

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS  
PROTEASAS DE *Nocardia brasiliensis* Y SU EFECTO  
INDUCTOR DE PROTECCION EN EL MICETOMA  
EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c.

POR

ANGEL LICON TRILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología

ABRIL, 1997

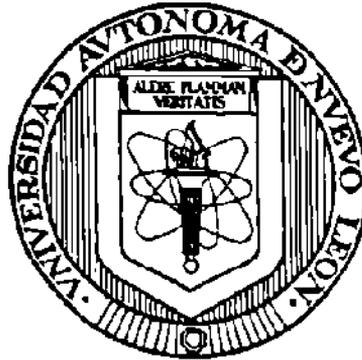
TD  
QR82  
.N6  
L5  
C.1



1080071213

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEASAS  
DE *Nocardia brasiliensis* Y SU EFECTO INDUCTOR DE PROTECCION  
EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c.**

**Por**

**ANGEL LICON TRILLO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología.**

**Abril, 1997.**

TM  
QR82  
.N6  
LS



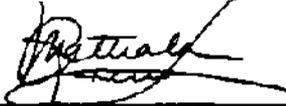
**ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEASAS  
DE *Nocardia brasiliensis* Y SU EFECTO INDUCTOR DE PROTECCION  
EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c.**

Aprobación de la Tesis:



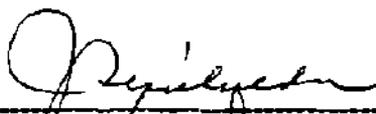
---

Dr. Mario César Salinas Carmona.  
Asesor Doctoral.



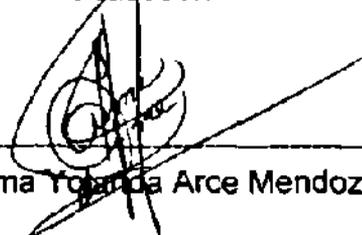
---

Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda.  
Coasesora.



---

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.  
Coasesor.



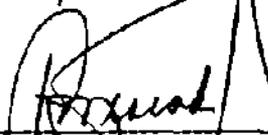
---

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza.



---

Dr. Oliverio Welsh Lozano.



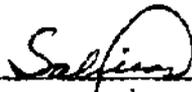
---

Dr. Roberto Mercado Longoria.  
Subdirector de Investigación y Estudios  
de Posgrado.

**ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEASAS  
DE *Nocardia brasiliensis* Y SU EFECTO INDUCTOR DE PROTECCION  
EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c.**

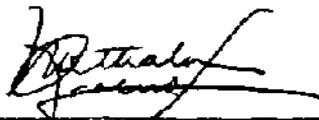
Presentado por: QBP MC Angel Licón Trillo

Este trabajo se realizó en los Departamentos de Inmunología e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona y la coasesoría de la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda y el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra. Apoyado parcialmente por CONACYT: proyectos M9201/F-123, 2143-M9303 y F226-S9207; y por la Universidad Autónoma de Nuevo León.



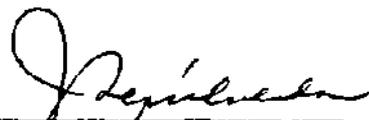
---

Dr. Mario César Salinas Carmona.  
Asesor Doctoral.



---

Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda.  
Coasesora.



---

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.  
Coasesor.

## **DEDICATORIA.**

**"No puedo dar a ningún científico de cualquier edad mejor consejo que éste: la intensidad de la convicción de que una hipótesis es cierta no tiene ninguna influencia sobre si es cierta o no"**

**Peter B. Medawar.**

### *In memoriam*

**En un sincero y humilde homenaje a los maestros:**

**Dr. Jesús Guerra Medina**

**Dr. Rodolfo Pérez Reyes**

**Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla**

**Honor a quien honor merece,**

**al maestro, al amigo, que siempre permanecerá en nuestro corazón y que forma parte de nuestro actuar y pensar ante la vida.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por haber depositado su confianza en mí y haberme dado la oportunidad de realizar este postgrado.**

**A la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda y al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su gran interés y colaboración en el desarrollo de este trabajo.**

**A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y al Dr. Oliverio Welsh Lozano por su colaboración y evaluación del trabajo.**

**A la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda por su amistad y enseñanza analítica de la Inmunoquímica.**

**Al Dr. Carlos Medina de la Garza por su amistad y compañerismo siempre a disposición de todos.**

**A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez por su trato siempre amable y cordial.**

**Al Dr. Luis Jimenez Zamudio y a la Dra. Martha Céspedes de Gómez por haberme iniciado en el campo científico de la Inmunología.**

**Al Dr. Rodolfo Pérez Reyes quién me dió la oportunidad de aprender a su lado un poco de su amplia experiencia en el estudio de la Parasitología.**

**A la Dra. Margarita Escobedo Gameros por mostrarme el camino de la ciencia como alternativa para desarrollar en la vida.**

**A mis compañeros del Departamento de Investigación de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por su solidaridad y apoyo que recibí para lograr este objetivo.**

**A mi familia, a la cual involucré en este proyecto en que sacrificamos nuestra convivencia diaria, pero que espiritualmente nos acercó más.**

**A Silvia Casillas Quintana, Angeles Castro Corona, Verónica López Zuñiga e Irma Martínez Dávila, por su sincera amistad y por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.**

**A Alma Isabel Ramos Cano, Catalina Rivas Morales, Luz Isabel Pérez Rivera, Ernesto Torres López, Luis Edgar Rodríguez Tovar y Julio Cordova por su amistad y compañerismo.**

**A Roberto Rangel, Carlos García, Eva Tamez, Anna Velia Vazquez, Sonia Roblero y Leslie García.**

**A Paula Cordero y Gloria Molina por su amistad.**

**Al Departamento de Histología: José Ruiz Ordoñez, Esaú García Salinas, Raquel Ballesteros, Rosa María Leal, y Saúl Martínez, por su colaboración.**

**A Betty, Aracely, Lizzy, Martita, Mónica e Hilda.**

**A Frank, Carlitos, Santana, Reynaldo, Victor, Don Juan y Don Manuel.**

**A Sam por darme la oportunidad de conocer la Ciudad de Monterrey desde sus cimas El Piloto en el Cerro de las Mitras, La Eme en la Sierra de Chipinque, y El Pico Norte en el Cerro de la Silla.**

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	xv
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
1. Origen de los Reactivos	13
2. Material Biológico	13
2.1 Cepa de Ratones	13
2.2 Cepa Bacteriana de <i>Nocardia brasiliensis</i>	13
3. Obtención del Extracto Celular Crudo de <i>Nocardia brasiliensis</i>	14
3.1 Preparación del Inóculo de <i>Nocardia brasiliensis</i>	14
3.2 Obtención de Masa Bacteriana	15
3.3 Obtención del Extracto Celular Crudo	15
4. Determinación de Proteínas por el Método de Bradford	16
5. Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes ( SDS-PAGE )	16
5.1 Tinción de Coomassie	17
5.2 Tinción con Nitrato de Plata	17
6. Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida en Condiciones No-desnaturalizantes ( Nativa )	18
7. Determinación de Actividad Caseinoltica	18
7.1 Determinación Cualitativa	18
7.1.1 Zimograma de Punto	19
7.1.2 Zimograma por Contacto en Geles de Poli- acrilamida	19

7.2	Determinación Cuantitativa	20
8.	Purificación de una Proteasa Caseinolítica de <i>N. brasiliensis</i>	21
8.1	Cromatografía de Intercambio Iónico	21
8.2	Electroelución de las Proteasas de Geles Preparativos en Condiciones Nativas	22
8.2.1	Electroforesis Preparativa	22
8.2.2	Identificación de la Actividad Caseinolítica	23
8.2.3	Electroelución de las Enzimas Caseinolíticas	23
9.	Caracterización Bioquímica Parcial de las Proteasas Caseinolíticas de <i>Nocardia brasiliensis</i>	24
9.1	Determinación de Masa Molecular por Cromatografía de Filtración en Gel ( Sephadex G-100 )	24
9.2	Determinación de Masa Molecular por SDS-PAGE	24
9.3	Isoelectroenfoque Analítico	25
9.4	Estabilidad Térmica de las Proteasas	26
9.4.1	Estabilidad Térmica de las Proteasas a 37, 45 y 56°C	27
9.4.2	Estabilidad Térmica de las Proteasas a 4°C	27
9.4.3	Electroforesis-Zimograma de la Muestras de Proteasas que Mostraron Autohidrólisis	27
9.5	Clasificación Catalítica de las Proteasas	27
9.5.1	Técnica de Electroforesis-Zimograma	28
9.5.2	Ensayo de McLaughlin y Faubert	28
10.	Determinación de la Inmunogenicidad de la Proteasa de 38 kDa en Ratones BALB/c	29
10.1	Esquema de Inmunización	29
10.1.1	Inmunización	29
10.1.2	Inmunización con Extracto Celular Crudo de <i>N. brasiliensis</i>	31

10.2	Determinación de Anticuerpos Anti-proteasa por una Técnica de ELISA	31
10.2.1	Sensibilización de las Placas de Poliestireno con Antígeno	31
10.2.2	Bloqueo	31
10.2.3	Reacción del Primer Anticuerpo	32
10.2.4	Reacción del Segundo Anticuerpo	32
10.2.5	Revelado	32
11.	Efecto de la Inmunización Activa y Pasiva con Proteasas de <i>N.brasiliensis</i> en el Micetoma Experimental en Ratones BALB/c	33
11.1	Estudio de la Inmunización Activa y Pasiva con la Proteasa de 38 kDa en Ratones BALB/c en el Establecimiento de la Infección	33
11.1.1	Inmunización Activa y Pasiva	34
11.1.1.1	Inmunización Activa	34
11.1.1.2	Inmunización Pasiva	35
11.1.2	Infección Experimental en Ratones BALB/c	35
11.1.2.1	Cuantificación de Bacterias	35
11.1.3	Observación Macroscópica del Establecimiento de la Infección	36
11.1.4	Estudio Histológico de las Lesiones	36
11.1.4.1	Descalcificación de las Muestras	37
11.1.4.2	Deshidratación e Inclusión	37
11.1.4.3	Cortes Histológicos y Tinción H y E	38
11.1.4.4	Tinción de Kinyoun	38
11.1.5	Estudio de la Respuesta de Anticuerpos contra la Proteasa de 38 kDa	38

11.2	<b>Estudio del Efecto de la Inmunización Activa y Pasiva con la Proteasa de 38 kDa en el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones BALB/c</b>	<b>39</b>
11.2.1	Obtención de Suero de Ratón para la Inmunización Pasiva	39
11.2.2	Inmunización Activa	41
11.2.3	Inmunización Pasiva	42
11.2.4	Observación Macroscópica del Desarrollo del Micetoma Experimental	42
11.2.5	Ensayo de ELISA para Determinar el Grado de Respuesta de Anticuerpos contra la Proteasa de 38 kDa	43
11.3	<b>Caracterización Parcial por ELISA de los Sueros usados en la Inmunización Pasiva</b>	<b>43</b>
11.3.1	ELISA anti <i>Nocardia brasiliensis</i>	43
11.3.2	Determinación de Isotipo por ELISA	43
	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
1.	Obtención del Extracto Celular Crudo de <i>N. brasiliensis</i>	45
2.	Aislamiento y Purificación de una Proteasa Caseinolítica	45
2.1	Cromatografía de Intercambio Iónico	45
2.2	Electroelución de la Proteasa Superior	48
3.	Caracterización Bioquímica Parcial de las Proteasas	48
3.1	Determinación de Masa Molecular	48
3.1.1	Cromatografía de filtración en Gel	48
3.1.2	Electroforesis SDS-PAGE	50
3.2	Determinación de Punto Isoeléctrico	52
3.3	Efecto de la Temperatura en la Estabilidad de las Proteasas en el Extracto Celular Crudo	52
3.4	Ensayo de Inhibición para la Clasificación Catalítica de las Proteasas	52

4. Inmunogenicidad de la Proteasa de 38 kDa	57
5. Efecto de los Anticuerpos Anti-Proteasa de 38 kDa en Ratones BALB/c en la Implantación y Desarrollo del Micetoma Experimental por <i>Nocardia brasiliensis</i>	59
5.1 Estudio del Efecto Protector Inducido por la Inmunización Activa y/o Pasiva en el Establecimiento de la Infección	59
5.2 Estudio del Efecto Protector Inducido por la Inmunización Activa y/o Pasiva en el Desarrollo del Micetoma Experimental	69
5.3 Caracterización Parcial por ELISA de los Sueros usados en Inmunización Pasiva	78
DISCUSION	83
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFIA	90
LISTA DE ABREVIATURAS	98
APENDICES	101
APENDICE A. GELES DE POLIACRILAMIDA	102
APENDICE B. TECNICAS DE INCLUSION Y TINCION	106
APENDICE C. COLORANTES	108

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Diagrama de Flujo del Proceso de Aislamiento de las Proteasas de <i>Nocardia brasiliensis</i>	22
2. Electroforesis SDS-PAGE en el Aislamiento de las Proteasas de <i>N. brasiliensis</i>	46
3. Electroforesis Nativa-Zimograma en el Aislamiento de las Proteasas de <i>N. brasiliensis</i>	47
4. Zimograma de Autodigestión Parcial de Muestras de Extracto Celular Crudo de <i>N. brasiliensis</i>	54
5. Zimograma de Muestras de Extracto Celular Crudo en la Determinación de la Clase Catalítica de las Proteasas	56
6. Inmunogenicidad de la Proteasa de 38 kDa en Ratones BALB/c	58
7. Implantación de la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> en el Cojinete Plantar de Ratones BALB/c	62
8. Registro de Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Durante la Implantación de la Infección Experimental	63
9. Microfotografía de Cojinete Plantar de Ratones Infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i>	64
10. Microfotografía de Cojinete Plantar con Gránulos de <i>N. brasiliensis</i> y Reactividad Osea	65
11. Microfotografía de Cojinete Plantar con Macrófagos	66
12. Impronta de la Secreción del Cojinete Plantar de Ratones BALB/c Infectados con <i>N. brasiliensis</i> , mostrando filamentos ácido-resistentes	67

13. Impronta de la Secreción del Cojinete Plantar de Ratones BALB/c Infectados con <i>N. brasiliensis</i> , mostrando gránulo y macrófago	68
14. Determinación de Anticuerpos Anti-Proteasa en Sueros de Ratón durante la Implantación de la Infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> mediante ELISA	69
15. Desarrollo del Micetoma Experimental en los Ratones BALB/c	72
16. Medición de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Inmunizados Activamente entre 30 y 150 Días Postinfección	73
17. Medición de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Inmunizados Pasivamente con Suero de 30 Días en el Desarrollo del Micetoma	74
18. Medición de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Inmunizados Pasivamente con Suero de 60 Días en el Desarrollo del Micetoma	75.
19. Determinación de Anticuerpos Anti-proteasa Durante el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones Inmunizados Activamente	76.
20. Determinación de Anticuerpos Anti-proteasa Durante el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones Inmunizados con Suero de 30 días	77
21. Determinación de Anticuerpos Anti-proteasa Durante el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones Inmunizados con Suero de 60 días	78

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
I. Purificación de Proteasas de <i>Nocardia brasiliensis</i> a Partir de un Extracto Celular Crudo	49
II. Determinación de Masa Molecular de las Proteasas de <i>N. brasiliensis</i> por Sephadex G-100	50
III. Determinación de Masa Molecular de las Proteasas de <i>N. brasiliensis</i> por SDS-PAGE	51
IV. Determinación de Punto Isoeléctrico de las Proteasas de <i>N. brasiliensis</i>	53
V. Ensayo de Inhibición de las Proteasas de <i>N. brasiliensis</i> para Determinar su Clase Catalítica. Técnica de McLaughlin y Faubert	55
VI. Desarrollo de Micetoma en los Ratones Inmunizados Activa y Pasivamente	71
VII. Determinación de Anticuerpos Anti-Extracto Celular Crudo, Anti-Extracto Semipurificado y Anti-Proteasa de 38kDa en los Sueros Transferidos Pasivamente a los Ratones BALB/c	80
VIII. Determinación por ELISA del Isotipo de los Anticuerpos Anti-Extracto Celular Crudo en los Sueros de Ratón Usados en la Inmunización Pasiva	81
IX. Determinación por ELISA del Isotipo de los Anticuerpos Anti-Proteasa en los Sueros de Ratón Usados en la Inmunización Pasiva	82

## RESUMEN.

Angel Licón Trillo

Fecha de Obtención del Grado: Abril de 1997

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio: ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS  
PROTEASAS DE *Nocardia brasiliensis* Y SU EFECTO  
INDUCTOR DE PROTECCION EN EL MICETOMA  
EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c**

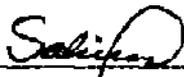
Número de Páginas:109

**Candidato al Grado de Doctor  
en Ciencias con Especialidad  
en Inmunología**

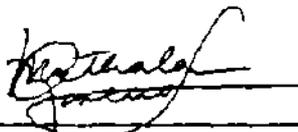
### Area de Estudio: Inmunología

**Propósito y Método del Estudio:** *N. brasiliensis* produce una serie de proteasas que pudieran estar involucradas en los mecanismos de virulencia de la bacteria. El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la inmunogenicidad de las proteasas y su posible efecto inductor de protección en el micetoma experimental en ratones BALB/c. Las proteasas se aislaron a partir de extractos celulares crudos de *N. brasiliensis*, en columnas de DEAE-celulosa, y posteriormente se purificaron por electroelución en geles preparativos de poliacrilamida. La inmunogenicidad de una de las proteasas aislada en ratones BALB/c, se determinó midiendo la respuesta de anticuerpos en el suero de los ratones mediante un ensayo de ELISA contra la enzima. El posible efecto protector de la proteasa fue determinado en experimentos de inmunización activa y pasiva en los ratones, los cuales fueron infectados en el cojinete plantar, y la inmunoprotección fue evaluada macroscópicamente y mediante el mismo ensayo de ELISA hasta los 150 días postinfección.

**Contribuciones y Conclusiones:** La proteasa aislada con un grado de purificación de 60.9, presentó una masa molecular de 42 kDa en condiciones nativas y de 38 kDa bajo condiciones desnaturizantes. Esta enzima, caracterizada como serina proteasa y que mostró un pI de 5.2, resultó ser inmunogénica para los ratones BALB/c. La respuesta inmune montada contra la proteasa modificó el desarrollo de micetomas experimentales en ratón. La inmunización activa de los ratones con emulsión de proteasa-AIF previno en un 100% el desarrollo de actinomicetoma. La inmunización pasiva de los ratones con sueros inmunes recolectados a los 30 días postinmunización, protegió parcialmente a los animales del desarrollo de la infección, mientras que la inmunización con suero de 60 días no confirmó protección.



Dr. Mario César Salinas Carmona  
Asesor Doctoral



Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda  
Coasesora



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra  
Coasesor

## INTRODUCCION.

Los géneros bacterianos *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium* están filogenéticamente relacionados ( 24, 34,38 ), clasificándose los tres últimos, según el manual Bergey de Bacteriología, en el orden de los Actinomycetales ( 22,37 ). Se han desarrollado diversas técnicas taxonómicas para diferenciar los géneros bacterianos, algunas de ellas basadas en el análisis químico de los constituyentes de pared celular, en donde se ha clasificado a los cuatro géneros anteriores por poseer carbohidratos de pared celular tipo IV y un patrón de azúcares de células totales tipo A ( arabinosa y galactosa ) ( 22,24,37 ) y además poseen ácidos micólicos cuyas cadenas varían entre 20-38, 34-66, 46-60, y 60-90 átomos de carbono respectivamente ( 24,34,37,39,58 ). Otra técnica utilizada en la clasificación bacteriana es el estudio de las características de sus ácidos nucleicos, donde los mismos géneros presentan un alto contenido ( porcentajes molares ) de guanina y citosina: 52-68%, 59-69%, 60-72%, y 62-70% respectivamente ( 34,47 ). Los criterios taxonómicos anteriores nos dan una idea de las similitudes bioquímicas y estructurales que existen entre estas bacterias, las cuales se observan en las reacciones cruzadas entre sueros inmunes contra uno u otro de los géneros mencionados ( 26,60,64 ). Las bacterias del género *Mycobacterium* son ácido-alcohol resistentes, mientras los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* lo son parcialmente con la técnica de Kinyoun ( 5,24,58,69 ). El lípido LCN-A de *Nocardia* se encuentra presente también en la pared celular del género *Rhodococcus* ( 58 ). Goodfellow y Minnikin en 1977, definieron al género *Nocardia* como actinomicetos Gram positivos, aeróbios, de desarrollo lento en el laboratorio, que producen un micelio aéreo primario que se fragmenta en elementos cocoides y bacilares ( 17,23,69 ), mientras que *Mycobacterium* y *Rhodococcus* no forman micelio aéreo ( 58 ). El tamaño de los

filamentos ramificados en el micelio aereo varia de 0.3 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro ( 52,69 ).

*Nocardia* spp está ampliamente distribuida en el suelo ( 69 ), descomponiendo sustancias orgánicas complejas como celulosa, proteínas, polisacáridos, lípidos, parafinas y otras fuentes de carbono y energía ( 17,38 ). Entre las especies más importantes clínicamente se encuentran *N. asteroides* subgrupos A y B, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* ( 37 ).

Las colonias de diferentes especies de *Nocardia* cuando crecen en agar Sabouraud pueden ser lisas y húmedas, o rugosas, con una superficie aterciopelada debida al micelio aereo ( 38 ). Cuando crecen en un medio líquido como el medio infusión cerebro-corazón (BHI) se origina habitualmente la formación de una película superficial seca y cerosa. Cuando *N. brasiliensis* se cultiva en agar dextrosa Sabouraud, muestra colonias secas, con aspecto cerebriforme y pigmentadas de color naranja ( 69 ). Debido a la producción de pigmentos de tipo carotenoides, las colonias adquieren coloraciones entre amarillo, naranja, rosa o rojo ( 38 ).

De acuerdo a las características clínicas y anatomopatológicas de las infecciones por *Nocardia* spp, se han clasificado éstas en 6 formas que son: nocardiosis pulmonar; nocardiosis sistémica ( involucrando 2 o más sitios ); nocardiosis de sistema nervioso central; nocardiosis extrapulmonar; nocardiosis cutánea, subcutánea y linfocutánea; y actinomicetoma ( 7 ). *N. asteroides* es el principal agente etiológico de la nocardiosis, mientras que *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* lo son del micetoma actinomicósico; aunque en un porcentaje muy bajo se observa la manifestación contraria ( 31,32,33,69 ).

Generalmente la nocardiosis es una enfermedad que afecta los pulmones y puede llegar a diseminarse. En la enfermedad pulmonar, las

lesiones pueden encontrarse dispersas por todo el parénquima o bien adquirir la forma de un absceso grande y confluyente. Las lesiones se caracterizan histológicamente por la existencia de supuración, con granulación y fibrosis del tejido que rodea las áreas de necrosis. *N. asteroides* se encuentra dispersa en los abscesos en forma de filamentos enmarañados, finos y ramificantes formando el llamado pseudogránulo, donde también se encuentran densamente empacados leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas, linfocitos y fibrina ( 37 ). A menudo las bacterias se diseminan por el torrente sanguíneo y forman abscesos metastásicos en los tejidos subcutáneos y en el sistema nervioso central. Las lesiones cerebrales y meníngeas presentan una alta mortalidad ( 37 ). La nocardiosis generalmente se presenta en individuos inmunocomprometidos como una infección oportunista ( 6,37,43 ), como ocurre en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida ( 1,2,65 ), durante la terapia postransplante o neoplásica ( 13 ), y en diabetes mellitus ( 33 ). En cambio en el micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*, éste aparece principalmente en individuos inmunocompetentes ( 43 ).

En los pacientes infectados con *Nocardia brasiliensis* se observa una celulitis pustular, localizada alrededor del área de trauma contaminada con tierra o material vegetal en descomposición ( 2,31,54 ). La enfermedad suele afectar principalmente miembros inferiores ( pie ), ocasionalmente las manos y el tronco, pero ha sido reportado en muchas otras localizaciones del cuerpo. El microorganismo probablemente penetra por implantación traumática en el tejido. Un sitio frecuentemente afectado es la planta del pie, iniciándose con una pequeña hinchazón subcutánea que lentamente aumenta de volumen y se reblandece. Al romperse la superficie, se forman fistulas y el proceso va penetrando en tejidos más profundos, causando inflamación y deformación del pie. El producto de exudación de las fistulas es un líquido filante y/o purulento, que contiene acúmulos bacterianos en estructuras llamadas "gránulos" de 30 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro ( 72 ). En general los micetomas actinomicóticos se

caracterizan por la invasión de tejido, destrucción ósea y por hiperplasia de tejido fibroso alrededor de las fistulas. Los gránulos actinomicóticos están compuestos de filamentos miceliales entretnejidos, muy delgados y con estructuras periféricas en forma de clavav ( 52 ). La enfermedad generalmente es de evolución crónica y los pacientes habitualmente tienen un buen pronóstico cuando son adecuadamente tratados ( 33 ).

La incidencia mundial más alta de micetoma se localiza alrededor del trópico de Cáncer, entre las latitudes 15° S y 30° N. Los países más afectados son India, Sudán, Senegal, Somalia, Venezuela y México, entre otros ( 71 ). En México, el 98% de los micetomas son causados por actinomicetos, de los cuales el 86% corresponde a los casos causados por *Nocardia brasiliensis* ( 21,71 ). Los estados de la república más afectados son los del centro entre los que se encuentran Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León ( 60 ).

La patogenia del micetoma ha sido descrita en ratones, en donde la respuesta inflamatoria inicial está compuesta predominantemente por un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares. Después de una semana, la pata de los ratones inoculados muestra una reacción inflamatoria de tipo granulomatoso. Después de los 14 días aparece el micetoma característico con un granuloma, en donde se observan pequeños abscesos con gránulos actinomicóticos ( 51 ). Los gránulos se encuentran rodeados de numerosos granulocitos y restos celulares formando un microabsceso. En los cortes histológicos se observa un anillo de histiocitos y granulocitos alrededor del microabsceso, y en una tercera zona excéntrica, un infiltrado inflamatorio conteniendo macrófagos con abundante citoplasma granular, células plasmáticas, linfocitos y células epiteliales ( 11 ).

El estudio de la respuesta inmune en las infecciones causadas por *Nocardia* spp, ha mostrado la presencia de reacciones cruzadas con antígenos de otros actinomicetos ( 21,26,37,64 ), así como la protección homóloga y heteróloga contra infecciones por *Nocardia* spp en animales inoculados con otros microorganismos parásitos intracelulares como *Listeria monocitogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* y *Besnoitia jellisoni* ( 35,62 ). Durante las infecciones por *Nocardia* spp, tanto la inmunidad humoral como celular son activados ( 21,25,26 ). Las investigaciones realizadas hasta el momento, sugieren que la inmunidad celular es la realmente efectiva en contra de la infección ( 14,51,71 ). La activación de macrófagos aparece como una condición necesaria en los experimentos de protección contra infecciones por *Nocardia asteroides* ( 14,35 ) y *Nocardia brasiliensis* ( 62 ). Los macrófagos activados son muy importantes en la disminución de las bacterias en diferentes órganos de ratones infectados, lo cual podría explicarse tanto por los mecanismos de fagocitosis y destrucción directa de los microorganismos, como por la secreción de citocinas ( 62 ).

González Ochoa y colaboradores en 1962, reportaron el uso de un antígeno polisacárido de *N. brasiliensis* en pruebas de intrademostración en pacientes con micetoma actinomicótico, obteniendo resultados negativos en aquellos pacientes con mal pronóstico, mientras que en los pacientes con infección benigna o en período de curación las pruebas fueron positivas ( 21 ).

La interacción de un extracto de *N. brasiliensis* con poblaciones de linfocitos de ratón, mostró un efecto mitogénico y de activación policlonal en células B, el cual resultó ser independiente de linfocitos T ( 46 ). La función de los linfocitos T es importante para el control de la infección, como se determinó en estudios con ratas atímicas mu/mu y Lewis infectadas con *N. brasiliensis* en donde los animales normales presentaron una infección localizada, mientras

que las ratas atímicas desarrollaron una infección diseminada y más grave ( citado en 71 ).

Con respecto a la inmunidad humoral, la respuesta de anticuerpos no se ha considerado como importante en infecciones por *Nocardia* spp ( 14,21 ) y por el contrario, parece favorecer el desarrollo de la enfermedad, como fué reportado por Rico y colaboradores en 1982, donde además describen que la acción de las células B específicas a antígenos de *N. brasiliensis* parecen contribuir al empeoramiento de la infección ( 51 ).

La respuesta inmune humoral ha sido utilizada en el inmunodiagnóstico y seguimiento de la terapéutica en contra de la infección en pacientes ( 4,57 ).

La inmunización pasiva con anticuerpos producidos en ratones infectados con *N. brasiliensis* y posteriormente retados con bacterias muertas, no confirió protección en una infección experimental; lo mismo ocurrió cuando se inocularon las bacterias cubiertas con anticuerpos, donde se observó que la infección se acentuó ( 51 ). La presencia de títulos altos de anticuerpos fijadores de complemento en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, se ha asociado con lesiones tisulares extensas, mal estado general de los pacientes y cronicidad de la enfermedad, mientras que los títulos bajos se reportaron en pacientes con una infección benigna ( 21 ). Por el contrario, el suero de ratones inmunizados con *Nocardia brasiliensis* muerta por calor, previno el establecimiento de micetomas experimentales en ratones BALB/c, pero pareció aumentar el grado de daño en ratones en los que el micetoma ya estaba desarrollado ( 66 ).

En otros estudios, la presencia de anticuerpos en cortes histológicos de las lesiones de ratones infectados con *N. brasiliensis*, por medio de inmunofluorescencia, reveló que los gránulos y las células plasmáticas

mostraron una intensa fluorescencia desde las 2 semanas postinfección. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos, éstos fueron eluidos del tejido y sometidos a una prueba inmunoenzimática contra un extracto celular de *N. brasiliensis*. La presencia de estos anticuerpos fué detectada en el suero de los ratones hasta los 45 días postinfección. Se demostró también la presencia de depósitos de C3 en el gránulo. Al mismo tiempo que se detectaron estos anticuerpos en los tejidos, se desarrolló el micetoma característico en los ratones, lo cual deja en duda el posible efecto protector de los anticuerpos (11).

En la relación hospedero-parásito, es esencial considerar la importancia que tienen las moléculas del microorganismo que están constantemente expuestas al sistema inmune, como las que han sido secretadas o excretadas y que pueden tener una implicación primordial en el establecimiento o desarrollo de una infección. En 1984, Zlotnik y col. purificaron y caracterizaron una proteasa caseinolítica extracelular de *N. brasiliensis*. La actividad proteolítica se detectó a las 40 horas de cultivo y con un pico a las 60 horas. Dicha actividad se encontró inmediatamente después de pasar la fase de crecimiento bacteriano exponencial y el inicio de la meseta estacionaria. El peso molecular descrito fué de 25 kDa por la técnica de filtración en gel, y de 35 kDa por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. De acuerdo al ensayo de inhibidores de proteasas realizado, los autores sugirieron que la actividad proteolítica aislada fue de una zinc-metaloenzima (74).

Tsuboi y col. realizaron en 1989 un estudio sobre proteasas extracelulares presentes en los medios de cultivo de aislados de pacientes. Los autores observaron la actividad proteolítica de los filtrados de los cultivos por su acción sobre azo-colágena, sin hacer una purificación de las enzimas responsables. Los investigadores encontraron actividad proteolítica en cultivos de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* obtenidos de pacientes inmunocompetentes

con nocardiosis cutánea primaria; los cultivos de *N. asteroides* obtenidos de pacientes inmunocomprometidos no mostraron actividad proteolítica. Este padecimiento tiene un cuadro de aparición aguda y localizada, en la piel y tejido subcutáneo de pacientes que sufrieron algún trauma y se infectaron con la bacteria ( 31 ). Las actividades de las proteasas fueron observadas solamente a pH neutro o alcalino, con un máximo entre un pH de 8 y 9, y mediante ensayos con inhibidores enzimáticos se determinó que los filtrados contenían una serina proteasa como proteína extracelular ( 67 ).

En 1992, Salinas Carmona y col. publicaron la identificación de 3 proteasas caseinolíticas intracelulares de *N. brasiliensis*, 2 de las cuales se encontraron en un filtrado de cultivo; mediante la técnica de zimograma se realizó el ensayo de inhibidores enzimáticos, el cual sugirió que se trataba de serina proteinasas ( inhibición por p-hidroximercuribenzoato y fluoruro de fenilmetil-sulfonilo ). Sin embargo, estas enzimas al ser tratadas con neocuproína, 2-mercaptoetanol y iodoacetato mostraron comportamientos de inhibición deferentes entre ellas, lo cual aunado a la observación de actividad caseinolítica en un rango de pH entre 3 y 9, usando la técnica de Mc Laughlin y Faubert en tubo de ensaye ( 41 ), hizo sugerir a los autores que las actividades enzimáticas podrían pertenecer a clases catalíticas diferentes. El peso molecular de las 3 proteasas determinado por cromatografía de filtración en gel fué de 35.5 kDa, mientras que por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas fue de 40.5, 42 y 51.5kDa respectivamente. Cuando se analizaron sueros de pacientes por inmunoelectrotransferencia contra extracto celular de *N. brasiliensis*, se encontró que de 10 sueros de pacientes con actinomicetoma, 9 sueros no reconocieron ninguna de las 3 bandas de las proteasas, y solamente uno de ellos reconoció 2 bandas; los sueros de 6 pacientes curados de micetoma reaccionaron por lo menos contra una de las bandas de proteasas; mientras que el suero de 5 pacientes con tuberculosis, 5

con lepra y 10 individuos aparentemente sanos, no reconocieron ninguna de las proteasas ( 56 ).

La hidrólisis de la caseína producida por *Nocardia brasiliensis* se utiliza en el laboratorio clínico como una prueba bioquímica diferencial para la identificación de esta especie, debido a que las otras especies importantes de nocardia aparentemente no lo hacen ( 37 ).

Es importante enfatizar las diferencias que existen entre las enfermedades causadas por nocardias: nocardiosis y micetoma. Por un lado , *N. brasiliensis* es el agente causal de una infección localizada en pacientes inmunocompetentes, y por otro lado *N. asteroides* habitualmente produce una infección más generalizada en pacientes inmunosuprimidos. Lo anterior hace suponer la existencia de mecanismos diferentes para el establecimiento y/o desarrollo de la infección en estas 2 especies de nocardia.

En los trabajos de González Ochoa ( 21 ), Deem ( 14 ), Rico ( 51 ), y Conde ( 11 ), la respuesta inmune humoral en contra de infecciones por *N. asteroides* y *N. brasiliensis* en lugar de proteger en contra de la infección parece favorecerla. En el trabajo desarrollado por Salinas Camona y col. ( 56 ) se muestra un papel diferente con respecto a los anticuerpos antiproteasas en pacientes con micetoma. En este caso, estos anticuerpos se detectaron en pacientes curados, mientras que en el suero de pacientes con micetoma no se observaron anticuerpos contra las proteasas, dando lugar a pensar en la posibilidad de un efecto protector de estos anticuerpos en contra de la infección por *N. brasiliensis*, que no ha sido observado hasta la fecha por los otros autores. En base a lo anteriormente expuesto, si existe una respuesta de anticuerpos contra las proteasas únicamente en los individuos curados de micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*, estos anticuerpos anti-

**proteasas caseinolíticas podrían tener un papel importante en el fenómeno de inmunoprotección.**

## **HIPOTESIS.**

Las proteasas caseinolíticas de *Nocardia brasiliensis* inducen una respuesta inmune humoral protectora en ratones BALB/c que previene o modifica el desarrollo del micetoma experimental.

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la inmunogenicidad y el efecto inmunoproláctico de la(s) proteasa(s) caseinolítica(s) de *Nocardia brasiliensis* en la implantación y en el desarrollo del micetoma experimental en el ratón BALB/c.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- 1.- Purificar la(s) proteasa(s) caseinolítica(s) de *Nocardia brasiliensis* a partir de cultivos en medio de infusión cerebro- corazón (BHI).
- 2.- Realizar la caracterización bioquímica parcial de la(s) proteasa(s) purificadas.
- 3.- Determinar la inmunogenicidad de la(s) proteasa(s) purificada(s) sobre la respuesta inmune humoral en ratones BALB/c.
- 4.- Investigar el efecto protector inducido por la(s) proteasa(s) en el desarrollo del micetoma experimental en ratones BALB/c.

## MATERIAL Y METODOS

### 1.- ORIGEN DE LOS REACTIVOS.

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron adquiridos de las siguientes casas comerciales: Baker ( J. T. Baker S. A. de C. V. México ); Bioxon ( Bioxon de México S. A. de C. V. ); Bio-Rad ( Bio-Rad Laboratories, Richmond CA. EUA ); Difco ( Difco Laboratories, Detroit MI. EUA ); LKB ( LKB. Bromma, Suecia ); Merck ( Merck México S. A. ); Monterrey ( Productos Químicos Monterrey S. A. ); y Sigma ( Sigma Chemical Co. St Louis MO. EUA ).

### 2.- MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1 Ratones BALB/c machos de 11-17 semanas de edad, obtenidos de la colonia del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL. Esta cepa es derivada de la cepa original del Instituto Nacional de Salud ( NIH. Bethesda, MD. EUA. ).

2.2 *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 ( 55,56,68 ).

La cepa se aisló de un paciente con micetoma dorsal en el Hospital Universitario José Eleuterio González ( HUJEG-1 ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Fue identificada mediante pruebas bioquímicas y reconfirmada por el Dr. Libero Ajello en el Centro para el Control de Enfermedades en Atlanta GA, EUA.

El mantenimiento de *N. brasiliensis* en el laboratorio se realizó mediante pases sucesivos en agar dextrosa-Sabouraud ( Bioxon ), a partir de

suspensiones unicelulares de la bacteria, y con almacenamiento intermedio a 4°C ( 38 ).

### 3.- OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR CRUDO DE *Nocardia brasiliensis*.

#### 3.1 Preparación del Inóculo de *N. brasiliensis*.

A partir de cultivos de *N. brasiliensis* en agar dextrosa-Sabouraud se realizaron pases a matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de caldo BHI ( caldo de infusión cerebro-corazón. Difco Laboratories ), y se procedió a incubarlos a 37°C en baño María con agitación ( GCA/Precision Scientific ) durante 48 horas. Los cultivos se colocaron en tubos de 50 ml y se centrifugaron a 166 x g durante 10 minutos en una centrífuga Beckman TJ-6 ( Beckman Instruments ); posteriormente el precipitado se lavó con solución salina 0.85% ( p/v ) dos veces más. Las bacterias se disgregaron con un agitador de vidrio y se resuspendieron en solución salina. El sobrenadante que quedó después de sedimentar el cultivo se utilizó para inocular 8 matraces Erlenmeyer con 30 ml de caldo BHI, los cuales se incubaron a 37°C en baño con agitación durante 48 horas. Las bacterias aparecen como una película seca y cerosa en la superficie del medio. Las bacterias se recuperaron y lavaron 3 veces con solución salina 0.85% a 166 x g, y se hizo pasar a través de un homogenizador Potter-Elvehem. El homogenizado de *N. brasiliensis* representa la suspensión unicelular bacteriana utilizada como inóculo para obtener masa bacteriana.

### 3.2 Obtención de Masa Bacteriana

Se inocularon 40 matraces Erlenmeyer con medio BHI ( 5.4 litros ) cada uno con 0.4 ml del inóculo anterior ( aproximadamente  $6 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias ) y se incubaron a 37°C durante 7 días sin agitación. Los matraces fueron decantados para retirar el máximo de medio, y los cultivos fueron recuperados en matraces Erlenmeyer para posteriormente lavarlos con agua destilada estéril en un embudo Buchner sobre un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. La masa bacteriana húmeda se colocó en un cristalizador para ser deslipidizada. Se adicionó solución de alcohol etílico-éter etílico ( 1:1 ) hasta cubrir el paquete bacteriano y se mantuvo en agitación por 10 minutos, al cabo de los cuales el sobrenadante se retiró cuidadosamente con una pipeta serológica . El procedimiento anterior se realiza las veces necesarias hasta que el sobrenadante pierda la coloración amarilla. Posteriormente se agregó 2 veces solución de etanol-éter ( 1:2 ), y una sola vez con la tercer solución ( 1:3 ). Este último deslipidizado se retiró por vacío y la masa bacteriana se colocó en un desecador durante toda la noche.

### 3.3 Obtención del Extracto Celular Crudo.

El material bacteriano deslipidizado y seco se colocó en un mortero al que se agregó una cantidad igual de vidrio molido. Las bacterias se trituraron mecánicamente en el mortero por 90 minutos. La mezcla resultante se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con el amortiguador de extracción Tris-HCl 0.1M, pH 6.5, en agitación constante a 4°C durante 12 horas. La mezcla se centrifugó a 200 x g durante 30 minutos para retirar el vidrio y bacterias intactas, el sobrenadante se recolectó y filtró por membrana Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro; mientras que el sedimento se volvió a resuspender en el amortiguador de extracción por 2 veces más. Este material de las 3 extracciones corresponde al extracto celular crudo de *N. brasiliensis*. Cada

extracto celular obtenido se clasificó por su contenido proteico ( 9 ) y por su patrón electroforético en geles de poliacrilamida, tanto en condiciones desnaturizantes con dodecil-sulfato de sodio ( SDS ) y 2-mercaptoetanol, como en condiciones nativas para observar la presencia de actividad caseinolítica por medio de zimogramas.

#### 4.- DETERMINACION DE PROTEINAS. METODO DE BRADFORD ( 9 ).

La determinación de proteínas se realizó mediante la construcción de una curva de calibración realizada con una solución estándar de albúmina sérica bovina ( 1mg/ml ). Las soluciones estándar se prepararon a una concentración entre 2 y 18  $\mu$ g/ml. Las muestras apropiadamente diluidas ( 0.25 ml ) se colocaron en presencia de 0.25 ml del reactivo de Bradford ( 6 mg de azul de Coomassie G-250 en 100 ml de ácido perclórico al 3% v/v en agua destilada ) por 25 minutos a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro DU-6 ( Beckman Instruments ).

#### 5.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES CON SDS Y 2-MERCAPTOETANOL.

Para el estudio de los componentes proteicos de las diferentes muestras de *N. brasiliensis*, se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli ( 36 ) con un gel de empaquetamiento al 5%T, 2.7%C, y geles de corrimiento en gradiente 10-18%T, 2.7%C ( ver apéndice A ). El gel se montó en el sistema de electroforesis Mini-Protean II ( BIO-RAD) y se aplicó el amortiguador de corrimiento ( Tris-HCl 125 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1% p/v ) en la cámara de corrimiento. El gel se recorrió a 50 V por 20 minutos con ayuda de una fuente de poder modelo 1000/500 ( BIO-RAD). Antes de aplicar al gel, las

muestras se trataron con amortiguador de muestra 4X ( Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% p/v, 2-Mercaptoetanol 10% v/v, sacarosa al 50% p/v, con azul de bromofenol como indicador del frente de corrida ) y se sometieron a ebullición por 2 minutos. Las muestras se aplicaron cuidadosamente en cada carril con una pipeta automática. La electroforesis se realizó a 80 V hasta que el frente de corrida alcanzó al gel de corrimiento, y entonces se aumentó el voltage a 150 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel.

### 5.1 Tinción de Coomassie ( 70 ).

Una vez terminada la electroforesis, se desensamblaron las placas de vidrio y el gel se colocó en un recipiente con solución de azul de Coomassie ( azul de Coomassie R-250 0.1% p/v en solución desteñidora: metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v en agua destilada ) por 30 minutos. El gel se desteñó con solución desteñidora por 1-3 horas.

### 5.2 Tinción con Nitrato de Plata ( 44 ).

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, y luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con solución de lavado ( etanol 10% v/v y ácido acético 5% v/v en agua destilada ) para eliminar el SDS. Enseguida el gel se colocó en la solución oxidante ( dicromato de potasio 3.4 mM, ácido nítrico 3.22 mM ) por 5 minutos y en agitación, para después lavar 3 veces con agua destilada por 10 minutos. Posteriormente el gel se colocó en la solución de nitrato de plata ( 12 mM ) durante 5 minutos a la luz intensa y 25 minutos a la luz normal. Las bandas se visualizaron con solución reveladora (carbonato de sodio 0.28 M y formaldehído al 0.05% v/v), deteniendo la reacción con ácido acético al 1%.

## 6.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO-DESNATURALIZANTES. ( 27 ).

Para no alterar la actividad caseinolítica de las muestras durante la electroforesis, se usaron condiciones nativas, es decir, sin tratamiento con SDS, 2-Mercaptoetanol o calor. Los geles fueron lineales y en forma discontinua ( ver apéndice A ).

La preparación y la electroforesis se realizó de la forma ya descrita para geles en condiciones desnaturizantes, excepto que aquí se utilizó el amortiguador de muestra 2X ( Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, sacarosa 50% p/v, y azul de bromofenol 0.0005% p/v ) y el amortiguador de corrimiento ( Tris-HCl 25 mM, glicina 0.12 M, pH 8.3 ) en condiciones no-desnaturizantes. Del mismo modo, el teñido y desteñido de los geles se realizó como se describió anteriormente.

## 7.- DETERMINACION DE ACTIVIDAD CASEINOLITICA.

### 7.1 Determinación Cualitativa.

Se utilizó la técnica de zimograma para hacer el seguimiento de la actividad caseinolítica a lo largo del esquema de aislamiento de las proteasas, así como en su caracterización. Se usaron 2 variantes de zimograma, una mediante la técnica descrita por Perez Montfort y col.( 49 ), y la otra desarrollada en nuestro laboratorio para observar la actividad enzimática total de las muestras ( zimograma de punto ).

### 7.1.1 Zimograma de Punto.

Esta técnica se utilizó sobre todo en las cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico para identificar las fracciones con actividad caseinolítica. Se colocaron 5  $\mu$ l de cada fracción sobre un gel-sustrato de poliacrilamida con caseína al 0.114% p/v, y se incubó a 37°C durante 90 minutos en cámara húmeda. Después se tiñó el gel con solución de Coomassie R-250 0.1% p/v igual que los geles de electroforesis. Al desteñir, se observaron los puntos donde hubo hidrólisis de la caseína como zonas sin teñir, y de esta manera se pudieron seleccionar las fracciones con actividad proteolítica

### 7.1.2 Zimograma por Contacto con Geles de Poliacrilamida Sometidos a Electroforesis. ( 18,49 )..

Este ensayo de actividad proteolítica en gel permitió la identificación de varias enzimas proteolíticas presentes en una muestra que previamente había sido procesada por electroforesis en un gel de poliacrilamida bajo condiciones no-desnaturalizantes. Una vez terminada la electroforesis nativa, el gel de poliacrilamida se sumergió en amortiguador Tris-HCl 0.1M, CaCl<sub>2</sub> 10mM, pH 7.4, durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de equilibrar el pH del gel. En una cámara húmeda se colocó una placa de vidrio, sobre la cual se depositó el gel analítico equilibrado, y encima de éste se acomodó el gel-sustrato humedecido en el mismo amortiguador. Los geles se cubrieron con otra placa de vidrio cuidando de no atrapar burbujas de aire. La cámara húmeda se incubó a 37°C por 90 minutos. El gel-sustrato se tiñó con colorante de Coomassie como ya se mencionó antes; las bandas de hidrólisis de caseína ( zonas no teñidas ) corresponden a las bandas de proteasas separadas en la electroforesis.

## 7.2 Determinación Cuantitativa.

Para realizar la cuantificación de la actividad caseinolítica se utilizó una modificación a la técnica de McLaughlin y Faubert ( 41 ), que permite determinar la actividad enzimática de las muestras usando azocaseína ( Sigma ) como sustrato ( 40,48 ). La técnica consistió en colocar 50  $\mu$ l de muestra con 50  $\mu$ l de amortiguador Tris-HCl 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 0.01 M, pH 7.4, en un baño María a 37°C con agitación. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de azocaseína (10 mg/ml de la solución amortiguadora) a cada mezcla de reacción, y se incubó por 10 minutos. La reacción se detuvo por la adición de 200  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 5% ( p/v ), sacando el tubo del baño María y manteniendolo 10 minutos a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 7700 x g por 5 minutos en una microcentrifuga modelo 5415 ( Eppendorf ), y en otro tubo con 350  $\mu$ l de NaOH 0.5 N se agregaron 150  $\mu$ l del sobrenadante. Se midió la absorbancia de esta solución contra un blanco de reactivos a 440 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro DU-6 ( Beckman Instruments ).

Para determinar las unidades de actividad enzimática se utilizó la siguiente ecuación ( 40 ):

$$A_{440} \times 60 / 1.6 ( t ) = \text{Actividad ( U/ml )}$$

t = Tiempo de incubación en minutos

En donde 1 Unidad= Actividad hidrolizante de 1mg de azocaseína en 1 hora, a un pH dado ( 40 ).

La actividad específica (AE) se obtuvo con el dato de contenido proteico de cada una de las muestras:

$$AE(U/mg) = U/ml / mg/ml$$

Para evaluar la purificación de las proteasas entre los distintos pasos del esquema de aislamiento, se determinó el grado de purificación mediante la siguiente ecuación ( 30 ).

$$\text{Grado de Purificación} = AE \text{ en el paso 2} / AE \text{ en el paso 1}$$

## 8.- PURIFICACION DE UNA PROTEASA CASEINOLITICA DE *Nocardia brasiliensis*.

Para la purificación de las proteasas caseinolíticas de *N. brasiliensis*, se seleccionaron las técnicas de cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa ( Sigma ) y electroelución de proteínas a partir de electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida. La fig. 1 muestra el diagrama de flujo de esta metodología.

### 8.1 Cromatografía de Intercambio Iónico ( DEAE-Celulosa ) ( 53,59 ).

La columna de DEAE-celulosa ( 2.7X11.0 cm ) se equilibró con amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 6.5, y se ajustó a un flujo de 2.5 ml/minuto. Se aplicaron 300 mg de extracto celular crudo de *N. brasiliensis* por columna en volúmenes de 200-350 ml, dependiendo del lote de extracto. Se recuperó el eluido no unido a la DEAE-celulosa ya que fue el que mostró actividad caseinolítica en zimogramas de punto de las fracciones de 2ml. Los eluidos con NaCl 1 M y 2 M, no mostraron actividad proteolítica. El eluido con la actividad caseinolítica ( eluido activo ) se colocó en membranas de diálisis con poro de exclusión de 12 kDa ( Sigma ) y se concentró con sacarosa a 4°C por 12 horas; posteriormente se dializó contra agua destilada por otras 12 horas. Finalmente

las muestras se liofilizaron en un liofilizador Freezemobile 12 ( Virtis ) para almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

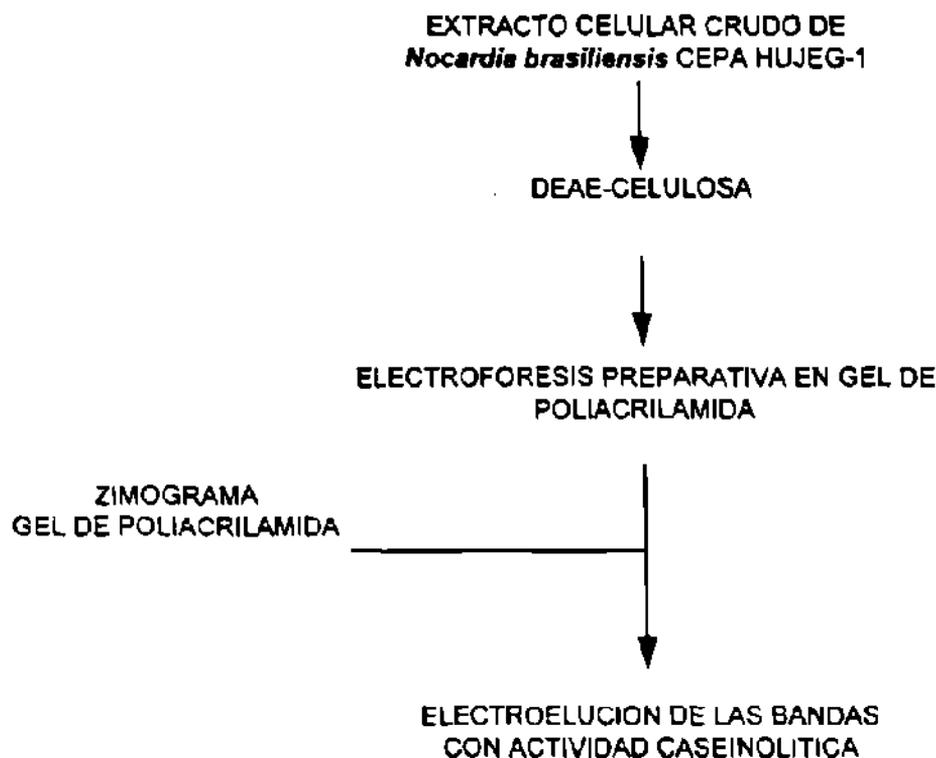


Figura No. 1 Diagrama de Flujo del Esquema Metodológico Utilizado para Aislar las Proteasas Caseinolíticas de *Nocardia brasiliensis*.

## 8.2 Electroelución de las Proteasas de Geles Preparativos 8%T en Condiciones Nativas.

### 8.2.1 Electroforesis Preparativa en Geles de Poliacrilamida en Condiciones No-desnaturalizantes ( 12 ).

Se trabajó con geles preparativos ( 14.2 X 10 X 0.3 cm ) de poliacrilamida 8%T, 2.7%C, en condiciones no-reductoras ( ver apéndice A ).

La electroforesis se realizó de la misma manera que con geles analíticos, solo que el amortiguador de corrimiento se utilizó a una concentración mayor (Trizma base 50 mM, glicina 384 mM ). Se aplicaron 3.5 mg del eluido de DEAE-celulosa de muestra por gel.

### 8.2.2 Identificación de la Actividad Caseinolítica.

Para identificar la posición en la que migraron las proteasas en el gel preparativo, se utilizó la técnica de zimograma ( 18,49 ). Una vez concluida la electroforesis del gel preparativo, se cortaron verticalmente los extremos izquierdo y derecho, así como una pequeña sección central para realizar el zimograma respectivo ( 49 ), mientras que las porciones intactas del gel se congelaron inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar la difusión de las proteínas. De esta manera, una vez teñido el zimograma, se determinaron los sitios de migración electroforética de las actividades caseinolíticas en el gel original.

### 8.2.3 Electroelución de las Enzimas Caseinolíticas ( 29 ).

Una vez determinado el sitio de migración de las proteasas en el gel preparativo, se cortaron las bandas correspondientes con ayuda de una hoja de bisturí y el gel se fragmentó en trozos pequeños. Los fragmentos de gel se colocaron en una cámara de electroelución modelo 422 ( BIO-RAD ), utilizando una membrana de diálisis con poro de exclusión de 12 a 15 kDa como barrera de retención. El amortiguador de la elución fue Tris-HCl 25 mM, glicina 0.12 M, pH 8.3. La electroelución se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ , aplicando 10 mA por muestra por 2.5 horas. Al concluir el tiempo, se retiró la solución amortiguadora y se dejaron dializando las muestras a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12 horas contra agua destilada; posteriormente se determinó la actividad específica de los electroeluidos y se liofilizaron para concentrarlos.

## 9.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL DE LAS PROTEASAS CASEINOLITICAS DE *Nocardia brasiliensis*.

### 9.1 Determinación de Masa Molecular por Cromatografía de Filtración en Gel en Columnas de Sephadex G-100 ( 50 ).

Para determinar el peso molecular de las proteasas en condiciones nativas, se utilizó una columna de Sephadex G-100 ( 2.3 X 20.8 cm ) empacada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, con un flujo de 0.6 ml/minuto a 4°C. Se usaron los marcadores de peso molecular para filtración en gel MW-GF-70 ( Sigma ): Dextrán azul ( 2000 kDa ); citocromo c de corazón de caballo ( 12.4 kDa ); anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino ( 29 kDa ); albúmina sérica bovina ( 66 kDa ). Se aplicaron muestras de 1 ml y se recolectaron fracciones de 2 ml, de acuerdo al boletín técnico GF-3 de Sigma. Se aplicó primero el dextrán azul para determinar el volúmen vacío de la columna (  $V_o$  ), y posteriormente los demás estándares. La absorbancia de cada fracción se midió a 280 nm para calcular el volúmen de elución (  $V_e$  ). Se construyó una gráfica con los valores de los cocientes  $V_e/V_o$  de cada estándar contra su peso molecular. El peso molecular aproximado de las proteasas se calculó a partir de la fracción más activa observada en un zimograma de punto, y posteriormente en otro realizado después de llevar a cabo la electroforesis de las mismas fracciones.

### 9.2 Determinación de Masa Molecular por Electroforesis SDS-PAGE ( 27 ).

Para la determinación de pesos moleculares bajo condiciones desnaturalizantes por SDS-PAGE, la electroforesis se realizó como se indica en el apartado 5, aplicando además en un carril una muestra de marcadores de peso molecular conocido Dalton Mark VII-L ( Sigma ). Los marcadores utilizados fueron:  $\alpha$ -Lactoalbúmina de leche bovina ( 14.2 kDa ); Inhibidor de

tripsina de soya ( 20.1 kDa ); Tripsinógeno de páncreas bovino ( 24 kDa ); Anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino ( 29 kDa ); Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo ( 36 kDa); Ovoalbúmina ( 45 kDa ); y Albúmina sérica bovina ( 66 kDa ); los cuales se utilizaron según las indicaciones de la casa comercial.

Una vez realizada la electroforesis y teñido el gel, se determinó la movilidad relativa de cada proteína o Rf:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{Distancia de migración del frente de corrida.}}$$

Los valores de Rf se graficaron en las abscisas contra los pesos moleculares conocidos en las ordenadas en un papel semilogarítmico. El peso molecular de las proteínas desconocidas se calculó a partir de la curva trazada por los marcadores de peso molecular ( Boletín técnico MWS-877L de Sigma ).

### 9.3 Isoelectroenfoque Analítico ( 3,18 )

Para determinar el punto isoeléctrico ( pI ) de las proteasas de *N. brasiliensis*, se sometieron a isoelectroenfoque en gel analítico 5%T, 2.9%C, ( ver apéndice A ) con un gradiente de pH de 3.0 a 10.0, en la cámara 2117 Multiphor II ( LKB ).

Para el isoelectroenfoque se colocó el gel sobre la cámara y encima de éste, en los extremos, se acomodaron 2 tiras de papel filtro humedecidas en solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M ( anolito ) y NaOH 1M ( catolito ) en donde descansaron los electrodos ( ánodo y cátodo, respectivamente ). El sistema se precorrió 30 minutos a 10 W, conectado a un baño recirculante 2209 Multitemp ( LKB ) ajustado a 10°C . Las muestras y marcadores se colocaron sobre papel filtro a

concentraciones entre 0.4 y 1.0 mg/ml. El corrimiento se realizó por 3 horas a 10 W.

Para visualizar las actividades caseinolíticas de las muestras se realizaron zimogramas con fracciones del gel. El resto del gel se colocó en solución fijadora ( ácido tricloroacético 11.5% y ácido sulfosalicílico 3.5% ) por 1 hora. Luego se dejó equilibrar el gel en solución equilibradora ( metanol 25%, ácido acético glacial 5%, en agua destilada ) por 15 minutos, para colocar después en la solución de tinte ( azul de Coomassie G-250 0.1% p/v en solución equilibradora ) por 1 hora a temperatura ambiente. El gel se destintó ( etanol 25%, ácido acético glacial 8%, en agua destilada ) hasta que el fondo del gel quedó claro.

Para la determinación de puntos isoeléctricos se siguieron las indicaciones del boletín técnico IEF-100 de Sigma. Los marcadores de pI conocido que se utilizaron fueron: Amiloglicosidasa de *Aspergillus oryzae*; Inhibidor de tripsina de soya;  $\beta$ -Lactoglobulina A de leche; Anhidrasa carbónica B de eritrocitos de bovino; Anhidrasa carbónica B de eritrocitos humanos; Mioglobina de corazón de caballo; Deshidrogenasa L- láctica de músculo de conejo; y Tripsinógeno de páncreas bovino. Se graficó el pI de los marcadores contra la distancia de migración desde el ánodo; mientras que en los zimogramas se midió la distancia de migración de las proteasas, para luego interpolar estas distancias en la gráfica y así determinar sus pI.

#### 9.4 Estabilidad Térmica de las Proteasas Caseinolíticas de *N. brasiliensis*.

Para observar la estabilidad de las enzimas a diferentes temperaturas se realizaron zimogramas de muestras de extracto celular crudo variando la temperatura y el tiempo de reacción.

#### 9.4.1 Estabilidad de las Proteasas Contenidas en el Extracto Celular Crudo a 37, 45 y 56°C.

Se colocaron 3 muestras de 100  $\mu$ l de extracto celular crudo ( 7 mg/ml, 0.645 U/mg ) en tubos de centrifuga ( Eppendorf ), los cuales fueron incubados a 37, 45 y 56°C durante 2 horas en baño María con agitación. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

#### 9.4.2 Estabilidad de las Proteasas Contenidas en el Extracto Celular Crudo a 4°C.

Otra muestra de extracto celular crudo de 500  $\mu$ l ( 7 mg/ml, 21.2 U/mg ), colocada en un tubo Eppendorf, se mantuvo a 4°C y se obtuvieron alicuotas de 50  $\mu$ l a los tiempos 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 días, las cuales se mantuvieron a -20°C hasta su estudio posterior.

#### 9.4.3 Electroforesis-Zimograma de las Muestras de las Proteasas que Mostraron Autohidrólisis.

Para observar el comportamiento enzimático de las proteasas después de los tratamientos anteriores, se colocaron muestras de 56  $\mu$ g de cada una de ellas en los carriles de un gel de poliacrilamida 8%T, 2.7%C, el cual se sometió a electroforesis en condiciones no-desnaturalizantes y posteriormente se realizó el zimograma correspondiente.

#### 9.5 Clasificación Catalítica de las Proteasas de *N. brasiliensis*.

La determinación de la clase catalítica de las proteasas se realizó mediante ensayos de inhibición de la actividad enzimática ( 15 ). Se prepararon

soluciones madre de cada uno de los inhibidores de proteasas: fluoruro de fenil-metil sulfonilo ( PMSF ) 200 mM en metanol ( Inhibidor de serina proteasas ); ácido etilen-diamino tetra-acético ( EDTA ) 0.5 M ( Inhibidor de metaloproteasas ); ácido iodoacético 100 mM ( Inhibidor de cisteina proteasas ); 1,10-fenantrolina 200 mM en metanol ( Inhibidor de metaloproteasas ); además se preparó una solución de 2-Mercaptoetanol 10 mM para verificar que la probable inhibición de la actividad por PMSF no fuera revertida ( serina proteasas ).

El procedimiento se realizó en tubos de centrifuga ( Eppendorf ) con muestras de extracto celular crudo de 350  $\mu\text{g}$  ( 0.645 U/mg ), a las cuales se adicionó el inhibidor a una concentración de: PMSF ( 0.2, 2 y 20 mM ), EDTA ( 0.5, 5 y 50 mM ), ácido iodoacético ( 0.1, 1 y 10 mM ), 1, 10-Fenantrolina ( 0.2, 2 y 20 mM ), y se incubó por 15 minutos a 37°C. Otros tubos con el inhibidor PMSF se trataron con 2-Mercaptoetanol 10 mM para diferenciar entre inhibición de serina proteasas y cisteina proteasas, y se incubaron otros 15 minutos adicionales a 37°C. El ensayo de inhibición de las proteasas fue seguido con 2 técnicas: electroforesis-zimograma y por medio de la técnica modificada de McLaughlin y Faubert.

#### 9.5.1 Técnica de Electroforesis-Zimograma.

La inhibición fue observada tomando una alícuota de 15  $\mu\text{l}$  ( 52  $\mu\text{g}$  ) de las mezclas de reacción y aplicando directamente en un gel de poliacrilamida, para que después de realizar la electroforesis-zimograma, determinar el patrón de inhibición sobre las 3 proteasas.

#### 9.5.2 Ensayo de McLaughlin y Faubert.

El resto de las mezclas de reacción incubadas con el inhibidor, fueron adicionadas con azocaseína como sustrato y nuevamente incubadas a 37°C

por 10 minutos. La reacción se detuvo con la adición de ácido tricloro-acético ( TCA ) 5% p/v. La actividad enzimática se determinó a cada muestra como se describió antes.

## 10.- DETERMINACION DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA PROTEASA DE 38kDa EN RATONES BALB/c

Para determinar si la proteasa aislada ( proteasa superior ), que presentó una masa molecular de 38 kDa, era inmunogénica en ratones BALB/c ( 28 ), se procedió a inmunizar una serie de ratones con el electroeluido correspondiente; y los sueros de estos animales fueron analizados en una prueba inmunoenzimática de ELISA para determinar si hubo respuesta de anticuerpos en contra de la proteasa.

### 10.1 Esquema de Inmunización de los Ratones BALB/c ( 28 ).

Las vías de inmunización/inoculación utilizadas en el trabajo fueron subcutánea e intramuscular, debido a que éstas son generalmente las vías de inoculación naturales de *N. brasiliensis*.

#### 10.1.1 Inmunización de los Ratones con la Proteasa de 38 kDa de *N. brasiliensis*.

Se formaron 4 grupos de 3 ratones cada uno:

**Grupo Inmunizado con Proteasa.** Este grupo se inmunizó con 10 µg de la proteasa de 38 kDa en 50 µl de volumen, aplicando 25 µl en el cojinete plantar y otros 25 µl en el muslo de la extremidad posterior izquierda ( 0.8 U/ratón ).

Grupo Inmunizado con Proteasa y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Este grupo recibió también 10 µg de proteasa de 38 kDa pero emulsificados con AIF ( Gibco ) en relación 1:2, en un volumen de 60 µl, aplicándose 30 µl en el cojinete plantar y otros 30 µl en el muslo de la extremidad posterior izquierda ( 0.8 U/ratón ).

Grupo Inmunizado con Eluido-DEAE. A este grupo se le inmunizó con 50 µg del eluido de DEAE-celulosa, aplicando 25 µl en el cojinete plantar y otros 25 µl en el muslo de la extremidad posterior izquierda ( 0.9 U/ratón ).

Grupo Testigo AIF. Estos ratones recibieron 50 µl de AIF, 25 µl en el cojinete plantar y 25 µl en el muslo de la extremidad posterior izquierda.

Antes de la inmunización, los ratones fueron sangrados del plexo retroorbital con ayuda de una pipeta Pasteur ( 20 ), se recolectó el suero y se almacenó a -20°C, correspondiendo éste a la muestra de tiempo cero. Los ratones se marcaron convenientemente en el pelo con ácido pícrico para reconocer individualmente cada ratón, y así de esta manera hacer el seguimiento del mismo a lo largo del experimento.

A los 15, 30 y 45 días postinmunización, los ratones se sangraron nuevamente antes de recibir una reinmunización, la cual consistió de 3 µg de proteasa y 20 µg de eluido-DEAE, en volúmenes de 50 µl, con o sin AIF, y aplicándose en el cojinete plantar izquierdo. Los ratones inmunizados con AIF también recibieron una dosis de 50µl de una emulsión de solución salina fisiológica-AIF. Los ratones volvieron a sangrarse a los 60 días,

### 10.1.2 Inmunización de Ratones con Extracto Celular Crudo de *N. brasiliensis* ( 28 ).

Para obtener un suero hiperinmune control contra el extracto celular crudo, se inmunizaron 9 ratones con 100 µg de extracto emulsificados en AIF en una relación 1:2 y en un volumen de 100 µl ( 0.4 U/ratón ). Se inocularon 50 µl en cada cojinete plantar. A los 15 y 30 días se reinmunizaron con 30 µg de extracto emulsificado en AIF. El sangrado de los ratones se realizó a los 38 días. Este suero se utilizó para adaptar una prueba de ELISA contra proteasas.

### 10.2 Determinación de Anticuerpos Anti-Proteasa por ELISA.

Para determinar el grado de respuesta de anticuerpos contra las proteasas, se utilizó un ensayo inmunoenzimático contra el electroeluido de la proteasa de 38 kDa, adaptando una técnica de ELISA ya estandarizada en el laboratorio ( 57 )

#### 10.2.1 Sensibilización de las Placas de Poliestireno con Antígeno.

Las placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos Costar ( BIO-RAD ), se sensibilizaron con 0.5 µg del electroeluido de la proteasa de 38 kDa, diluidos en 200 µl de amortiguador de acetatos 0.14 M pH 5.0 por pozo, y se dejaron a 4°C durante toda la noche.

#### 10.2.2 Bloqueo.

Las placas se lavaron 3 veces por 10 minutos, aplicando 200 µl por pozo de amortiguador de fosfatos-salina 0.15 M, pH 7.4 y Tween 20 1:1000 ( PBS-Tween ). Posteriormente, el bloqueo de la placa se realizó colocando 200 µl por pozo de una solución de PBS-Tween-Leche al 5%, durante 2 horas a 37°C. Se

utilizó leche descremada Svelty ( Nestlé ). Después se lavó la placa con 200  $\mu$ l por pozo con PBS-Tween. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos y luego 3 lavados de 1 minuto a temperatura ambiente.

### 10.2.3 Reacción del Primer Anticuerpo.

La reacción del primer anticuerpo se realizó diluyendo los sueros de los ratones inmunizados 1:50 en solución de PBS-Tween-Leche 5%, y aplicando 200  $\mu$ l por pozo. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó la placa con PBS-Tween, aplicando 200  $\mu$ l por pozo, haciendo 2 lavados de 5 minutos y 3 lavados de 1 minuto.

### 10.2.4 Reacción del Segundo Anticuerpo.

El anticuerpo polivalente anti-inmunoglobulina de ratón ( IgM, IgG e IgA ) producido en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano tipo VI ( Sigma ), se diluyó 1:1000 en PBS-Tween-Leche 1%. Se aplicaron 200  $\mu$ l por pozo y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después la placa se lavó con PBS-Tween de la siguiente manera: 1 vez por 5 minutos, y 2 veces por 1 minuto, aplicando 200  $\mu$ l por pozo del amortiguador.

### 10.2.5 Revelado.

La reacción de la peroxidasa que quedó unida en la placa se llevó a cabo en un amortiguador de citrato-fosfato ( ácido cítrico 0.024 M y fosfato monoácido de sodio 0.051 M ) pH 5.0. Se prepararon 25 ml de amortiguador, y antes de agregar 160  $\mu$ l por pozo se disolvieron 0.01 g de o-fenilendiamina ( Sigma ) y 3  $\mu$ l de peróxido de hidrogeno al 30%. La placa se tapó con papel aluminio y se dejó reaccionar en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de 40  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1N a

cada pozo. La lectura de absorbancia se realizó a 492nm en un lector de ELISA BP-96 ( DIAMEDIX ).

## 11.- EFECTO DE LA INMUNIZACION ACTIVA Y PASIVA CON PROTEASAS DE *Nocardia brasiliensis* EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL EN RATONES BALB/c.

Para estudiar la probable inmunoprotección de ratones inmunizados con la proteasa aislada, en contra de una infección experimental por *Nocardia brasiliensis*, se realizaron 2 experimentos para evaluar, por un lado, el establecimiento de la infección, y por el otro el desarrollo del micetoma en el ratón.

### 11.1 Estudio de la Inmunización Activa y Pasiva con la Proteasa de 38 kDa en Ratones BALB/c, Durante el Establecimiento de la Infección.

Se formaron 6 grupos de 8 ratones cada uno, los cuales fueron inmunizados y posteriormente infectados en el cojinete plantar. La valoración de la protección se realizó midiendo el aumento de la inflamación en el cojinete plantar y observando el daño macroscópico, así como mediante cortes histológicos de las lesiones y por determinación de anticuerpos antiproteasa en la prueba de ELISA descrita anteriormente.

### 11.1.1 Inmunización Activa y Pasiva.

#### 11.1.1.1 Inmunización Activa.

**Grupo Proteasa-AIF.** Este grupo de ratones recibió 10  $\mu\text{g}$  del electroeluido de la proteasa de 38 kDa, emulsificados con AIF en relación 1:1 y en volumen de 50  $\mu\text{l}$ , los cuales se inocularon en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Extracto Celular Crudo.** Los ratones de este grupo fueron inmunizados con 100  $\mu\text{g}$  de extracto Celular Crudo en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  y aplicados en el cojinete plantar derecho.

**Grupo AIF.** Este grupo de ratones fue inmunizado con una emulsión de solución salina fisiológica - AIF en relación 1:1, en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  y aplicados en el cojinete plantar izquierdo. Este grupo de ratones se utilizó solamente como control de inflamación ya que no fue ni infectado, ni muestreado para obtener suero o los cortes histológicos de cojinete plantar.

Los grupos anteriores fueron reinmunizados a los 15 días, con una emulsión de 3  $\mu\text{g}$  de Proteasa-AIF, 30  $\mu\text{g}$  de Extracto Celular Crudo y la misma dosis de solución salina-AIF respectivamente, aplicándose en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  en el cojinete plantar inmunizado antes. Los ratones fueron infectados en el cojinete plantar izquierdo ( tiempo cero ), a los 15 días posteriores a la reinmunización.

**Grupo Testigo.** Este grupo de ratones no recibió ningún tratamiento previo a la infección con las bacterias.

### 11.1.1.2 Inmunización Pasiva de los Ratones.

Para la inmunización pasiva se utilizó el suero de los ratones del experimento anterior, haciendo una mezcla de los sueros de los ratones inmunizados con Proteasa y Proteasa-AIF por un lado ( Grupo Pasivo Proteasa ), y los sueros de los ratones tratados con AIF por otro ( Grupo Pasivo AIF ). Los sueros fueron colectados y almacenados a  $-20^{\circ}$  C. Los sueros fueron inactivados a  $56^{\circ}$  C por 30 minutos y filtrados por filtro Millipore de  $0.22 \mu\text{m}$  al momento de utilizarse.

Grupo Pasivo Proteasa. Los 8 ratones de este grupo, recibieron  $100 \mu\text{l}$  del suero mencionado antes, en el muslo derecho, al momento de ser infectados con el inóculo de *Nocardia brasiliensis* ( tiempo cero ). Se repitió la misma dosis del suero a las 48 y 96 horas postinfección.

Grupo Pasivo AIF. Los ratones de este grupo recibieron el mismo tratamiento del grupo anterior, pero con el suero de ratones tratados únicamente con adyuvante incompleto de Freund.

### 11.1.2 Infección experimental en los ratones inmunizados ( 65,73 ).

Los ratones fueron infectados con una dosis de  $50 \mu\text{l}$  de inóculo de *Nocardia brasiliensis* consistente de  $5 \times 10^6$  U F C, por vía subcutánea en el cojinete plantar izquierdo. El tiempo en el cual se realizó la infección constituyó el tiempo cero del experimento.

#### 11.1.2.1.- Cuantificación de Bacterias. Método Estándar en Placa ( 63 ).

La cuantificación de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra ( UFC/ml ) se realizó a partir de la suspensión unicelular de

*N. brasiliensis*. En tubos de ensaye 15 x 145 mm con tapón de rosca, se adicionaron 9 ml de solución salina 0.85% p/v, estéril, y se realizaron diluciones seriadas de 1:10 a 1:10<sup>7</sup> del inóculo de *N. brasiliensis*. Antes de preparar cada dilución, la muestra se mezcló por 2 minutos en un vortex S/P ( American Scientific Products ). Se agregó 1 ml de cada dilución a una caja Petri estéril de 9 cm de diámetro, a la cual se adicionaron 18 ml de agar BHI enfriado a 40-45°C. Se mezcló con movimientos circulares para que la muestra quedara extendida homogéneamente y se dejó solidificar. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas ( Incubadora J.M. Ortiz ). Se cuantificaron las colonias en un cuentacolonia Quebec modelo 3327 ( Leica ), y se determinó el número de UFC/ml de inóculo.

#### 11.1.3 Observación Macroscópica del Establecimiento de la Infección.

Se realizó un estudio de la respuesta inflamatoria en el cojinete plantar infectado, determinando el aumento de volumen debido a la infección como la diferencia ( en cm ) entre el grosor del cojinete plantar inflamado, y el grosor medido antes de infectar los ratones ( 45 ). Las mediciones se realizaron a los 2, 4 y 7 días ( n=8 ); 15 días ( n=6 ); a los 21, 26 y 30 días ( n=4 ) postinfección con ayuda de un vernier ( Scala ). Los datos fueron manejados estadísticamente mediante la prueba t de Student ( 19,45 ).

#### 11.1.4 Estudio Histológico de las Lesiones Causadas por *Nocardia brasiliensis* ( 42 ).

Se sacrificaron 2 ratones de cada grupo a los 7, 15 y 30 días postinfección. Los ratones fueron anestesiados en una atmósfera con éter etílico y posteriormente fueron desangrados a blanco mediante el corte de los

vasos sanguíneos del cuello con una hoja de bisturí. La sangre se colectó y el suero obtenido se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Inmediatamente después se cortó la extremidad posterior izquierda y se colocó en PBS. Con la hoja de bisturí se realizó un corte perpendicular longitudinal a lo largo del cojinete plantar hasta que se alcanzó el tejido óseo, y luego se hizo un corte hacia la región lateral externa. Se realizó una impronta del material en un portaobjeto y finalmente la pieza se depositó en formaldehído al 4% v/v a temperatura ambiente, hasta terminar el experimento. Las improntas se fijaron con metanol y se tñeron con la técnica de Kinyoun ( 5).

#### 11.1.4.1 Descalcificación de las Muestras.

Para realizar un estudio del estado óseo de las piezas fijadas en formaldehído, se llevó a cabo una descalcificación de las mismas. Las piezas se lavaron con agua corriente y se colocaron en solución descalcificadora ( HCl concentrado 115 ml, ácido fórmico 65 ml y 500 ml de agua destilada ) por 6 días.

#### 11.1.4.2 Deshidratación e Inclusión en Parafina de las Muestras.

Una vez que se fijaron y descalcificaron las piezas, fueron deshidratadas primeramente antes de hacer la inclusión en parafina. El protocolo de deshidratación- inclusión fue realizado en un Histokinette ( British American Optical Co. LTD ) ( ver apéndice B ).

#### 11.1.4.3 Cortes Histológicos y Tinción con Hematoxilina-Eosina.

Los cortes de las piezas se realizaron mediante un microtomo 820 Spencer ( American Optical Corp. ), haciendo secciones de 5  $\mu\text{m}$  de ancho. Los cortes se hicieron de las partes superficial, intermedia y profunda de cada muestra. En el apéndice B se describe la técnica utilizada para la tinción de los cortes.

#### 11.1.4.4 Tinción de Kinyoun ( 5 ).

Las improntas realizadas de las piezas de cojinete plantar, se tiñeron por 5 minutos con carbolfucsina de Kinyoun sin calentar ( ver apéndice C ). Luego se destiñó ligeramente con una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 %. Se contrastó con azul de metileno ( 0.3 g. de azul de metileno en 100 ml de agua destilada ) por 1 minuto,

#### 11.1.5 Estudio de la Respuesta de Anticuerpos contra la Proteasa de 38 kDa.

La determinación del grado de respuesta de anticuerpos contra la proteasa de 38 kDa se realizó mediante el ensayo de ELISA descrito antes. Además de los sueros colectados de los animales sacrificados para el estudio histológico, se sangraron 3 ratones de cada grupo por vía del plexo retroorbital a los 7 y 15 días postinfección (  $n=5$  ), y 2 ratones a los 30 días (  $n=4$  ).

Cabe aclarar que inicialmente se sangraron 5 ratones de cada grupo al tiempo cero, antes de que fueran infectados en el cojinete plantar.

## 11.2 Estudio del Efecto de la Inmunización Activa y Pasiva con la Proteasa de 38 kDa en el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones BALB/c.

En este segundo experimento se planteó investigar el efecto protector en ratones inmunizados con la proteasa de 38 kDa durante el desarrollo del micetoma experimental, haciendo una comparación entre los diferentes grupos de ratones y el desarrollo natural de la enfermedad en un grupo testigo. Se trabajaron 15 grupos de ratones integrados por 7 animales cada uno, divididos éstos entre inmunización activa, inmunización pasiva con suero de 30 días postinmunización, e inmunización pasiva con suero de 60 días postinmunización ( 5 grupos de ratones por experimento ). La evaluación del efecto protector de la inmunización contra una infección por *Nocardia brasiliensis* se realizó mediante la observación macroscópica del desarrollo de lesiones en el cojinete plantar de los ratones, y mediante la técnica de ELISA para determinar su respuesta de anticuerpos contra la proteasa de 38 kDa entre los 30 y los 150 días postinfección.

### 11.2.1 Obtención de los Sueros de Ratón para la Inmunización Pasiva.

Para obtener los sueros inmunes necesarios para la inmunización pasiva, se formaron 5 grupos de 5 ratones cada uno, los cuales fueron tratados como sigue:

**Grupo Anti-Proteasa.** Este grupo recibió 10 µg de proteasa de 38 kDa en un volumen de 50 µl, por vía subcutánea en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Anti-Proteasa + AIF.** Los ratones de este grupo recibieron 50 µl de una emulsión de 10 µg de proteasa de 38 kDa y AIF, en relación 1:1, en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Anti-AIF.** Estos ratones recibieron 50  $\mu$ l de una emulsión de solución salina fisiológica - AIF 1:1, en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Anti-Extracto Celular Crudo.** Este grupo se inmunizó con 100  $\mu$ g de extracto celular crudo en un volumen de 50  $\mu$ l en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Anti-*Nocardia brasiliensis* muerta por calor.** En este grupo los ratones recibieron 50  $\mu$ l de una suspensión de *Nocardia brasiliensis* muerta por calor ( 15 libras/pulgada<sup>2</sup>, 15 minutos en autoclave ) correspondiendo a  $9 \times 10^9$  UFC, en el cojinete plantar derecho. ( 66 ).

A los 15 días posteriores a la inmunización se realizó una reinmunización inyectando el antígeno por vía subcutánea en el cojinete plantar derecho y en un volumen de 50  $\mu$ l. Las dosis aplicadas fueron: 3  $\mu$ g de proteasa; emulsión de 3  $\mu$ g de proteasa-AIF; emulsión de solución salina fisiológica-AIF; 30  $\mu$ g de extracto celular crudo; y  $3 \times 10^9$  *Nocardia brasiliensis* muerta por calor, respectivamente.

Después de 15 días se sacrificaron 2 ratones de cada grupo para obtener su suero, y se sangraron del plexo retroorbital los 3 restantes. Los sueros colectados se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , constituyendo el suero de 30 días necesario para la inmunización pasiva.

Posteriormente, a los 30 días, se sacrificaron los 3 ratones restantes de cada grupo y se obtuvo su suero, el cual se colectó, se inactivó a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos y se filtró por Millipore 0.22  $\mu\text{m}$ . Este suero de ratón de 60 días postinmunización se utilizó para inmunizar pasivamente a otros grupos de

ratones. Al mismo tiempo se descongeló el suero de 30 días postinmunización y también se inactivó y filtró para ser utilizado inmediatamente.

### 11.2.2 Inmunización Activa.

Para hacer coincidir los esquemas de inmunización pasiva y activa con el tiempo de infección de los ratones ( tiempo cero del experimento ), 30 días antes de obtener el suero inmune pasivo de 60 días se inmunizaron los ratones correspondientes a la inmunización activa. Se formaron 5 grupos de 7 ratones cada uno, de la siguiente manera:

**Grupo Proteasa.** Cada ratón se inmunizó con 10  $\mu\text{g}$  de Proteasa de 38 kDa en un volumen de 50  $\mu\text{l}$ , por vía subcutánea en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Proteasa-AIF.** Este grupo recibió 50  $\mu\text{l}$  de una emulsión de 10  $\mu\text{g}$  de proteasa de 38 kDa en AIF ( 1:1 ) en el cojinete plantar derecho.

**Grupo Testigo.** Este grupo de ratones no recibió ningún tratamiento previo a la infección experimental.

**Grupo Extracto Celular Crudo.** Los ratones de este grupo fueron inmunizados con 50  $\mu\text{l}$  de una muestra de 100  $\mu\text{g}$  de extracto celular crudo, por vía subcutánea en el cojinete plantar derecho. .

**Grupo AIF.** A este grupo se le administraron 50  $\mu\text{l}$  de una emulsión de solución salina fisiológica-AIF (1:1 ) en el cojinete plantar derecho.

Después de 15 días, los ratones se reinmunizaron con 3  $\mu\text{g}$  de proteasa; emulsión de 3  $\mu\text{g}$  de proteasa-AIF; 30  $\mu\text{g}$  de extracto celular crudo; y emulsión

de solución fisiológica-salina, respectivamente. Cada dosis se aplicó por vía subcutánea en el cojinete plantar derecho, en un volumen de 50  $\mu$ l.

Posteriormente, a los 15 días después de reinmunizar los animales, se infectaron con  $5 \times 10^6$  UFC de *Nocardia brasiliensis* en un volumen de 50  $\mu$ l, aplicados en el cojinete plantar izquierdo ( tiempo cero ).

### 11.2.3 Inmunización Pasiva.

En el experimento de inmunización pasiva se formaron 10 grupos de 7 ratones cada uno : 5 grupos para la inmunización pasiva de 30 días, y 5 grupos para la inmunización pasiva de 60 días. Las inmunizaciones pasivas se iniciaron al tiempo cero, es decir, en el momento de realizar la infección con  $5 \times 10^6$  UFC de *Nocardia brasiliensis* aplicadas en el cojinete plantar izquierdo. Los grupos de ratones que recibieron la inmunización pasiva, se identificaron con el nombre del antígeno con el cual se inmunizaron los ratones donadores del suero. Cada ratón recibió una dosis de suero correspondiente de 100  $\mu$ l por vía intraperitoneal, la cual se repitió a las 48 y 96 horas postinfección:

Grupo Pasivo Proteasa

Grupo Pasivo Proteasa-AIF

Grupo Pasivo AIF

Grupo Pasivo Extracto Celular Crudo

Grupo Pasivo *Nocardia brasiliensis* muerta por calor

### 11.2.4 Observación Macroscópica del Desarrollo del Micetoma Experimental.

La evaluación del proceso inflamatorio del cojinete plantar se realizó cada 15 días a lo largo del experimento. Los datos fueron manejados igual que en el apartado 11.1.3 para cada uno de los 15 grupos estudiados.

### **11.2.5 ELISA para Determinar el Grado de Respuesta de Anticuerpos contra la proteasa de 38 kDa.**

Se sangraron 3 ratones de cada grupo a los 30, 60, 90, 120 y 150 días postinfección, y sus sueros analizados para determinar el grado de respuesta contra la proteasa de 38 kDa, como se describió previamente.

### **11.3 Caracterización Parcial por ELISA de los Sueros usados en Inmunización Pasiva.**

#### **11.3.1 ELISA anti *Nocardia brasiliensis*.**

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-proteasa en los sueros inmunes utilizados en este experimento, se realizaron 3 pruebas de ELISA: ELISA anti-proteasas que se detalló antes; ELISA anti-extracto celular crudo estandarizado en nuestro laboratorio; y ELISA anti-extracto semipurificado estandarizado también en el laboratorio de Inmunología y aplicado en el diagnóstico de micetoma en pacientes del Hospital Universitario ( 57 ).

Las placas se sensibilizaron con 0.5 µg de proteína por pozo para la proteasa de 38 kDa y para el extracto semipurificado; mientras que del extracto celular crudo se aplicaron 50 µg. Los ensayos se realizaron como en el apartado 10.2.

#### **11.3.2 Determinación de Isotipo por ELISA.**

Para determinar el isotipo de los anticuerpos anti-extracto celular crudo y anti-proteasa, de los sueros de inmunización pasiva, se utilizó un equipo Mouse Typer Sub-Isotyping ( Bio-Rad ).

El procedimiento es el descrito previamente ( 57 ), lo mismo que las cantidades de antígeno utilizadas para sensibilizar las placas. La diferencia radica en que en lugar de agregar el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa, se adicionaron los anticuerpos tipificadores del equipo, desarrollados en conejo contra las inmunoglobulinas de ratón ( anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b y anti-IgG3 ). Después de lavar, se agregó un tercer anticuerpo anti-IgG de conejo desarrollado en cabra y conjugado a peroxidasa diluido 1:1000. El resto del ensayo se realizó como ya fue descrito.

## RESULTADOS.

### 1. OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO DE *Nocardia brasiliensis*.

Cada lote de cultivo de *Nocardia brasiliensis* en medio BHI, se obtuvo a partir de 5.4 L de medio, de los cuales se obtuvieron 10 g de masa bacteriana seca. El rendimiento obtenido del extracto celular crudo fue de 270 a 350 mg de proteína total ( 9 ). En la fig. 2 se muestra el patrón electroforético del extracto celular crudo en gel de poliacrilamida del bajo condiciones desnaturalizantes ( carril 2 ), el cual muestra una serie de bandas entre los marcadores de 66 y 14 kDa. En la fig. 3 se presenta una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no-desnaturalizantes, en donde se muestra el extracto celular y su respectivo zimograma que presenta las tres actividades proteolíticas descritas antes ( carriles 1 y 4 respectivamente )( 56 ).

### 2. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE UNA PROTEASA CASEINOLITICA DE *Nocardia brasiliensis*.

Para el aislamiento y purificación de una proteasa, a partir de extracto celular crudo de *Nocardia brasiliensis*, se seleccionó la metodología que menos interfirió con la actividad enzimática y que produjo los mejores rendimientos. Un resumen de esta metodología se presenta en la fig. 1.

#### 2.1. Cromatografía de Intercambio Iónico en Columnas de DEAE-celulosa.

El paso del extracto celular crudo a través de las columnas de DEAE-celulosa, equilibrada con Tris-HCl 0.1M, pH 6.5, retuvo aproximadamente un 95% de material proteico no-proteolítico, mientras que en el 5% del material proteico eluido se encontraron las actividades caseinolíticas en estudio. Por

cada lote de cultivo de *Nocardia brasiliensis* en medio BHI, se recuperaron entre 13 y 15 mg de eluido proteolítico ( 9 ). En la fig. 2 se observa una muestra

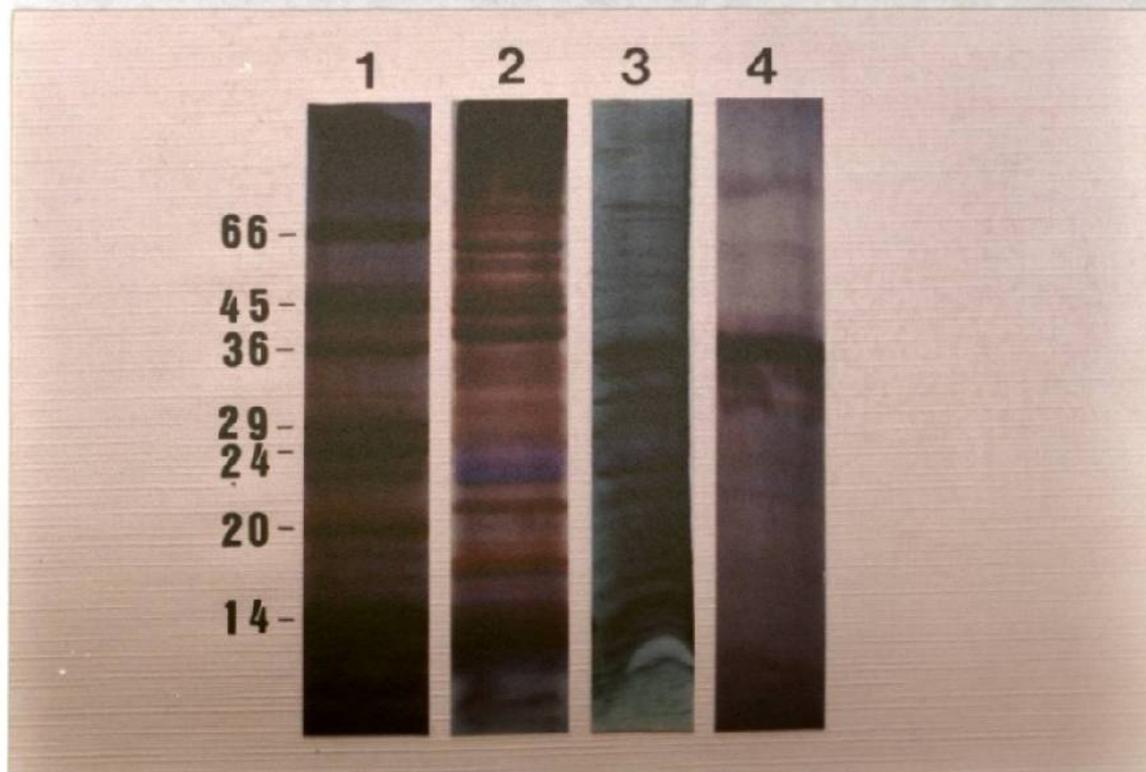
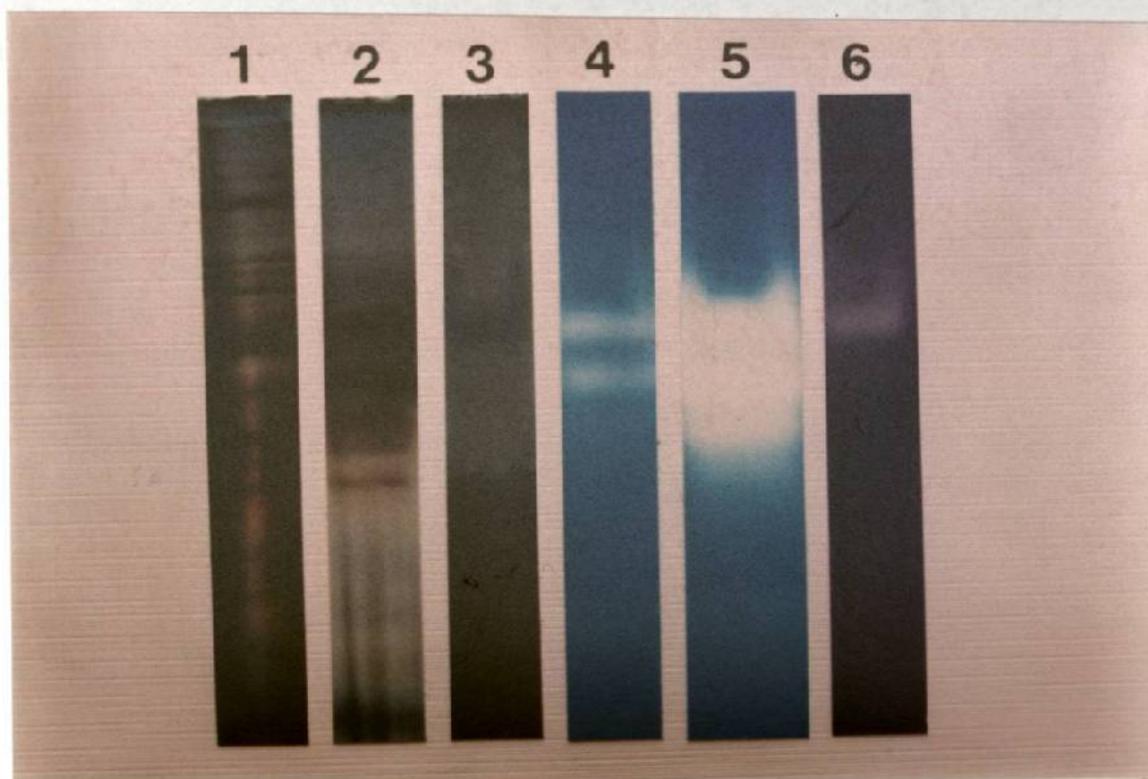


Figura No. 2 Electroforesis SDS-PAGE en el Aislamiento de las Proteasas de *Nocardia brasiliensis*. Geles de Poliacrilamida 10-18%T, 2.7%C. Carriles: **1**, Marcadores de masa molecular; **2**, Extracto celular crudo; **3**, Eluido-DEAE; **4**, Electroeluido de la proteasa superior. Tinción con azul de Coomassie y nitrato de plata.

de este eluido activo procesado bajo electroforesis en condiciones desnaturizantes ( carril 3 ), mientras que en la fig. 3 se muestra el mismo eluido pero bajo electroforesis nativa con su zimograma correspondiente para demostrar la actividad de las proteasas presentes ( carriles 2 y 5 respectivamente ).

## 2.2 Electroforesis de Nativas y Zimogramas

La electroforesis nativa se realizó en un gel de poliacrilamida 12%T y 2.7%C y en un gel sustrato de poliacrilamida 7.5%T y 2.7%C con Caseína 1.14 mg/ml. Carriles: 1, Extracto celular crudo; 2, Eluido-DEAE; 3, Electroeluido de la proteasa superior; 4, 5 y 6 son los zimogramas correspondientes teñidos con azul de Coomassie.



### 3.1 Determinación de Masa Molecular

Figura No. 3 Electroforesis Nativa-Zimograma en el Aislamiento de las Proteasas de *Nocardia brasiliensis*. Geles Nativos de Poliacrilamida 12%T, 2.7%C, y Geles Sustrato de Poliacrilamida 7.5%T, 2.7%C, con Caseína 1.14 mg/ml. Carriles: 1, Extracto celular crudo; 2, Eluido-DEAE; 3, Electroeluido de la proteasa superior; 4, 5 y 6 son los zimogramas correspondientes teñidos con azul de Coomassie. Los carriles 1, 2 y 3 están teñidos con azul de Coomassie y nitrato de plata.

### 3.2 Cromatografía de Filtración en Gel de Sephadex G-100

Debido a la poca resolución mostrada por la columna de Sephadex G-100 para separar las tres actividades proteolíticas, la masa molecular calculada por los gráficos fue de 42 kDa (Tabla II). Lo anterior debido a que la fracción más activa que mostró la actividad caseinólisis más alta en un zimograma

## 2.2. Electroelución de la Proteasa Superior.

La electroelución del eluido activo obtenido por cromatografía en DEAE-celulosa y sometido a electroforesis preparativa en condiciones no-desnaturalizantes dió un rendimiento entre el 0.4 y 0.6% en proteína total ( 9 ) para el electroeluido 1 que corresponde a la proteasa superior detectada por zimograma. Ver fig. 2 ( carril 4 ) y 3 ( carriles 3 y 6 respectivamente ).

En la tabla I se muestran los grados de purificación obtenidos en el aislamiento de la proteasa superior, la cual fue aislada con un grado de 60.9. Esta tabla además incluye el contenido de proteínas y la actividad específica de cada uno de los pasos del esquema de aislamiento seguido.

## 3. CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL DE LAS PROTEASAS CASEINOLITICAS DE *Nocardia brasiliensis*.

### 3.1. Determinación de Masa Molecular.

La masa molecular de las proteasas se determinó por cromatografía de filtración en gel y por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

#### 3.1.1 Cromatografía de Filtración en Gel en Sephadex G-100.

Debido a la poca resolución mostrada por la columna de Sephadex G-100 para separar las tres actividades proteolíticas, la masa molecular calculada para las mismas fue de 42 kDa (Tabla II). Lo anterior debido a que la fracción cromatográfica que mostró la actividad caseinolítica más alta en un zimograma

TABLA I

AISLAMIENTO DE LAS PROTEASAS DE *Nocardia brasiliensis*

	PROTEINA TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA	GRADO DE PURIFICACION*
EXTRACTO CELULAR CRUDO	300 mg	1.8 U/mg	
ELUIDO DEAE- CELULOSA	14.7 mg	5.7 U/mg	3.1
ELECTRO- ELUIDOS 1, 2 Y 3**	0.068 mg	109.7 U/mg	60.9
	0.143 mg	37.7 U/mg	20.9
	0.099 mg	26.2 U/mg	14.5

\* Grado de Purificación= Actividad Específica en el Paso 2/Actividad Específica en el Paso 1.

\*\* El orden corresponde a la primera, segunda y tercera actividad proteolítica en los zimogramas.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford ( 9 ), mientras que la actividad proteolítica fue medida mediante la técnica de McLaughlin y Faubert ( 41 ).

de punto, también presentó la mayor actividad de las 3 proteasas en un zimograma realizado de una electroforesis de las fracciones.

### 3.1.2 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes con SDS.

Para la determinación de masa molecular de las proteasas de *N. brasiliensis*, se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes ( SDS-PAGE ) a partir de enzimas purificadas por electroelución. Las masas moleculares calculadas fueron de 38 y 36 kDa para las proteasas superior e intermedia respectivamente. Estos valores representan un promedio de 5 determinaciones. En la tabla III se muestra una de estas determinaciones. La tercer actividad caseinolítica no fue posible detectarse en las electroforesis.

**TABLA II**

#### **DETERMINACION DE MASA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL ( SEPHADEX G-100 ).**

<b>MARCADORES</b>	<b>Ve ( ml )</b>	<b>Ve/Vo</b>	<b>PM ( kDa )</b>
<b>ALBUMINA BOVINA</b>	<b>40.2</b>	<b>1.116</b>	<b>66</b>
<b>ANHIDRASA CARBONICA</b>	<b>54.8</b>	<b>1.522</b>	<b>29</b>
<b>CITOCROMO c</b>	<b>63.2</b>	<b>1.755</b>	<b>12.4</b>
<b>PROTEASAS DE <i>N. brasiliensis</i></b>	<b>50.0</b>	<b>1.388</b>	<b>42.2</b>

Vo Dextrán azul= 36.0 ml

r=-0.998; A=159.818; B=-84.692

TABLA III

DETERMINACION DE MASA MOLECULAR POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES ( SDS-PAGE ), DE LAS PROTEASAS DE *Nocardia brasiliensis*.

MARCADORES	Rf	PM ( kDa )
ALBUMINA BOVINA	0.250	66
ALBUMINA DE HUEVO	0.366	45
GLICERALDEHIDO 3-P DESHIDROGENASA	0.433	36
ANHIDRASA CARBONICA	0.566	29
TRIPSINOGENO	0.616	24
INHIBIDOR DE TRIPSINA	0.733	20
$\alpha$ -LACTOALBUMINA	0.883	14.2
ELECTROELUIDO 1 PROTEASA SUPERIOR	0.483	38.5
ELECTROELUIDO 2 PROTEASA INTERMEDIA	0.516	36.0

$r=0.942$ ; A=75.183; B=75.924

### 3.2. Determinación de Punto Isoeléctrico.

De acuerdo a los datos obtenidos de los zimogramas y los geles de isoelectroenfoque respectivos, el punto isoelectrico para la proteasa superior fue de 5.2, mientras que para la intermedia y la inferior el valor varió entre 4.0 y 4.7. Los valores anteriores son un promedio obtenido de 7 determinaciones. En la tabla IV se muestra una de ellas.

### 3.3 Efecto de la Temperatura en la Estabilidad de las Proteasas Presentes en el Extracto Celular Crudo.

La incubación del extracto celular crudo a 37°C durante 2 horas, practicamente no presentó cambios en el zimograma con respecto al control sin incubar, como se observa en los carriles 2 y 1 respectivamente, de la fig. 4.

En cambio los tratamientos a 45 y 56°C, si muestran pérdida de actividad proteolítica, sobre todo a 56°C ( carril No. 4 ); mientras que la incubación del extracto a 45°C parece mostrar una ligera disminucion en la actividad de la proteasa superior ( carril No. 3 ). Por otro lado, las muestras incubadas a 4°C y recolectadas a los 0, 6, 12 y 18 días ( carriles 5 al 8 ), muestran claramente como la actividad caseinolítica superior va disminuyendo con el tiempo, mientras la intermedia va aumentando. La proteasa inferior parece aumentar también ligeramente, pero con muy poca actividad.

### 3.4 Ensayo de Inhibición de la Actividad de las Proteasas de *Nocardia brasiliensis* para Determinar su Clase Catalítica.

El ensayo de inhibición realizado con el extracto celular crudo, y observado mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida y

zimograma, mostró inhibición de la actividad caseinolítica con PMSF, en las tres concentraciones probadas, la cual no fue revertida por la adición del

**TABLA IV**

**DETERMINACION DE PUNTO ISOELECTRICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LAS PROTEASAS DE *Nocardia brasiliensis*.**

MARCADORES	MOVILIDAD DESDE EL ANODO ( cm )	pI
AMILOGLICOSIDASA	1.40	3.55
INHIBIDOR DE TRIPSINA	2.10	4.55
β-LACTOGLOBULINA A	4.80	5.13
ANHIDRASA CARBONICA	6.15	5.65
MIOGLOBINA	7.15 Y 7.60	6.76 Y 7.16
DESHIDROGENASA L-LACTICA	8.05, 8.35 Y 8.65	8.30, 8.40 Y 8.55
TRIPSINOGENO	8.90	9.30
PROTEASA SUPERIOR	4.20	5.28
PROTEASA INTERMEDIA E INFERIOR	2.35 Y 3.00	4.02 Y 4.46

Las proteasas se observaron por zimografía del gel de isoelectroenfoque.

r=0.951; A=2.420; B=0.683

agente reductor 2-mercaptoetanol, como se muestra en la fig. 5 ( carriles 2 y 3 ). En cambio, el tratamiento del extracto celular crudo con los otros inhibidores, no muestra diferencia con respecto al control en el zimograma ( carriles 1, 4, 5 y 6 ). Por otro lado, en la tabla V se presenta el ensayo paralelo realizado con azocaseína, en el cual observamos el mismo comportamiento anterior, en donde PMSF produjo una inhibición del 58% de la actividad caseinolítica, la cual no fue revertida por el 2-mercaptoetanol 10mM. En cambio los otros inhibidores no tuvieron aparentemente ningún efecto sobre

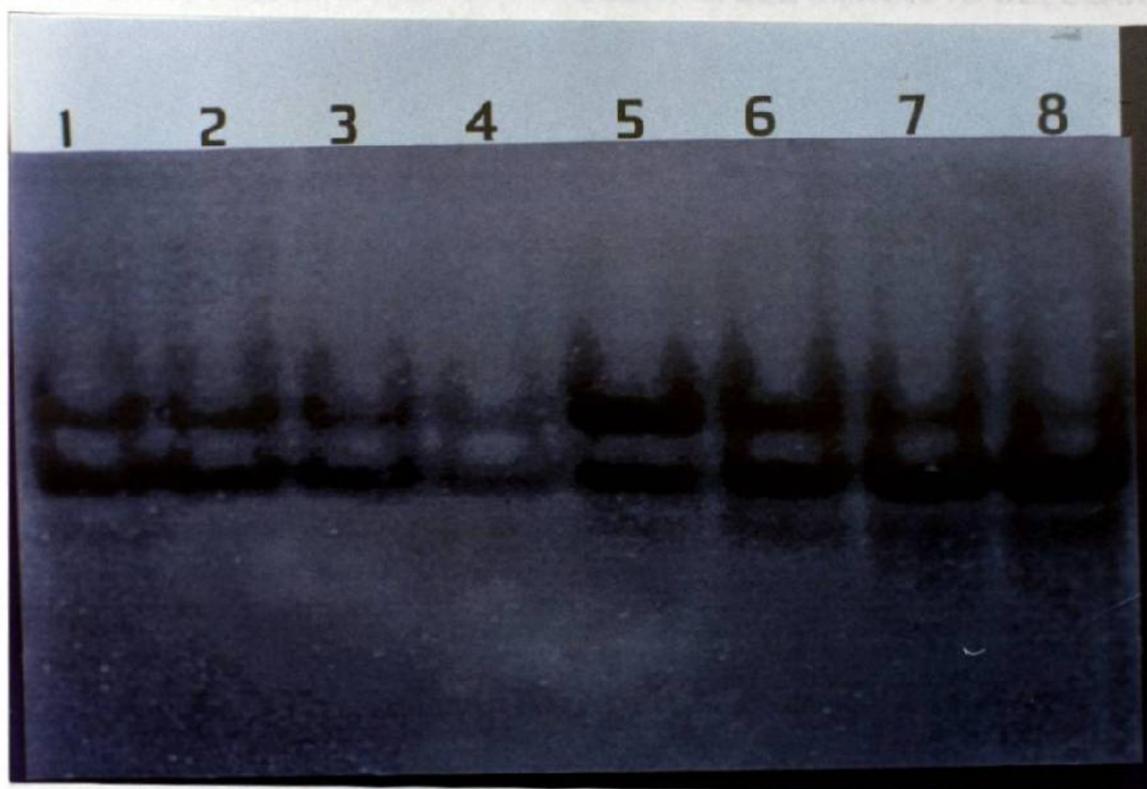


Figura No. 4 Zimograma de Autodigestión Parcial de Muestras de Extracto Celular Crudo de *Nocardia brasiliensis*. "Negativo" de zimograma de extracto celular crudo incubado a diferentes temperaturas para observar la autodigestión de las proteasas. Carriles 1-4, Control y muestras incubadas a 37, 45 y 56°C por 2 horas respectivamente; Carriles 5-8, Control y muestras incubadas a 4°C durante 6, 12 y 18 días respectivamente.

la actividad de las muestras. Lo anterior, permite clasificar a las proteasas de *Nocardia brasiliensis* como serina proteasas.

**TABLA V**

**ENSAYO DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD CASEINOLITICA PARA DETERMINAR SU CLASIFICACION CATALITICA. PORCENTAGE DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL EXTRACTO CELULAR CRUDO DE *Nocardia brasiliensis***

<b>INHIBIDOR</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<b>PORCENTAJE DE INHIBICION</b>
<b>PMSF</b>	<b>0.2 mM</b>	<b>58</b>
<b>PMSF+2-ME</b>	<b>0.2 mM</b>	<b>58</b>
<b>EDTA</b>	<b>5 mM</b>	<b>0</b>
<b>AC. IODOACETICO</b>	<b>0.1 mM</b>	<b>0</b>
<b>1-10 FENANTROLINA</b>	<b>2 mM</b>	<b>0</b>

Concentraciones efectivas: PMSF ( 0.1-1.0 mM ), EDTA ( 1-10 mM ), Acido iodoacético ( 10-100mM ), 1-10 Fenantrolina ( 1-10 mM ) ( 8 ).

Método de Mc Laughlin y Faubert ( 41 ).

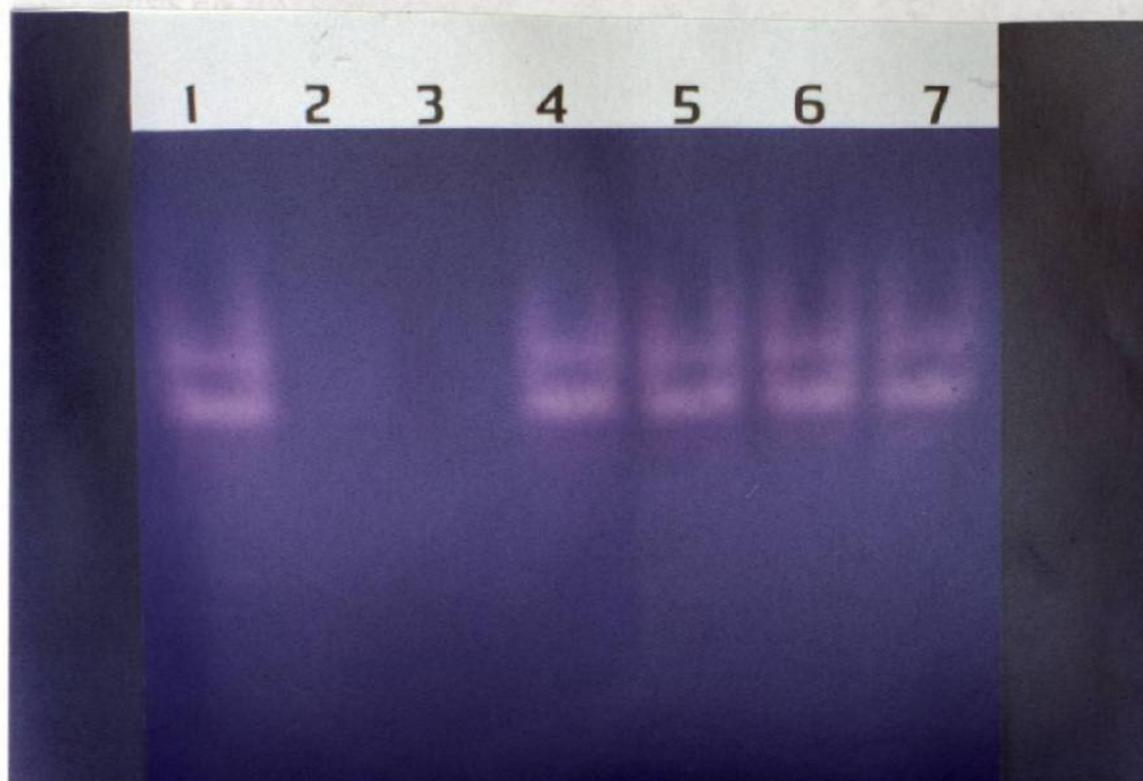


Figura No. 5 Zimograma de Muestras de Extracto Celular Crudo en la Determinación de la Clase Catalítica de las Proteasas. Se trataron muestras de extracto celular crudo con los diferentes inhibidores a 1, 10 y 100 veces su concentración efectiva ( 8 ). La mezcla de inhibición se incubó por 15 minutos a 37°C antes de ser aplicada a un gel de poliacrilamida y efectuar la electroforesis en condiciones no-desnaturalizantes. La figura representa el zimograma correspondiente. Carriles: **1**, Extracto celular crudo sin tratamiento; **2**, PMSF; **3**, PMSF y 2-mercaptoetanol; **4**, EDTA; **5**, Acido iodoacético; **6**, 1,10-fenantrolina; **7**, Control de solvente con metanol

#### 4. INMUNOGENICIDAD DE LA PROTEASA DE 38 kDa DE *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el grupo de ratones inmunizados con el electroeluido 1 ( proteasa de 38 kDa ), respondieron positivamente contra el mismo antígeno en la prueba de ELISA a los 30 y 45 días posteriores a la inmunización, mientras que los ratones inmunizados con la emulsión de electroeluido 1 y adyuvante incompleto de Freund respondieron desde los 15 días de una manera más rápida y alta. Los sueros de los ratones inmunizados con el eluido de extracto celular crudo pasado por columnas de DEAE y enriquecido en las 3 proteasas, también mostraron una buena respuesta desde los 15 y 30 días. Por otra parte, los valores de absorbancia de los sueros de los ratones tratados solo con adyuvante incompleto de Freund, se utilizaron como el control negativo del ensayo, junto con los sueros de los demás ratones recolectados a tiempo cero. Ver la fig. 6.

El análisis estadístico de estos resultados fue realizado mediante la prueba t de Student y reveló que no existen diferencias significativas entre la magnitud de la respuesta de anticuerpos de los ratones inmunizados con el electroeluido 1 emulsificado con adyuvante incompleto de Freund y la respuesta de anticuerpos de los ratones tratados con el eluido de DEAE-celulosa (  $p < 0.5$  ) a ninguno de los tiempos ensayados. En cambio la respuesta de estos mismos ratones junto con la de los ratones inmunizados solamente con el electroeluido 1 muestra una diferencia significativa a los 45 y 60 días (  $p < 0.01$  ) con respecto a los ratones tratados únicamente con adyuvante incompleto de Freund. Por otro lado, la respuesta de anticuerpos del grupo de ratones inmunizados con la proteasa-AIF y el grupo tratado con eluido-DEAE respecto al grupo tratado con AIF mostró una  $p < 0.001$  a los 45 y 60 días. La respuesta observada entre los ratones inmunizados con el electroeluido 1 y los

ratones tratados con el mismo electroeluido emulsificado con adyuvante también fue estadísticamente diferente entre los 45 y 60 días ( $p < 0.01$ ). Entre los 0 y 15 días no se presentaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de ratones estudiados.

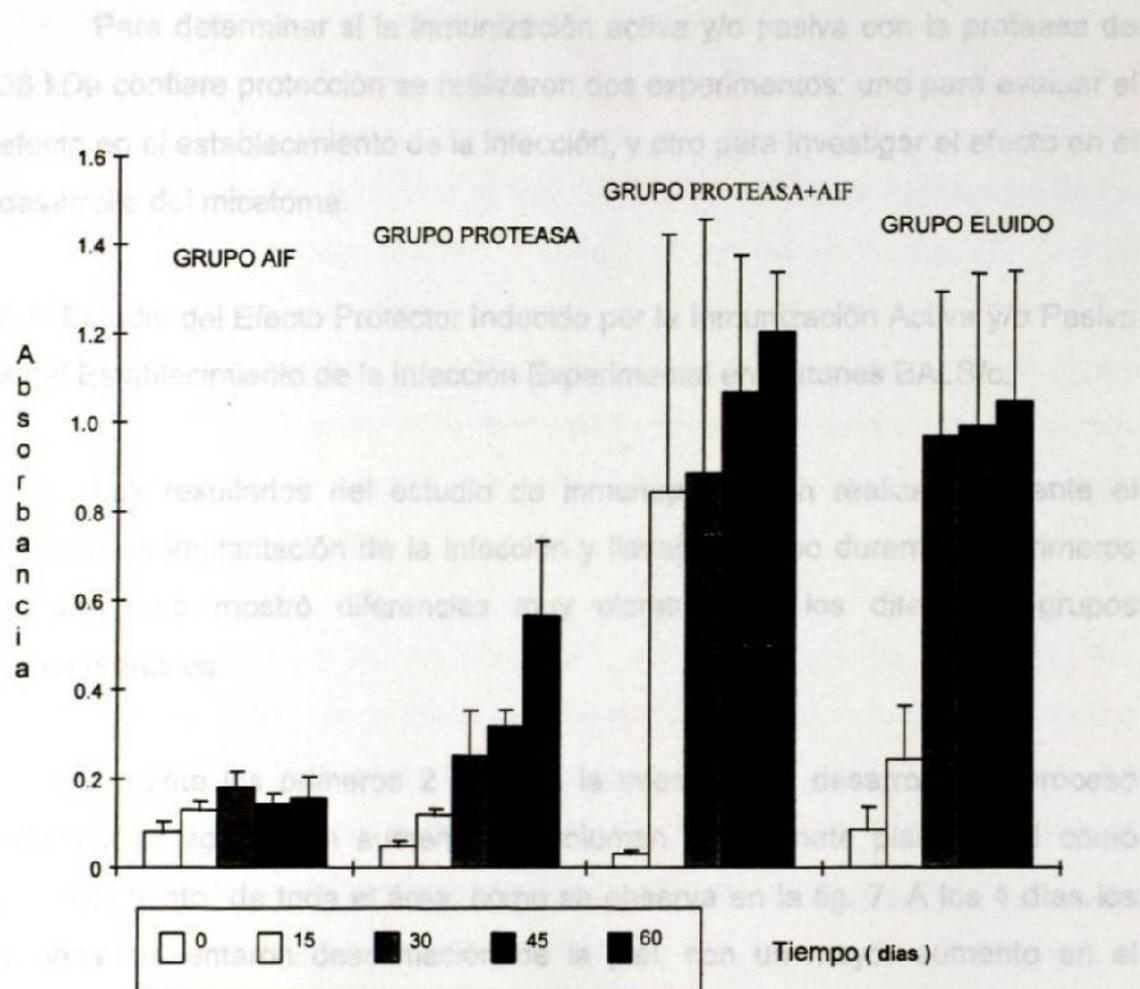


Figura No. 6 Inmunogenicidad de La Proteasa de 38kDa en Ratones BALB/c. Las columnas representan el promedio de los valores de absorbancia y su desviación estándar, de los sueros de ratones inmunizados analizados por ELISA contra la proteasa.

El registro que se realizó midiendo el tamaño del cojinete plantar de los ratones con respecto al tamaño que presentaban antes de ser infectados,

## 5. EFECTO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEASA DE 38 kDa EN RATONES BALB/c EN LA IMPLANTACION Y DESARROLLO DEL MICETOMA EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis*.

Para determinar si la inmunización activa y/o pasiva con la proteasa de 38 kDa confiere protección se realizaron dos experimentos: uno para evaluar el efecto en el establecimiento de la infección, y otro para investigar el efecto en el desarrollo del micetoma.

### 5.1. Estudio del Efecto Protector Inducido por la Inmunización Activa y/o Pasiva en el Establecimiento de la Infección Experimental en Ratones BALB/c.

Los resultados del estudio de inmunoprotección realizado durante el periodo de implantación de la infección y llevado a cabo durante los primeros 30 días, no mostró diferencias muy claras entre los diferentes grupos experimentales.

Durante los primeros 2 días de la infección se desarrolló un proceso inflamatorio agudo con aumento de volumen del cojinete plantar, así como enrojecimiento de toda el área, como se observa en la fig. 7. A los 4 días los ratones presentaron descamación de la piel, con un mayor aumento en el volumen del cojinete plantar. A los 7 días postinfección además se observó la presencia de ulceraciones en la piel con secreción sero-purulenta. Después de 15 días postinfección, los ratones presentaron mejoría en forma paulativa, desapareciendo la secreción, las úlceras, la descamación de la piel y disminuyendo el volumen del cojinete plantar hasta casi alcanzar el tamaño normal en la mayoría de los ratones entre los 21-30 días.

El registro que se realizó midiendo el tamaño del cojinete plantar de los ratones con respecto al tamaño que presentaban antes de ser infectados,

muestra también el comportamiento observado en la fig. 7, en donde a los 7 días se presentó el mayor aumento en el volumen del cojinete, el cual fue disminuyendo pero sin alcanzar el tamaño normal (Fig. 8). Algunos ratones como los tratados por inmunización pasiva con suero anti-proteasa ( Grupo Pasivo Proteasa ) presentaron mayor inflamación, con una tendencia a aumentar entre los 26 y 30 días. En cambio el Grupo Proteasa-AIF presentó una inflamación menor en estos mismos días, siendo estadísticamente diferente al Grupo Extracto Celular Crudo en los días 21, 26 y 30, al Grupo Testigo en los días 2, 4 y 26, y también al Grupo Pasivo Proteasa en los días 4, 15, 21 y 30 (  $p < 0.01 - 0.05$  ). Los ratones del grupo control de inflamación (Grupo AIF ) tratados únicamente con solución salina-AIF, solo presentaron una ligera inflamación a los 7 días, pero fue estadísticamente diferente a los demás grupos a lo largo del experimento (  $p < 0.01$  ), con la excepción del Grupo Proteasa-AIF a los 30 días.

Con respecto al estudio histológico del cojinete plantar de los mismos grupos de ratones inmunizados e infectados, no se encontraron grandes diferencias entre los mismos. En la evaluación a los 7 días postinfección, los ratones mostraron en sus cojinetes plantares una necrosis tisular más severa, con gran ulceración de la piel y con abscesos muy grandes y mal delimitados ( Fig. 9 ). El hueso se encontró aparentemente sano y no se observaron gránulos del agente infeccioso, apreciándose una intensa infiltración de leucocitos polimorfonucleares y ocasionalmente macrófagos. A los 15 días postinfección se observaron abscesos con tendencia a la delimitación ( Fig. 9 ), y una disminución de las áreas de necrosis. Ya no se observó ulceración de la piel, ocasionalmente se encontraron gránulos ( Fig. 10 ) y se apreció un aumento de macrófagos principalmente en la periferia de los abscesos. Los cortes de cojinetes plantares de 30 días postinfección mostraron abscesos bien delimitados con cápsulas de pared gruesa, zonas mínimas de necrosis y un aumento del tejido de cicatrización. Se identificaron gránulos en el centro de

los abscesos. En este estadio los abscesos aparecieron rodeados de una mayor cantidad de macrófagos distribuidos en la periferia ( Fig. 11 ). En general, los cortes histológicos mostraron una transición de un proceso infeccioso agudo inespecífico, a la formación de granulomas conteniendo los gránulos característicos de los actinomicetomas.

En el estudio de las improntas de los cojinetes plantares infectados no se observó una diferencia clara entre los diferentes grupos experimentales. A los 7 días postinfección se observaron una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares, y filamentos y grumos de bacterias acidoresistentes ( Fig. 12 ). A los 15 días ya no se observaron bacterias y se encontraron células mononucleares. A los 30 días se identificaron gránulos del agente infeccioso, así como un incremento en el número de macrófagos ( Fig. 13 ).

El ensayo de ELISA para determinar el grado de respuesta contra la proteasa de 38 kDa, realizado en estos mismos ratones ( Fig. 14 ), muestra como los ratones del Grupo Proteasa-AIF presentaron una buena respuesta de anticuerpos desde el tiempo cero hasta los 30 días postinfección, siendo sus valores estadísticamente significativos con respecto a los demás grupos a los 0 y 7 días; y además a los 15 días comparando con los Grupos Testigo y Pasivo Proteasa (  $p < 0.01 - 0.05$  ). Este mismo Grupo Proteasa-AIF solo fue diferente al Grupo Extracto Celular Crudo al tiempo cero (  $p < 0.01$  ). El Grupo Pasivo Proteasa mostró una diferencia significativa con respecto al Grupo Pasivo AIF únicamente a los 15 y 30 días (  $p < 0.01$  y  $p < 0.02$  respectivamente ).

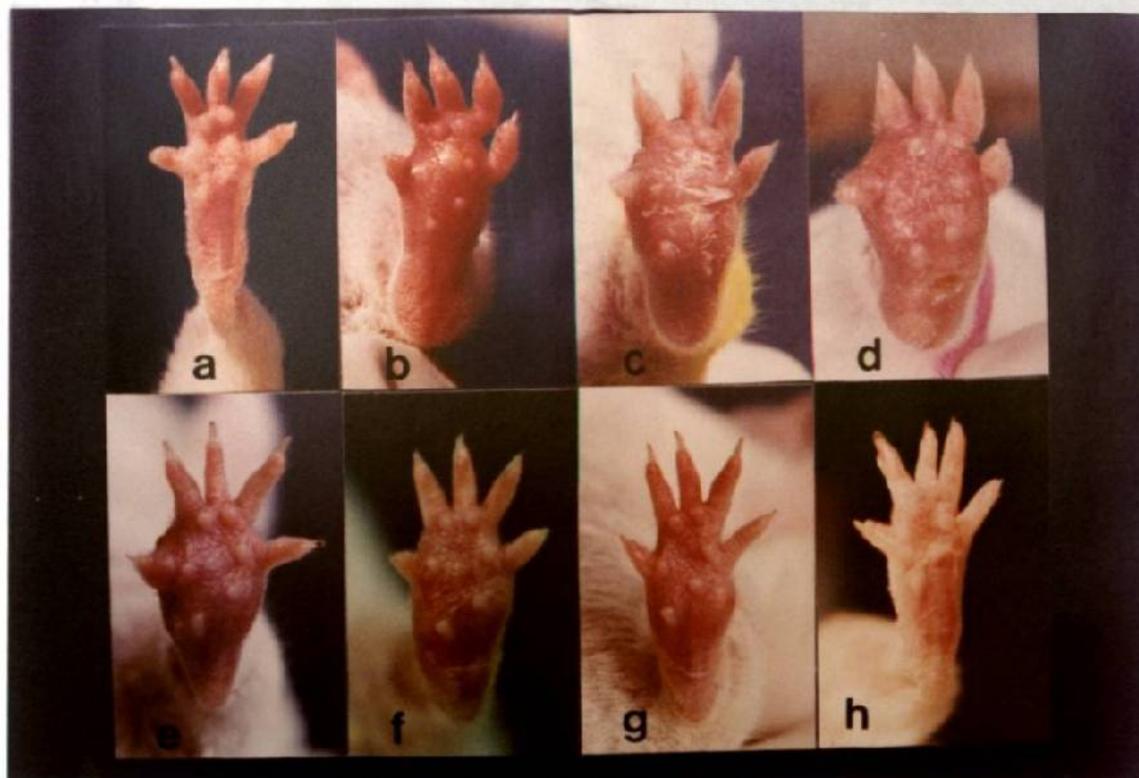


Figura No. 7 Implantación de la Infección por *Nocardia brasiliensis* en el Cojinete Plantar de Ratones BALB/c. Los ratones recibieron una dosis de  $5 \times 10^6$  UFC por vía subcutánea en el cojinete plantar. **a**, Cojinete plantar sano; **b-h**, Cojinetes plantares con 2, 4, 7, 11, 15, 21 y 30 días postinfección respectivamente. 2X.

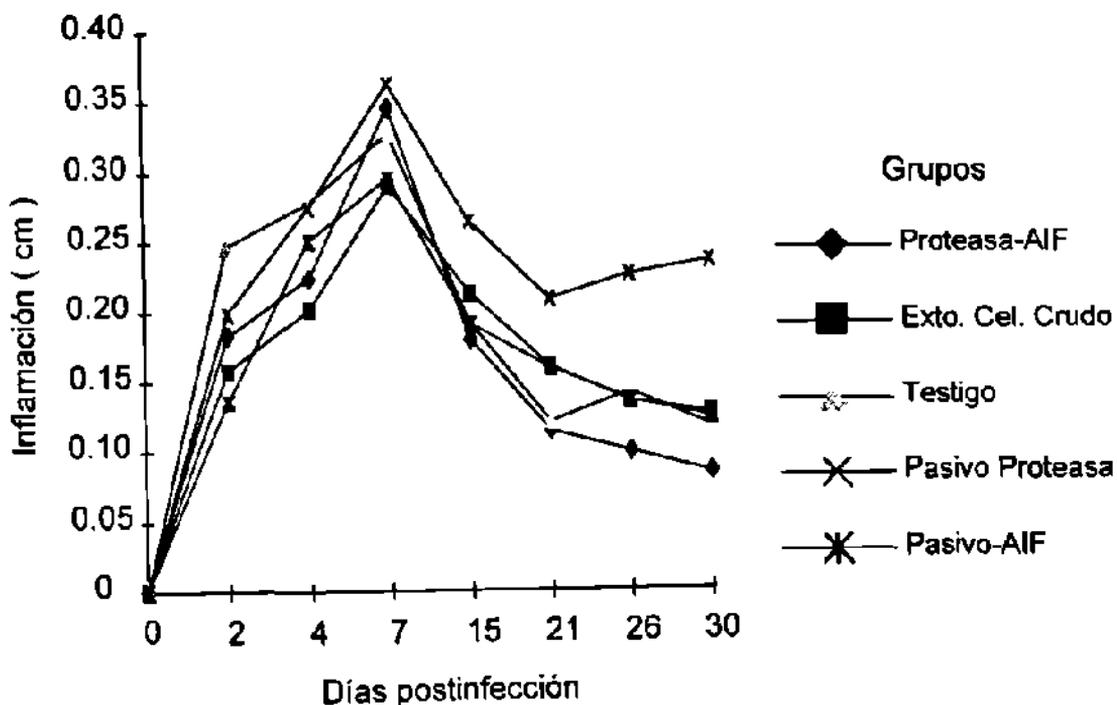


Figura No. 8 Registro de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar Durante la Implantación de la Infección Experimental. El registro de inflamación corresponde a la diferencia ( en centímetros ) entre la medición del cojinete plantar de los animales infectados con respecto al tamaño del mismo antes de la infección. Los grupos de ratones Proteasa-AIF y Extracto Celular Crudo corresponden a la inmunización activa, mientras los grupos Pasivo Proteasa y Pasivo-AIF a la inmunización pasiva. Cada punto representa los promedios de 8 ratones (días 2, 4 y 7 ), 6 ratones (15 días ) y 4 ratones ( 21, 26 y 30 días ) de cada grupo experimental. El eje X no se encuentra a escala.

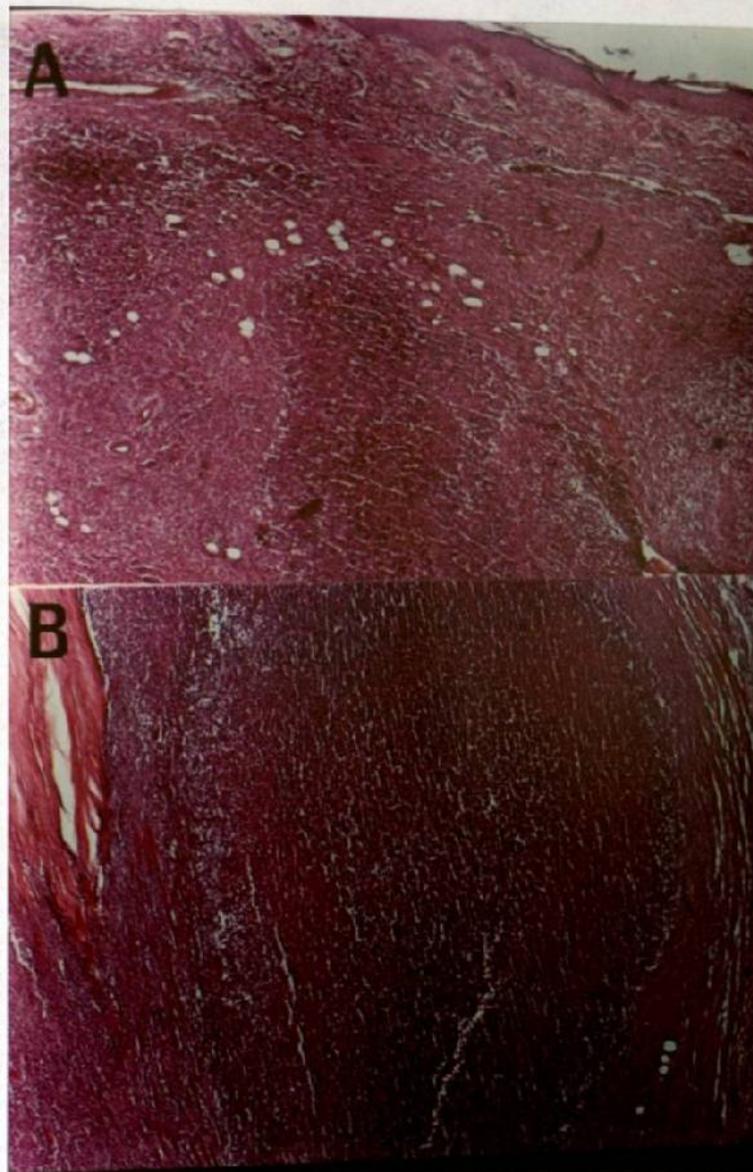


Figura No. 9 Microfotografía de Cojinete Plantar de Ratones Infectados con *Nocardia brasiliensis*. Fenómeno inflamatorio en los cojinetes plantares de ratón en donde se observan abscesos grandes: **A**, Grupo Pasivo AIF de 7 días postinfección, con poca o nula delimitación; **B**, Grupo Extracto Celular Crudo de 15 días postinfección, mostrando una ligera delimitación de los abscesos. Cortes de 5  $\mu$ m, Tinción de H y E. 50X,

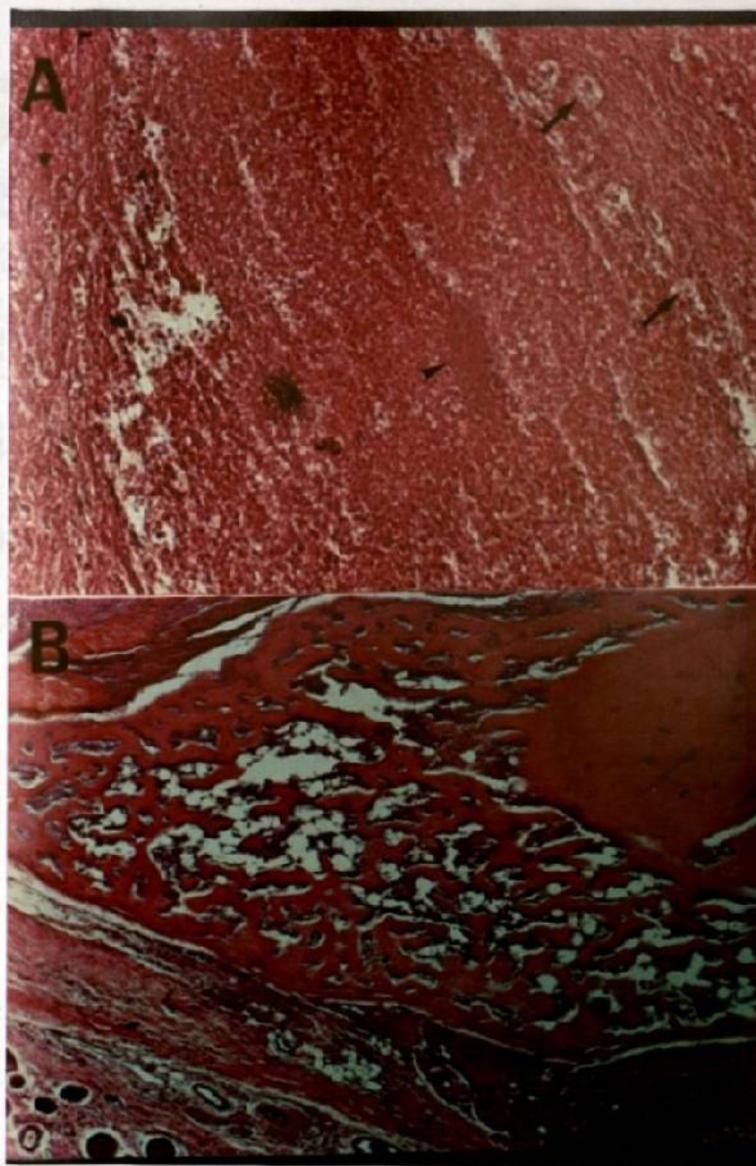


Figura No. 10 Microfotografía de Cojinete Plantar con Gránulo de *Nocardia brasiliensis* y Afección Osea. **A**, Grupo Testigo de 15 días postinfección, mostrando absceso rodeado ligeramente por algunos macrófagos ( flechas ) y con un gránulo del agente infeccioso al centro ( punta de flecha ), 160X; **B**, Grupo Extracto Celular Crudo de 15 días postinfección. Cortes de 5  $\mu$ m, tinción de H y E. 50X.

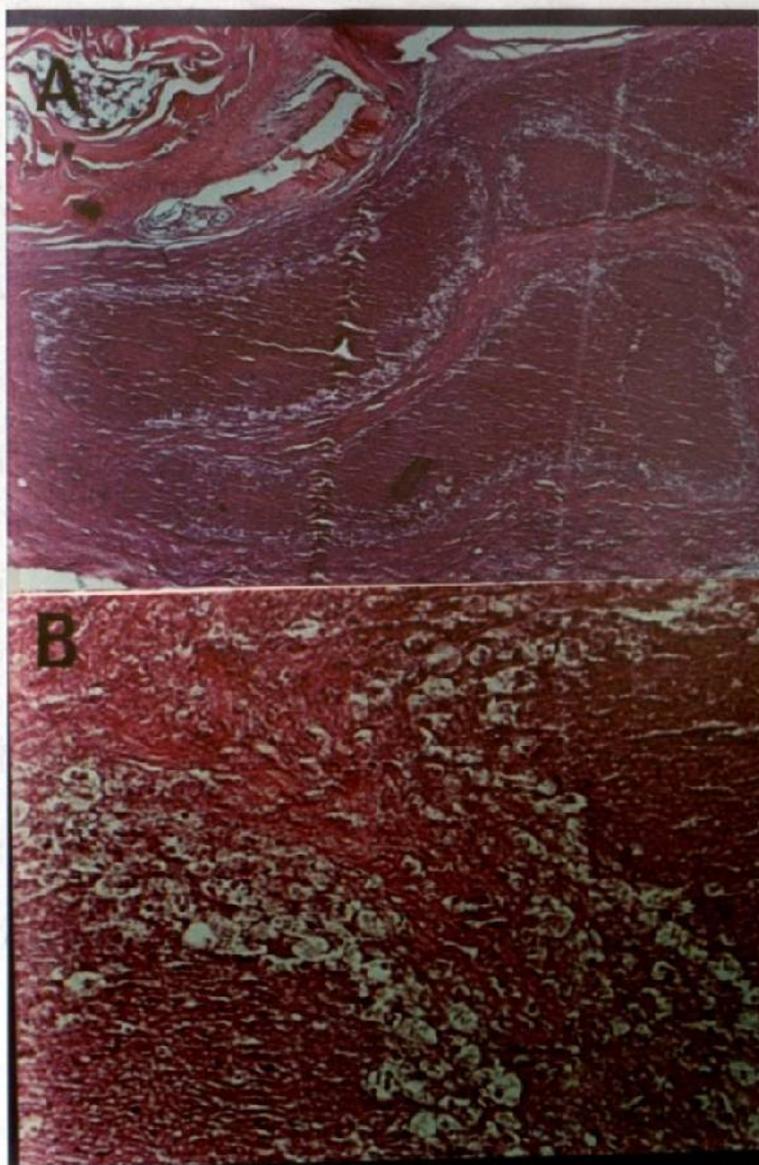


Figura No. 11 Microfotografía de Cojinete Plantar con Macrófagos. Cortes histológicos de animales del Grupo Extracto Celular Crudo con 30 días postinfección: **A**, Abscesos bien delimitados con anillo de macrófagos periféricos, 50X; **B**, Acercamiento entre 2 abscesos rodeados de macrófagos. Cortes de 5  $\mu$ m, tinción de H y E. 160X.

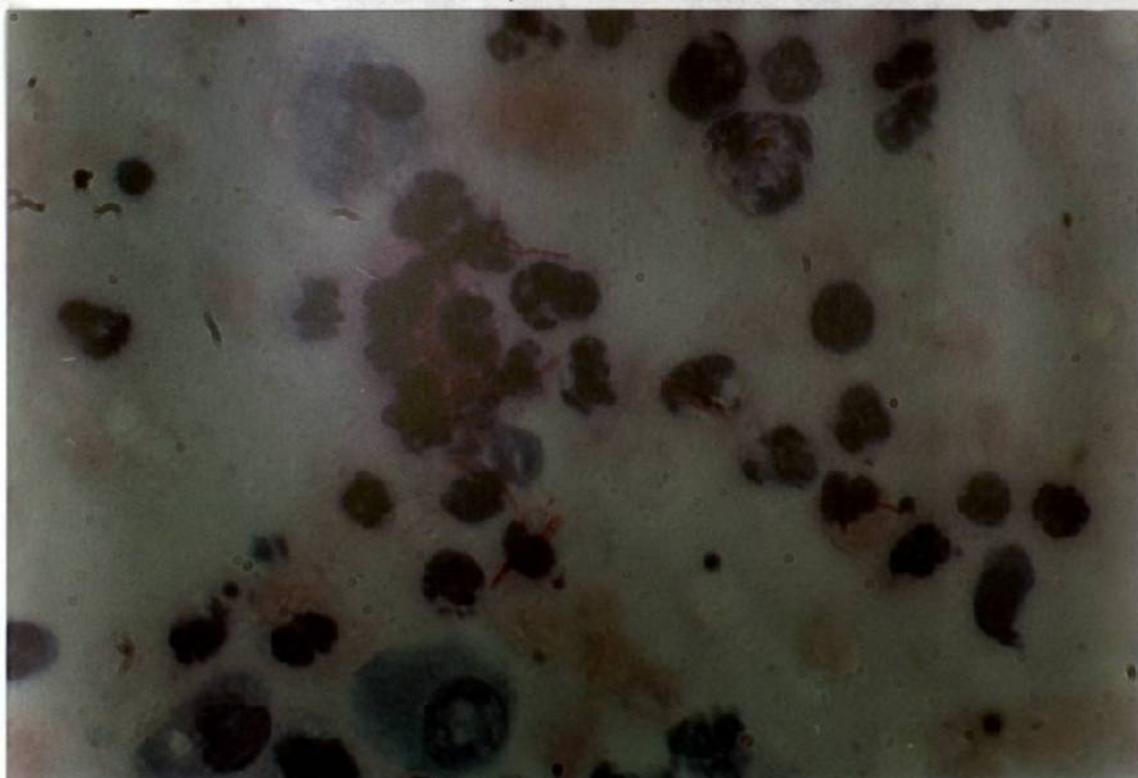


Figura No. 12 Impronta de la Secreción del Cojinete Plantar de Ratones BALB/c Infeccionados con *N. brasiliensis* Mostrando Filamentos Ácido-resistentes. Se observan filamentos y grumos ácido-resistentes junto con leucocitos polimorfonucleares y mononucleares. Grupo Extracto Celular Crudo a los 7 días postinfección. Tinción de Kinyoun. 1000X

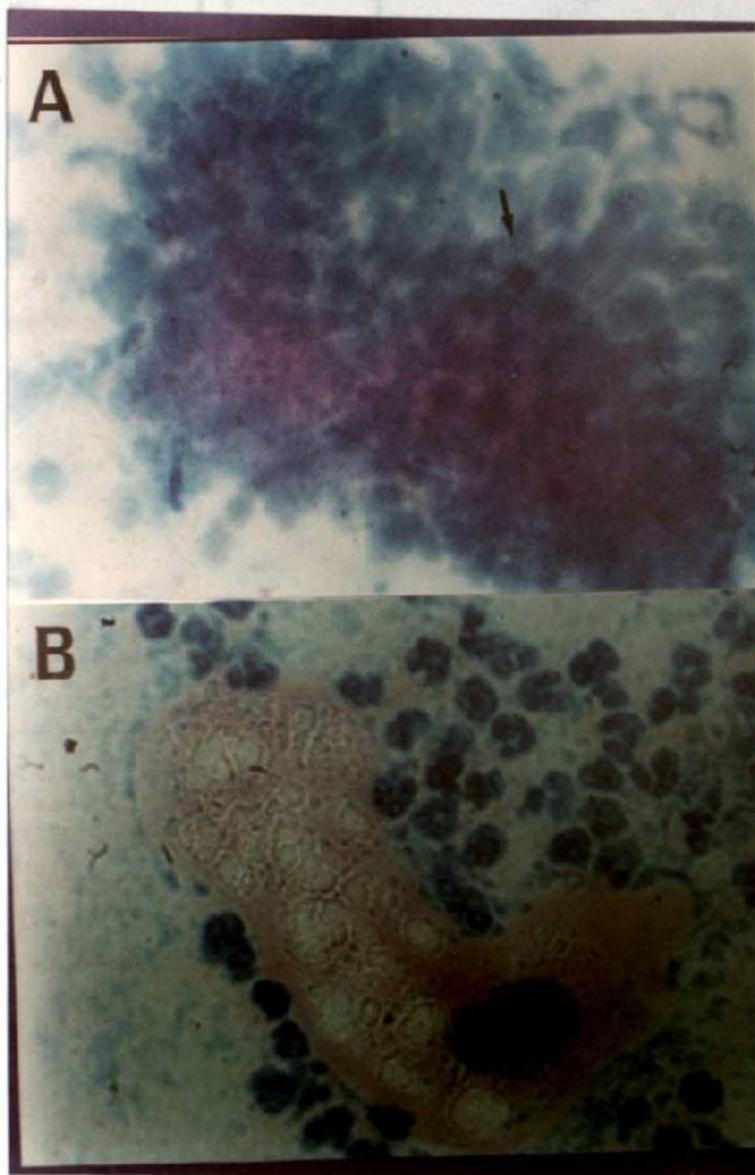


Figura No. 13 Imprinta de Cojinete Plantar de Ratones BALB/c Infeccionados con *N. brasiliensis* Mostrando Gránulo y Macrófago. **A**, Grupo Proteasa-AIF de 30 días postinfección, se muestra un gránulo del agente infeccioso rodeado de células inflamatorias, la flecha indica los filamentos de la microcolonia, 1000X; **B**, Macrófago gigante junto a leucocitos polimorfonucleares en un micetoma de 166 días. Tinción de Kinyoun. 500X

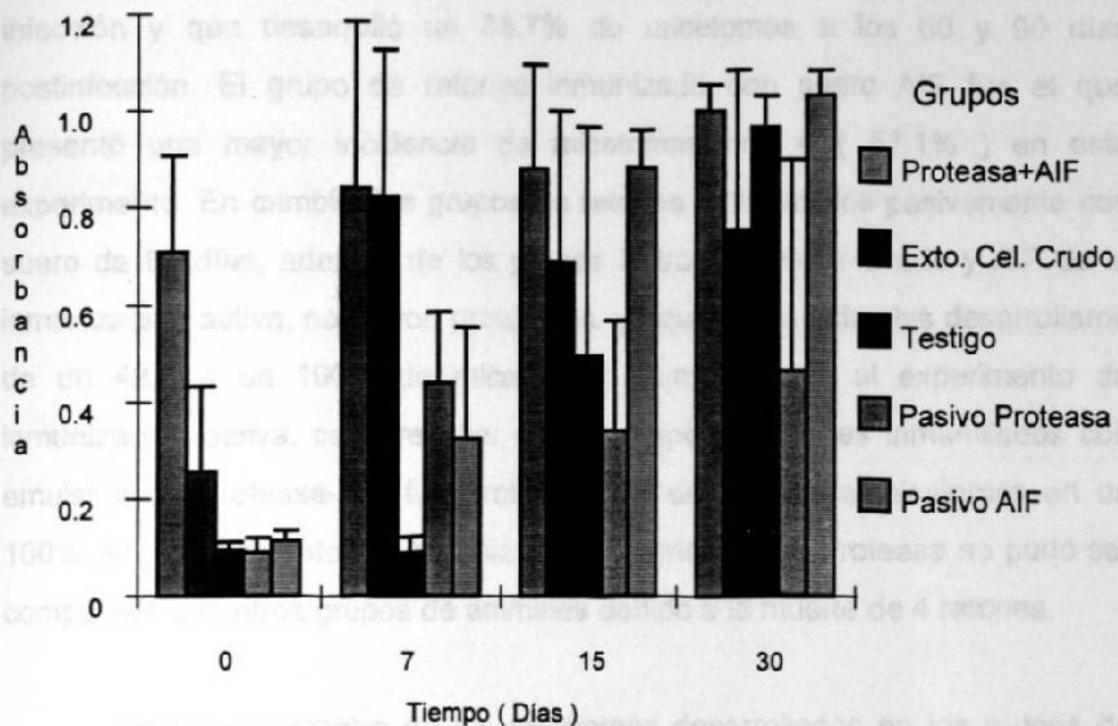


Figura No. 14 Determinación de Anticuerpos Anti-Proteasa por ELISA en Sueros de Ratones Inmunizados Activa y Pasivamente Durante el Establecimiento de la Infección por *Nocardia brasiliensis*. Cada columna representa el promedio de valores de absorbancia más 1 desviación estándar (  $n=5$  a los tiempos 0, 7 y 15 días ; y  $n=4$  a los 30 días ).

## 5.2 Estudio del Efecto Protector Inducido por la Inmunización Activa y/o Pasiva en el Desarrollo del Micetoma Experimental.

El estudio del efecto de los anticuerpos anti-antígenos de *N. brasiliensis*, en ratones inmunizados activa y pasivamente, sobre el desarrollo de micetoma experimental evaluado entre los 30 y 150 días postinfección, muestra en general que la inmunización pasiva con suero de 30 días protegió en forma parcial a los ratones, los cuales presentaron una marcada disminución en el desarrollo de micetomas ( 14.2-42.8% en los grupos Proteasa, Proteasa-AIF, Extracto Celular Crudo y *N. brasiliensis* muerta por calor ) ( Tabla VI ), con respecto al grupo Testigo que no recibió ninguna inmunización previa a la

infección y que desarrolló un 85.7% de micetomas a los 60 y 90 días postinfección. El grupo de ratones inmunizado con suero AIF fue el que presentó una mayor incidencia de micetomas con 4 ( 57.1% ) en este experimento. En cambio, los grupos de ratones inmunizados pasivamente con suero de 60 días, además de los grupos Extracto Celular Crudo y AIF de la inmunización activa, no fueron protegidos, ya que estos animales desarrollaron de un 42.8 a un 100% de micetomas. Con respecto al experimento de inmunización activa, cabe resaltar que el grupo de ratones inmunizados con emulsión de Proteasa-AIF fue protegido del desarrollo de micetomas en un 100%. El grupo de ratones inmunizado activamente con Proteasa no pudo ser comparado con otros grupos de animales debido a la muerte de 4 ratones.

Aunque el diámetro de los micetomas desarrollados en los grupos de ratones de la inmunización pasiva con suero de 30 días, fue ligeramente menor al de los experimentos con suero de 60 días e inmunización activa, las diferencias entre ellos no fueron estadísticamente significativas ( Fig. 15 ).

En la fig. 16, se muestra el estudio del aumento de volumen de los cojinetes plantares de los ratones inmunizados en forma activa. El Grupo Proteasa-AIF presentó una disminución en el tamaño del cojinete plantar desde los 30 días hasta los 150 días postinfección, con valores estadísticamente diferentes a los de los otros grupos de ratones (  $p < 0.02$  ). El Grupo Testigo resultó estadísticamente igual a los grupos inmunizados con Extracto Celular Crudo y con emulsión de solución salina-AIF.

El aumento de volumen del cojinete plantar en el experimento de inmunización pasiva con suero de 30 días, representado en la fig. 17, no mostró diferencias estadísticas entre los grupos de ratones; lo mismo ocurrió entre los resultados de la inmunización pasiva con suero de 60 días ( Fig. 18 ).

TABLA VI

**DESARROLLO DE MICETOMA EN LOS RATONES INMUNIZADOS ACTIVA  
Y PASIVAMENTE.**

Inmunización Activa o Pasiva de Ratones	Número de Micetomas Presentes Postinfección		
	30 días	60 días	90 días
<b>Inm. Activa</b>			
Proteasa	1 ( 14.2 )	3 ( 60.0 )+	1 ( 33.3 )++
Proteasa-AIF	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
Testigo	4 ( 57.1 )	6 ( 85.7 )	6 ( 85.7 )
Exto. Cel. Crudo	5 ( 71.4 )	5 ( 71.4 )	5 ( 71.4 )
AIF	5 ( 71.4 )	6 ( 85.7 )	5 ( 83.3 )#
<b>Inm. Pasiva 30 d.</b>			
Proteasa	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 14.2 )
Proteasa-AIF	0 ( 0.0 )	2 ( 28.5 )	3 ( 42.8 )
AIF	0 ( 0.0 )	2 ( 28.5 )	4 ( 57.1 )
Exto. Cel. Crudo	0 ( 0.0 )	1 ( 14.2 )	2 ( 28.5 )
<i>N. brasiliensis</i> *	1 ( 14.2 )	1 ( 14.2 )	1 ( 14.2 )
<b>Inm. Pasiva 60 d.</b>			
Proteasa	2 ( 28.5 )	4 ( 66.6 )&	4 ( 80.0 )&
Proteasa-AIF	7 ( 100.0 )	7 ( 100.0 )	7 ( 100.0 )
AIF	5 ( 71.4 )	5 ( 71.4 )	6 ( 85.7 )
Exto. Cel. Crudo	2 ( 28.5 )	3 ( 42.8 )	3 ( 42.8 )
<i>N. brasiliensis</i> *	2 ( 28.5 )	3 ( 42.8 )	4 ( 57.1 )

\* *N. brasiliensis* muerta por calor.

+ 2 Ratones muertos aparentemente sanos.

++ 2 Ratones muertos con micetoma.

# Ratón muerto con micetoma.

&amp; Ratones sacrificados con problemas neurológicos aparentes.

En parentesis se presenta el Porcentaje por Grupo.

n=7

De acuerdo a la inflamación del cojinete plantar de los ratones, el grupo inmunizado activamente con emulsión de Proteasa-AIF resultó ser igual a todos los grupos de la inmunización pasiva de 30 días; en cambio, resultó estadísticamente diferente a los grupos inmunizados con suero de 60 días ( $p < 0.01-0.05$ ) exceptuando al grupo inmunizado con Extracto Celular Crudo que solamente fue diferente a los 90 días.

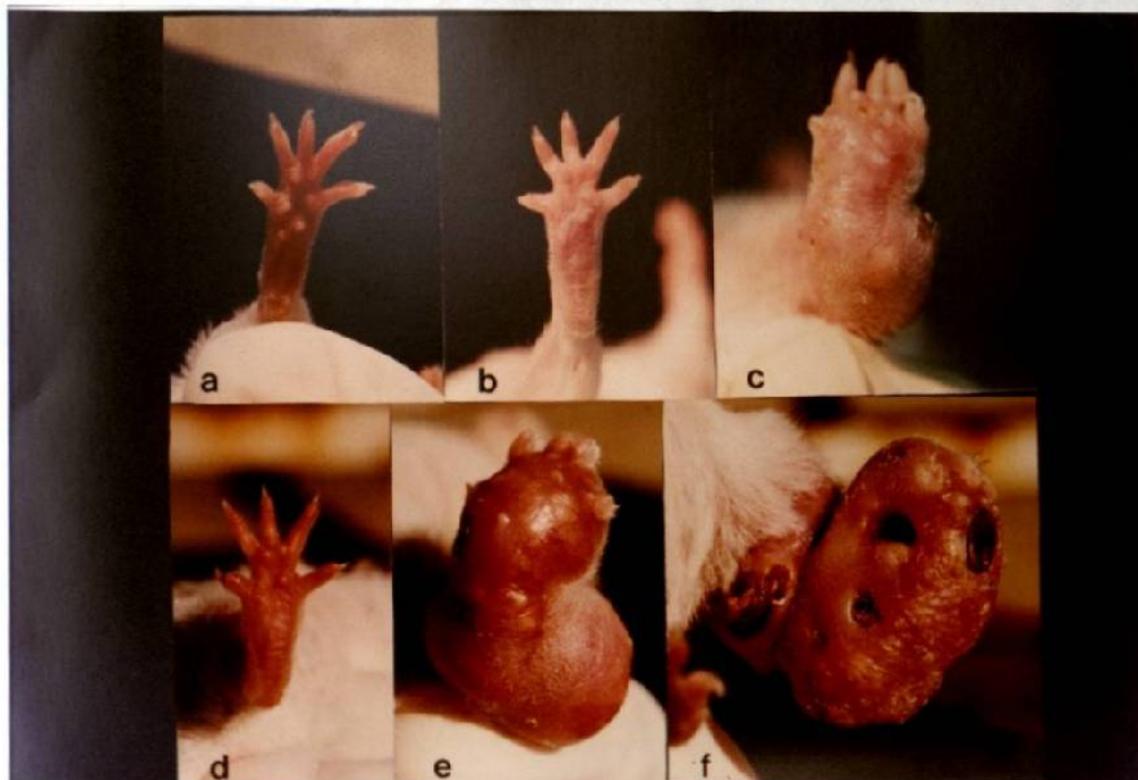


Figura No. 15 Desarrollo del Micetoma Experimental en los Ratones BALB/c. Los ratones se infectaron con  $5 \times 10^6$  UFC de *Nocardia brasiliensis* en el cojinete plantar izquierdo: **a**, Ratón sano; **b**, Grupo Pasivo AIF 30 de 49 días postinfección; **c**, Grupo Pasivo Proteasa-AIF 60 de 49 días; **d**, Grupo Pasivo Proteasa 30 de 97 días postinfección; **e**, Grupo Activo AIF de 97 días; y **f**, Grupo Pasivo *Nocardia brasiliensis* muerta por calor 60 de 97 días postinfección. 1.5X.

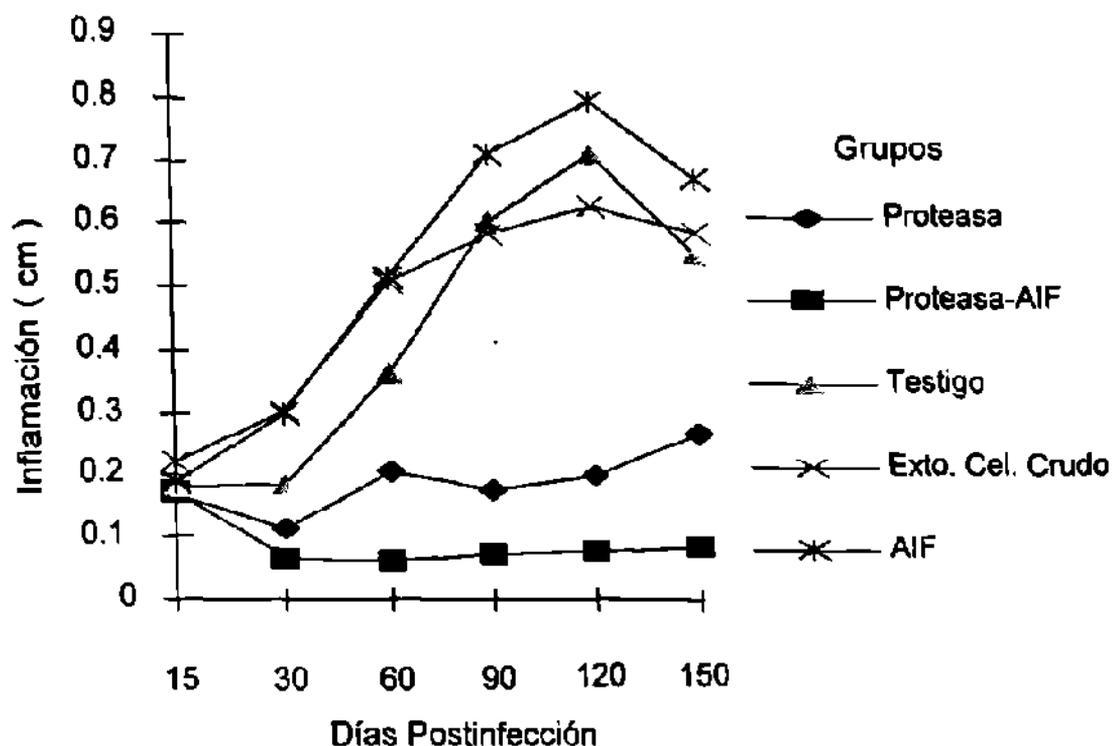


Figura No. 16 Medición de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Inmunizados Activamente entre 30 y 150 Días Postinfección. Cada punto representa el promedio de mediciones del cojinete plantar realizadas a 7 ratones por grupo.

Todos los grupos de la inmunización pasiva con suero de 30 días fueron diferentes al grupo Testigo de la inmunización activa ( $p < 0.01-0.05$ ), exceptuando al grupo inmunizado con suero de ratones tratados previamente con emulsión de solución salina-AIF a los 120 y 150 días, y al grupo de ratones inmunizados con suero de animales inoculados con *N. brasiliensis* muerta por calor a los 30 y 120 días. Por otro lado, no se encontró diferencia entre este grupo Testigo y los ratones inmunizados pasivamente con suero de 60 días.

El ensayo de los sueros de ratón por ELISA, para determinar el grado de respuesta de anticuerpos contra la proteasa de 38 kDa, reveló que en el experimento de inmunización activa no se encontró diferencia entre los grupos

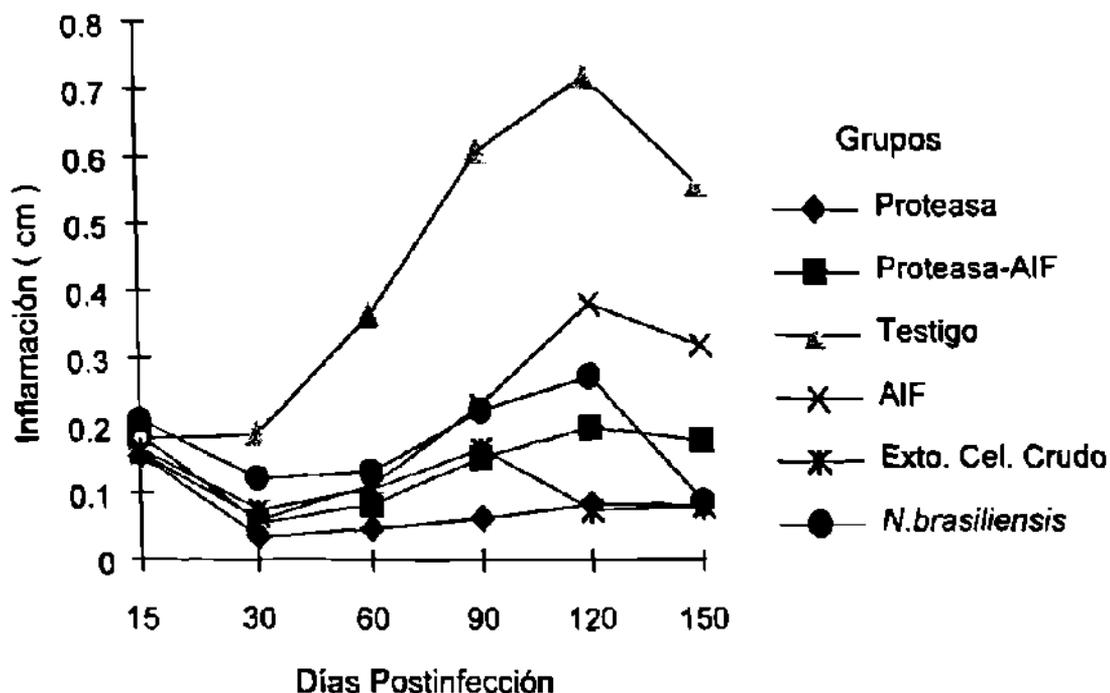


Figura No. 17 Medición de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Inmunizados Pasivamente con Suero de 30 Días Durante el Desarrollo del Micetoma. Cada punto representa el promedio de mediciones del cojinete plantar de 7 ratones por grupo.

experimentales de ratones, excepto entre los grupos Testigo y Extracto Celular Crudo a los 60 y 90 días ( $p < 0.05$ ) ( Fig. 19 ).

En el experimento de inmunización pasiva con suero de 30 días, los sueros de los ratones presentaron lecturas de Absorbancia ligeramente más bajas que las de los grupos inmunizados activamente ( Fig. 20 ), aunque éstas aparecieron sin diferencias estadísticas entre ellos.

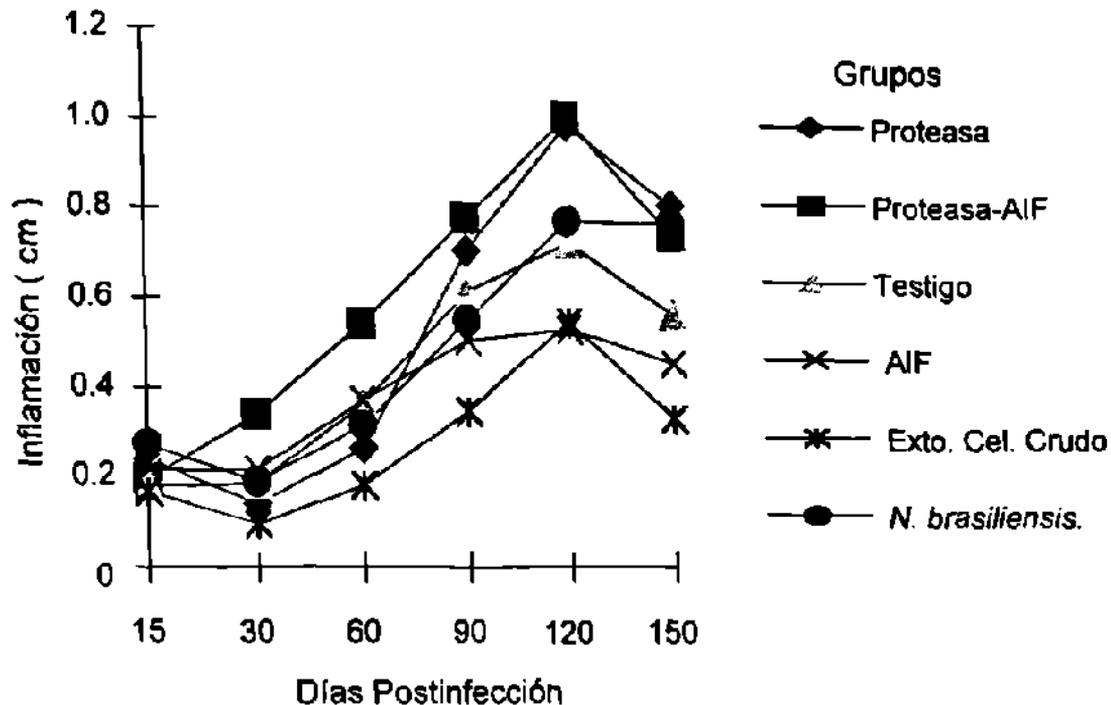


Figura No. 18 Medición de la Inflamación Macroscópica en el Cojinete Plantar de los Ratones Inmunizados Pasivamente con Suero de 60 Días Durante el Desarrollo del Micetoma. Cada punto representa el promedio de mediciones del cojinete plantar realizadas a 7 ratones por grupo.

En la inmunización pasiva con sueros de 60 días ( Fig. 21 ), no se encontró diferencia en los valores de absorbancia entre los grupos Proteasa, AIF, y el que recibió suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor, lo mismo que entre los grupos Proteasa-AIF y Extracto Celular Crudo. En cambio, si se presentaron diferencias entre el Grupo Proteasa-AIF y los grupos Proteasa, AIF y *N. brasiliensis* muerta por calor (  $p < 0.01$  ). Este mismo Grupo Proteasa-AIF resultó diferente al Grupo Testigo (  $p < 0.01$  ) excepto a los 120 días.

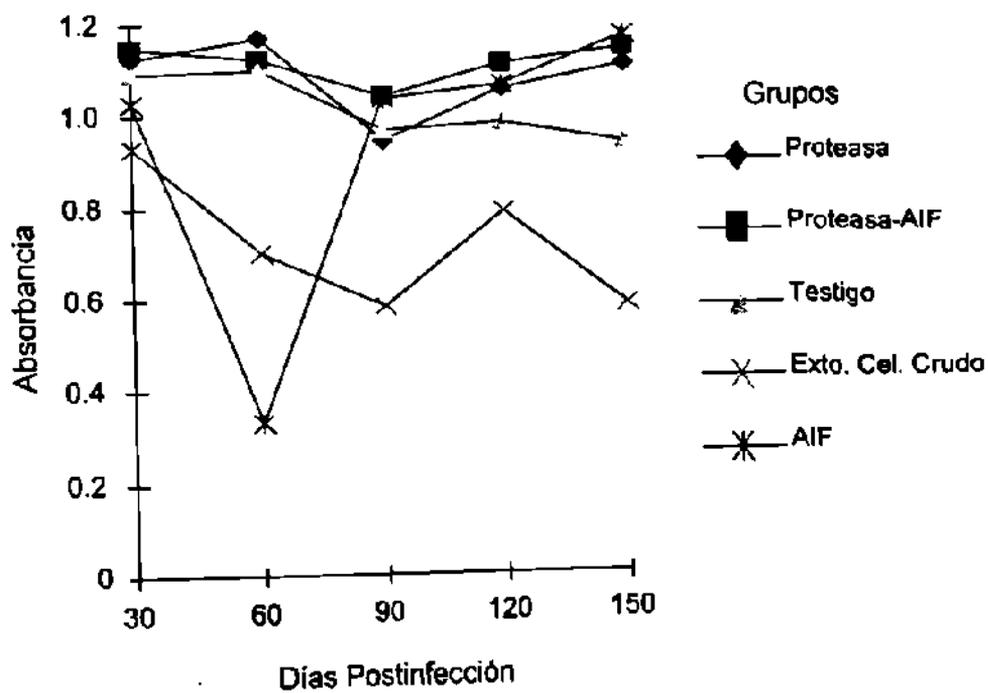


Figura No. 19 Determinación de Anticuerpos Anti-Proteasa Durante el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones Inmunizados Activamente. Cada punto representa la media de 3 determinaciones por ELISA.

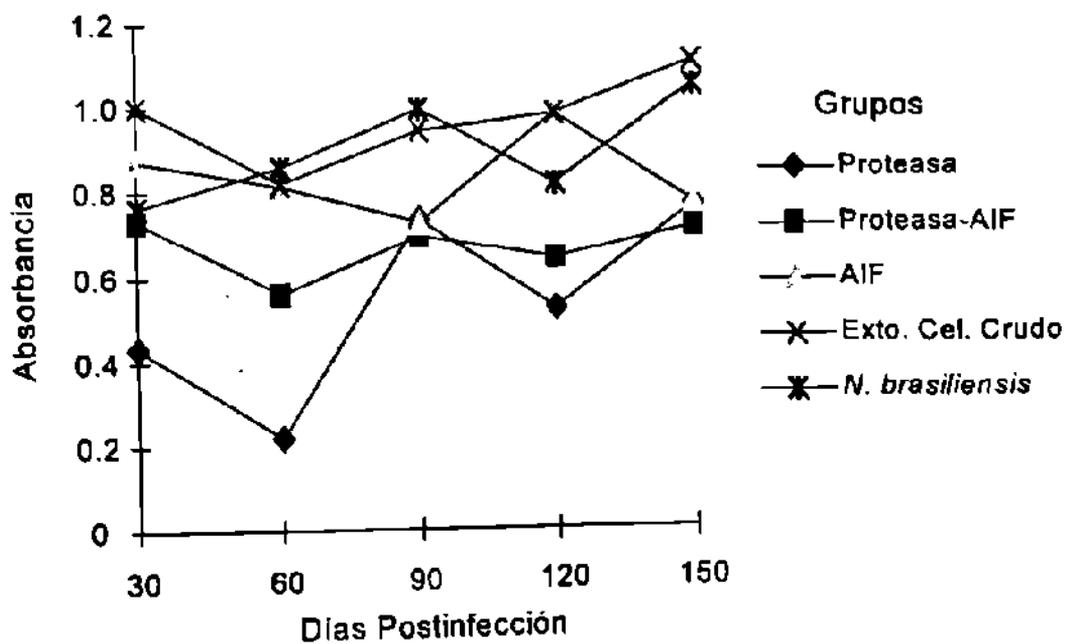


Figura No. 20 Determinación de Anticuerpos Anti-Proteasa Durante el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones Inmunizados Pasivamente con Suero de 30 Días. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones por ELISA.

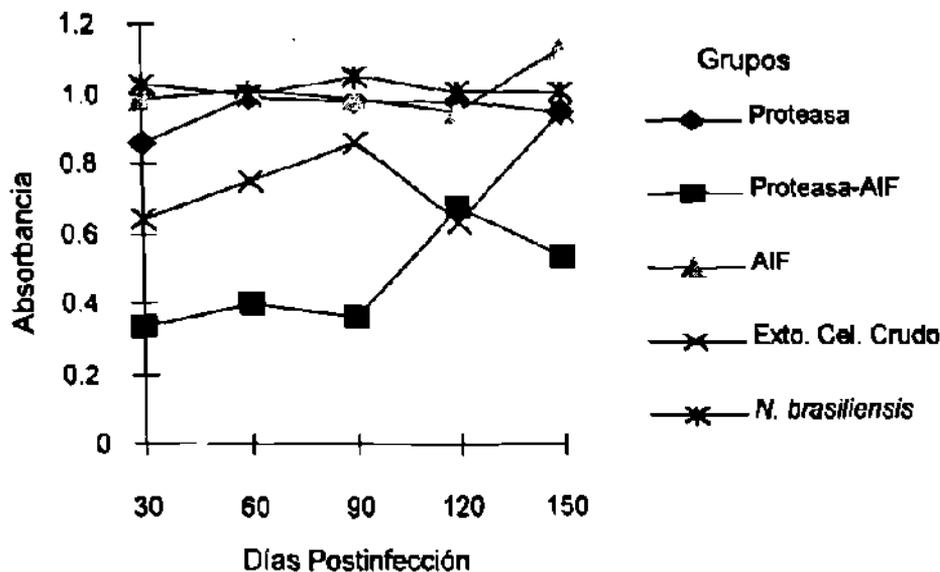


Figura No. 21 Determinación de Anticuerpos Anti-Proteasa Durante el Desarrollo del Micetoma Experimental en Ratones Inmunizados Pasivamente con Suero de 60 Días. Cada punto representa la media de 3 determinaciones por ELISA.

Al comparar los grupos de ratones Proteasa-AIF entre los 3 experimentos, los valores de absorbancia no presentaron diferencias entre los ratones inmunizados pasivamente con suero de 30 y 60 días; en cambio, ambos grupos resultaron estadísticamente diferentes al Grupo Proteasa-AIF activo ( $p < 0.01-0.05$ ).

### 5.3 Caracterización Parcial de los Sueros de Ratón Utilizados para la Inmunización Pasiva.

Los resultados de la determinación de anticuerpos dirigidos contra antígenos del extracto celular crudo, extracto semipurificado y proteasa de 38 kDa, mediante pruebas de ELISA, muestran que solamente los sueros de los ratones de los grupos Proteasa y Proteasa-AIF fueron los que mostraron

anticuerpos reactivos contra los 3 antígenos probados, ya que los demás sueros no presentaron respuesta contra ninguno de ellos ( Tabla VII ). Así mismo, los sueros de ratones inmunizados con Proteasa-AIF de 30 y 60 días fueron los únicos que reconocieron antígenos en el extracto celular crudo y en el extracto semipurificado; este mismo comportamiento se observó con los sueros de los ratones inmunizados con Proteasa-AIF del experimento de 0-30 días, pero con valores de absorbancia menores al observado cuando se hicieron reaccionar contra la proteasa aislada..

La determinación del isotipo de los anticuerpos en contra de los antígenos del extracto celular crudo, mostró un patrón de respuesta de IgG1, IgG2a e IgG2b en los sueros Proteasa del experimento 0-30 días, así como en los sueros Proteasa-AIF de 30 y 60 días del experimento de 30-150 días. El suero Proteasa-AIF de 30 días presentó también una ligera respuesta del tipo IgM ( Tabla VIII ).

Por otro lado, el isotipo de los anticuerpos anti-proteasa presentó también un patrón de respuesta muy similar al anterior pero con valores de absorbancia mayores ( Tabla IX ). El suero Proteasa-AIF de 30 días presentó respuesta contra todas las clases de inmunoglobulinas ensayadas, presentando una mayor absorbancia en la subclase IgG2b, seguida de IgG1 e IgG2a. Los sueros Proteasa y Proteasa-AIF de 30 días mostraron la presencia de anticuerpos IgM pero en menor cantidad.

TABLA VII

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-EXTRACTO CELULAR CRUDO,  
ANTI-EXTRACTO SEMIPURIFICADO Y ANTI-PROTEASA DE 38 kDa EN  
LOS SUEROS TRANSFERIDOS PASIVAMENTE A LOS RATONES BALB/c.  
VALORES DE ABSORBANCIA A 492nm.

Suero de Ratones Inmunizados con:	Extracto Celular Crudo	Extracto Semipuri- ficado	Proteasa 38 kDa
<b>Experimento 0-30 días</b>			
Proteasa	0.118	0.110	1.198
AIF	0.022	0.061	0.000
<b>Experimento 30-150 días</b>			
Proteasa 30	0.000	0.023	1.237
Proteasa 60	0.000	0.000	1.162
Proteasa-AIF 30	0.381	0.812	1.244
Proteasa-AIF 60	0.846	0.807	1.239
AIF 30	0.000	0.000	0.000
AIF 60	0.005	0.000	0.000
Exto. Cel. Crudo 30	0.082	0.000	0.000
Exto. Cel. Crudo 60	0.026	0.000	0.000
<i>N. brasiliensis</i> 30	0.044	0.000	0.000
<i>N. brasiliensis</i> 60	0.027	0.007	0.264
<b>Controles</b>			
Suero Normal	0.008	0.033	0.000
Micetoma 166 días*	1.139	0.040	1.100
Exto. Cel. Crudo**	1.018	1.233	1.053

\* Suero de ratón con micetoma de 166 días.

\*\* Suero de ratones hiperinmunizados, usado para estandarizar el ELISA contra la proteasa.

TABLA VIII

DETERMINACION POR ELISA DEL ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-EXTRACTO CELULAR CRUDO EN LOS SUEROS DE RATON USADOS EN LA INMUNIZACION PASIVA. VALORES DE ABSORBANCIA A 492nm.

Suero de Ratones Inmunizados con:	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
<b>Experimento 0-30 d.</b>						
Proteasa	0.000	0.093	0.160	0.101	0.224	0.066
<b>Experimento 30-150 d.</b>						
Proteasa 30	0.000	0.097	0.072	0.073	0.074	0.063
Proteasa 60	0.000	0.101	0.083	0.062	0.072	0.054
Proteasa-AIF 30	0.000	0.128	0.227	0.115	0.211	0.084
Proteasa-AIF 60	0.004	0.095	0.243	0.145	0.294	0.044
<b>Controles</b>						
Suero Normal	0.000	0.076	0.063	0.033	0.063	0.062
Micetoma 166 días*	0.077	0.162	0.963	1.060	0.797	0.077
Exto. Cel. Crudo**	0.045	0.207	1.237	0.83	1.101	0.155

\* Suero de ratón con micetoma de 166 días.

\*\* Suero de ratones hiperinmunizados con extracto celular crudo utilizado para estandarizar el ELISA contra la proteasa.

TABLA IX

DETERMINACION POR ELISA DEL ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEASA EN LOS SUEROS DE RATON USADOS EN LA INMUNIZACION PASIVA. VALORES DE ABSORBANCIA A 492nm.

Suero de Ratones Inmunizados con:	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
<b>Experimento 0-30 d.</b>						
<b>Proteasa</b>	<b>0.101</b>	<b>0.134</b>	<b>0.814</b>	<b>0.503</b>	<b>0.413</b>	<b>0.145</b>
<b>Experimento 30-150 d.</b>						
<b>Proteasa 30</b>	<b>0.099</b>	<b>0.193</b>	<b>0.495</b>	<b>0.617</b>	<b>0.483</b>	<b>0.175</b>
<b>Proteasa 60</b>	<b>0.099</b>	<b>0.180</b>	<b>0.282</b>	<b>0.551</b>	<b>0.256</b>	<b>0.166</b>
<b>Proteasa-AIF 30</b>	<b>0.121</b>	<b>0.214</b>	<b>0.764</b>	<b>0.559</b>	<b>0.857</b>	<b>0.229</b>
<b>Proteasa-AIF 60</b>	<b>0.110</b>	<b>0.188</b>	<b>0.748</b>	<b>0.607</b>	<b>0.614</b>	<b>0.193</b>
<b>Controles</b>						
<b>Suero Normal</b>	<b>0.107</b>	<b>0.188</b>	<b>0.187</b>	<b>0.146</b>	<b>0.182</b>	<b>0.177</b>
<b>Micetoma 166 días*</b>	<b>0.112</b>	<b>0.188</b>	<b>0.761</b>	<b>0.518</b>	<b>0.598</b>	<b>0.208</b>
<b>Exto. Cel. Crudo**</b>	<b>0.123</b>	<b>0.524</b>	<b>0.703</b>	<b>0.517</b>	<b>0.711</b>	<b>0.297</b>

\* Suero de ratón con micetoma de 166 días.

\*\* Suero de ratones hiperinmunizados con extracto celular crudo utilizado en la estandarización del ELISA contra la proteasa.

## DISCUSION.

La presente investigación confirmó la presencia de 3 actividades proteolíticas en extractos celulares crudos de *Nocardia brasiliensis* que pertenecen a la clase catalítica de las serina proteasas previamente reportadas ( 56 ), de las cuales se logró aislar una proteasa de 38 kDa. Esta proteasa resultó ser diferente a la enzima que aislaron Zlotnik y col. ( 74 ) a partir de sobrenadantes de medio de cultivo. La proteasa de 35 kDa aislada por Zlotnik y presente en el medio de cultivo, fue clasificada como una zinc-metaloproteasa. Cabe aclarar que los cultivos realizados por estos investigadores se hicieron en fermentadores de 20 L por lote y que mediante las condiciones de cultivo aplicadas pudieron haber favorecido la presencia importante de esta metaloproteasa en los sobrenadantes, ya que este tipo de enzimas son inducibles según la fuente de nitrógeno disponible en los cultivos ( 67,74 ).

Por otro lado, Tsuboi y col. ( 67 ) determinaron la presencia de serina proteasas en los sobrenadantes de cultivo de *N. brasiliensis* provenientes de pacientes. Estos investigadores estudiaron aislados de *N. asteroides* productores de proteasas, y debido a que la hidrólisis de caseína ha sido una prueba bioquímica para la diferenciación entre *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, debería investigarse si hubo una identificación correcta de los microorganismos utilizados por estos autores. La correlación entre la patogenicidad y la producción de proteasas por las bacterias estudiadas por estos autores no es concluyente ya que el grado de virulencia se debería estudiar en un micetoma experimental.

En el presente trabajo la susceptibilidad de las proteasas al calor fue estudiada a diferentes temperaturas, incluyendo a 4°C, donde los resultados parecen sugerir que las 3 actividades proteolíticas estudiadas se encuentran

localizadas en una sola cadena polipeptídica, es decir, que la proteasa de mayor masa molecular, por autohidrólisis está dando lugar a la proteasa intermedia, y que ésta a su vez da origen a la tercer banda que es menos activa, lo cual es apoyado por las siguientes observaciones: 1). las 3 actividades proteolíticas se comportaron de una manera semejante frente a los inhibidores de proteasas utilizados, y 2). la no-separación de las 3 bandas con las diferentes técnicas utilizadas durante el aislamiento, apoyan la hipótesis de que se trata de una sola cadena polipeptídica. Existen datos en la bibliografía que apoyan también esta sugerencia, como es el trabajo de Loomes y col. ( 40 ) quienes trabajaron sobre el aislamiento y caracterización de enzimas proteolíticas de *Proteus* spp. Estos autores observaron que dichas enzimas no pudieron ser purificadas individualmente y que al incubar muestras con actividad proteolítica a diferentes tiempos, registraron un aumento en el número de proteasas de masas moleculares menores a la proteína original, por lo cual propusieron la autohidrólisis como la probable explicación a la aparición de estas otras actividades.

La inmunogenicidad de la proteasa de 38 kDa en ratones BALB/c, hace plantear una pregunta: ¿ porqué no son inmunodominantes ? ( 55 ); caso contrario ocurre con p24 la cual resultó ser un pobre inmunógeno en ratones ( 10 ), pero es un antígeno inmunodominante como se demostró por inmunoelectrotransferencia tanto en sueros de pacientes como de ratones con infección experimental ( 55,66 ). Una probable explicación del fenómeno anterior podría deberse a la accesibilidad de estos antígenos al sistema inmune durante el desarrollo de la infección, y otra posibilidad es su presencia en cantidades suficientes para inducir una respuesta inmune adecuada. Es decir, que durante una infección por *N. brasiliensis*, la proteasa podría no estar accesible o en cantidad suficiente para inducir una buena respuesta de anticuerpos.

En los experimentos de inmunoprolifaxis, la inmunización activa y pasiva de los ratones aparentemente no los protegió en contra del establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* en los primeros 30 días postinfección. La respuesta de anticuerpos anti-proteasa en los ratones inmunizados con Proteasa-AIF se hizo aparente desde el tiempo cero, lo cual demuestra nuevamente su carácter inmunogénico, el cual no se vió reflejado en protección contra la infección. En este mismo grupo de ratones inmunizado con emulsión de Proteasa-AIF se presentó una disminución clara de la inflamación a los 21-30 días con respecto a los otros grupos de ratones, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa en este lapso de tiempo. Esta ligera disminución de la inflamación podría reflejar protección a tiempos mayores. Precisamente, en este tiempo mayor de 30 días fue donde se observó la protección de los ratones inmunizados. Los ratones inmunizados activamente con Proteasa-AIF fueron protegidos en un 100%, a los 90-150 días postinfección. En cambio, el Grupo Proteasa-AIF inmunizado pasivamente con suero de 30 días protegió solamente un 50% de los ratones, en contraste con el grupo inmunizado pasivamente con suero de 60 días que no fue protegido ( 0.0% ). La protección contra el desarrollo de micetoma se correlaciona con el tamaño de la inflamación de los cojinetes plantares, ya que el grupo inmunizado activamente presentó mínima inflamación, el grupo pasivo de 30 días en promedio mostró una inflamación intermedia, y la máxima inflamación de todos los grupos de ratones la presentó el grupo pasivo de 60 días; mientras que la cantidad de anticuerpos anti-proteasa ( ELISA ) presenta una relación inversa, es decir, el grupo activo protegido fue el que presentó la absorbancia mayor, el grupo pasivo de 30 días dió valores intermedios, y el grupo pasivo de 60 días mostró los valores más bajos. Esto significa una correlación entre protección contra el desarrollo de micetomas en los ratones y la respuesta de anticuerpos anti-proteasa, los cuales pudieran estar involucrados en los mecanismos de resistencia del hospedero en contra de la infección por *Nocardia brasiliensis*. Los datos anteriores, así como los reportados previamente por Salinas y col.

( 56 ), parecen sugerir nuevamente que los anticuerpos antiproteasa podrían formar parte de los mecanismos de defensa protectores en contra del desarrollo de actinomicetoma experimental por *N. brasiliensis*, así como durante el proceso de recuperación de los pacientes.

Es importante enfatizar que cuando se compararon los resultados entre los grupos de ratones inmunizados pasivamente con suero inmune de 30 y 60 días, observamos que los ratones tratados con suero de 30 días fueron protegidos parcialmente contra el desarrollo de micetomas. Cuando se determinaron por ELISA los anticuerpos anti-extracto celular crudo, anti-extracto semipurificado, y anti-proteasa en estos mismos sueros, no se detectó reactividad. Por lo tanto, si los sueros hiperinmunes de 30 días protegieron parcialmente a los ratones del desarrollo de micetomas, pero no presentaron anticuerpos anti-extracto celular crudo o semipurificado, lo mismo que anti-proteasa, entonces ¿ qué es lo que confirió dicha protección parcial ?. La protección observada anteriormente en nuestro laboratorio sobre ratones inmunizados pasivamente con suero de ratones hiperinmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor ( 66 ), probablemente también pudiera estar dada por el(los) mismo(s) mecanismo(s) efector(es) debido a que ese suero hiperinmune, se obtuvo a los 7 días posteriores a una reinmunización ( los sueros de 30 días postinmunización utilizados en la inmunización pasiva, fueron obtenidos 15 días posteriores a la reinmunización de los ratones, ver 11.2.1 )

En base a los resultados obtenidos, la hipótesis planteada en este trabajo no fue comprobada, ya que en la protección contra el desarrollo de micetoma experimental no se pudo demostrar que esto se debía a los anticuerpos anti-proteasa, ya que los sueros de 30 días, que aparentemente no tenían anticuerpos detectables por ELISA contra antígenos de *N. brasiliensis*, también confirieron protección, aunque de una manera parcial.

Los resultados anteriores son un reflejo de la complejidad de la respuesta inmune, cuyos mecanismos en la relación hospedero-parásito aún no han sido totalmente aclarados en infecciones por microorganismos intracelulares, y en particular, en el actinomicetoma por *N. brasiliensis*. Los datos del presente trabajo parecen apuntar también hacia otros componentes presentes en el suero de 30 días sin especificidad aparente contra antígenos de *N. brasiliensis*, como los elementos responsables de la protección parcial. Lo anterior podría indicarnos que la inmunidad innata u otros factores tendrían una implicación primordial en el efecto inductor de protección estudiado ( 16 ).

La isotipificación de los anticuerpos de los sueros usados en la inmunización pasiva, mostró que las inmunoglobulinas del isotipo IgM se incrementaron ligeramente en los sueros de 30 días respecto a los de 60 días, por lo que la protección parcial observada podría deberse a un evento inducido por IgM, la cual es producida principalmente en respuestas inmunes primarias o contra antígenos timo-independientes. La mayoría de los anticuerpos anti-proteasa presentaron principalmente los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b, los cuales son característicos de una respuesta inmune secundaria. El cambio de isotipo en las cadenas de estas inmunoglobulinas inducido por citocinas en el ratón, involucran a la IL-4, el IFN- $\gamma$  y el TGF- $\beta$  respectivamente. El fenotipo de las células T cooperadoras productoras de estas interleucinas correspondería a una mezcla de respuestas  $T_H1$  y  $T_H2$  ( 61 ).

Silva y Faccioli ( 62 ) estudiaron el efecto de TNF sobre ratones infectados con *N. brasiliensis* y observaron protecciones parciales al inocular esta citocina a los animales, lo cual fue inhibido por la inyección de anticuerpos anti-TNF. Lo anterior sugiere el papel de los macrófagos en los mecanismos de resistencia en contra de la infección, y dirige también la atención hacia los mecanismos innatos de defensa del hospedero contra los microorganismos.

Estudios adicionales en el desarrollo del micetoma experimental en ratones, permitirán determinar si el evento de protección observado en este trabajo es debido a citocinas u otros componentes de la inmunidad innata ( respuesta independiente de antígeno ), o si el papel de la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T y sus mecanismos efectores ( respuesta antígeno-específica ) en contra de *Nocardia brasiliensis* pudieran ser los responsables de la protección observada.

## CONCLUSIONES.

1. La proteasa aislada con un grado de purificación de 60.9 presentó una masa molecular de 42 kDa bajo condiciones nativas ( filtración en gel ) y de 38 kDa en condiciones desnaturalizantes ( SDS-PAGE ), un pI de 5.2 y pertenece a la clase catalítica de las serina proteasas.
2. La proteasa es inmunogénica en ratones BALB/c.
3. La inmunización de ratones con la proteasa, en forma activa o pasiva, no fue capaz de impedir el establecimiento de la infección ( 0 a 30 días postinfección ).
4. La inmunización activa de ratones con la proteasa y AIF confirió protección en contra del desarrollo del micetoma experimental ( 30 a 150 días postinfección ), en cambio los ratones que recibieron solución salina y AIF no fueron protegidos
5. Los sueros inmunes obtenidos a los 30 días postinmunización, protegieron pasivamente en forma parcial a los ratones del desarrollo de micetomas. En cambio los sueros inmunes obtenidos a los 60 días no confirieron protección.

**BIBLIOGRAFIA.**

1. Adair J. C., Beck A. C., Apfelbaum R. Y. and Baringer J. R. 1987. Nocardial cerebral abscess in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Neurol.* **44**: 548-550.
2. Aisu T. O. and Eriki P. P. 1991. Nocardiosis mimicking pulmonary tuberculosis in Ugandan AIDS patients. *CHEST.* **100** (3): 888.
3. An Der Lan B. and Chrambach A. 1987. Analytical and preparative gel electrofocusing. *In* Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. p 157-187. Edited by Hames B. D. and Rickwood D. IRL Press. Oxford, U. K.
4. Angeles A. M. and Sugar A. M. 1987. Rapid diagnosis of nocardiosis with an enzyme immunoassay. *The Journal of Infectious Diseases.* **155**(2):292-296.
5. Bailey W. R. and Scott E. G. 1970. Diagnostic Microbiology. 3<sup>d</sup> ed. p 259-264, 355-356. The C. V. Mosby Company. Saint Louis, MO. USA.
6. Bamicoat M. J., Wierzbicki A. S. and Norman P. M. 1989. Cerebral nocardiosis in immunosuppressed patients: five cases. *Quarterly Journal of Medicine.* **72**:689-698.
7. Beaman B. L. and Beaman L. 1994. *Nocardia* species: Host-parasite relationships. *Clinical microbiology Reviews.* **7**:213-264.
8. Beynon R. J. and Salvesen G. 1993. Commercially available protease inhibitors. Apendix III. *In* Proteolytic enzymes, a practical approach. p 241-249. Edited by Beynon R. J. and Bond J. S. IRL Press. Oxford, U. K.
9. 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.
10. Castro Corona M. A. 1995. Obtención de anticuerpos monoclonales para buscar a la proteína inmunodominante de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.

11. Conde C., Mancilla R., Fresan M. and Ortíz-Ortíz L. 1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infection and Immunity*. 40(3):1218-1222.
12. Chrumbach A. and Rodbard D. 1987. "Quantitative" and preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *In Gel electrophoresis of proteins, a practical approach*. p 93-143. Edited by Hames B. D. and Rickwood D. IRL Press. Oxford, U. K.
13. Darwich M. S., Wiegand L. y Reynolds H. Y. 1996. Nocardiosis humana: revisión clínica de dos casos. *Infectología*. 16:56-67.
14. Deem R. L., Beaman B. L. and Gershwin M. E. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infection and Immunity*. 38:914-920.
15. Dunn B. M. 1993. Determination of protease mechanism. *In Proteolytic enzymes, a practical approach*. p 57-81. Edited by Beynon R. J. and Bond J. S. IRL Press. Oxford, U. K.
16. Fearon D. T. and Locksley R. M. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 272:50-54.
17. Frobisher M. 1968. *Fundamentals of Microbiology*. 8<sup>m</sup> ed. p 480-484. W. B. Saunders Company. Philadelphia, PA. USA.
18. Gabriel O. and Gersten D. M. 1992. Detection of enzymatic activity after polyacrylamide electrophoresis and agarose gel isoelectric focusing. *In Enzyme assays, a practical approach*. p 217-253. Edited by Eisenthal R. and Danson M. J. Oxford University Press. New York, NY. USA.
19. Gamboa I. A. 1985. ABC de la Estadística Médica Aplicada en Investigación. Segunda edición. p 149-160. Impresiones "Año 2100". Puebla, Pue.
20. Garvey J. S., Cremer N. E. and Sussdorf D. H. 1977. *Methods in Immunology*. Third Edition. p 34-35. The Addison-Wesley Publishing Company. Reading, MA. USA.
21. González-Ochoa A., Shibayama H., Félix D. and Anaya M. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Excerpt. Med. Int. Congr. Series* 55: 542-551.

22. Goodfellow M. 1989. The actinomycetes I. Suprageneric classification of actinomycetes. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. p 2333-2339. Edited by Williams S. T., Sharpe M. E. and Holt J. G. Williams & Wilkins. Baltimore MD. USA.
23. Goodfellow M. and Minnikin D. E. 1977. Nocardioform bacteria. *Annual Rev. of Microbiology.* **31**:159-180.
24. Goodfellow M. and Schaal K. P. 1979. Identification Methods for *Nocardia*, *Actinomadura* and *Rhodococcus*. *In* Identification Methods for Microbiologists. 2<sup>o</sup> ed. p 261-276. Academic Press. Orlando, Florida. USA.
25. Gupta R., Pancholi 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.
26. Gupta R., Pancholi V., Vinayak V. K. and Khuller G. K. 1985. Protective immunity to systemic nocardiosis in mice immunized with cell extract antigens of *Nocardia asteroides*. *Medical Microbiology and Immunology.* **174**:157-166.
27. Hames B. D. 1987. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. *In* Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. p 1-91. Edited by Hames B. D. and Rickwood D. IRL Press. Oxford, U. K.
28. Harlow E. & Lane D. 1988. Immunizations. *In* Antibodies, a Laboratory Manual. p 53-138. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. USA.
29. Harrington M. G. 1990. Elution of protein from gels. *In* Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology. Volume 182. p 488-495. Edited by Deutscher M. P. Academic Press. San Diego, CA. USA.
30. Harris E. L. V. 1992. Initial Planning. *In* Protein Purification Methods. p 1-10. Edited by Harris E. L. V. and Angal S. IRL Press. Oxford, U. K.
31. Hironaga M., Mochizuki T. and Watanabe S. 1990. Acute primary cutaneous nocardiosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **23**:399-400.
32. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A., Brooks G. F., Butel J. S. and Ornston L. N. 1990. Microbiología Médica. 13a edición en español de la 18a edición en inglés. p 313-314. Editorial El Manual Moderno. México, DF.

33. Koll B. S., Brown A. E., Kiehn T. E. and Armstrong D. 1992 Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection with septic arthritis. *Clinical Infectious Diseases*. **15**:469-472.
34. Krech T. and Hollis D. G. 1991. *Corynebacterium* and Related Organisms. *In* Manual of Clinical Microbiology. p 277-286. Edited by Ballows A., Hauser W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. and Shadomy H. J. Fifth edition. American Society for Microbiology. Washington DC. USA.
35. Krick J. A. and Remington J. S. 1975. Resistance to infection with *Nocardia asteroides*. *The Journal of Infectious Diseases*. **131**(6): 665-672.
36. Laemmli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
37. Land G., Mc Ginnis M. R., Staneck J. and Gatson A. 1991. Aerobic Pathogenic Actinomycetales. *In* Manual of Clinical Microbiology. Fifth edition. p 340-359. Edited by Ballows A., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. and Shadomy H. J.. American Society for Microbiology. Washington, DC. USA.
38. Lechevalier H. A. 1989. Nocardioform Actinomycetes. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. p 2348-2361. Edited by Williams S. T., Sharpe M. E. and Holt J. G. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. USA.
39. Lechevalier M. P., Horan A. C. and Lechevalier H. 1971. Lipid composition in the classification of Nocardiae and Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **105**:313-318.
40. Loomes L. M., Senior B. W. and Kerr M. A. 1992. Proteinases of *Proteus* spp.: purification, properties, and detection in urine of infected patients. *Infection and Immunity*. **60**(6):2267-2273.
41. Mc Laughlin J. and Faubert G. 1977. Partial purification and some properties of a neutral sulphhydryl and an acid proteinase from *E. histolytica*. *Can. J. Microbiology*. **23**:420-425.
42. McManus J. F. A. and Mowry R. W. 1965. Staining Methods, Histological and Histochemical. p: 3-46. Hoeber Medical Division. Harper & Row, New York. NY. USA.
43. McNeil M. M. and Brown J. M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. **7**:357-417.

44. Merrill C. R., Dunau M. L. and Goldman D. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **110**:201-207.
45. Müller K. M., Jaunin F., Masouyé Y., Saurat J-H., and Hauser C. 1993. Th2 cells mediate IL-4-Dependent Local Tissue Inflammation. *J. Immunol.* **150**:5576-5584.
46. Ortiz-Ortiz L., Parks D. E., Lopez J. S. and Weigle W. O. 1979. B-Lymphocyte activation with an extract of *Nocardia brasiliensis*. *Infection and Immunity.* **25**(2):627-634.
47. Owen R. J. and Hill L. R. 1979. The Estimation of Base Compositions, Base Pairing and Genoma Sizes of Bacterial Deoxyribonucleic Acids. *In Identification Methods for Microbiologists.* Second edition. p 277-296. Edited by Skinner F. A. and Lovelock D. W.. Academic Press. Orlando, Florida. USA.
48. Pérez-Rivera L. I. 1992. Identificación de Proteínas con Actividad Caseinolítica en un Extracto Celular de *Nocardia brasiliensis*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
49. Pérez Montfort R., Ostos Saloma P., Velázquez Medina L., Montfort I. and Becker I. 1987. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**:87-98.
50. Preneta A. Z. 1992. Separation on the basis of size: gel permeation chromatography. *In Protein Purification Methods, a practical approach.* p 293-306. Edited by Harris E. L. V. and Angal S. IRL Press. Oxford, U. K.
51. Rico G., Ochoa R., Oliva A., González-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**(4):1688-1693.
52. Rippon J. W. 1974. Micología Médica: Hongos y Actinomicetos Patógenos. Tomado de : Tratado de Microbiología de William Burrows. Tercera edición traducida de la 20a edición en inglés. p 597-653. Editorial Interamericana. México,DF.
53. Roe S. 1992. Separation based on structure. *In Protein Purification Methods.* p 175-244. Edited by Harris E. L. V. and Angal S. IRL Press. Oxford, U. K.

54. Sachs M. K. 1992. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection acquired from a cat scratch: case report and review. *Clinical Infectious Diseases*. 15:710-711.
55. Salinas M. C., Vera L., Welsh O. and Rodriguez M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* 276:390-397.
56. Salinas-Carmona M. C., Pérez L. I., Welsh O., Rodríguez M. and Rinaldi M. G. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Méd.* 2:1-6.
57. Salinas-Carmona M. C., 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.
58. Sasser M. and Wichman M. D. 1991. Identification of Microorganisms through Use of Gas Chromatography and High- Performance Liquid Chromatography. *In* Manual of Clinical Microbiology. 5<sup>th</sup> ed. p 111-118. Edited by: Ballows A., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. and Shadomy H. J.. American Society for Microbiology. Washington, DC. USA.
59. Scopes R. K. 1988. Protein Purification. Principles and Practice. 2<sup>d</sup> ed. Springer-Verlag. New York, NY. USA.
60. Serrano J. A. y Sandoval A. H. 1992. Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos. p 141-154. Talleres Gráficos Universitarios. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
61. Siebenkotten G. and Radbruch A. 1995. Towards a molecular understanding of immunoglobulin class switching. *The Immunologist*. 3:141-145.
62. Silva C. L. and Faccioli L. H. 1992. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from the livers and spleens of mice. *Infection and Immunity*. 60(9):3566-3570.
63. Sonnenwirth A. C. 1980. Bacteriologic Methods. *In* Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Vol II. Chapter 70. p 1347. Edited by Sonnenwirth A. C. and Jarret L. The Mosby Company. St. Louis, MO. USA.

64. Sugar A. M., Schoolnik G. K. and 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**(5):895-901.
65. Telzak E., Hii J., Polsky B., Kiehn T. E. y Armstrong D. 1990. Infección por nocardia en Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. *Infectología*. **10**(8):483-485.
66. Torres López E. 1995. Estudio de la Respuesta Inmune Humoral en el Establecimiento y Resolución de la Infección Experimental por *Nocardia brasiliensis* en Ratonés. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
67. Tsuboi R., Yamaguchi T., Matsuda K. and Ogawa H. 1989. Extracellular proteinase production and the pathogenicity of *Nocardiae*. *Arch. Dermatol. Res.* **281**:78-80.
68. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M. C., Welsh O. and Rodríguez M. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**(5):1183-1188.
69. Vizcaya L. E. 1982. Caracterización morfológica, fisiológica e inmunológica de cepas de nocardia. Trabajo presentado ante el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes, como credencial para ascender a la categoría de Profesor Agregado. Departamento de Microbiología. Mérida, Venezuela.
70. Weber K. and Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412.
71. Welsh O. 1991. Mycetoma. Current concepts in treatment. *International Journal of Dermatology*. **30**(6):387-398.
72. Welsh O., Salinas M. C. and Rodríguez M. A. 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma. *In Current Topics in Medical Mycology*. Volume 6. p 47-71. Edited by Borgers M., Hay R. and Rinaldi M. G. J. R. Prous Science Publishers. Barcelona, España.
73. Zlotnik H. and Buckley H. R. 1980. Experimental Production of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*. **29**:1141-1145.

74. Zlotnik H., Schramm V. L. and Buckley H. R. 1984. Purification and partial characterization of a *Nocardia brasiliensis* extracellular protease. *J. Bacteriol.* **157**:627-631.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BHI	Medio de infusión cerebro-corazón
Cel	Celular
C3	Componente 3 del sistema del complemento
cm	Centímetros
col	Colaboradores
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
Exto	Extracto
Fig	Figura
°C	Grados centígrados
°S	Grados de latitud sur
°N	Grados de latitud norte
g	Gravedades
g	Gramos
H y E	Hematoxilina y eosina
HCl	Acido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico
IFN-γ	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltones
L	Litros
2-ME	2- mercaptoetanol
μg	Microgramos
μl	Microlitros

$\mu\text{m}$	<b>Micrometros</b>
mg	<b>Miligramos</b>
ml	<b>Mililitros</b>
M	<b>Molar</b>
mM	<b>Milimolar</b>
mA	<b>Miliamperios</b>
nm	<b>Nanometros</b>
$\text{NH}_4\text{OH}$	<b>Hidroxido de amonio</b>
p	<b>Página</b>
PBS	<b>Amortiguador de fosfatos-salina</b>
pH	<b>Potencial de hidrogeniones</b>
pI	<b>Punto isoeléctrico</b>
PM	<b>Peso molecular</b>
PMSF	<b>Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo</b>
% p/v	<b>Porcentaje peso/volumen</b>
% v/v	<b>Porcentaje volumen/volumen</b>
%T	<b>Porcentaje total de acrilamida-bisacrilamida en el gel</b>
%C	<b>Porcentaje de bisacrilamida en el total de acrilamida</b>
r	<b>Coefficiente de correlación</b>
SDS-PAGE	<b>Electroforesis en gel de poli-acrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil-sulfato de sodio</b>
TEMED	<b>N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina</b>
TGF- $\beta$	<b>Factor de Crecimiento Tumoral beta</b>
$T_H1$	<b>Célula T Cooperadora 1</b>
$T_H2$	<b>Célula T Cooperadora 2</b>
TNF- $\alpha$	<b>Factor de Necrosis Tumoral alfa</b>
U	<b>Unidades de actividad enzimática</b>

<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias</b>
<b>V</b>	<b>Voltios</b>
<b>Ve</b>	<b>Volumen de elución</b>
<b>Vo</b>	<b>Volumen vacío</b>
<b>W</b>	<b>Watts</b>

**APENDICES**

## APENDICE A

### PREPARACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.

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

##### 1.1 Gel de Corrimiento en Gradiente 10-18%T, 2.7%C.

	10%T	18%T
Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	0.720ml	1.259ml
Amortiguador Tris-HCl 3.02M, pH 8.8	0.396ml	0.396ml
Glicerol 50% ( v/v )	0.144ml	0.222ml
Agua Destilada	0.874ml	0.193ml
SDS 10% ( p/v )	0.020ml	0.020ml
Persulfato de Amonio 10% ( p/v )	0.007ml	0.007ml
TEMED	0.001ml	0.001ml

Se utilizó un formador de gradiente ( BIO-RAD ) y una bomba peristáltica Microperpex 2132 ( LKB ) para preparar el gel, el cual se dejó polimerizar durante 1 hora colocando agua destilada sobre la superficie del gel formando una interfase.

##### 1.2 Gel de Empaquetamiento 5%T, 2.7%C.

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

### Preparación del gel de empaquetamiento 5%T, 2.7%C:

Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	0.499ml
Amortiguador Tris-HCl 1M, pH 6.8	0.375ml
Agua Destilada	1.980ml
SDS 10% ( p/v )	0.030ml
Persulfato de Amonio 10% ( p/v )	0.105ml
TEMED	0.003ml

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

## 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no-desnaturalizantes.

### 2.1 Geles de Corrimiento al 8, y 12%T ( 2.7%C ).

	8%T	12%T
Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	1.330ml	2.000ml
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	0.625ml	0.625ml
Agua Destilada	3.000ml	2.350ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.025ml	0.025ml
TEMED	0.002ml	0.002ml

### 2.2 Gel de Empaquetamiento 4%T, 2.7%C.

Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	0.325ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.312ml
Agua Destilada	1.850ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.012ml

TEMED	0.002ml
-------	---------

### 3. Gel-Sustrato 7.5%T, 2.7%C, Caseína 1.14mg/ml.

Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	1.500ml
Amortiguador Tris-HCl 0.075 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4	1.500ml
Agua Destilada	2.910ml
Caseína	6.840mg
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.030ml
TEMED	0.003ml

### 4. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida en condiciones no-desnaturalizantes.

#### 4.1 Gel de Corrimiento 8%T, 2.7%C.

Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	14.390ml
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	6.740ml
Agua Destilada	32.540ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.270ml
TEMED	0.027ml

#### 4.2 Gel de Empaquetamiento 4%T, 2.7%C.

Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 30%T, 2.7%C )	0.975ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.937ml
Agua Destilada	5.589ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.037ml
TEMED	0.007ml

**5. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida 5%T, 2.9%C.**

<b>Acrilamida-Bis-Acrilamida ( 10.3%T, 2.9%C )</b>	<b>12.03ml</b>
<b>Glicerol</b>	<b>2.4ml</b>
<b>Anfolinas pH 3-10 ( Sigma )</b>	<b>1.4ml</b>
<b>Agua Destilada</b>	<b>8.17ml</b>

La mezcla anterior se desgasificó por 10 minutos con ayuda de una bomba de vacío y se le adicionaron 60 ml de solución de persulfato de amonio al 10% p/v antes de aplicar al molde de polimerización.

## APENDICE B

### TECNICAS DE INCLUSION Y TINCION DE LOS CORTES HISTOLOGICOS.

1. Deshidratación e inclusión en parafina de las muestras de cojinete plantar de ratón.

- Etanol 80% v/v, 1 hora ( 2 veces )
- Etanol 95% v/v, 1. 5 horas ( 3 veces )
- Etanol Absoluto, 12 horas
- Alcohol Isopropílico, 1 hora ( 2 veces )
- Xilol, 1 hora ( 2 veces )
- Parafina ( 54 - 56° C de fusión ), 3 horas ( 2 veces )

Finalmente las piezas orientadas con el cojinete plantar hacia el fondo de los moldes, fueron cubiertas con parafina y dejadas solidificar en bloques en un equipo Tissue-Tek II ( Miles Laboratories Inc. ).

2. Tinción de hematoxilina-eosina ( H y E ).

- Xilol, 5 minutos ( 2 veces)
- Acetona, 3 minutos
- Etanol 96°, 3 minutos ( 2 veces )
- Agua destilada, lavar
- Hematoxilina, 4 minutos
- Agua destilada, lavar
- Alcohol - acido ( 5 ml HCl conc. en 350 ml de etanol ), 1 segundo
- Agua destilada, lavar
- Solución alcalina ( 5 ml NH<sub>4</sub>OH en 500 ml agua ), 1 segundo
- Agua destilada, lavar

**Etanol 96°, 3 minutos**

**Eosina, 10 segundos**

**Etanol 96°, 3 minutos ( 2 veces )**

**Acetona, 3 minutos**

**Xilol, 5 minutos ( 2 veces )**

**Montaje.**

## APENDICE C

### PREPARACION DE SOLUCIONES DE LOS COLORANTES.

#### 1. Técnica de hematoxilina y eosina.

##### 1.1 Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina .....	15 g.
Sulfato de Aluminio y Potasio.....	300 g.
Etanol absoluto .....	150 ml.
Agua destilada.....	3000 ml.
Oxido rojo de Mercurio.....	7.5 g.
Acido acetico: 20 ml por cada 500 ml de colorante	

##### 1.2 Eosina ( Orange G ).

Eosina Y ( hidrosoluble ).....	1 g.
Orange G .....	1 g.
Agua destilada .....	1000 ml.

#### 2. Técnica de Kinyoun.

##### Solución de Carbofucsina de Kinyoun:

Fucsina básica.....	4 g
Fenol.....	8 ml
Etanol 95° .....	20 ml
Agua destilada.....	100 ml

