LISTA DE FIGURAS Página

1.- Fotografía de un micetoma por *N. brasiliensis* en el cojinete plantar de un ratón BALB/c.....90

2.- Patrón electroforético del Extracto crudo de *N. brasiliensis* PAGE-SDS 10-18% 92

3.- Determinación de actividad enzimática del extracto crudo de *N. brasiliensis*.....93

4.- Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot) de proteínas de *N. brasiliensis* reveladas con suero de ratón con micetoma causado por *N. brasiliensis*. 94

5.-Determinación de Anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa por un método inmunoenzimático (ELISA) en suero de ratón inmunizado con antígenos de *N. brasiliensis* obtenido en el día 45. 97

6.- Inmunización activa con antígenos solubles de *N. brasiliensis* e infectados en el día 45.....99

7.- Inmunización activa con antígenos solubles de *N. brasiliensis* e infectados en el día 15.....100

8.- Inmunización activa con antígenos solubles de *N. brasiliensis* e infectados en el día 7.....101

9.- Inmunización activa con antígenos solubles de *N. brasiliensis* e infectados en el día 3.....102

10. Inmunización activa con antígenos particulados de *N. brasiliensis* e infectados en el día 45.....103

11. Inmunización activa con antígenos particulados de *N. brasiliensis* e infectados en el día 15.....104

12.- Inmunización activa con antígenos particulados de *N. brasiliensis* e

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 electroforeticamente en un gel 8-18% con SDS/2ME

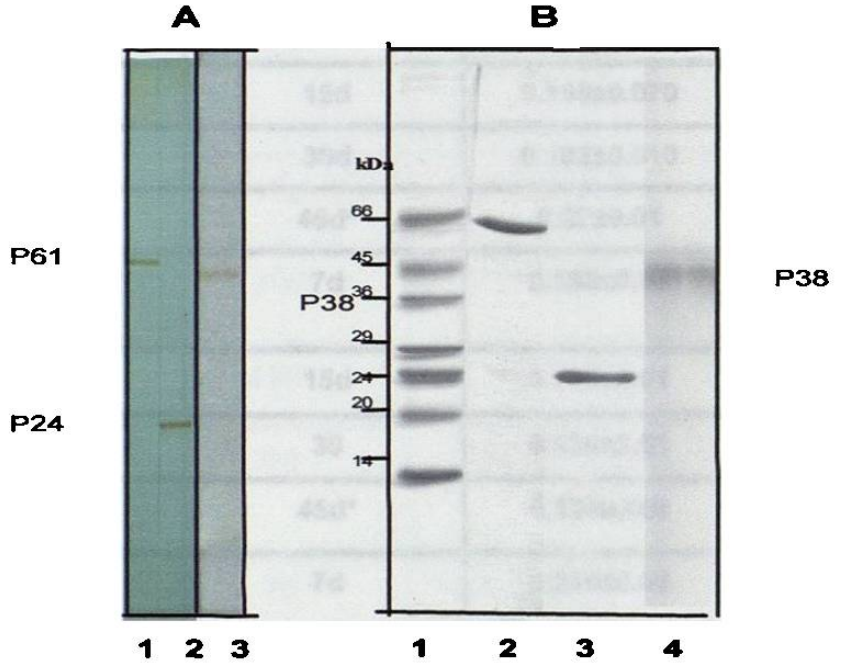

Figura 4: Lado A : Inmunoelectrotransferencia de suero De ratón con micetoma el reconoce a las proteínas purificadas de *N. brasiliensis*: Proteína P61(tira1), P24 (tira 2) y Proteasa o P38 (tira 3) **Lado B**.- Electroforesis en gel 8-18% con SDS de las proteínas purificadas de *N. brasiliensis*. En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

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

3.1.- Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra antigenos 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 especifico (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 antigenos de *N. brasiliensis*, los **mas inmunogénicos fueron los Antígenos particulados**

Acs anti-antígenos particulados		Antígeno especifico (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 antigenos 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)

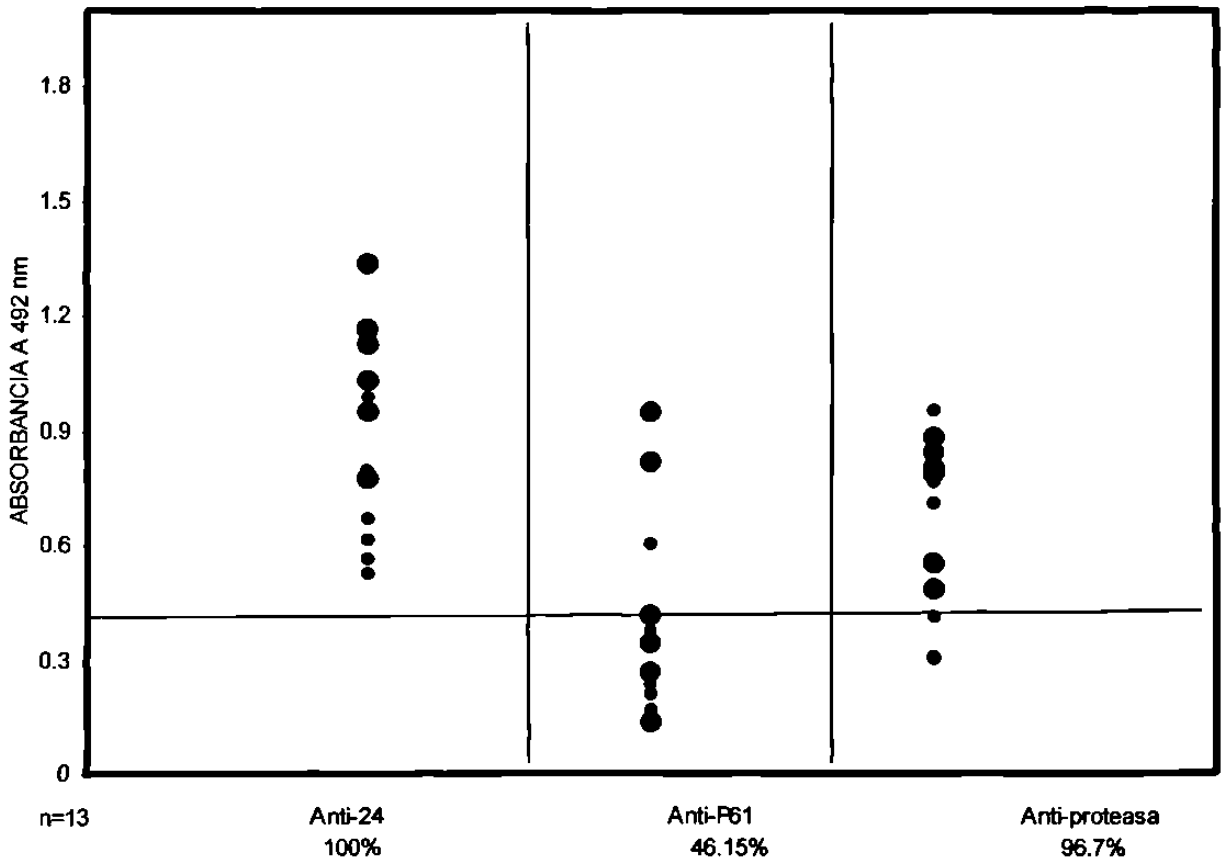

Figura 5.- Determinación de anticuerpos anti-P24, anti-P61 y anti-proteasa por el método de ELISA en ratones BALB/c inmunizados con antígenos solubles y sangrados en el dia 45 post-inmunización.

*** 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 dia 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 (dia 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)**

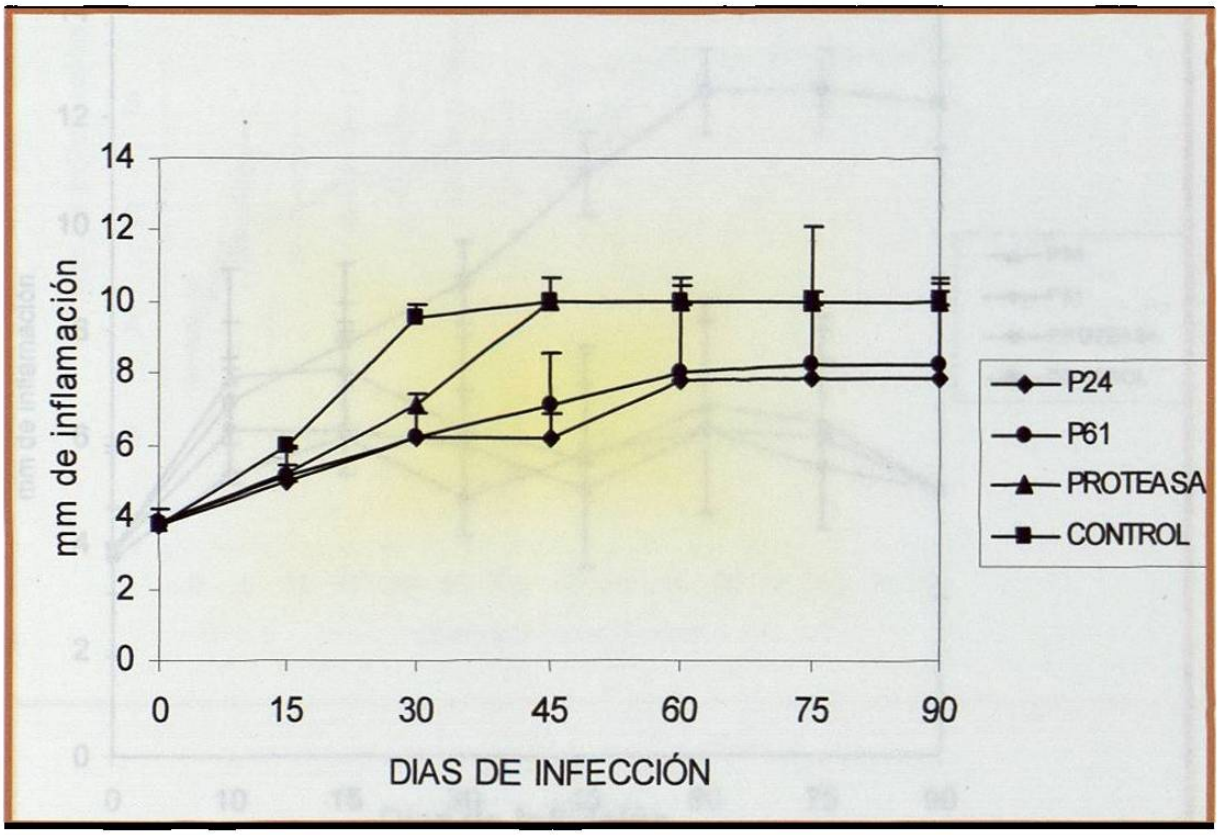

Figura 6.- Inmunización activa con los antigenos solubles (P24, P61 y proteasa de *N. brasiliensis* y en el día 45 post-inmunización los ratones se infectaron con *N. brasiliensis* viva

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**).

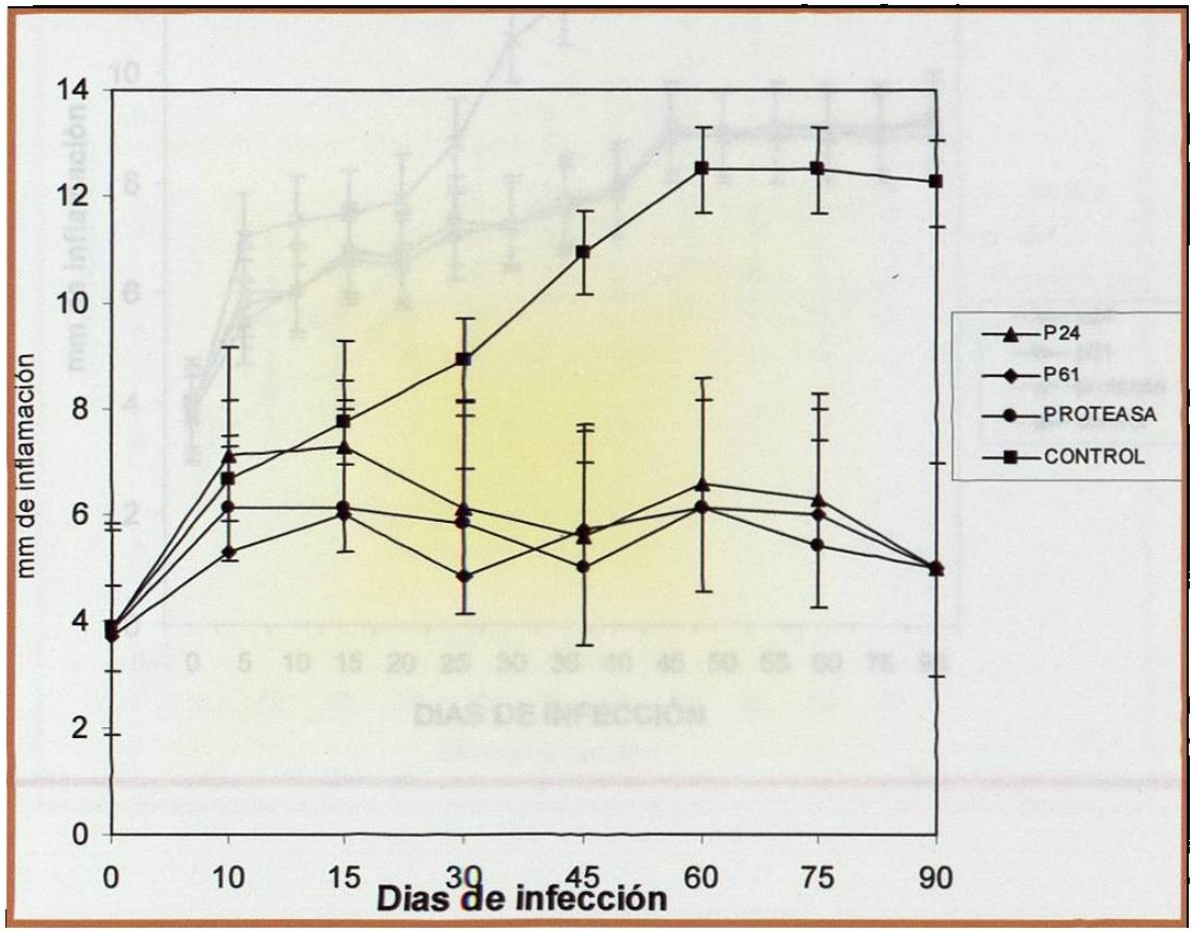

Figura 7.-Inmunización activa con **antígenos solubles** (P24, P61 y Proteasa) e infectados con *N. brasiliensis* en el **día 15** post-inmunización

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**)

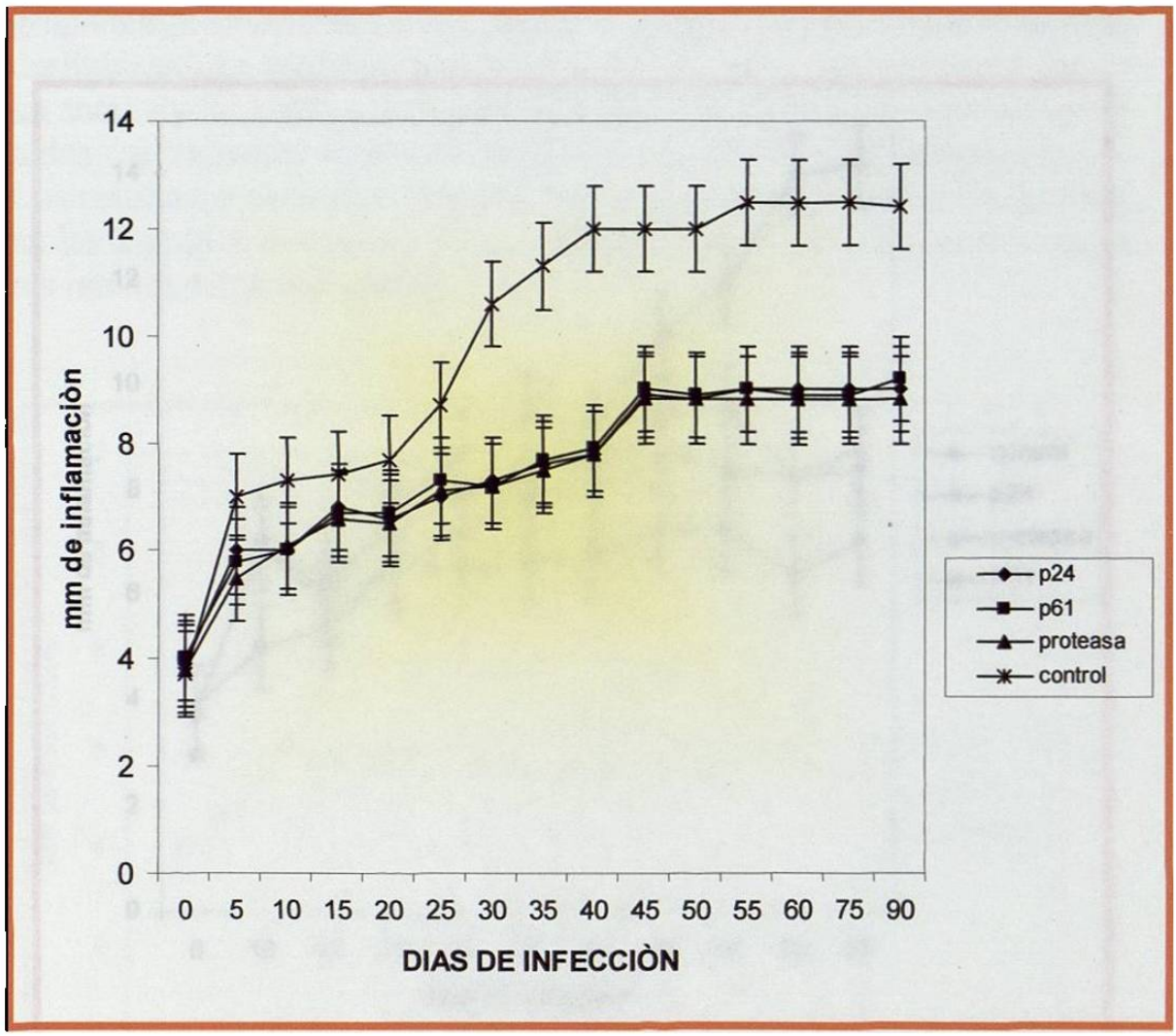

Figura 8.- Inmunización activa con **antígenos solubles** (proteasa) e infectados en el **día 7** post-inmunización con *N. brasiliensis*.

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 hubó protección ya que todos los animales desarrollaron el micetoma. **(Figura 9)**

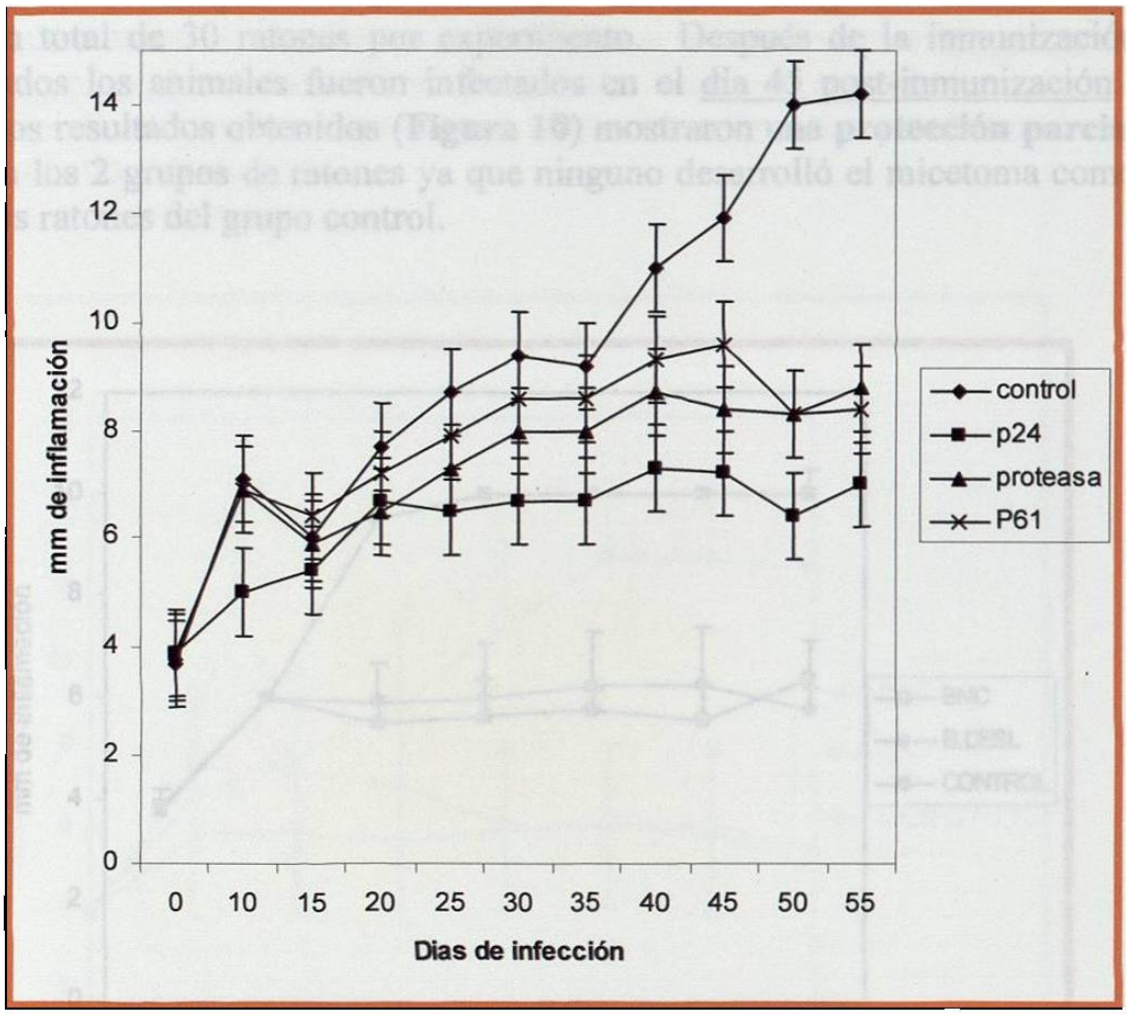

Figura 9.- Inmunización activa con **antígenos solubles** (P24, P61 y proteasa) e infectados con *N. brasiliensis* en el **día 3d** pos-tinmunización

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 dia 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.

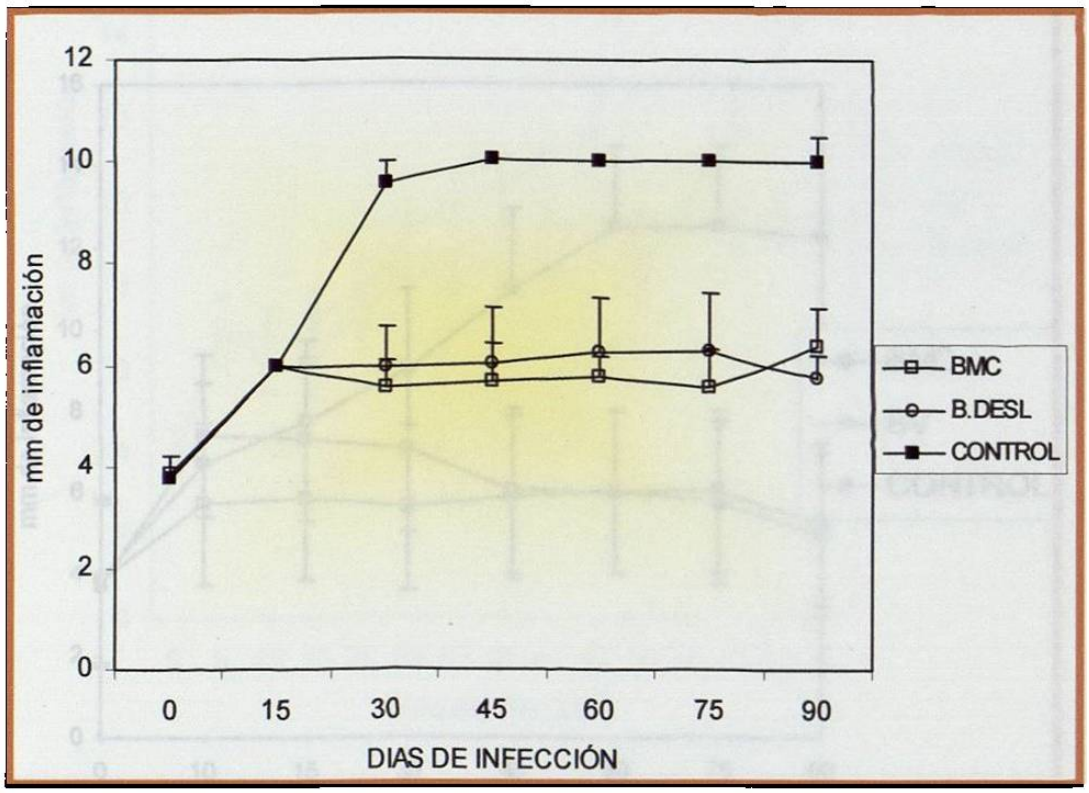

Figura 10.- Inmunización activa con **antígenos particulados** (bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas) e infectados con *N. brasiliensis* en el día **45**d postinmunización

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 dias) 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 dia 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.

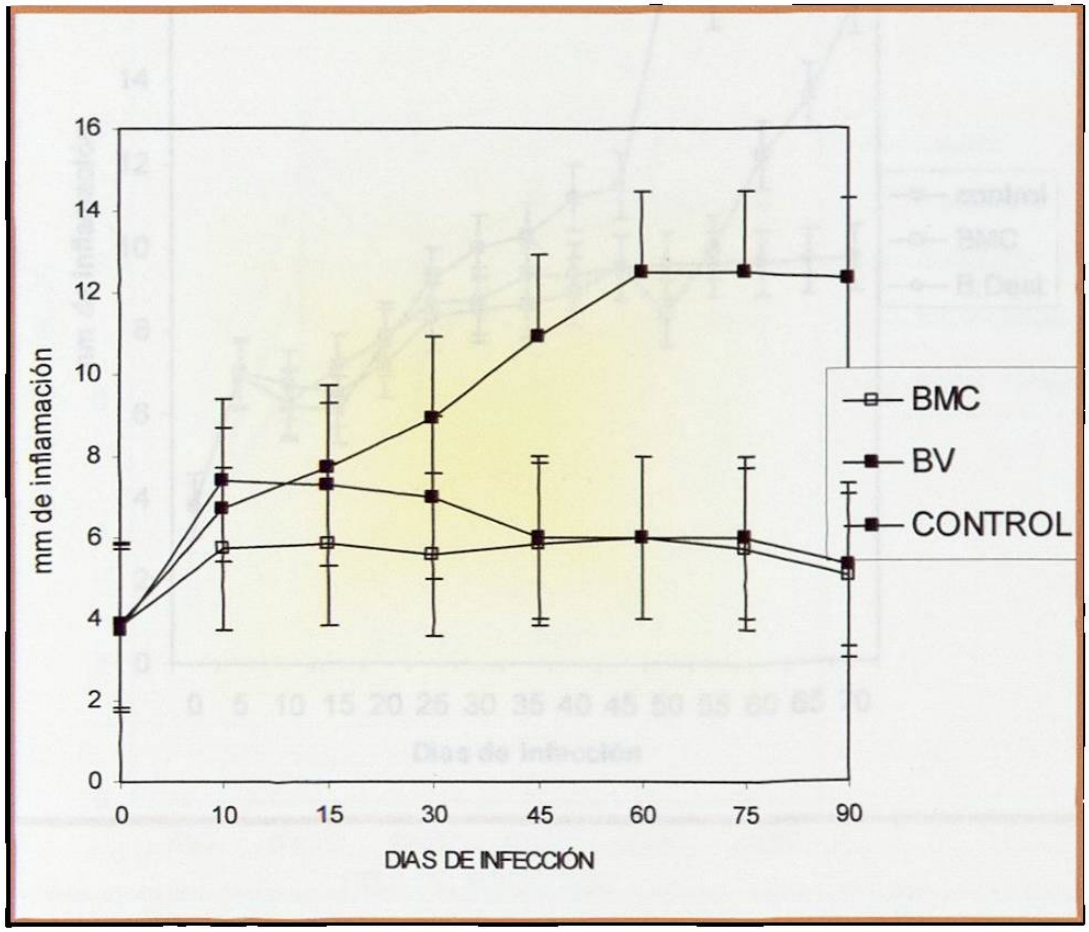

Figura 11.- Inmunización activa con **antígenos particulados** (bacterias muertas por calor y bacterias deslipidizadas) e infectados con *N. brasiliensis* en el **día 15** postinmunización

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 desarrollarón protección parcial, mientras que el otro grupo de ratones inmunizados con BMC todos los animales del grupo desarrollaron micetoma. **(Figura 12).**

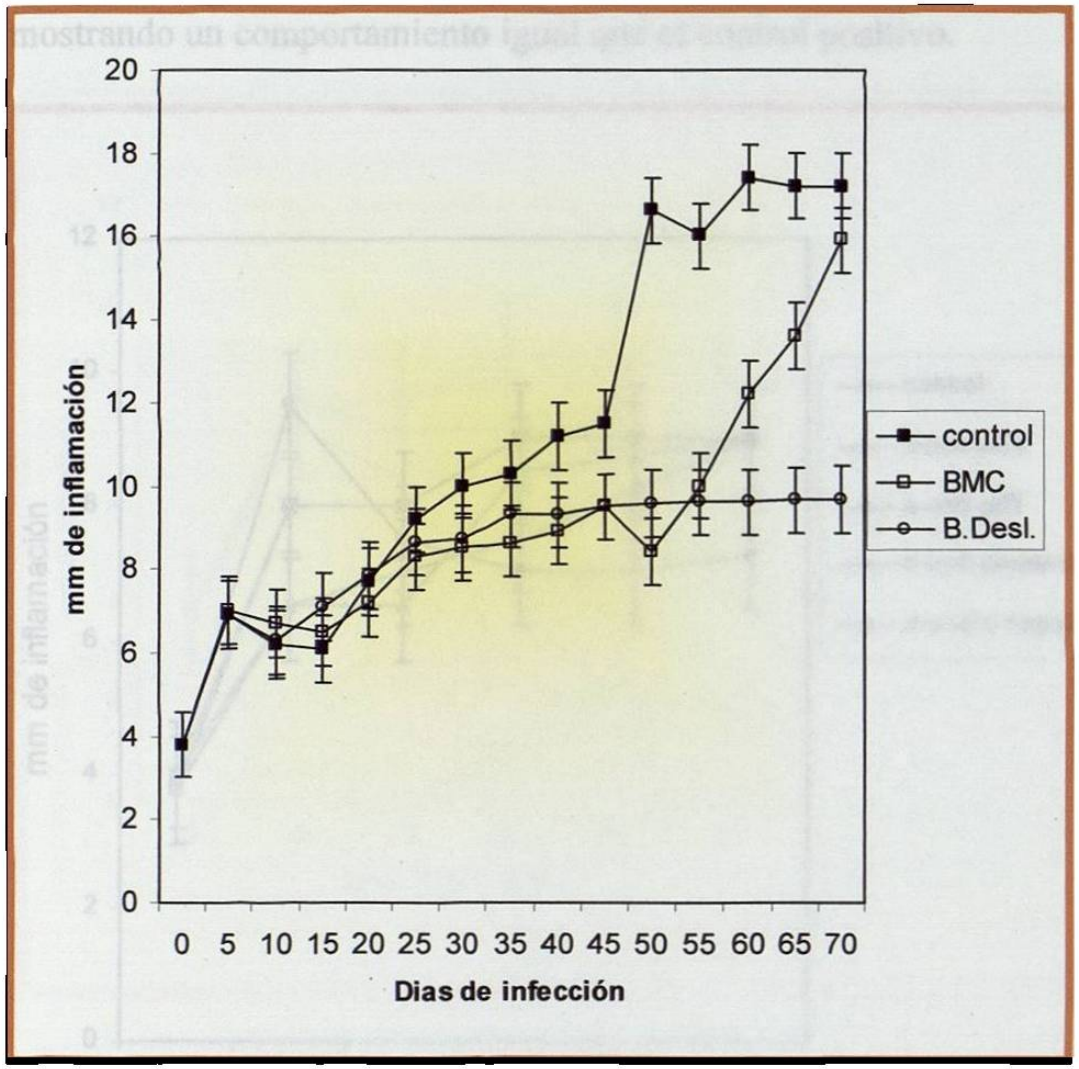

Figura 12.-Inmunización activa con actígenos particulados (BMC Y BD) de *N. brasiliensis* e infectados con *N. brasiliensis* en el **día 3 post-inmunización.**

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 dia 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 el resto de los grupos hacia el dia 50 todos habían desarrollaron micetoma mostrando un comportamiento igual que el control positivo.

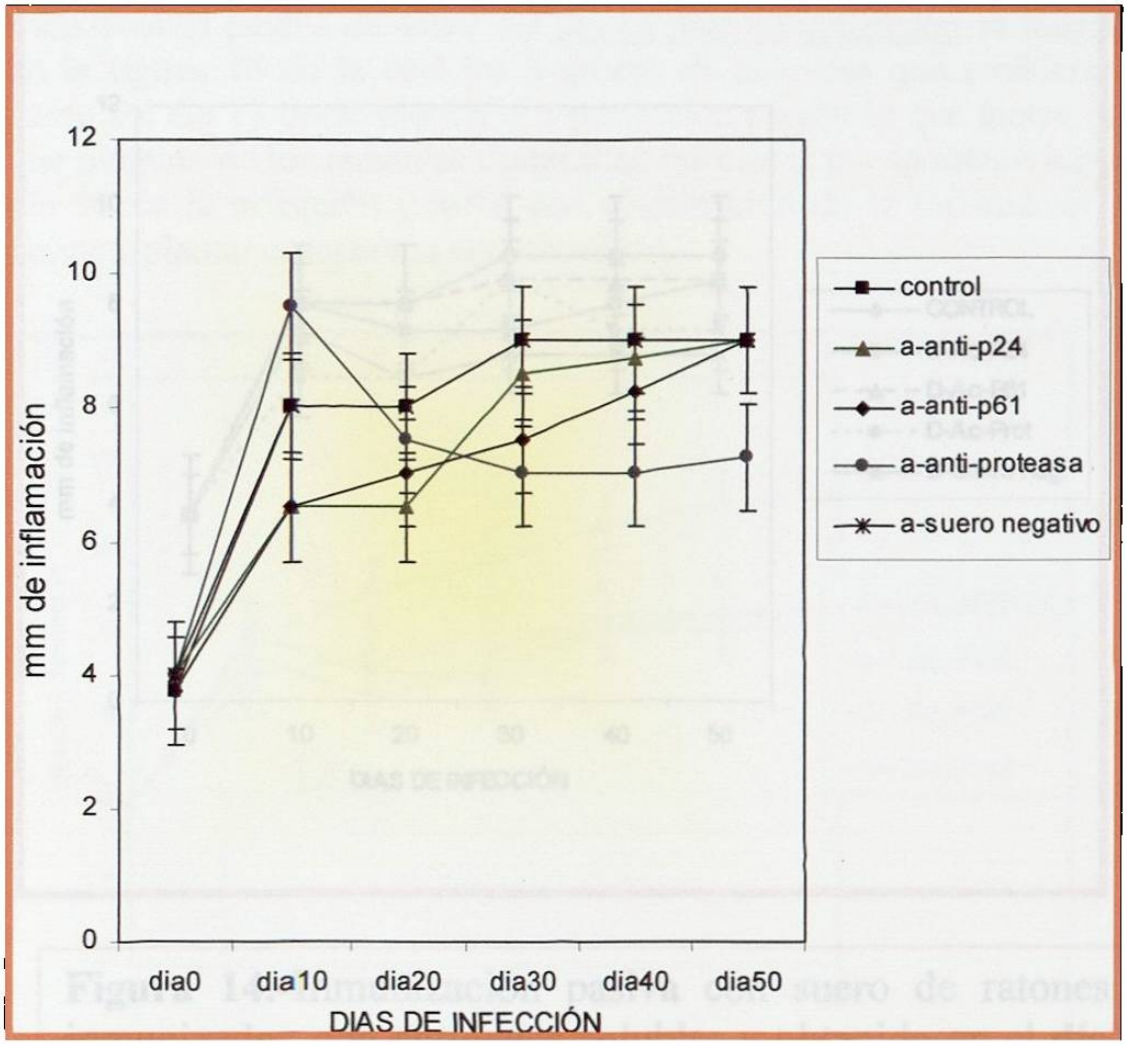

Figura 13.- Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenido en el **dia 45** y dado a ratones BALB/c **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

En cambio cuando los ratones de los grupos que recibieron los 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.

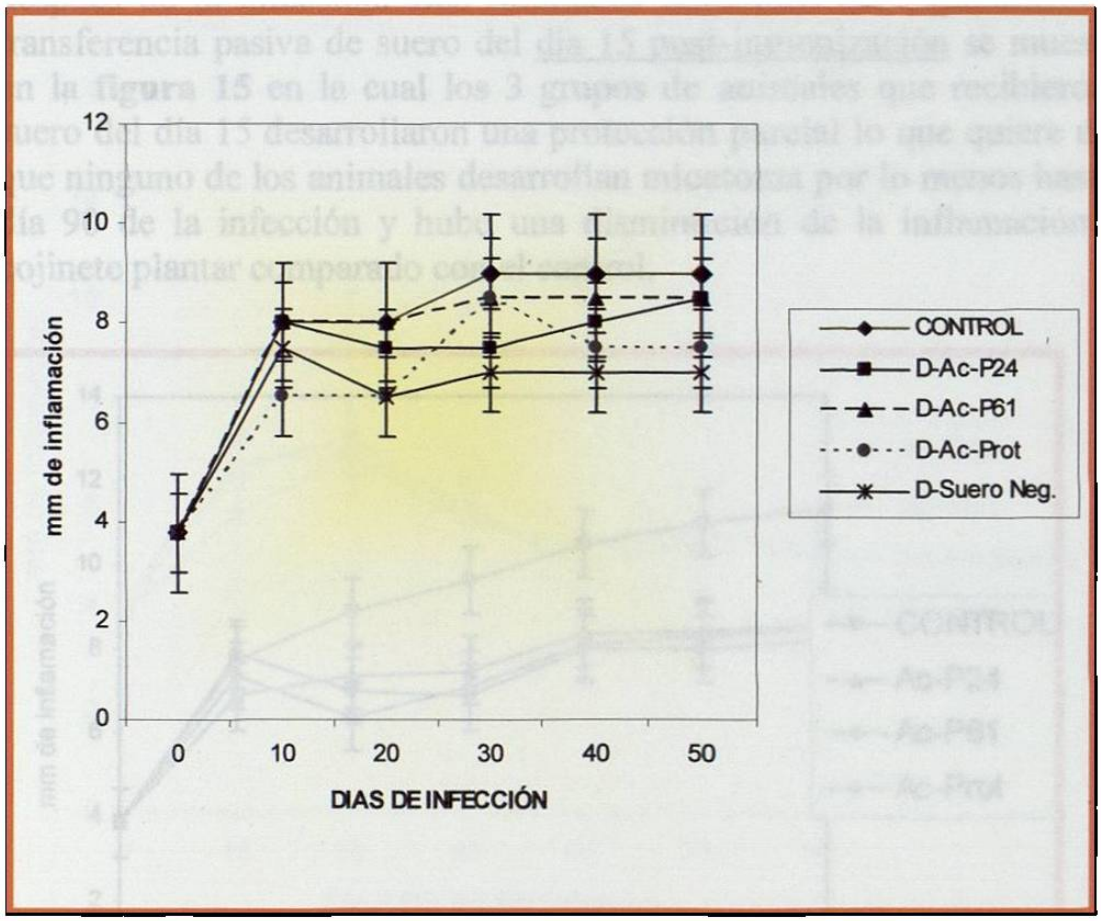

Figura 14.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles y obtenido en el **día 45** y dado a ratones BALB/c **después** de la infección con *N. brasiliensis*

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 hiperinmne 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.

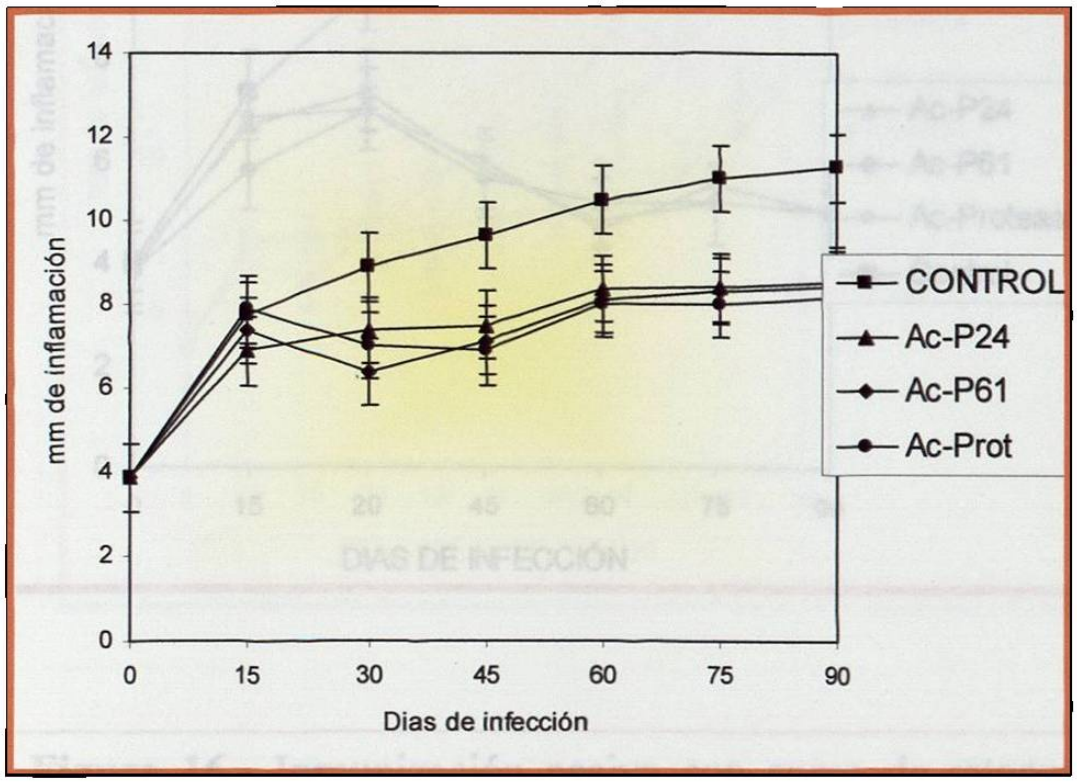

Figura 15.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles y obtenido en el **día 15** y dado a ratones BALB/c antes de la infección con *N. brasiliensis*

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.

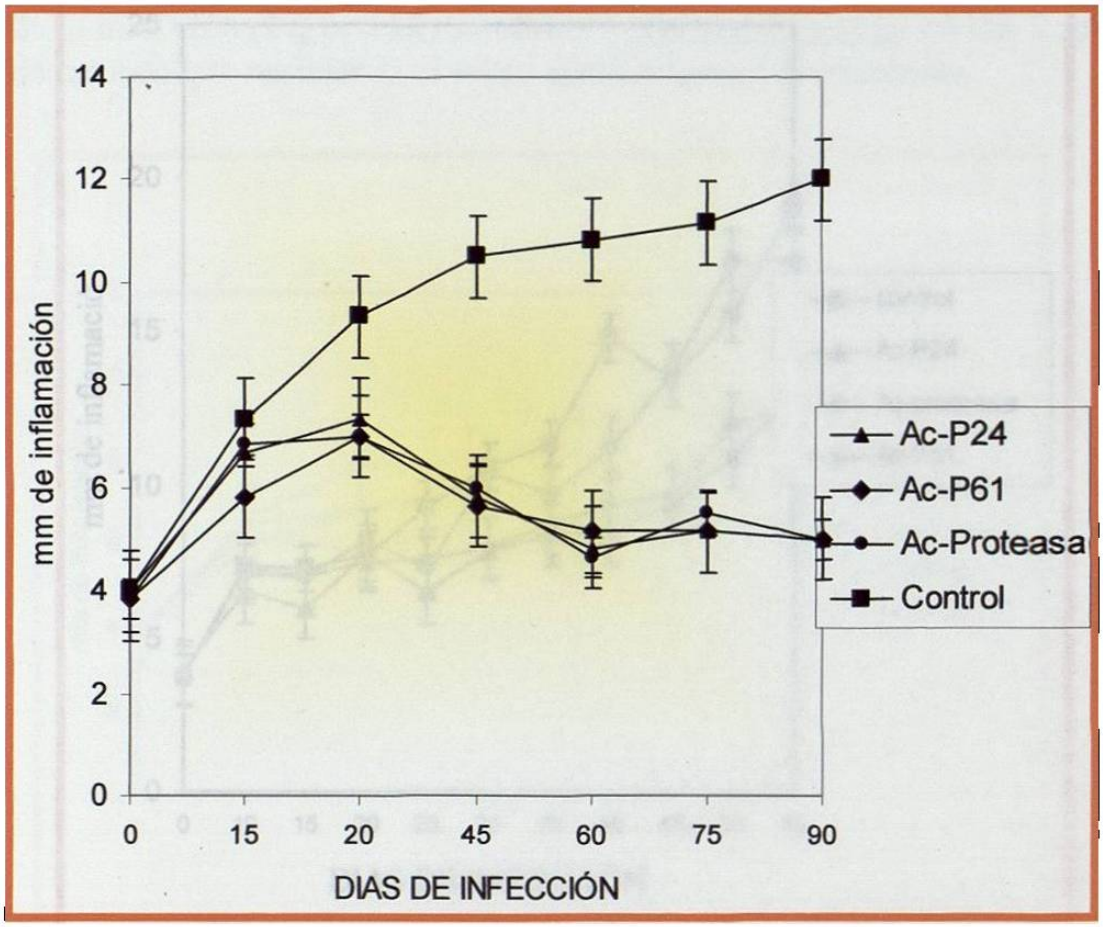

Figura 16.- Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles y obtenido en el **día 7** y dado a ratones BALB/c **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

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

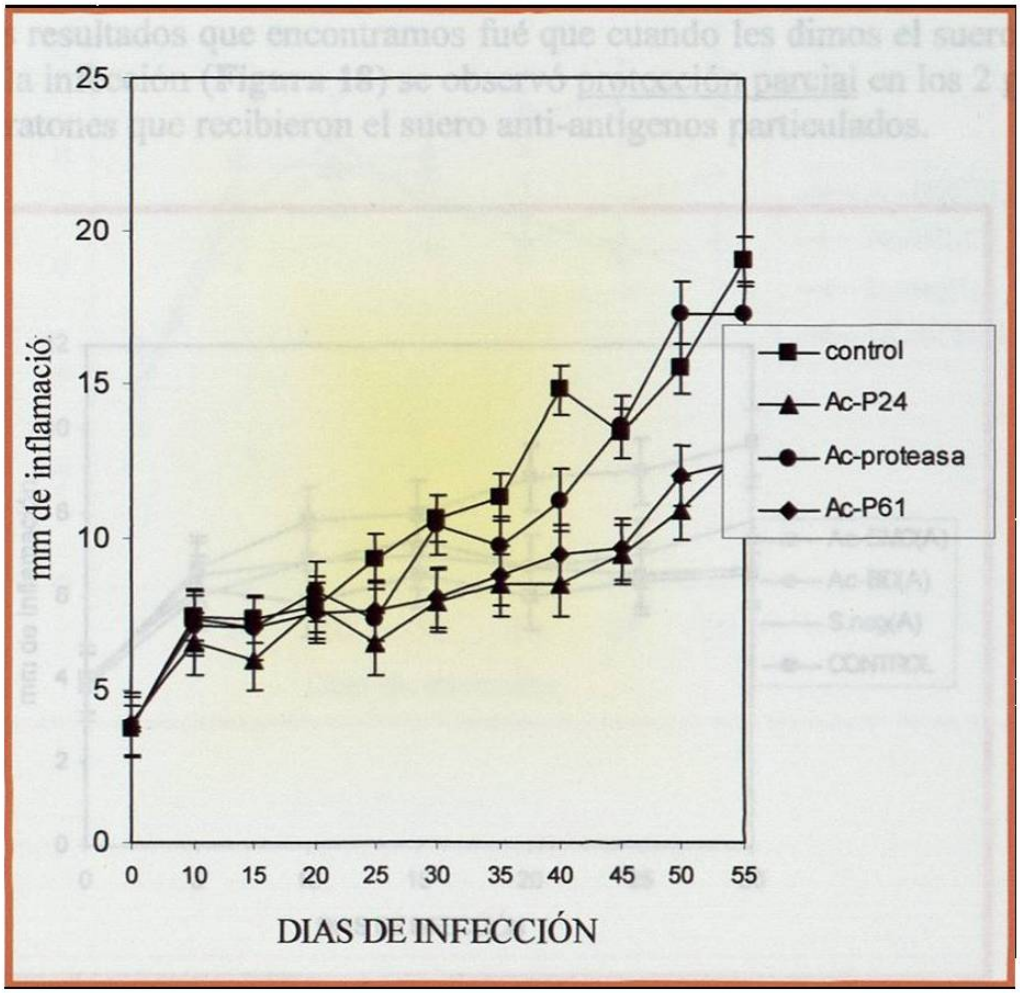

Figura 17.-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos solubles obtenido en el **día 3** y dado a ratones BALB/c **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

7.- Transferencia pasiva del suero hiperinmune contra antígenos particulados admisnistrados 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 (via 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.

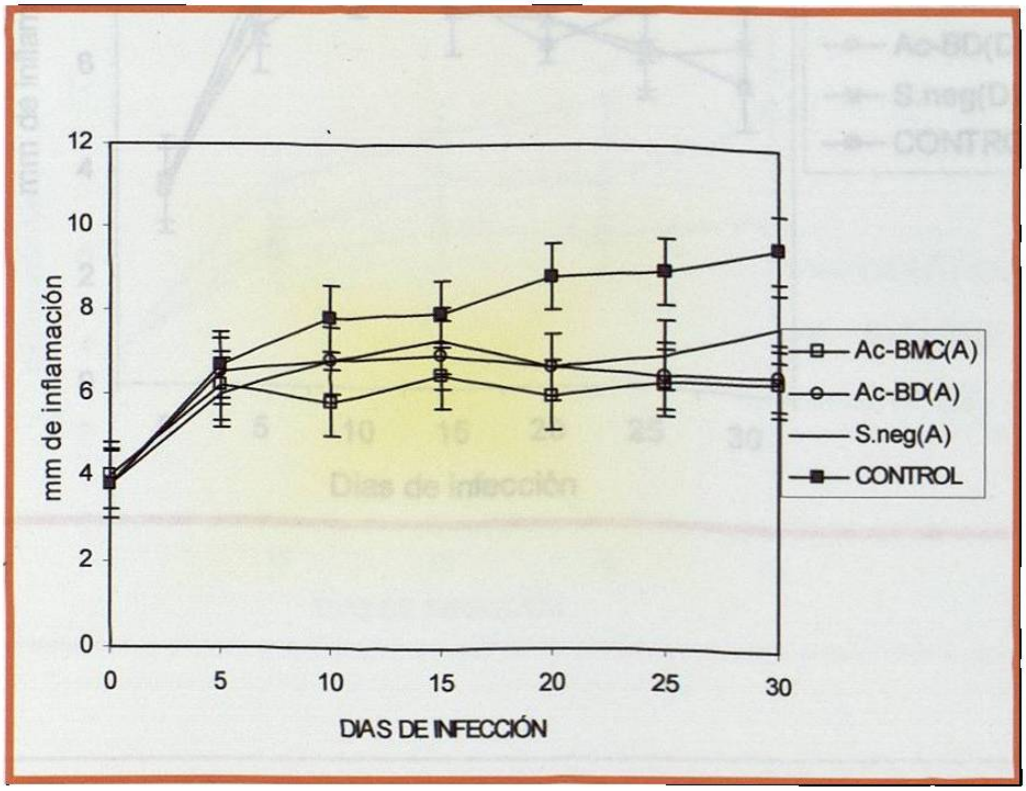

Figura 18 .-Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados obtenido en el **día 45** y dado a ratones BALB/c **antes** de la infección con *N. brasiliensis*

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**)

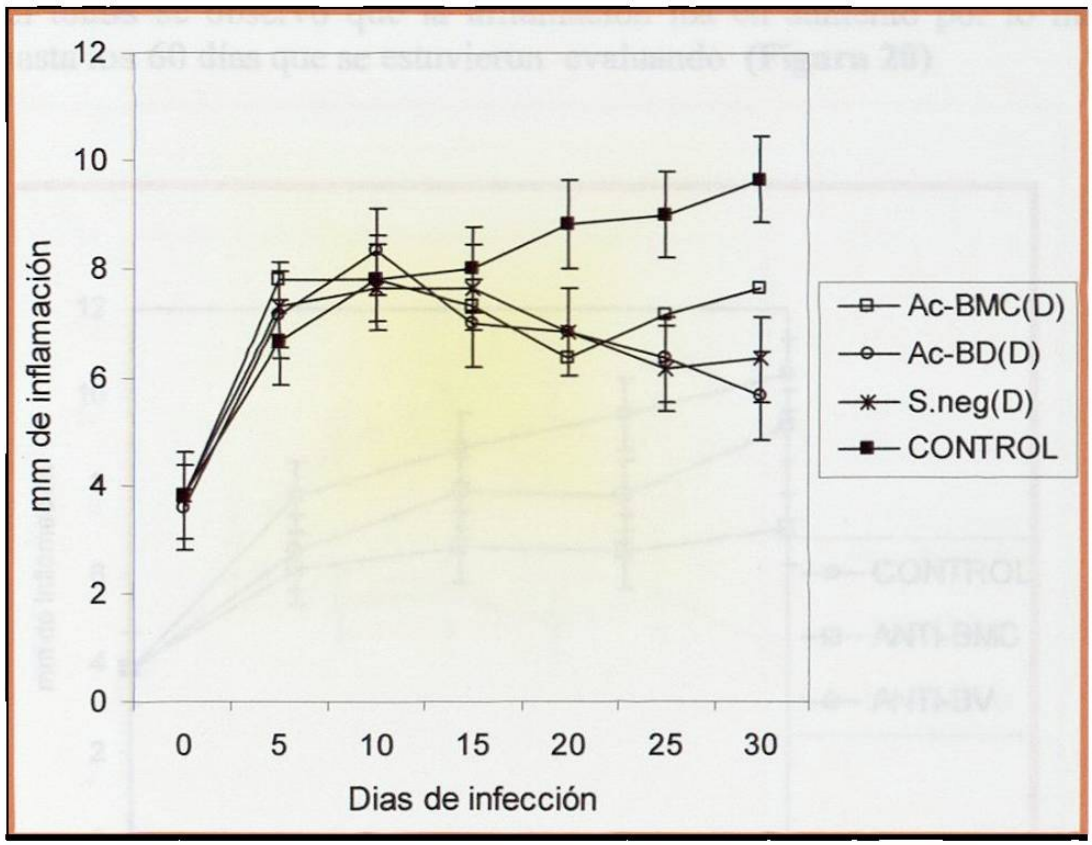

Figura 19.- Inmunización pasiva con suero de ratones inmunizados con antígenos particulados y obtenido en el **día 45** y dado a ratones BALB/c **después** de la infección con *N. brasiliensis*