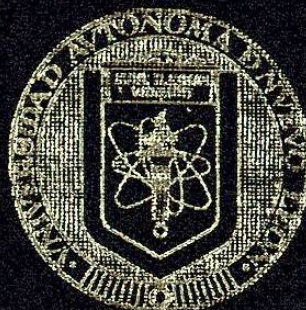


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



"IDENTIFICACION DE ANTIGENOS  
INMUNODOMINANTES HUMORALES Y CELULARES  
DE FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis*"

Por

M.C.P. MONICA ALEJANDRA MORCOS GONZALEZ

Director de tesis: Dr. med. Oliverio Welsh Lozano

Co-directores de tesis: Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera

Dr. Sc. Mario C. Salinas Carrizosa

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN MEDICINA

Julio 2004

TD  
Z 6 6 5 8  
FM  
2 0 0 4  
. M 6 7

W.C.P. MONICA ALBANDORA MORCCOS GOONZALIZ



1020150074

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



"IDENTIFICACION DE ANTIGENOS  
INMUNODOMINANTES HUMORALES Y CELULARES  
DE FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis*"

Por

M.C.P. MONICA ALEJANDRA MORCOS GONZALEZ

Director de tesis: Dr. med. Oliverio Welsh Lozano  
Co-directores de tesis: Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera  
Dr. Sc. Mario C. Salinas Carmona

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN MEDICINA

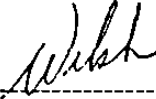
Julio 2004



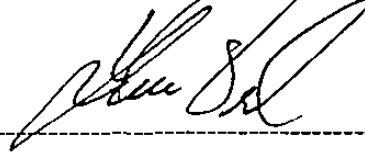
FONDO  
TESIS

IDENTIFICACION DE ANTIGENOS INMUNODOMINANTES  
HUMORALES Y CELULARES DE FILTRADO DE  
CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis*

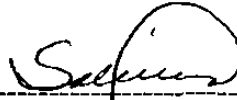
Aprobación de tesis:



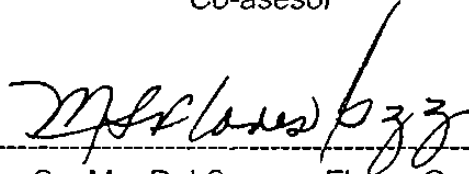
Dr. med. Oliverio Welsh Lozano  
Asesor Doctoral



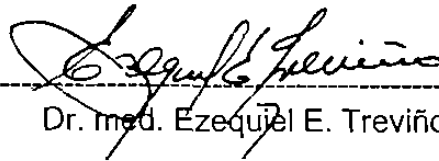
Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera  
Co-asesor



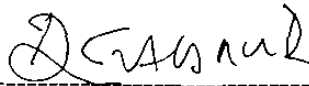
Dr. Sc. Mario Cesar Sálinas Carmona  
Co-asesor



Dra. Sc. Ma. Del Socorro Flores González



Dr. med. Ezequiel E. Treviño Cavazos

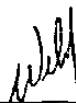


Dr. Dionicio A. Galarza Delgado  
Subdirector de Investigación y Estudios de Post-grado


**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES  
HUMORALES Y CELULARES DE FILTRADO DE  
CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis***

PRESENTADO POR: MCP Mónica A. Morcos González

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León., bajo la asesoría del Dr. Oliverio Welsh Lozano y la co-asesoría del Dr. Lucio Vera Cabrera y el Dr. Mario César Salinas Carmona.



Dr. med. Oliverio Welsh Lozano

  
Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera

Dr. Sc. Mario César Salinas Carmona

## DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar a este momento.

A mis padres Guillermo A. Morcos Flores y Ma. Guadalupe González de Morcos por tener la visión de darme lo mejor, el estudiar una carrera y apoyarme en mi especialidad y ahora terminar un doctorado. Gracias por todo su esfuerzo y amor.

A mi esposo Alejandro C. Rodríguez Pérez por ser mi apoyo incondicional siempre, por todos los momentos que hemos compartidos juntos.

A mis hijos Montserrat y Alejandrino que son lo más grande que me ha dado Dios y al ser que llevo dentro de mí, que dará una mayor alegría a nuestras vidas y al cual estamos esperando con tanto amor.

A mis hermanos Memo, Gaby, David y Faruck por ser una parte muy importante en el desarrollo de mi vida.



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por todas las cosas maravillosas que me ha dado a lo largo de mi vida.

A mis maestros el Dr. Oliverio Welsh L y Dr. Lucio Vera-Cabrera, agradezco todo el tiempo, paciencia y voluntad que me han dedicado a lo largo de estos últimos años y por haber depositado en mí su confianza para este proyecto.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su gran interés y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ma. Del Socorro Flores González y al Dr. Ezequiel E. Treviño Cavazos por su colaboración y evaluación de este trabajo.

A mis maestros el Dr. Juventino González, Dr. Jorge Ocampo C, Dra. Minerva Gómez F, Dr. Gildardo Jaramillo, y Dr. Sergio González por su apoyo en este trabajo y por el ejemplo que son para mí.

A la Dra. Angeles Castro Corona por su amistad y gran ayuda desinteresada en la realización de este trabajo.

A Adriana Pizaña, Wendy Escalante, Conchita y Eva por su amistad, compañerismo y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A mi padre por ser un ejemplo para mí, el cual me ha enseñado a ser una mujer honesta, trabajadora, leal y disciplinada.

A mi madre por ser una mujer que siempre me ha impulsado en todas las metas que me he propuesto, por darme siempre su amor incondicional.

A mi esposo Alejandro por amarme y apoyarme en todo momento, por siempre pensar en mí y estar a mi lado.

A mi muñequita Montserrat y a mi bebe Alejandrino que amo con todo mi corazón y que día a día me hacen ser una mejor persona.

A Luz Marcela Vidaurri S. por su gran amistad y apoyo durante la residencia.

A mis suegros Jaime Rodríguez G y Conchita P. de Rodríguez por el apoyo recibido para lograr este objetivo.

A mis amigos, compañeros y maestros que durante la residencia me brindaron su apoyo.

## INDICE GENERAL

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
2.1 Material biológico.....	11
2.2 Microorganismos.....	11
2.3 Animales de laboratorio.....	11
2.4 Obtención de sueros.....	12
2.5 Sueros de sujetos sanos.....	12
2.6 Aislamiento primario e identificación de la cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	12
2.7 Obtención de los antígenos de filtrado de cultivo de <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	13
2.7.1 Medio de cultivo.....	13
2.7.2 Preparación de los antígenos de filtrado de cultivo.....	14
2.7.3 Liofilización de los antígenos de filtrado de cultivo (AFC).....	15

2.8	Análisis de los antígenos de filtrado de cultivo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	15
2.9	Tinción con Coomassie.....	16
2.10	Tinción con nitrato de plata.....	17
2.11	Inmunoelectrotransferencia.....	17
2.12	Cuantificación Espectrofotométrica de proteínas.....	19
2.13	Fraccionamiento del antígeno crudo de <i>N. brasiliensis</i> .....	20
2.14	Electroelución.....	21
2.15	Sensibilización de los animales.....	21
2.16	Determinación de la reacción de hipersensibilidad tardía.....	22
2.17	Estudio Histopatológico.....	23
3.	RESULTADOS.....	24
3.1	Preparación de antígeno de filtrado de cultivo.....	24
3.2	Análisis comparativo de las cepas de <i>N. brasiliensis</i> utilizadas.....	24
3.3	Ensayo de inmunoelectrotransferencia de los AFC con sueros de pacientes con micetoma por <i>N. brasiliensis</i> .....	27
3.4	Fraccionamiento del antígeno de filtrado de cultivo (AFC)	

de la cepa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.....	30
3.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	33
3.6 Ensayos de hipersensibilidad tardía con intradermoreacciones de AFC de <i>N. brasiliensis</i> .....	34
3.7 Estudio histopatológico.....	41
4. DISCUSION.....	42
5. CONCLUSIONES.....	49
5.1 Contribuciones.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51
LISTA DE ABREVIATURAS.....	57
APENDICE.....	60
APENDICE A. GELES DE POLIACRILAMIDA.....	61

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Electroforesis de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en un gel de poliacrilamida- SDS al 12%.....	25
2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 12% de AFC de las cepas de <i>N.brasiliensis</i> .....	27
2. Inmunoelectrotransferencia utilizando los AFC de las 9 diferentes cepas de <i>N. brasiliensis</i> utilizadas.....	29
4. Western blot. Control con sueros de individuos sanos.....	30
5. Electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS al 15% de las fracciones de los AFC de <i>N. brasiliensis</i> de la 1-8.....	32
6.- Electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS al 15% de las fracciones de los AFC de <i>Nocardia brasiliensis</i> de la 5-12.....	33

7.- Lectura de intradermoreacciones.	
Arriba. Fracciones 1, 2, 3.	
Abajo fracciones 4, 5, y 6.....	39
8.- Lectura Intradermoreacciones. Fracciones 7-12.....	40
9.- Medida de eritema e induración de las intradermoreacciones con las fracciones 7, 8, 9, 10, 11 y 12.....	40

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Cepas utilizadas para la obtención de los antígenos de filtrado de cultivo, períodos de cultivos, cortos de una semana y largos de 6 semanas.....	26
II Número de fracciones obtenidas en un gel de poliacrilamida, con cortes realizados según el peso molecular de marcadores preteñidos Benchmark .....	31
III Reacción de eritema e induración con diferentes concentraciones del antígeno de filtrado de cultivo crudo .....	35
IV Gráfica de intradermoreacciones Reacción de eritema e induración en cobayos con las diferentes concentraciones de antígeno de filtrado de cultivo crudo.....	36
V Lectura de intradermoreacciones a las 48 y 72hrs. Realizadas con las diferentes fracciones del antígeno de filtrado de cultivo.....	37



VI Gráfica de intradermoreacciones. Utilizando el antígeno  
crudo fraccionado del 1 al 12, se observa el grado de  
eritema e induración en mm a las 48 hrs..... 38

## RESUMEN

Mónica A. Morcos González

Fecha de obtención del  
grado: Julio 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio: IDENTIFICACION DE ANTIGENOS  
INMUNODOMINANTES HUMORALES Y  
CELULARES DE FILTRADO DE CULTIVO  
DE *Nocardia brasiliensis*

Número de páginas: 63

Candidato para el grado de Doctora  
en Medicina

Área de estudio: Dermatología

En algunas enfermedades bacterianas, como la causada por *Mycobacterium tuberculosis*, se ha observado que en los filtrados de cultivo de este organismo se encuentran proteínas que estimulan fuertemente la respuesta inmune celular y humoral. Estos hallazgos han sido de gran ayuda para su diagnóstico temprano. En *Nocardia brasiliensis* ha sido difícil determinar los antígenos inmunodominantes exportados al medio de cultivo, debido en parte a la escasa cantidad de antígeno proteico excretado obtenido en estudios previos. (15). En los actinomicetomas por *Nocardia brasiliensis* es necesario contar con una intradermoreacción que nos ayude a confirmar el diagnóstico de la enfermedad y el agente etiológico mediante el uso de antígenos apropiados. El objetivo del presente estudio fue identificar los antígenos inmunodominantes extracelulares en el filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis* que inducen una respuesta inmune celular en cobayos previamente sensibilizados con *N. brasiliensis*, e identificar aquellos que reaccionan con sueros de pacientes con actinomicetomas por *N. brasiliensis*. Utilizamos 9 cepas de esta bacteria que se cultivaron en el medio RPMI 1640. El filtrado de cultivo obtenido se dializó y se concentró mediante liofilización; a la muestra de antígenos se le realizó electroforesis en un gel analítico de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Para identificar las proteínas inmunodominantes se realizaron ensayos de Western Blot, utilizando sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* y como control sueros de individuos sanos.

El antígeno completo (25, 50 y 75 µg) de filtrado de cultivo fue evaluado, mediante intradermoreacciones en cobayos hembras de 9

semanas, los cobayos fueron sensibilizados cuatro semanas antes vía intradérmica con 100 µg de una emulsión de adyuvante incompleto de Freund y de 40 mg de fragmentos de colonias preparadas de *N. brasiliensis*. En otro ensayo con técnica similar se repitió el procedimiento pero con la variación de usar el antígeno crudo fragmentado en 12 fracciones de acuerdo a su peso molecular. Al grupo control se le inyectó solución salina. Las intradermoreacciones se evaluaron a las 48 y 72hrs.

**Contribuciones y conclusiones:** Se demostró por electroforesis la presencia de abundantes proteínas de *N. brasiliensis* en el filtrado de cultivo y se determinó con sueros de pacientes con actinomicetoma, la inmunogenicidad de 4 proteínas de *N. brasiliensis* de pesos relativos de 60-, 48-, 28- y 26- kDa.

Se demostró mediante intradermoreacciones en el cobayo previamente sensibilizado una reactividad positiva con el antígeno de *N. brasiliensis* del filtrado de cultivo completo y de sus fracciones.

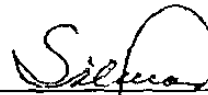
Esta metodología nos permitirá en el futuro determinar que antígenos que inducen una respuesta inmune celular en cobayos previamente sensibilizados y también en pacientes infectados.



Dr. med. Oliverio Welsh Lozano



Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera



Dr. Sc. Mario C. Salinas Carmona

## 1.-INTRODUCCION

### 1.1 Generalidades

El micetoma actinomicético es una enfermedad infecciosa localizada que afecta la piel, el tejido celular subcutáneo, los huesos, y órganos adyacentes. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de una firme tumefacción en el sitio afectado, nódulos y abscesos que drenan pus que contiene granos o gránulos del agente etiológico (3, 4, 5,6).

El micetoma afecta más comúnmente a individuos de áreas rurales en países en desarrollo, pero puede observarse en la población en general. Los pacientes con esta infección generalmente tienen una historia de un traumatismo previo en el sitio de la infección. Los miembros inferiores son la región más frecuentemente afectada y el mayor número de casos se localiza en el pie; otros sitios donde se observa esta enfermedad son el tronco, las extremidades superiores, la cara y el cuello. La mayoría de los reportes de actinomicetoma son en países subtropicales (3, 4, 5, 6, 26, 29, 31).

El micetoma fue descrito por primera vez por Gill en el distrito de Madura en India en 1842, llamándolo pie de Madura. Carter en 1860 denominó a este padecimiento como "micetoma" que literalmente significa tumor causado por hongos (3). Posteriormente, en 1913, Pinoy sub-dividió al micetoma en 2 grupos: los causados por bacterias aeróbicas (actinomicetomas) y los causados por hongos verdaderos (eumicetomas) (38).

En México alrededor del 98% de los casos son causados por actinomicetos (bacterias aerobias filamentosas), y solo el 2% restante son producidos por hongos. *Nocardia brasiliensis* es el agente causal del 86% de los casos y *Actinomadura madurae* del 8% restante (26).

El género *Nocardia* incluye organismos patógenos intracelulares facultativos que infectan tanto a individuos normales, como a sujetos inmunocomprometidos (4, 11, 12,40).

El actinomicetoma es producido por microorganismos que normalmente habitan en el suelo y viven como saprofitos. La infección se induce por la inoculación del agente infectante por un traumatismo en la piel con espinas de acacias o astillas de madera y otras heridas infectadas por estos microorganismos. Clínicamente la enfermedad comienza con la presencia de pequeños nódulos, indurados y firmes los cuales pueden persistir y evolucionar a una gran tumoración de consistencia firme (5, 8, 26, 29, 53,54).

El micetoma es endémico alrededor del trópico de Cáncer, a 15° al sur y 30° al norte del ecuador, afecta regiones tropicales y subtropicales. Países como México, Venezuela, Sudán, India, Pakistán, Senegal y Somalia tienen la incidencia más alta de esta enfermedad (26). En México, la incidencia es aproximadamente de 70 casos por año. En Estados Unidos, Asia y otros países de América Latina se observa una menor frecuencia. En general el micetoma predomina en hombres en una proporción de 3:1 con respecto a las mujeres (26).

Hasta el momento, no se han dilucidado completamente los factores

inmunológicos del hospedero que influyen en el desarrollo de una infección tipo micetoma por *N. brasiliensis* y de los cuales depende la instalación de la infección por *Nocardia*. La virulencia de *Nocardia* parece depender de la capacidad para evadir y modular la respuesta inmune del huésped y el desarrollo de una respuesta inmune celular adecuada o no del hospedero (8,9). Se ha demostrado que aunque se estimula la inmunidad humoral, la respuesta inmune celular parece desempeñar el papel más importante en la resistencia a la infección (8, 30).

El diagnóstico de micetoma se realiza en base al cuadro clínico y se confirma con el cultivo microbiológico, el cual tarda de 2 a 3 semanas (4, 5, 11, 40, 52, 54).

El inmunodiagnóstico de pacientes con infección por *Nocardia* debe permitir un reconocimiento más temprano y más rápido de la enfermedad, lo cual puede mejorar el manejo médico de la enfermedad. Para ello se han desarrollado algunos ensayos inmunológicos que detectan anticuerpos contra agentes causales de micetoma, ya sea utilizando filtrados de cultivo, antígenos citoplásmicos, o diversos antígenos de los actinomicetos (15, 19, 23, 24, 25, 27, 39, 41, 45, 48, 46). En el caso de *Nocardia brasiliensis*, Salinas y cols, observaron que la respuesta inmune humoral esta dirigida contra tres proteínas de 24-, 26- y 61-kDa de un extracto celular de este microorganismo (46). Posteriormente estas proteínas fueron aisladas y purificadas por Vera-Cabrera y cols (49). Las proteínas de 24- y 26-kDa han sido utilizadas

para desarrollar una prueba de ELISA que detecta anticuerpos en pacientes infectados con *N. brasiliensis* y se ha observado una correlación entre los títulos de anticuerpos y la condición clínica de los pacientes. En individuos con enfermedad activa los títulos de anticuerpos se encontraron elevados y en los curados los niveles de anticuerpos eran muy bajos o no se observaban (47).

En la actualidad no contamos con una prueba que mida la respuesta inmune celular que nos permita coadyuvar en el diagnóstico, pues las que han sido probadas en diferentes investigaciones en las últimas décadas han presentado reactividad cruzada con pacientes infectados con otras bacterias como *M. tuberculosis* y *M. leprae* ( 8, 9 ).

La respuesta inmune celular en infecciones por *Nocardia*, ha sido estudiada por diversos autores. Drake y Henrici en 1943 en una investigación con conejos adultos y cobayos previamente sensibilizados con suspensiones oleosas de *N. asteroides* inyectadas intratesticularmente, obtuvieron intradermoreacciones positivas con el extracto crudo de *N. brasiliensis* no calentada a las 24-48 hrs., de 18mm de diámetro, observándose el máximo de la reacción en el segundo día post-inyección. Los animales controles no dieron intradermoreacciones positivas. La hipersensibilidad retardada cutánea en animales previamente inmunizados con *N. asteroides* fue específica y no presentó reacciones cruzadas con la tuberculina (25).

En el estudio de Almeida y Lacaz emplearon antígenos para pruebas cutáneas en el diagnóstico de micetoma, sus resultados fueron negativos empleando un filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* en pacientes con micetoma causado por este actinomiceto. En 1945 Lacaz preparó un filtrado de cultivo con la combinación de 26 especies de *N. brasiliensis* y debido a la pobre respuesta cutánea, descartó el estudio como un procedimiento útil en el diagnóstico de micetoma (16).

González-Ochoa y Baranda en 1953 lograron obtener un antígeno polisacárido (L-2) con el que obtuvieron una reacción cutánea negativa en infecciones experimentales en conejos y ratones y fue positiva en pacientes con actinomicetoma causados por *N. brasiliensis* observándose que la intradermoreacción era positiva, solamente en los pacientes con actinomicetoma y negativa en individuos normales y pacientes con diversas infecciones micóticas. Es interesante hacer notar que el eritema e induración de las intradermoreacciones se minimizaba y/o desaparecía al segundo día de la intradermoreacción (16).

En el estudio de Bojalil y Magnusson en 1963 sobre la respuesta de la reacción cutánea a mezclas antigénicas conteniendo proteínas desnaturalizadas por calor, obtenidas de precipitados de filtrados de cultivo de *N. brasiliensis* obtenidas de pacientes con actinomicetomas causados por esta bacteria, demostraron reactividad cutánea de la dilución del precipitado obtenido, al cual llamaron "sensitina", los autores reportaron positividad a la intradermoreacción en 14 pacientes



con actinomicetoma causados por *N. brasiliensis* y negativo en un paciente con infección causado por *Actinomyces bovis* y otro con un actinomicetoma causado por *Actinomadura madurae*, también fue negativo en individuos PPD positivos. En este estudio los autores no lograron definir el tipo de compuestos y o mezclas, desconociéndose si estos precipitados podrían inducir una respuesta antigénica en animales de experimentación (10). Bojalil en un estudio posterior reportó que la revisión de los resultados reportados en la literatura médica sobre reacciones cutáneas en infecciones por *Nocardia* no eran consistentes y se avocaron a realizar estudios con extractos citoplasmáticos (36).

En 1972, Ortiz-Ortiz y cols. (35) estudiaron la inducción de hipersensibilidad tardía en cobayos inyectados subcutáneamente cada semana durante 3 semanas (con 1 mg de *N. asteroides* vivas ó de *N. brasiliensis* emulsificada con adyuvante incompleto de Freund) y 21 días después se evaluó la hipersensibilidad retardada mediante intradermoreacciones con extractos citoplásmicos de *Nocardia* que contenían proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los autores observaron que había diferencia entre los animales sensibilizados con *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, los animales inyectados con el extracto celular homólogo desarrollaron una mayor reacción cutánea. En el mismo estudio se pudo apreciar una reacción positiva a estos antígenos en animales previamente sensibilizados con BCG, por lo que se consideró que el antígeno indujo una reacción cruzada, y lo mismo sucedió al probar estos antígenos en pacientes con infecciones

causados por *Nocardia*, *M. leprae* y en individuos positivos al PPD en los cuales también se produjeron reacciones cruzadas (36). Estos mismos autores también observaron que una proteína ribosomal obtenida de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* era capaz de inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía positiva en animales (cobayos) previamente sensibilizados con estas bacterias (37). Sin embargo, hay otro reporte en donde esta variedad de antígenos presentaron una reacción cruzada con antígenos ribosomales de *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (25).

Mahgoub y colaboradores (1977) estudiaron el estado inmunológico de los pacientes con micetoma, mostrando alguna evidencia de inmunidad celular deprimida en estos pacientes. Sin embargo Bendl y colaboradores, no encontraron alteraciones inmunológicas en 15 pacientes (30). Vera y cols. demostraron que en micetomas experimentales por *N. brasiliensis* en ratas normales Lewis y en ratas atímicas rnu/rnu, las ratas Lewis desarrollaron micetoma con gránulos, pero las ratas atímicas murieron y la necropsia mostró la diseminación de la infección. (50) El uso de las reacciones cutáneas es un método simple y ampliamente utilizado para poner de manifiesto la hipersensibilidad tardía. Su uso clínico en infecciones por *Nocardia* ha sido probado con fines diagnósticos frecuentemente con resultados variables referentes a especificidad y sensibilidad. Las investigaciones realizadas hasta el momento, sugieren que la inmunidad celular es la realmente efectiva en contra de la infección (8).

En la infección por *N. brasiliensis* en humanos se producen anticuerpos contra las proteínas de un extracto celular de este microorganismo de 61, 26 y 24 kDa. (46,47). Sin embargo se desconocen los antígenos específicos que induzcan un estado de resistencia y/o inmunidad celular. En otros actinomicetos aeróbicos patógenos para el humano, como en *Mycobacterium tuberculosis* se han descrito proteínas de secreción tales como la ESAT-6 o el complejo antígeno 85 que inducen una excelente respuesta inmune celular (7).

*M. tuberculosis* está filogenéticamente relacionada con *Nocardia* y existe la posibilidad de que antígenos de filtrado de cultivo de esta bacteria pudieran estimular la respuesta inmune tardía del hospedero.

El objetivo de la presente tesis es inducir la producción de proteínas al medio y determinar las proteínas de filtrado de cultivo que reaccionan con los sueros de pacientes infectados con *N. brasiliensis* e identificar los antígenos específicos en el filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis* que inducen una respuesta de hipersensibilidad retardada en el cobayo.

## **HIPÓTESIS**

*N. brasiliensis* produce antígenos de exportación al medio de cultivo que reaccionan con el sistema inmune humoral y celular del hospedero.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar los antígenos inmunodominantes en el filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener las proteínas del filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis*.
2. Identificar por Western blot las proteínas de filtrado de cultivo que reaccionan con los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis*.
3. Determinar las fracciones proteicas secretadas al medio de cultivo que producen una respuesta de hipersensibilidad tardía en cobayos previamente sensibilizados por *Nocardia brasiliensis*.

## **2.- MATERIALES Y METODOS**

### **2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO**

### **2.2. MICROORGANISMOS**

Para la obtención del antígeno de filtrado de cultivo utilizamos cepas obtenidas de la colección del Laboratorio Interdisciplinario de Dermatología aisladas de pacientes vistos en el Hospital Universitario de la U.A.N.L. Estas cepas fueron aisladas de pacientes con micetoma causado por *N. brasiliensis* y se conservaron en leche descremada a -70°C. Al momento de usarlas se resembraron en agar Sabouraud. Se utilizaron 9 cepas de *N. brasiliensis* con la finalidad de determinar en cual de ellas encontrábamos diferente patrón de producción de proteínas. Entre estas se incluyeron dos de colección *N. brasiliensis* HUJEG-1 y *N. brasiliensis* NCTC 10300 Ver tabla 1.

### **2.3 ANIMALES DE LABORATORIO**

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) hembras de la cepa Hartley, de 9 semanas de edad, obtenidos del Bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México. Seleccionamos esta variedad de animales porque en ellos se han realizado ensayos por diversos autores

de hipersensibilidad tardía. Los animales durante nuestro estudio fueron cuidados en el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste (IMSS) por el Dr. Gerardo Lozano G. (33).

#### **2.4- OBTENCION DE SUEROS**

De cada uno de los pacientes, sanos y con la enfermedad se obtuvieron 5 ml de sangre, la cual fue centrifugada para obtener el suero, las muestras se colocaron en crioviales de 1ml cada uno y se congelaron a -70°C. Se obtuvieron sueros de pacientes con diagnóstico de actinomicetoma causados por *N. brasiliensis*. Excluimos los sueros de aquellos pacientes en los cuales no se pudo confirmar el diagnóstico de actinomicetoma por cultivo, así como aquellos pacientes en tratamiento y pacientes curados.

#### **2.5. - SUEROS DE SUJETOS SANOS**

Como control se utilizaron sueros de sujetos sanos en los ensayos de Western Blot.

#### **2.6 AISLAMIENTO PRIMARIO E IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE *Nocardia brasiliensis***

Para confirmar el diagnóstico de micetoma por *N. brasiliensis*, se realizó el cultivo de la secreción de las lesiones de los pacientes incluidos en el estudio. Se practicó el cultivo en medio de Sabouraud,

de la secreción de las lesiones de los pacientes incluidos en el estudio. Las colonias se desarrollaron en un período de entre 15 y 21 días, y la especie fue identificada mediante pruebas bioquímicas de hidrólisis de la caseína, hipoxantina, xantina y tirosina (11,40).

## **2.7.- OBTENCION DE LOS ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE *N. brasiliensis***

### **2.7.1 MEDIO DE CULTIVO**

El medio de cultivo utilizado para obtener los antígenos excretados fue el RPMI 1640 el cual es un medio constituido por aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas ampliamente utilizado para cultivo de líneas celulares.

Para preparar el medio de cultivo colocamos en una matraz Erlenmeyer, 10.4g del polvo RPMI 1640 (Sigma) y 1000ml de agua bidestilada, lo disolvimos mediante agitación con una varilla de vidrio estéril y ajustamos el pH hasta 7 (medidor de pH. Orion Mod. 330). El colorante (rojo fenol) del medio de cultivo fue eliminado, por medio del filtrado en papel filtro estéril con carbón activado para evitar interferencia en el procesamiento posterior de las proteínas.



### 2.7.2.- PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO

A partir de los cultivos en agar Sabouraud se tomó un fragmento de cada colonia, se colocó en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm conteniendo 0.5ml de solución salina y se trituró con un homogenizador, para preparar una suspensión. El inóculo de cada cepa se vació en un matraz conteniendo 50 ml de RPMI 1640 esterilizado por filtración y se incubó a 37°C en agitación a 9,000 rpm durante 7 días y otros durante 6 semanas. La racionalidad para el empleo de diferentes tiempos en el cultivo de *Nocardia* es debido a que se ha reportado que en *M. tuberculosis* los patrones electroforéticos del filtrado de cultivo en periodos largos de incubación (más de 1 mes), y de corta duración (6 días) son diferentes. Debido a que *Nocardia* esta filogenéticamente relacionada con *M. tuberculosis* decidimos probar ambos periodos de incubación para la obtención de antígenos exportados al medio de cultivo para observar si existía diferencia significativa en el patrón de producción de proteínas. Al término de la incubación, se filtró a un matraz estéril la masa bacteriana, utilizando embudos de vidrio de cuello largo con papel filtro estéril, se centrifugó y posteriormente los sobrenadantes se filtraron con un acrodisco (Millipore) de 0.2 micras y se distribuyeron en crioviales de 1.5 ml procediéndose a congelarlos a

-20°C para su posterior liofilización. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

### **2.7.3 LIOFILIZACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO (AFC)**

Los viales con el antígeno de filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* se congelaron en hielo seco y alcohol metílico y se liofilizaron (Liofilizadora LABCONCO Freeze Dry/Shell Freeze System) durante 24 hrs.

El liofilizado de cada cepa se reconstituyó en un volumen de 2ml de agua bidestilada estéril y se dializó en una membrana de celulosa (Spectrapor, límite de corte 12,000-14,000) contra agua bi-distilada fría por 24 hrs. Una vez que se obtuvo el AFC dializado, se volvió a liofilizar. Obteniéndose mediante este proceso el AFC de cada cepa.

### **2.8.- ANÁLISIS DE LOS AFC MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES**

Para el estudio de los componentes proteicos de las diferentes cepas de *N. brasiliensis*, se realizó electroforesis de proteínas, en geles de corrimiento al 12%, como gel de empaquetamiento o concentrador

se utilizó un gel de poliacrilamida al 4% (ver apéndice A). El gel se montó en el sistema de electroforesis Mini-Protean II (BioRad), y se aplicó el amortiguador de corrimiento (Tris-HCL 125 mM, glicina 192mM, SDS al 0.1% p/v) en la cámara de corrimiento.

Se vertió el contenido de cada uno de los viales liofilizados en tubos Eppendorf, y se les agregó 40 µl de buffer de muestra 4X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% p/v, 2-Mercaptoetanol 10%, sacarosa al 50% p/v, con azul de bromofenol como indicador del frente de corrida); y se sometieron a ebullición durante 2 minutos (para desnaturalizar las proteínas) y se centrifugaron. De cada alícuota se tomaron 10 µl con una pipeta automática (Eppendorf) para colocarlos en cada carril del gel de poliacrilamida -SDS al 12%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 v, hasta que el gel de empaquetamiento alcanzó el gel de corrimiento y después se aumento el voltaje a 150 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel de corrimiento.

## **2.9- TINCIÓN CON COOMASSIE**

Una vez terminada la electroforesis, el gel que se encontraba en la mini cámara, se sacó y se colocó en un recipiente conteniendo azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.1% p/v en solución desteñidora: metanol 40% v/w y ácido acético 10% v/v en agua destilada) por 30 minutos. El gel se destiñó con solución desteñidora por 1-3 horas.

## **2.10.- TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA**

El gel recién corrido se sumergió en solución fijadora (metanol 50% v/v y ácido acético 12% v/v en agua destilada) por 20 minutos, después se realizaron 3 lavados con solución de lavado por 10 minutos c/u (etanol 10% v/v y ácido acético 5% v/v en agua destilada) para eliminar el SDS. En seguida el gel se colocó en solución oxidante (dicromato de potasio 3.4 mM, ácido nítrico 3.22 mM) por 5 minutos en agitación, para posteriormente realizar 3 lavados con agua destilada (10 minutos cada lavado). Posteriormente se agregó el Nitrato de Plata 0.509 g en 250ml de agua bidestilada por 5 minutos expuesto a luz intensa. Posterior a esto se continuo la aplicación de la solución reveladora, Carbonato de Sodio,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.28M (2.965 g- por cada 100 ml de agua) y formaldehído 0.05% v/v, 50 $\mu\text{l}$  para cada 100 ml de agua, el gel se sumergió en la solución hasta observar la coloración, se agregó una pequeña cantidad de ácido acético para detener la reacción (32).

## **2.11.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

Los geles se equilibraron en buffer de transferencia (48 mM de tris, 39 mM de glicina, 20% de metanol, a un PH de 9.2) por 30 minutos y se colocaron en el aparato de transferencia (Trans-blot semi-dry, BioRad

Laboratories), con un amperaje de 300 mA por 20 minutos. Después de la transferencia la membrana se lavó con buffer TBS por 5 minutos y se incubó con solución bloqueadora (gelatina al 3% en TBS) a 37°C durante una hora, posteriormente, se realizaron 3 lavados a la membrana de 10 minutos cada uno con TBS. Cada membrana se incubó con el suero de los pacientes con micetoma diluido 1:25 en gelatina al 1.5% en TBS con tween 20 1:1000, y se dejó hasta el día siguiente a temperatura ambiente. La membrana se volvió a lavar en 3 ocasiones con gelatina al 0.3% en TBS con tween 20 1:1000 por 30 minutos cada lavado. Se agregó el conjugado (anti-IgG humano-Fosfatasa Alcalina) diluido 1:10,000 en solución de gelatina al 1.5% en TBS con tween 1:1000, y se incubó una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con solución de lavado, y posteriormente se realizó un lavado con buffer de fosfatasa alcalina, y se procedió a revelar añadiendo 10 mls. de buffer y 100 µl de NBT (nitroblue de tetrazolio). Posteriormente se agregó 100 µl de BCIP y se esperó a que aparecieran las bandas.

Una vez obtenidos los resultados en el Western Blot, nuevamente se realizaron cultivos de una sola cepa de *Nocardia brasiliensis* y se cultivaron grandes cantidades para obtener mayor cantidad del AFC. Utilizamos el método de Bradford para conocer la cantidad de proteínas que obtuvimos en cada cultivo.

## 2.12.-CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS

1. El procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas, *está basado en el método diseñado por Bradford (1976).*
2. Se prepara una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg disueltos en 10 ml de NaCl 0.15 M. La concentración de albúmina en la solución se comprueba con un análisis espectrofotométrico a 278 nm, en el espectro UV; la absorbancia a esta longitud de onda, debe ser de 0.66, si este dato no se obtiene es necesario ajustar la concentración.
3. Las soluciones conteniendo de 10 a 100 µg de estándar de albúmina, se pipetea en tubos de 12 x 100 mm y en un volumen de 0.1 ml. El volumen en el tubo de prueba también se ajusta a 0.1 ml con solución de NaCl 0.15 M.
4. Se le agregan 5 ml de reactivo, el cual se prepara de la siguiente forma: se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1 litro.
5. Se traza una gráfica patrón de proteínas: cantidad de albúmina (eje de las abscisas) contra absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de las ordenadas).
6. La solución problema se diluye con NaCl 0.15 M. Se pipetea en cada tubo un volumen de 0.1 ml de la solución problema en tubos de

12 x 100 mm, se le agregan 5 ml de reactivo y se lee a una longitud de onda de 595 nm. Se prepara un blanco que contenga 0.1 ml de NaCl 0.15 M más 5 ml de reactivo.

7. La absorbancia resultante del problema se interpola a la curva patrón y se extrapola de esta al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra (13).

### **2.13.- FRACCIONAMIENTO DEL ANTÍGENO CRUDO**

Para obtener fracciones del antígeno crudo de filtrado de cultivo, se realizó un gel de poliacrilamida de corrimiento al 15% con un gel de empaquetamiento del 4% utilizándose para su corrimiento la cámara para electroforesis para geles de 20 X 16 cm. Protean II xi cell. BIO-RAD, utilizando un peine grande donde se aplicó el equivalente de 10 mgs. de AFC de *N. brasiliensis* de la cepa HJEG-1 reconstituido con 700 µl de agua bidestilada y buffer de muestra 4X. Para guiarnos en el corte de las bandas se aplicaron 20 µl de proteínas pre-teñidas (BenchMark Prestained Protein Ladder de Gibco) en las orillas del gel. En esta ocasión, dada la alta concentración de proteínas que incrementa la temperatura del buffer y del gel, se utilizó un sistema de enfriamiento. Una vez terminado el corrimiento se procedió a fragmentar el gel en bandas basándonos en los pesos moleculares de los marcadores preteñidos, y los fragmentos de gel se guardaron a –

70°C, para posteriormente realizar electroelución de cada una de las fracciones (21). Después se realizó la cuantificación de las proteínas de cada una de las fracciones utilizando el método de Bradford.

#### **2.14.- ELECTROELUCIÓN**

La electroelución se llevo a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Isco Electroeluter (49). En resumen, cada fragmento de gel se colocó en una cámara ISCO (Lincoln, Nebr.) usando como buffer de electroelución 384 mM –Tris 250 mM y para el interior de la cámara el mismo buffer diluido 1:10. Para la diálisis contra PBS se utilizó una membrana de diálisis con un limite de corte de 12,000 a 14,000 Da (Sigma). La electroelución se realizó a 150 V por 2 hrs. y las proteínas fueron recuperadas de la cámara catódica.

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford y la calidad de las mismas mediante SDS-PAGE en un sistema de minigel en condiciones iguales a las antes mencionadas (13,55).

#### **2.15.- SENSIBILIZACIÓN DE LOS ANIMALES**

Se utilizaron cobayos hembra de aproximadamente 120 g de peso de la cepa Hartley, los cuales fueron donados por el Dr. Enrique Pinzón (UNAM). Los animales se inocularon con 100 µl de una emulsión con adyuvante incompleto de Freund de 40 mg de fragmentos de colonias



preparados con la siguiente técnica: se cultivó *N. brasiliensis* cepa HJEG-1 en BHI por 3 días a 37 °C, se cosecharon por centrifugación y se molieron en una licuadora por 2 min., se centrifugaron a 100 g por 5 min., se retiró el sobrenadante y el sedimento se lavó 2 veces con solución salina y el sedimento se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos se pesó y se ajustó a la cantidad antes mencionada. El primer grupo se sensibilizó con *N. brasiliensis* vía subcutánea, el segundo grupo se sensibilizó con solución salina, 6 semanas después se realizaron pruebas cutáneas utilizando como antígeno 1 µg de cada una de las fracciones obtenidas y en otros de los cobayos de cada grupo se utilizó antígeno crudo no fraccionado en una cantidad de 25, 50 y 75 microgramos de proteínas, y como control solución salina.

## **2.16 DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TARDÍA.**

Después de 6 semanas, los animales se rasuraron en el lomo y se les aplicó intradérmicamente 0.1 ml de cada fracción que contenía 1 µg de proteína. Como control positivo se aplicaron 100 µl de 25, de 50 y de 75 µg de proteína del AFC. Como control negativo se aplicaron 100 µl de solución salina. A las 48 y 72 horas se determinó la presencia de eritema e induración en el sitio de cada aplicación de las inyecciones y se tomaron muestras de tejido de las zonas de eritema e induración.

## **2.17 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO**

Se realizó biopsia de cada uno de los sitios de piel de las intradermoreacciones, previa anestesia con xilocaína, utilizando un sacabocados de 4mm de diámetro y se conservaron los especímenes en formol para su procesamiento y posterior tinción con H y E.

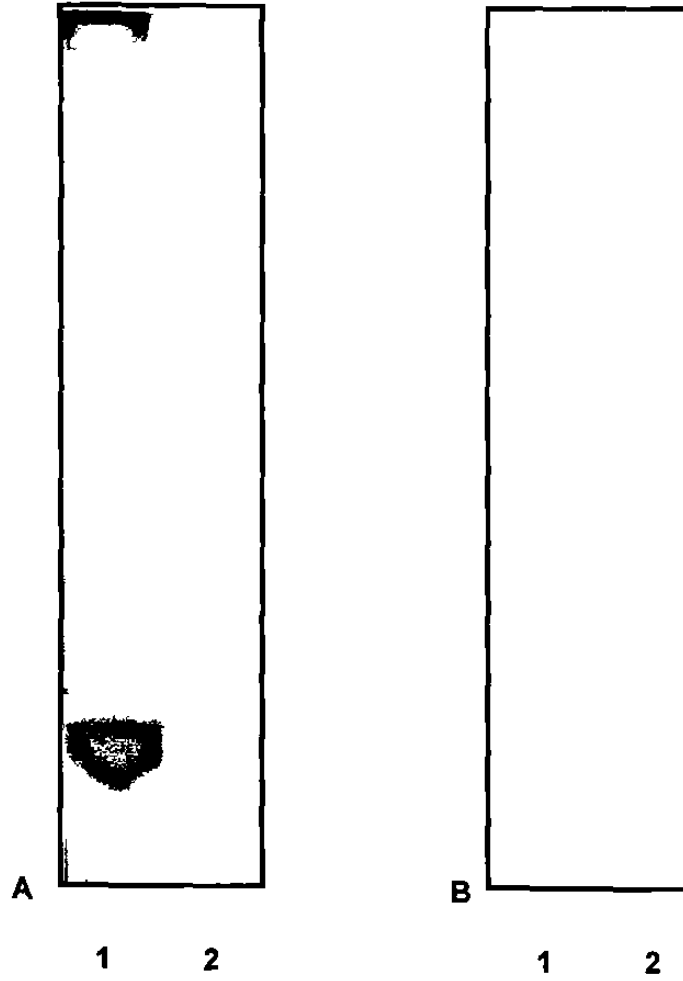
### 3.- RESULTADOS

#### 3.1. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO DE FILTRADO DE CULTIVO

**(AFC).** En el análisis de las proteínas de *N. brasiliensis* en el medio de cultivo RPMI-1640 se detectó una gran cantidad de proteínas de excreción en cada una de las diferentes cepas analizadas (Fig. 1 y 2). Las proteínas principalmente se localizaron por su peso molecular entre las regiones de 66- a 14- kDa.

#### 3.2.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CEPAS DE *N.*

***brasiliensis* UTILIZADAS.** Con el propósito de evaluar diferencias en la producción de proteínas con respecto al tiempo de incubación se realizaron cultivos de 9 cepas en dos períodos de incubación, uno de 7 días y otro de 6 semanas (tabla No. 1) . En la figura 2 se muestra el análisis de algunos de los extractos en un gel de SDS-PAGE al 12% teñido con plata, no encontrándose diferencia significativa en la producción de proteínas en ambos tiempos.



**Fig. 1. Electroforesis de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (25 $\mu$ g) en un gel de poliacrilamida- SDS al 12%. A.- Gel teñido con plata, carril 1: 25  $\mu$ g de AFC, carril 2: marcadores de peso molecular. B.- Tinción con Coomassie, carril 1: 25  $\mu$ g del AFC, carril 2: marcadores de peso molecular.**

**Tabla I. Cepas utilizadas para la obtención de los antígenos de filtrado de cultivo**

<b>Cepa</b>	<b>Periodos de incubación del Cultivo (Semanas)</b>
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-91	1
<i>N. brasiliensis</i> V-399	1
<i>N. brasiliensis</i> V-399	6
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	1
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	6
<i>N. brasiliensis</i> W-120	1
<i>N. brasiliensis</i> W-120	6
<i>N. brasiliensis</i> NCTC 10300	1
<i>N. brasiliensis</i> W-102	1
<i>N. brasiliensis</i> W-102	6
<i>N. brasiliensis</i> V-243	6
<i>N. brasiliensis</i> V-409	6
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-81	6



**Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 12% de AFC de las cepas de *N.brasiliensis*. Carriles; 1: *N. brasiliensis* HUJEG-1 (1 sem). 2: *N. brasiliensis* HUJEG-1 (6 sem.). 3: *N. brasiliensis* LIID W-120 (1 sem.),4.- *N. brasiliensis* LIID W-120 (6 sem.), 5.- *N. brasiliensis* NCTC 10300 (6 sem.), 6.- *N. brasiliensis* LIID V-243 (6 sem.), 7.- *N. brasiliensis* LIID V-399 (6 sem).**

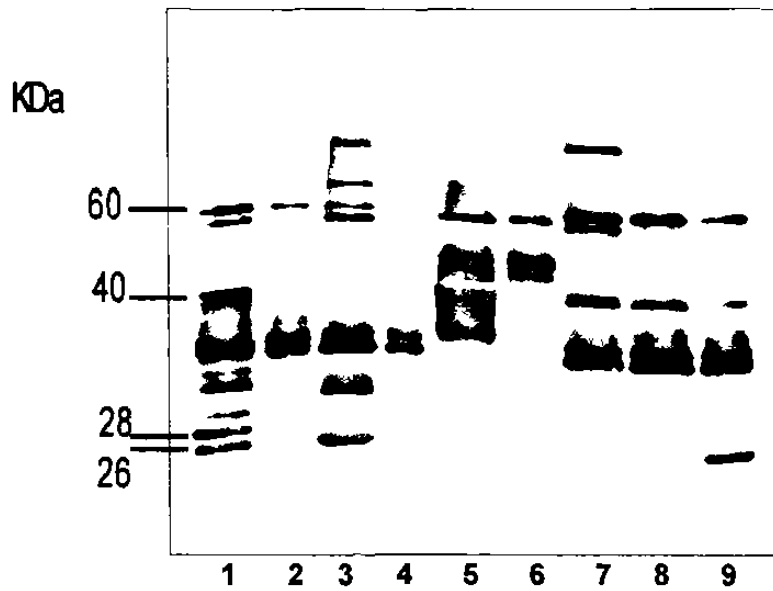
**3.3.-ENSAYO DE IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LOS AFC CON SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA POR *N. brasiliensis*.** Con respecto al segundo objetivo que fue el de identificar las proteínas inmunodominantes de los antígenos de filtrado de cultivo

de las diferentes cepas, se realizaron ensayos de Western blot con los sueros de 14 pacientes con micetoma causados por *N. brasiliensis*.

Se observó que los sueros de los pacientes reconocieron diversas bandas de proteínas obtenidas de los filtrados de cultivo de todas las cepas evaluadas de *N. brasiliensis*. Las proteínas reconocidas por todos los sueros estuvieron localizadas en las regiones de 60-, 40-, 28- y 26- kDa ( Fig. 3).

Al utilizar sueros controles de sujetos sanos encontramos que no reconocieron ninguna de estas bandas (Fig.4). Al analizar un mayor número de sueros observamos que estos resultados son reproducibles.

Para el análisis subsecuente de este estudio se realizó la selección de la cepa HUJEG-1 de *N. brasiliensis* en base a que fue la cepa que mostró una mayor cantidad de bandas de proteínas en la electroforesis. (Fig.2). Posteriormente se analizó la reactividad de esta cepa con todos los sueros de pacientes con micetoma, observándose que varias proteínas fueron reconocidas por todos los sueros (Fig.3).



**Fig. 3. Inmunoelectrotransferencia utilizando los AFC de las 9 diferentes cepas de *N. brasiliensis* utilizadas.**  
 Carriles; 1: *N. brasiliensis* V-399 2: *N. brasiliensis* HUJEG-81, 3: *N. brasiliensis* W-120, 4.- *N. brasiliensis* NCTC 10300 5.- *N. brasiliensis* HUJEG-91, 6.- *N. brasiliensis* V-243, 7.- *N. brasiliensis* HUJEG-1, 8.-*N. brasiliensis* W-102, 9.-*N. brasiliensis* V-409.





**Fig. 4. Western Blot. Control con sueros de individuos sanos.** Inmunolectrotransferencia utilizando los AFC de las cepas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con sueros de sujetos sanos.

### **3.4.- FRACCIONAMIENTO DEL ANTÍGENO AFC DE LA CEPA *N.***

#### ***brasiliensis* HUJEG-1**

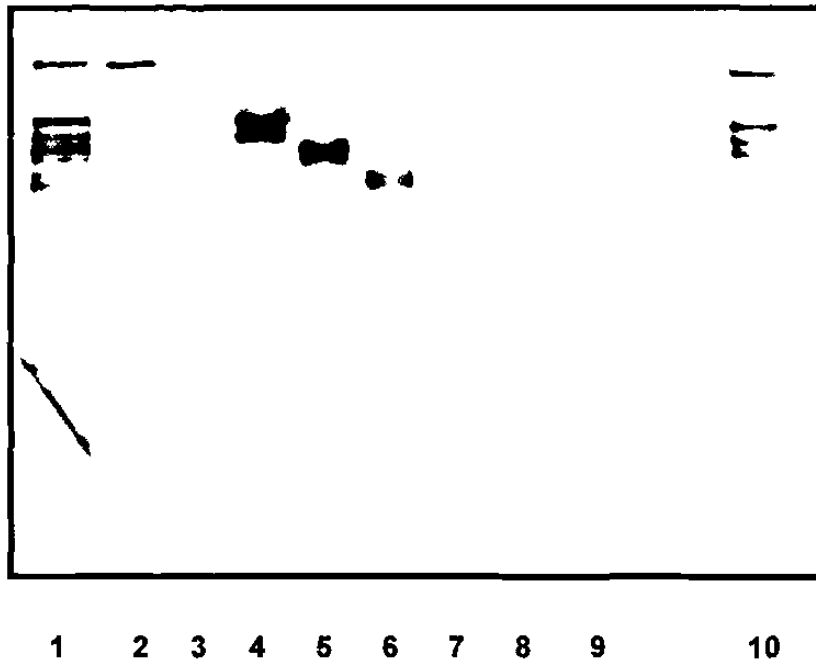
Una vez realizado los ensayos de Western blot y haber logrado el segundo objetivo de identificar con esta técnica las proteínas de excreción que reaccionan con los sueros de pacientes, se produjo una mayor cantidad de antígeno de filtrado de cultivo de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1. El estudio por electroforesis del antígeno de filtrado de cultivo fue fraccionado obteniéndose 12 fracciones las cuales

se enumeraron de acuerdo a su peso molecular de entre 220- a 10- kDa. (Ver tabla 2).

Fracción	Peso Molecular aparente (kDa)	Apparent kDa*
1	220-130	-220
2	130-90	130
3	90-70	-90
4	70-60	-70
5	60-40	-60 -
6	40-30	-40
7	30-20	-30 -
8	20-15	20 -
9	15-10	-15 -
10	10	-10
11	menos 10	
12	menos 10	

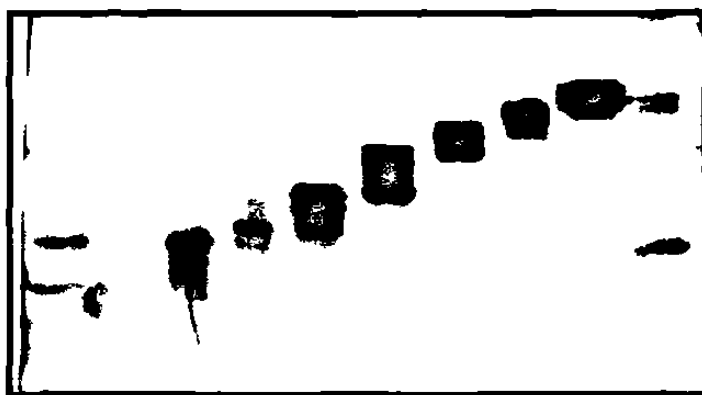
**Tabla II. Fracciones obtenidas en gel de poliacrilamida.** Los cortes se realizaron según el peso molecular de marcadores preteñidos Protein Ladder Benchmark (Gibco BRL Products) (Fig. derecha)

En la electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de cada una de las fracciones se pudo corroborar el peso molecular aproximado de cada corte de todas las fracciones. (Figuras 5 y 6).



**Fig. 5 Electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS al 15% de las fracciones los AFC de *N. brasiliensis*.**

Carril 1.- 25  $\mu$ g del Antígeno de filtrado de cultivo completo, carril 2: fracción 1, carril 3: fracción 2, carril 4: fracción 3, carril 5: fracción 4, carril 6: fracción 5, carril 7: fracción 6, carril 8: fracción 7, carril 9: fracción 8, carril 10: 25  $\mu$ g de AFC de *Nocardia brasiliensis*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**Fig.6 Electroforesis de las fracciones de los AFC de *N. brasiliensis* en un gel de poliacrilamida SDS al 15%. Carril 1.- 25 µg del Antígeno de filtrado de cultivo completo, carril 2: fracción 12, carril 3: fracción 11, carril 4: fracción 10, carril 5: fracción 9, carril 6: fracción 8, carril 7: fracción 7, carril 8: fracción 6, carril 9: fracción 5, carril 10: 25 µg de AFC de *Nocardia brasiliensis*.**

### **3.5.-CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD**

La cuantificación de las proteínas obtenidas en cada fracción electroeluida del antígeno de filtrado de cultivo la obtuvimos por medio del método de Bradford (13).

### **3.6.- ENSAYOS DE HIPERSENSIBILIDAD TARDÍA CON INTRADERMOREACCIONES DE ANTÍGENOS DE FILTRADO DE CULTIVO DE *Nocardia brasiliensis*.**

Nuestro tercer objetivo fue determinar las fracciones proteicas que secretadas al medio de cultivo inducen una respuesta de hipersensibilidad tardía en cobayos previamente sensibilizados con *N. brasiliensis*.

Del antígeno de filtrado de cultivo, obtuvimos 12 fracciones proteicas, las cuales fueron electroeluidas realizándose posteriormente intradermoreacciones de estas fracciones en cobayos previamente sensibilizados con *N. brasiliensis*, los resultados obtenidos a las 48 y 72 hrs. del grado de eritema e induración, fueron los siguientes:

En el grupo previamente sensibilizados con *N. brasiliensis* los resultados obtenidos con la realización de las pruebas cutáneas fueron las siguientes, con la aplicación de 25 µg de AFC crudo se observó eritema e induración en un diámetro de 10 mm.

En la intradermoreacción de 50 µg se observó en un diámetro de eritema e induración de 15 mm.

Con 75 µg del AFC se observó el mismo diámetro de eritema e induración, que con 50 µg.

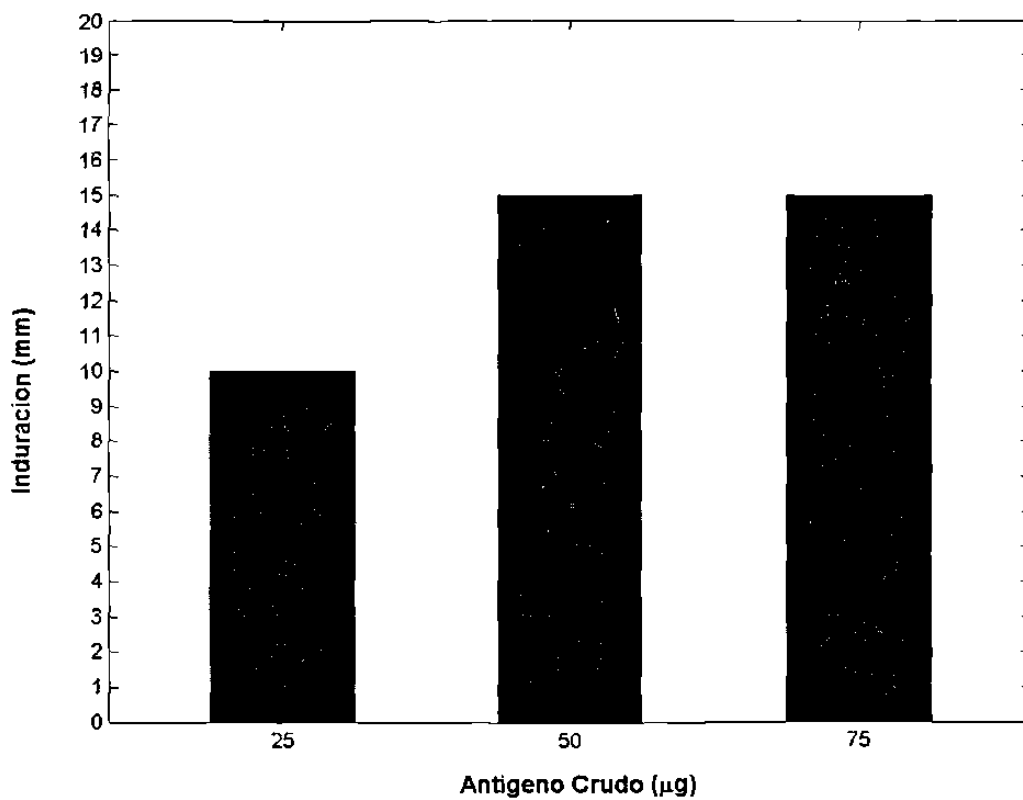
Con la inyección control con solución salina, no se observó eritema e induración a las 48 y 72 hrs. posterior a las intradermoreacciones.

Tabla 4 y 5.

En los cobayos en los que se utilizó el AFC fraccionado para las intradermoreacciones observamos a las 48 y 72 hrs. los siguientes resultados. Con la fracción 1 hubo un desarrollo de eritema e induración de 8 mm de diámetro, en las fracciones 2 y 3 las consideramos negativas pues no hubo desarrollo de eritema, ni induración, una de las fracciones que consideramos positiva fue con la fracción 4 pues se observó eritema e induración en un diámetro de 10 mm de diámetro, en las fracciones 5 y 6 observamos un diámetro de eritema e induración de 7 mm de diámetro, en las fracciones 7 y 8 observamos una respuesta de un diámetro de 5 mm, en la fracción 9 observamos una induración de 8 mm de diámetro, en la fracción 10 la respuesta de 5 mm, en la fracción 11 fue negativa, y en la fracción 12 se observó solamente 2 mm de eritema e induración. Las respuestas reportadas fueron similares en ambos períodos el de 48 y 72 hrs. tablas 4, 5, 6,7.

**Tabla. III. Reacción de eritema e induración con diferentes concentraciones del antígeno de filtrado de cultivo crudo**

Lectura de intradermoreacciones a las 48 y 72 hrs. (Grupo control)	
Antígeno crudo, dosis inyectada ( $\mu$ g)	Eritema e induración (mm)
25	10
50	15
75	15

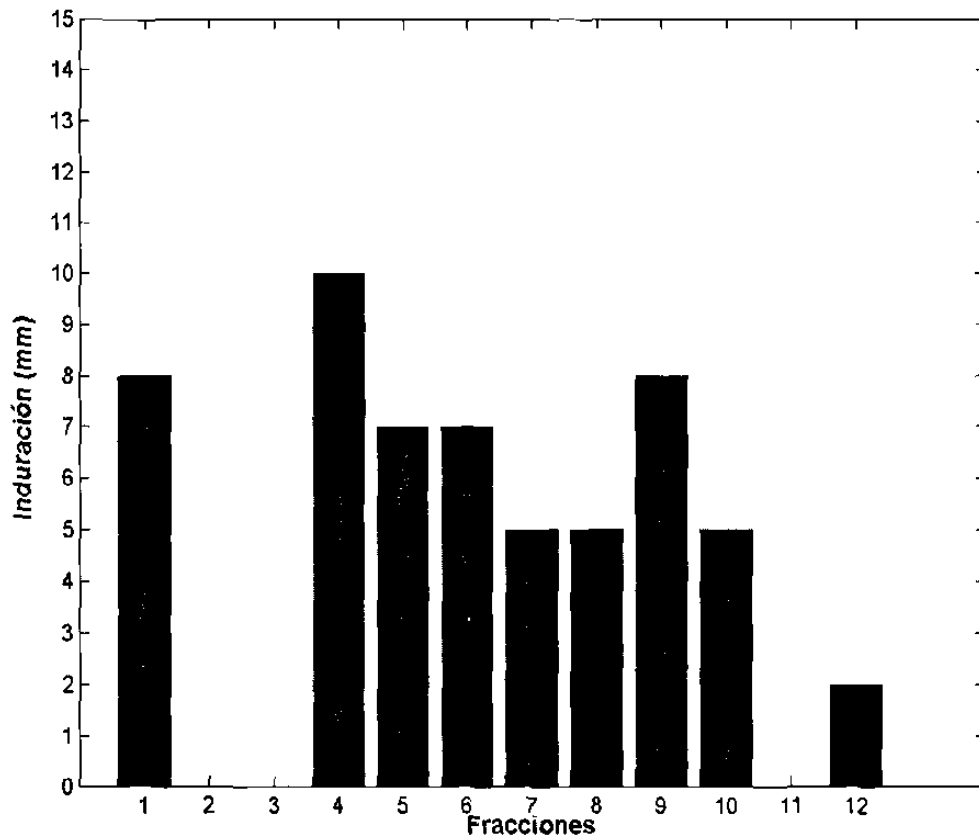


**Tabla IV. Gráfica de intradermoreacciones.** Utilizando el antígeno crudo en diferentes concentraciones 25, 50 y 75  $\mu\text{g}$ , se determinó el grado de eritema e induración en mm a las 48hrs.

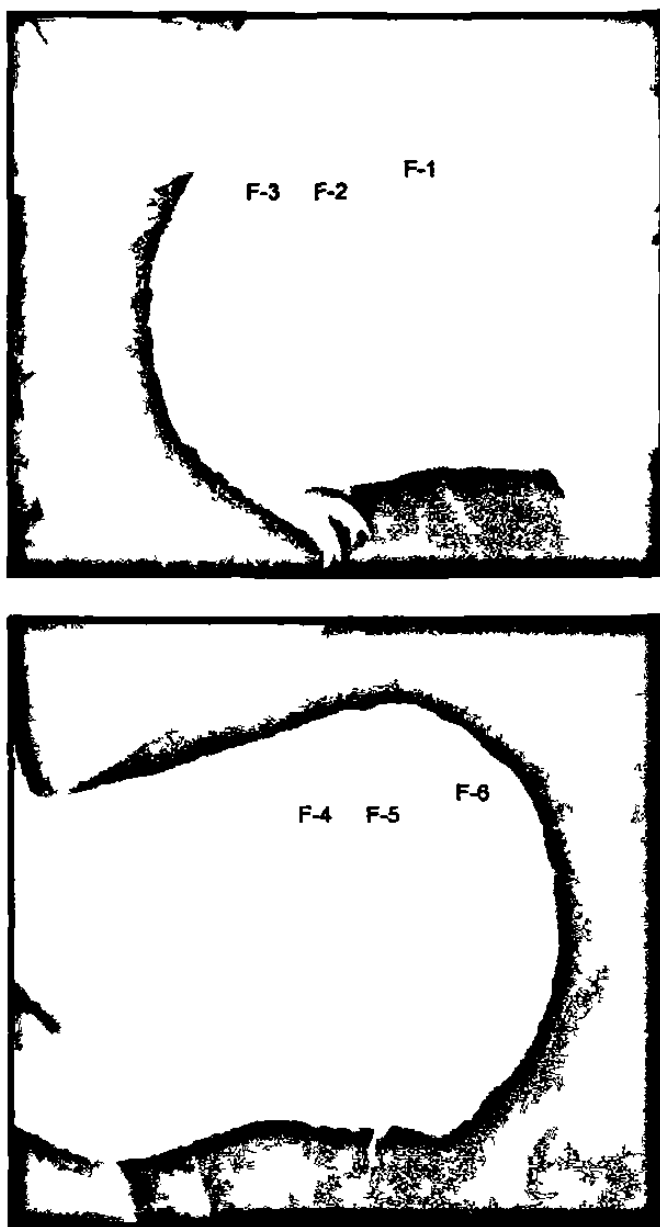
**Tabla V. Lectura de intradermoreacciones a las 48 y 72hrs.**  
Realizadas con las diferentes fracciones del antígeno de filtrado de cultivo.

Fracciones	Eritema e induración (mm)
1	8
2	0
3	0
4	10
5	7
6	7
7	5
8	5
9	8
10	5
11	0
12	2

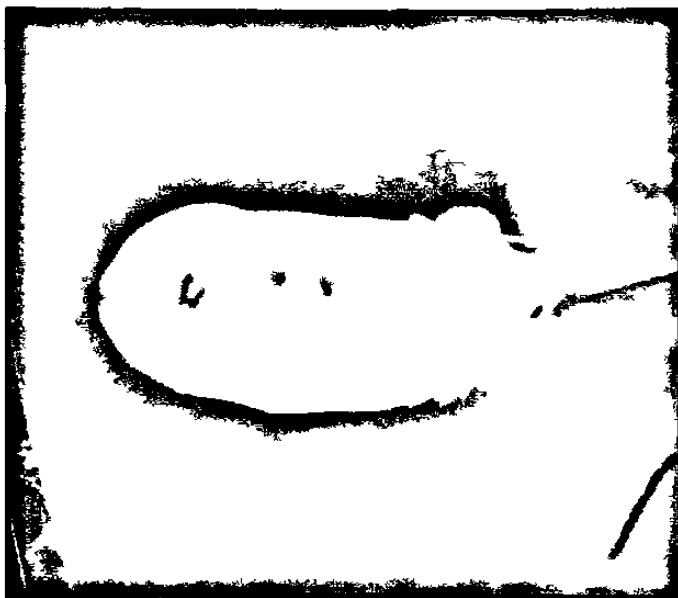




**Tabla VI. Gráfica de intradermoreacciones.** El antígeno crudo fraccionado del 1 al 12, se determinó el grado de eritema e induración en mm a las 48 hrs.



**Fig. 7. Lectura de Intradermoreacciones.** Arriba. Fracciones 1, 2, 3. Abajo fracciones 4, 5, y 6. Se observa el área de eritema e induración en cada una de las fracciones inyectadas.



**Fig. 8. Lectura de intradermoreacciones. Reacción de eritema e induración con las fracciones inyectadas 7-12**



**Fig. 9. Medida de eritema e induración de las intradermoreacciones con las fracciones 7, 8, 9, 10, 11 y 12.**

### **3.7.-ESTUDIO HISTOPATOLOGICO**

Las biopsias realizadas de las intradermoreacciones positivas con las fracciones 1, 4 y 9 revelaron la presencia de un infiltrado celular con abundantes linfocitos y células mononucleares, en el resto de las intradermoreacciones realizadas con las fracciones 2,3,5,6,7,10,11 y 12 se observó un leve infiltrado inflamatorio sin predominio específico del algún tipo de célula.

#### 4.-DISCUSIÓN

Desde la década de los cuarentas se ha intentado estudiar la respuesta inmune humoral y celular de las infecciones actinomicóticas y eumicóticas causantes del micetoma, la mayoría de las investigaciones se han sido realizado para entender la respuesta inmune humoral, empleándose diversos antígenos de eumicetos y de actinomicetos aerobios. La investigación inmunológica experimental en los actinomicetos causantes de esta enfermedad y los pacientes han contribuido al estudio de la fisiopatogenia y el diagnóstico de la enfermedad. Salinas y colaboradores identificaron 3 antígenos proteicos citoplasmáticos inmunodominantes de 61-, 26- y 24- kDa, (46) los cuales reaccionaban específicamente con sueros de pacientes con actinomicetoma causados por *N. brasiliensis* y no reaccionaban con sueros de pacientes con tuberculosis o lepra. Estas proteínas fueron aisladas y purificadas por Vera-Cabrera y colaboradores (49). Las proteínas de 24- y 26-kDa mencionadas anteriormente fueron utilizadas como antígenos para detectar anticuerpos en una prueba de ELISA desarrollada por Salinas y colaboradores en pacientes con actinomicetomas infectados con *N. brasiliensis* observándose una correlación entre los títulos de anticuerpos, el diagnóstico de la enfermedad y la respuesta terapéutica con antimicrobianos. En los

individuos con enfermedad activa los títulos de anticuerpos se encontraron elevados, en los curados los niveles de anticuerpos eran muy bajos o no detectables (47). En la actualidad esta prueba está disponible en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina UANL, en Monterrey, para el estudio serológico de infecciones causados por *N. brasiliensis* en los pacientes.

Kjelstrom y colaboradores. también desarrollaron un panel serológico para el reconocimiento de infecciones por *Nocardia* en modelos murinos, utilizando pruebas de ELISA empleando antígenos de filtrados de cultivo y extractos citoplasmáticos de *N. asteroides*. Estos autores demostraron que un extracto citoplasmático era altamente sensible para detectar anticuerpos mediante un estudio de inmunoensayo, sin embargo la especificidad de la reacción era baja, ya que cruzaba con sueros de pacientes infectados por micobacterias (23).

En el proceso de obtención de antígenos de filtrado de cultivo de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* se han utilizado en los últimos 30 años diversos medios como el de Proskauer y Beck, y el de Sauton, con los cuales se han obtenido varios antígenos, no determinándose las características antigénicas de sus componentes y tampoco su análisis electroforético. Considerando la experiencia previa en el laboratorio interdisciplinario de investigación dermatológica (LIDD), de que al utilizar estos medios de cultivo se obtenía una baja producción de biomasa y por lo tanto una producción muy limitada de proteínas, se decidió probar su crecimiento en un medio de cultivo diferente. Este fue

el RPMI 1640 el cual tiene como ventaja tener en su composición moléculas pequeñas de aminoácidos y azúcares. En el caso de otros medios de cultivo como el BHI este contiene una gran cantidad de peptona lo que podría inducir interferencia al momento de la purificación. En el estudio de las proteínas excretadas al filtrado de cultivo, utilizando el medio RPMI 1640 observamos una gran producción de proteínas excretado al medio. En la literatura revisada no encontramos reportes de la utilización de este medio para obtener antígenos del filtrado del cultivo. Otra ventaja importante en el empleo de este medio fue de que la tasa de crecimiento bacteriana de *N. brasiliensis* tanto en períodos de cultivos de 7 días y en períodos más largos fue muy buena, no encontrándose diferencia significativa en la cantidad de producción de proteínas. Esto contrasta con lo observado y reportado en *M. tuberculosis* donde se han reportado una diferencia cuantitativa en la producción de proteínas de excreción en períodos cortos y largos del crecimiento bacteriano (1).

En relación a la repuesta de hipersensibilidad tardía en infecciones por *Nocardia*, aunque se han hecho múltiples intentos por obtener un antígeno específico y reproducible esto aún no se ha logrado. Lo reportado en la literatura a partir de los años 40 es controversial. Como se ha podido observar en lo reportado en los diferentes trabajos antes mencionados. En sus estudios Almeida y Lacaz (16) no encontraron resultados positivos utilizando un filtrado de

cultivo de *N. brasiliensis* por lo que lo descartaron como un procedimiento útil en el diagnóstico del micetoma. En relación a *N. brasiliensis* González-Ochoa y Baranda lograron obtener un polisacárido con el que observaron reacciones positivas solamente en pacientes infectados por *N. brasiliensis* y reacciones negativas en pacientes infectados con microorganismos diferentes, pero encontraron que en infecciones experimentales en ratones y conejos con *N. brasiliensis* las reacciones fueron negativas, lo cual no ocurrió en nuestro trabajo (16). Bojalil y Magnusson en sus estudios probaron en pacientes con micetoma una prueba cutánea obtenida de un precipitado con TCA del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* y de *N. asteroides*, con los que encontraron resultados positivos en las pruebas cutáneas, y dieron reacciones cruzadas en los pacientes con tuberculosis y animales previamente sensibilizados con *M. tuberculosis*. En su trabajo no se determinó con exactitud el tipo de compuestos antigénicos utilizados (10). Por lo que posteriormente utilizaron extractos citoplasmáticos observando reacciones cruzadas en animales sensibilizados con lepra y/o tuberculosis (35). En todos los estudios antes mencionados todavía no se contaba con la tecnología que actualmente esta a nuestro alcance, ni se definió el tipo de compuestos antigénicos y su peso molecular.

En nuestra investigación observamos que los antígenos obtenidos de filtrado de cultivo fueron reconocidos por los sueros de pacientes con actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*. Es



importante enfatizar que los antígenos que reaccionaron con mayor intensidad y frecuencia fueron las proteínas de un peso molecular de 60-,40-, 28- y 26- kDa.

Con los resultados obtenidos en esta investigación con los antígenos de filtrado de cultivo, puede ser posible que algunas de estas proteínas pudieran tratarse del mismo tipo que las que fueron purificadas por Vera-Cabrera y colaboradores.

A través de los años y a pesar de los múltiples investigaciones sobre sustancias antigénicas que se han realizado con *Nocardia* no contamos en la actualidad con una prueba diagnóstica cutánea confiable para coadyuvar en el diagnóstico de estas infecciones, (14,16, 22, 28, 34, 36,37) como lo es en el caso del PPD que es una herramienta importante en el diagnóstico y pronóstico de las infecciones por *M. tuberculosis*. En esta bacteria se conoce que existen antígenos específicos obtenidos de filtrados de cultivos que producen una reacción cutánea de hipersensibilidad tardía bien definida (7). Es bien sabido que los miembros del género *Nocardia* y *Mycobacterium* por su cercanía filogenética tienen propiedades en común, y se han observado en ellos características similares en su morfología, en sus cultivos, en su quimiotaxonomía y particularmente sus características serológicas. En *M. tuberculosis* varios de los antígenos que difunden al medio de cultivo inducen una fuerte respuesta inmune celular y son utilizados como antígenos.

En nuestro proyecto evaluamos la respuesta inmune celular en cobayos previamente sensibilizados con *N. brasiliensis* observándose que el conjunto de proteínas de filtrado de cultivo obtenidas estimulan la respuesta inmune celular cuando utilizamos 50 y 75 microgramos de las proteínas del antígeno crudo. Al fraccionar estas se observó que algunas de ellas estimulan la respuesta inmune celular tardía y otras no. En el estudio de pruebas cutáneas de González-Ochoa en las cuales utilizó antígenos polisacáridos de *N. brasiliensis* las pruebas cutáneas fueron negativas en los animales de experimentación, positivos en los pacientes con micetoma. Nos llama la atención que el grado de eritema e induración no permanecía por más de 24 hrs., a diferencia de nuestro estudio en los cuales la positividad permaneció con la misma intensidad a las 72 hrs. post-inyección. Esto constituye una evidencia de que las proteínas del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* inducen una respuesta inmune celular. En estudios posteriores se podrá determinar si las proteínas de excreción (filtrado de cultivo) probadas en las pruebas cutáneas coinciden con las que reaccionaron con los sueros de pacientes con actinomicetoma.

La identificación de las proteínas de excreción que inducen una respuesta celular podría ser evaluada en pacientes para determinar su reactividad y especificidad en el diagnóstico y evaluación terapéutica de los pacientes que padecen esta enfermedad.

En esta investigación identificamos proteínas que difunden al medio de cultivo de *N. brasiliensis* y se logró implementar un método para su

producción utilizando el medio de cultivo RPMI 1640. Se demostró que no todas las fracciones antigénicas inducen una respuesta de hipersensibilidad tardía.

## 5.- CONCLUSIONES

1. Los sueros de los pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis* identifican proteínas de filtrado de cultivo de pesos moleculares relativos de 60-, 40-, 26- y 24- kDa.
2. El filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* es un inductor de hipersensibilidad retardada en cobayos previamente sensibilizados con *N. brasiliensis*.
3. Las fracciones del filtrado de cultivo que tienen mayor capacidad inductora de hipersensibilidad retardada son las de peso molecular relativo de 220-130-, 70-60-, 15-10- kDa.

## 5.1 CONTRIBUCIONES

*Nocardia brasiliensis*, es el agente etiológico más común del actinomicetoma en México, para lograr el diagnóstico es necesario realizar el aislamiento de la bacteria por medio del cultivo, y apoyarnos con el de pruebas inmunológicas diagnósticas y de pronóstico para esta enfermedad. Sin embargo no existe una prueba cutánea que nos ayude en este aspecto, particularmente debido a la falta de la caracterización de antígenos inmunodominantes y específicos de *Nocardia brasiliensis*.

En el presente trabajo se logró identificar proteínas de excreción de *N. brasiliensis* y comprobar que inducen una respuesta inmune humoral y celular en el hospedero. Con los resultados que obtuvimos logramos desarrollar un método para la obtención de proteínas de excreción de *N. brasiliensis* al medio de cultivo en mayores cantidades, pues en otros medios de cultivo utilizados como el Proskauer y Beck, Long, Sauton entre otros, no se había logrado una producción importante de esta variedad de antígenos de filtrado de cultivo.

El presente estudio abre la posibilidad de utilizar antígenos de filtrado de cultivo para analizar la respuesta inmune celular y humoral como método diagnóstico y de evaluación terapéutica.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, and Heron I.** 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun.* **59**: 1905–1910.
2. **Angeles A.M. and Sugar A.M.** 1987. Rapid diagnosis of Nocardiosis with enzyme immunoassay. *The Journal of infectious Diseases.* **155**: 292-296.
3. **Angeles AM, Sugar A M, Carter HV.** 1874. On mycetoma or the Fungus Disease of India. J & A Churchill: London.
4. **Arenas R.** 2003. *Micología Médica Ilustrada.* Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F.
5. **Beaman B.L. and Beaman L.** 1994. *Nocardia* species: Host-parasite relationships. *Clinical Microbiology Reviews.* **7**: 213-264.
6. **Beaman, B.L.** 1993. Nocardial Infections. In: Murphy J.W, Friedman H, Bendinelli M. eds. *Fungal Infections and Immune Responses.* New York: Plenum Press, p, 553-554.
7. **Berthet, F. X., P. B. Rasmussen, I. Rosenkrands, P. Andersen, and B. Gicquel.** 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* **144**:3195-3203.
8. **Boiron, P.** 1997. *Nocardia*, Host defenses and immune diagnosis. In: Jacobs PH, Nall L (Ed), *Fungal disease. Biology, immunology, and diagnosis.* Marcel Dekker :265-79.
9. **Boiron O, Locci R, Goodfellow M, et al.** 1998. *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma. *Med Mycol* **36** (suppl 1):26-37.
10. **Bojalil L. F., Magnusson M.** 1963. Specificity of skin reaction of human to *Nocardia* sensitins. *Am. Rev. Resp. Dis.* **88**: 409-411.
11. **Bonifaz, A.** 1990. *Micología Médica Básica.* Primera edición. Editorial Francisco Méndez Cervantes. México, D. F. p.135-160.

150074

12. **Bout G, Lavallo P, Mariat F, SÚchil P.** 1987. Etude épidémiologique des mycetomes au Mexique. A propos de 502 cas. *Bull Soc Path Exot.* **80**: 329-39.
  
13. **Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
  
14. **Drake, C, H; and A. T. Henrici.** 1943. *Nocardia asteroides*: Its pathogenicity and allergic properties. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* **48**:184-198.
  
15. **González Ochoa, A; and F. Vazquez-Hoyos.** 1953. Serologic relation of the principal pathogenic Actinomycetes *Rev Inst Salubr Enferm.Trop.* **33**:177-187.
  
16. **González-Ochoa and F. Baranda.** 1953. A cutaneous test for diagnosis of actinomycotic mycetoma caused by *N. brasiliensis*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm.Trop. México,* **13**:189-197.
  
17. **Gonzalez-Ochoa A., Shibayama H, Felix D. and Anaya M.** 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. 12<sup>th</sup> Intern. Congr. Dermatol. Excerpt. Med. International. Congr. Series No. **55**:542-551.
  
18. **Gonzalez-Ochoa, A.** 1973. Virulence of *Nocardia*. *Canadian Journal of Microbiology.* **19**: 901-904.
  
19. **Gupta R., Panchoi V., Vinayak V.K. and Khuller G. K.** 1985. Immunological responses to protein. Carbohydrate and lipid fractions of *Nocardia asteroides* in mice. *Journal of Medical Microbiology* **20**:263-274.
  
20. **Hay RJ, Mahgoub ES, Leon A, Al Sogair S, Welsh O.** 1992. Mycetoma. *J Med Vet Mycol. (Suppl.1)*:41-9.
  
21. **Harrington M. G.** 1990. Elution of protein from gels. In *Guide to protein Purification, Methods in Enzymology. Volume 182* .p488-495. Edited by Deutscher M.P. Academic Press. San Diego, CA. USA.
  
22. **Keeler, R. F. and A. C. Pier.** 1965. Extracellular antigens of *Nocardia asteroides*. II. Fractionation and chemical characterization. *Am. Resp. Dis;* **91**: 400-408.

23. **Kjelstrom, J. A. and Beaman, B.L.** 1993. Development of a Serologic Panel for the Recognition of Nocardial Infections in a murine. *Diag Microbiol Infect Dis*, **16**:291-301.
24. **Kwapinski, J, B, and H.P.R. Seeliger.** 1965. Investigations on the antigenic structure of actinomycetales. IX Serological classification of the nocardie with the polysaccharide fractions of their cell walls. *Mycopathol*, **25**, 173-182.
25. **Laub R, Delville J, Cocito C.** 1978. Immunological relatedness of ribosomes from mycobacteria, nocardie and corynebacteria, and microorganisms in leprosy lesions. *Infect Immun*; **22**:540-547.
26. **López-Martínez, R, Méndez TR, Lavallo P, Welsh O, Saul A, Macotela-Ruiz E.** 1992. Epidemiology of Mycetoma: study of 2,105 cases. *Gac Med. Mex.* **128**. 477-481.
27. **Macotela Ruiz, E.** 1962. Características Inmunológicas de los actinomicetes patógenos para el hombre-sus relaciones serologicas según la técnica de anticuerpos fluorescentes. *Dermatología Trópica*. Vol. 1, No. 3, October-December 1962.
28. **Magnusson M, Mariat F.** 1968. Delineation of *Nocardia asteroides* by delayed type skin reaction on guinea pigs. *J. Gen Microbiol.***51**.151-158.
29. **Mariat F, Destombes P, Segreting.** 1973. The mycetomas: clinical features, pathology, etiology and epidemiology. *Contrib Microbiol Immunol.* **4**:1-39. Review.
30. **Mahgoub E.S. Gamma S.A.** 1977. Immunological status of micetoma patients. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* **70**:48-54.
31. **McNeil. Michael and Brown, J.** 1994. The Medically important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical microbiology Reviews*, p. 357-417.
32. **Merril C. R. Dunau M . L. and Goldman D** 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **110**:201-207.
33. **Noonan D.** 1994. The Guinea Pig (*Cavia porcellus*). *Anzccart News* Vol.7.



34. **Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Contreras M.F** 1972. Delayed hypersensitivity to polysaccharides from *Nocardia*. *J Immunol*, **108**:1409-1413.
35. **Ortiz-Ortiz L, Contreras MF**, 1972. Cytoplasmic antigens from *Nocardia* eliciting a specific delayed hypersensitivity. *Infect Immun* **5**: 879-882.
36. **Ortiz L, Bojalil L F.** 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. *Clin Exp Immunol*; **12**:225-229.
37. **Ortiz-Ortiz L, Contreras MF and Bojalil L. F.** 1972. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from *Nocardia*. *Sabouraudia*, **10**: 147-151.
38. **Pinoy E.** 1913. Actinomycoses and mycetomes. *Bull. Inst. Pasteur*. **11**:929-938.
39. **Rico G., Ochoa R., Oliva A., Gonzalez-Mendoza A. Walker S.M. and Ortiz Ortiz L .** 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *The Journal of Immunology*. **129**:1688-1693.
40. **Rippon J W.** 1988. *Medical Mycology . The pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3<sup>rd</sup> Ed. Philadelphia. WB. Saunders; 80-118.
41. **Rodríguez et al.** 1996. Investigation of the Temporal Humoral Immune Response in a Murine Model of actinomycetoma. *PRSHSJ*. June Vol. **15**. No. 2.
42. **Salinas-Carmona, M.C.** 2001. Anticuerpos Anti-*Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomycetoma y su utilidad clínica. *Gac. Med.Méx.* **137** No.1.
43. **Salinas-Carmona M.C, Torres-Lopez E.** 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infect Immun Infection*; May, P, 2428-2432.
44. **Salinas-Carmona M. C, Pérez L, Welsh O, Rodríguez M and Rinaldi M. G.** 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Méd.* **2**:1-6.

45. **Salinas-Carmona M.C, Torres-Lopez E.**1996. Role Of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Ann NY Acad Sci* **797**:263-265.
46. **Salinas-Carmona M.C, Vera L, Welsh O, and Rodríguez M.**1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* **276**:390-7.
47. **Salinas-Carmona MC, Welsh O, and Casillas S.M.**1993. Enzyme- linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiology.* **31**:2901-2906.
48. **Sugar A. M., Schoolnik G. K. Stevens D. A.** 1985. Antibody response in human nocardiosis: Identification of two immunodominant culture-filtrate antigens derived from *Nocardia asteroides*. *The Journal of infectious Diseases.* **151**:895-901.
49. **Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC Welsh O Rodríguez M.** 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigen from *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol*, **30**:1183-8.
50. **Vera-Cabrera L, Rodríguez-Quintanilla M, Boiron P, Salinas-Carmona MC.** 1998. Experimental Micetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J. Mycol Med*, **8**,183-187.
51. **Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jacobsen, S., Rasmussen, P. B., Elhay, M. J., Andersen, P.** 1998. Two-Dimensional Electrophoresis for Analysis of Mycobacterium tuberculosis Culture Filtrate and Purification and Characterization. *Infect Immun.* 1998. **66** (8): 3492-3500.
52. **Welsh O, Salinas-Carmona MC, Rodríguez MA** 1996. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma. In: *Current Topics in Medical Mycology*. Vol. **6**. P.47-71. Edited by Borges M. Hay R. and Rinaldi M.G. J.R. Prous Science Publishers. Barcelona. España.
53. **Welsh, O., Salinas-Carmona M.C. and Rodríguez M.A.** 1994. Mycetoma. In: *Infectious diseases*, 5Th. Ed. **174**: 1402-1406
54. **Welsh O.** 1991. Mycetoma. Current concepts in treatment. *Int J Dermatol.* **30**:387-398

55. **Weldingh K, Hansen A, Jacobsen S and Andersen P.** 2000. *High Resolution Electroelution of Polyacrilamide Gels for the Purification of Single Proteins from Mycobacterium tuberculosis Culture Filtrate.* Scand. J. Immunol. **51**:79-86.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFC	Antígenos de filtrado de cultivo
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
cm	Centímetros
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
Fig.	figura
°C	grado centígrado
g	gramo
H y E	Hematoxilina y eosina
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
hrs.	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodaltones
L	Litros
2-ME	2-mercaptoetanol
µg	microgramos
µl	microlitros
mg	miligramos
ml	mililitros

M	molar
mA	miliamperios
µg	microgramos
µl	microlitros
mM	milimolar
mm	milímetros
NaOH	hidróxido de sodio
NaCl	cloruro de sodio
NCTCC	National Collection of Type Culture
nm	nanómetros
Pág.	Página
PBS	amortiguador de fosfatos-salina
pH	potencial de hidrogeniones
PM	peso molecular
% p/v	porcentaje peso/volumen
% v/v	porcentaje volumen/volumen
%/ T	porcentaje total de poliacrilamida en el gel
% C	porcentaje de bisacrilamida en el total de acrilamida
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio
SDS	Lauryl Sulfato de Sodio

TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N'N-Tetrametiletilendiamina
UFC	Unidades formadoras de colonias
U	Unidades
V	Voltios
W	Watts

## **APENDICE**

## APENDICE A

### PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA

1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

1.1 Gel de corrimiento al 12%

Agua Destilada	6.8ml	1.36ml
Acilamida-Bis Acilamida ( 30%T,0.8%w/v)	8ml	1.6ml
Amortiguador Tris-HCl 3.02M, Ph 8.8	5ml	1ml
SDS 20% ( p/v )	0.1ml	20µl
Persulfato de Amonio 10% ( p/V )	0.1ml	20µl
TEMED	0.010ml	2µl

Se utilizó un formador de gradiente (BIO-RAD) el cual se dejó polimerizar durante 1 hora colocando agua destilada sobre la superficie del gel formando una interfase.

1.1 Gel de Empaquetamiento al 4% T o 0.125 Molar

Antes de colocar el gel de empaquetamiento se secó con papel filtro y se colocó el peine de teflón con los carriles deseados.

Agua Destilada	3.075 ml	615 µl
Acilamida-Bis-Acilamida ( 30%T,0.8w/v)	0.670 ml	134 µl
Amortiguador Tris-HCl 1M, pH6.8	1.250 ml	250 µl



SDS 20% (w/v)	0.025 ml	5 $\mu$ l
Persulfato de Amonio 10% (p/v) APS	0.025 ml	5 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l

Después de polimerizado el gel, se sacó el peine y se lavaron los pozos con agua destilada.

2. - Electroforesis en gel de policrilamida en condiciones desnaturizantes SDS al 15%.

### 2.1 Geles de Corrimiento al 15%

	Gel grande	Gel pequeño
Agua Destilada	4.8 ml	960 $\mu$ l
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	5.0 ml	1.0 ml
Acrilamida-Bis- Acrilamida ( 30% T)	10 ml	2.0 ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	100 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	2 $\mu$ l

### 2.2 Gel Empaquetamiento al 4% T

Antes de colocar el gel de empaquetamiento se secó con papel filtro y se colocó el peine de teflón con los carriles deseados.

Agua Destilada	3.075 ml	615 $\mu$ l
Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T,0.8w/v)	0.670 ml	134 $\mu$ l

Amortiguador Tris-HCl 1M, pH6.8	1.250 ml	250 $\mu$ l
SDS 20% (w/v)	0.025 ml	5 $\mu$ l
Persulfato de Amonio 10% (p/v) APS	0.025 ml	5 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l

