



La transferencia pasiva de células esplénicas de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* evita el establecimiento de la infección

ANNA V. VÁZQUEZ M.*, LUZ PÉREZ RIVERA*, PATRICIA A. GALLEGOS V.*,
MARIO C. SALINAS CARMONA*

Nocardia brasiliensis es el principal agente causal del actinomictoma en México,¹ el mictoma es una enfermedad infecciosa crónica de la piel y tejido celular subcutáneo que en ocasiones se extiende al músculo, a los huesos y a los órganos adyacentes. En nuestro medio, usualmente, afecta a las extremidades inferiores.^{2,3}

El mictoma granulomatosa crónica se caracteriza por una inflamación persistente, con áreas de abscesos múltiples donde pueden encontrarse microcolonias del agente causal llamados gránulos o granos macroscópicamente visibles, de alrededor de 1 mm de diámetro, colores variables y células inflamatorias que rodean las colonias microscópicas del organismo infectante.^{2,4} La defensa del huésped contra la infección de microorganismos intracelulares depende, críticamente, de la presencia, funcionalidad e integridad de los fagocitos mononucleares (MO). Los macrófagos eliminan la mayoría de las nocardias mediante la fagocitosis. En particular, esas células son elementos centrales, tanto en la respuesta innata como en la respuesta adoptiva a la invasión microbiana.²

Estudios realizados por Krick *et al.*⁵ y Melendro, en México, propusieron que la inmunidad no específica mediada por macrófagos confiere resistencia cruzada en ratones infectados con gérmenes

intracelulares, como la *Listeria monocytogenes* o *Toxoplasma gondii*.⁶

Por otra parte, se sabe que macrófagos de distintos sitios anatómicos difieren en sus interacciones con la nocardia. Y células de Kupffer de ratones no inmunizados muestran capacidad menor para la fusión fagosoma-lisosoma y permiten el crecimiento de cepas de nocardia de virulencia mayor e intermedia, en tanto que los macrófagos de peritoneo y de bazo muestran capacidad mayor para fagocitar las células microbianas en la fusión fagosoma-lisosoma.²

En la defensa del huésped contra las infecciones por microorganismos intracelulares, entre éstos la nocardia, se han propuesto como esenciales tanto los efectores de la resistencia innata como los de la inmunidad adquirida específica.⁷ En el caso de los microorganismos patógenos intracelulares como *Listeria*, *mycobacterium*, *Salmonella* y *Nocardia*, la contribución de la inmunidad celular (LT) en el control de la infección se ha estudiado. En el caso de las infecciones con LVS, el ratón atímico muere en la primera semana de infección. Sin embargo, en otros experimentos realizados con *Salmonella* y *Listeria*, se observó que el

*Departamento de Inmunología de Hospital Universitario "Dr. José E. González". Facultad de Medicina, UANL.

control de la infección se lleva a cabo mediante la participación de la respuesta inmune humoral (células B). En tales experimentos se demostró un efecto protector en la fase temprana de la respuesta inmune humoral⁸. Debido a esto, Salinas-Carmona y Pérez-Rivera⁹ demostraron que los animales inmunizados con antígenos solubles purificados de *N. brasiliensis*,^{10,11} en forma activa y pasiva, solamente en los primeros días de la inmunización: 15 y 7, respectivamente, quedaban protegidos de la infección por *N. brasiliensis*.

Tales resultados concuerdan con Salinas-Carmona y Torres-López,¹² quienes mostraron que la transferencia pasiva de suero antibacterias muertas por calor confiere protección al transferirse a otro ratón que había sido infectado con *Nocardia brasiliensis*. Asimismo, en los resultados mostrados por Licón-Trillo *et al.*¹³ el suero antiproteasa obtenido en los días 30 y 60 posinmunización protege total y parcialmente a los animales que luego fueron infectados con *N. brasiliensis*, mientras que los sueros antiproteasa obtenidos en los días 90 y 120 no los protegen. El propósito de este estudio es investigar el papel que juegan las células mononucleares obtenidas del bazo de ratones inmunizados con antígenos de *Nocardia brasiliensis*, presentes específicamente en los días en los cuales se ha visto que hay protección para transferirlas a otros recipientes, y para observar el efecto de estas células sensibilizadas en el establecimiento y evolución de micetoma experimental causado por *N. brasiliensis*.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron 50 ratones BALB/c (hembras y machos de 12 a 14 semanas de edad) con peso promedio de 20 g. Esta cepa la donó gentilmente el Dr. Hanson, de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda Ma), en 1982, y se ha mantenido en el Bioterio del Departamento de Inmunología. A los roedores se les proporcionó alimen-

to comercial (Purina de México S.A. de C.V.) y agua estéril *Ad libitum*.

Obtención de la cepa de *N. brasiliensis*

Se utilizó en este estudio la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1, obtenida en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario «Dr. José E. González» (UANL), de un paciente al que se le diagnosticó micetoma, registrada en el ATCC por el Dr. Mario C. Salinas C., con el número 700358, gracias a la confirmación realizada por June Brown.¹⁷

Esta bacteria se mantiene cultivada en Medio Agar Sabouraud a 37°C.

Obtención de la suspensión unicelular¹⁸

A partir de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1, la cual se cultiva en Agar Sabouraud, se tomó con una asa bacteriológica un acumulo de colonias, y éstas se colocaron en 30 ml de medio de un cultivo e infusión de cerebro-corazón (BHI) contenido en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Posteriormente, se incubaron a 37°C con agitación durante 48-72 hrs (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/precisión Scientific)

Las colonias hidratadas se colocaron en tubos cónicos de 50 ml (Falcón) con tapón de rosca y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. Después de decantar el sobrenadante, se le agregó 10 ml de solución salina 0.85% y se colocó en un tubo cónico de 50ml, donde se trituró con un agitador de vidrio; luego se lavaron las bacterias con solución salina de 0.85%. Asimismo, se homogeneizaron (Potter-Evelham) y se obtuvo una suspensión bacteriana unicelular. Finalmente, a la suspensión bacteriana unicelular se le determinó UFC/ml (Miles y Misra) y se ajustaron a una concentración de 10×10^6 /ml, utilizando 0.1 ml de esta suspensión para infectar a los ratones BALB/c.

Obtención y purificación de los antígenos solubles de *N. brasiliensis* (P24, P61 y proteasa)

A partir del extracto celular crudo de *N. brasiliensis* se obtuvo la masa bacteriana, la cual fue deslipidizada con una mezcla de etanol: éter; posteriormente, se hizo una extracción de proteínas con buffer Tris-acetato de magnesio 0.1 M pH 7.4. La proteína p24 se obtuvo mediante la precipitación de proteínas a 50% con sulfato de amonio saturado del extracto celular crudo; después de la precipitación se centrifugó y del sobrenadante filtrado por sephadex G100 se obtuvo la proteínas P24, mientras que la P61 y la proteasa se obtuvieron a partir del precipitado mediante elusión mecánica a partir de geles preparativos a 12%.

Inmunización de los ratones BALB/c con antígenos solubles de *N. brasiliensis*

Se utilizaron tres grupos de ratones de 10 cada uno, los cuales se inmunizaron con 20µg/0.1ml más 0.1 ml de AIF de la proteínas P24, P61 y proteasa, respectivamente. La inmunización se realizó por vía sc., y los animales se sacrificaron a diferentes tiempos de ésta (45, 30, 15 y 7 días). A continuación, en condiciones de esterilidad, se obtuvo el bazo de los ratones, del cual se obtuvieron las células esplénicas que después se transfirieron a otros grupos de ratones BALB/c (receptores).

Transferencia pasiva de células mononucleares de bazo de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis*

Las células MN obtenidas de los bazos de los ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* a diferentes tiempos de inmunización (7, 15, 30 y 45 días posinmunización) se ajustaron a una concentración de 100,000 células/0.1 ml, las cuales se transfirieron vía IP. Una vez transferidas las células MN a los ratones BALB/c (receptores), in-

mediatamente se infectaron éstos con *N. brasiliensis*.

Infección con *N. brasiliensis* a los ratones BALB/c (receptores) que recibieron las células MN de los ratones inmunizados con antígenos solubles con *N. brasiliensis*²⁰

Todos los ratones transferidos pasivamente con las células MN provenientes de los ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis*; posteriormente, fueron infectados con 0.1 ml de una suspensión de *N. brasiliensis*, cuya concentración fue de $10 \times 10^6/1\text{ml}$ en el cojinete plantar. Después de la infección con la bacteria, a los animales se les midió la inflamación del cojinete plantar con un vernier.

Los resultados se graficaron en mm de inflamación contra días de infección

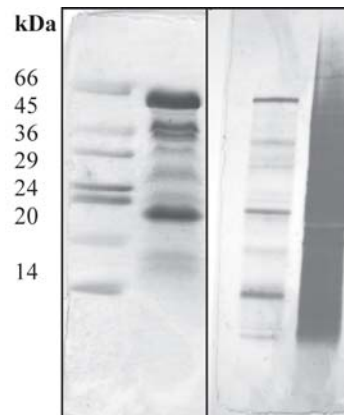


Fig. 1. Patrón electroforético del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* en un gel 8-18%, con SDS. Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, extracto celular de *N. brasiliensis*. A: Tinción azul de Coomassie; B: Tinción con nitrato de plata.

Resultados y discusión

Extracto celular crudo de *N. brasiliensis*

Las proteínas solubles de *N. brasiliensis* se obtuvieron del extracto crudo celular. En la figura 1 se

muestra el patrón electroforético del extracto crudo de *N. brasiliensis*. Después de realizar una electroforesis de proteínas SDS-PAGE, el gel se tiñó con azul de Coomassie (figura 1A) o nitrato de plata (figura 1B). Se observó una serie de bandas proteicas y se encontraron entre éstas los antígenos solubles (p24, P61 y proteasa).

Transferencia pasiva de células mononucleares obtenidas del bazo de ratones inmunizados con antígenos solubles de *N. brasiliensis*

Con base en los resultados obtenidos del efecto protector en los experimentos de inmunización activa con antígenos de *N. brasiliensis* en el día 15, así como en los experimentos de transferencia pasiva de suero hiperinmune del día 7, se realizaron experimentos de transferencia pasiva de células MN de bazo obtenidas a diferentes tiempos e inyectadas vía IP a otros ratones que fueron infectados con *N. brasiliensis*. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Transferencia de células MN del día 45 posinmunización

Los resultados mostraron que los ratones (R) que recibieron células MN de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidas en el día 45, transferidos antes de la infección (figura 1), no produ-

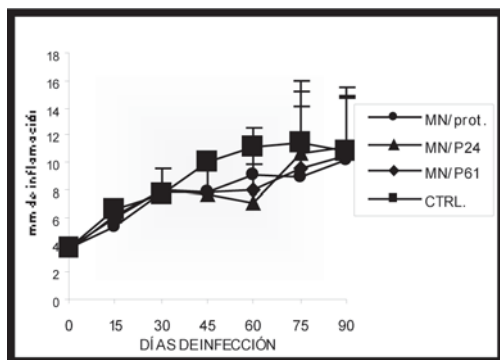


Fig. 2. Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 45 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*.

jeron protección alguna en los receptores, ya que todos los ratones desarrollaron micetoma hacia el día 90 posinfección.

Transferencia de células MN del día 30 posinmunización

No se observó protección contra la infección en los ratones que recibieron células MN obtenidas en el día 30 provenientes de ratones inmunizados con antígenos solubles (figura 5) y antígenos particulados (figura 2) de *N. brasiliensis*.

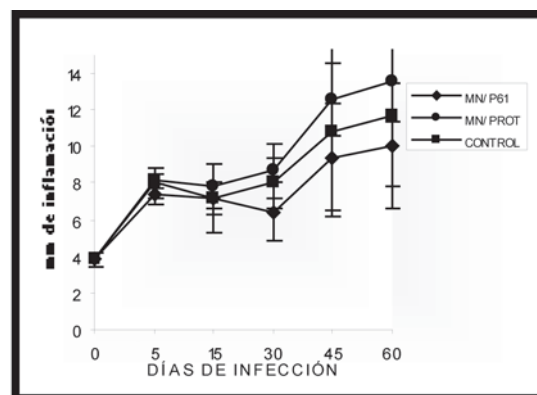


Fig. 3. Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 30, y dados a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*.

Transferencia de células MN del día 15 posinmunización

En la figuras 3 se muestran los resultados obtenidos de los ratones que fueron infectados, pero habían recibido vía IP las células MN obtenidas en el día 15 posinmunización. Los resultados mostraron protección parcial en cuanto al establecimiento de la infección en todos los grupos de ratones.

Transferencia de células MN del día 7 posinmunización

Finalmente, los experimentos de transferencia pasiva de células MN obtenidas en el día 7

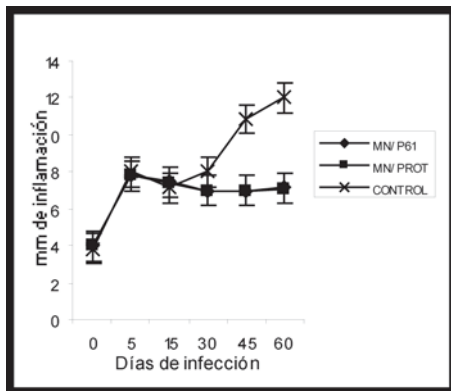


Fig. 4. Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 15, y dados a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*.

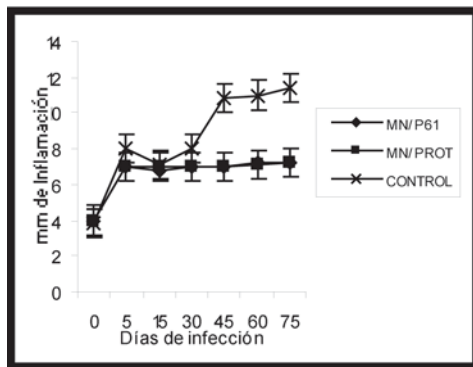


Fig. 5. Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 7, y dados a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*.

posinmunización (figura 4) se transfirieron a otros ratones (R), los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*. Los resultados mostraron que todos tenían una disminución de la inflamación, comparados con los ratones del grupo control y hasta el día 75 posinfección ninguno de los ratones desarrolló micetoma (protección parcial).

Discusión

Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos y publicados por Salinas Carmona *et al.*,⁹ en los cuales se observó protección en los sueros de ratones inmunizados por antígenos

solubles y particulados obtenidos en los días 7 y 15 de posinmunización. Igualmente, los resultados mostraron que los ratones que recibieron células esplénicas obtenidas de ratones inmunizados con antígenos solubles y adquiridas solamente en los días 7 y 15 confieren protección total solamente en un 80% de los ratones recibieron tales células esplénicas, mientras que aquellos ratones que recibieron células del día 30 y 45 no quedaron protegidos. Tales resultados nos llevan a la conclusión de que éstos se producen en los primeros días de la respuesta y confieren protección, las células que los producen pudieran estar presentes en el bazo, de modo que el mismo efecto lo encontramos en estos experimentos.

Conclusiones

Los resultados mostraron falta de protección, cuando los ratones recibieron células de bazo de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidas del día 45 y 30 de posinmunización.

Se observó protección total en los ratones que recibieron células de bazo obtenidas en el día 15 y 7 de posinmunización, provenientes de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis*.

La protección total que se observó fue en 80% de los casos.

Resumen

N. brasiliensis es una bacteria que vive como saprofito en el suelo y entra a la piel a través de una inoculación traumática. Es el principal agente causal del actinomicetoma en México. En 1992, Salinas-Carmona y Ernesto Torres (7) fueron capaces de inducir el micetoma en forma experimental en ratones BALB/c infectando con *N. brasiliensis* de la cepa HJEG-1. En el trabajo realizado por Salinas-Carmona y cols. (2005) donde reportaron el papel protector de la IgM presente en los ratones inmunizados y su efecto en el establecimiento y evolución del micetoma experimental, de ahí el interés de conocer si ese mismo efecto protector

también está presente en las células del bazo de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* obtenidos en los mismos días de la inmunización.

Palabras clave: Nocardia, Receptores de células esplénicas, Micetoma.

Abstract

N. brasiliensis is a bacteria that lives as a soil saprophyte and enters the skin through a traumatic inoculation. *N. brasiliensis* is the main causal agent of Actinomycetoma in Mexico. In 1992, Salinas-Carmona and Ernesto Torres (7) were able to induce experimental mycetoma in a BALB/c mice model by infecting them with live *N. brasiliensis* strain HUJEG-1. In the work by Salinas-Carmona et al in which they reported the IgM protective role present in immunized mice and the effect of establishment and evolution of the experimental mycetoma, comes our interest of knowing if the same protective effect is also present in the spleen cells of immunized mice with *N. brasiliensis* antigens obtained in the same day of the immunization.

Keywords: Nocardia, Spleen cell receptors, mycetoma

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Conacyt (clave CO2-43707) y por Paicyt-UANL (clave CA1256-06). M. García Méndez agradece al Dr. Miguel Ávalos Borja, del CCMC-UNAM, Ensenada, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo el análisis de muestras. Asimismo, a la M.C. Eloísa Aparicio Ceja, por haber realizado el análisis de rayos X de las muestras.

Referencias

1. Mahgoub, E.S.; Murray, I.G. 1973: Mycetoma. London: William Hernemann 76-115.
2. Beaman, B.L.; Beaman, L. 1994 Nocardia species: Host-parasite Relationships clinical microbiology reviews. 7(3):357-417.
3. Welsh, O., Salinas-Carmona, M.C.; Rodríguez, M.A. in: Borgers M., Hay R., Rinaldi M.G. (Eds) Current topics in Medical Mycology prouse. Science Barcelona, Spain 1995 pp 47-71
4. Beaman, D.L; Saubolle, M.A.; Wallace R. J. 1995. Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oeskova and other aerobic actinomycetes of medical Importance on Manual of Clinical Mesubiology. Editado por P.R. Murray, ACM press
5. Krick, J. A. and Remington J.S. 1978. Resistencia to infection with Nocardia asteroides. J. Infect Dis. 132 (6): 665-672
6. Melendro, E.I.; Contreras M.T., Ximénez, C. et al 1978. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis in mice: Cross protection against Listeria monocytogenes. Int Archs Allergy Appl Immunol. 57:74-81.
7. Welsh O., Salinas-Carmona M.C., Rodriguez, M.A. in: Hoeprich P.D., Jordan M.C., Ronald A.R. (Eds). Infectious Disease J.B., Lippincott Company Philadelphia. 1994, pp. 1402-1404.
8. Mc Donough, K.A.; Kress, K. and Bloom B.R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis; Interaction of Mycobacterium tuberculosis with macrophages. Infect Immunity 61:2763-2773
9. Salinas-Carmona, M.C. and Pérez-Rivera I. 2004. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by Nocardia brasiliensis. Infect. Immun. 72:5597-5604
10. Vera-Cabrera, L.; Salinas-Carmona, M.C.; Welsh, O.1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from Nocardia brasiliensis J. Clin. Microbiol

- 30(5):1183-1188.
11. Salinas-Carmona, M.C; Pérez-Rivera, L.I. and Torres-López E. 2003. Isolation and purification of the immunodominant antigen P61 from *Nocardia brasiliensis* culture filtrate. *J. Mycol Med* 13:117-121.
 12. Salinas-Carmona, M.C. and Torres-López. 1996. Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 797:263-265.
 13. Licón-Trillo, A.; Castro-Corona, M.A. and Salinas-Carmona M.C. 2003. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 37:37-44.

Recibido: 5 de abril de 2007
Aceptado: 31 de mayo de 2007