

11261

ley
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

RESISTENCIA A LA INFECCION POR NOCARDIA brasiliensis:

EFEECTO DEL ANTICUERPO Y LA INHUNIDAD CELULAR.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA: MA. GUADALUPE RICO ROSILLO.

BIBLIOTECA CENTRAL

MEXICO D.F.

FALLA DE ORIGEN

1983.



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 está 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.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	13
DISCUSION.....	19
BIBLIOGRAFIA.....	25
TABLAS.....	31

INTRODUCCION.

El género Nocardia forma parte de los Actinomicetales, organismos pleomórficos que se caracterizan por ser: bacilos ácido-alcohol resistentes, aerobios, Gram positivos, no esporulados y por formar micelios aéreos. El género Nocardia fué descrito por primera vez en 1888 por Nocard (1), para designar a un organismo aislado de una lesión en el ganado bovino que Trevisan había referido como Nocardia farcinica (2). Posteriormente del mismo tipo de lesiones se aislaron otros actinomicetos como Nocardia brasiliensis, Nocardia mexicana y Nocardia pelletieri. Sin embargo González-Ochoa y col. (3) encontraron que los cultivos de N. brasiliensis y N. mexicana eran morfológica y biológicamente idénticos lo cual permitió considerar a N. mexicana como un sinónimo de la forma sudamericana previamente descrita. Dentro de este género existen tres especies que son patógenas para el hombre, ellas son Nocardia brasiliensis, Nocardia caviae y Nocardia asteroides. Las dos primeras inducen los micetomas que serán descritos posteriormente. N. asteroides es responsable de la nocardiosis pulmonar o pseudotuberculosis que se produce por la inhalación del microorganismo, el cual se establece en los pulmones originando un cuadro clínico semejante a la tuberculosis. Estos microorganismos han sido aislados del suelo en diferentes estados de la República Mexicana (4,5,6,7,8,) y aunque son capaces de infectar animales de experimentación, las manifestaciones clínicas son diferentes de las que se presentan cuando se inocula un microorganismo aislado de un paciente infectado (9).

N. brasiliensis, microorganismo que nos ocupa, es el agente causal del

micetoma que se observa no solamente en países de América del Sur y México, sino también en África. El micetoma es una infección destructiva y crónica de la piel, tejido subcutáneo, fascias y hueso, que produce una tumefacción localizada.

N. brasiliensis presente en la tierra (5), probablemente penetre en los tejidos del pie descalzo y de la pierna, después de traumatismos. En el individuo las lesiones se ven más frecuentemente en pie, pierna, rodilla y musculo y con menor frecuencia en las extremidades superiores. En México se han visto pocos casos con localizaciones dorsolumbares, escapulares, pectorales y con diseminación a pulmón y médula espinal(9). La patología gruesa del micetoma depende del área anatómica afectada por la enfermedad y el agente etiológico involucrado. Hay algunas diferencias importantes en la apariencia de las fístulas, la reacción tisular y la invasión a otros tejidos; el drenaje de los trayectos fistulosos es característicamente seroso o serosanguinolento, aunque se pueden agregar infecciones bacterianas, en cuyo caso la secreción es de características purulentas, complicándose con ello el aspecto clínico y patológico de la enfermedad. A pesar del agente etiológico implicado las lesiones son histológicamente similares; los gránulos se observan generalmente en el centro del absceso, el cual se encuentra rodeado por una gran acumulación de neutrófilos en diferentes estados de degeneración, Alrededor del absceso hay una gran zona de fibrosis y tejido de granulación, el cual es rico en capilares, células epitelioides, macrófagos y células gigantes multinucleadas. Los gránulos Actinomicósicos particularmente los producidos por N. brasiliensis, se caracterizan por su coloración blanca, en ocasiones a-

marillenta, los cuales miden generalmente menos de un mm de diámetro, son suaves, lobulados y pueden algunas veces presentar en su periferia la organización de los filamentos que a la microscopía se observan como clavos; dichos gránulos se pueden encontrar aislados o formando conglomerados. Es posible también observar filamentos ácido-alcohol resistentes que se fragmentan, dando lugar a los conocidos cuerpos bacilares (9).

Se desconoce con exactitud la evolución de la enfermedad así como el papel que juega la respuesta inmune en el huésped infectado. Reportes varios indican que la Nocardia es fagocitada por células polimorfonucleares y por macrófagos. Teóricamente la Nocardia fagocitada puede también ser digerida y eliminada o bien puede permanecer viable y persistir o aún replicarse dentro de las células e iniciar una respuesta inmune celular o humoral (10,11). Los organismos que crecen intracelularmente, están protegidos de factores humorales y frecuentemente pueden estimular una inmunidad celular (12).

Tanto la respuesta humoral como la celular que se presenta en individuos o animales infectados con N. brasiliensis ha sido estudiada por varios autores (13,14). Así, se ha reportado la hipersensibilidad de tipo tardío (HTT) a diferentes antígenos obtenidos de Nocardia, Globe y col. (15) y Bojalil y Magnusson (16), realizaron experimentos donde usaron antígenos obtenidos del medio de cultivo de Nocardia y se observaron reacciones cruzadas en pacientes tuberculosos. Asimismo, Ortiz-Ortiz y col. (17,18,19), utilizando antígenos obtenidos del material somático (extracto citoplasmático purificado, proteína ribosomal y polisacáridos), lograron distinguir animales sensibilizados con N. brasiliensis de aquellos sensibilizados con N. asteroides. Posteriormente

Ortiz-Ortiz y Bojalil (20) ensayaron estos extractos por intradermoreacción en pacientes con lepra, tuberculosis y en individuos sanos, y no observaron reacciones inflamatorias demostrando de esta manera su especificidad para N. brasiliensis. Con estos antígenos se obtuvo tanto in-vitro como in-vivo, una mayor especificidad que la observada con los preparados a partir del medio de cultivo. Se ha investigado también la participación de los mecanismos de inmunidad celular en animales infectados con N. brasiliensis y se ha reportado un aumento en la actividad fagocítica y en la digestión intracelular de los macrófagos inmunes (21).

Ortiz-Ortiz, Contreras y Melendro (22), realizaron estudios sobre la dinámica de la HTT en animales infectados con Nocardia, por medio de la prueba cutánea (PC) observando que la reacción alcanzaba su mayor intensidad alrededor de los días 20 a 25 después de la infección y posteriormente disminuía. El máximo de reactividad celular encontrada en estos experimentos coincidía con la reducción del tamaño del micetoma; de la misma manera, la reducción de la HTT se asociaba con un aumento en el tamaño del tumor, concluyendo en muchos casos con la esfacelación del miembro infectado. Asimismo, Melendro y col. (21) midieron cambios en la resistencia del huésped infectado con N. brasiliensis, usando como indicador de esta propiedad la fagocitosis, la digestión intracelular de Listeria monocytogenes de los macrófagos de animales infectados. En este estudio de protección cruzada se encontró inicialmente en el día 15, un aumento en la digestión intracelular y posteriormente, en el día 20, un aumento en la fagocitosis. Los resultados muestran que los animales infectados con Nocardia presentan una estrecha relación entre la

reacción de HTT al antígeno de Nocardia y el incremento en la resistencia cruzada a L. monocytogenes, sugiriendo una relación entre estas características y la inmunidad mediada por células (23).

En lo que respecta a la inmunidad humoral, se ha demostrado la presencia de anticuerpos tanto en animales infectados con N. brasiliensis como en pacientes con micetoma actinomicótico. Bojalil y col. (23,24) demostraron por precipitación la presencia de anticuerpos contra el polisacárido de N. brasiliensis. González-Ochoa y col. (25) hicieron una correlación entre los títulos de anticuerpos detectados por fijación de complemento y la evolución clínica de pacientes con micetoma; los autores observaron que el aumento de los anticuerpos acompañaba a un mal pronóstico de la enfermedad; por el contrario una disminución de los mismos era indicativo de un buen pronóstico.

Ximenez y col. (26) encontraron que la vacunación de ratones con Nocardia o con Bacilo Calmette-Guerin (BCG) resulta en la formación de anticuerpos contra los antígenos de Nocardia (26). Estos datos indican la existencia de una reactividad cruzada entre los antígenos de ambos organismos. Sin embargo, un hallazgo importante es que solamente el grupo inmunizado con Nocardia es resistente a la infección por Nocardia. Esta resistencia correlaciona con una mayor HTT a los antígenos de Nocardia que a los de BCG, lo cual pone de manifiesto la importancia de la inmunidad mediada por células (IMC) en la protección contra las infecciones por Nocardia (21). Los resultados son similares a los que se presentan en otras infecciones causadas tanto por bacterias como por parásitos intracelulares (27,28,29).

Las evidencias anteriores sugieren que alteraciones en la IMC pueden ser

importantes en la patogénesis de la infección por Nocardia (30). Así, se ha encontrado que ratones atímicos (desnudos), infectados con N.brasiliensis, mueren más rápido que los ratones normales, lo que apoya la importancia de los linfocitos T en la resistencia a la infección por Nocardia (30). Sin embargo, la falta de células T en los ratones desnudos afecta no sólo la respuesta de IMC, sino también la respuesta de tipo humoral.

El objetivo de este estudio es determinar el papel que el anticuerpo y la célula T tienen en la resistencia a la infección experimental por N.brasiliensis.

MATERIALES Y METODOS.

Animales. Se usaron ratones hembras BALB/c singénicos de 4 a 6 semanas de edad, de una colonia mantenida en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se alimentaron con tabletas de Purina (Purina de México, S.A. de C.V.), y agua ad libitum. Los animales se distribuyeron en diferentes grupos procurando que su peso fuera homogéneo.

N. brasiliensis. Se usó la cepa de N. brasiliensis UPHG-24, obtenida de un cultivo mantenido en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, (31). La bacteria se propagó en un medio de Proskauer y Beck modificado por Youmans y Karlson (32).

Obtención del antígeno. El antígeno utilizado se preparó de acuerdo a los métodos previamente reportados (20). El proceso consiste en lo siguiente: La cepa de N. brasiliensis se creció en medio de Proskauer y Beck modificado por Youmans (32) a 37°C. Las bacterias se cosecharon 21 días después de la incubación, se lavaron con agua destilada caliente y se desengrasaron con una mezcla de alcohol-éter (1:1), los organismos se secaron y se suspendieron en una solución amortiguadora de tris-hidroximetil aminometano (Tris) 0.01M, pH 7.4, que contenía 0.01 M de acetato de magnesio (aproximadamente 50 g de Nocardia en 200 ml de Tris). Se agregó desoxirribonucleasa a una concentración de 2 ug/ml y la suspensión se fraccionó en un aparato Sorvall-Ribi (modelo RF-1) a una presión de 15000- 30000 psi. Esta suspensión se mantuvo toda la noche a 4°C. Posteriormente las células se separaron de los restos celulares por centrifugación a 3020 g durante 60 min, el sobrenadante se cen-

trifugó de nuevo a 12000 g por 30 min. y después a 48000 g por 15 min. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 144000 g por 3 h. El sobrenadante obtenido se dializó contra agua, se liofilizó y se congeló a -20°C. Este antígeno se usó en la titulación de anticuerpos contra Nocardia y en la prueba de HTT (14).

Ratones depletados de células T (B). Para eliminar las células T, los animales de 4 semanas se timectomizaron, posteriormente se irradiaron letalmente (900 R) (33) y finalmente se reconstituyeron por vía intravenosa con 5×10^7 células de médula ósea contenida en 0.3 ml de Solución Salina Balanceada (SSB), obtenidas de ratones normales singénicos de la misma cepa que habían sido previamente tratadas con suero anti-timocito y complemento (34). Al mismo tiempo se irradiaron los animales controles. Los animales se infectaron una semana después de la transferencia celular. Cuando los animales B se sacrificaron se verificó la presencia de residuos de tejido tímico; si se encontraban, eran excluidos del experimento.

Infección con Nocardia. Los animales se inocularon en el cojinete plantar con 0,05ml de una emulsión que contenía 2×10^8 células de N. brasiliensis viables en solución de Na Cl 0.15 M, incorporada en adyuvante incompleto de Freund (AIF) (Difco Laboratories, Detroit, Mich) como se ha descrito previamente (35). Los cojinetes infectados se midieron y examinaron periódicamente para determinar la presencia del micetoma. El grosor se midió con un microcalibrador (The L.S. Starret Co, Athol, Mass). Las lecturas se compararon con las obtenidas en animales inyectados solamente con el adyuvante. Los valores fueron expresados en mm. La respuesta inflamatoria en los animales

infectados con Nocardia se midió de la misma manera. Las evaluaciones finales se realizaron generalmente 3 semanas después de la infección. La respuesta inflamatoria se evaluó en una escala de 0-4 (36) como se describe en la tabla I.

Histología. En cada animal se hicieron estudios histológicos del miembro infectado. Para su observación los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (36).

Obtención de anticuerpos. El suero anti-Nocardia se preparó inoculando lotes de ratones con 2×10^8 células de Nocardia viables suspendidas en AIF. La inmunización se realizó inyectando 0.05 ml en el cojinete plantar; 10 días después se repitió la dosis en el otro cojinete plantar, usando ahora N. brasiliensis muerta. A diferentes intervalos se tomaron muestras de sangre del plexo retro-orbital y se detectó la presencia de anticuerpos anti-Nocardia mediante la prueba de doble difusión en agar (23,37). La prueba fue positiva en el período comprendido entre los días 25 y 45 después de la inmunización. Los animales se sangraron 40 días después de la infección y los anticuerpos se precipitaron con una solución de sulfato de amonio (38,39).

Nocardia opsonizada. Se preparó mezclando 2×10^8 células de N. brasiliensis viables con 3 mg de anticuerpo específico (ya que se vio que era la concentración que mejor opsonizaba). Para su inoculación la Nocardia se lavó 3 veces y se resuspendió en solución de Na Cl 0.15 M. Este método resultó adecuado para cubrir a la Nocardia ya que bajo condiciones similares el anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (40,41) se combinó con la Nocardia in-vitro, como pudo evidenciarse al microscopio de fluorescencia. La

bacteria así tratada se inoculó a cada ratón en un volumen de 0.05 ml .

Conjugación del anticuerpo anti-Nocardia con isotiocianato de fluoresceína. El anticuerpo anti-Nocardia se marcó con isotiocianato de fluoresceína (41). La reacción entre el isotiocianato de fluoresceína y el anticuerpo se llevó a cabo mezclándolos en una proporción de 1:20 (la concentración del anticuerpo fué de 1%) respectivamente, usando una solución amortiguadora de carbonatos 0.5 M pH 9; la mezcla se incubó 60 min a 4°C con agitación constante. La proteína conjugada se dializó contra un amortiguador de fosfatos isotónico 0.15 M pH 7, hasta que el líquido dializado estuvo libre de colorante.

Determinación de anticuerpos. Se usó hemaglutinación indirecta para titular los anticuerpos en sangre obtenidos del plexo retro-orbital de animales infectados con Nocardia. Se sensibilizaron eritrocitos de carnero (SRBC) con un extracto de Nocardia (EN), por medio de glutaraldehido y ácido tánico como ha sido previamente descrito (42). Con este objeto, se trató un volumen de una suspensión de SRBC al 5% con glutaraldehido y ácido tánico (5 mg/100 ml de PBS 0.01 M pH 7.2), se mezcló con un volumen igual de EN que contenía 1mg/ml de proteína. Las células se agitaron 60 min a 24°C y se lavaron 4 veces con un amortiguador de fosfato isotónico 0.01 M pH 7.2 . Se colocaron volúmenes de 0.1 ml de la suspensión de SRBC en placas de hemaglutinación (Cooke Engineering Co, Alexandria VA) y se agregó 0.1 ml de las diferentes diluciones del suero en estudio. Las placas se incubaron a 4°C durante 24 h y se determinaron los títulos de hemaglutinación.

Eliminación de linfocitos con receptores para Nocardia. Con el objeto de eliminar específicamente la población de linfocitos con receptores para EN se siguió el método descrito previamente por Walker y col. (43). La técnica consiste en incubar 1×10^9 SRBC cubiertos con el EN (SRBC-EN) con 5×10^7 células de bazo suspendidas en un ml de BSS enriquecida con 5% de suero fetal bovino (BSS-S) durante 30 min. Después de la incubación las células se centrifugan a 140 g por 3 min a 4°C y se dejan por 30 min a 4°C ; Finalmente el paquete celular se resuspende suavemente con una pipeta Pasteur. Las células que forman rosetas con SRBC-EN se separan de las células que no forman rosetas por centrifugación en un gradiente de Ficoll-hypaque (44) a 200 g por 8 min a 20°C . Las células que forman rosetas se van al fondo del gradiente mientras las que no hacen, es decir, las células que no llevan inmunoglobulina específica para el EN, permanecen en la interfase del gradiente. Las células que permanecen en la interfase se aspiran y se lavan dos veces con BSS-S. Esta población de linfocitos carente solamente de aquellos con receptores para el EN se usó en los estudios de transferencia. Esta última fué incapáz de formar rosetas con SRBC-EN.

Determinación de linfocitos formadores de rosetas con SRBC-EN. La cuantificación de estos linfocitos se hizo por medio de examen microscópico considerando como roseta a aquel linfocito que tuviera 3 o más SRBC unidos a su superficie. El número de rosetas se determinó por cuenta total en la cámara de Neubauer.

Reacción de HTT. Se inocularon 50 ug de EN en 50 ul, en el cojinete plantar derecho de los animales normales; en los animales infectados con N.

brasiliensis la prueba se realizó en el cojinete no infectado, Para excluir la posibilidad de una reacción inmediata el sitio de inyección se examinó 6 y 8 horas después. A las 24 h , nuevamente se midió el grosor del cojinete inoculado, con un microcalibrador. Se hicieron también estudios histológicos de los cojinetes inoculados (17, 36).

Análisis estadístico. Se usaron las pruebas de Fisher (47) para determinar la homogeneidad de las varianzas de ambos grupos. Cuando fueron homogéneas se aplicó la prueba t de Student (47) para estimar la significancia de las diferencias. Cuando las varianzas fueron heterogéneas se usó la prueba U de Mann-Whitney (47) con el fin de evaluar las diferencias.

RESULTADOS

Infección con Nocardia. Ratones inoculados en el cojinete plantar con 2×10^8 células de Nocardia viables incorporadas en AIF, presentaron una reacción inflamatoria inespecífica la cual también se evidenció en los ratones controles, inoculados solamente con AIF. Sin embargo, los animales infectados con Nocardia mantuvieron una inflamación significativa, la cual fué mucho mayor que la de los animales que recibieron solamente el adyuvante. La respuesta inflamatoria subsecuente y la presencia de micetoma se analizó después de 3 semanas de la infección.

Los estudios histológicos de la zona infectada mostraron inicialmente un infiltrado de células polimorfonucleares, Después de una semana los cortes mostraron una reacción inflamatoria de tipo granulomatoso, sin gránulos actinomicósicos. Sin embargo, los estudios realizados después del día 14 mostraron la presencia de micetoma, que consistió esencialmente de un granuloma en cuyo centro se apreciaban pequeños abscesos rodeados de gránulos actinomicósicos; en algunos casos se apreció caries en el hueso que contenía el infiltrado granulomatoso. Las lesiones multilobulares presentaron zonas bien definidas con una masa central de organismos ácido-alcohol resistentes formando un gránulo, rodeado por granulocitos e histiocitos. El número de lóbulos aumentó a lo largo de la infección y después de 2 semanas de la infección se observaron a su alrededor macrófagos espumosos, los cuales aumentaron después de tres semanas de infección. En el citoplasma de los macrófagos se encontró gran número de microorganismos. Los animales control que recibieron únicamente

salina en AIF mostraron inicialmente una reacción inflamatoria inespecífica caracterizada por un infiltrado celular de polimorfonucleares que generalmente desapareció después de 2 semanas.

Efecto de la eliminación de células T sobre la resistencia a la infección por *N. brasiliensis*. Las células T de ratones se eliminaron por timectomía (Tx), irradiación y reconstitución con células de médula ósea (ratones B), los ratones B no formaron anticuerpos cuando se les inoculó un antígeno timo dependiente (eritrocitos de burro). Estos ratones B se infectaron con 2×10^8 organismos de Nocardia. La alta susceptibilidad de estos animales a la infección por Nocardia se manifestó por la pérdida espontánea de la pata infectada. A los 14 días post infección, 7 de los 14 ratones infectados habían perdido la pata infectada y para el día 21, otros 5 animales la perdieron. Estos animales no presentaron anticuerpos hemaglutinantes anti-Nocardia a lo largo del experimento. Histológicamente no hubo diferencias cualitativas con aquellos animales que perdieron el miembro infectado, aunque el infiltrado celular fué de menor magnitud. Por otro lado, el grupo control no timectomizado, reconstituido con células B e infectado con Nocardia, sólo presentó pérdida del miembro en 2 animales y todos presentaron anticuerpos hemaglutinantes a Nocardia y a EB (Tabla II). Histológicamente todos los animales mostraron micetoma. Los ratones B, sin células T parecen ser más susceptibles a la infección por Nocardia que aquellos animales que presentaron su aparato inmunológico intacto.

Los ratones B que recibieron solamente el AIF mostraron una reacción inflamatoria de mayor magnitud que los animales normales. Sin embargo, la

inflamación sólo fué significativa a los 7 días después de la inoculación.

Estos resultados sugieren que las células T ya sea por medio de la inmunidad humoral o celular juegan un papel importante en la resistencia a la infección por Nocardia.

Papel del anticuerpo en la infección por Nocardia. Con el objeto de determinar el papel que el anticuerpo tiene durante la infección por N. brasiliensis, se realizaron estudios en los cuales se administró pasivamente anticuerpo anti-Nocardia en el curso de la infección de ratones con N. brasiliensis. Inicialmente se realizó un experimento en el cual se administró pasivamente anticuerpo anti-Nocardia un día antes, 7 y 14 después de la infección con N. brasiliensis (con el objeto de mantener elevado el nivel de anticuerpo). En los ratones que recibieron pasivamente el anticuerpo, se encontraron anticuerpos anti-Nocardia hemaglutinantes. Los títulos de anticuerpos en los ratones B y los normales se determinaron los días 0, 6, 13 y 20 después de la infección y fueron similares en ambos grupos (Tabla III). El rango de los títulos de anticuerpos varió entre 1:64 y 1:512. Los resultados obtenidos indican que el anticuerpo no parece tener un efecto protector, sino por el contrario, parece favorecer la infección, ya que los animales B que recibieron anticuerpo presentaron una pérdida de la pata infectada en menos tiempo que los animales similarmente tratados (Tabla IV).

Se hicieron otros estudios para determinar si el anticuerpo anti-Nocardia podía proteger. Estos consistieron en administrar el anticuerpo pasivo en forma similar al experimento anterior y además infectar con Nocardia pero ahora opsonizada. Como puede observarse en la Tabla V, el tratamiento

combinado de anticuerpo pasivo y de Nocardia opsonizada, no fué más efectivo en la inducción de resistencia que la sola transferencia de anticuerpo e infección con Nocardia viable sin cubrir con el anticuerpo. Por el contrario, los animales normales y B así tratados tendieron a aumentar la pérdida espontánea del miembro infectado. Así, después de 12 días de infección, el 50% de los ratones B perdieron la extremidad infectada, y el 100% de ellos la habían perdido para el día 18. Los ratones normales tratados idénticamente tuvieron después de tres semanas de la infección con Nocardia un 80% de pérdida del miembro infectado. Sin embargo, ni el anticuerpo administrado pasivamente al huésped, ni la bacteria cubierta con anticuerpo, disminuyeron la presencia del micetoma, por el contrario ambos favorecieron la infección y la pérdida de la pata infectada.

HTT en ratones infectados con N.brasiliensis. Esta prueba se hizo a intervalos de 5 días después de la infección. La reacción tardía aumentó hasta alcanzar su máximo en los días 20-25. Posteriormente la HTT disminuyó. Los ratones normales no mostraron ninguna respuesta al antígeno de Nocardia.

Respuesta inmune contra EB en ratones normales y B. Para comprobar si los ratones B estaban desprovistos de células de timo se procedió a inmunizarlos con un antígeno timo dependiente y a determinar su capacidad de formar anticuerpos contra el mismo. La determinación de anticuerpos se realizó por el método de Jerne (45,46). Comparativamente se inmunizó un grupo de ratones normales. Como puede verse en la Tabla VII, los ratones B fueron incapaces de formar anticuerpos contra EB. Por otra parte los ratones normales formaron anticuerpos contra dicho antígeno.

Efecto de la eliminación específica de linfocitos B con receptores para Nocardia. Células de bazo de ratón con receptores para EN se aislaron de animales normales por medio de incubación con SRBC cubiertos con el extracto de Nocardia. Las células B con estos receptores formaron rosetas con SRBC-EN, permitiendo de esa manera su separación en un gradiente de densidad. Todas las demás células como son: linfocitos B no específicos para Nocardia y linfocitos T permanecieron en la interfase. La idea presupone que este procedimiento podría prevenir la formación de anticuerpos contra EN permitiendo la producción de otras inmunoglobulinas no alteradas.

Después de la irradiación letal (900 R) un grupo de ratones se reconstituyó por vía i.v. con 5×10^7 células de bazo de las cuales se habían eliminado linfocitos con receptores específicos para EN y otro con células de bazo totales (no tratadas). Una semana después los ratones se inyectaron en el cojinete plantar con 2×10^8 organismos de Nocardia. Se puede observar que los ratones que se inocularon con células sin linfocitos B con receptores específicos para EN tuvieron menor inflamación en la pata infectada que aquellos ratones no tratados e infectados con Nocardia en la misma forma.

A los 50 días de iniciado el experimento, los ratones reconstituidos con células sin linfocitos B específicos para Nocardia no presentaron micetoma, de acuerdo al criterio histológico (Tabla VI). Por otro lado los ratones controles que recibieron células de bazo totales desarrollaron un micetoma típico y cinco perdieron el miembro infectado (Tabla VI).

La Tabla VII muestra que los sueros de los ratones irradiados y reconstituidos con células linfoides que no contenían células B específicas para

Nocardia, no producen anticuerpos hemaglutinantes contra EN después de 50 días de la infección. En cambio los sueros de los ratones reconstituídos con células totales de bazo tienen títulos de anticuerpos hemaglutinantes en un rango de 1:16 a 1:64, después de 25 días de la infección y estos títulos permanecen así hasta los 50 días. Es necesario mencionar que los ratones reconstituídos con células de bazo sin linfocitos B con receptores para EN responden normalmente a otros antígenos no relacionados, como por ejemplo EB (Tabla VII). Las células formadoras de anticuerpos contra EB fueron similares en los ratones reconstituídos con células linfoides sin células B específicas para Nocardia o en los transferidos con células totales de bazo y posteriormente inmunizados con EB, lo cual nos indica que no existe ninguna alteración en la respuesta inmune a antígenos no relacionados. A continuación se determinó si los ratones que no formaron anticuerpos después de la infección podían producir reacciones de HTT. La prueba se hizo inoculando EN en el cojinete plantar de los ratones. Los ratones para la prueba se escogieron arbitrariamente. Una se realizó el día 25, tiempo en el que se ha reportado que la respuesta de HTT es más alta (14); la otra se hizo 50 días después de la infección. Ambos grupos presentaron una reacción de HTT positiva en los días 25 y 50 después de la infección (Tabla VII), mostrando así que la reactividad de las células T para el EN era normal y que la presencia o ausencia del anticuerpo contra EN, no afecta significativamente la inducción o la expresión de la IMC a Nocardia.

DISCUSION

Los datos que aquí se presentan sobre la caracterización de la respuesta inmune en animales infectados con N. brasiliensis indican que, la inmunidad por linfocitos T es importante en el mecanismo de defensa de tales huéspedes infectados y que el anticuerpo no parece participar de una manera significativa en el mismo. Los resultados iniciales que involucran a las células T provienen de experimentos con ratones deficientes en estas células y que se infectaron con N. brasiliensis y en donde se vió que la protección a la infección era casi nula. Los resultados indican que ratones B (deficientes en células T) son más susceptibles a la infección por N. brasiliensis que aquellos con aparato inmune completo. Aunque los ratones B muestran una reacción inflamatoria de menor intensidad que los animales normales, sus lesiones tienden a ser más destructivas.

Estos resultados correlacionan con los de Folb y col, (30), donde se usaron ratones atímicos (desnudos nu/nu). Sin embargo, en ambos experimentos la carencia de células T es capaz de afectar no solamente la inmunidad celular sino también la inmunidad humoral. Cuando los ratones B, incapaces de formar anticuerpo contra Nocardia, se transfirieron pasivamente con tales anticuerpos, ellos fueron totalmente incapaces de controlar la infección. En tales animales la infección progresó rápidamente, y el miembro infectado con la bacteria sufrió una esfacelación. Esto ocurrió más rápido que en los ratones B y los normales que no habían recibido anticuerpo pasivamente (Tabla III),

Los resultados obtenidos con la Nocardia opsonizada son interesantes (Tabla III). Uno esperaría que la Nocardia opsonizada sería más rápidamente fagocitada, y promovería la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo que ocasionaría la destrucción del organismo dentro del macrófago. Sin embargo, en la presencia de anticuerpo la Nocardia prolifera y produce lesiones en el miembro infectado, sugiriendo que la fagocitosis y la fusión fagosoma-lisoso- ma no son suficientes para destruir a este microorganismo ácido-resistente. Folb y col. (30) han reportado que aunque en los animales infectados no se observa la fusión del fagosoma-lisosoma, sí se presentan cambios progresivos y degenerativos de la Nocardia. Los hallazgos en pacientes con micetoma no difieren de los aquí reportados, ya que el anticuerpo anti-Nocardia no parece ser protector sino por el contrario de mal pronóstico (25). Los experimentos discutidos anteriormente no demuestran que el anticuerpo tenga ningún papel importante en la protección contra Nocardia; asimismo, tampoco apoyan la participación directa de células T en tal resistencia.

Todo parece indicar que bajo las condiciones estudiadas el anticuerpo facilita la infección. Este mecanismo de acción ha sido descrito en sistemas tumorales (48) y la explicación que se ha dado es que el anticuerpo enmascara los determinantes antigénicos de las células tumorales, evitando tanto el estímulo antigénico del aparato inmunocompetente como el reconocimiento inmunológico de dichas células (49), lo que resulta en la supervivencia de las células tumorales. En los experimentos que nos ocupan, un mecanismo similar puede estar evitando el reconocimiento de la Nocardia por las células inmunocompetentes una vez que se ha combinado con el anticuerpo específico, facilitando así

su desarrollo en el sitio de inoculación .

Los antígenos de Nocardia pueden inducir un bloqueo inmunológico incrementando la producción de anticuerpos, como ocurre con otros inmunógenos, o con antígenos tumorales o de tejido(48). Así, el anticuerpo puede abolir la IMC al unirse a la Nocardia bloqueando de esa manera su reconocimiento por las células inmunocompetentes del huésped. En los ratones la transferencia pasiva de anticuerpos a Nocardia aumenta el crecimiento del microorganismo y los conduce a la pérdida espontánea del miembro infectado, proporcionando de esa manera una prueba adicional para el último mecanismo de facilitación propuesto. Sin embargo no se sabe con certeza si la infección por Nocardia está realmente asociada con la presencia de anticuerpos bloqueadores.

Otra posibilidad para explicar la falta de protección puede ser la formación de complejos antígeno anticuerpo, que interfieren con la función de linfocitos T; o bien que existe una regulación en la producción y función de las células mediadoras de HTT.

Aunque en el huésped el uso de adyuvantes aumenta la susceptibilidad a la infección por Nocardia, el desarrollo de la infección es el mismo que el observado en los ratones infectados con N. brasiliensis en solución salina; ambos presentan el mismo patrón histológico y no existen diferencias en la aparición del micetoma. Además las características histológicas son similares a las que se observan en humanos infectados con N. brasiliensis.

Los resultados presentados aquí también indican que la respuesta humoral no contribuye significativamente al mecanismo de resistencia contra Nocardia. La respuesta de los animales a Nocardia se determinó por hemaglutinación.

Los títulos de anticuerpo en el suero no correspondieron a lo esperado, considerando que Nocardia es como Mycobacterium, un buen adyuvante y que contiene substancias que le dan tales propiedades (50,51), además también es un activador policlonal.

Sin embargo existen varias posibilidades que expliquen los títulos bajos de anticuerpos en animales infectados con N. brasiliensis. La primera es que el EN utilizado para sensibilizar a los SRBC no contenga todos los antígenos presentes en el microorganismo. La segunda, es que la Nocardia propicie la formación de células T supresoras, lo cual puede alterar la respuesta inmune del huésped infectado (manuscrito en preparación). La tercera es que el anticuerpo circulante se enlace al sitio de infección donde se encuentra la Nocardia, como ocurre en otras condiciones patológicas.

Experimentalmente se ha encontrado que ratones inmunizados con BCG o con Nocardia, presentan títulos de anticuerpos similares (50). A pesar de la similitud en títulos de anticuerpo se ha visto que estos animales tienen un comportamiento diferente en la resistencia al desafío con Nocardia. Los ratones inmunizados con Nocardia son más resistentes a la infección con el organismo homólogo que aquellos inmunizados con BCG, ya que los mecanismos de resistencia que se desarrollan durante las reinfecciones homólogas con microorganismos intracelulares, son más potentes debido a que se encuentran íntimamente ligados con un evento inmunológico específico que es el desarrollo de la hipersensibilidad. La idea era eliminar la respuesta humoral específica a Nocardia por medio de la remoción de las células B específicas para tal microorganismo. Nuestros estudios de eliminación de clones específicas para

Nocardia apoyan la hipótesis de que el anticuerpo contra Nocardia facilita la infección en el huésped. El número de células que formaron rosetas no varía de los reportados en otros sistemas (43), si se considera que el extracto de Nocardia contiene varios antígenos y que cada uno de estos contribuye a la formación de las mismas por las células linfoides. Como ya se mencionó el EN usado en la formación de rosetas B, puede no contener todos los antígenos del microorganismo; sin embargo, los resultados obtenidos permiten aseverar que los antígenos importantes están presentes en el mismo, ya que la eliminación de las células B con receptores para Nocardia protege al animal contra la infección. A pesar de su incapacidad para formar anticuerpos, los animales transferidos con la población depletada en células B fueron capaces de dar una respuesta de HTT al antígeno de Nocardia, similar a la presentada por los animales normales infectados. Sin embargo, a diferencia de los últimos, los ratones transferidos con la población depletada fueron capaces de controlar la infección por Nocardia. Estos resultados apoyan el papel facilitador del anticuerpo y sugieren que la HTT, en ausencia de anticuerpo parece ser efectiva en controlar la infección, estableciendo la importancia de la IMC en esta enfermedad. El cojinetar plantar de los ratones que recibieron células de bazo sin linfocitos con receptores para Nocardia y que se infectaron con Nocardia, no presentaron ninguna característica macro o microscópica de micetoma. Por otro lado, los ratones transferidos con la población total del bazo presentaron gránulos actinomicóticos característicos de la infección.

La importancia de la IMC y del anticuerpo en el huésped infectado con

N. brasiliensis está delineada en nuestros experimentos con ratones depletados de células T y en aquellos depletados de células B específicas para Nocardia. Los resultados indican que la IMC es esencial en la infección producida por Nocardia y que el anticuerpo facilita el crecimiento de este organismo en el huésped infectado.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Nocard, E. Note sur la maladie de boeufs de la Guadeloupe, connue sous le nom de forcín. Ann. Inst. Pasteur, Paris. 2: 293, 1888.
- 2.- Trevisan, V. I Genere e le especies delle Bacteriaceae, Milán, 1889.p 36.
- 3.- González-Ochoa, A. y Vásquez-Hoyos, A. Relaciones serológicas de los principales actinomyces patógenos. Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. 13: 177, 1953.
- 4.- González-Ochoa, A. Mycetomas caused by Nocardia brasiliensis, with a note on the isolation of the causative organism from soil. Lab. Invest. 11: 1118, 1962.
- 5.- González-Ochoa, A. y Sandoval, M.A. Aislamiento de Nocardia brasiliensis y Asteroides a partir de suelos. Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. (Mex.) 20: 147, 1968.
- 6.- Mejorada, B. A. Aislamiento de Nocardia brasiliensis de diversos tipos de tierra. Tesis profesional, Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Michoacana de San Nicolás, México, 1972.
- 7.- Ortíz-Ortíz, L., Contreras, M.F. y Bojalil, L.F. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from Nocardia. Sabourauda. 10: 147, 1972.
- 8.- González-Ochoa, A. Geografía de las micosis profundas. Rev. Salud Pública. 35: 85, 1975.
- 9.- Rippon, J.W. The Pathogenic Actinomyces. Medical Mycology. E. B. Saunders Company, Philadelphia, 1974. p 48.
- 10.- Krick, J.A. y Remington, J.S. Resistance to infection with Nocardia - asteroides. J. Inf. Dis. 131: 665, 1975.

- 11.- Beaman, B.L. Possible mechanism of nocardial pathogenesis. En The Biology of the nocardiae. Editado por M. Goodfellow, G.H. Brownell y J.A. Serrano. Academic Press. New York. p 386.
- 12.- North, R.J. Cell-mediated immunity and the response to infection. En mechanism of cell mediated immunity. Editado por R.T. Mc. Cluskey y S. Cohen. John Wiley & Sons, New York. p 185.
- 13.- De la Riva-Pinal, M. Respuesta inmune humoral en la infección experimental por Nocardia brasiliensis. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 1977.
- 14.- Melendro, E.I. Inmunidad celular en infecciones producidas por Nocardia brasiliensis. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. 1975.
- 15.- Glober, R.P., Herrel, W.E., Heilman, F.R. y Pfuetze, K.H. Nocardiosis. Nocardia asteroides infections simulating pulmonary tuberculosis. J. Am. Med. Ass. 136: 172, 1978.
- 16.- Bojalil, L.F. y Magnusson, M. Specificity of skin reaction of human to Nocardia sensitins. Am. Rev. Resp. Dis. 88: 409, 1963.
- 17.- Ortiz-Ortiz, L., Solarolo, E.B. y Bojalil, L.F. Delayed hypersensitivity to ribosomal protein from BCG. J. Immunol. 107: 1022, 1971.
- 18.- Ortíz-Ortiz, L., Contreras, M.F. y Bojalil, L.F. Cytoplasmic antigens from Nocardia eliciting a specific delayed hypersensitivity. Infect. Immunol. 5: 879, 1972.
- 19.- Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M.F. y Bojalil, L.F. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from Nocardia. Sabouraudia. 10: 147, 1972.

- 20.- Ortíz-Ortíz, L. y Bojalil, L.F. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of Nocardia organism as a means of diagnosis and epidemiological study of Nocardia infections. Clin. Exp. Immunol. 12: 225, 1972.
- 21.- Melendro, E.I., Contreras, M.F., Ximénez, C., García-Maynes, A.M. y Ortíz-Ortíz, L. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis en mice; cross protection against Listeria monocytogenes. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57: 74, 1978.
- 22.- Ortíz-Ortíz, L.M. Contreras, M.F., Melendro, E.I. y Bojalil, L.F. Inmunidad celular en infecciones producidas por Nocardia brasiliensis. Proceedings First International Conference on The Biology of the Nocardiae. Mérida, Venezuela, 1974. p 106.
- 23.- Bojalil, L.F. y Zamora, A. Precipiting and skin testing in the diagnosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113: 40, 1963.
- 24.- Zamora, A., Bojalil, L.F. y Bastarrachea, F. Immunologically active polysaccharides from Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis. J. Bacteriol. 85: 549, 1963.
- 25.- González-Ochoa, A., Shibayama, H., Félix, D. y Anaya, M. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. XII. Inter. Congr. Dermatol. Excerpt. Med., International Congress Series No. 55: 542, 1962.
- 26.- Ximénez, C., Melendro, E.I., González-Mendoza, A., Gracfa, A.M., Martínez, A. y Ortíz-Ortíz, L. Resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice immunized with Nocardia or BCG. Mycopathol. 70: 117, 1980.

- 27.- Ortíz-Ortíz, L., Ortega, M.T., Capín, R. y Martínez, M.T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 50:232, 1976.
- 28.- Ruskin, J. y McIntosh, J.S. studies on the mechanism of resistance to phylogenetically diverse intracellular organism. *J. Immunol.* 103 : 252, 1969.
- 29.- Larsh, J.E. y Weatherly, M.F. Cell mediated immunity in certain parasitic infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 67: 113, 1974.
- 30.- Folb, P.I., Timme, A. y Norowitz. Nocardia infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* 18: 459. 1977.
- 31.- Ortíz-Ortíz, L., Bojalil, L.F. y Contreras, M.F. Delayed hypersensitivity to polisaccharides from Nocardia *J. Immunol.* 108: 1409, 1972.
- 32.- Youmans, 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. *Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 55: 529, 1947.
- 33.- Miller, J.F.A.P. Immunological functions of the thymus, *Lancet*, 2:748, 1961.
- 34.- Ortíz-Ortíz, L., Nakamura, R.N. y Weigle, W.O. T cell requirement for experimental Allergic Encephalomyelitis induction in the rat. *J. Immunol.* 117: 567, 1966.
- 35.- González-Ochoa, A. y Baranda, F. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por Nocardia brasiliensis. *Rev. Inst. Salub.*

Enferm. Trop. 13: 189, 1953.

- 36.- González-Ochoa, A. Virulence of Nocardia. Can. J. Microbiol. 19:901, 1973.
- 37.- Ouchterlony, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergic, 6: 30, 1962.
- 38.- Campbell, D.h., Gorvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H. Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc. New York, 1970. p76.
- 39.- Deutsch, H.F. Preparation of immunoglobulin concentrates. Meth. Immunol. Immunocem. 1: 315, 1967.
- 40.- Johnson, G.D., and Holborow, E.J. Immunofluorescence. In Handbook of experimental immunology. Eddited by D.M. Weir Blackwell, Oxford, 1973. p 18.
- 41.- Cherry, B.W. y Hoody, M.D. Fluorescent-antibody techniques in diagnostic bacteriologic. Bacteriol. Rev. 29: 222, 1965.
- 42.- Walker, S.M., Meinke, G.C. and Weigle, W.O. Enrichment of antigen-specific B lymphocytes by the direct removal of B cell not bearing specificity for the antigen. J. Exp. Med. 146: 445, 1977.
- 43.- Walker, S.M., Meinke, G.C. and Weigle, W.O. Separations of various B-cell subpopulations from mouse spleen. Cell. Immunol. 46: 158, 1979.
- 44.- Davidson, W.F., and Parfsh, C.R. A procedure for removing red cells and dead cells from lymphoid cell suspensions. J. Immunol, Method, 7: 291, 1975.
- 45.- Jerne, N.K., and Nordin, A.A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. Science. 140: 405. 1963.

- 46.- Golub, E.S., Mishell, R.I., Weigle, W.O. and Dutton, R.W. a modification of the hemolytic plaque assay for use with protein antigens. J. Immunol. 100: 133, 1968.
- 47.- Dixon, W.J. and Massey, S.J. Introduction to statistical analysis. M.C. Graw-Hill, New York. 1969. p 43.
- 48.- Hellstrom, I., Hellstrom, K.E. y Pierce, G.E. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. Nature, 220:1352, 1968.
- 49.- Hellstrom, K.E. y Hellstrom, I. Immunologic defenses against cancer. En, Immunobiology. Editado por Good, R. A. y Fisher, D.W. Sinauer Associated, Inc. Suderland, Mass., 1974. P. 209.
- 50.- Freund, J. and Lipton, M.M. Potentiating effect of Nocardia asteroides on sensitization to picryl chloride and on production of isoallergic encephalomyelitis. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 68:373-377, 1948.
- 51.- Freund, J. and McDermott, K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49:548-553, 1942
- 52.- Ximenez, G. C. Estudios de protección en la infección experimental por Nocardia brasiliensis. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. 1979.
- 53.- Mackaness, G.B. Cellular resistance to infection. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance. Br. Med. Bull. 23:52 1967.

TABLA I

Inducción de micetoma en ratones infectados con N. brasiliensis.

Inóculo	Inflamación ^a días				Histología ^b positiva/total	Pérdida espontánea del miembro infectado	
	2	7	16	21		14	21
<u>Nocardia</u> -AIF	3.4	3.8	3.0	3.3	10/10	0/10	2/10
Salina-AIF	1.3	1.1	0	0	0/10	0/10	0/10

- a. La evaluación se hizo en una escala de 0-4; 0, sin inflamación; 1, lesión inflamatoria media; 2, inflamación moderada, la pata muestra una inflamación mayor que la pata normal, la cual no llega al doble de la última; 3, inflamación que es dos veces el tamaño de la pata de los ratones no infectados; 4, inflamación tres ó más veces el tamaño de la pata infectada ó pérdida espontánea del miembro infectado.
- b. Es positiva cuando hay infiltrado celular con características de un granuloma, gránulos actinomicóticos y/o hueso dañado.

TABLA II

Efecto de la eliminación de células T en la resistencia de ratones a infecciones por Nocardia^a

Ratones	Inóculo	Inflamación ^b	Histología positiva/total	Pérdida espontánea del miembro infectado		
				D	I	A S
				7	14	21
B	<u>Nocardia</u> -AIF	3.4	14/14	0/14	7/14	10/14
	Salina-AIF	0	0/15	0/5	0/5	0/5
Normales	<u>Nocardia</u> -AIF	3.2	10/10	0/10	0/10	2/10
	Salina-AIF	0	0/5	0/5	0/5	0/5

- a. Los ratones se inocularon en el cojinete plantar con 2×10^8 organismos de Nocardia incorporados en AIF. Los ratones no infectados se inocularon con solución salina 0.15M incorporada en AIF.
- b. La inflamación se midió en el día 21 en una escala de 0-4 (Tabla I).

TABLA III

Determinación de anticuerpos anti-Nocardia en ratones transferidos pasivamente con anticuerpo anti-Nocardia^a.

Determinación de anti-EN ^b DIAS	Títulos de hemaglutinación ^c RATONES	
	B	NORMALES
-2	0	0
0 ^d	322 ± 76	230 ± 25
6	76 ± 12	140 ± 31
13	115 ± 37	217 ± 80
20	281 ± 62	473 ± 161

- a. Los ratones se inyectaron ip con 1 mg de anticuerpo anti-Nocardia los días -1, 7 y 14 después de la infección con 2×10^8 organismos de Nocardia.
- b. El suero se obtuvo del plexo retroorbital de los animales.
- c. La prueba de hemaglutinación se hizo con SRBC-EN preparada como se describe en Material y Métodos. Los valores representan la recíproca de los títulos promedios ± ES del suero obtenido de 5 ratones.
- d. La prueba se hizo una hora antes de la infección con Nocardia.

TABLA IV

Efecto en ratones de la transferencia pasiva de anticuerpos anti-Nocardia sobre la resistencia a la infección por Nocardia.^a

Ratones	Inflamación ^b	Histología positivo/total	Pérdida espontánea del miembro infectado		
			D I A S		
			7	14	21
B	3.8	7/7	0/7	4/7	6/7
Normales	3.4	10/10	0/10	0/10	4/10

a. Los ratones recibieron tres inoculaciones de 1 mg de anticuerpo anti-Nocardia en los días -1, 7 y 14 después de la infección con 2×10^8 organismos de Nocardia.

b. La evaluación final de la inflamación se hizo 3 semanas después de la infección como se describe en la Tabla I.

TABLA V

Efecto del anticuerpo anti-Nocardia sobre la resistencia a la infección por Nocardia previamente opsonizada con anticuerpo específico.

Ratones ^a	Inflamación ^b	<u>Histología</u> positiva /total	<u>Pérdida espontánea del miembro infectado</u>			
			D I A S			
			7	12	18	22
B	4.0	12/12	0/12	6/12	12/12	-
Normales	3.0	10/10	0/10	0/10	2/10	8/10

- a. Los ratones se inyectaron ip con 1 mg de anticuerpo anti-Nocardia los días -1, 7 y 14 después de la infección con 2×10^8 organismos de Nocardia opsonizada previamente con anticuerpo específico como se describe en Material y Métodos.
- b.- La evaluación final de la inflamación se hizo 3 semanas después de la infección como se describe en la Tabla I.

TABLA VI

Efecto en ratones de la eliminación de linfocitos B con receptores para Nocardia sobre la infección por Nocardia.

Inóculo transferido	Inflamación	<u>Histología</u> positiva/total	<u>Pérdida espontánea del</u> <u>miembro infectado</u>		
			D I A S		
			25	30	50
Células linfoides sin células B específicas para <u>Nocardia</u> .	0,5	0/10	0/10	0/10	0/10
Células totales de bazo	2,6	10/10	2/10	2/10	5/10

- a. Se transfirieron ratones irradiados letalmente (900R) con 5×10^7 células totales de bazo o bien con células linfoides sin células B con receptores para Nocardia. Una semana después se les inyectó con 2×10^8 organismos de Nocardia.
- b. Los animales se observaron 50 días antes de sacrificarlos para los estudios histológicos.

TABLA VII

Eliminación de linfocitos B con receptores específicos para Nocardia: Efecto sobre la respuesta inmune después de la infección con Nocardia.^a

Inóculo transferido	Anticuerpos a EN ^b			EBC ^c (PFC/10 ⁶)	HTT a EN ^d positiva/total	
	D I A S				25	50
	25	30	50			
Células linfoides sin células B espe- cíficas para <u>Nocardia</u>	0/5	0/5	0/5	290 ± 35	5/5	5/5
Células totales de bazo	5/5	5/5	5/5	252 ± 60	5/5	5/5

- a. Ver leyenda de la Tabla I.
- b. La recíproca de los títulos de hemaglutinación \pm ES de los sueros de 5 ratones transferidos con células totales de bazo fueron: día 25, 32 ± 9 ; día 30, 35 ± 8 ; día 50, 51 ± 8 . Los ratones transferidos con células linfoides sin células B específicas para Nocardia no formaron anticuerpos hemaglutinantes a EN.
- c. Los ratones se inmunizaron con 1×10^9 EB ip en 0.2 ml de solución salina y 5 días más tarde se sacrificaron para determinar la presencia de anticuerpos. La evaluación de células formadoras de anticuerpo se llevó a cabo el día 50 post-infección.

d. El promedio del grosor del cojinete plantar \pm ES (mm) de los ratones normales que recibieron 50 μ g de EN fué de 0.070 ± 0.0017 . Una respuesta HTT positiva, fué significativamente diferente de la obtenida en los controles normales. El promedio del grosor del cojinete plantar \pm ES de los ratones transferidos con células linfoides que no tenían células B específicas para Nocardia fué de 0.100 ± 0.0032 y la de los ratones que recibieron células totales de bazo fué de 0.109 ± 0.0035 . No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en los diferentes días ensayados.