

concuerdan con los obtenidos por Salinas y cols (111) en la que sueros hiperinmune 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 nosostros 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 proteinas en las cuales encontramos que P24 y proteasa fueron mas immunogénicas 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 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 este 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 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> 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 1<sup>a</sup> 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 interactua 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 esta 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 primer 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 este 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 infección 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 estén 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 boefs de la Guadeloupe le nom de forcin, Ann. Inst. Pasteur.
- 3.- Trevisan V.1889. Igneri 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 Rhodocous 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 menoquinone 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 it's 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 nora.*, 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. 2bl. 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. Editado por P.R. Murray, 6<sup>th</sup> ed ASM Press. Washington, D.C.
19. Welsh O.1991.Mycetoma current concepts intreatment. Int J. Dermatol. 30:387-398.
20. Welsh O., Salinas- Carmona M.C., Rodriguez M.A., in: Hoeprich 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., Locc 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. Toneda. 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 ultrastructurate within the Nocardia Zentralbl. Bakteriol.Mikrobiol. Hyg. 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. Mifuco 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. Viloria,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. Epidemiología 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.

42. Torres,-López, E. 2001. La actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en el micetoma experimental. Tesis doctoral.
43. Black, C. M., Palieschesckey M., Beaman B.L., Donovan R.M. and Goldstein E. 1986 Acidification of phagosomes in murine macrophages: Blockages by *Nocardia asteroides*. *L. Infect Dis* **154**:952-958.
44. Takeuchi, O., et al 1999: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negativa and gram-positiva cell wall components. *Immunity* **11**: 443-451
45. González-Ochoa, A., Shibayama H. Félix D.1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Excerpta Med Int Congr Ser* **55**:542-551.
46. Horwitz, M.A., Lee , B.W.E., Dillon B.J. 1995 Protective mmunity against tuberculosis induce by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* *Proc. Natl Acad Sci (USA)* **92**:1530-1534.
47. Beaman,B.L. and Maslan S. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infect Immun* **20**(1): 290-295
48. Beaman B.L. 1984. Actinomycete pathogenesis. pp 457-479

49. Davis S., C., and Beaman, B.L. 1980. Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: immunological enhanced of phagocytosis, phagosome-lysosomal fusion and microbicidal activity. *Infect. Immun* **30**:578-587
50. Burgeois L., and Beaman B.L. 1974. Probable L-forms of *Nocardia asteroides* induced in cultivated mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **9**:576-596.
51. Beaman B.L. 1982. Nocardiosis: role of the cell wall deficient state of *Nocardia*. p. 231-255
52. Beaman,B.L. 1984. The cell wall as a determinant of pathogenicity in *Nocardia* : the role of L-forms in pathogenesis p. 89-105
53. Beaman B.L. 1985 Ultrastructure of L-forms of *Nocardia asteroides*. *Microsc Electron Biol Cell*. P. 173-185
54. Beaman B.L., and Smathers 1976. Interaction of *Nocardia asteroides* with cultures rabbit alveolar macrophagos. *Infect Immun* **13**: 1126-1131
55. Splino M.V. Merka and F. Kintera 1995. Phagocytosis and intracellular of *Nocardia asteroides* in cell structures in vitro. I.- Alveolar macrophages of Guinea pigs. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg I.- Abt Orig. A.* **232**:334-341.

56. Beaman B.L., and B.L. Beaman 1984. The role of oxygen and its derivates in microbial pathogenesis in host defense. Annu Rev Microbiol **38**:27-48.
- 57 McDonough, K.A., Kress, K. and Bloom B.R. 1993. pathogenesis of tuberculosis; Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Infect Immunity **61**:2763-2773.
- 58 .Ladel, CH., Daugelat, S., Kaufmann SHE:1995. Imune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Güerin infection in major histocompatibility complex class I and II deficent knock-out mice: Contribution of CD4 and CD8 cells to acquired resistance. Eur J Immunol **25**:377-384.
59. Krick, J. A. And Remington J.S. 1978. Resistence to infection with *Nocardia asteroides*. J. Infect Dis. **132**: 665-672.
60. Melendro E.I., Contreras M.T., Ximenez, C.1978. Changes in host resistence caused by *Nocardia brasiliensis* in mice: Cross protection against *Listeria monocytogenes*. Int Archs Allergy Appl Immunol. **57**:74-81.
- 61 Folb. P., Jaffe R. And Altmann G. 1977 *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infection on mice. Infect Immun **13**:1490-1496.

62. Yamashiro S., Kamahara H., Wang J.M., Gots W.H. and Yoshim. 2001.T. Phenotypic and functional change of cytokine activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptiva immune response J. of Leukocyte Biology.**69**:698-704.
63. Conlan JW. North R.J. 1991: Neutrophils mediated dissolution of infected host cells as a defense Strategy against a facultative intracellular bacterium. J. Exp. Med. **174**:741-744.
64. Rogers H.W. Unanue ER.1973. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. Infect Immun. **61**:5090-5096.
65. Conlan J.W.and North RJ. 1992. Roles of *Listeria monocytoges* virulence factors in survival: virulence factors distinct from listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediaded host defense mecanism. Infect Immun **60**:951-957.
66. Gregory S.H., Sagnimeni A.J. and Wing F.J. 1996. Bacteria in the blood strem are trapped in the liver and killed by PMN gram (+) neutrophils. J. Immunol. **157**:2514
67. Filice, G.A., Beaman, B.L. and Krick, J.A. 1980. Effect of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*. Failure of

- killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J. Infect Dis.* **142**:432-438.
68. Simon HB., Sheagren J.N. 1971.: Cellular Immunity in vitro T-Immunologically mediated enhancement of macrophage bactericidal capacity. *J. Exp. Med.* **133**:1377-1389.
69. Conlan JW, Dunn PL., North RJ 1993: Leucocyte mediated lysis of infected hepatocytes during listeriosis occurs in mice depleted of NK cells or CD4+ CD8+ thy 1.2 Tcells. *Infect Immun* **61**:2703-2707.
70. Czuprynski CJ, Brown, Maroushek J.F., Wagner W. And Steinbergh R.D.1994: Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol* **152**:1836-1846
71. Verdrengh,M., and Tarkowski A. 1997. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureous*. *Infect Immun.* **65**:2512
72. Lowrance J., Sullivan F.O., Caver T.,Waegell W. and Gresham H. 1994. Spontaneous elaboration of transforming growth factor B suppresses host defense against bacterial infection in autoimmune MRL/lpr mice. *J. Exp.Med.* **180**:1693

73. Conlan J.W. 1997. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infection of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 65:630
74. Beaman, B.L., Black,C.M., and Beaman, L. 1985. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*. *Infect Immun.* 47:135-141
75. Yoshimura A., Lien E., Ingalls R.R., Tuomanen E., Dziarski R. and Golenbock D. 1999. *J. of Immunol* 163:1-5
76. Michelsen K.S., Doherty T.M., Shah P.K. and Ardite M. 2004. TLR Signaling: An emerging bridge from Innate Immunity to atherogenesis. *J. of Immunol.* 173:5901-5907.
77. Akira, S. 2003. Toll-like receptor signaling. *J. Biol Chem.* 278:38105
78. Muzio M. Et al. 1998. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappa B and JNF/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor associated factor 6(TRAF6). *J. Exp Med* 187:2097-2101
79. Wooten R.M., Ma Y., Yoder R.A., Brown J.P., Wers J.H., Zachary J.F., Kirschning C.J. and Wers J.J. 2002. Toll-like receptor 2 is

required for innate but not Acquired, Host defense to *Borrelia burgdorferi*. The Journal of Immunology. 202;168:348-355

80. Dunn P.L. North R.J.1991 Early gamma interferon production by natural killer is important in defense against murine listeriosis. Infect Immun 59:2892-2900.
81. Bancroft G.J.1993 The role of natural killer cells in innate resistance to infection. Curr Opin Immunol 5:503-510.
82. Czuprynski C.J., Brown J.F. Maroushek N. Wagner R.D. Steinberg H.1994. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *L. monocytogenes* infection. J. Immunol 152:1836-1846.
83. Dunn P.L.,North R.J. 1991. Resolution of primary murine listeriosis and acquired resistance to lethal secondary infection can be mediated predominantly by Thy-1+ CD4 CD8 cells. J. Infect Dis 164:869-877.
84. Martin, F., and J.F. Kearney. 2001 B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin Immunol.* 13:195
85. Herzenberg L.A. 2000.B-1 cells:The lineage question revisited. Immunol Rev. 175:9.
86. Alugupalli K.R., Gerstein R.M., Chen J., Szomolanyi-Tsuda E., Woodland R.T. and Leong J.M. 2003. The resolution of relapsing

- fever borreliosis IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *J. of Immunol* **170**:3819-3827.
87. Kaufman S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**:129-163.
88. Deem R.L., Beaman B.L. and Gershwin 1982 . Adaptive transfer of Immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect Immun* **38**:914-920.
89. Deem , R.L., Doughty F.A. and Beaman B.L.1983. Immunologically specific direct T lymphocyte-mediated killing of *Nocardia asteroides* *J. Immunol* **130**:2401-2406.
90. Beaman B.L. and Scates S.M. 1981. Role L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetoma in normal and immunodeficient murin models. *Infect Immun* **33**:893-907.
91. Beaman L.V., Beaman B.L. 1990. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *N. asteroides* within the intact host. *Infect Immunity* **58**:3122-3128.
92. Beaman, B.L. and Maslan 1978. Virulence of *Nocardia asteroide* during its growth cycle . *Infect Immun* **20**:290-295.

93. Beaman, B.L. Gershwin M.E. Ahmed A. Scates S.M. and Deem R. 1982. Response of CBA/N X DBA2/F1 mice to *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* **35**:111-116.
94. Rico G., Ochoa R., Oliva A. González-Mendoza, Walker S.M. Ortiz -Ortiz, L. 1982 Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infectionin mice depleted of antigen-specific B cells. *J. Immunol* **129**:1688-1693.
95. Ochsenbein A.F., Fehr T., Lutz C., Suter M., Brombacher F., Hengartner H. and Zinkernagel R.M. 1999. Control of Early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**:2156-2159.
96. Ortiz-Ortiz L., Melendro E.I. and Conde C. 1984. Host-parasite relationship in infections due to *Nocardia brasiliensis* p 119-133.
97. Coutinho A., Kazatchkine M.D. and Avrameas S. 1995 Natural autoantibodies. *Curr Opin. Immunol* **7**:812-818.
98. 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.

99. Conde C., Mancilla R., Fresán M., Ortiz-Ortiz. 1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immunity* **40**:1218-1222.
100. Mc Neil M.M., Brown J.M. 1994. The medical important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **3**:357-417.
- 101.- Scott P., Natovitz P., Coffman R.L. Pearce E., Sher A. 1988 Immunoregulation of cutaneos leishmaniasis T cell lines that transfer protective Immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp. Med* **168**:1675-1684.
102. Kauffmann SHE. 1993 Tuberculosis:The role of Immune response. *Immunologist* **1**:109-114.
103. Rollenhagen C., Sørensen M., Rizos K., Hurvitz R. and Bumann D. 2004 Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine devepment for an intracellular pathogen. *PNAS* **24**:8739-8744.
104. Blander S.J., Horwitz M.G. 1989. Vaccination with the major secretory protein of *Legionella pnemophila* induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J.Exp. Med.* **169**:691-705.

105. Blander S.J., Horwitz M.A. 1991. Vaccination with the major secretory protein of *Legionella* induces humoral and cell-mediated immune responses and protective immunity across different serogroups of *Legionella pneumophila* and different species of *Legionella*. *J.Immunol* **147**:285-291.
106. Tavares D., Ferreira P. and Araña-Chaves M. 2003. Increased resistance in BALB/c mice to reinfection with *Candida albicans* is due to immunoneutralization of a virulence-associated immunomodulatory protein. *Microbiology* **149**:333-339.
107. Salinas-Carmona, M.C. Vera L., Welsh O. and Rodríguez, M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* in man. *ZBL Backt* **276**:390-397.
108. 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.
109. Salinas-Carmona M.C., Torres-López E., Ramos A.I., Licón-Trillo A., Gonzalez-Spencer D. 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **67**:2428-2432.

110. 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.
111. 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.
112. Licón-Trillo A., Castro-Corona M.A. and Salinas-Carmona M.C. 2003. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease envolved in patogénesis of mycetoma. FEMS Immunology and Medical Microbiology 37:37-44.
113. Salinas-Carmona, M.C., Welsh O. and Casillas, S.M. 1993. Enzime-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. J. Clin Microbiol. 31:2901-2903.
114. Zinsser Microbiología 20º edición . Ed. Panamericana Pp 91-92
115. Brook. Biología de los microorganismos. Octava edición 1999. De Prentice may. Pp 155-157.
116. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle ofprotein-dye binding. Anual. Biochem 72:248-254.

117. Laemmli, V.K. 1970.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
118. Pérez-Montfort R., Ostos-Saloma P., Velazquez Medina L., Montfort I., Becker I. 1987 Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**:87-98.
119. Salinas-Carmona, Pérez-Rivera L.I., Welsh, O. Rodríguez, M. and Rinaldi, M.G. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol Med* **2**:183-188.
120. Rivas Morales C. Tesis doctoral. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasas caseinolíticas.
121. Manual of Flow Cytometry. Becton Dickinson 1994.
122. Ramos-Cano A.I. Tesis Doctoral. Efecto de la concentración y del estado físico de antígenos de *Nocardia brasiliensis* en las respuestas humorales y celulares contra una fracción inmunodominante en ratones BALB/c.
123. Salinas-Carmona, M.C., E. Torres and A. Revol. 2003. Experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* in different mouse strains. *J. Mycol Med.* **13**:163-167.
124. Battegan, M., Moskophidis D., Waldner H., Bründler M.A., Fungng-Leung, W.P., Mak T.W., Hengartner H. and Zinkernagel R.M.

1993. Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by viruses specific cytotoxic T cells . J.Immunol **151**:5408-5415.
125. S  ller P., Kalinke U., R  licke T., Bucher E., Böse Ch. Zinkernagel R.M. and Hengartner H. 1998. Enhanced Virus Clearance by early inducible lymphocytic choriomeningitis virus-neutralizing antibodies in immunoglobulin-transgenic mice. J. of Virology **72**:2253-2258.
126. Viau M and Zouali M. 2005. B-lymphocytes, innate immunity and autoimmunity. Clinical Immunology **114**:17-26.
127. Askense P.W., et al. 2004. Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha 14(+) NKT cells and B1B cells. Trends Immunol **25**:441-449.
128. Oliver A.M., Martin F., Kearny J.F. 1999. IgM high CD21 high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. J. Immunol **162**:7198-7207.
129. Kushnir N., Bos N., Zuercher A:W., Coffin S.E., Moser Ch. A., Offit P.A. and Cebra J.J. 2001. B2 but not B1 cells can contribute to CD4+ T-cell mediated clearance of rotavirus in SCID mice. J. of Virology **75**:5482-5490.

130. Wortis H.H. and Berland R. 2001. Cutting edge commentary:origins of B-1 cells. *J. Immunol* **166**:2163-2166.
131. Smith D.W. 1985. Protective efect of BCG in experimental tuberculosis. *Adv. Tuberc Res.* **22**:1-97.
132. Raun, P. Boesn, H., Pederson B.K. and Andersen, P.1997. Human T cell responses induced by vaccination with *M. bovis* bacillus Calmette-Güerin. *J. Immunol* **55**:1949-1955.
133. Fine PE. 1995. Variation in protection by BCG: Implications of and for heterologous immunity. *Lancet* **346**:1339-1345.

## **APÉNDICE**

### **1.-Reactivos de Bradford.**

6 mg de azul de Coomassie G-250 (Sigma) se disolvieron en 100 ml de ácido perclórico (Merck) al 3% v/v en agua. Se filtró y se guardó en frasco ámbar.

### **2.- PBS 0.1 m pH 7.2-7.4.**

NaCl 8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.22 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, KCL 0.2 g (Merck) se disolvieron y se ajustó el pH a 7.2-7.4 y se aforó a 1 litro con agua b-destilada.

### **3.-Reactivos para la electroforesis.**

#### **3.1 Amortiguador para preparar el gel de empaquetamiento.**

Tris-HCl 1.2M pH 6.8

#### **3.2 Amortiguador para preparar el gel de corrimiento o separación**

Tris-HCL 3.02M pH 8.8

#### **3.3 Amortiguador de corrimiento.**

Glicina 192mM, Trizma Base 25 mM, SDS 0.1% p/v pH 8.3

#### **3.4 Amortiguador de la muestra 4X**

En 17.5 ml de Tris-OH 49mM, pH 6.8 se disolvieron 1 g de SDS y 5mg de azul de bromo-fenol, se mezcló con 5 ml de glicerol y se aforó a 50 ml de agua. Al momento de usarse se agregó 5% v/v de 2-mercuento-etanol.

### **3.5.- Acrilamida/Bisacrilamida 30% (acrilamida 30%T,2.7%C)**

29.2 g de acrilamida y 0.8 g de mutilen-bis-acrilamida fueron mezclados con 70 l de agua en un matraz erlenmeyer (cubierto con papel aluminio) sometidos a agitación suave por 12 hrs a 4°C. Una vez a temperatura ambiente se aforó a 100 ml con agua bidestilada y se filtro con papel Whatman y se mezcló con amberlita XAD7 en una proporción 4:1 v/v dejandose en agitación suave durante 1 hora a 4°C. Se filtró, recuperandose en un frasco cubierto con papel aluminio y se almacenó a 4°C.

### **3.6 Gel de empaquetamiento o concentrador (5%T, 2.7%C) con SDS**

acrilamida-bisacrilamida 30% (30%T,2.7%C).....0.350ml

Amortiguador Tris-HCL pH 6.8.....0.700ml

Agua.....0.600ml

SDS 10%.....0.01 ml

Persulfato de amonio 10% .....0.035 ml

TEMED.....0.001 ml

### **3.7 Gel de Corrimiento o de Separación (8-18%) 10% 18%**

Acrilamida-bisacrilamida 30%.....0.720 ml 1.29ml

Amortiguador Tris-HCl pH 8.8 .....0.396 ml 0.396 ml

Glicerol.....0.144 ml 0.222 ml

Agua.....0.874 ml 0.219 ml

**Persulfato de amonio 10%..... 0.007 ml 0.007 ml**

**TEMED..... 0.001 ml 0.001 ml**



