

2.-Rendimiento obtenido de las proteínas inmunodominantes (P24 y P61) y no inmunodominante (proteasa) a partir de un cultivo de *N. brasiliensis* en medio de BHI.

Los antígenos solubles se aislaron y purificaron a partir del extracto celular crudo de *N. brasiliensis*. El rendimiento obtenido de las 3 proteínas purificadas se muestran en la tabla 1 a partir del 15.8 mg de proteínas del extracto celular crudo se aisló mediante técnicas filtración en gel y precipitación con sulfato de amonio solamente 0.385 mg (2.43%) de P24, 2.59 mg de P61 (16.39%) y 0.1 mg de proteasa (0.63%) mientras que del filtrado de cultivo (6 ltos) se aisló 0.3 mg (1.89%).

Tabla 1.- Rendimiento de las proteínas solubles aisladas a partir de un cultivo del Extracto crudo celular de *N. brasiliensis*.

	Extracto Celular crudo	Volúmen del Filtrado	Proteína P24	Proteína P61	Proteasa
Filtrado de Cultivo	—	6 ltos.	—	—	0.3 mg (1.89%)
Masa bacteriana P.húmedo 153.5 g P.seco 17.3g	15.8 mg	—	0.385 mg (2.43%)	2.59 mg (16.39%)	0.1 mg (0.63%)

También se le determinó su patrón electroforético en un gel 12% sin SDS y sin 2ME (condiciones no desnaturizantes) para identificar la presencia de la proteína P38 (proteasa con actividad caseinolítica) mediante una técnica de zimograma en punto en un gel 7.5% con caseína (Figura 3A) y zimograma por contacto (Figura 3 B2). Observamos los halos claros lo cual indica la hidrólisis del sustrato(caseína) por medio de la proteasa de *N. brasiliensis*.

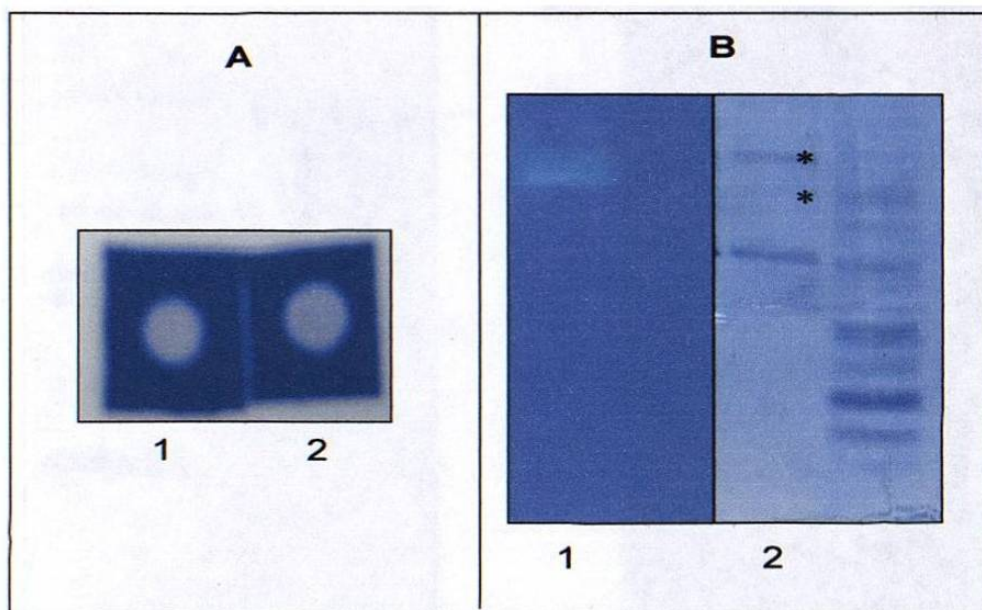


Figura 3.- Determinación de la actividad enzimática Del Extracto Celular de *N. brasiliensis* (proteasa)
A) Zimograma en punto: Lado 1 y 2 :ECC de *N. brasiliensis*
B) Zimograma de contacto.- Gel 1:Gel-sustrato (caseína 7.5%) y Gel 2: Gel 12 % sin SDS el cual contiene el ECC de *N. brasiliensis* (carril 1) y Marcadores de Peso molecular (Carril2)

2.1.- Extracto celular crudo de *N. brasiliensis*

Las proteínas solubles de *N. brasiliensis* fueron obtenidas a partir del Extracto crudo celular . En la figura 2 se muestra el patrón electroforético del extracto crudo de *N. brasiliensis* el cual después de realizar una electroforesis de proteínas SDS-PAGE el se gel se tiñó con azul de Coomassie (Figura 2 A) o Nitrato de plata (Figura 2B) .Se observaron una serie de bandas proteicas encontrandose entre ellas los antígenos solubles (p24, P61 y proteasa).

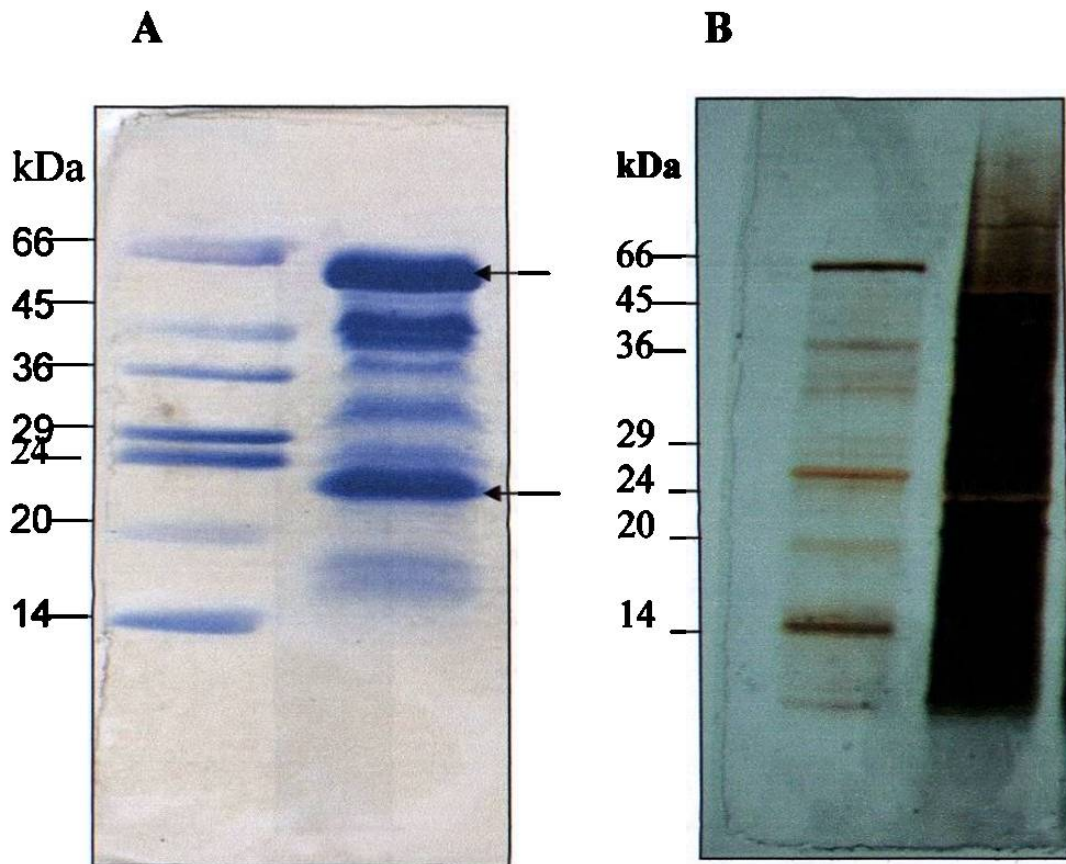


Figura 2.- Patrón electroforético del Extracto celular de *Nocardia brasiliensis* en un gel 8-18%

2.1.1.- Proteínas P24, P61 y proteasa purificadas partir del extracto crudo de *N. brasiliensis*

Finalmente para demostrar la pureza de las proteínas purificadas se realizó una inmunoelectrotransferencia (WB) de las proteínas P24, P61 y proteasa de *N. brasiliensis* las cuales fueron reveladas con suero de ratón con micetomas (Figura 4 A) y en el lado B se muestra las proteínas separadas electroforéticamente en un gel 8-18% con SDS/2ME

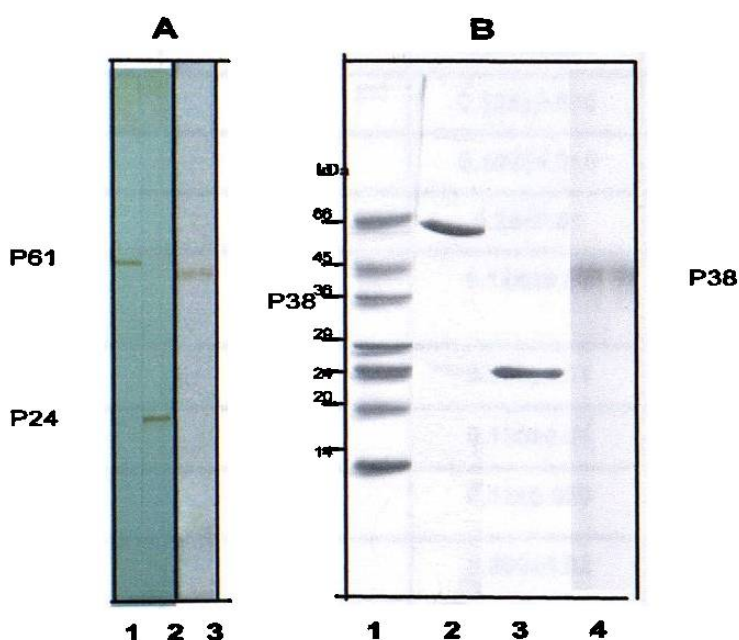


Figura 4: Lado A : Inmunoelectrotransferecia de suero De ratón con micetoma el reconoce a las proteínas purificadas de *N. brasiliensis*: Proteína P61(tira1), P24 (tira 2) y Proteasa o P38 (tira 3) Lado B.- Electroforesis en gel 8-18% con SDS de las proteínas purificadas de *N. brasiliensis*. En el Carril 1:Marcadores de PM, carril 2: Proteína P61, Carril 3: P24 Y en el carril 4. Proteína P38 o proteasa

3.- Inmunización activa con antígenos solubles de *N. brasiliensis*

3.1.- Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) y particulados de *N. brasiliensis*.

En la tabla 2 se muestran los títulos de anticuerpo IgG e IgM contra antígenos solubles, de los cuales proteasa fue mas inmunogénica en los sueros de los ratones inmunizados 1 sola vez y obtenidos en los días 7,15 y 30 días. El suero obtenido en el día 45 (ratones reinmunizado) título de IgG fue mayor para P24 (P24 fue más inmunogénica)

Acs- anti-antígenos solubles		Antígeno específico (ELISA)	
	Días de Inmunización	IgM	IgG
Suero anti-P24	0d	0.093±0.004	Negativo
	7d	0.183±0.001	-----
	15d	0.135±0.070	-----
	30d	0.102±0.010	-----
	45d*	0.25±0.01	0.881±0.06
Suero anti-P61	7d	0.188±0.01	-----
	15d	0.136±0.01	-----
	30	0.130±0.01	-----
	45d*	0.12±0.009	0.373±0.02
	Suero anti-Proteasa	7d	0.200±0.02
15d		0.231±0.01	-----
30d		0.220±0.015	-----
45d*		0.23±0.01	0.656±0.05

Tabla 2.- Determinación de anticuerpos IgM e IgG (ELISA) dirigidos hacia los antígenos solubles de *N. brasiliensis*

En la **tabla 3** se muestran los títulos de IgG e IgM dirigidos contra antígenos particulados siendo mas inmunogénica bacterias muertas por calor (BMC) que bacterias deslipidizadas (BD). De acuerdo a estos resultados podemos decir que de los 2 antígenos de *N. brasiliensis*, los **mas inmunogénicos fueron los Antígenos particulados**

Acs anti-antígenos particulados		Antígeno específico (ELISA)	
	Días de Inmunización	IgM	IgG
Suero anti-BMC	0d	0.139±0.050	-----
	7d	0.257±0.040	-----
	15d	0.286±0.060	-----
	30d	0.214±0.055	-----
	45d*	0.14±0.01	1.13±0.08
Suero anti-BD	0d	0.139±0.05	-----
	7d	0.148±0.01	-----
	15d	0.125±0.009	-----
	30d	0.117±0.009	-----
	45d*	0.12±0.009	1.01±0.07

Tabla 3.- Determinación de anticuerpos IgM e IgG (ELISA) dirigidos hacia los antígenos particulados de *N. brasiliensis*

3.2.- Determinación de anticuerpos IgG contra antígenos solubles (P24, P61 y proteasa) de *N. brasiliensis* (Suero hiperinmune del día 45).

Los sueros de los ratones inmunizados con antígenos solubles se analizaron por medio un método inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de anticuerpo IgG anti-antígenos solubles. Los resultados obtenidos nos muestran (figura 5) que de las 3 proteínas solubles utilizadas la P24 fue la mas inmunogénica ya que el 100% de los ratones dieron lecturas superiores al valor de corte (0.300) mientras que la proteína P61 fue la menos inmunogénica ya que solamente el 46.15% dieron positivos .

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA AGS. DE *N. brasiliensis* (ELISA)

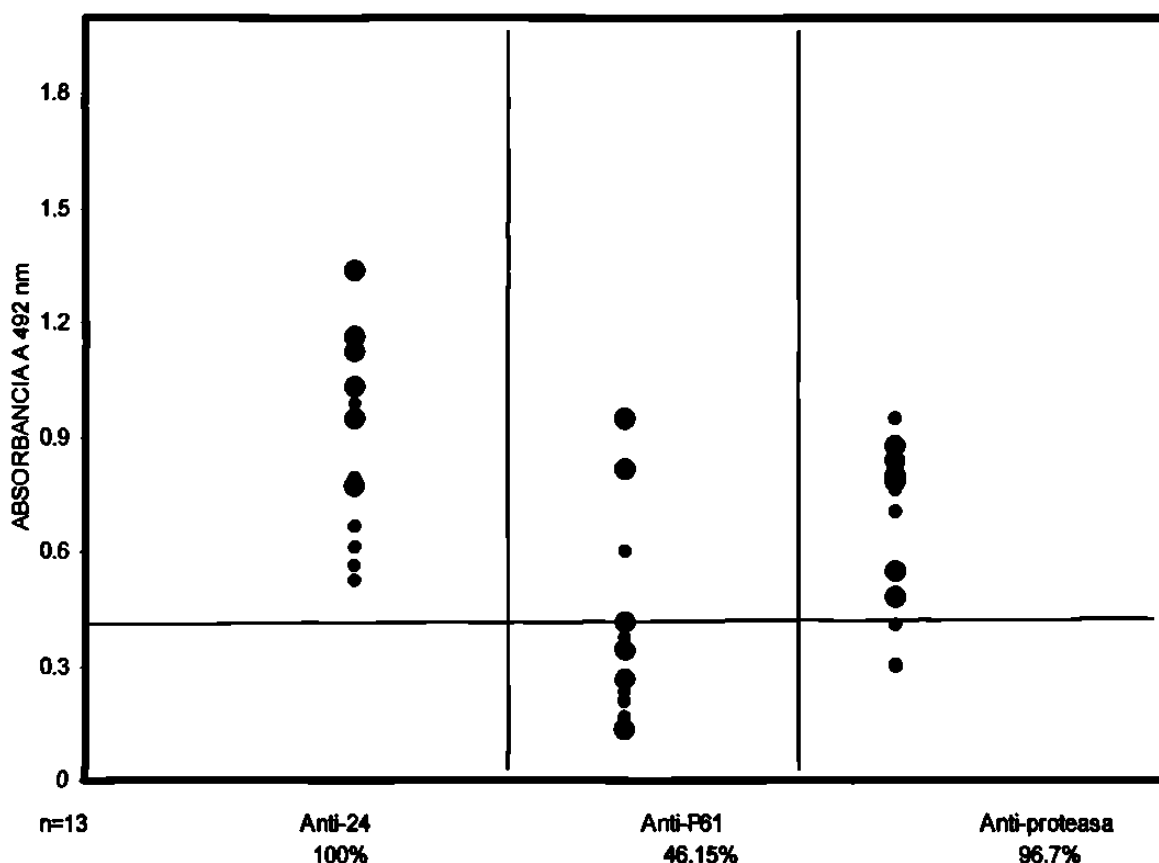


Figura 5.- Determinación de anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa por el método de ELISA en ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles y sangrados en el día 45 post-inmunización.

* Suero del día 45 proviene de raton inmunizado 3 veces con dosis de 20, 15 y 15µg/0.1 ml

También se les determinó el isotipo de IgG en los sueros de ratones inmunizados con P24, P61 y proteasa y los resultados mostraron que el isotipo producido por la inmunización con P24 fue tipo IgG1 e IgG2b, mientras que para P61 fue solamente IgG1 y para proteasa fue IgG2a e IgG3. Todos dieron cadenas ligeras kappa (Tabla 2).

Antisuero de ratón	Isotipo	Isotipo	Cadena ligera
Suero de ratón Anti-P24	IgG1	IgG2b	Kappa
Suero de ratón Anti-P61	IgG1		Kappa
Suero de ratón Anti-proteasa	IgG2a	IgG3	Kappa

Tabla 4.- Determinación del isotipo de los anticuerpos anti-P24, anti-p61 y anti-proteasa de sueros de ratones inmunizados con proteínas de *N. brasiliensis* obtenidos en el día 45 post-inmunización

4.- Inmunización activa con antígenos solubles de *N. brasiliensis* y su efecto en el establecimiento de la infección con *N. brasiliensis* .

4.1.- Inmunización activa e infección en el día 45 post-inmunización.

Siguiendo el esquema tradicional para inducir la producción de anticuerpos tipo IgG se utilizaron 5 grupos de ratones de 10 cada uno dando un total de 50 ratones por experimento, los cuales después de recibir las 3 inmunizaciones con los antígenos solubles de *N. brasiliensis* con intervalos de 15 días entre una inmunización y otra. Posteriormente todos los ratones fueron infectados (día 45) en el cojinete plantar y luego se midió la inflamación en mm (vernier). Los resultados mostraron una protección parcial para aquellos ratones inmunizados con P24 y proteasa mientras que los inmunizados con P61 al día 45 todos habían desarrollado micetoma.(Figura 6)

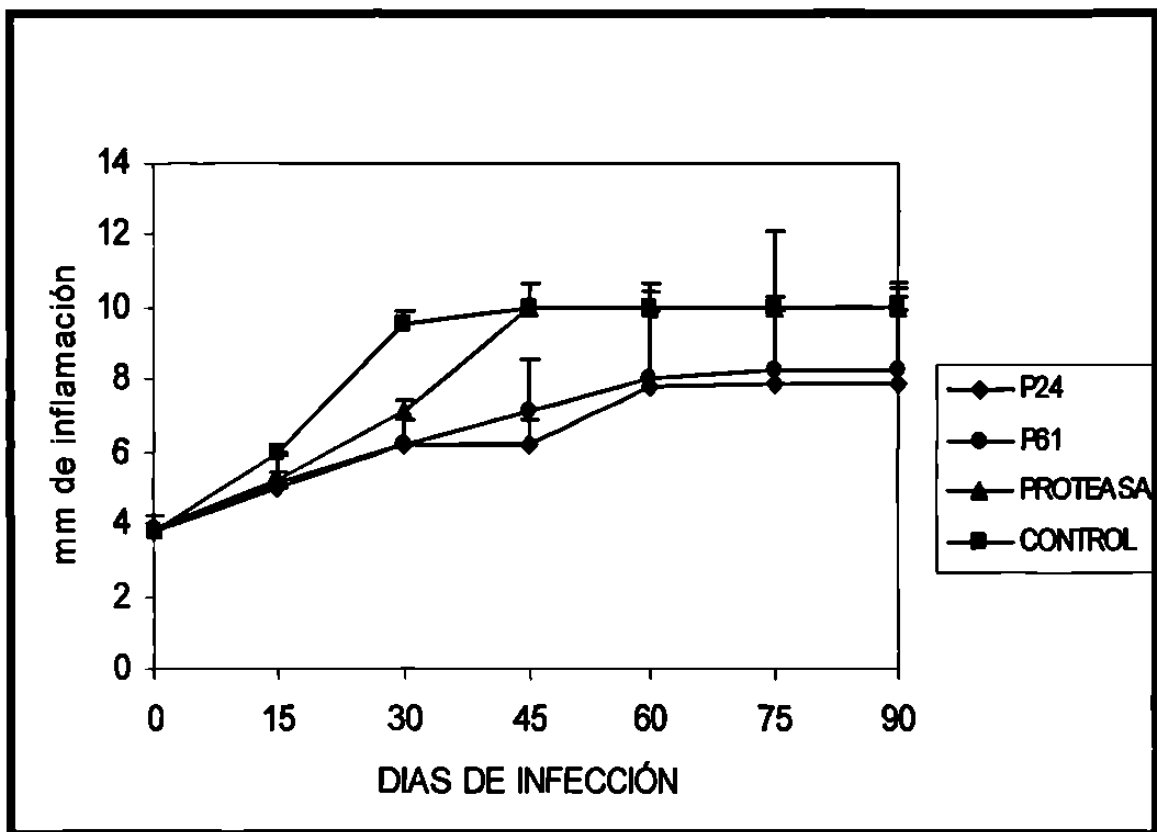


Figura 6.- Inmunización activa con los antígenos solubles (P24, P61 y proteasa de *N. brasiliensis* y en el día 45 post-inmunización los ratones se infectaron con *N. brasiliensis* viva

4.2.- Inmunización activa con antígenos solubles e infección con *N. brasiliensis* a tiempos cortos de inmunización

En base a los resultados anteriores decidimos repetir el experimento pero en este caso los ratones se inmunizaron 1 sola vez y se infectaron a los 15 días de la inmunización con los antígenos solubles. Los resultados mostraron una **Protección total** ya que ninguno de los ratones inmunizados e infectados desarrollaron micetoma por lo menos hasta los 90 días en las que se les estuvo midiendo la inflamación (**Figura 7**).

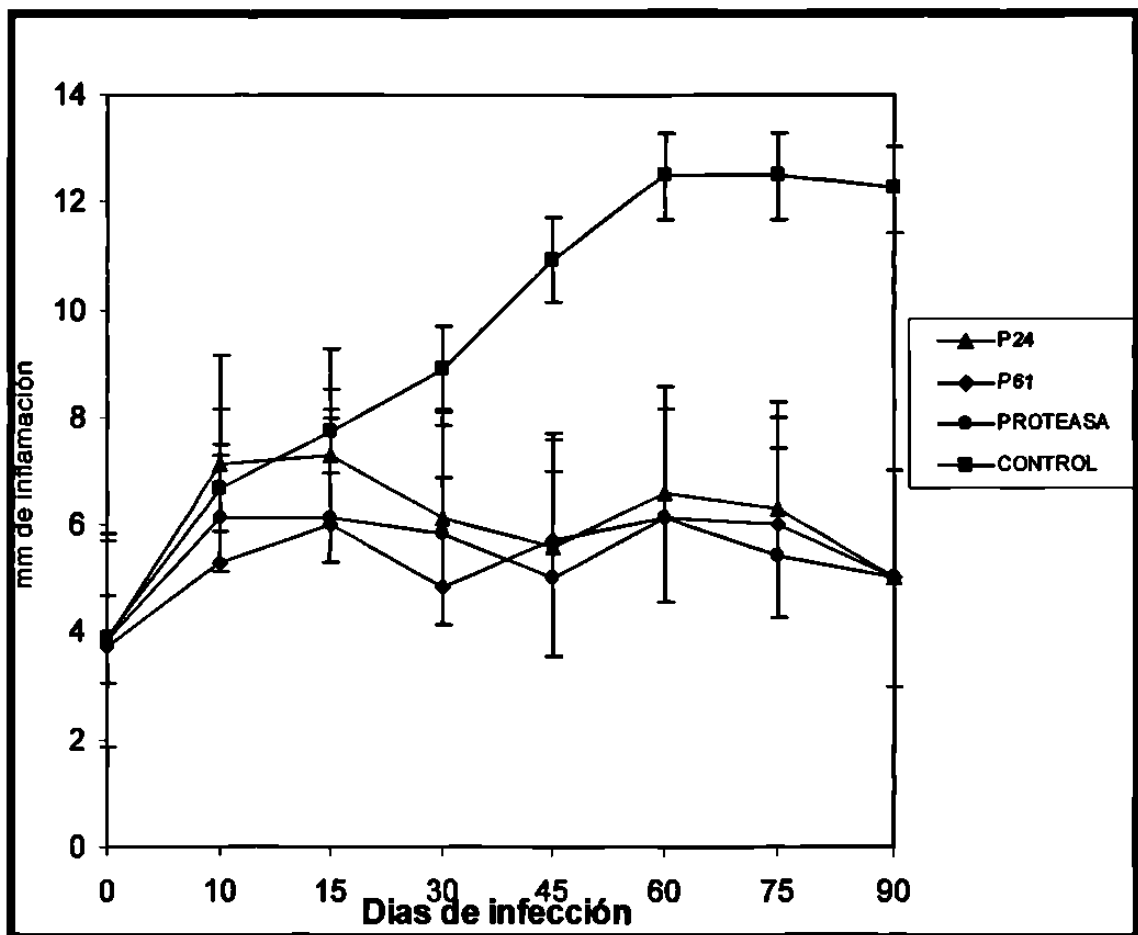


Figura 7.-Inmunización activa con antígenos solubles (P24, P61 y Proteasa) e infectados con *N. brasiliensis* en el día 15 post-inmunización

Sin embargo cuando los ratones inmunizados con antígenos solubles pero infectados en el día 7 post- inmunización no hubo protección por lo menos hasta el día 90. (Figura 7)

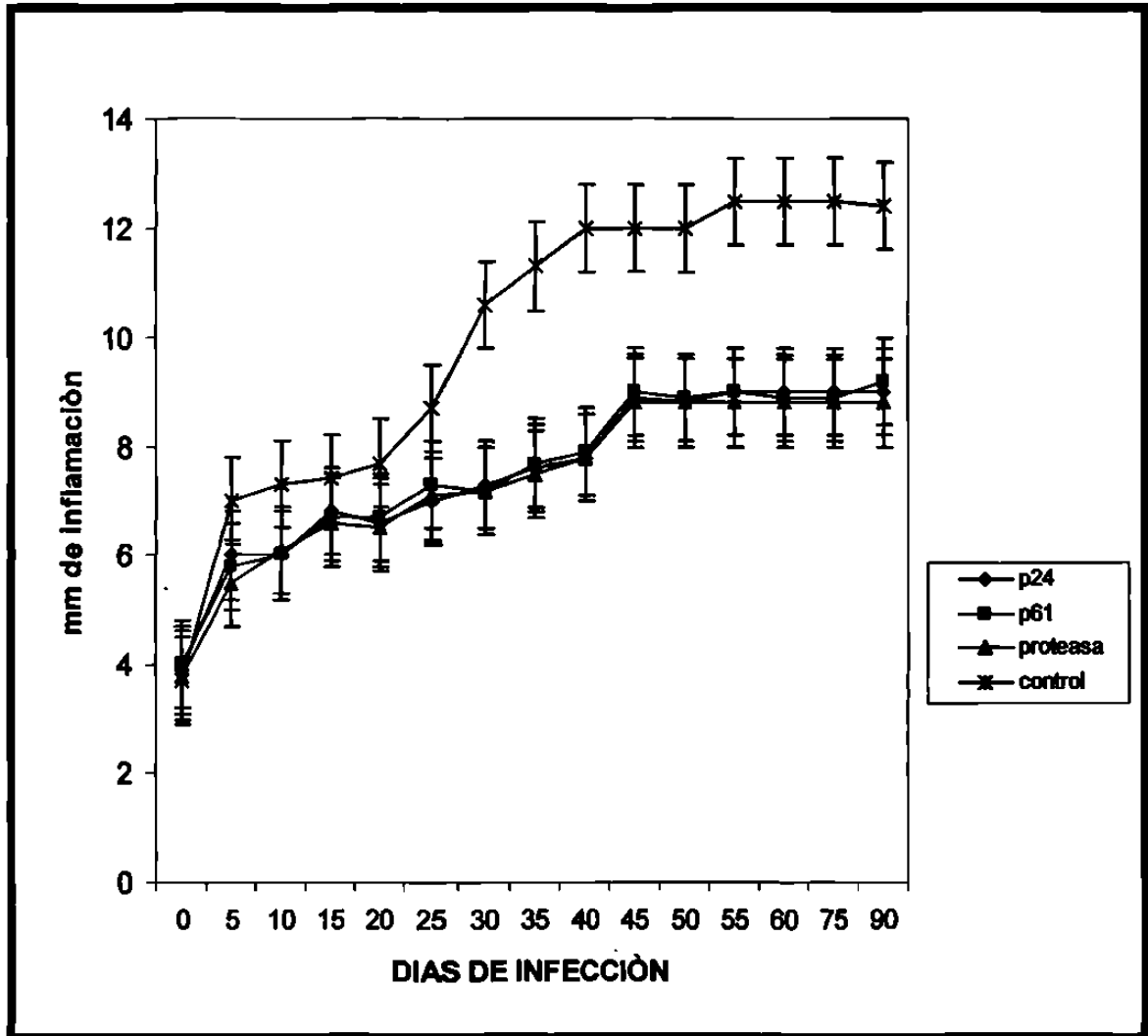


Figura 8.- Inmunización activa con antígenos solubles (proteasa) e infectados en el día 7 post-inmunización con *N. brasiliensis*.

Y finalmente repetimos el mismo experimento pero en esta ocasión los ratones se infectaron en el día 3 . Los resultados mostraron una protección parcial en aquellos ratones inmunizados previamente con P24, mientras que los ratones inmunizados con P61 y proteasa no hubo protección ya que todos los animales desarrollaron el micetoma. (Figura 9)

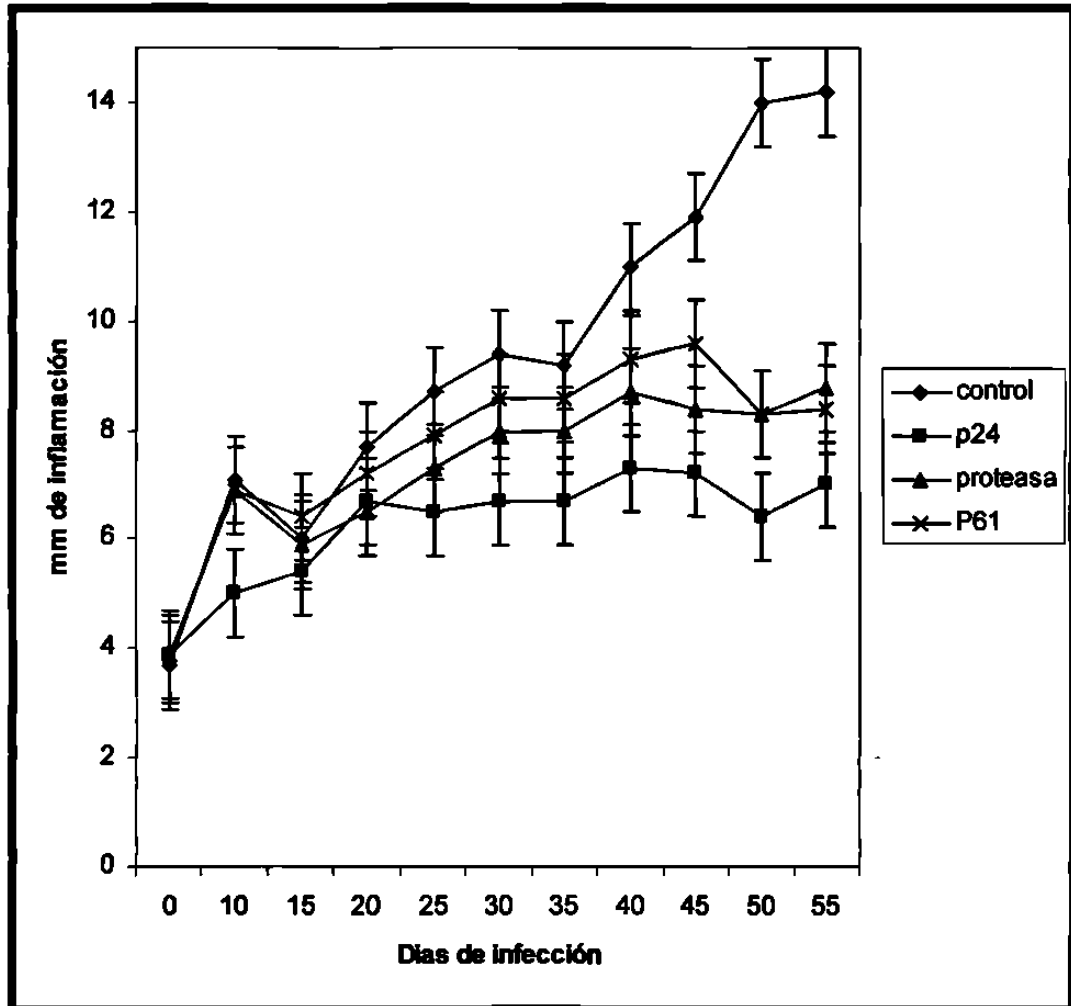


Figura 9.- Inmunización activa con **antígenos solubles** (P24, P61 y proteasa) e infectados con *N. brasiliensis* en el día 3d pos-tinmunización

5.- Inmunización activa con antígenos particulados de *N. brasiliensis* y su efecto en el establecimiento de la infección con *N. brasiliensis*.

5.1.- Inmunización activa e infección en el día 45 post-inmunización

En los siguientes experimentos se utilizaron grupos de 10 ratones por grupo/antígeno en este caso y fueron 2 antígenos particulados (bacterias deslipidizadas y bacterias muertas por calor), mas el grupo control dando un total de 30 ratones por experimento. Después de la inmunización todos los animales fueron infectados en el día 45 post-inmunización. Los resultados obtenidos (**Figura 10**) mostraron una **protección parcial** en los 2 grupos de ratones ya que ninguno desarrolló el micetoma como los ratones del grupo control.

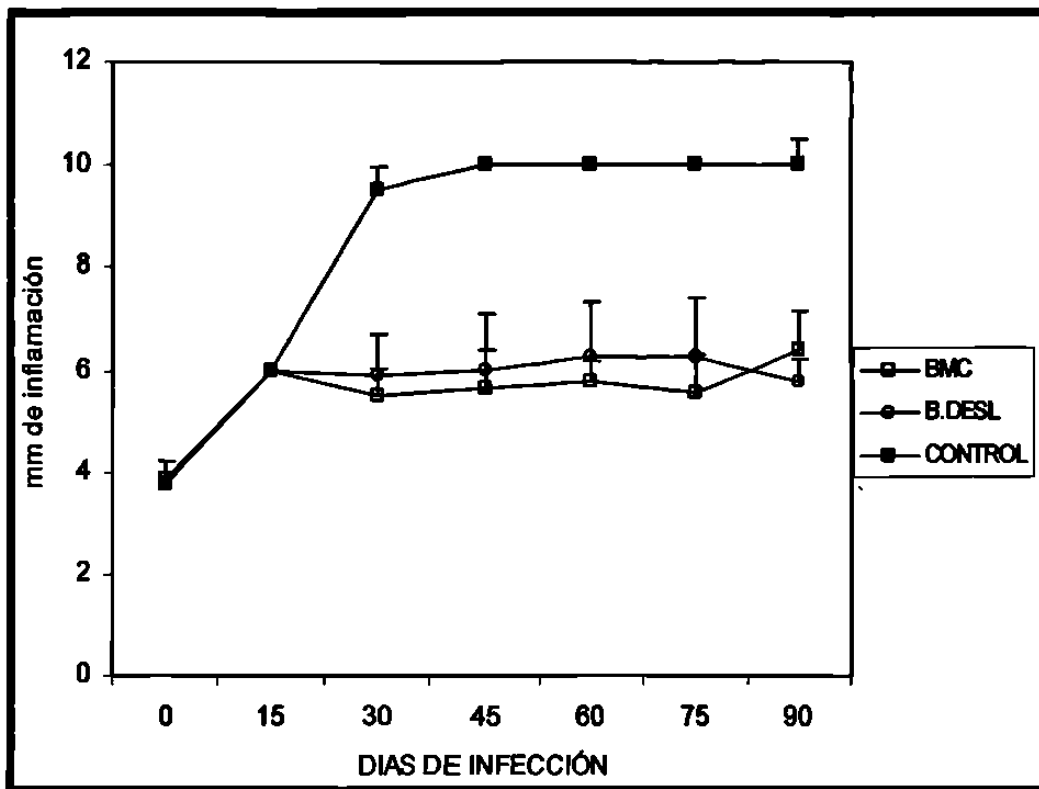


Figura 10.- Inmunización activa con antígenos particulados (bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas) e infectados con *N. brasiliensis* en el día 45d postinmunización

5.2 Inmunización activa con antígenos particulados e infección con *N. brasiliensis* a tiempos cortos de inmunización.

Debido a que en los experimentos de inmunización activa con antígenos particulados e infección a tiempos largos (45 días) mostraron protección parcial, decidimos conocer como era el comportamiento en aquellos ratones a los cuales se les realizaba la infección en tiempos mas cortos 15, y 3 días post-inmunización. En la **figura 11** se muestran los resultados obtenidos en los cuales vemos que los 2 grupos de animales inmunizados con antígenos particulados e infectados en el día 15 post-inmunización, desarrollaron **protección total** ya que ninguno de los animales desarrolló el micetoma. Todos los animales se evaluaron hasta el día 90 post-infección.

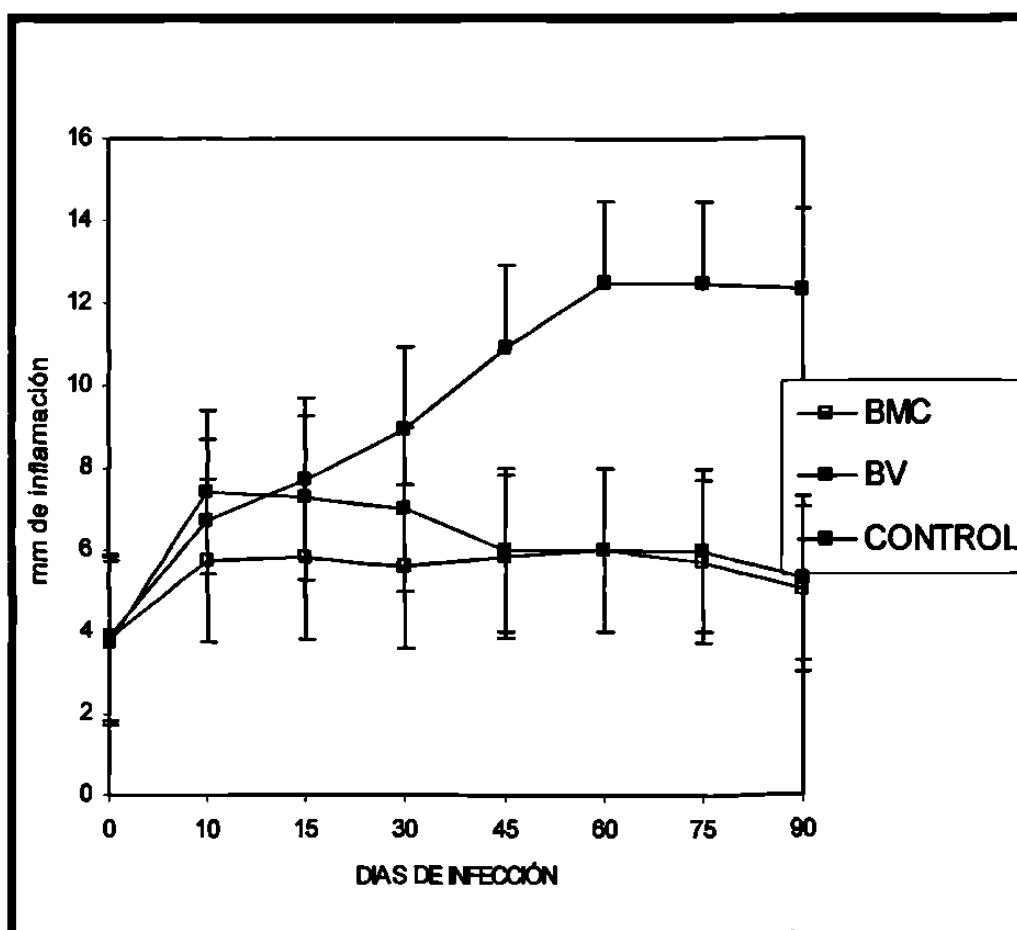


Figura 11.- Inmunización activa con antígenos particulados (bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas) e infectados con *N. brasiliensis* en el día 15 postinmunización

Posteriormente realizamos otros experimentos donde los animales fueron inmunizados con antígenos particulados y posteriormente fueron infectados en el día 3 . Los resultados obtenidos fueron que solamente los ratones que fueron previamente inmunizados con bacterias deslipidizadas desarrollaron protección parcial, mientras que el otro grupo de ratones inmunizados con BMC todos los animales del grupo desarrollaron micetoma. (Figura 12).

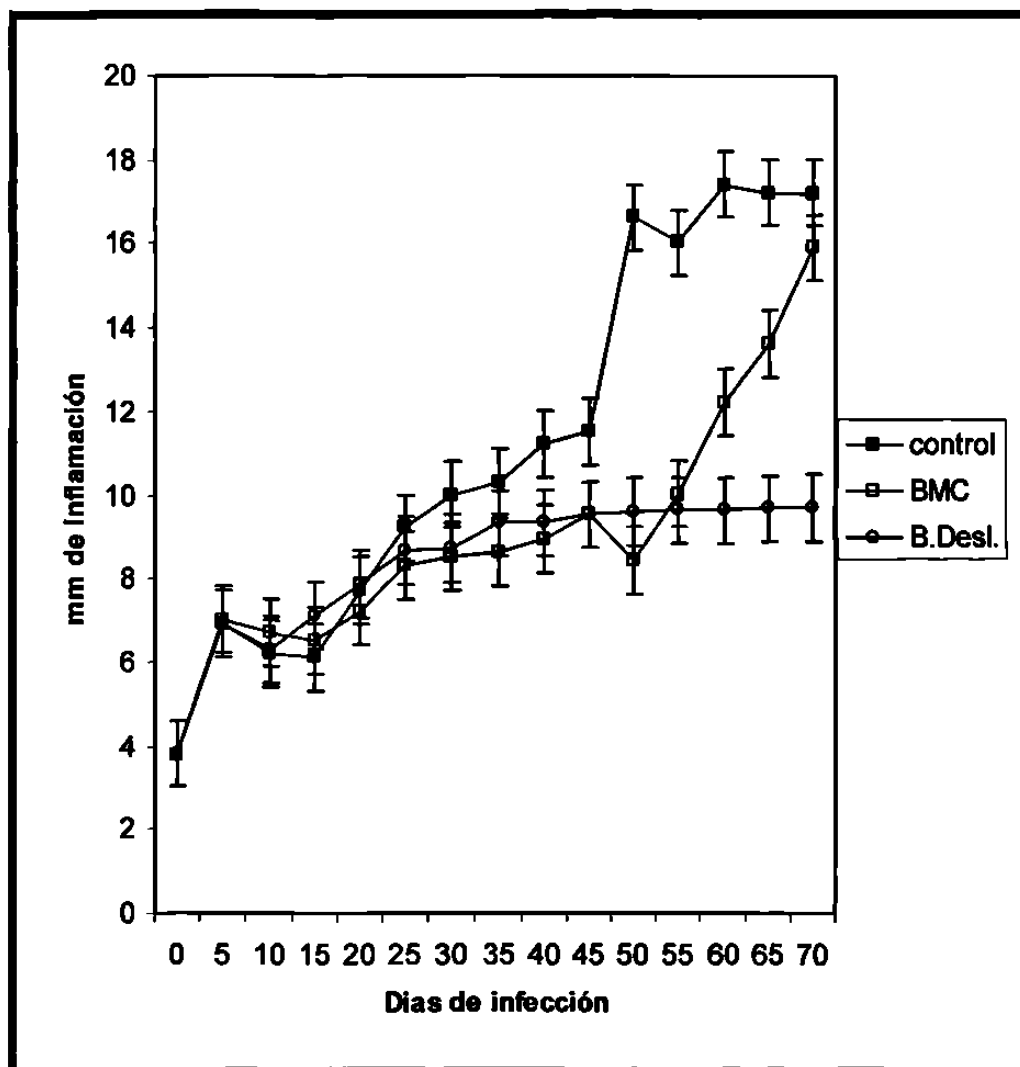


Figura 12.-Inmunización activa con actígenos particulados (BMC Y BD) de *N. brasiliensis* e infectados con *N. brasiliensis* en el día 3 post-inmunización.

6.-Transferencia Pasiva de suero hiperinmune contra antígenos solubles administrados antes y después de la infección con *N. brasiliensis*

6.1. Transferencia Pasiva de suero del día 45 post-inmunización administrado antes de la infección.

Los resultados que se obtuvieron cuando les dimos el suero antes de la infección (Figura 13) solamente el grupo de ratones que recibió el suero anti-P61 no desarrollaron micetoma (protección parcial) mientras el resto de los grupos hacia el día 50 todos habían desarrollado micetoma mostrando un comportamiento igual que el control positivo.

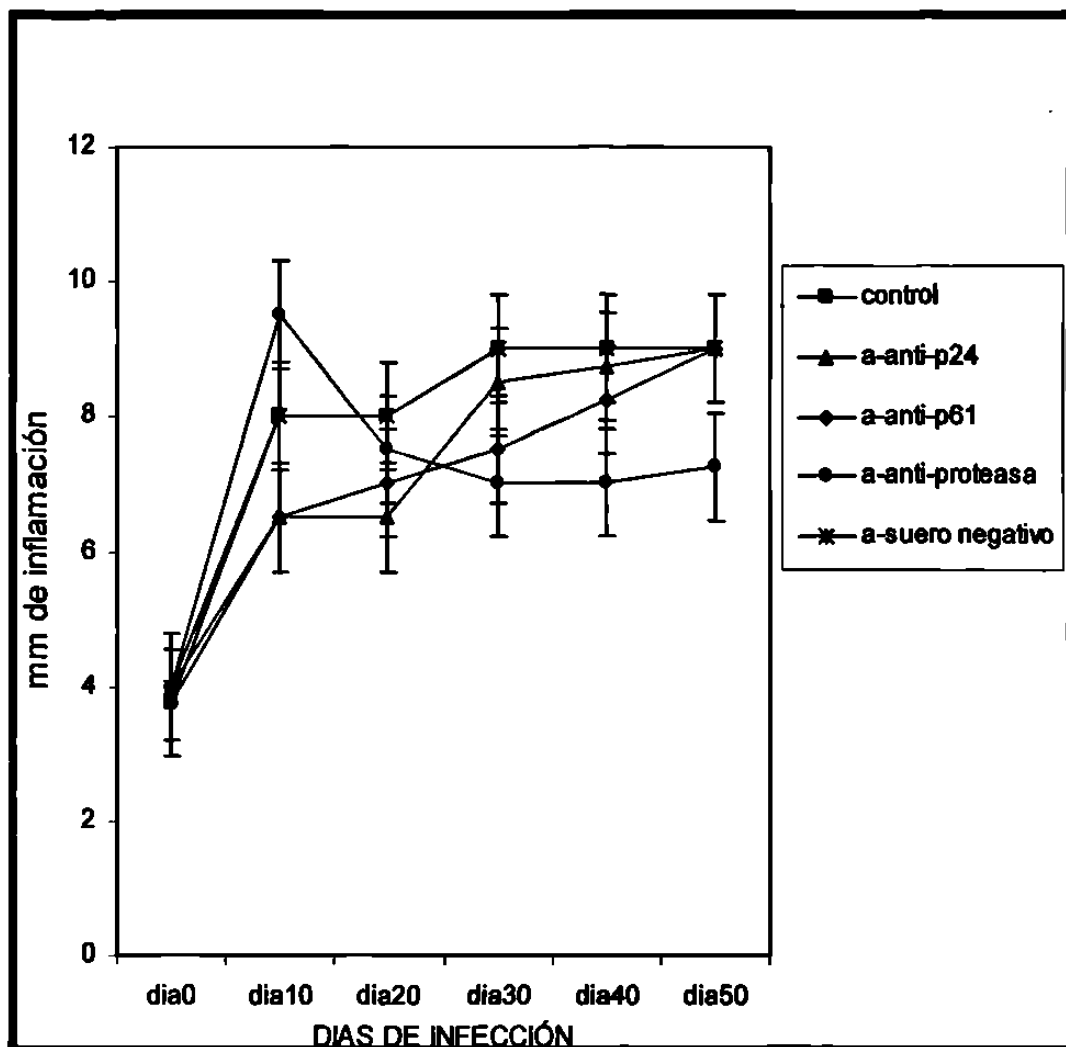


Figura 13.- Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

En cambio cuando los ratones de los grupos que recibieron el suero después de la infección (Figura 14) todos los grupos desarrollaron protección parcial lo que significa que ninguno desarrolló micetoma por lo menos hasta el día 50 en el que se estuvieron evaluando. No hubo diferencia significativa entre los mismos grupos solamente el grupo que recibió el suero anti-proteasa hubo un $p < 0.05$ comparada con el control.

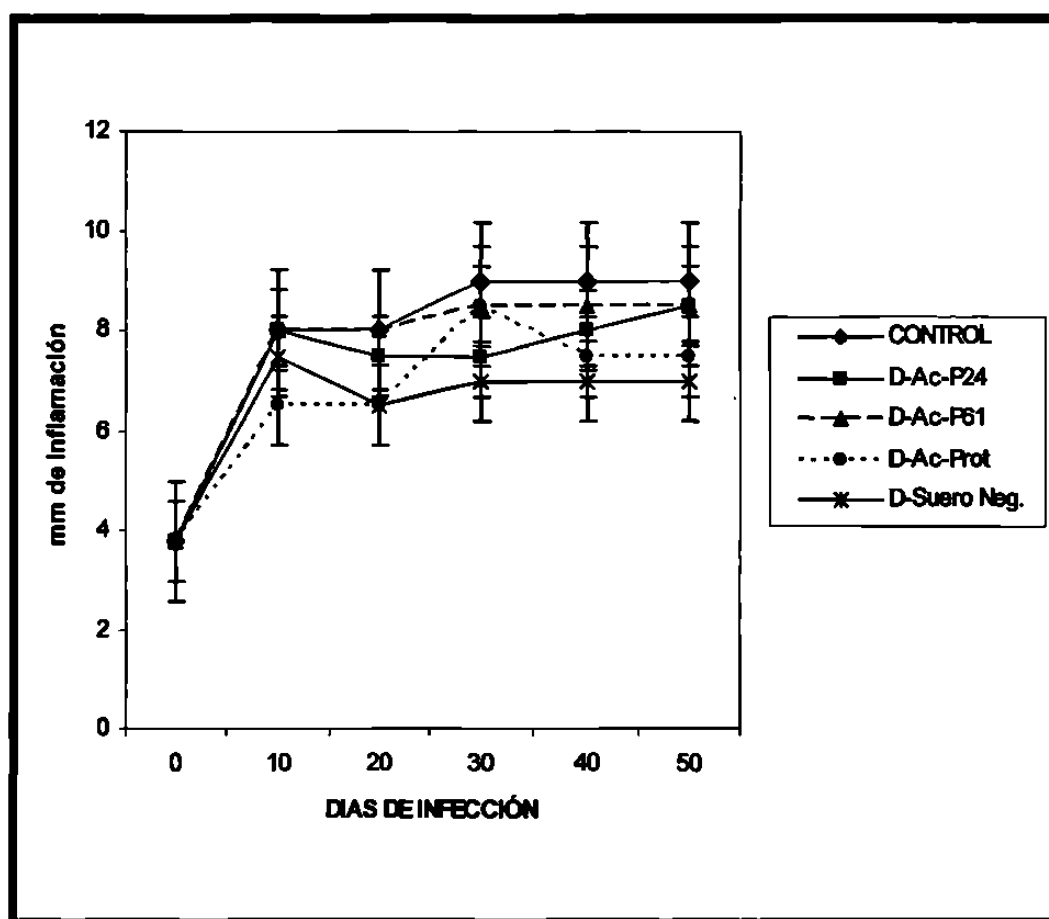


Figura 14.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles y obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c después de la infección con *N. brasiliensis*

6.2.- Transferencia pasiva de suero hiperinmune obtenido a tiempos cortos de inmunización con antígenos solubles de *N. brasiliensis* y dado antes de la infección con *N. brasiliensis*.

En base a los resultados obtenidos y con el fin de ver a que tiempo era posible obtener protección mediante transferencia pasiva con sueros hiperinmunes. Entonces se realizaron experimentos en ratones los cuales recibieron suero hiperinmune obtenido en el día 15, 7 y 3 post-inmunización. Estos experimentos se hicieron solamente administrando suero antes de la infección, ya que vimos en los experimentos del día 45 que no había diferencia entre un experimento que se dio el suero antes o después de la infección. Los resultados obtenidos del experimento de transferencia pasiva de suero del día 15 post-inmunización se muestran en la **figura 15** en la cual los 3 grupos de animales que recibieron el suero del día 15 desarrollaron una protección parcial lo que quiere decir que ninguno de los animales desarrollan micetoma por lo menos hasta el día 90 de la infección y hubo una disminución de la inflamación del cojinete plantar comparado con el control.

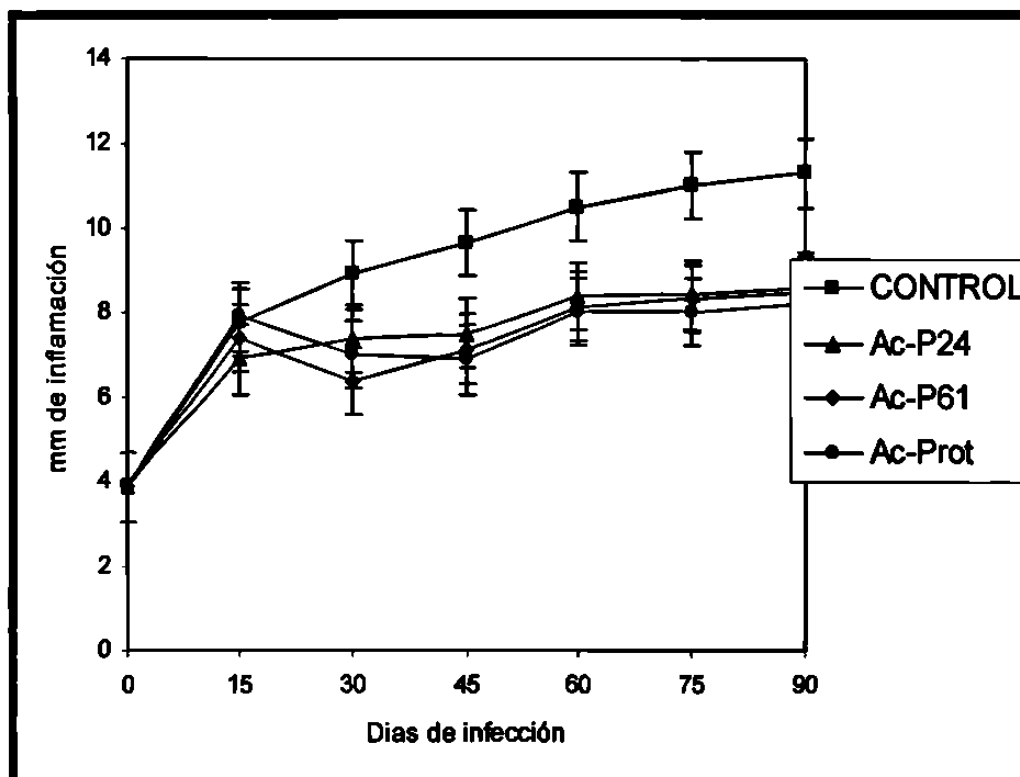


Figura 15.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles y obtenido en el día 15 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

Ahora bien aquellos ratones que recibieron 1 sola dosis de 0.1 ml de suero hiperinmune del día 7 contra antígenos solubles de *N. brasiliensis* y luego fueron infectados con *N. brasiliensis* viva en el cojiente plantar (Figura 16). Los animales de los 3 grupos que recibieron el antisuero ninguno desarrolló micetoma por lo menos hasta el día 90 en el que se estuvieron evaluando. Lo que significa que el suero del día 7 fue capaz de conferir **protección total** por lo tanto se logró prevenir el establecimiento de la infección en estos animales.

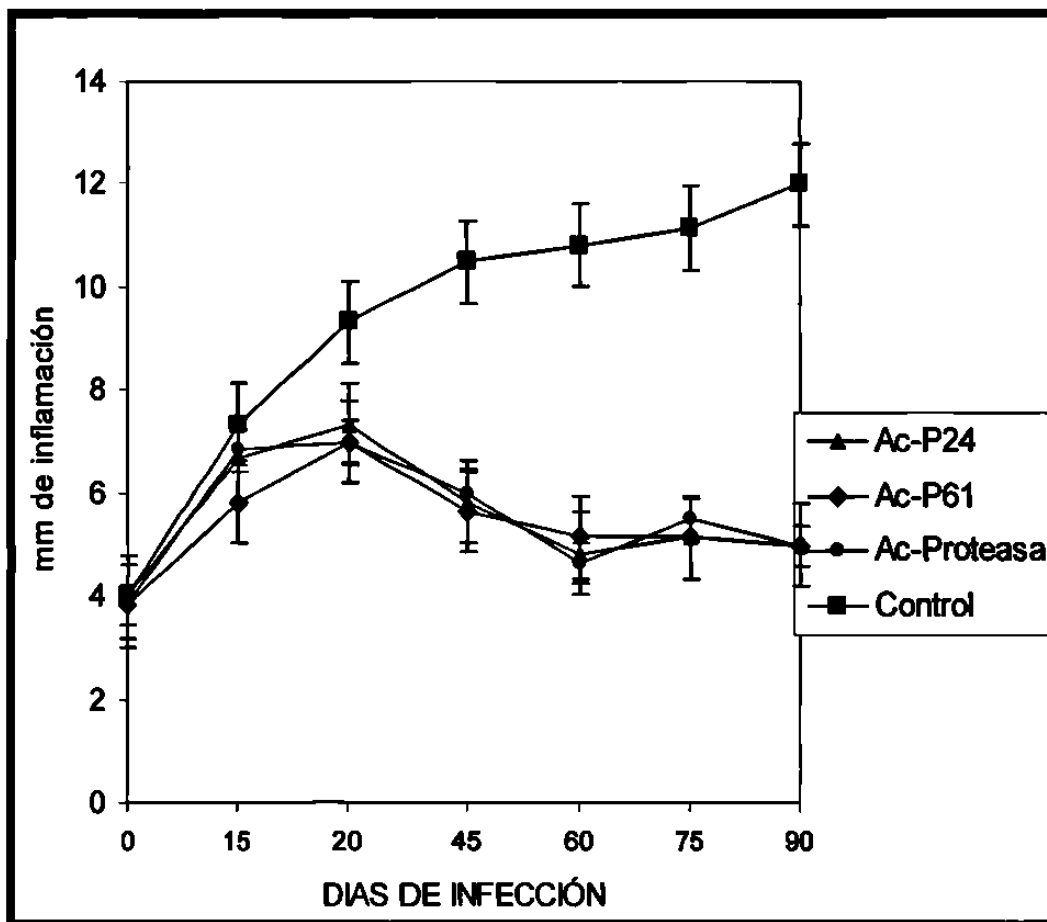


Figura 16.- Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles y obtenido en el día 7 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

Sin embargo en los grupos de animales que recibieron el suero del día 3 post-inmunización, todos los animales desarrollan micetoma (Figura 17).

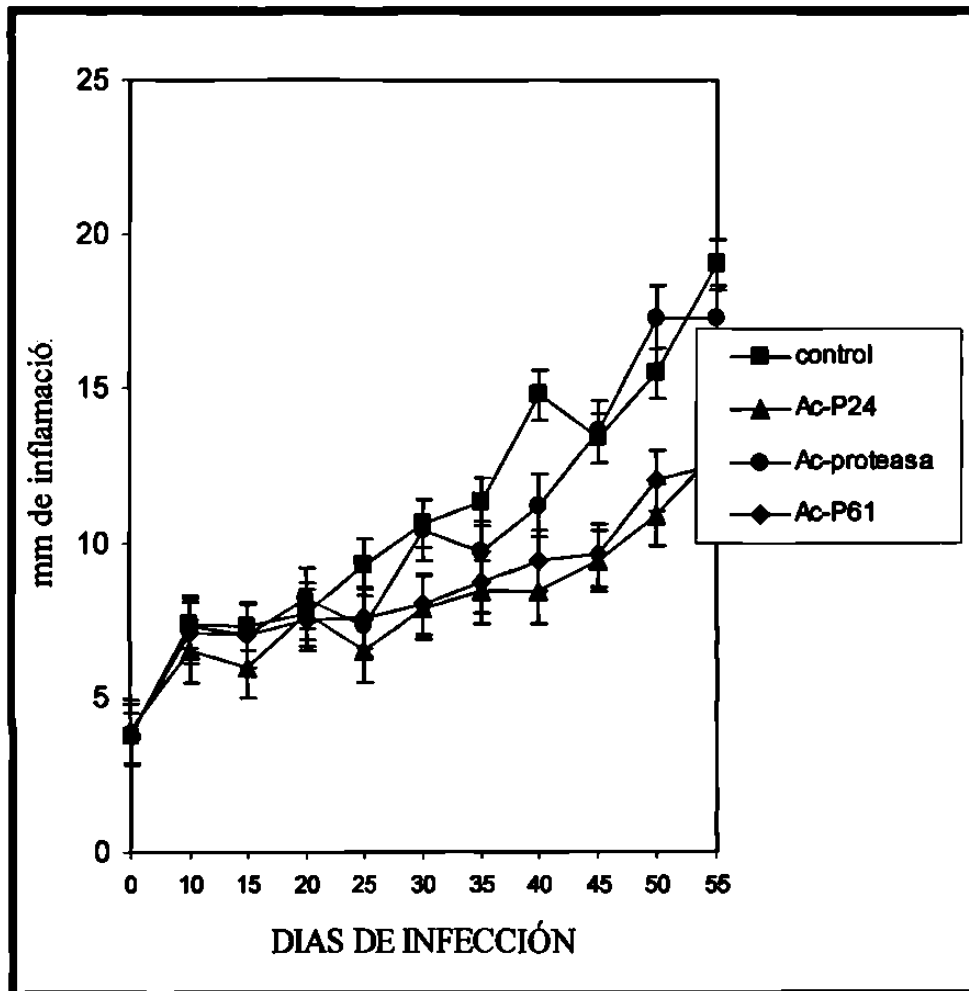


Figura 17.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenido en el día 3 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

7.- Transferencia pasiva del suero hiperinmune contra antígenos particulados administrados antes y después de la infección con *N. brasiliensis*

7.1. Transferencia pasiva del suero del día 45 post-inmunización administrado antes de la infección.

Para la realización de este experimento utilizamos suero hiperinmune contra antígenos particulados de *N. brasiliensis* el cual fué transferido en forma pasiva (vía IP) a otros ratones los cuales posteriormente fueron infectados con *N. brasiliensis*. Unos grupos de ratones recibieron 3 dosis de suero de 0.1 ml antes y otros 3 dosis de suero después de la infección. Los resultados que encontramos fué que cuando les dimos el suero antes de la infección (Figura 18) se observó protección parcial en los 2 grupos de ratones que recibieron el suero anti-antígenos particulados.

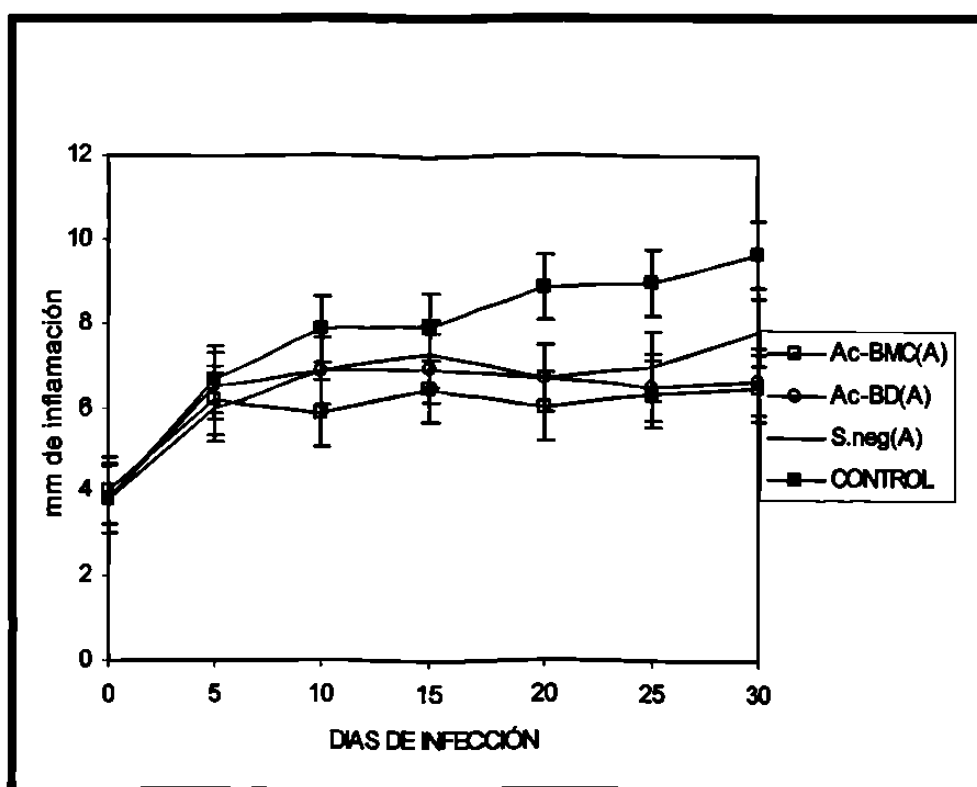


Figura 18 .-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

También realizamos transferencia de suero anti-antígenos particulados dados después de la infección y los resultados que encontramos fué una protección parcial en los 2 grupos de ratones que recibieron suero anti-antígenos particulados del día 45. (figura 19)

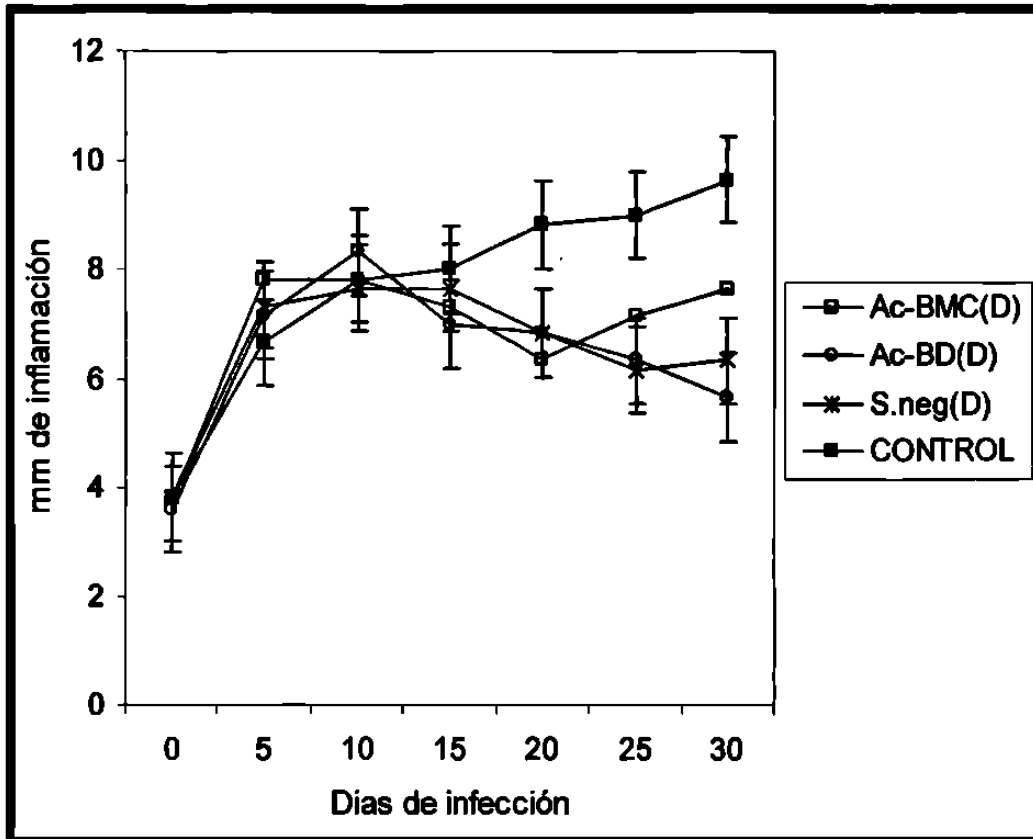


Figura 19.- Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados y obtenido en el día 45 y dado a ratones BALB/c después de la infección con *N. brasiliensis*

7.2.- Transferencia Pasiva de suero hiperinmune obtenidos a tiempos cortos de inmunización con antígenos particulados de *N. brasiliensis* y dados antes de la infección.

Sin embargo aquellos ratones que recibieron suero hiperinmune obtenidos de ratones inmunizados con antígenos particulados y sangrados en el día 15 y transferidos a otros grupos de ratones. Los resultados mostraron **protección parcial** en todos los animales ya que en todos se observó que la inflamación iba en aumento por lo menos hasta los 60 días que se estuvieron evaluando (Figura 20)

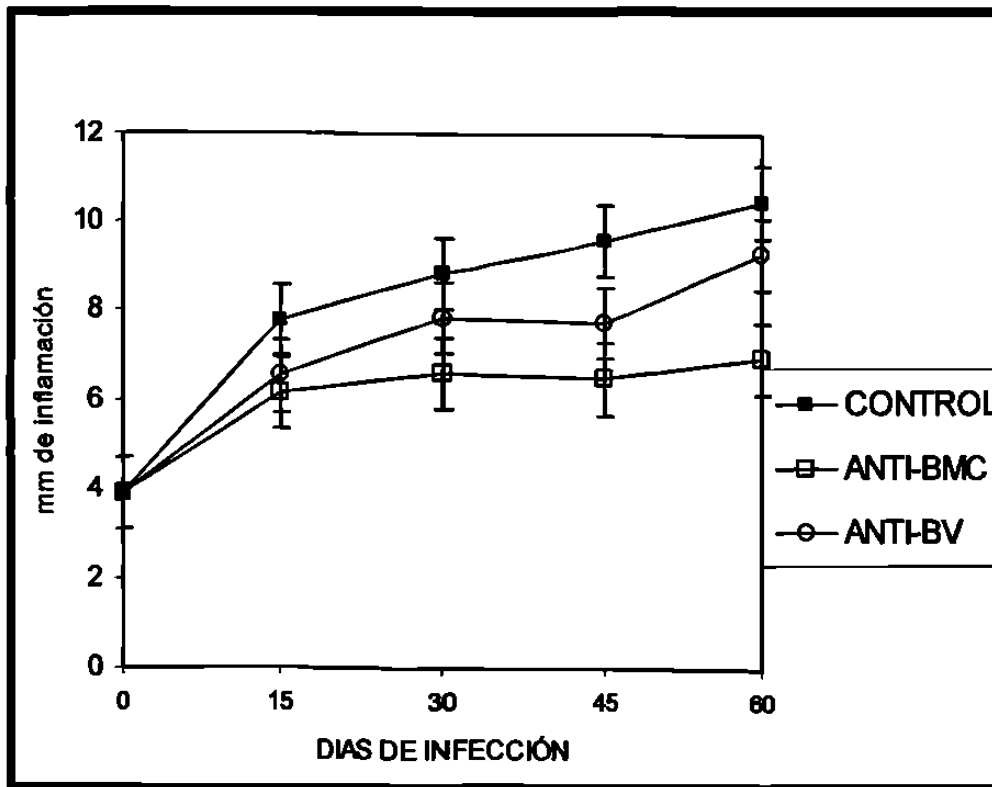


Figura 20.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados y obtenidos en el día 15 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

Posteriormente realizamos otros experimentos de transferencia pasiva de suero hiperinmune obtenido en el día 7 post-inmunización contra antígenos particulados y luego fueron infectados con *N. brasiliensis* viva (Figura 21), los resultados mostraron que hubo protección total ya que ninguno de los ratones por lo menos hasta el día 90 desarrollaron micetoma. Sin embargo los ratones que recibieron el suero obtenido del día 3 (figura 22) ninguno quedó protegido ya que todos desarrollaron micetoma.

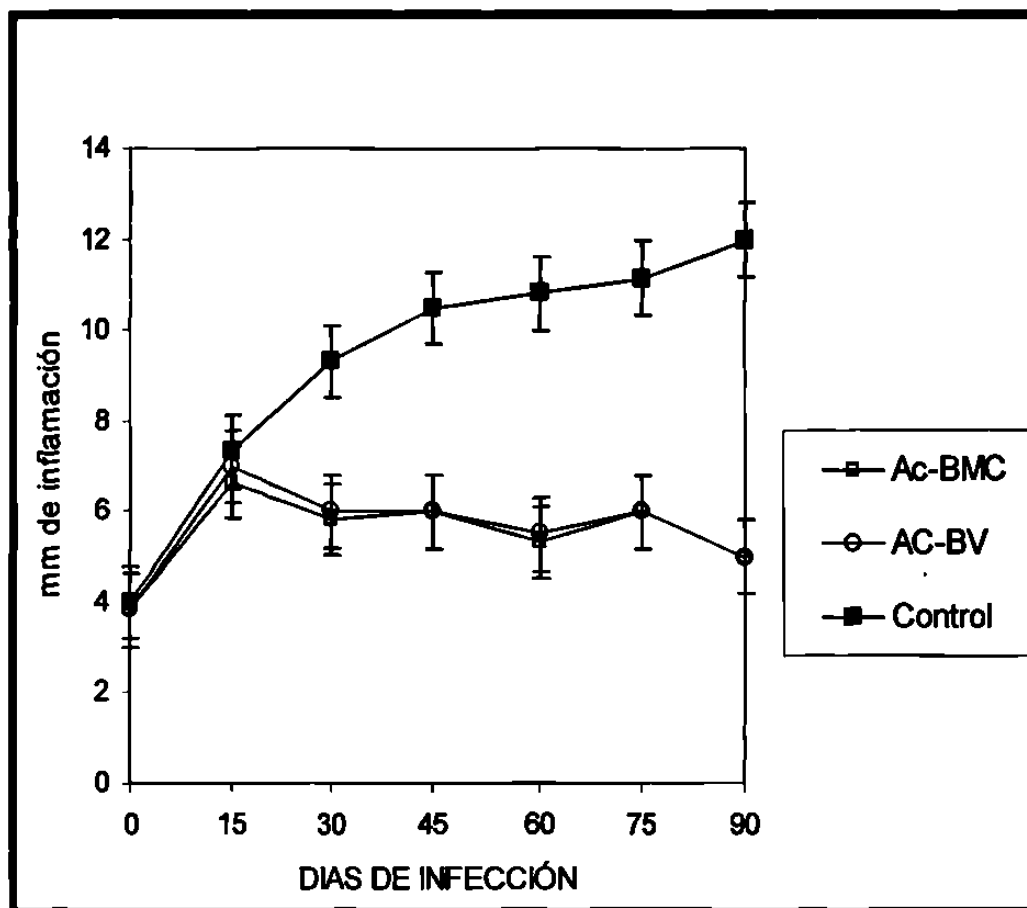


Figura 21.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados y obtenido en el día 7 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

Sin embargo los ratones que recibieron el suero obtenido del día 3 (figura 22) ninguno quedo protegido ya que todos desarrollaron micetoma.

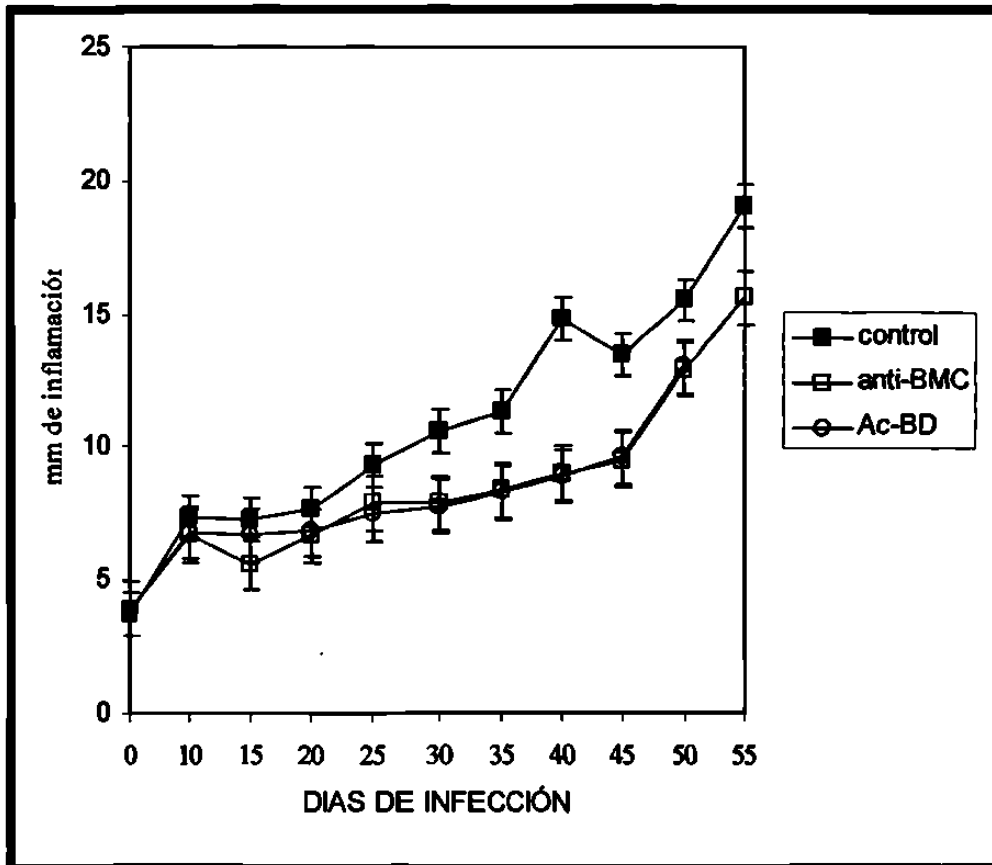


Figura 22.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el día 3 y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

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

En base a 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 via IP a otros ratones los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes.

8.1 Transferencia de células MN del día 45 post-inmunización.

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 23) no produjeron protección alguna en los receptores, ya que todos los ratones desarrollaron micetoma hacia el día 90 post-infección.

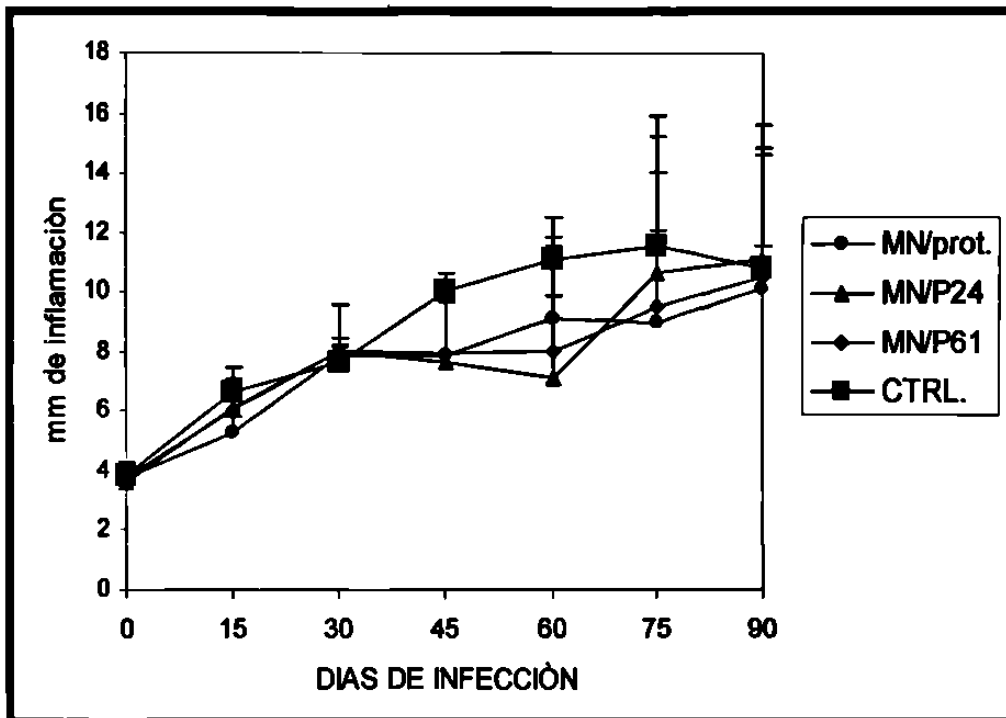


Figura 23.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 45 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

Sin embargo en los grupo de ratones que recibieron células mononucleares obtenidas en el día 45 a partir de animales inmunizados con antígenos particulados (bacterias deslidadas y BMC), administrados antes de la infección. Los resultados observados mostraron un efecto protector en los ratones que recibieron células MN obtenidas de animales inmunizados con BMC, mientras que las células MN obtenidas de animales inmunizados con BD no confirieron protección ya que todos los ratones desarrollaron micetoma. (Figura 24).

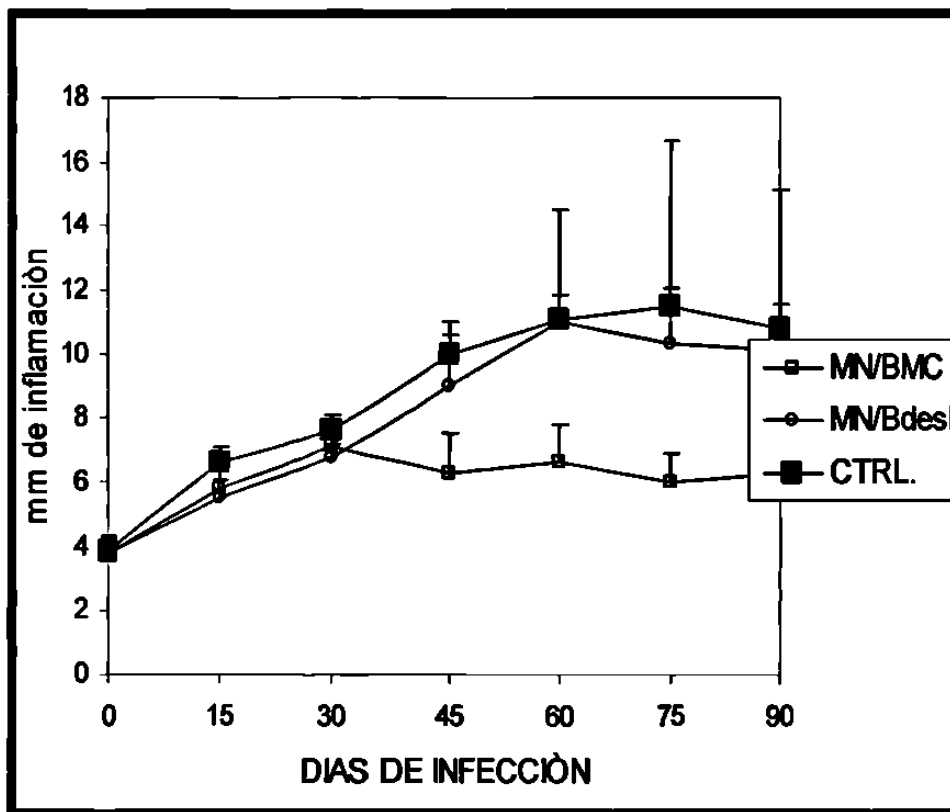


Figura 24.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidas en el día 45 y dado a ratones BALB/c (Receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

8.2 Transferencia de células MN del día 30 post-inmunización

No se observó protección contra la infección en aquellos ratones que recibieron células MN obtenidas en el día 30 provenientes de ratones inmunizados con antígenos solubles (Figura 25) y antígenos particulados (Figura 26) de *N. brasiliensis*.

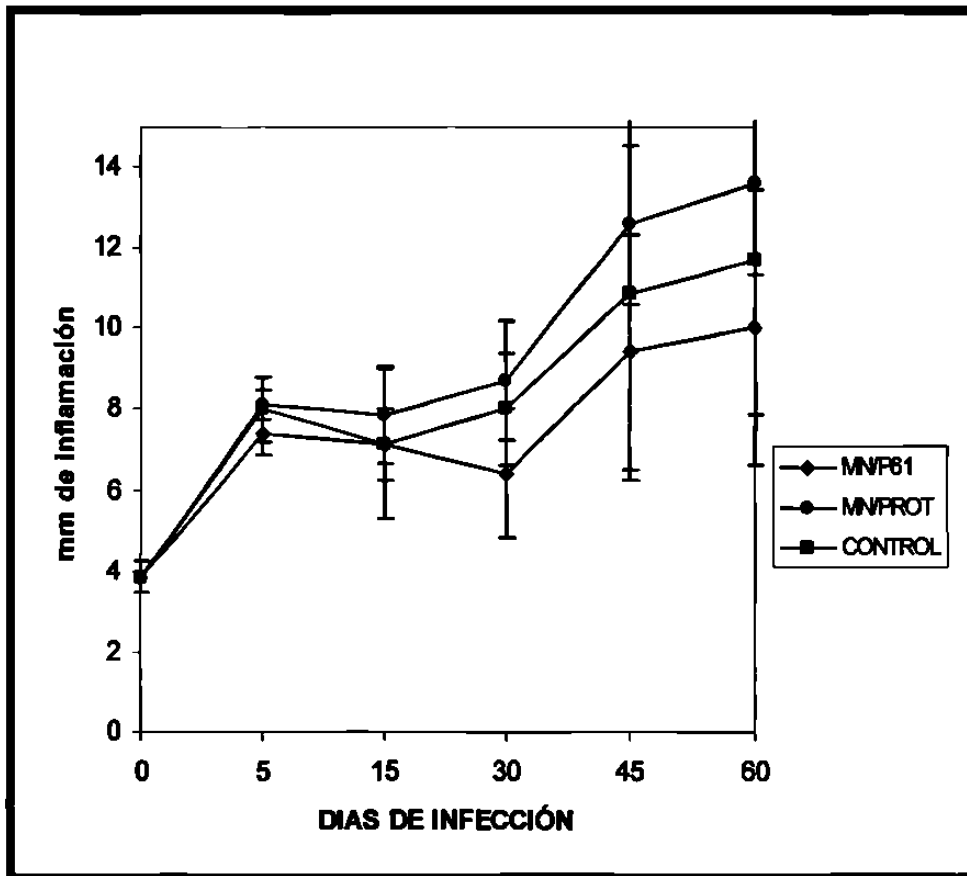


Figura 25.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 30 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

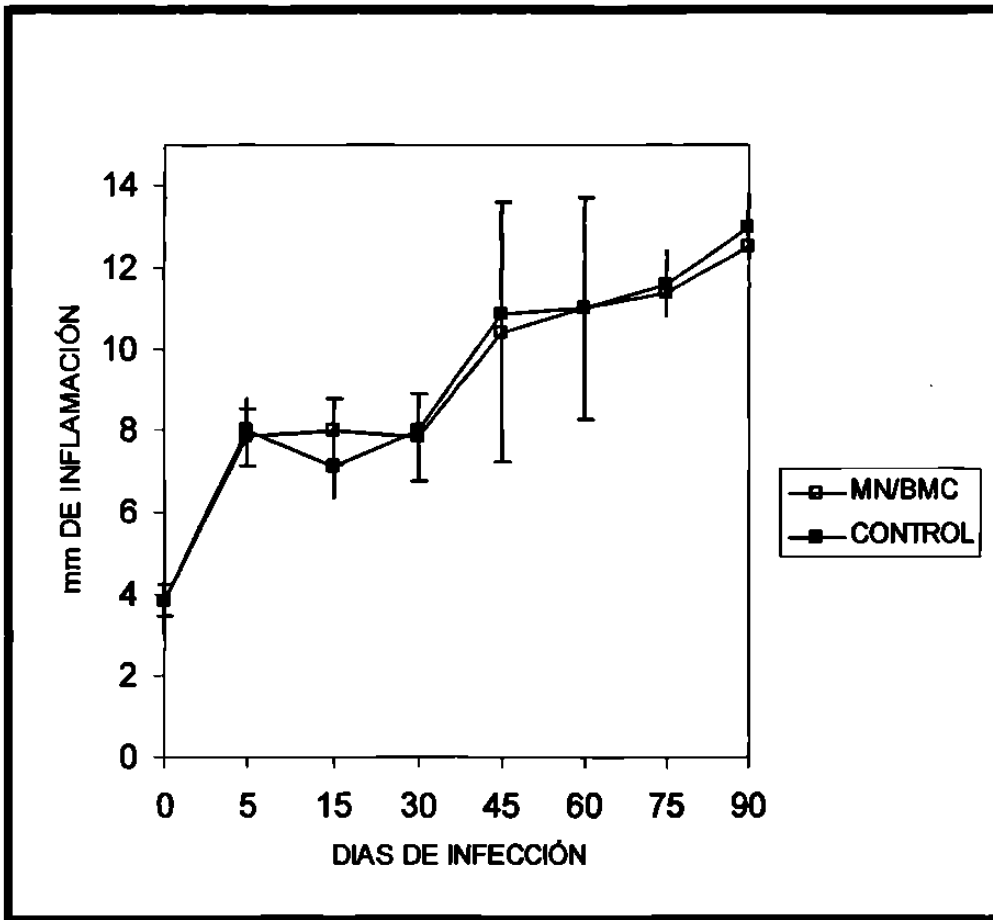


Figura 26.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el día 30 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

8.3 Transferencia de células MN del día 15 post-inmunización.

En las figuras 27 y 28 se muestran los resultados obtenidos de los ratones que fueron infectados pero habían recibido vía IP las células MN obtenidas en el día 15 post-inmunización. Los resultados mostraron protección total en cuanto al establecimiento de la infección en todos los grupos de ratones.

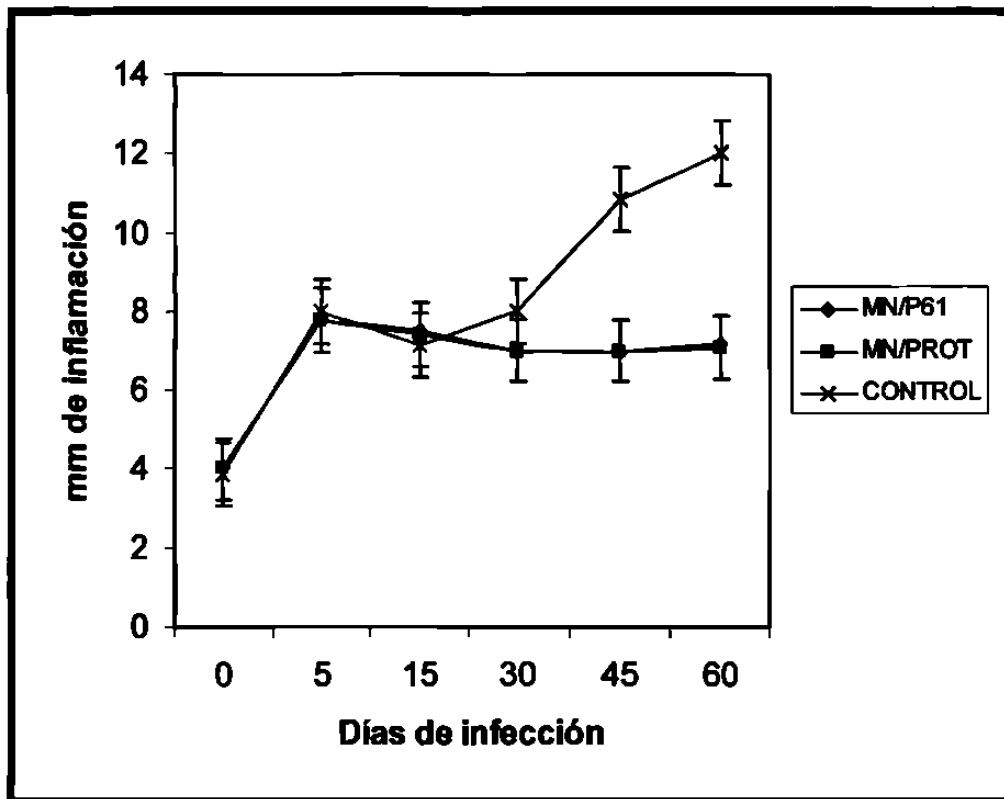


Figura 27.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 15 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

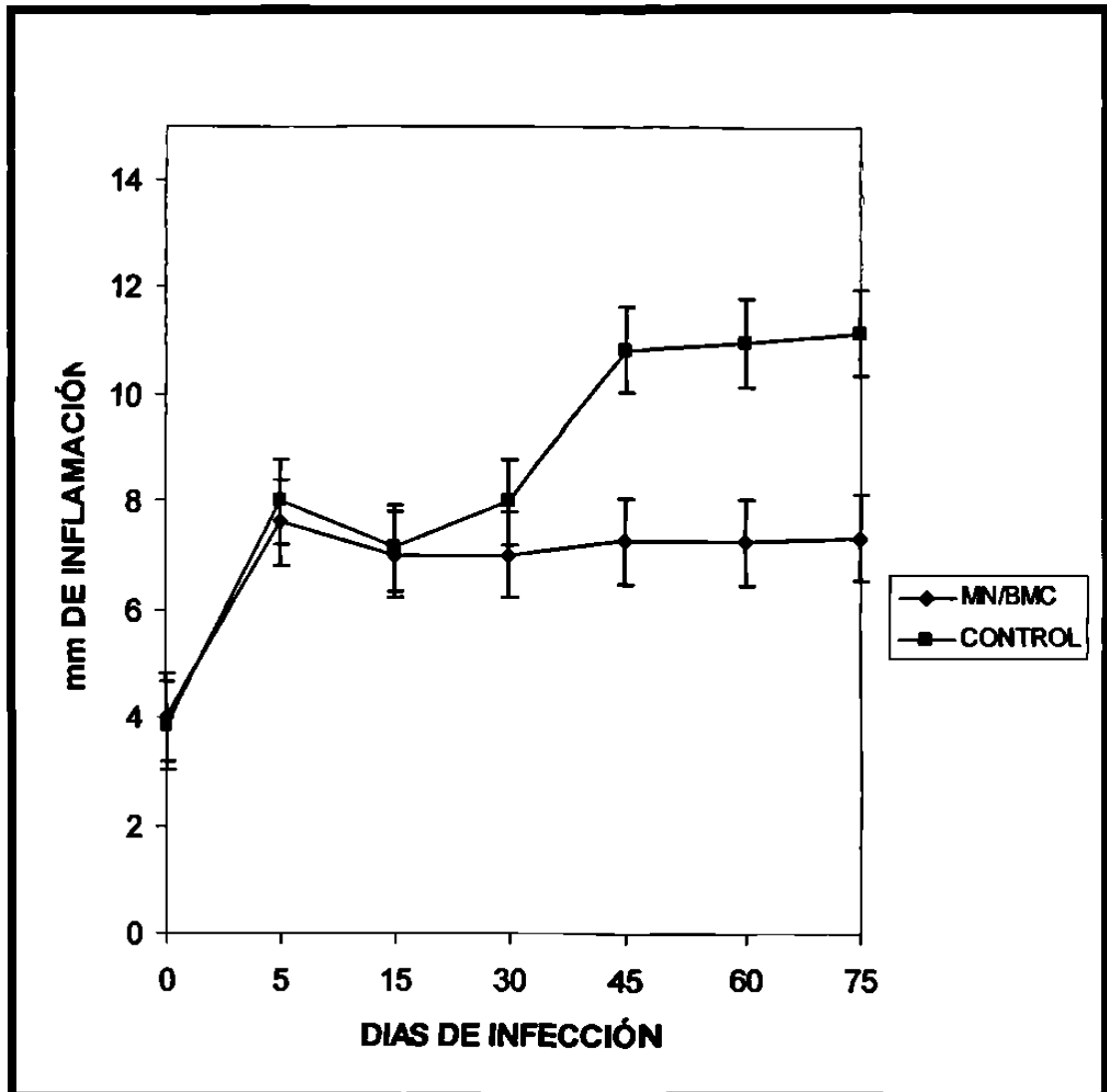


Figura 28.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el día 15 y dado a ratones BALB/c (Receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

8.4 Transferencia de células MN del día 7 post-inmunización

Finalmente los experimentos de transferencia pasiva de células MN obtenidas en el día 7 postinmunización.(Figura 29 y 30) y transferidas a otros ratones (R) los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*. Los resultados mostraron que todos los ratones tenían una disminución de la inflamación comparado con los ratones del grupo control y hasta el día 75 post-infección ninguno de los ratones desarrollo micetoma (protección total).

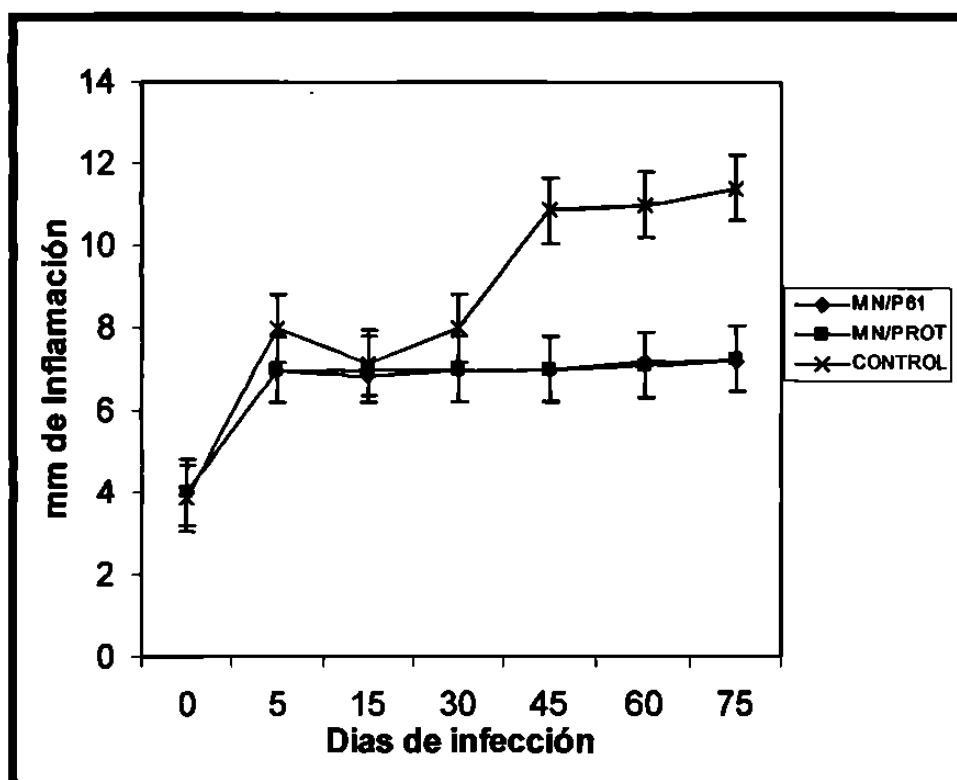


Figura 29.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenidos en el día 7 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

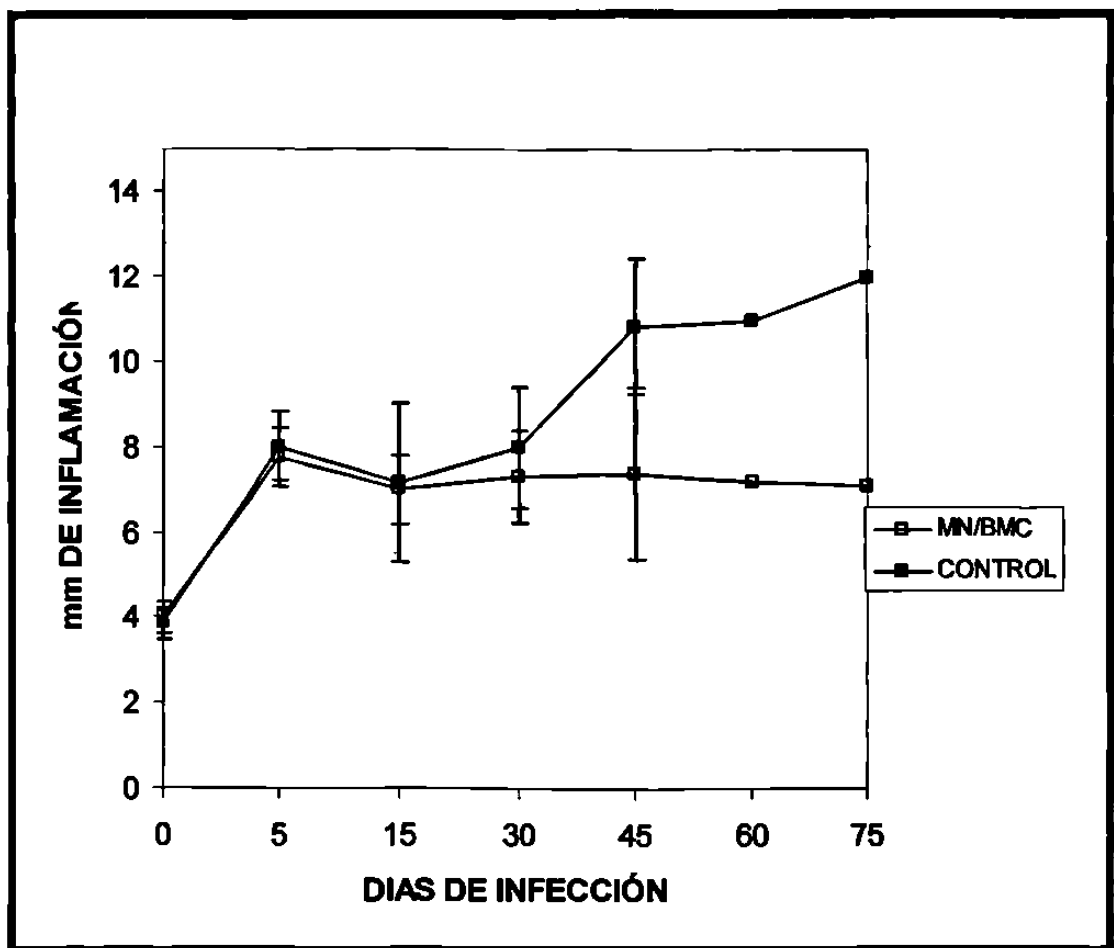


Figura 30.- Transferencia pasiva de células mononucleares (MN) de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenidos en el día 7 y dado a ratones BALB/c (receptores) antes de la infección con *N. brasiliensis*

9.- Re-infección con *N. brasiliensis* a diferentes tiempos post-infección.

9.1 Re-infección en el día 90 post-infección en los ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* e infectados en el día 15 post-inmunización.

En los experimentos de inmunización activa con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* en ratones infectados en el día 15 (figura 7 y 11) se observó el efecto protector en contra del establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* en los ratones que fueron previamente inmunizados, de ahí que en estos experimentos se decidió realizar una segunda infección (re-infección) con *N. brasiliensis* en estos mismo ratones en el día 90 post-infección. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la inflamación como era de esperarse, pero esta inflamación continuó hasta el día 135 post-infección en todos los grupos de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis* .(Figura 31).

RE-INFECCIÓN EN EL DÍA 90

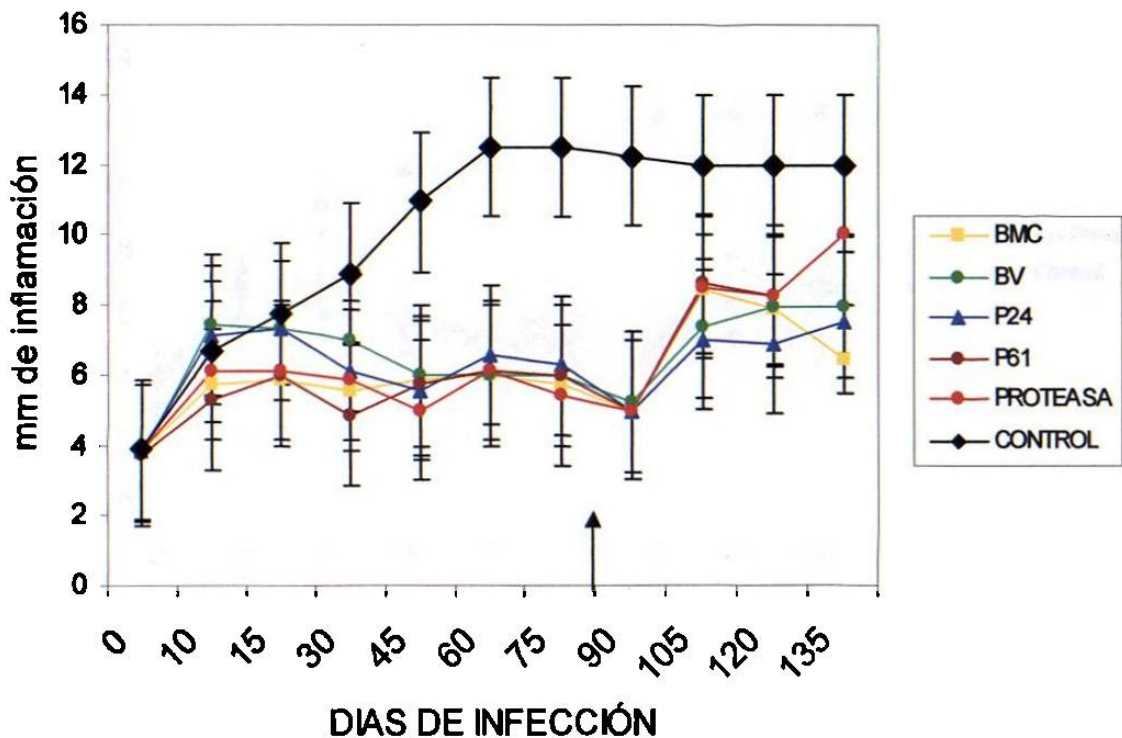


Figura 31 .-Efecto de la re-infección a los 90 días post-infección en los experimentos de inmunización activa con antígenos solubles y particulados en ratones BALB/c e infectados en el día 15 post-inmunización.

9.2 Re-infección en el día 90 en los ratones que recibieron suero hiperinmune contra con antígenos de *N. brasiliensis* los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis* en el día 7 post-inmunización

Los resultados que se obtuvieron en estos experimentos mostraron inflamación en los grupos que recibieron suero anti-P24, BV y BMC, mientras que los grupos de ratones que recibieron suero anti-P61 y anti-proteasa la inflamación observada fue muy poca, sin embargo en el día 135 post-infección la mayoría de los grupos mostraron poca inflamación de modo que podemos sugerir que los ratones que habían recibido previamente el suero anti- antígenos de *N. brasiliensis* obtenido del día 7 en forma pasiva previno el establecimiento de la infección en forma temporal.

RE-INFECCIÓN EN EL DIA 90

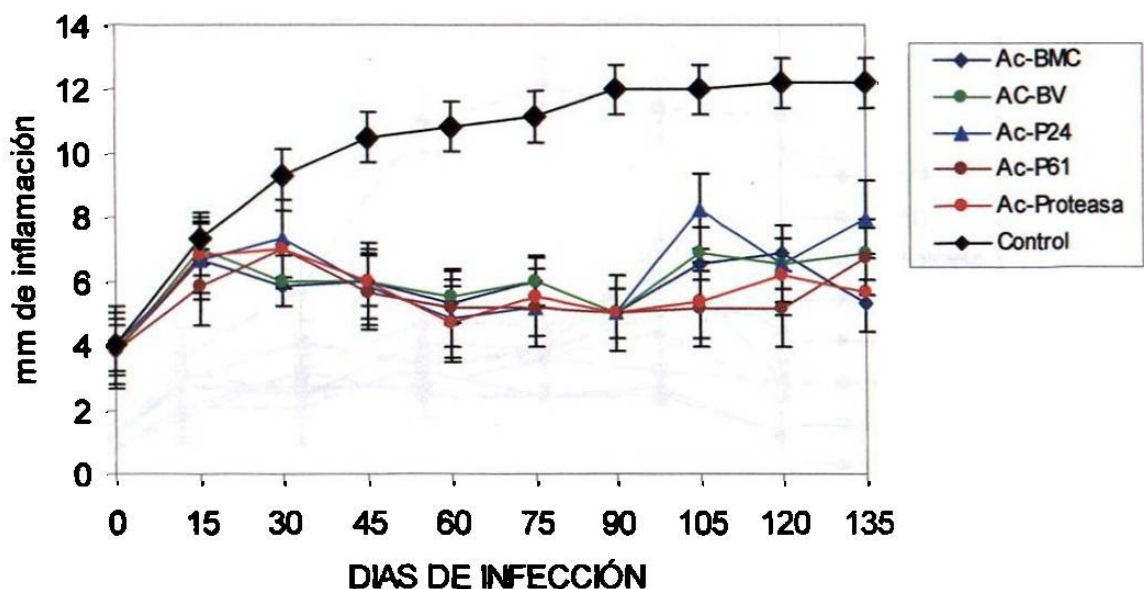


Figura 32.- Efecto de la re-infección a los 90 días post- infección en los experimentos de nmunización Pasiva con suero hiperinmune hacia antígenos solubles y particulados obtenido en el día 7 y transferidos a otros ratones los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*

9.2.- Re-inmunización a diferentes tiempos en ratones inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N brasiliensis* e infectados en el día en el día 15.

En base a los resultados obtenidos de reinfección del día 90 se decidió realizar re-infecciones a tiempos cortos (15,30,45 y 60 días post-infección) En este experimento los ratones después de haberlos inmunizados con antígenos solubles se re-infectaron en el día 17 y cada 15 días se re-infectaban de modo que terminamos con 3 grupos de animales inmunizados e infectados en el día 15, 1 grupo de animales inmunizados y re-infectados en el día 15, 1 gpo. Animales inmunizados y Re-infectados en el día 30, 1 gpo. de inmunizados y re-infectados en el día 45 y 1 grupo de animales inmunizados y re-infectados en el día 60 y el grupo control (Figura 33). Los resultados mostraron que ninguno de los grupos que fueron infectados así como los que fueron reinfectados a diferentes tiempos desarrollaron micetoma. Esto refirma que efectivamente la respuesta Inmune humoral temprana dada principalmente por IgM podría determinar la protección en contra de la infección en este modelo experimental de micetoma.

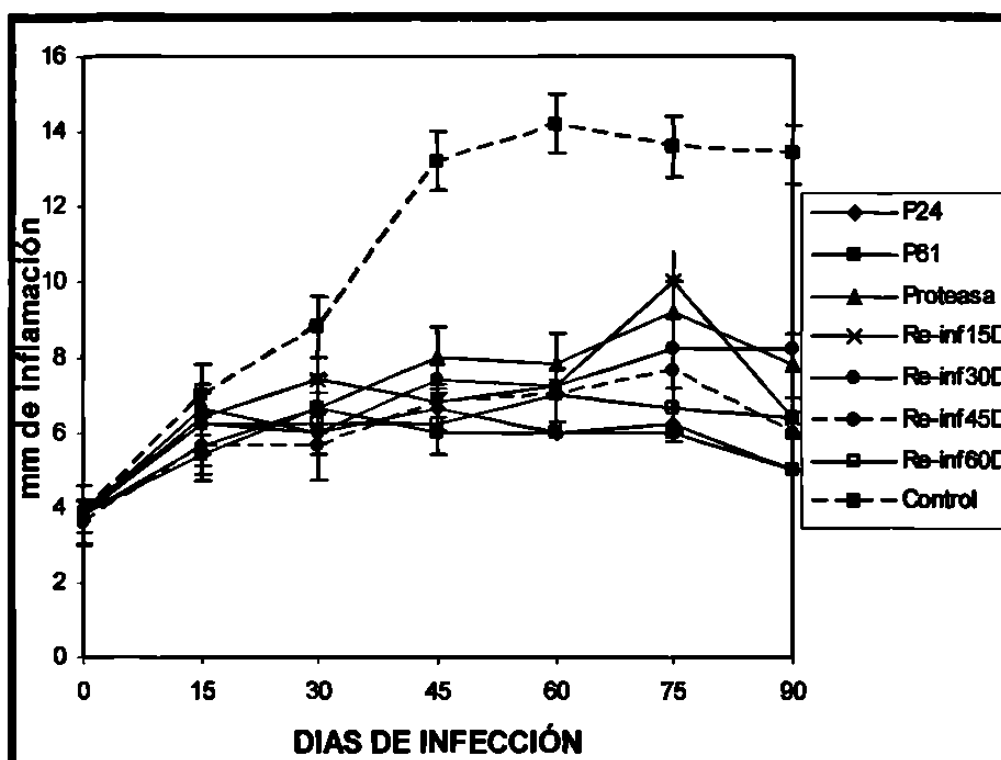


Figura 33.- Inmunización activa con antígenos solubles e infección con *N brasiliensis* a los 7 días y re-infecciones con *N. brasiliensis* a diferentes tiempos 15,30,45,60 días post-infección).

10.- Análisis de las subpoblaciones de células B-1a, B-1b y B-2 en células de cavidad peritoneal, obtenidas a diferentes tiempos de inmunización con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* (7, 15 y 30 días post-inmunización) mediante Citometría de flujo.

Los resultados mostrados en la tabla 5 en cel. De cavidad peritoneal un aumento del % de las células B1a y B-2 en los días 7 y 15, mientras que se observó una disminución de las células B-1b en los mismos días.

Tabla 5.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células de cavidad peritoneal por citometría de flujo

ANTÍGENO	Día 0	Células (%) B-1a Día 7	Día 15 CAV. PERITONEAL	Día 30
P61	3.17±	29.28±9.4	24.59±9.9	0.91±0.01
Proteasa	1.13	20.71±12.	13.43±1.7	4.33±0.01
BMC	1.82±	44.18±10.	30.52±8.9	5.67±0.02
control	1.13±	3.01±2.44	1.89±0.47	1.82±0.65
		Células (%) B-1b		
P61	81.36	48.61±11.	60.61±10.	98.11±0.1
Proteasa	97.24	61.61±18.	71.45±3.1	94.04±0.0
BMC	97.07	35.28±8.1	56.51±12.	91.65±0.4
control	81.36	81.36±18.	97.24±0.8	97.07±1.0
		Células (%) B-2		
P61	1.2	22.1±2.70	14.79±3.5	0.89±0.01
Proteasa	1.2	17.67±8.0	15.11±3.9	1.58±0.02
BMC	1.1	20.52±6.0	12.95±5.1	2.38±0.01
control	1.1	6.61±1.0	1.2±0.30	1.1±0.38

10.1.- Análisis de las células B-1a , B-1b y B-2 en células esplénicas a diferentes tiempos de inmunización.

En la tabla 6 se muestran los resultados del análisis de las células de bazo a diferentes tiempos de inmunización y los resultados mostraron un aumento de las células B1a y B-2 en los 3 grupos analizados en los días 7 y 15 post-inmunización, mientras que se observó una disminución del % de las células B1b en los mismos días.

Tabla 6.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células esplénicas por citometría de flujo.

ANTÍGENO	BAZO			
	Día 0	Día 7	Día 15	Día 30
P61	3.17±1.78	24.55±1	16.34±8.7	1.34±0.03
Proteasa	1.13±0.02	30.76±1	43.70±5.7	1.21±0.01
BMC	1.82±0.03	38.22±25.	28.67±16.	2.31±0.01
control	1.13±0.01	2.42±2.60	1.08±0.28	1.13±0.39
		Células (%) B-1b		
P61	81.36±2.5	61.04±22.	67.97±14.	95.05±0.
Proteasa	97.24±2.6	46.65±16.	37.77±5.8	94.18±0.0
BMC	97.07±5.6	40.83±17.	58.67±12.	93.47±0.5
control	81.36±2.7	91.70±8.4	96.29±1.6	95.82±2.1
		Células (%) B-2		
P61	1.2±0.03	14.39±8.3	14.79±3.5	3.54±0.03
Proteasa	1.2±0.01	22.58±3.1	18.51±1.5	4.51±0.01
BMC	1.1±0.02	20.94±7.9	12.64±9.7	4.24±0.04
control	1.1±0.0	5.87±1.96	3.02±1.61	3.04±2.28

10.2.-. Análisis de las células B-1a , B-1b y B-2 en el día 30 post-inmunización en diferentes poblaciones celulares.

En la **tabla 7** se muestran los resultados de las 3 subpoblaciones de células B presentes en células sanguíneas donde se puede observar un aumento de las células B1a y B-2 en los días 7 y 15 post-inmunización y una disminución de las células B1b en los días 7 y 15.

Tabla 7.- Análisis de las células B1a, B1b y B-2 en células sanguíneas por citometría de flujo.

ANTÍGENO	SANGRE P.			
	Día 0	Día 7	Día 15	Día 30
P61	3.17±1.70	22.35±5.	19.16±8.	7.42±0.02
Proteasa	1.13±0.01	29.57±4.	25.76±2.	2.61±0.01
BMC	1.82±0.02	32.32±6.	22.80±12.	6.63±0.02
control	1.13±0.01	2.77±1.62	3.30±1.28	3.17±1.73
		Células (%) B-1b		
P61	81.3±0.1	55.60±11.	66.46±13	65.57±0.1
Proteasa	97.24±1.	55.48±6.1	46.86±12	87.4±0.11
BMC	97.07±2.	50.00±6.8	66.14±13	87.42±0.1
control	81.36±2.	74.71±20.	90.92±1.	91.52±2.
		Células (%) B-2		
P61	1.2±0.01	22.36±3.5	14.40±6.	26.55±0.
Proteasa	1.2±0.01	14.94±1.7	24.97±10	9.87±0.02
BMC	1.1±0.05	17.67±4.4	10.45±4.	5.73±0.01
control	1.1±0.06	6.08±3.11	5.38±1.41	5.3±1.92

DISCUSIÓN

Las infecciones por microorganismos intracelulares constituyen un problema muy importante de salud pública en muchos países entre ellos México.

La respuesta inmune en las infecciones por microorganismos intracelulares es una serie de eventos biológicos que depende de varios factores tanto del agente infeccioso como del hospedero (18). Sabemos por estudios realizados anteriormente y específicamente con *N. brasiliensis* (122) que la dosis del antígeno y su naturaleza química o presentación modula la intensidad de la respuesta inmune. Por mucho tiempo se ha aceptado que la respuesta inmune celular juega un papel importante en la protección en contra de las infecciones por microorganismos intracelulares (88,89), mientras que la respuesta inmune humoral dada por los anticuerpos al parecer no juega un papel importante en la protección (90,92), incluso hay quienes llegaron a aseverar que más que ayudar agravan las lesiones(99). Tales resultados sugirieron la poca participación de las células B en la infección por este microorganismo. Los resultados presentados en este trabajo demuestran claramente que la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización activa y pasiva utilizando antígenos de *N. brasiliensis* (solubles y particulados) fueron capaces de prevenir el establecimiento de

la infección por *N. brasiliensis*. Nuestros resultados difieren de aquellos reportados por Blander y Horwitz donde publicaron sus hallazgos de protección inmune inducida por inmunización activa con proteínas extracelulares (MSP) de *Legionella pneumophila* (104). Horwitz y cols. (46) extendieron sus observaciones a un modelo animal de infección con *M. tuberculosis* y propusieron que la inmunización con proteínas EC es capaz de inducir protección contra esta enfermedad. Resultados similares se observaron con *Leishmania donovani* (101,106), así como con *C. albicans* específicamente con la proteína P43 la cual mediante la inmunización se logró prevenir la candidiasis sistémica en ratones BALB/c. En los experimentos de inmunización activa con la proteína inmunodominante P24 de *N. brasiliensis* la cual no se secreta al medio de cultivo (IC) al igual que la proteasa la cual se secreta en cantidades abundantes al medio de cultivo (extracelular) (120) ambas fueron igual de eficientes para inducir protección cuando los animales fueron infectados tanto en el día 45 como en el día 15 post-inmunización lo cual es contrario a lo que se había dicho que solamente las proteínas extracelulares de los microorganismos intracelulares confieren protección (105). Aunque existen estudios similares de transferencia pasiva de suero hiperinmune con títulos altos de IgG anti-Nocardia no fueron capaces de conferir protección (112), dichos resultados

concuerdan con los obtenidos por Salinas y cols (111) en la que sueros hiperimmune de ratones inmunizados con BMC y suero anti-proteasa con titulos altos de IgG y obtenidos en los dias 60, 90 y 120 dias post-inmunización (112) no fueron capaces de inducir protección. Sin embargo en otros experimentos realizados por el mismo autor se menciona que la transferencia pasiva de suero anti-proteasa obtenida en el día 30 fue capaz de inducir protección parcial en aquellos animales que posteriormente fueron infectados con *N. brasiliensis* (112). Estos resultados concuerdan con los que nosotros encontramos en los experimentos de transferencia pasiva con suero de ratones inmunizados con proteasa, P24 y P61 obtenido en el día 45 de la inmunización, dicho suero fue capaz de inducir protección parcial solamente con las proteínas P24 y proteasa mientras que el suero anti-P61 no logró prevenir el establecimiento de la infección. Dichos resultados concuerdan con lo que habíamos visto mediante la determinación de anticuerpos de tipo IgG (ELISA) en los sueros de los 3 grupos de animales inmunizados con estas proteínas en las cuales encontramos que P24 y proteasa fueron mas inmunogénicas ya que lograron inducir anticuerpos de tipo IgG (subclase IgG1, IgG2b e IgG3) en un 100% y 94% de los ratones inmunizados, mientras que la proteína P61 solo logró inducir anticuerpos de tipo IgG (IgG1) en un 42% de los animales

inmunizados dichos resultados nos llevan a conclusión del porque solamente observamos protección en los grupos de animales inmunizados con P24 y proteasa y no con P61. Sin embargo cuando los animales fueron inmunizados con antígenos particulados (BMC y BD) y posteriormente se infectaron, en todos los animales tratados se logró prevenir el establecimiento de la infección. Lo cual concuerda con la hipótesis planteada que los antígenos particulados confieren mayor protección que los antígenos solubles siempre y cuando la infección se lleve a cabo en el día 45 de la inmunización. En cambio cuando realizamos experimentos de transferencia pasiva de suero obtenido en el día 45 post-inmunización dicho suero no logró inducir protección en otros animales los cuales fueron infectados. Ahora bien cuando realizamos inmunización activa con antígenos solubles y particulados y específicamente en el día 15 de la inmunización los animales fueron infectados. Los resultados que encontramos fue protección total ya que el 100% de los animales no desarrollaron micetoma. En trabajos realizados por Salinas-Carmona y cols. (123) donde utilizaron diferentes cepas de ratones a los cuales se les indujo el micetoma con *N. brasiliensis*, los resultados obtenidos fueron que los híbridos F1 (CB/N X DBA/2) machos, desarrollaron el micetoma hasta los 5 meses después de la infección mientras que los ratones BALB/c lo hicieron a los 30 días. Si

bien estos ratones F1 tienen un defecto en la maduración de las células B que no pueden hacer el cambio de IgM a IgG lo cual nos inclina a pensar que es la respuesta inmune mediada por IgM y no IgG la que está jugando un papel importante en el retraso del establecimiento de la infección. De ahí que tal vez la explicación de los resultados que encontramos en cuanto a la protección total producida mediante la inmunización activa con antígenos solubles y particulados e infectados en los primeros días de la inmunización (día 15), en ese momento los ratones no habían producido anticuerpos IgG y es solamente la IgM la que está presente en circulación, sin embargo los experimentos de transferencia pasiva con suero del día 15 obtenido de animales inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* y dados a otros ratones los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*, se observó protección parcial en todos los ratones que recibieron dicho suero. Existen evidencias en algunas enfermedades causadas por virus citopáticos tal como el virus de la polio, influenza, rabia y virus de la estomatitis vesicular (VSV), en tales infecciones se generan anticuerpos neutralizantes protectores los cuales se producen durante la primera semana de la infección. Mientras que en las infecciones causadas por virus no citopáticos (124) como el virus de inmunodeficiencia, virus de hepatitis B y C se induce una pobre y tardía respuesta de anticuerpos

neutralizantes , incluso en las infecciones casuadas por el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) inducen anticuerpos neutralizantes en forma temprana de tipo IgM los cuales contribuyen a la rápida eliminación del virus en la fase aguda de la infección (125). Estos experimentos apoyan a la protección total observada en los ratones que antes de ser infectados con *N. brasiliensis* recibieron suero hiperinmune del día 7 obtenido de animales inmunizados con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis*. Tales resultados nos hacen inferir que aquello que se logró inducir en las 1ª y 2ª semana mediante la inmunización con antígenos solubles y particulados y que está presente entre el día 7 y 15 post-inmunización es capaz de prevenir el establecimiento de la infección. Posteriormente para demostrar que el o los factores séricos responsables de dicha protección se producen en los primeros 3 días de la inmunización con los antígenos de *N. brasiliensis*. Realizamos experimentos de inmunización activa y pasiva a los 3 días y los resultados que encontramos fueron que no hubo protección ni mediante inmunización activa ni en experimentos de transferencia pasiva con suero del día 3 post-inmunización. Lo cual nos lleva a la conclusión posiblemente los factores involucrados en prevenir el establecimiento de la infección se producen después del 3er día y están presentes a partir de la 1ª semana de inmunización en el suero de los animales inmunizados.

Si bien el efecto protector observado en los experimentos de inmunización activa y pasiva en los primeros días de la respuesta inmune, decidimos realizar experimentos de transferencia pasiva de células mononucleares obtenidas en esos mismos días a partir del bazo de ratones inmunizados con antígenos solubles y particulados, como era de esperarse, los ratones que recibieron dichas células MN del día 7 y 15 post-inmunización quedaron protegidos en forma total en el 80 % de los casos, ya que no desarrollaron micetoma en el tiempo esperado mientras que los ratones que recibieron células MN del día 30 todos los animales desarrollaron micetoma en el día 30 post-infección. Aunque no existen antecedentes en cuanto a experimentos de transferencia pasiva de células MN obtenidas de bazo de animales inmunizados, los resultados encontrados son interesantes e importantes ya que concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de transferencia de sueros anti-proteasa del día 30 post-inmunización (112). Existen evidencias que indican que subpoblaciones de células B con funciones de inmunidad innata las cuales juegan un papel adicional en la defensa (126), nos dimos a la tarea de investigar que subpoblación de la célula B (B1-a, B1-b y B-2) está presente exactamente en esos días en los cuales observamos la protección contra la infección. Los resultados obtenidos fueron que las poblaciones más abundantes en los días 7 y 15 en los

cuales observamos la protección, fueron las células B-1 a y B-2 las cuales estaban aumentadas en un 20 a 40 % comparado con las células del control (ratón no inmunizado), mientras que las células del día 30 que no confirieron protección mediante transferencia pasiva dieron mismo patrón de células que del animal no inmunizado (control) siendo las células B-1b presentes en todos los grupos de animales tratados. Todo esto nos lleva a inferir que probablemente las células B-1 a y B-2 participen en la protección la cual se observa en los primeros días de la respuesta inmune. Existen evidencias que concuerdan con nuestros resultados en las cuales se ha visto la participación de las células B-1 a en la defensa del huésped, ya que se ha visto que interactúa con las células NK (127), es productora de inmunoglobulina M y presenta una alta capacidad presentadora de antígeno (128). Sin embargo en estudios realizados en modelos de animales con SCID infectados con rotavirus han visto el papel de las células B-2 en la rápida eliminación de este microorganismo (129). Los resultados encontrados son interesante ya que si la protección observada es debida a la participación de las células B-1 a y B-2 y sus productos (IgM) las cuales son detectables en bazo y están en cantidades abundantes en cavidad peritoneal y pleural en el ratón (130), cuyas células presentan una alta capacidad de presentación de antígeno e interactuar con las cel. NK naturales (128). Esto nos lleva a

pensar que probablemente lo que está sucediendo en los primeros días de la inmunización con los antígenos de *N. brasiliensis* es la participación de las células B (entre ellas las B-1a y B-2) las cuales son la primera población celular con las que se encuentra un antígeno y forman parte de la primera línea de defensa en contra de los patógenos. Estas células al ser inducidas producen rápidamente anticuerpos naturales (IgM) con actividad neutralizante durante la primera semana de la inmunización. Tal vez esta sea la explicación que cuando el animal es infectado posteriormente (específicamente en el día 7 o 15 días), ciertos factores séricos al ser producidos en los primeros días (inmunoglobulina M) traerá como resultado la prevención de establecimiento debido a la rápida eliminación de este microorganismo. Esto nos lleva a cambiar el concepto de que no solamente es la respuesta inmune adquirida tipo celular la que está jugando un papel importante en la protección(104), sino que también la respuesta inmune innata humoral la que juega un papel importante en la protección en contra de las infecciones por microorganismos intracelulares entre los cuales *N. brasiliensis*.(98). No solamente las proteínas extracelulares confieren protección (105), sino que también proteínas intracelulares como P24 y P61 de *N. brasiliensis* inducen protección mediante inmunización activa en animales infectados posteriormente. También existe el concepto de que es la respuesta

inmune adquirida donde se determina el establecimiento de la enfermedad, sin embargo de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en este trabajo se cambia también este concepto lo cual nos lleva a pensar que es en los primeros días de la respuesta inmune (respuesta inmune innata) donde se determina el establecimiento o la progresión de la enfermedad. Partiendo del concepto que existen diversos factores que esten participando y jugando un papel importante en tal evento como son los factores séricos: IgM, citocinas, moléculas de adhesión, factores antimicrobianos y así como la participación de factores celulares (células dendríticas, macrófago, PMN , células NK y diferentes subpoblaciones de células B (B-1 a, B-1 b y B-2) (126). Finalmente la aportación mas importante y de mayor relevancia es la de abrir una campo al desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de vacunas que protejan en contra de otros microorganismos intracelulares tales como *M. tuberculosis* etc.). (131). Sabemos hasta la fecha no se ha avanzado mucho en cuanto al desarrollo de vacunas eficaces de logren inducir protección total. En la búsqueda de encontrar mejores vacunas, la vacuna contra la tuberculosis ha sido la mas estudiada y la mas controversial hasta hoy (132). Existen evidencias en la cual se ha encontrado gran variación en humanos con una eficacia del 30 al 80%. Existen pocos reportes en cuanto a la respuesta inmune humoral inducido por BCG y la

mayoría de los estudios es concerniente a estudiar la respuesta inmune celular. Con todo esto las razones del porque la carencia de la eficacia de la vacuna es un problema no resuelto, existe la urgente necesidad para lograr un eficiente control de la tuberculosis a nivel mundial lo cual conlleva a unir esfuerzos a niveles internacionales a poder desarrollar nuevas vacunas. (133). Los resultados presentados en este trabajo contribuyen al diseño de nuevas estrategias para la obtención de vacunas efectivas que estimulen la producción de la inmunoglobulina IgM.

CONCLUSIONES

- 1.- La inmunización activa con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* previene el establecimiento de la infección en forma total. La protección es transitoria o de corta duración.**
- 2.-La inmunización pasiva mediante transferencia de suero hiperinmune contra antígenos solubles y particulados confirió protección total pero transitoria.**
- 3.- La transferencia pasiva de células mononucleares de bazo de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis*, previno el establecimiento de la infección en un 80% de los ratones infectados, este efecto protector es transitorio.**

PERSPECTIVAS

- ✓ Investigar el papel de la célula B1-a y B-2 productoras de IgM en la respuesta contra bacterias intracelulares.**
- ✓ Establecer líneas celulares productoras de IgM anti-bacterias intracelulares y determinar su eficiencia en el tratamiento de enfermedades infecciosas.**
- ✓ La información obtenida es útil para el desarrollo de nuevas vacunas que protejan en contra de otros microorganismos intracelulares.**

BIBLIOGRAFIA

1. Hay R I, Mahgoub Es, Lean G 1992: Mycetoma. *J. Med Vet Mycol.* **1:41-49.**
- 2.- Nocard M.E.1988 Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe le nom de forcin, *Ann. Inst. Pasteur.*
- 3.- Trevisan V.1889. Igeneri ele specie de lle battierlancee Milano: Zanabon and Gabazzi, *Int Bull. Bacteriol. Nomend. Taxon* **2. 13-14.**
- 4.- Blanchard R.1896. Parasitis vegetoux al' exdosion des bacteries, in, Bouchard B. (Ed.), *Traite de Pathologie Generale.* G. Massan, Paris. **2:811-932.**
- 5.- Sandoval Trujillo, H. 1993. " Actinomicetus", Edit. Universidad Autónoma Metropolitana. 345-432.
- 6.- Alshamaony L., Goodfellow M., Minnikin D. 1976. Free mycolic acids as a criteria in the classification of *Nocardia* and *rhodochroux* complex, *J. Gen. Microbiol.* **92:188-199**
- 7.- Butler W.R., Kilburn J.G., Kubica G.P. 1987. High performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species, *J. Clin Microbiol.* **25:2126-2131.**

8. Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. 1970.: Prauser H.(Ed.), the Actinomycetales, Gustav Fischer Verlag, Jena Germany. pp 393-405
9. Lechevalier M.P. 1977. Lipids in Bacterial taxonomy a taxanormist's view, crit. Rev. Microbiol. 5:109-210.
10. Yamada Y., Inouye, G., Tahara, Y., Kondo, K. 1976. The menaquinone system in the classification of some nocardioform bacteria and related organisms. J. Gen Appl Microbiol. 22:203-214.
11. Collins M.D., Goodfellow M., Minikin D.E., Alderson G.1985. The menaquinone composition of mycolic acid containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. J. Appl. Bacteriol. 58:77-86.
12. Goodfellow M., Orchard V.A.1974. Antibiotic sensitivity of some nocardio form bacterium and its value as a criterium for taxonomy, J. Gen Microbiol. 83:375-387
13. Wallace Jr R.J.,Brown B.A., Tsukamura M., Brown J.M., Onyi G.O.1991. Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*, J. Clin. Microbiol. 29:2407-2411
14. Wallace Jr. R.J., Tsukamura M., Brown B.A.,Brown J., Steingrube V.A., Zhang Y., Nash D.R. 1990.Cefataxime resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. J. Clin Microbiol. 28:2720-2732

15. Orchard V.A., Goodfellow M. 1980. Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil, *J. Gen Microbiol* **118**:295-315.
16. Goodfellow M., E.G. Thomas A.C., Ward and A.L. James. 1990: Classification and identification of rhodococci. *Zbl. Bakt* **274**:299-315.
17. Beaman B.L., Beaman L. 1994. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev.* **7** (2):213-264.
18. Beaman D.L., Saubolle M.A., Wallace R.J. 1995. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia* and other aerobic actinomycetes of medical importance. Pp329-399. *Manual of Clinical Microbiology*. Edited por P.R. Murray, 6th ed ASM Press. Washington, D.C.
19. Welsh O. 1991. Mycetoma current concepts in treatment. *Int J. Dermatol.* **30**:387-398.
20. Welsh O., Salinas- Carmona M.C., Rodriguez M.A., in: Hoepfich P.D., Jordan M.C., Ronald A.R. (Eds). 1994. *Infectious Disease J.B.*, Lippincott Company Philadelphia. pp 1402-1404
21. Welsh O., Salinas-Carmona M.C., Rodriguez M.A., in: Borgers M., Hay R., Rinaldi M.G. (Eds). 1995. *Current topics in Medical Mycology* prouse. Science Barcelona, Spain. pp 47-71

22. Boiron P., Loco R., Goodfellow, M., Gumoa A., Isik K., Kim, B., McNeil M., Salinas-Carmona M.C. and Shojaett. 1998. Nocardia, Nocardiosis and Mycetoma. *Medical Mycology*. **36**:26-37.
23. Beaman, B.L., Bourgeois A.L. and Moring S.E. 1981. Cell wall modification resulting from growth in the cell wall-deficient state. *J. Clin. Microbiol.* **14**:574-578.
24. Beaman, B.L. and Moring S.E. 1988. Relationship among cell wall composition stage of growth and virulence of *Nocardia asteroides*. *GUH-2. Infect. Immun* **56**:557-563
25. Beaman, B.L. 1973. An ultrastructural analysis of Nocardia during experimental Infections in mice. *Infect Immun.* **8**:828-840
26. Beaman, B.L. 1975. Structural and biochemical alterations of *Nocardia asteroides* cell walls during it's growth cycle. *J. Bacteriol.* **123**: 1235-1253
27. Etemadi, A.H. 1967. Les acides mycoliques: Structure biogenes et interet phylogenetique. *Expo Annu, Biochim. Med.* **28**:77-109
28. Beaman, B.L., S.F., Moring and T. Toned. 1988. Effect of growth stage on mycolic acid structure in cell walls of *Nocardia asteroides* *GUH-2. J. Bacteriol.* **170**:1137-1142

29. Beaman, B.L., Serrano, J.A. and Serrano A.A. 1977. Comparative ultrastructure within the *Nocardia* Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Abt. I suppl 6:201-220.
30. Beaman B.L. 1979. Interaction of *Nocardia asteroides* at different Phases of growth with in vitro maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbits. Infect. Immun. 26:355-361.
31. Azuma I., F.U. Kanetsuna, Y. Tanaka, M. Mera. Y., Yanagihara I. Mifuchō and Y. Yamamura 1973. Partial characterization of the cell wall of *Nocardia asteroides* strain 131. Jpn J. Microbiol. 17:154-159
32. Lechevalier, H.A. 1989. Nocardioform actinomycetes. In S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 4: 2348-2404.
33. Beaman, B.L., and A. M. Sugar 1983. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infections in animals. J. Hyg: 91:393-419.
34. Serrano, J.A., Beaman, B., Mejía, M.A. Vilorio, J.E. and Zamora R. 1988. Histological and microbiological aspects of

- actinomycetoma cases in Venezuela. Rev.Inst. Med. Trop. Sao Paulo 30:297-304.
35. López M.R., Méndez T.R., Lavalle P.O., Welsh O., Saúl A., Ruiz E.M.1992. Epidemiologia del Mycetoma in México: 2105 cases. Gaceta Medica México. 128:177-181
 36. Schaal, K.P., and Beaman B.L. 1984. Clinical significance of actinomycetes. p. 389-424
 37. Uzcategui M. 2004. Tesis de Maestría. Aislamiento de bacterias del género Nocardia a partir de suelos de la región norte de Nuevo León.
 38. Beaman, B.L. P.Boiron,L., Beaman. G. Brownell K, Schaal and M. Gomert 1992. Nocardia and Nocardiosis. J. Med. Vet. Mycol. 30(suppl I):317-331
 - 39 Mahgoub ES, Murray IG. 1973: Mycetoma. London: Willian Hernemann 76-115
 40. Lopez Martinez R., Mendez Tovar L.J., Lavalle P. [Epidemiology of mycetoma in México:] Gac. Med. Mex. 1992. 128:477-481.
 41. Sandoval Trujillo, H. 1993. "Actinomicetus" Edit Universidad Autónoma Metropolitana pp 345-432.