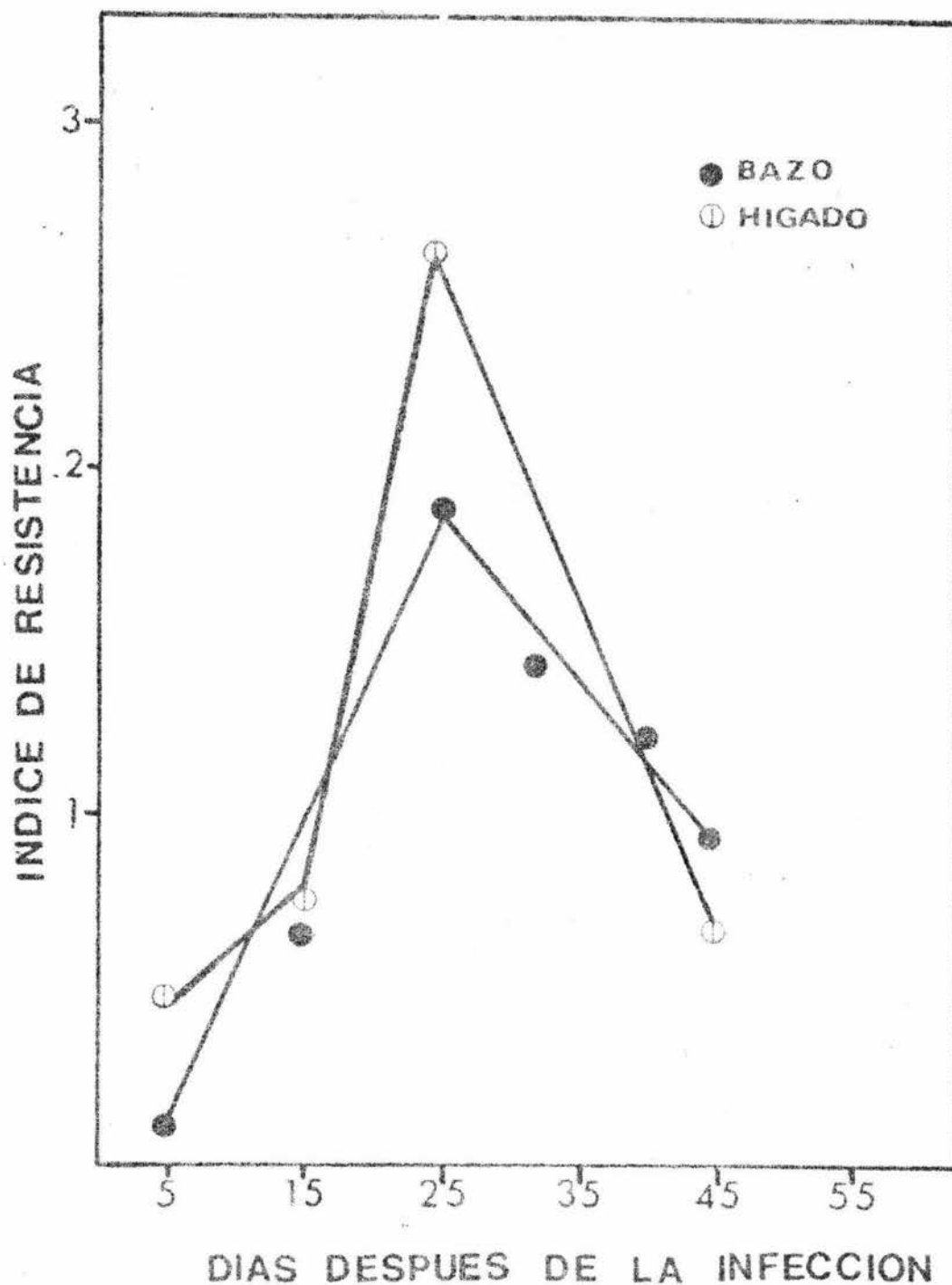
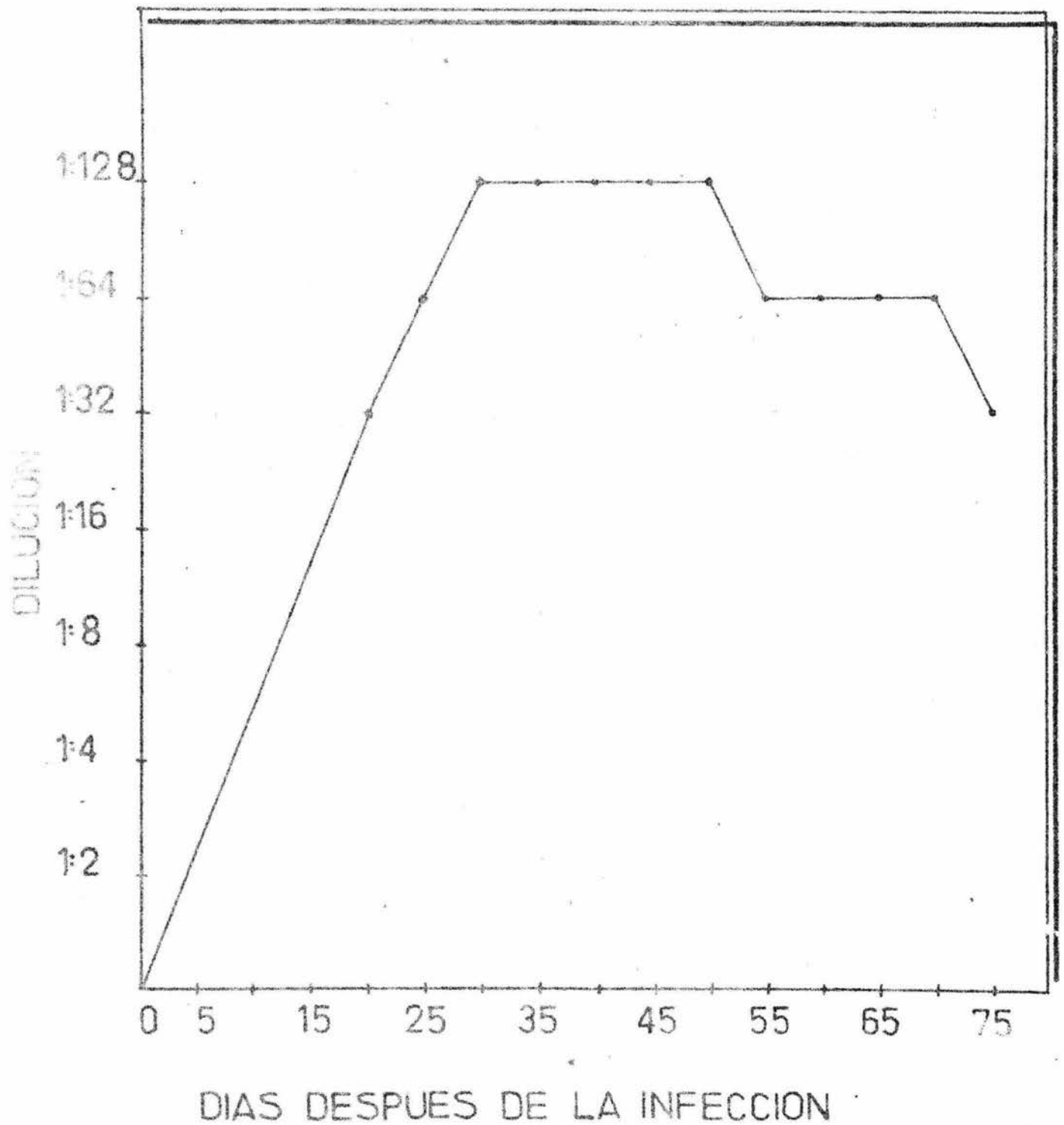


Fig. 1

Cinética de la respuesta inmune mediada por células determinadas por el índice de resistencia a *L. monocytogenes* en animales infectados con *N. brasiliensis* a diferentes intervalos después de la infección. (56).



Cinetica de la Respuesta Inmune Humoral contra Nocardia brasiliensis en suero de animales infectados con este microorganismo a intervalos después de la infección. (Hemaglutinación pasiva).

Fig. II.

Determinación de anticuerpos anti-Nocardia brasiliensis por el método de la doble difusión en -- agar (Ouchterlony) usando un antígeno con una concentración de 830 mg. de proteína por ml.

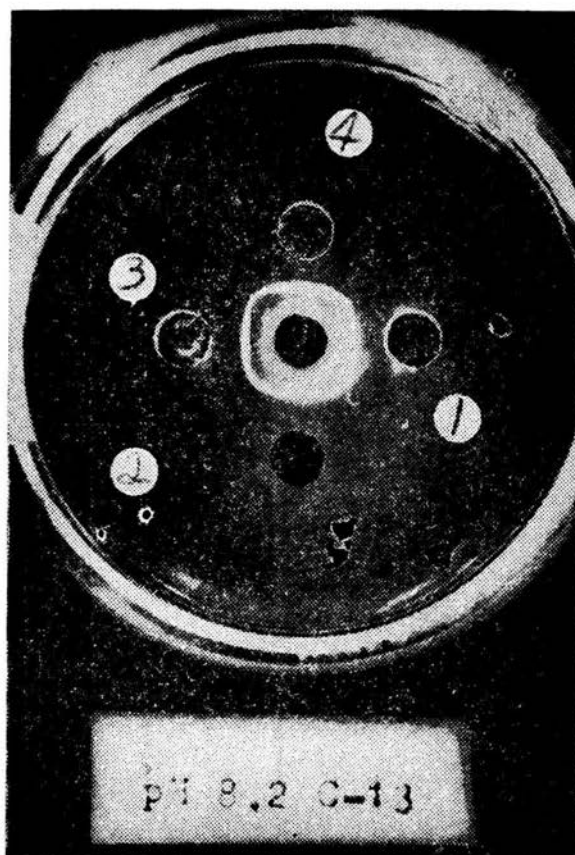


Fig. III

C* Antígeno con una concentración de 830 mg de -
proteína por ml.

- 1) 35 días después de la infección.
- 2) 40 días después de la infección.
- 3) 45 días después de la infección.
- 4) 55 días después de la infección.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ALAIN QUERE
VOCAL: DR. JUAN GENESCA
SECRETARIO: DR. IGNACIO GONZALEZ
SUPLENTE: M. en C. ALEJANDRO BAEZA
SUPLENTE: DR. OCTAVIO REYES

El tema de este trabajo se desarrolló en:

* El Laboratorio de Electroquímica del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

* El Laboratorio de Investigación de la Sección de Química Analítica de la División de Ciencias Químico-Biológicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

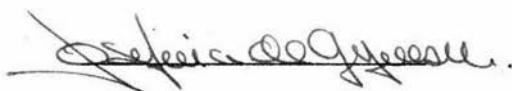
* El Area de Electroquímica de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Sustentante:

Directora:



Q. Alberto Rojas Hernández.



M. en C. Josefina De Gyves M.