

11261  
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIOS DE PROTECCION EN LA INFECCION  
EXPERIMENTAL POR NOCARDIA BRASILIENSIS

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

CECILIA XIMENEZ GARCIA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

300793

XM48/X55 e 1978

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

A MI HIJA MONTSERRAT  
Y A MI ESPOSO MANUEL RAMIRO H.

A MIS PADRES SOFIA GARCIA A. y  
LUIS XIMENEZ C.

A MIS HERMANOS Y FAMILIARES.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CON SINCERO AGRADECIMIENTO A MI ASESOR  
DE TESIS, DR. LIBRADO ORTIZ-ORTIZ, Y A  
TODOS LOS AMIGOS Y COMPAÑEROS QUE DE -  
UN MODO U OTRO COLABORARON EN LA REALI-  
ZACION DE ESTE TRABAJO.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## C O N T E N I D O

	Pág.
I.- INTRODUCCION .....	1
II.- MATERIAL Y METODOS .....	10
III.- RESULTADOS .....	17
IV.- DISCUSION .....	27
V.- TABLAS Y FIGURAS .....	34
VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	44

## INTRODUCCION

Se conoce con el nombre de micetoma al padecimiento granulomatoso crónico en el cual se presentan tumoraciones fistulosas, en las que el hongo o actinomicete causante forma cúmulos de micelio o microcolonias denominadas gránulos; estas formaciones exhiben una coloración y morfología característica para las diferentes especies de agentes causantes de esta enfermedad.

Los agentes etiológicos de esta enfermedad son una gran variedad de bacterias (micetoma actinomicótico) y hongos (micetoma eumicótico), presentes en residuos de plantas y tierra (5, 45). Las principales bacterias que pueden causar esta enfermedad tanto en el hombre como en los animales son las siguientes: Actinomyces israeli (gránulos de color blanco o amarillo); Nocardia asteroides (gránulos blancos); Nocardia brasiliensis (gránulos blancos); Actinomadura madurae (gránulos blancos, amarillos o rosados); Nocardia caviae (gránulos blancos o amarillo) Actinomadura pelletieri (gránulos rojo púrpura) y Streptomyces somaliensis (gránulos amarillos o cafés). Los hongos involucrados en la producción de micetoma son: Allescheria boydii (gránulos blancos); Madurella grisea (gránulos negros) Madurella mycetomii (gránulos negros); Lepidosphaeria senegaliensis (gránulos negros); Phialophora jeanselmei (gránulos negros); Curvularia ge-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

niculata (gránulos blancos), etc.

Con excepción del A. israeli, todos los organismos anteriores son sapróticos y patógenos -- para plantas y penetran a la dermis por abrasión o implantación (45). En regiones altamente endémicas la continua exposición a los agentes infectantes, la inadecuada nutrición, los malos hábitos de higiene y el mal estado de salud, pueden jugar un papel importante en la implantación e incidencia -- de la enfermedad.

Algunos de los agentes anteriores muestran una distribución geográfica y prevalencia ecológica. La mayoría de ellos se han encontrado en áreas totalmente separadas unas de las otras (América y Africa), lo cual habla de una amplia distribución mundial. En algunos sitios como el Sudán, la enfermedad presenta una incidencia elevada (1). -- Linch (21) reportó un aumento muy importante en el número de casos anuales en ese país. Diferentes -- autores franceses (21, 26, 48, 49) han enfatizado la alta endemicidad del micetoma en la zona ecuatorial de Africa; en estas regiones, los agentes -- etiológicos más frecuentes son M. mycetomii, S. so maliensis y A. pelletieri, los cuales han sido aislados del suelo (48). Otra área altamente endémica es México, donde la casuística, aunque menor -- que la observada en los estados africanos, constituye un problema de salud pública importante. Lava lle (20), ha resaltado que en ambas regiones existe un interesante paralelismo entre las condicio--

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

nes ambientales y las climatológicas.

En nuestro país los agentes etiológicos pre dominantes en orden de importancia son: N. brasiliensis, A. madurae y N. asteroides; los microorganismos anteriores han sido aislados del suelo en diferentes estados de la República (11, 13, 29, -- 36). La capacidad infectante de los organismos aislados del suelo varía de aquellos aislados de individuos enfermos (45).

En el individuo las lesiones se localizan más frecuentemente en el pie, pierna, rodilla, mulo y con menor frecuencia en las extremidades superiores (mano y antebrazo). En México se han encontrado con relativa frecuencia localizaciones dorsolumbares, escapulares, pectorales y en algunos casos diseminación a pulmón y médula espinal (45). 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 ro-

deado 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 actinomicóticos, particularmente los producidos por N. brasiliensis, se caracterizan por su coloración blanca, en ocasiones amarillenta, los cuales miden generalmente menos de 1 mm de diámetro, son suaves, lobulados y pueden algunas veces presentar en su periferia la organización de los filamentos en forma de 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". (45)

La evolución de la infección en el huésped no se conoce con certeza, sin embargo, se piensa que como sucede en otras infecciones muy relacionadas, se encuentra determinada por la respuesta inmunológica (3, 12, 30, 37, 42).

El papel que desempeña la hipersensibilidad de tipo tardío en el establecimiento del micetoma parece ser importante, ya que las características granulomatosas de las lesiones durante la fase crónica de la enfermedad, son semejantes a las que se observan en otros padecimientos que también inducen hipersensibilidad celular; sin embargo, la participación de la respuesta inmune en la patogenia-

del micetoma no está bien dilucidada.

La hipersensibilidad de tipo tardío a diferentes antígenos obtenidos de Nocardia ha sido motivo de múltiples publicaciones. Area Leão (59) - demostró por primera vez este fenómeno con un antígeno de un filtrado de cultivo de Actinomyces bovis. Posteriormente, Lacaz da Silva (17), preparó un antígeno derivado de 26 especies de actinomyce-tes y las ensayó en pacientes con micetoma causado por N. brasiliensis con resultados negativos, debi- do probablemente a estados de anergia. Más tarde- González Ochoa y col. (10, 12, 50) aislaron un po- lisacárido crudo de N. brasiliensis y lo utiliza- ron como antígeno en pacientes con micetoma, encon- trando reacciones de hipersensibilidad retardada - en los casos estudiados. González Ochoa (12) de- mostró la especificidad del material polisacárido- de Nocardia en pacientes con cromomycosis, cocci- díoidomycosis, tuberculosis cutánea, dermatomycosis y en individuos normales obteniendo resultados negativos en todos los casos reportados. Al mismo tiempo señaló que la falta de reactividad cutánea- al antígeno de Nocardia en individuos con micetoma actinomicótico indicaba un mal pronóstico en la - evolución del padecimiento. Glober y col. (8) y - Bojalil y Magnusson (3) realizaron experimentos - donde usaron antígenos obtenidos de medio de culti- vo de Nocardia y observaron en todos los casos es- tudiados, reacciones cruzadas en pacientes tubercu- losos. Así mismo, Ortiz-Ortiz y col. (34-36) ob- servaron in vivo e in vitro una reacción de hiper-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sensibilidad tardía en cobayos infectados con N. brasiliensis y N. asteroides y ensayados con antígenos somáticos tales como extracto citoplásmico, proteína ribosomal y polisacárido. Posteriormente, Ortiz-Ortiz y Bojalil (33) utilizaron estos mismos extractos para un estudio epidemiológico en el cual se incluyeron individuos infectados con Nocardia, Mycobacterium tuberculosis y Micobacterium leprae, así como individuos normales que radicaban en zonas consideradas endémicas para N. brasiliensis, y observaron gran especificidad en las pruebas cutáneas realizadas. Además de los estudios anteriores, se ha investigado 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 (30).

En cuanto a la respuesta inmune humoral -- existen trabajos importantes en los que se ha demostrado la presencia de anticuerpos en animales infectados con Nocardia y en pacientes con micetoma actinomicótico; para tal efecto, se han utilizado diferentes pruebas serológicas tanto con fines diagnósticos como con fines pronósticos (12, 25, - 42).

González-Ochoa y Vázquez-Hoyos (50) y Bojalil y col. (53, 54) por medio de precipitación demostraron la presencia de anticuerpos contra el polisacárido de N. brasiliensis. Esta prueba ha sido de gran ayuda diagnóstica en este tipo de pa -

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cientes.

Otros investigadores han utilizado la reacción de fijación de complemento sérico. Así, González-Ochoa y col. (12) hicieron la primera correlación entre los títulos de anticuerpos detectados por esta prueba y la evolución clínica de los pacientes con micetoma, observando que un aumento de los anticuerpos acompaña a un mal pronóstico de la enfermedad; por el contrario, con una evolución favorable los títulos de anticuerpos permanecen bajos llegando a desaparecer con el tratamiento médico. Los resultados anteriores están de acuerdo con los obtenidos por Mahgoub (25), quien hizo una evaluación de las diferentes pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico del micetoma, señalando la importancia y utilidad de esta prueba en el pronóstico de la enfermedad. Por el contrario, con las pruebas de aglutinación se han obtenido resultados muy irregulares; González-Ochoa y col. -- (12) observaron que los resultados de tales pruebas realizadas en sueros de pacientes con micetoma no podían ser relacionados con la evolución del padecimiento ni con el estado general de los pacientes estudiados.

Se han hecho estudios recientes con el objeto de definir si la respuesta de tipo humoral participa o no en la evolución del micetoma causado por Nocardia; Rico y Ochoa (42), observaron que los animales timectomizados, irradiados y reconstituidos con linfocitos B a los cuales se les infec-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

taba con N. brasiliensis, desarrollaban micetomas más severos que los animales normales infectados - con la misma dosis de microorganismos; así mismo, - los primeros mostraron un índice mayor de amputaciones espontáneas que los animales no tratados. - Estos mismos investigadores demostraron que la inoculación de N. brasiliensis opsonizada no favorecía la eliminación del microorganismo por el huésped, desarrollándose la enfermedad de la misma manera que en los animales infectados con el microorganismo no tratado. Todo parece indicar que los anticuerpos específicos formados durante la enfermedad no tienen un papel protector y que su presencia podría hablar más de un efecto nocivo que benéfico para el huésped.

Por otro lado, se ha reconocido más claramente la importancia de la inmunidad mediada por células (IMC) en la protección contra las infecciones por Nocardia (30, 42). Los resultados obtenidos son similares a los que se presentan en otras infecciones causadas tanto por bacterias como por parásitos intracelulares (7, 18, 28, 32, 38, 41, - 46).

La participación de la IMC en animales infectados con Nocardia ha sido demostrada en estudios de activación de la función fagocítica y digestiva de macrófagos (30, 37).

Tomando en consideración que, M. tuberculosis y N. brasiliensis son microorganismos relacio-

nados antigénicamente (4, 16, 24, 43, 44, 51) y - que ambos presentan reacciones cruzadas de IMC (2, 14, 27, 58), decidimos realizar estudios para determinar si la inmunización con el antígeno homólogo o la inmuoestimulación con M. tuberculosis o - BCG, resulta en la protección de ratones contra la infección experimental con Nocardia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratones hembras - de la cepa Cardworth Farm cuyo peso fluctuó entre 18 a 25 g al inicio del experimento.

Microorganismos. En todos los experimentos que aquí se describen se usó una cepa de N. brasiliensis (UPHG-24) mantenida en el Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. La Nocardia muerta usada en la inmunización - se esterilizó en autoclave.

La vacuna de Mycobacterium bovis cepa de - Calmette y Guerin (BCG) se obtuvo del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

La cepa H37Ra de M. tuberculosis se obtuvo de los Laboratorios DIFCO (Detroit Michigan).

Medios de cultivo. La N. brasiliensis se - cultivó en el medio Proskauer y Beck modificado - por Youmans y Karlson (52).

Obtención de antígenos. Los antígenos usados para las pruebas cutáneas se obtuvieron de la manera siguiente: se cosechó después de 21 días de incubación a 37° C, se lavó con agua destilada caliente, se desengrasó con acetona y después con - una solución 1:1 de etanol-eter etílico. El mate-

rial se secó al vacío para después suspenderlo en una solución amortiguadora de tris-hidroximetilamino metano (TRIS) (0.01M, pH 7.4) que contenía 0.01M de acetato de magnesio (aproximadamente 50 g de bacterias en 200 ml de TRIS); posteriormente se añadió desoxirribonucleasa a una concentración de 2 ug/ml. La suspensión se pasó a través de un fraccionador de células SORVALL RIBI (Modelo RF1) a una presión de 15,000 a 30,000 psi. La suspensión celular obtenida se dejó durante la noche a 4°C. Para separar las células que no se rompieron y los restos celulares, el material se centrifugó a 3,020 g durante una hora, a 12,000 g por 30 minutos, a 48,000 g por 15 minutos y por último a 144,000 g durante 3 horas con el objeto de eliminar el ácido desoxirribonucleico altamente polimerizado y los ribosomas. El material obtenido después de este tratamiento es un extracto citoplásmico (EC), el cual se utilizó para la prueba cutánea después de dializarlo contra agua destilada, liofilizarlo y determinarle el contenido de proteína por el método de Lowry y col. (60).

Inmunización. Los ratones se inmunizaron con:

N. brasiliensis. Se utilizaron  $2 \times 10^8$  bacterias viables o muertas, resuspendidas en 0.1 ml de una solución 1:1 de adyuvante incompleto de Freund (AIF) y solución salina isotónica (SSI). La inoculación se realizó en el cojinete plantar o por vía subcutánea en la región de la nuca.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

BCG. Para la inmunización en el cojinete - plantar o en la región de la nuca, se usaron ---  $4 \times 10^6$  bacilos viables suspendidos en 0.1 ml de - una solución 1:1 de AIF y SSI; para inmunizar por - vía endovenosa se usaron  $4 \times 10^6$  BCG viables en 0.1 ml de SSI.

M. tuberculosis H37Ra. Se inmunizó en la - región de la nuca, con 200 ug del inmunógeno sus- - pendidos en 0.1 ml de una solución 1:1 de AIF y - SSI.

Todos los animales inmunizados en el cojine - te plantar recibieron una dosis del inmunógeno, -- mientras que los inmunizados en la región de la nu - ca, recibieron 2 dosis, con una semana de interva - lo entre cada una de ellas.

Infección. Los animales se desafiaron en - el cojinete plantar del miembro posterior contra- - rio a la tumoración primaria, con  $2 \times 10^8$  células - de N. brasiliensis viables suspendidas en 0.1 ml - de SSI. En un experimento los animales en estudio se desafiaron con N. brasiliensis viable a los 12, 20, 30, y 60 días después de la inmunización. La - evolución del tumor se midió a intervalos de 5 - - días durante los 45 días de duración del ensayo. - En otro experimento, los animales inmunizados dos - veces por vía subcutánea se desafiaron a los 20 - días después de la primera inoculación, tiempo su - ficiente para generar una respuesta inmune (22).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Determinación de anticuerpos contra N. brasiliensis. Los animales se sangraron del plexo retroorbital a diferentes intervalos posteriores al desafío. Los sueros obtenidos de cada grupo se mezclaron y se almacenaron congelados hasta el momento de su utilización.

El acoplamiento de la proteína (antígeno de Nocardia) a eritrocitos de carnero (EC) por medio de glutaraldehído (56) se realizó de la siguiente manera:

Se lavaron EC en SSI, tres veces y se ajustaron con la misma solución al 50%; a continuación se preparó una solución al 25% de glutaraldehído (GA) neutralizado con carbonato de sodio al 10%, del cual se utilizó 1.5 ml para añadirse a 5 ml de SSI y 1 ml de amortiguador de fosfatos 0.015 M, pH 8. A la solución anterior se le agregó gota a gota 1.0 ml de la suspensión de EC, agitando constantemente durante 24 h a 4°C; posteriormente, los eritrocitos se lavaron cuatro veces en SSI. Estos eritrocitos se pueden almacenar por varias semanas o usarse de inmediato para el acoplamiento.

Para acoplar se mezclan 1 mg de proteína en 1.5 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 6.8, 0.1 ml de paquete de EC-GA y 5 ml de amortiguador de acetatos, 0.1 M, pH 5; a continuación se incubó con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Los eritrocitos pueden ser conservados -

en PBS pH 6.8 con acida de sodio al 0.1% y almacenados en refrigeración.

Para realizar la técnica de hemaglutinación (57) se ajustan los eritrocitos al 2.5% y se procede con el micrométodo de la manera siguiente. En cada una de las excavaciones de las placas para hemaglutinación se agregan 0.5 ml de PBS pH 6.8; a continuación se adiciona en la primera excavación 0.05 ml de los sueros inactivados y previamente absorbidos con eritrocitos de carnero. Posteriormente, por medio de una asa de microdilución, se realizan diluciones al doble desde 1:2 hasta 1:1024. A continuación, se añade en cada una de las excavaciones 0.025 ml de los eritrocitos sensibilizados con el antígeno de Nocardia, utilizando para el caso una pipeta de gota graduada. La placa se agita durante un minuto, se cubre con una cinta adhesiva y se mantiene a 4°C durante 24 h. El título de anticuerpos se expresa como la inversa de la dilución más alta del suero que aglutina a los eritrocitos sensibilizados.

Hipersensibilidad de tipo tardío. La prueba se realizó a diferentes intervalos antes y después del desafío con N. brasiliensis. El antígeno de Nocardia en una dosis de 50 ug, se inyectó en el cojinete plantar que no había recibido Nocardia o BCG. Los cojinetes se midieron con una microcalibrador (Mitutoyo Mfg. Co., Ltd. Tokio, Japón) antes y 24 h después de la inoculación del antígeno. Los valores obtenidos son el resultado del incre--

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mento en el grosor del cojinete plantar de los animales infectados menos la medida de la inflamación inespecífica de los animales normales.

Examen directo del micetoma inducido por el desafío. Al final del experimento se realizó la búsqueda de gránulos actinomicósicos en las extremidades afectadas por el tumor, tomando el pus o la secreción de trayectos fistulosos con una pipeta Pasteur estéril; posteriormente la muestra se lavó 3 veces con SSI estéril, se decantó el sobrenadante y el sedimento se utilizó para hacer frotis y tinción con eritrocina al 1% en solución acuosa (68). La observación se hizo al microscopio contando los gránulos en 6 campos diferentes.

Aislamiento de *N. brasiliensis* a partir del micetoma inducido por el desafío. El retrocultivo se hizo también al final del experimento, sembrando las secreciones o directamente de los miembros afectados; se utilizó un medio sólido de Proskauer y Beck modificado por Youmans y Karlson (52), adicionado de 100 U/ml de penicilina sódica. Las cajas sembradas se incubaron a 37 °C durante un período de 10 días.

Estudio histopatológico. Los miembros amputados se fijaron con una solución de formaldehído al 10% y se procesaron para su estudio histopatológico de acuerdo a la técnica previamente descrita (58).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mento en el grosor del cojinete plantar de los animales infectados menos la medida de la inflamación inespecífica de los animales normales.

Examen directo del micetoma inducido por el desafío. Al final del experimento se realizó la búsqueda de gránulos actinomicósicos en las extremidades afectadas por el tumor, tomando el pus o la secreción de trayectos fistulosos con una pipeta Pasteur estéril; posteriormente la muestra se lavó 3 veces con SSI estéril, se decantó el sobrenadante y el sedimento se utilizó para hacer frotis y tinción con eritrocina al 1% en solución acuosa (68). La observación se hizo al microscopio contando los gránulos en 6 campos diferentes.

Aislamiento de N. brasiliensis a partir del micetoma inducido por el desafío. El retrocultivo se hizo también al final del experimento, sembrando las secreciones o directamente de los miembros afectados; se utilizó un medio sólido de Proskauer y Beck modificado por Youmans y Karlson (52), adicionado de 100 U/ml de penicilina sódica. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante un período de 10 días.

Estudio histopatológico. Los miembros amputados se fijaron con una solución de formaldehído al 10% y se procesaron para su estudio histopatológico de acuerdo a la técnica previamente descrita (58).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Análisis estadístico. Se empleó la prueba de Fisher para determinar la homogeneidad de las varianzas entre grupos (55). La significancia de las diferencias entre las medias de los grupos - con varianzas homogéneas, se determinó por la prueba de  $t$  de Student y entre las varianzas heterogéneas por la prueba de Cochran y Cox (55).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

Evolución del micetoma en los ratones infectados. Las dimensiones del micetoma a intervalos de 5 días, durante 45 días posteriores a la infección, se observan en las Figs. 1 a 4 en las que se grafica el promedio del grosor del cojinete plantar infectado  $\pm$  el error tipo. Estos animales se utilizaron como controles en cada uno de los experimentos realizados.

La evolución del micetoma en estos animales aparece más o menos constante (Figs. 1-4). Se inicia con un aumento importante en las dimensiones del cojinete plantar durante los primeros días de la infección, producto de una inflamación debida al traumatismo ocasionado por la administración del inóculo; posteriormente, el grosor va disminuyendo, de manera que, aproximadamente entre los 15 y 20 días después de la infección se observan las medidas más pequeñas. Posteriormente, observamos un aumento gradual en el tamaño del micetoma el cual se mantiene hasta el final del experimento.

Evolución del micetoma en los ratones inmunizados. La evolución del micetoma en los animales inmunizados se observan en las Figs. 1 a 4, donde se grafica el promedio del grosor del cojinete plantar infectado  $\pm$  el error tipo. Estos animales se inmunizaron en el día 0 y se desafiaron a diferentes intervalos después de la misma.

La evolución del micetoma en los animales - desafiados a los 12 días después de la inmuniza- - ción se observa en la Fig. 1 donde podemos ver, - que a través de los 45 días de estudio, el grupo - inoculado con N. brasiliensis viable es el que - muestra una mayor protección, la cual se manifiesta a niveles significativos desde los 15 días después del desafío y se mantiene a lo largo del experimento. Aquellos animales inmunizados con N. brasiliensis muerta también muestran una disminución en el tamaño del micetoma, aunque no alcanza los niveles del grupo anterior. En este grupo se observan diferencias significativas con respecto a los controles infectados no inmunizados a partir del día 20 después del desafío. El grupo de animales inmunizados con BCG endovenoso no muestra diferencias significativas con respecto al grupo control durante todo el experimento, salvo en el día 5 después del desafío donde se puede ver que las dimensiones del micetoma son menores que en el resto de los grupos estudiados; este grupo desarrolla posteriormente micetomas muy semejantes a los observados en el grupo control. En el grupo inmunizado con BCG suspendido en AIF se observa un efecto protector a partir del día 30 el cual se mantiene hasta el final del experimento.

En el grupo que se desafió a los 20 días -- después de la inmunización (Fig. 2) observamos que, a los 15 días, los grupos inmunizados con N. brasiliensis muerta o BCG en AIF, son los que muestran micetomas de menor tamaño que el resto de los gru-

pos estudiados. Esta protección se mantiene a lo largo de los 45 días de observación. Más tarde, a los 20 días los animales inoculados con Nocardia viable muestran un micetoma de dimensiones similares a los grupos anteriores el cual no evoluciona como lo hace el grupo de animales infectados no vacunados. Los animales tratados con BCG en SSI desarrollan micetomas más grandes que el resto de los grupos inmunizados, aunque 30 días después del desafío los micetomas son menores significativamente que los observados en el grupo control.

Los resultados obtenidos en el grupo de animales desafiados a los 30 días después de la inmunización (Fig. 3) son los siguientes: Aquellos animales inyectados con N. brasiliensis viable muestran una disminución constante en el tamaño de sus micetomas, pero sólo a partir de los 30 días después del desafío se observan diferencias significativas en relación al grupo control no inmunizado. Los animales tratados con Nocardia muerta muestran una disminución progresiva del micetoma durante los primeros días de observación; sin embargo, a partir del día 20, el micetoma parece estabilizarse y su tamaño es menor que el observado en los controles ( $P < 0.0005$ ). El grupo inmunizado con BCG endovenoso presenta después de 30 días, micetomas de menores dimensiones que los grupos no inmunizados. La disminución no es tan importante como la observada en los animales inmunizados específicamente. Resultados similares se obtuvieron cuando la inmunización se realizó con BCG incorporado-

en AIF (Fig. 3).

El grupo de animales desafiados a los 60 días después de la inmunización (Fig. 4) presentan durante los primeros 20 días, un patrón similar al grupo control. Sin embargo, los animales inmunizados específicamente desarrollan después de 30 días, una mayor protección, particularmente aquellos animales tratados con N. brasiliensis muerta. Los grupos tratados con BCG en SSI o suspendido en AIF no muestran a lo largo del experimento, diferencias significativas con respecto a los controles.

En resumen, los animales inoculados con N. brasiliensis viva o muerta son capaces de controlar con mayor habilidad la infección con el microorganismo homólogo. La inmunización con BCG es de menor duración y magnitud que la observada con los inmunógenos específicos.

Hipersensibilidad de tipo tardío. Los resultados de las pruebas de hipersensibilidad tardía realizadas en el grupo de animales inmunizados con una dosis de inmunógeno en el cojinete plantar o por vía endovenosa (BCG en SSI) se muestran en la Fig. 5. En este experimento, los ratones se desafiaron 20 días después de la inmunización con  $2 \times 10^8$  células de N. brasiliensis viables.

Los animales inoculados con Nocardia viable desarrollan una reacción de tipo tardío intensa que conservan hasta el final del experimento. Los-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

animales inmunizados con Nocardia muerta también - presentan una hipersensibilidad tardía considera- - ble, aunque de menor magnitud que la observada en - el grupo anterior; en ambos casos, la diferencia - entre estos grupos y los controles no inmunizados - es altamente significativa ( $P < 0.00005$ ). Los ani- - males inmunizados por vía endovenosa con BCG en -- SSI muestran un grado de hipersensibilidad semejan- - te a los valores encontrados en el grupo de anima- - les controles, aunque al final de experimento, la - reactividad cutánea de estos animales se mantiene - por arriba de los valores observados en los grupos - controles. Los animales que se inmunizaron con - BCG suspendido en AIF muestran una hipersensibili- - dad de tipo tardío al antígeno de Nocardia (Fig. - 5-6) semejante a la observada en el grupo de rato- - nes inmunizados solamente con BCG.

En la Fig. 6 se presentan las pruebas de hi- - persensibilidad tardía realizadas en los animales - inmunizados con 2 dosis de inmunógeno por vía sub- - cutánea en la región de la nuca. En este experi- - mento se repite el mismo patrón de reactividad al - antígeno de Nocardia descrito en el experimento an- - terior, sólo que las diferencias entre los grupos - en estudio son más claras y la reactividad aparece - más tempranamente. Los animales inoculados con -- N. brasiliensis viva o muerta, muestran hipersensi- - bilidad de tipo tardío considerable, la cual se ex- - presa a niveles significativos a partir de los 8 - días después del desafío conservándola durante to- - do el experimento; sin embargo aquellos animales - inmunizados con el microorganismo muerto muestran-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

una reactividad menor que la observada en el grupo inoculado con la Nocardia viable.

En los animales tratados con BCG suspendido en AIF, se observa un aumento de la reactividad cutánea si se compara con el observado en el experimento anterior (animales inmunizados con una dosis de inmunógeno). Estos animales muestran diferencias significativas a partir del día 24 y se mantienen hasta el final del experimento, aunque éstas no llegan a ser tan importantes como las observadas en los animales inmunizados específicamente. El grupo tratado con M. tuberculosis H37Ra no muestra diferencias significativas con respecto a los animales controles infectados salvo al final del experimento (días 40 y 45), donde se observa un aumento en su reactividad cutánea al antígeno de Nocardia.

Titulación de anticuerpos. En las Tablas I y II se presentan los resultados de la titulación de anticuerpos contra N. brasiliensis en los animales desafiados a los 20 días después de la primera inmunización. La primera es el resultado de los títulos encontrados en los animales inmunizados con una dosis de inmunógeno. Como puede verse, los títulos de anticuerpos anti-Nocardia (Ac-anti-N) en los animales inmunizados muestran pocas diferencias en relación a los títulos encontrados en los animales controles no inmunizados (Tabla 1); salvo en aquellos animales que se inocularon con N. brasiliensis viable o muerta donde los Ac-anti-N se detectan antes que en los demás grupos estu--

diados y en los inmunizados con BCG suspendido en SSI, quienes muestran títulos de Ac-anti-N en constante aumento.

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos en los ratones inmunizados con 2 dosis de inmunógeno. En estos animales nuevamente no se observan diferencias importantes entre los grupos en estudio; sin embargo, podemos observar que estos animales desarrollan títulos de Ac-anti-N más elevados que los animales inmunizados con una dosis de inmunógeno.

Examen directo del micetoma inducido por el desafío. La búsqueda de gránulos actinomicósicos en las secreciones de los miembros afectados por el desafío, reportó una diferencia importante entre los grupos inmunizados y los no inmunizados. En la Tabla III se pueden apreciar los resultados obtenidos en los animales inmunizados con una dosis: Los animales controles infectados, mostraron en todos los casos hasta 20 gránulos por campo de observación, con las características previamente descritas (9, 20, 45). Por otra parte, los animales inoculados con N. brasiliensis viable o muerta, no mostraron la presencia de gránulos. Solo 3 de los 5 animales tratados con BCG en SSI mostraron gránulos en cantidades variables, aunque menores de 10 por campo de observación. Por otra parte, 3 animales inmunizados con BCG en AIF presentaron hasta 10 gránulos actinomicósicos por campo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los resultados en el grupo de animales inmunizados con 2 dosis de inmunógeno, por vía subcutánea en la nuca (Tabla IV), son muy semejantes a los obtenidos en el grupo anterior. Todos los animales controles no inmunizados mostraron gránulos actinomicósicos abundantes (15 por campo). Por otra parte, uno de los 7 animales inoculados con Nocardia viable mostró hasta 5 gránulos por campo; mientras que, uno de los 7 animales inmunizados con N. brasiliensis muerta tenía de 1 a 3 gránulos por campo de observación. Los animales inmunizados con M. tuberculosis H37Ra desarrollaron entre 4 y 16 gránulos actinomicósicos por campo. Por problemas técnicos no se realizó el estudio en los animales inmunizados con BCG incorporado en AIF.

Aislamiento de N. brasiliensis a partir del micetoma inducido por el desafío. Las muestras obtenidas de los abscesos y fístulas del micetoma se cultivaron como se describió en el capítulo anterior. Los resultados del estudio en los animales que recibieron una dosis del inmunógeno se muestran en la Tabla III. En el grupo no inmunizado que se desafío con N. brasiliensis, se aisló el microorganismo homólogo en las secreciones obtenidas de fístulas y abscesos. Solo uno de los 5 animales inoculados con una dosis de Nocardia viable y en 2 de los 5 inmunizados con N. brasiliensis muerta se aisló el microorganismo ácido alcohol resistente. Por otra parte, en todos los animales inmunizados por vía intravenosa con BCG en SSI y en 4 de los 5 animales tratados con BCG incorporado en AIF se -

aisló la Nocardia.

Los resultados de las muestras obtenidas -- del miembro con micetoma en el grupo de animales - inmunizados con 2 dosis de inmunógeno (Tabla IV) - son los siguientes: En 2 de los 7 ratones inoculados con N. brasiliensis viable y en uno de los 7 - inmunizados con Nocardia muerta se aisló la Nocardia. Cuando se inmunizó con M. tuberculosis, 4 de los 7 ratones presentaron crecimiento de N. brasiliensis. En el grupo de animales inmunizados con - BCG incorporado en AIF no se realizaron retrocultivos.

Estudio histopatológico. Los animales controles no inmunizados mostraron la evidencia de un micetoma activo, caracterizado por trayectos fistulosos con reacción inflamatoria aguda y crónica intensa, en donde se observaron abundantes granos - del microorganismo (Tablas III y IV). En el grupo inoculado con una dosis de N. brasiliensis viable - solamente 1 de 5 animales mostró micetoma (Tabla - III); mientras que, el grupo de 7 ratones que recibió dos dosis inmunizantes presentó 2 con micetoma (Tabla IV). El resto de los animales en ambos grupos mostraron una reacción inflamatoria crónica y fibrosis. Los animales inmunizados con una dosis - de Nocardia muerta solo presentaron en los sitios - desafiados una reacción inflamatoria moderada con trayectos fistulosos, en donde en varios cortes no fué posible demostrar la presencia de micetoma (Tabla III). Un cuadro similar, se observó en el gru

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

po que recibió 2 dosis inmunizantes del microorganismo muerto, solo que en este caso los animales - mostraron una reacción inflamatoria mínima con o - sin fístulas o fibrosis asociada a una reacción - xantogranulomatosa (Tabla IV). Los grupos inmuni- zados con una o 2 dosis de BCG incorporado en AIF- presentaron micetomas en mayor proporción que los- otros grupos estudiados. Aquellos que recibieron- una dosis del inmunógeno presentaron micetomas en- 2 de 5 animales tratados. Por otra parte todos - los que recibieron dos dosis de BCG en AIF mostra- ron micetomas. Finalmente 4 de los 7 animales in- munizados con M. tuberculosis presentaron miceto- mas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que, el tratamiento de ratones con N. brasiliensis viable o muerta, aumenta los mecanismos específicos de resistencia, de tal forma que los animales desarrollan un estado de inmunidad que les permite manejar y eliminar de una manera más eficiente el desafío con el microorganismo homólogo, con lo cual se modifica la evolución natural del micetoma.

En las infecciones bacterianas y parasitarias intracelulares se han realizado estudios comparativos para evaluar la efectividad de las vacunas preparadas con microorganismos viables o muertos (72-75). Se ha mencionado que las vacunas viables son más efectivas debido a que la proliferación bacteriana y la persistencia prolongada del microorganismo en los tejidos del huésped, da lugar a una estimulación antigénica mayor; además, in vivo los microorganismos producen antígenos que no son sintetizados in vitro o son destruidos durante la preparación de las vacunas no viables.

Se ha observado que la infección experimental de ratones con microorganismos viables del género Salmonella, es más efectiva en el desarrollo de mecanismos de resistencia contra un desafío con microorganismos homólogos (72) o heterólogos (73). Estos mecanismos fallan cuando los animales son -

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inmunizados con microorganismos muertos. Sin embargo, existen reportes en los cuales la vacunación de animales con inmunógenos muertos, puede ser tan eficaz como la infección crónica en la inducción de protección contra un desafío con microorganismos intracelulares homólogos (75) o heterólogos (74). Esto al parecer depende de la forma en que el inmunógeno es presentado al huésped y a la persistencia del mismo en los tejidos. La utilización de adyuvantes en la preparación de vacunas no viables aumenta su eficacia en el establecimiento de mecanismos de resistencia en el huésped.

En nuestro modelo experimental encontramos que, la inmunización con N. brasiliensis muerta es tan efectiva en la inducción de protección contra la infección con el microorganismo homólogo, como la inoculación con la Nocardia viva, como se demuestra en la evolución del micetoma (Figs. 1-4) y los estudios microbiológicos e histopatológicos realizados (Tablas III y IV).

Aunque se conocen bien las propiedades del BCG como inmuno-estimulador inespecífico en infecciones intracelulares bacterianas y parasitarias de tipo facultativo u obligado (14, 22, 37 y 58), en nuestro diseño experimental, los mecanismos de estimulación del sistema inmune por tratamiento con BCG no son efectivos en la modificación de la evolución del micetoma (Figs. 1-5), especialmente cuando se utiliza por vía endovenosa. Estos hallazgos no difieren de otras observaciones donde -

se ha demostrado que la inmunidad celular es más eficiente cuando se usa como agente inmunizante el microorganismo homólogo (46, 62). Se ha sugerido también 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 tardía (69). Estos fenómenos son el resultado de un proceso mediado por linfocitos derivados de timo (64, 65), - los cuales han sido sensibilizados previamente y - al ser estimulados nuevamente con el antígeno específico liberan mediadores químicos (linfocinas), - los cuales parecen ser los responsables de las modificaciones fisiológicas observadas en el sistema fagocítico (63, 64, 65). Este parece ser el caso en las infecciones por N. brasiliensis, donde los mecanismos de inmunidad celular, durante la infección experimental, juegan un papel muy importante. Se ha demostrado experimentalmente que animales timectomizados, irradiados, reconstituídos con médula ósea y que se infectan con Nocardia opsonizada desarrollan micetomas más severos y con amputaciones más tempranas que aquellos animales que recibieron Nocardia no tratada (42). Las observaciones anteriores correlacionan con las obtenidas en el presente estudio, ya que los ratones mejor protegidos contra la infección por Nocardia, son aquellos que presentan una mayor reacción de hipersensibilidad de tipo tardío (Figs. 6 y 7).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Existen algunos aspectos importantes en la evolución del micetoma en relación con el tiempo - en el cual se hizo el desafío. Cuando se utilizó - Nocardia viable se observó aparentemente una mejor protección cuando el desafío se realizó dentro de los primeros 12 días después de la inmunización - (Fig. 1). Las diferencias entre el grupo inoculado con N. brasiliensis viva y el grupo tratado con el microorganismo muerto son significativas a partir del día 15 después del desafío.

Ahora bien, se trató de observar si el uso de 2 dosis de inmunógeno tendría alguna repercusión en la respuesta humoral y en la celular de los animales en experimentación. Para ello se estudiaron 2 grupos de animales: el primero recibió una dosis de inmunógeno y el segundo recibió dos dosis de inmunógeno y con una semana de diferencia entre cada una de ellas; ambos grupos fueron desafiados 20 días después de la última inmunización. Se midió en ambos casos la respuesta humoral (Tablas I y II) y la respuesta celular (Figs. 5 y 6). La utilización de dos dosis de inmunógeno da lugar a un aumento tanto en la respuesta de anticuerpos, como en la respuesta de hipersensibilidad tardía; en donde se observan diferencias significativas entre el uso de una ó dos dosis de inmunógeno.

En general, los títulos de Ac-Anti-N muestran pocas variaciones entre los diferentes grupos, salvo en aquellos animales tratados con N. brasiliensis viva o muerta, donde los anticuerpos apare

cen antes que en los otros grupos. Por otra parte, los animales inmunizados con BCG suspendido en SSI presentan títulos de Ac-anti-N más elevados hacia el final del experimento (Tablas I y II).

Mucho se ha hablado del papel de los anticuerpos en la respuesta inmune; así, Mackaness, La grange, Miller e Ishibashi (19, 31, 67), han demostrado que animales inmunizados con altas dosis de inmunógeno presentan un fenómeno de regulación entre la respuesta humoral y la hipersensibilidad de tipo tardío, de tal manera que, altos títulos de anticuerpos aparecen cuando la hipersensibilidad retardada disminuye o viceversa; sin embargo, otros autores han observado que este fenómeno de modulación entre respuesta celular y humoral se pierde con el uso de adyuvantes (39, 47, 67). En nuestro modelo experimental, no se observó regulación alguna; es posible que estos resultados se deban tanto al carácter adyuvante que poseen M. tuberculosis y N. brasiliensis (70, 71), como al uso de AIF.

Ahora bien, ¿cuál es el papel de estos anticuerpos en el fenómeno de protección inducido por la inmunización? Nuestros resultados en los animales desafiados muestran que los títulos de anticuerpos encontrados no se relacionan con la evolución favorable o desfavorable del micetoma. Así, el grupo inmunizado con BCG endovenoso, es el menos protegido sin embargo presenta los títulos de anticuerpos más elevados (Tabla 1). Por otro lado, los animales inoculados con N. brasiliensis viva o

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

muerta, que desarrollan protección, también muestran Ac-anti-N en títulos similares; esto nos hace pensar que, en las infecciones por Nocardia, los anticuerpos no juegan un papel determinante en la protección. Por otra parte, la respuesta de IMC si parece ser determinante, ya que los grupos en los cuales se observa una reacción de hipersensibilidad tardía más elevada y duradera (Figs. 5 y 6), son los mejor protegidos (Fig. 2). Aunque los animales inmunizados con BCG o M. tuberculosis muestran también reactividad cutánea al antígeno de Nocardia, esto se debe principalmente a que dichos microorganismos comparten antígenos de reacción cruzada (4, 16, 24, 43, 44, 50 y 51).

Por último se hizo necesario observar como estaban influyendo los fenómenos encontrados en los estudios anteriores en la microbiología e histopatología del micetoma. Los resultados son bastante claros ya que los animales no inmunizados siempre desarrollaron micetomas activos demostrados por el estudio bacteriológico e histopatológico de los miembros afectados. De los animales inmunizados, aquellos que se inmunizaron con el microorganismo homólogo presentaron una mayor protección. El estudio histopatológico de los animales inmunizados con Nocardia muerta no mostró la presencia de gránulos actinomicósicos, aunque en algunos casos fué posible aislar N. brasiliensis a partir de las secreciones y tejidos del miembro afectado por el desafío (Tablas III y IV). Cabe la posibilidad de que estos animales con retrocultivos positivos, en los cuales no se encontraron gránulos

los tanto en el examen directo como en el estudio-histopatológico, pudieran desarrollar posteriormente, un micetoma activo. Es posible que la formación de gránulos en los tejidos del huésped se viera afectada por los mecanismos inmunológicos inducidos por la inmunización.

En resumen, podemos decir que la inmunización con N. brasiliensis es capaz de proteger a ratones frente a un desafío con el microorganismo homólogo, aumentando su respuesta celular, sin mostrar cambios importantes en los títulos de anticuerpos y sin embargo inhibiendo el desarrollo del micetoma. Todo lo anterior parece indicar que los mecanismos de inmunidad celular juegan un papel muy importante en el fenómeno de protección en las infecciones debidas a N. brasiliensis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

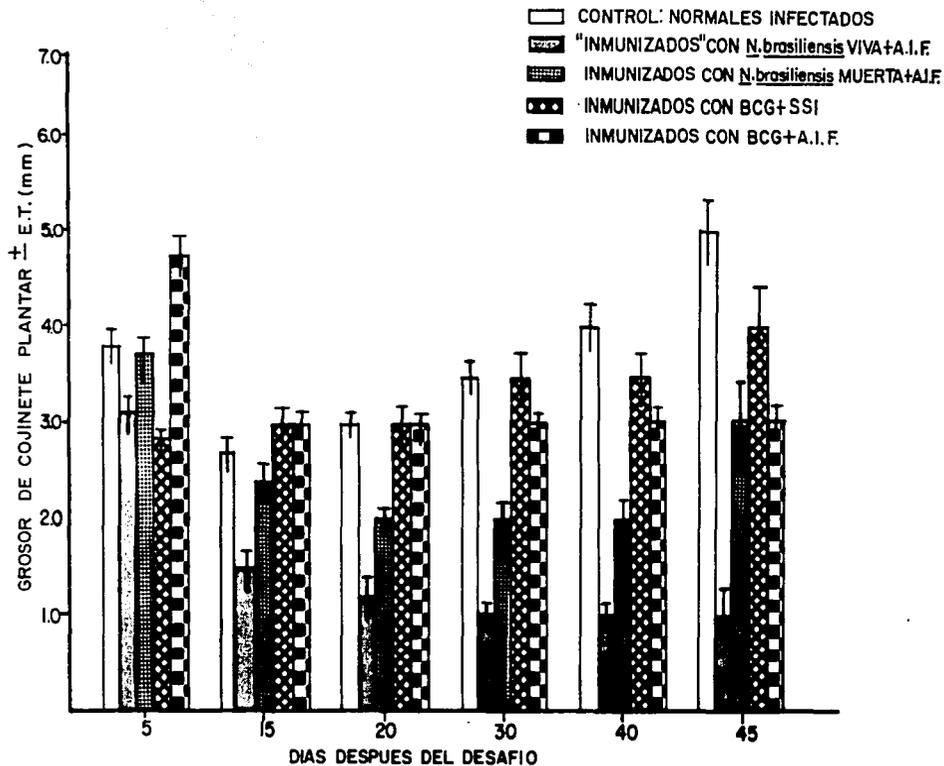


FIG.1 RESULTADOS DE LA EVOLUCION DEL MICETOMA EN ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 Y DESAFIADOS A LOS 12 DIAS

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

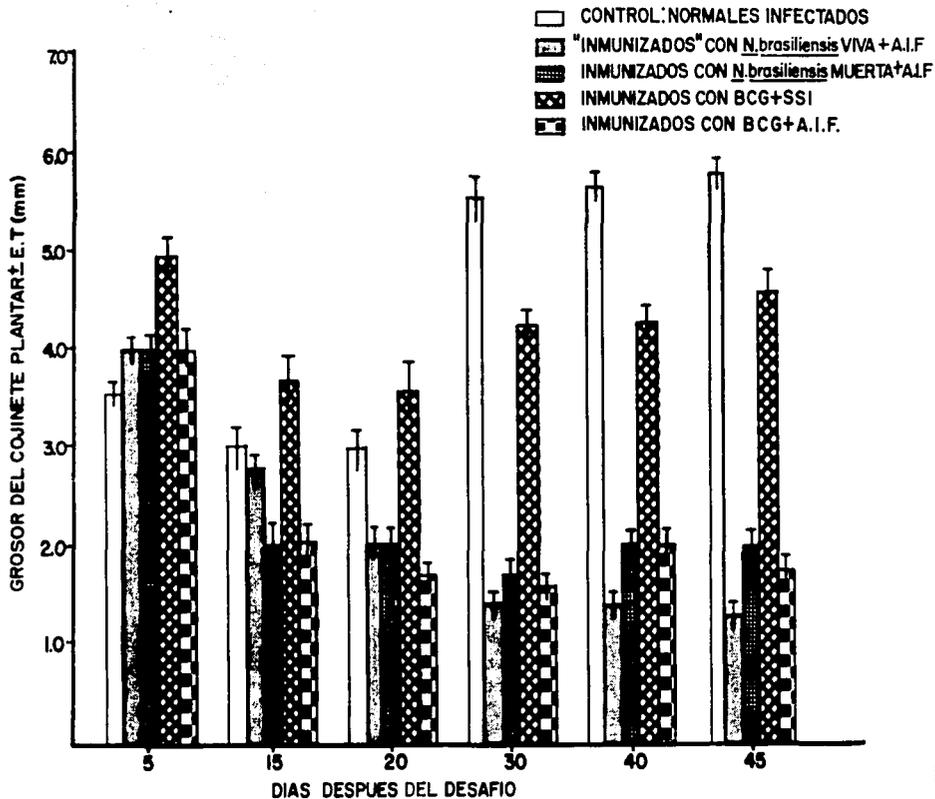


FIG.2 RESULTADOS DE LA EVOLUCION DEL MICETOMA EN ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA O Y DESAFIADO A LOS 20 DIAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

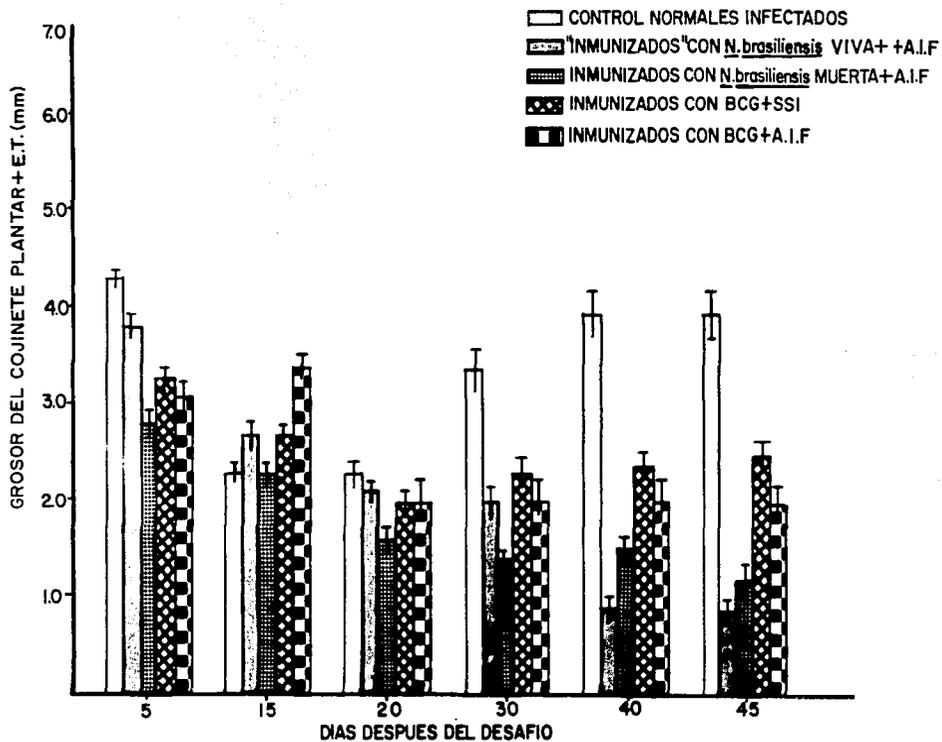


FIG. 3 RESULTADOS DE LA EVOLUCION DEL MICETOMA EN ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 Y DESAFIADOS A LOS 30 DIAS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

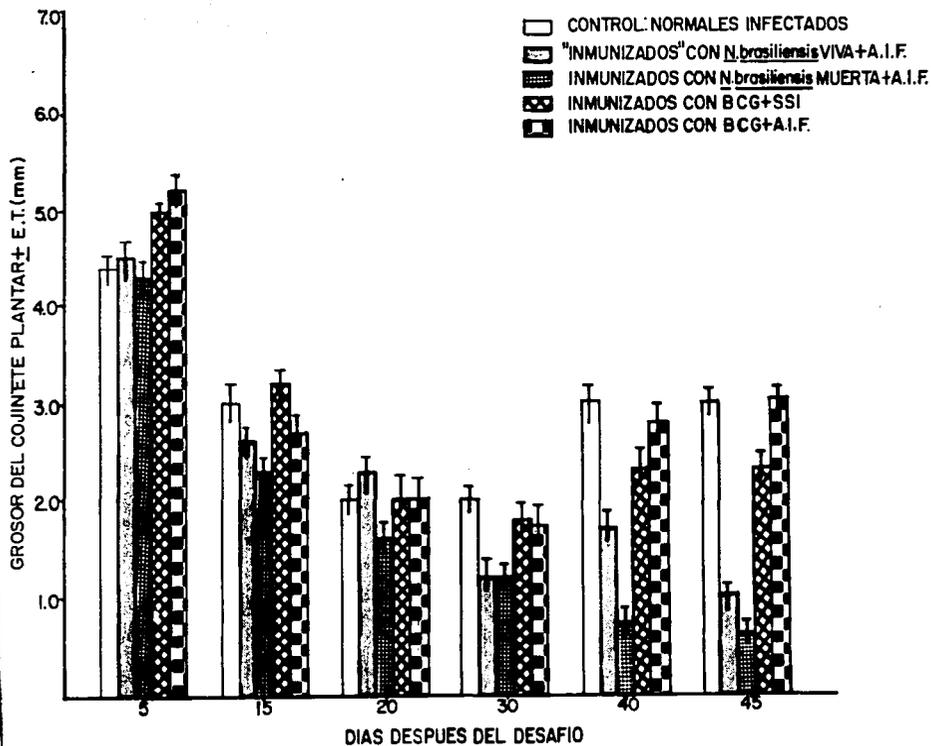


FIG.4. RESULTADOS DE LA EVOLUCION DEL MICETOMA EN ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 Y DESAFIADOS A LOS 60 DIAS.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

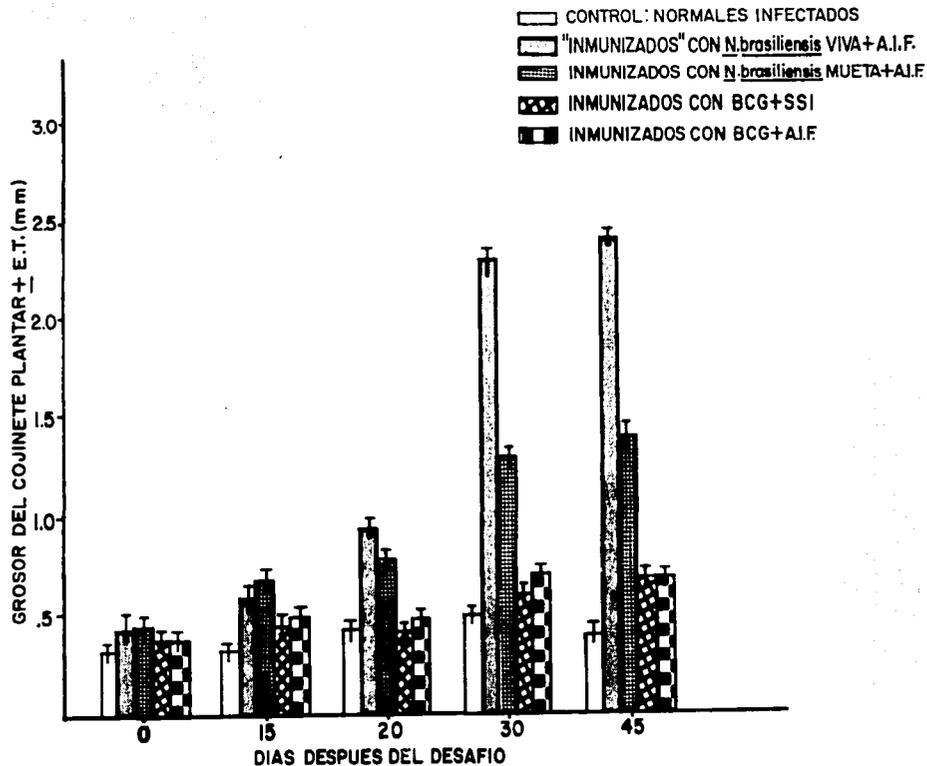


FIG. 5 RESULTADOS DE LA PRUEBA CUTANEA; ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 Y DESAFIADOS A LOS 20 DIAS DESPUES

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

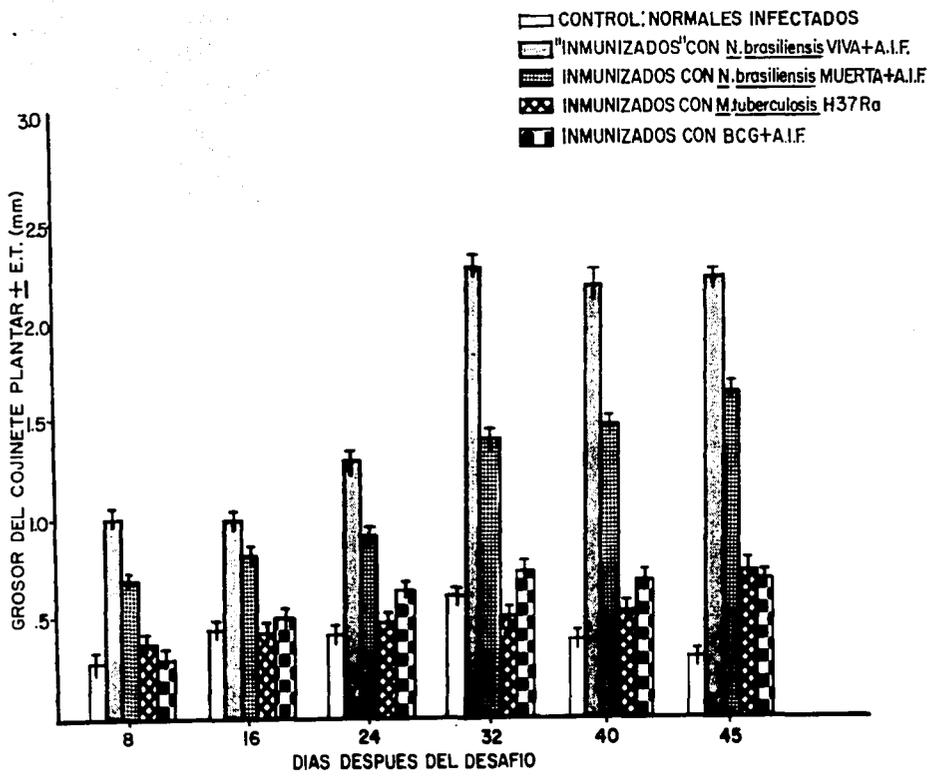


FIG. 6 RESULTADOS DE LA PRUEBA CUTANEA: ANIMALES INOCULADOS EN EL DIA 0 Y 8, DESAFIADOS A LOS 20 DIAS DESPUES DE LA INOCULACION

T A B L A I

TITULOS DE ANTICUERPOS

ANTI-N. brasiliensis<sup>a</sup>

TRATAMIENTO PREVIO AL DESAFIO	DESAFIO CON $2.0 \times 10^8$ <u>N. brasiliensis</u>			CELULAS DE	
	DIAS	DESPUES	DEL	DESAFIO	
	0	15	25	30	45
NINGUNO	0	0	32	64	64
$2 \times 10^8$ CELULAS DE <u>N. brasiliensis</u> VIABLES SUSPENDI- DAS EN A.I.F. <sup>c</sup>	0	64	128	NSH	NSH
$2 \times 10^8$ CELULAS DE <u>N. brasiliensis</u> MUERTAS SUSPENDIDAS EN A.I.F.	0	64	64	128	128
$4 \times 10^6$ BCG VIABLES SUSPENDIDAS EN A.I.F. <sup>c</sup>	0	0	32	128	128
$4 \times 10^6$ BCG VIABLES SUSPENDIDOS EN S.S.I. <sup>d</sup>	0	8	64	128	512

- a) SE TITULARON ANTICUERPOS ANTI-Nocardia POR EL METODO DE HEMAGLUTINACION PASIVA. CADA DATO REPRESENTA LOS TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS EN UNA MEZCLA DE SUERO DE 5 RATONES.
- b) EL DESAFIO SE HIZO 20 DIAS DESPUES DE LA INMUNIZACION.
- c) ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 UTILIZANDO LA VIA SUBCUTANEA EN EL COJINETE PLANTAR.
- d) ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 UTILIZANDO LA VIA ENDOVENOSA.

T A B L A II  
TITULOS DE ANTICUERPOS

ANTI-N. brasiliensis<sup>a</sup>

TRATAMIENTO PREVIO AL DESAFIO	DESAFIO CON $2 \times 10^8$ CELULAS DE <u>N. brasiliensis</u> <sup>b</sup>				
	DIAS 8	DESPUES 24	DEL 32	DESAFIO 40	DESAFIO 45
NINGUNO	0	128	128	128	64
$2 \times 10^8$ CELULAS DE <u>N. brasiliensis</u> VIA- BLES SUSPENDIDAS EN A.I.F. <sup>c</sup>	-	512	512	128	128
$2 \times 10^8$ CELULAS DE <u>N. brasiliensis</u> MUE- RAS SUSPENDIDAS EN A.I.F. <sup>c</sup>	0	64	32	256	256
$4 \times 10^6$ BCG VIABLES SUSPENDIDOS EN A.I.F. <sup>c</sup>	0	32	256	512	128
200 ug de <u>M. tubercu-</u> <u>losis</u> H37 Ra SUSPENDI- DAS EN A.I.F. <sup>c</sup>	0	64	256	128	128

- a) SE TITULARON ANTICUERPOS ANTI-Nocardia POR EL METODO DE HEMAGLUTINACION PASIVA. CADA DATO REPRESENTA LOS TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS EN UNA MEZCLA DE SUERO DE 5 RATONES.
- b) EL DESAFIO SE HIZO 20 DIAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION.
- c) ANIMALES INMUNIZADOS EN DIA 0 Y 8 UTILIZANDO LA VIA SUBCUTANEA EN LA REGION DE LA NUCA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T A B L A III

RESULTADO DEL EXAMEN BACTERIOLOGICO E HISTOPATOLOGICO<sup>a</sup>

TRATAMIENTO PREVIO AL DESAFIO	GRANULOS ACTINOMICOSICOS <sup>b</sup>		RETROCULTIVOS <sup>c</sup>		HISTOPATOLOGIA <sup>d</sup>	
	POSITIVOS/TOTALES	NUMERO/CAMPO	POSITIVOS/TOTALES	CARACTERISTICAS	MICETOMA	
NINGUNO	5/5	20	5/5	TIPICA DE MICETO MA ACTIVO.	5/5	
2 x 10 <sup>8</sup> CELULAS DE N. brasiliensis VIABLES SUSPENDIDAS EN A.I.F.	0/5	0	1/5	INFLAMACION CRO- NICA Y FIBROSIS EN 4/5 MICETOMA EN 1/5.	1/5	
2 x 10 <sup>8</sup> CELULAS DE N. brasiliensis MUERTAS SUSPENDIDAS EN A.I.F.	0/5	0	2/5	INFLAMACION CRONI CA Y FIBROSIS. NO HAY MICETOMA.	0/5	
4 x 10 <sup>6</sup> B.C.G. VIA-- BLES SUSPENDIDAS EN A.I.F.	3/5	10	4/5	MICETOMA EN 2/5 INFLAMACION CRONI CA EN 3/5.	2/5	
4 x 10 <sup>6</sup> B.C.G. VIA-- BLES SUSPENDIDAS EN S.S.I.	3/5	10	5/5	NSH <sup>f</sup>		

- a) ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 POR VIA SUBCUTANEA EN EL COJINETE PLANTAR Y DESAFIADOS 20 DIAS DESPUES DE LA INMUNIZACION.
- b) SE TOMARON MUESTRAS DE LAS FISTULAS Y ABSCESOS PRODUCIDOS POR EL DESAFIO, SE HIZO FROTIS Y TINCION CON ERITROCINA AL 1% EN SOLUCION ACUOSA Y SE OBSERVO AL MICROSCOPIO PARA LA BUSQUEDA DE GRANULOS ACTINOMICOSICOS.
- c) SE TOMARON MUESTRAS DE PUS A PARTIR DE LAS FISTULAS Y ABSCESOS, SE LAVARON CON SSI ESTERIL Y SE SEMBRARON EN CAJAS CON MEDIO SOLIDO DE PROKAUER Y BECK MODIFICADO POR YOUMANS Y KARLSON, ADICIONADO con 100 U DE PENICILINA SODICA POR ML DE MEDIO; SE INCUBARON LOS CULTIVOS A 37° DURANTE 15 DIAS.
- d) SE AMPUTARON LAS PATAS AFECTADAS POR EL DESAFIO, SE FIJARON EN FORMOL AL 10%, Y SE HICIERON 10 COR TES DE CADA MUESTRA PROCESADA Y SE EXAMINARON.
- e) ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 POR VIA ENDOVENOSA Y DESAFIADOS 20 DIAS DESPUES.
- f) NO SE HIZO.

TESIS CON  
 VALIA DE ORIGEN

T A B L A I V  
 RESULTADO DEL EXAMEN BACTERIOLOGICO E HISTOPATOLOGICO<sup>a</sup>

TRATAMIENTO PREVIO AL DESAFIO	GRANULOS ACTINOMICOSICOS <sup>b</sup> POSITIVOS/TOTALES NUMERO/CAMPO		RETROCULTIVOS <sup>c</sup> POSITIVOS/TOTALES	HISTOPATOLOGIA <sup>d</sup> CARACTERISTICAS MICETOMA
NINGUNO	7/7	15	7/7	MICETOMA ACTIVO 7/7
2 x 10 <sup>8</sup> CELULAS DE <i>N. brasiliensis</i> VIABLES SUSPENDIDAS EN A.I.F.	1/7	5	2/7	MICETOMA EN 2/7 INFLAMACION CRO NICA Y FIBROSIS EN 5/7.
2 x 10 <sup>8</sup> CELULAS DE <i>N. brasiliensis</i> MUERTAS SUSPENDIDAS EN A.I.F.	1/7	3	1/7	INFLAMACION CRO NICA CON RELACION XANTOGRANULOMATOSA NO HAY MICETOMA. 0/7
4 x 10 <sup>6</sup> BCG VIABLES SUSPENDIDAS EN A.I.F.	NSH <sup>e</sup>		NSH <sup>e</sup>	MICETOMA 7/7
200 ug DE <i>M. tuberculosis</i> H37 Ra SUSPENDIDOS EN A.I.F.	4/7	16	4/7	MICETOMA 4/7

a) ANIMALES INMUNIZADOS EN EL DIA 0 Y 8 VIA SUBCUTANEA EN LA REGION DE LA NUCA Y DESAFIADOS 20 DIAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION.

b-d) VER TABLA III.

e) NO SE HIZO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABBOTT, P. Mycetoma in the Sudan. Trans. R. - Soc. Trop. Med. Hyg. 50: 11, 1956.
2. BLUMING, A.Z.; Vogel, C.L.; Ziegler, J.L.; - Mody, N. y Kamia, G. Immunological - - effects of BCG in malignant melanoma: - two modes of administration compared. - Ann. Int. Med. 76: 405, 1972.
3. BOJALLI, L.F. y Magnusson, M. Specificity of skin reaction of humans to Nocardia sensitins. Am. Rev. Resp. Dis. 88: 409, - 1963.
4. CUMMINS, C.S. Chemical composition and antigenic structures of cell walls of Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, - Actinomyces and Arthrobacter. J. Gen.- Microbiol. 28: 35, 1962.
5. DAVID-CHAUSSE, J.; Texier, L. y Darrasse, H.- Mycetoma du pied autochtone a Pyrenochaeta romeroi. Bull. Soc. Fr. Dermatol. - Syphiligr. 75: 452, 1968.
6. FOLB, P.I.; Timme, A. y Horowitz, A. Nocardia infection in congenitally athymic (nude) mice and other inbred mouse strains. - Infec. Immun. 18: 459, 1977.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

7. GENTRY, L.O. y Remington, J.S. Resistance - - against Cryptococcus conferred by intra cellular bacteria and protozoa. J. Infect. Dis. 123: 22, 1971.
8. GLOBER, R.P.; Herrel, W.E.; Heilman, F.R. y Pfuetze, K. H. Nocardiosis. Nocardia - asteroides infection simulating pulmonary tuberculosis. J. Am. Med. Ass. 136: 172, 1948.
9. GONZALEZ-OCHOA, A. Virulence of nocardiae. - Can. J. Microbiol. 19: 901, 1973.
10. GONZALEZ-OCHOA, A. y Baranda, F. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma por Nocardia brasiliensis. Rev. - - Inst. Salubr. Enf. Trop. (Méx.) 13: 189, 1953.
11. GONZALEZ-OCHOA, A. Mycetomas caused by Nocardia brasiliensis, with a note on the - isolation of the causative organism - - from soil. Lab. Invest. 11: 1118, 1962.
12. GONZALEZ-OCHOA, A.; Shibayama, H.; Félix, D. - y Anaya, M. Immunological aspects of - actinomycotic mycetoma and nocardiosis. XII Inter. Congr. Dermatol. Excerpt. - - Med., International Congress No. 55: - 542, 1962.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

13. GONZALEZ-OCHOA, A. y Sandoval, M.A. Aislamiento de Nocardia brasiliensis y asteroides a partir de suelos. Rev. Inst.-Salubr. Enf. Trop. (Méx.) 20: 147, 1960.
14. GUTTERMA, J.U.; McBride, C.; Freireich, E.J.; Mavligit, C.; Frei, E. y Hersh, E.M. - Active immunotherapy with BCG for recurrent malignant melanoma. Lancet 1: - - 1208, 1973.
15. KRAHENBUHL, J.L. y Remington, S.S. In vitro - induction of non specific resistance in macrophage by specifically sensitized - lymphocytes. Infect. Immun. 4: 337, - - 1971.
16. KWAPINSKY, J.B. y Snyder, M.L. Antigenic - - structures and serological relationship of Mycobacterium, Actinomyces, Streptococcus and Diplococcus. J. Bacteriol. - 82: 632, 1961.
17. LACAZ DA SILVA, C. Contribuicao para o estudo dos actinomicetos productores de mi cetoma. Tesis. Rec. Med. Univ. Sao Paulo. Brazil, 1945.
18. LARSH, J. E. Weatherly, N.F. Cell mediated - immunity in certain parasitic infec- - tions. Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 67: 113, 1974.

19. LAGRANGE, P.H.; Mackaness, G.B. y Miller, T.E. Potentiation of T-cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. J. Exp. Med. 139: 1529, 1974.
20. LAVALLE, P. Agents of Mycetoma. En Fungi and fungus disease (G. Dalldorf, Ed.) - Charles C. Thomas, Springfield, 1962 p. 50.
21. LYNCH, J.B. Mycetoma in the Sudan. Ann. R. Coll. Surg. Engl. 35: 319, 1964.
22. MACKANESS, G.B. The immunological basis of acquired cellular resistance. J. Exp. Med. 120: 105, 1964.
23. MACKANESS, G.B.; Auclair, D.J. y Lagrange, P.H. Immunopotential with BCG. I. Immune response to different strains and preparation. J. Natl. Cancer Inst. 51: - 1655, 1973.
24. MAGNUSSON, M. Specificity of mycobacterial sensitins. I. Studies in guinea pigs with purified "tuberculin" prepared from mammalian and avian tubercle bacilli Mycobacterium balnei and other acid fast bacilli. Am. Rev. Resp. Dis. 83: - 57, 1961.

25. MAHGOUR, El Sheikh. Serologic diagnosis of - mycetoma. Proc. Third International Conference on the mycosis. Sao Paulo Brazil, 1975 p. 154.
26. MARIAT, F. Sur la distribution géographique et la repartition des agents de mycetomes. Bull. Soc. Pathol. Exot. 56: 35, - 1963.
27. MATHE, G.; Kamel, M.; Dezfulian, M.; Halle - Pannenko, O. y Bourut, C. And experimental screening for "Systemic adjuvants of immunity" applicable in cancer immunotherapy. Cancer Res. 33: 1987, 1973.
28. MAUEL, J. y Behin, R. Cell-mediated and humoral immunity to protozoan infection. - Transplant. Rev. 19: 121, 1974.
29. 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.
30. MELENDRO, E.I.; Contreras, M.F.; Ximénez, C.; García Maynez, A.M. and Ortiz-Ortiz, L. Changes in host resistance caused by -- Nocardia brasiliensis in mice: Cross - protection against Listeria monocytogenes. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. - 57: 74, 1978.

31. MILLER, T.E.; Mackaness, G.B. y Lagrange, P.H. Immunopotential with BCG. II. Modulation of the response to sheep red blood cells. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1669,-1973.
32. NELSON, D.S. Macrophages as effectors of - - cell-mediated immunity C.R.C. Crit. Rev. Microbiol. 1: 353, 1972.
33. ORTIZ-ORTIZ, L. and Bojalil, L.F. Delayed - skin reaction to cytoplasmic extract of Nocardia organisms as a mean of diagnosis and epidemiological study of Nocardia infections. Clin. Exp. Immunol. - - 12: 225, 1972.
34. ORTIZ-ORTIZ, L.; Contreras, M.F. and Bojalil, L.F. Delayed hypersensitivity to polysaccharides from Nocardia. J. Immunol.- 108: 1409, 1972.
35. ORTIZ-ORTIZ, L.; Contreras, M.F. and Bojalil, L.F. Cytoplasmic antigens from Nocardia eliciting a specific delayed hypersensitivity. Infect. Immun. 5: 879, 1972.
36. ORTIZ-ORTIZ, L.; Contreras, M.F. and Bojalil, L.F. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from Nocardia. Sabouraudia 10: 147, 1972.

37. ORTIZ-ORTIZ, L.; Contreras, M.F.; Melendro, - M.E. y Bojalil, L.F. Inmunidad celular en infecciones producidas por Nocardia brasiliensis. Proceedings First International Conference on the Biology of Nocardie. Mérida Venezuela, 1974. p. 106.
38. ORTIZ-ORTIZ, L.; Ortega, M.T.; Capín, R. y - Martínez, M.T. Enhanced mononuclear phagocytic during Trypanosoma cruzi infection in mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 50: 232, 1976.
39. PARKER, D.; Scheper, R.J. y Turk, J.L. The relation between B-cell stimulation and - delayed hypersensitivity. Immunology - 32: 885, 1977.
40. PETERS, L.C.; Hanna, M.G. y Hersh, E.M. Modulation of the immune response of guinea pigs by repeated BCG scarification. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147: 344, -- 1974.
41. REMINGTON, J.S. y Merigon, T.C. Resistance - to virus challenge in mice infected - - with protozoa or bacteria. Proc. Soc. - Exp. Biol. Med. 131: 1184, 1969.
42. RICO, R. Ma. G. y Ochoa, R.R. Papel de la - respuesta celular y humoral en infecciones producidas por Nocardia brasiliensis. Tesis Profesional, Facultad de - - Ciencias, U.N.A.M. México 1977.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

43. RIDELL, M. Serological study of nocardiae and mycobacteria by using "Mycobacterium" - pellegrino and Nocardia corallina precipitation reference system. Int. J. Syst. Bact. 24: 64, 1974.
44. RIDELL, M. y Norlim, M. Serological study of Nocardia by using mycobacterial precipitation reference systems. J. Bacteriol. 113: 1, 1973.
45. RIPPON, J.W. The pathogenic actinomyces. Medical Mycology. E.B. Saunders Company - Philadelphia. London 1974 p. 48.
46. RUSKIN, J.; McIntosh, J. S. Studies on the mechanism of resistance to phylogenetically diverse intracellular organism. - J. Immunol. 103: 252, 1969.
47. TURK, J.L.; Parker, D. y Poulter, L.W. Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. Immunology. 23: 492, 1972.
48. SEGRETAİN, G. y Mariat, F. Recherches sur la presence d'agents de mycetomes dans le sol et sur les spineus du Senegal et de la Mauritanie. Bull. Soc. Pathol. Exot. 61: 194-202, 1968.

49. SEGRETAİN, G. y Destombes, P. Recherche sur -  
le mycetomes a Madurella grisea et - -  
Pyrenchaeta romeroi. Sabouraudia 7: 51-  
61, 1969.
50. GONZALEZ-OCHOA, A. y Vázquez-Hoyos, F. Rela--  
ciones serológicas de los principales -  
actinomyces patógenos. Rev. Inst. --  
Salubr. Enf. Trop. (Méx.) 13: 177, 1953.
51. YAMAMURA, Y.; Misaki, A. y Azuma, I. Chemical  
and serological studies on polysacchari  
de antigens of mycobacteria, Nocardia -  
and Corynebacteria. Bull. Un. Int. Tu--  
ber. 47: 181, 1972.
52. YOMANS, G.P. y Karlson, A.C. Streptomycin -  
sensitivity of tubercule bacilli and -  
the development of resistance to Strep--  
tomycin in vivo. Amer. Rev. Tuber. 55:-  
529, 1947.
53. BOJALIL, L.F. y Zamora, A. Precipitin and -  
skin test in the diagnosis of mycetoma--  
due to Nocardia brasiliensis. Proc. Soc.  
Exp. Biol. Med. 113: 40, 1963.
54. ZAMORA, A.; Bojalil, L.F. y Bastarrachea, F.--  
Immunologically active polysaccharides  
from Nocardia asteroides and Nocardia -  
brasiliensis. J. Bacteriol. 85: 549, --  
1963.

55. DIXON, W.J. y Massey, S.J. Introduction to -  
statistical analysis. M.C. Graw-Hill, -  
New York, 1969 p. 43.
56. AVRAMEAS, S. Coupling of enzyme to protein -  
with glutaraldehyde. Use of the conjuga  
tes for the detection of antigens and -  
antibodies. Immunochemistry 6: 43, 1969.
57. KAGAN, G.I. Manual Techniques. Center for - -  
Diseases Control, Atlanta Georgia, 1972.
58. ORTIZ-ORTIZ, L.; González, M.A. y Lamoyi, E.A  
vaccination procedure against Trypano--  
soma cruzi infection in mice by non - -  
specific immunization. J. Immunol. 114:  
1424, 1975.
59. AREA LEAO, A.E. L'intradermo-reaction dans -  
l'actinomyose. Reaction specifique de-  
la peau avec le filtrat de culture d'Ac  
tinomyces bovis. Cr. Soc. Biol. (Paris)  
98: 1575, 1928.
60. LOWRY, O.H.; Rosebraught, N.J.; Farr, A.L. y-  
Randall, R.J. Protein measurements with  
the folin reagent. J. Biol. Chem. 193: -  
265, 1951.
61. RUSKIN, J. y Remington, J.S. Resistance to -  
Listeria and Salmonella induced by Toxo  
plasma. J. Clin. Invest. 47:85, 1968.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

62. COLLINS, F.M. Recall of immunity in mice vaccinated with Salmonella enteritidis or Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. - 95: 2014, 1968.
63. MACKANESS, G.B. Varied effects of lymphocyte-products ranging from destruction of - target cells to activation of lymphocytes and macrophages. En Mediators of cellular immunity (Lawrence, H.S. y Landy, N., Eds.) Academic Press, New York, - - 1969 p. 370.
64. NATHAN, C.F.; Remold, H.G. y Davis, J.R. Characterization of a lymphocyte factor -- which alters macrophages function. J. - Exp. Med. 137: 275, 1973.
65. BLANDEN, R.V.; Lefford, M.J. y Mackaness, G.B. The host response to BCG infection in -- mice. J. Exp. Med. 129: 1079, 1969.
66. NOBLE, B.; Parker, D.; Scheper, R.J. y Turk, - J.L. The relation between B-cell stimulation and delayed hypersensitivity. -- Immunology. 32: 886, 1977.
67. MACKANESS, G.B.; Lagrange, P.H.; Miller, T.E. e Ishibashi, T. Feedback inhibition of specifically sensitized lymphocytes. J. Exp. Med. 139: 543, 1974.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

68. SEGRETAİN, G.; Drouhet, E. y Mariat, F. Diagnóstico de laboratorio en Micología Médica. Prensa Méd. Mex. México, 1976 -- p. 63.
69. MACKANESS, G.B. Cellular resistance to infection. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance. Br. Med. Bull. 23: 52, 1967.
70. 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.
71. FREUND, J. and Mcdermott, K. Sensitization - to horse serum by means of adjuvants. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49: 548--553, 1942.
72. COLLINS, F.M., MACKANESS, M.B., y BLANDEN, R. V. Infection Immunity in Experimental-Salmonellosis. J. Exp. Med. 124: 601, - 1966.
73. BLANDEN, R.V., MACKANES, G.B. y COLLINS, F.M., Mechanism of acquired resistance in mouse typhoid. J. Exp. Med., 124: 585, - - 1966.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

74. RUSKIN, J. y REMINGTON, J. Resistance to intracellular infection in mice immunized with toxoplasma vaccine and adjuvant. - J. Reticuloendothel Soc. 9: 465, 1971.
75. COLLINS, F.M. y MACKANESS, G.B. The relationship of delayed hypersensitivity to - - acquired antituberculous immunity. Cell Immunol., 1: 266, 1970.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN