

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA RESPUESTA DE
ANTICUERPOS CONTRA FRACCIONES LIPIDICA,
PROTEICA Y POLISACARIDA DE
Nocardia brasiliensis EN RATONES BALB/c

POR

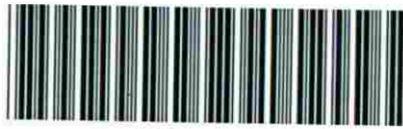
IRMA ALICIA MARTINEZ DAVILA

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

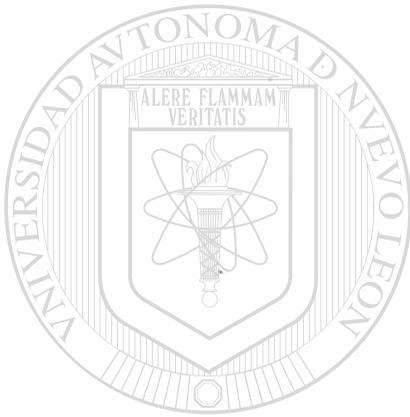
Monterrey, N. L.

Julio de 1996

TM
OR82
.N6
M3
c.1



1080071648



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACION DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS
CONTRA FRACCIONES LIPIDICA, PROTEICA Y POLISACARIDA
DE *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c**

Por

IRMA ALICIA MARTINEZ DAVILA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

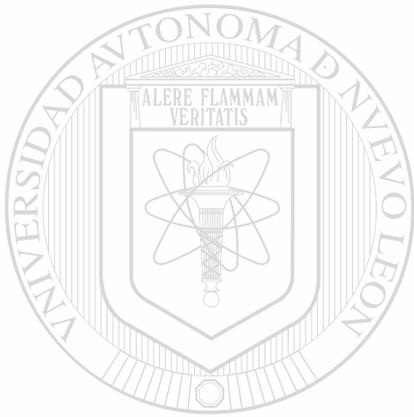
Como requisito parcial para obtener el Grado de

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

Monterrey, N.L.

Julio de 1996

TM
QR82
• N6
M3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**DETERMINACION DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS CONTRA
FRACCIONES LIPIDICA, PROTEICA Y POLISACARIDA DE
Nocardia brasiliensis EN RATONES BALB/c**

Aprobación de la Tesis:



Dr. Mario César Salinas Carmona

Asesor de la Tesis



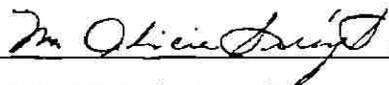
Dra. Noemí Waksman de Torres



Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez



M.C. Alicia Suárez Semour



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Secretaria Académica del Area Básica

Subdirección de Estudios de Postgrado

**DETERMINACION DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS CONTRA
FRACCIONES LIPIDICA, PROTEICA Y POLISACARIDA DE
Nocardia brasiliensis EN RATONES BALB/c**

Presentado por: Q. F.B. Irma Alicia Martínez Dávila

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología 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. Noemí Waksman de Torres. Apoyado por CONACYT, proyecto F226-S9207.



UANL

Asesor.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Salinas', is written over a horizontal line.

Dr. Mario César Salinas Carmona

Coasesor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Noemí Waksman de Torres', is written over a horizontal line.

Dra. Noemí Waksman de Torres

DEDICATORIA

A Dios, por regalarme tanto: la oportunidad de vivir, amar, contar con una familia, tener libertad y soñar, y ver algunos de esos sueños convertidos en realidad.

A mis padres Sr. Salomón Martínez Constante y Sra. Rosa Elia Dávila Contreras a quienes amo y admiro profundamente y de quienes he recibido todo sin límite: amor, cariño, comprensión y apoyo. Gracias por sus sacrificios y desvelos; por buscar siempre mi bienestar y el de mis hermanos; por compartir conmigo la alegría de algún logro; alentarme y ayudarme con paciencia y mucho amor en los momentos difíciles.....los amo.

A mis hermanos: Jorge Alberto, Sergio Ariel, Salomón Eduardo y Samuel Gerardo, por ser verdaderamente especiales; por el cariño que siempre nos ha mantenido unidos, gracias por preocuparse por mí y demostrármelo con "pequeños" detalles, realmente doy gracias a Dios por tener la dicha de compartir con ustedes etapas maravillosas.....los quiero mucho.

A mis abuelitos:

Samuel y Alicia

Apolonio y Dominga

con mucho amor, gracias por brindarme su amor y ternura y sobre todo gracias por que con su cariño hicieron posible la existencia de nuestra familia.....están siempre en mi corazón.

A Mayra Hortensia Sarmiento Cruz, quien ha dado una nueva faceta a nuestra vida familiar.....gracias por transmitirnos tu alegría.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por su acertada asesoría y sus valiosas enseñanzas y consejos; por transmitirnos su optimismo en momentos difíciles, y sobre todo por enseñarnos que a base de paciencia, dedicación y perseverancia se pueden lograr las cosas, gracias.

A la Dra. Noemí Waksman, por su asesoría, por estar dispuesta en todo momento a colaborar y por el trato siempre amable que recibí de usted, gracias.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, gracias por sus consejos y sugerencias y por el apoyo brindado durante estos años.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez por sus sugerencias, por la disponibilidad para ayudar y su honestidad.

A la M.C. Alicia Suárez Semour, por su serenidad, por sus sugerencias y por darme siempre ánimo.

A la Dra. María del Socorro Flores, nunca olvidaré, que aún sin conocerme, me dió una oportunidad, confió en mí y me tendió su mano amiga, gracias.

Al Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza, por ayudar siempre de forma desinteresada.

Gracias a:

Ana María Sifuentes Rincón, con mucho cariño, por todo lo que hemos compartido juntas.....porque contigo he comprendido el real significado de la amistad.

La Familia Sarmiento Cruz, por todas las atenciones que tanto mi familia como yo, hemos recibido de ustedes.

Angeles Castro Corona y Silvia Magdalena Casillas Quintana, quienes guiaron mis primeros pasos en el laboratorio, gracias por compartir conmigo, trabajos, desvelos, preocupaciones y también diversiones; es una fortuna encontrar personas como ustedes, siempre dispuestas a ayudar, pero sobre todo gracias por su amistad.

Angel Licón Trillo, por tu amistad, por estar siempre dispuesto a escuchar y ayudar, gracias por tus sugerencias y consejos, y por compartir tu experiencia y conocimientos con nosotros.

M.C. Alma Isabel Ramos, por ser un ejemplo de dedicación al trabajo, por tratar siempre de ayudar y por su calidad como ser humano.

Isabel, Anna Velia y Rosario, por sus enseñanzas, su carácter alegre y su cariño.

A las personas con las que compartí, durante estos años, en el Laboratorio de Inmunología Celular, momentos de alegrías, de reflexión, de diversión y de preocupación: Silvia, Angeles, Angel, Luis Edgar, Vero, Isabel y Alma Isabel , gracias, nunca los olvidaré.

Ramiro y Julio , por su peculiar forma de ser.

A Sergio y Marisol por su alegría que contagia, gracias por su disponibilidad para ayudar y por regalarme algo muy valioso: su amistad y cariño.

A Sonia, Juan Carlos, Abdías, Blanca Estela, Marisol y Sergio, por su espontaneidad y sinceridad, realmente nunca olvidaré los momentos tan divertidos que compartimos.

A Angel Gerardo Espinoza Castro, por tu apoyo y nuestra amistad, que a pesar de la distancia ha permanecido inquebrantable.

Con afecto y cariño a Marina Treviño, Laura Villafaña, Claudia Isabel Salas, que compartieron conmigo el inicio de una etapa.

Con cariño a Fely, Ana Laura, Marissa, Ana María, Marina, Elisa, Blanca, Angeles, Karen, Sefene y Mary, por todo lo que compartimos juntas y porque llegamos a formar una "pequeña" familia.

A Lizzy, Bety, Marthita y Aracely por su cariño y ayuda.

A el personal del Departamento de Inmunología: Isabel, Velia, Lucy, Silvia Noemí, Verónica, Aracely, Lizzy, Mónica, Marthita, Bety, Paty, Marilú, Luis Armando, Sergio, Ernesto, Paco, Héctor, Vicente, y Carlitos.

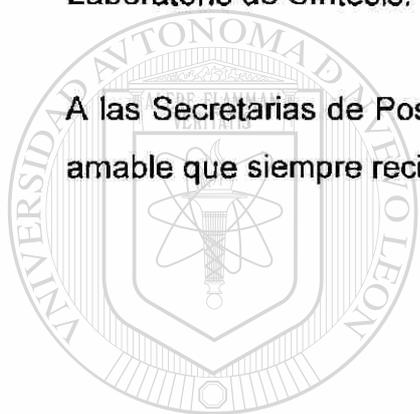
A todos mis compañeros, a quienes siempre recordaré con cariño: Eva, Roberto, Silvia Magdalena, Angel, Angeles, Luis Edgar, Vero, Isabel, Alma Isabel, Ramiro, Julio, Velia, Ana Catalina (Caty), Ana Laura, Marthita Contreras, Lupita de la Cruz, Catalina Rivas, Lucio, Sonia, Juan Carlos, Abdías, Marisol, Sergio, Blanca Estela, Alejandra, Blanca Ruth, Raúl, Rosario y Leslie.

A mis compañeros de la ULIEG por el apoyo y ayuda que me brindaron.

Al personal y a mis compañeros del Departamento de Microbiología, en especial a Wendy, Conchis, Adriana y Agustina

Al personal del Departamento de Farmacología y Toxicología, en especial a la Q.C.B. Magdalena Gómez y al Q.C.B. Rigoberto Vargas, por su ayuda en el análisis por cromatografía de gases; a Rosalba, Adolfo, Ivonne y Gloria Alejandra, gracias, por prestarme su ayuda durante mi estancia en el Laboratorio de Síntesis.

A las Secretarías de Postgrado, Normita, Sonia y Socorrito, gracias por el trato amable que siempre recibí de ustedes.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIDES

No te resignes antes de perder definitiva, irrevocablemente, la batalla que libras. Lucha erguido y sin contar las enemigas huestes. ¡Mientras veas resquicios de esperanza, no te rindas!

La suerte gusta de acumular los imposibles para vencerlos en conjunto, siempre con el fatal y misterioso golpe de su maza de Hércules. Sabes tú si el instante en que ya fatigado desesperes, es justo aquel que a la definitiva realización de tu ideal precede? Quien alienta una fe tenaz al hado más torvo compromete en su favor. La fe otorga el divino privilegio de la casualidad a quien la tiene en grado heroico.

Cuando las tinieblas y los espectos y los trasgos lleguen a inspirarte pavor, ¡cierra los ojos, abraza tu fe toda, y arremete! ¡verás como los monstruos más horribles, al embestirlos tu, se desvanecen!. Cuanto se opone a los designios puros del hombre, es irreal; tan sólo tiene la imaginaria vida que le dan nuestro miedo y nuestra fiebre. Dios quiso en su bondad que los obstáculos para aguzar las armas nos sirviesen; quiso que el imposible estuviera no más para vencerle, como está la barrera en los hipódromos, a fin de que la salten los corceles. Búrlate, pues, de cuanto en el camino tu alivio impulso detener pretenda. ¡No cedas ni a los hombres ni a los ángeles! (con un ángel lucho Jacobo, inerte por el espacio entero de una noche, y el ángel le bendijo, complaciéndose en la suprema audacia del mancebo).

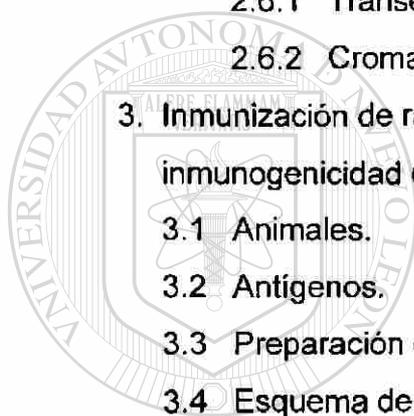
¡Ama mucho: el que ama embota hasta los agujones de la muerte! ¡Que tu fe trace un círculo de fuego entre tu alma y los monstruos que la cerquen, y si es mucho el horror de los fantasmas que ves, cierra los ojos, y arremete.

Amado Nervo

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	3
III. OBJETIVOS.	10
1. Objetivo general.	10
2. Objetivos específicos.	10
IV. MATERIAL Y METODOS.	11
1. Obtención de las fracciones proteica, lipídica y polisacárida de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	11
1.1 Cepa bacteriana de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	11
1.2 Preparación del inóculo de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	11
1.3 Obtención de la fracción proteica (extracto celular deslipidizado) de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	12
1.4 Obtención de la fracción lipídica de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	12
1.5 Aislamiento de la fracción polisacárida de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	12
1.5.1 Obtención de la fracción polisacárida I	13
1.5.2 Obtención de la fracción polisacárida II.	13
2. Caracterización parcial de las fracciones proteica, lipídica y polisacárida de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	13
2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en gradiente 10-18% con SDS.	
2.1.1 Preparación de geles.	14
2.1.2 Corrimiento electroforético de las fracciones.	15
2.1.3 Tinción con Nitrato de plata.	15
2.1.4 Tinción con azul de Coomassie.	16
2.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.	16

2.3	Determinación de la concentración de carbohidratos por el método de Dubois	16
2.4	Determinación de la presencia de ácidos nucleicos.	17
2.5	Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	17
2.6	Cromatografía gas-líquido de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	18
2.6.1	Transesterificación.	18
2.6.2	Cromatografía gas-líquido.	19
3.	Inmunización de ratones BALB/c para determinar la inmunogenicidad de las fracciones obtenidas.	20
3.1	Animales.	20
3.2	Antígenos.	20
3.3	Preparación de antígenos para inmunizar.	20
3.4	Esquema de inmunización.	20
4.	Determinación de la respuesta de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con las fracciones proteica, lipídica polisacárida I y polisacárida II de <i>N. brasiliensis</i> (dosis máximas y mínimas)	21
4.1	Determinación de anticuerpos contra la fracción proteica de <i>N. brasiliensis</i>	21
4.2	Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	23
4.2.1	Estandarización de una técnica de aglutinación para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	23
4.2.1.1	Preparación de la suspensión estándar de kaolín.	23



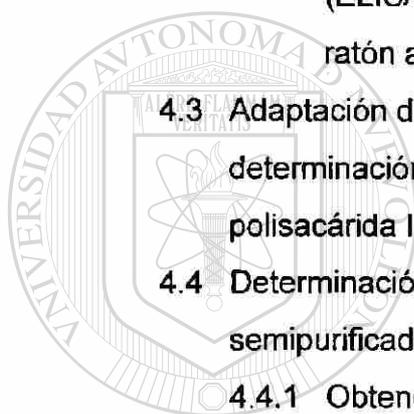
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



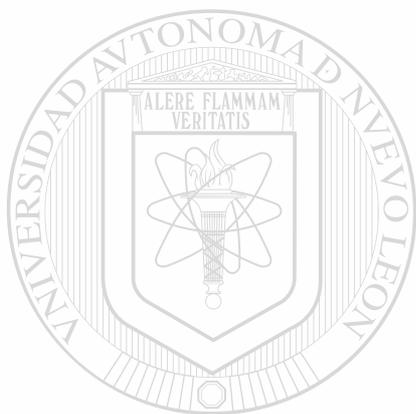
4.2.1.2	Preparación de la suspensión de kaolín sensibilizada con antígeno.	23
4.2.1.3	Ensayo de aglutinación del kaolín .	23
4.2.1.4	Condiciones ensayadas en la estandarización de la técnica de aglutinación del kaolín.	24
4.2.2	Estandarización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	24
4.3	Adaptación de un ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos contra la fracción polisacárida II de <i>N. brasiliensis</i> .	27
4.4	Determinación de anticuerpos contra extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .	28
4.4.1	Obtención del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .	28
4.4.1.1	Precipitación del extracto celular deslipidizado de <i>N. brasiliensis</i> .	28
4.4.1.2	Tratamiento del sobrenadante obtenido al precipitar el extracto celular deslipidizado de <i>N. brasiliensis</i> con solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	29
4.4.1.3	Preparación y calibración de una columna de Sephadex G-100 para cromatografía de filtración en gel.	29
4.4.1.4	Cromatografía de filtración en gel.	30
4.4.2	Técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos anti- extracto semipurificado de	



	Página
<i>N. brasiliensis.</i>	30
V. RESULTADOS.	32
1. Obtención de las fracciones de <i>N. brasiliensis.</i>	32
1.1 Obtención de la fracción proteica.	32
1.2 Obtención de la fracción lipídica.	32
1.3 Obtención de la fracción polisacárida I.	32
1.4 Obtención de la fracción polisacárida II.	32
2. Caracterización parcial de las fracciones de <i>N. brasiliensis.</i>	33
2.1 Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones de <i>N. brasiliensis.</i>	33
2.1.1 Análisis en SDS-PAGE de la fracción proteica de <i>N. brasiliensis.</i>	33
2.1.2 Análisis de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> mediante SDS-PAGE.	33
2.1.3 Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción polisacárida I de <i>N. brasiliensis.</i>	33
2.1.4 Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción polisacárida II de <i>N. brasiliensis.</i>	34
2.2 Determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos en las fracciones de <i>N. brasiliensis.</i>	37
2.3 Determinación de la presencia de ácidos nucleicos.	38
2.4 Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis.</i>	40
2.5 Cromatografía gas-líquido de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis.</i>	41
3. Condiciones de las técnicas de aglutinación e inmunoenzimática para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de <i>N. brasiliensis.</i>	43

3.1	Condiciones óptimas de la técnica de aglutinación del kaolín para la determinación de anticuerpos contra la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	43
3.2	Condiciones de la técnica inmunoenzimática en fase sólida (ELISA), para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	43
4.	Adaptación de un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos anti-fracción polisacárida II de <i>N. brasiliensis</i> .	44
5.	Obtención del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .	44
5.1	Cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante obtenido al precipitar la fracción proteica de <i>N. brasiliensis</i> con sulfato de amonio.	44
5.2	Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Sephadex G-100.	45
6.	Determinación de la respuesta de anticuerpos mediante la técnica de ELISA en sueros de ratones inmunizados con las fracciones de <i>N. brasiliensis</i> (dosis máximas y mínimas).	47
6.1	Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica de <i>N. brasiliensis</i> .	47
6.2	Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	47
6.3	Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción polisacárida II de <i>N. brasiliensis</i> .	47
6.4	Determinación de la respuesta de anticuerpos contra el extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .	48
7.	Efecto de la dosis máxima y mínima de antígeno.	48

	Página
VI. DISCUSION.	57
VII. CONCLUSIONES.	62
VIII. LITERATURA CITADA.	63
IX. APENDICES.	68
APENDICE A. EQUIPO.	68
APENDICE B. REACTIVOS QUIMICOS.	70
APENDICE C. ABREVIATURAS.	73



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos en las fracciones de <i>N. brasiliensis</i> .	37
II. Volúmen de elución de diferentes marcadores en una columna empaquetada con Sephadex G-100.	45



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Análisis de la fracción proteica de <i>N. brasiliensis</i> mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en gradiente de 10-18% T, 2.7% C.	35
2. Análisis de las fracciones de <i>N. brasiliensis</i> en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en gradiente de 10-18% T, 2.7% C.	36
3. Determinación de ácidos nucleicos en las fracciones de <i>N. brasiliensis</i> mediante análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.	39
4. Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	40
5. Análisis por cromatografía gas-líquido de la fracción lipídica de <i>N. brasiliensis</i> .	42
6. Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente 10-18% de las fracciones obtenidas al filtrar por Sephadex G-100.	46
7. Respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 µg/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos.	49
8. Respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 µg/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 µg/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos emulsificados con AIF.	50

9. Respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 μ g/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos. 51
10. Respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 μ g/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 μ g/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos emulsificados con AIF. 52
11. Respuesta de anticuerpos contra la fracción polisacárida II en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 μ g/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos. 53
12. Respuesta de anticuerpos contra la fracción polisacárida II en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 μ g/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 μ g/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos. 54
-
13. Respuesta de anticuerpos contra el extracto semipurificado en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 μ g), de los antígenos heterólogos. 55
14. Respuesta de anticuerpos contra el extracto semipurificado en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 μ g/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 μ g/ratón) de los antígenos homólogo y heterólogos emulsificados con AIF. 56

I. RESUMEN

A partir de cultivos de *Nocardia brasiliensis* en medio infusión cerebro-corazón (BHI), se obtuvieron 4 fracciones antigénicas de la masa bacteriana, las cuales denominamos: fracción proteica, fracción lipídica, fracción polisacárida I y fracción polisacárida II.

Estas fracciones se caracterizaron parcialmente mediante las técnicas de Bradford, Dubois, y análisis por electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida, excepto la fracción lipídica la cual se caracterizó mediante cromatografía gas-líquido y cromatografía en capa fina. La caracterización mostró que la llamada fracción "proteica" está compuesta por una mayor cantidad de carbohidratos que de proteínas, en una proporción proteína-carbohidrato de 1:2, la fracción polisacárida I posee una relación proteína - carbohidrato aproximada de 1:8, mientras que la fracción polisacárida II está casi exenta de proteínas y su componente principal son los carbohidratos en una proporción 1:262. La fracción lipídica está compuesta por lípidos de diferentes polaridades y ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono.

Una vez caracterizadas las fracciones, se utilizaron como antígenos para inmunizar ratones hembra de la cepa BALB/c. La determinación de la respuesta de anticuerpos (en los sueros de los ratones inmunizados) hacia esos antígenos se hizo mediante la técnica de ELISA, utilizando en cada caso el antígeno homólogo adherido a la placa; además, estos sueros se probaron también por ELISA contra las otras fracciones (antígenos heterólogos) y contra un extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis* que contiene los antígenos inmunodominantes que han sido identificados tanto en humanos como en ratones.

II. INTRODUCCION

Nocardia brasiliensis es una bacteria perteneciente al género *Nocardia* el cual está relacionado filogenéticamente a microorganismos de los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordona* y *Tsukamurella*, que al igual que *Nocardia* contienen abundantes ácidos micólicos en su pared celular (37, 44, 48).

Nocardia brasiliensis es un microorganismo gram positivo, parcialmente ácido resistente, intracelular facultativo, aerobio, no móvil, que presenta extensa ramificación celular, cuyos filamentos fragmentan en formas cocoides o bacilares. La pared celular de *Nocardia* se compone principalmente como la de las micobacterias de tres elementos: peptidoglicano, arabinogalactana y ácidos micólicos (40) .

Las *Nocardias* son quimiorganótrofos catalasa-positivos con un metabolismo tipo oxidativo. La pared celular es quimiotipo IV ya que contiene ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), arabinosa, galactosa, y ácido N-glicolil murámico. Estos microorganismos se caracterizan por la presencia de dos grupos fundamentales de ácidos grasos: los ácidos no hidroxilados y los ácidos micólicos. Algunos de los ácidos no hidroxilados más comunmente encontrados son el palmítico C16:0 (ácido hexadecanoico), palmitoleico C16:1 (ácido 9-hexadecenoico), esteárico C18:0 (ácido octadecanoico) y oleico C18:1 (ácido 9-octadecenoico). Por lo que se refiere a los ácidos micólicos (los cuales están enlazados al peptidoglicano por medio de un polímero de arabinogalactano), el género *Nocardia* se caracteriza por poseer ácidos nocardiomicólicos que tienen una cadena de carbonos que varía en longitud de 44 a 64 átomos con cero a cuatro dobles enlaces. Los ácidos grasos característicos liberados de los ácidos micólicos por pirólisis-cromatografía de gas varían en tamaño de 12 a 18 átomos de carbono. Esos ácidos grasos pueden estar saturados o contener dobles

Detectamos respuesta de anticuerpos contra las fracciones "proteica" y polisacárida I y II, mientras que no se detectaron anticuerpos contra la fracción lipídica. Además se observó que los sueros de los ratones inmunizados con la fracción polisacárida I presentaron la mayor concentración de anticuerpos contra las fracciones "proteica", polisacárida II y contra el extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

enlaces. Otro de los ácidos grasos característicos que se encuentra en la envoltura celular de *Nocardia* es el ácido 10-metilesteárico (ácido tuberculoesteárico). La principal menaquinona en *Nocardia* está tetrahidrogenada con 8 unidades isopreno. La composición guanina más citosina del DNA varía de 64 a 72 mol % (5).

El peptidoglicano de la pared celular de *Nocardia* es estructuralmente similar al encontrado en *Mycobacterium* y *Rhodococcus*. El glicano basal consiste de ácido beta-N-acetil glucosaminil-1,4-N-glicolil murámico con L-alanina enlazada al grupo carboxilo del ácido N-glicolil murámico. Las cadenas laterales de aminoácidos consisten de tripéptidos diamidados L-alanina-D-alfa glutamina-meso DAP y tetrapéptidos L-alanina-D-alfa - 1glutamina- meso- DAP- D- alanina. Esos tetrapéptidos están entrecruzados por enlace directo entre la D-alanina de un polímero al meso-DAP del polímero adyacente o por enlaces entre residuos adyacentes meso-DAP. Como en las paredes celulares Micobacterianas, el peptidoglicano está unido por medio de un enlace fosfodiéster a la porción arabinosa de un polímero de arabinogalactano. Algunos de los residuos de arabinosa de esta arabinogalactana se encuentran esterificados a una molécula de ácidos micólicos, formando así un gran complejo peptidoglicano-arabinogalactano-micolato. Las paredes celulares de la mayoría de las *Nocardias* contienen no solo arabinosa y galactosa (que son los azúcares que se encuentran en mayor proporción) , sino también glucosa, manosa e inositol. La mayoría de las cepas de *Nocardia* contienen trealosa, la cual está unida a dos moléculas de ácidos micólicos en las posiciones 6,6'. Este 6,6'-dimicolato de trealosa (conocido como factor cuerda) tiene actividad biológica específica; es tóxico, inhibe la función fagolisosoma en los macrófagos y parece estar asociado con la virulencia de *Nocardia* (5).

Hay un gran número de especies saprofiticas de *Nocardia* encontradas comunmente en el suelo. Tres especies causan infecciones en el hombre,

Nocardia asteroides, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia otitidis caviarum*. *Nocardia brasiliensis* provoca generalmente abscesos subcutáneos crónicos destructivos llamados micetomas, mientras que *Nocardia asteroides*, provoca principalmente una infección sistémica denominada Nocardiosis (16).

El Micetoma es una infección crónica que afecta la piel, tejido subcutáneo, fascia, y ocasionalmente músculo y huesos. La infección resulta de la implantación traumática del microorganismo causal en la dermis o tejido subcutáneo, es decir, la enfermedad inicia en el sitio de una lesión localizada, tal como una herida causada por una espina o una astilla. Por consiguiente, los micetomas son observados con mayor frecuencia en pies, piernas, brazos o manos, pero se pueden desarrollar en cualquier parte del cuerpo tal como la espalda, hombros y cabeza.

El micetoma inicia más frecuentemente como un nódulo indoloro que se desarrolla en el sitio de la lesión días a meses después del daño. Este nódulo incrementa en tamaño y puede eventualmente llegar a ser purulento y necrótico.

Se desarrollan tractos sinuosos a través de los cuales se puede descargar pus. Durante el desarrollo progresivo de las lesiones, puede ocurrir inflamación granulomatosa crónica con hinchamiento concomitante y crecimiento de las áreas vecinas con la formación de múltiples nódulos secundarios adicionales y tractos sinuosos que exudan fluido seroso a veces de aspecto purulento. El exudado de esos tractos sinuosos generalmente contiene gránulos que tienen un tamaño, forma y color característicos. Los gránulos representan pequeñas colonias del agente infeccioso rodeadas por masas de células inflamatorias. Generalmente el micetoma permanece localizado, desarrollándose por extensión de los organismos a través de los tejidos, raramente puede extenderse a órganos por diseminación hematogena (5, 47). Con el tiempo la infección puede involucrar el músculo y el hueso, provocando una osteomielitis destructiva. Una vez establecida, las lesiones se agravan progresivamente en un período de

de varios años y frecuentemente no responde a la quimioterapia (5).

El micetoma puede ser producido por bacterias aerobias en cuyo caso se le da el nombre de micetoma actinomicótico o actinomicetoma, o por hongos denominándosele micetoma eumicótico o eumicetoma. En el humano se presenta en ambos sexos, pero es más común en hombres que en mujeres en una proporción 4:1; se han reportado micetomas en niños y en adultos de 80 años de edad, aunque es más frecuente en individuos entre la segunda y cuarta década de la vida (47).

El estado nutricional, susceptibilidad a la infección, respuesta inmune y tratamiento inicial, determinan que se resuelva la infección o que se instale la entidad con el cuadro clínico característico (37).

La prevalencia de los agentes causales de esta entidad varía de país a país. La infección ya sea actinomicótica o eumicótica es más frecuente en países con climas templados, se ha reportado en América, Europa, África y Asia; los países más afectados son India, Sudán, Senegal, Somalia, Venezuela y México (17, 47).

En México el 98% de los micetomas son causados por actinomicetos de los cuales 86% son producidos por *Nocardia brasiliensis* (34, 47) seguido por *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia asteroides*, *Actinomadura pelletieri* y *Nocardia otitidiscaviarum* (*Nocardia caviae*). El 2% restante es causado por eumicetos tales como *Madurella micetomatis* y *Madurella grisae*; otras especies tales como *Acremonium sp*, *Pseudoallescheria boydii* y *Fusarium sp* son agentes causales raros (38, 47).

En México se han descrito casos prácticamente en toda la República, predominando en los Estados de: Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca,

Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León.

En la infección por *Nocardia* se induce inmunidad mediada por células, así como la producción de anticuerpos circulantes del tipo IgG durante las diferentes etapas del micetoma (37).

Los mecanismos de patogenicidad de los actinomicetos, así como los mecanismos de resistencia del huésped aún no están bien claros.

Los estudios realizados con *Nocardia* están encaminados principalmente a tratar de explicar los mecanismos de resistencia del huésped contra esta bacteria.

Existen algunos estudios que sugieren que la inmunidad mediada por células desempeña un papel preponderante en la respuesta del huésped a infecciones por *Nocardia*. En 1977 Folb y colaboradores (15) efectuaron estudios en los que infectaron ratones atímicos (cepas ICR nu/nu y C3H/eB nu/nu) con *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis* y observaron que morían con mayor rapidez que los ratones con timo, lo que sugiere la posibilidad de que los linfocitos que maduran en timo desempeñen un papel fundamental en la resistencia a infecciones por *Nocardia*. En 1980 Ximénez y cols. (49) realizaron estudios en los que inmunizaron ratones con *Nocardia brasiliensis* muerta o con BCG y posteriormente los retaron con *Nocardia brasiliensis* viva y demostraron que la inmunización con organismos homólogos proporciona protección al disminuir las lesiones causadas por *N. brasiliensis* en la infección en ratón, en comparación con microorganismos heterólogos como BCG. La cantidad de anticuerpos en ambos grupos fue muy similar.

En 1982, Beaman (4) estudió la respuesta inmune humoral en ratones CBA/N x DBA2/F1 infectados con *N. asteroides*, estos se caracterizan por tener

disfunción de linfocitos B ligada al cromosoma X, por lo tanto los ratones macho son deficientes en la producción de anticuerpos, mientras que los ratones hembra sí presentan esa capacidad. Al determinar en los animales la LD₅₀ del microorganismo, se encontró que los ratones macho no eran más susceptibles que los ratones hembra, a pesar de que estas producían anticuerpos.

En 1982 Rico y cols (33) analizaron el efecto de la transferencia de suero inmune anti- *N. brasiliensis* a dos grupos de ratones infectados con *N. brasiliensis*, uno de ellos era inmunológicamente normal, mientras que el otro era deficiente en células T, no encontrando función protectora en ninguno de los dos grupos, sino que por el contrario, los anticuerpos favorecían la infección.

En base a los antecedentes mencionados aparentemente la respuesta inmune humoral no parece tener un papel relevante en la resistencia a la infección.

Gupta y cols. en 1985 (18) realizaron estudios en los cuales se analizó la respuesta inmune de ratones albinos hacia proteínas, polisacáridos y fosfolípidos extraídos y parcialmente purificados de *Nocardia asteroides*, encontrando respuesta inmune humoral y celular contra la fracción proteica, respuesta inmune humoral contra fosfátidos mientras que los polisacáridos no fueron inmunogénicos. Posteriormente inmunizaron dos grupos de ratones, uno de ellos fue inmunizado con un extracto celular de *N. asteroides*, mientras que el otro grupo se inmunizó con una fracción purificada de dicho extracto observando que ambos antígenos inducían respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular significativa. Cuando los animales se retaron con dosis letales de *N. asteroides*, después de inmunizarlos, vieron que éstos exhibían protección, lo que se demostró por una disminución en la mortalidad comparada con los animales no inmunizados. Los animales inmunizados con estos extractos celulares, compuestos principalmente por proteínas, fueron capaces de eliminar la infección

mucho más rápido que los ratones control, lo que sugiere que los extractos tienen un papel importante en la prevención y restricción de la infección por *Nocardia* (19).

En 1992 Salinas y cols. (35) identificaron mediante Western blot tres antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis*, que fueron reconocidos por sueros de pacientes con micetoma, pero no por pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae*. Con éstos antígenos estandarizaron una técnica de ELISA (36), con la cual se puede diferenciar entre pacientes con tuberculosis y lepra, de pacientes infectados con *Nocardia*. Más tarde comprobaron que los antígenos de *Nocardia brasiliensis* identificados como inmunodominantes en humanos, lo eran también para ratón (25).

La importancia de la inmunidad celular y humoral en las infecciones por *Nocardia*, no está claramente definida, aunque se ha sugerido que la inmunidad mediada por células es más importante en la resistencia a la infección que la humoral (4, 10, 12, 22, 27, 49).

Sin embargo en el Departamento de Inmunología de esta Facultad, se tienen resultados no publicados, donde el suero obtenido de ratones hiperinmunizados con *Nocardia brasiliensis* muerta por calor, es capaz de prevenir el establecimiento del micetoma experimental en ratón (25).

En el presente trabajo nos propusimos investigar la respuesta de anticuerpos séricos en ratones BALB/c hacia fracciones de *Nocardia brasiliensis*, para en estudios posteriores, determinar si alguna de estas fracciones está involucrada en la inducción de inmunidad protectora en ratones.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Conocer la respuesta de anticuerpos de ratones BALB/c contra diferentes componentes de *Nocardia brasiliensis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Aislar y caracterizar parcialmente tres fracciones de *Nocardia brasiliensis* compuestas por lípidos, proteínas y polisacáridos.
2. Estandarizar una técnica para determinar anticuerpos contra la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.
3. Estandarizar una técnica para determinar anticuerpos contra la fracción polisacárida de *Nocardia brasiliensis*.
4. Determinar la respuesta de anticuerpos contra las fracciones lipídica, proteica y polisacárida de *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.

IV. MATERIAL Y METODOS

1. Obtención de las fracciones proteica, lipídica y polisacárida de *Nocardia brasiliensis*.

1.1 Cepa bacteriana de *Nocardia brasiliensis*.

La cepa de *Nocardia brasiliensis* empleada en este trabajo fue obtenida de un paciente con micetoma que acudió al Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" (cepa HUJEG-1), su identificación fue realizada en el Departamento de Microbiología de esta Facultad por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y su identidad fue confirmada por el Dr. Libero Ajello, del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta Georgia.

La cepa es mantenida en medio Sabouraud a temperatura ambiente, resemebrándola cada 2 a 3 semanas.

1.2 Preparación del inóculo de *Nocardia brasiliensis*.

Se tomaron colonias crecidas en el agar Sabouraud y se inocularon en cuatro matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml de infusión cerebro corazón (BHI) cada uno, se dejaron incubar en baño de agua 48 horas a 37°C con agitación constante; El cultivo se recolectó en tubos cónicos y se centrifugó a 1500 x g por 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y la masa celular se lavó 2 veces con solución salina estéril al 0.85%. La masa bacteriana se trituró con un agitador de vidrio estéril, las colonias no fragmentadas se dejaron sedimentar. Con el sobrenadante obtenido se inocularon ocho matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml del medio BHI, se incubaron con agitación constante a 37°C por 48h; las células bacterianas posteriormente se lavaron tres veces con solución salina al 0.85% y se centrifugaron a 1500 x g por 7 minutos. La masa bacteriana se trituró con un homogenizador Eberbach por un tiempo de 1.5 min. con descansos de 30 segundos, el homogenizado se centrifugó a 100 x g por 5 min.. La suspensión se almacenó en un frasco de vidrio estéril (45).

1.3 Obtención de la fracción proteica (extracto celular deslipidizado) de *Nocardia brasiliensis* (7, 9, 45).

Con la suspensión bacteriana obtenida previamente se inocularon 40 matraces Erlenmeyer de 1 y 2 litros conteniendo 160 y 170 ml respectivamente, de medio de cultivo BHI. Estos cultivos se incubaron por una semana a 37°C sin agitación. Las bacterias se recolectaron y se lavaron con agua destilada estéril tibia. La masa bacteriana se centrifugó durante 7 min. a 1250 x g, repitiendo el proceso 4 veces. Las células se desengrasaron con una mezcla etanol - éter en diferentes proporciones (1:1, 1:2 y 1:3), esto se hizo varias veces, posteriormente las bacterias se secaron a temperatura ambiente.

Las bacterias secas se trituraron mecánicamente en un mortero con polvo de vidrio durante una hora y media; las bacterias trituradas se resuspendieron en una solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 M con acetato de magnesio 0.01 M pH 7.4 y se dejó agitando a 4°C por 12 h. La mezcla se centrifugó a 1500 x g por 30 min, el precipitado se eliminó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 144,000 x g por 3 h.

El sobrenadante se recuperó y se dializó durante 12 h contra agua destilada. El dializado se separó en alícuotas y se liofilizó. Una alícuota se separó para determinar proteínas por el método de Bradford (6).

1.4 Obtención de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

La masa bacteriana obtenida a partir de una suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis* se deslipidizó con una mezcla etanol-éter en diferentes proporciones, 1:1, 1:2 y 1:3, el extracto lipídico así obtenido se concentró por evaporación a 35°C en un rotavapor, y constituyó la fracción lipídica.

1.5 Aislamiento de la fracción polisacárida de *Nocardia brasiliensis*.

La obtención de la fracción polisacárida de *Nocardia brasiliensis* se realizó mediante 2 procedimientos diferentes, por lo cual se decidió trabajar las 2 fracciones por separado y denominarlas fracción polisacárida I y fracción

polisacárida II, las cuales se obtuvieron utilizando la metodología que se describe enseguida:

1.5.2 Obtención de la fracción polisacárida II de *Nocardia brasiliensis*.

La obtención de esta fracción, se hizo a partir de la fracción proteica, la cual se resuspendió en Tris-HCl 0.01 M pH 7.8, se digirió con proteinasa K (utilizando una concentración de enzima de 50 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h a 55°C, la reacción se detuvo con TCA 0.11 M a 4°C (26), la muestra se centrifugó a 10, 800 x g y el sobrenadante obtenido se dializó contra agua bidestilada; este sobrenadante constituyó la fracción polisacárida II.

2. Caracterización parcial de las fracciones proteica, lipídica y polisacárida de *Nocardia brasiliensis*.

2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en gradiente 10-18% con SDS.

Para el análisis electroforético del contenido proteico, de las diferentes fracciones de *Nocardia brasiliensis*, se utilizó un gel de poliacrilamida en sistema discontinuo de Laemmli (23) con un gel de empaquetamiento al 5% T y un gel de corrimiento en gradiente de 10-18% T, los que se prepararon de la siguiente manera:

2.1.1 Preparación de geles.

Gel de corrimiento 10-18% T:

Concentración % T	10 %	18 %
Acrilamida-bis-acrilamida (30 % T, 2.7 % C)	0.720 ml	1.259 ml
Amortiguador Tris -HCl 3 M pH 8.8	0.396 ml	0.396 ml
Glicerol al 50%	0.144 ml	0.222 ml
Agua tridestilada	0.874 ml	0.193 ml
SDS al 10 %	0.020 ml	0.020 ml
Persulfato de amonio	0.007 ml	0.007 ml
TEMED	0.001 ml	0.001 ml

El gel de corrimiento se preparó con la ayuda de un dispositivo generador de gradientes de 2 compartimentos, conectados a una bomba peristáltica (BIO-RAD). La solución de acrilamida al 10% T, se vació en el compartimento izquierdo del aparato y la solución de 18%T en el compartimento de la derecha, la unión entre los dos compartimentos se abrió al conectar la bomba y las soluciones se mezclaron en la cámara derecha con la ayuda de un agitador magnético. La mezcla se agregó a un mini cassette (BIO-RAD) de 10 x 7 cm, con espaciadores de 0.75 mm, por medio de una bomba peristáltica a una velocidad aproximada de 1 ml por min. Una vez que se terminó de pasar la mezcla, se aplicó una capa de agua para evitar que el oxígeno inhibiera la polimerización. Después de que el gel polimerizó, se eliminó la capa de agua con ayuda de papel filtro. Posteriormente se colocó en la parte superior del mini cassette un peine de teflón para formar los carriles donde se aplicaron las muestras; con una pipeta Pasteur se adicionó el gel concentrador, que se preparó en la forma que se describe a continuación:

Preparación del gel concentrador al 5%

Acrilamida-bis-acrilamida (30 % T, 2.7% C)	0.499 ml
Amortiguador Tris-HCl pH 6.8	0.375 ml
Agua bidestilada	1.980 ml
SDS al 10 %	0.030 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.105 ml
TEMED	0.003 ml

2.1.2 Corrimiento electroforético de las fracciones.

Una vez que el gel concentrador polimerizó, se retiró el peine y en cada uno de los carriles se aplicó amortiguador de electroforesis Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, con SDS al 0.1%, pH 8.3. El cassette se colocó en la cámara de electroforesis y se realizó el precorrimiento del gel a 50 volts durante 20 minutos.

Las muestras problema se mezclaron con buffer de muestra (SDS al 10%, β -mercaptoetanol al 10%, glicerol al 50% en buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 y 0.2% de azul de bromofenol como indicador de frente de iones), tales muestras fueron sometidas a ebullición por 2 min. Posteriormente las muestras y marcadores de peso molecular (Dalton Mark VII) se aplicaron al gel, para someterlos a electroforesis. La electroforesis se inició a 80 volts hasta que el azul de bromofenol llegó al gel de corrimiento, enseguida se aumentó el voltaje a 150 v, hasta que el frente del colorante llegara al extremo inferior del gel. Finalmente el gel fue teñido con azul de Coomassie y/o Nitrato de plata.

2.1.3 Tinción con Nitrato de plata.

Una vez concluida la electroforesis, el gel se colocó en solución fijadora (metanol 50%, ácido acético glacial 12%) durante 20 min.; luego se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con solución lavadora (etanol 10%, ácido acético glacial 5%), para eliminar el exceso de SDS. Posteriormente el gel se sumergió en solución oxidante (dicromato de potasio 0.0034 M, en ácido nítrico 0.0032 N) y

se mantuvo en ella con agitación constante durante 5 min., después se hicieron 3 lavados de 10 min. cada uno con agua bidestilada. Enseguida se adicionó al gel Nitrato de plata 0.012 M durante 30 min. , los primeros 5 min. en luz intensa y posteriormente en luz normal. Finalmente se efectuaron 2 lavados rápidos con solución reveladora (carbonato de sodio 0.28 M, formol 6.6 mM) y se dejó en esta solución hasta que aparecieron las bandas, la reacción se detuvo con ácido acético 1% (28).

2.1.4 Tinción con azul de Coomassie.

El gel se sumergió en azul de Coomassie (0.1 g de azul de Coomassie R-250 en metanol 40%, ácido acético 10%) durante toda la noche. Posteriormente se retiró el colorante y se añadió solución desteñidora (metanol 40%, ácido acético 10%) hasta que se eliminó el colorante no unido a proteínas (13).

2.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Para determinar la cantidad de proteínas presentes en cada una de las fracciones obtenidas de *Nocardia brasiliensis* se utilizó el método de Bradford (6). Para ello se hizo una curva de calibración utilizando como estándar albúmina sérica bovina a concentraciones de 2 a 18 $\mu\text{g/ml}$; a los estándares, las muestras problema (fracciones) y los blancos, se les adicionó reactivo de Bradford (6 mg de azul de Coomassie G-250 en ácido perclórico al 3%), se agitaron en vortex y se dejaron reposar 30 min., posteriormente se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas en las muestras problema se determinó, interpolando la absorbancia de éstas con la curva estándar.

2.3 Determinación de la concentración de carbohidratos por el método de Dubois.

La determinación de carbohidratos en cada una de las fracciones se realizó mediante el método de Dubois (14). Se usó como estándar galactosa a

concentraciones de 10 a 70 $\mu\text{g/ml}$ y con ellos se realizó una curva de calibración. A las muestras problema (fracciones), los estándares y los blancos se les agregó fenol al 80%, posteriormente se les añadió ácido sulfúrico concentrado, se dejaron reposar 10 min., inmediatamente las muestras se agitaron y se colocaron en un baño de agua a 25-30°C durante 20 min. La absorbancia se determinó a 490 nm. La cantidad de azúcar presente en las muestras se determinó interpolando las absorbancias de las muestras problema en la curva de calibración.

2.4 Determinación de la presencia de ácidos nucleicos.

Para determinar la presencia de ácidos nucleicos en las fracciones de *Nocardia brasiliensis* se utilizó un gel de agarosa al 1 % (agarosa al 1% en amortiguador Tris 0.89 M -ácido bórico 0.89 M -EDTA 25 mM , con bromuro de etidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$), el cual se colocó en una cámara para electroforesis que contenía el amortiguador de corrimiento Tris-ácido bórico-EDTA. Posteriormente las fracciones de *Nocardia* y un estándar de DNA (25 $\mu\text{g/ml}$) se mezclaron con "jugo azul" (xilencianol-azul de bromofenol-glicerol, que se utiliza como indicador de la movilidad de fragmentos de DNA) y fueron aplicadas al gel. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 v durante 1h 20 min.. Finalmente el gel se observó en una lámpara de luz ultravioleta.

2.5 Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

El análisis de los diferentes componentes de la fracción lipídica se hizo mediante cromatografía en capa fina, utilizando para ello cromatofolios Al de silicagel 60 F₂₅₄, con un espesor de capa de 0.2 mm (Merck). Como estándares de referencia se utilizaron: L-alfa-lecitina/esfingomielina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Estos estándares se disolvieron en cloroformo para tenerlos a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se colocaron, al igual que las muestras problema, en los cromatofolios con ayuda de

un microcapilar de 5 μ l. Se utilizaron 15 μ l del estándar de L-alfa-lecitina/esfingomielina, 20 μ l de los estándares de esfingomielina y fosfatidilcolina, 5 μ l de los de fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol y 35 μ l de la muestra problema (fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*).

Las cromatografías se realizaron en una cámara de vidrio de 11x14x9.6 cm (Sigma-Aldrich) en un sistema de solventes (fase móvil) de cloroformo-acetona-metanol-ácido acético-agua 50:20:10:10:5 v/v durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se sacaron los cromatofolios, se dejaron secar y posteriormente se revelaron con ácido fosfomolibdico (ácido fosfomolibdico al 10% en etanol) y calor (luego de rociar el revelador, la placa se colocó a 120°C durante 1-3 min.) (20).

2.6 Cromatografía gas-líquido de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

Como parte de la caracterización parcial de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*, se incluyó el análisis de ésta por cromatografía gas-líquido.

Puesto que la cromatografía gas-líquido separa componentes volátiles de una mezcla dependiendo de sus tendencias relativas a disolverse en el material empacutado en la columna, y a ser arrastrados por una corriente de gas inerte, se llevó a cabo una derivatización de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*, para incrementar su volatilidad y así poder analizarla.

Para el análisis de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica, ésta se calentó en una mezcla de metanol con un ácido fuerte, lo cual convierte a los ácidos grasos esterificados con glicerol en sus metil ésteres, proceso conocido como transesterificación. Esos acil metil ésteres fueron luego sometidos a la cromatografía gas-líquido (24).

2.6.1 Transesterificación.

1 g de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis* se colocó en un matraz redondo de fondo plano que contenía 200 ml de metanol, luego se le adicionaron

1.5 ml de ácido sulfúrico. El matraz se conectó a un refrigerante y la mezcla se dejó refluendo durante 4 horas.

Posteriormente la muestra refluída fue extraída con una mezcla éter etílico-agua bidestilada (1:1 v/ v), la capa etérea fue recuperada y se filtró a través de un papel Whatman # 1 que contenía 20 g de sulfato de sodio anhidro, se recolectó en un matraz y se aforó a 250 ml con éter-etílico; finalmente esta muestra se concentró por evaporación en un rotavapor a 30-35°C y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

2.6.2 Cromatografía gas-líquido.

Una vez transesterificada la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*, se llevó a cabo el análisis de ésta por cromatografía gas-líquido.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 2 B con detector de ionización de flama. El gas acarreador empleado como fase móvil en el análisis fue el nitrógeno. El tipo de columna utilizada fue la SP 2330. Esta columna, es útil en separaciones a altas y bajas temperaturas de muestras como isómeros geométricos de ésteres metílicos de ácidos grasos (42).

Se empleó como estándares una mezcla comercial de ácidos grasos saturados e insaturados de 16 a 22 átomos de carbono (Sigma, mezcla de estándares 189-1 de los siguientes átomos de carbono: 16:0, 17:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3; mezcla 189-2 de 16:0, 17:0, 18:0, 18:1 y 20 átomos de carbono; mezcla 189-4 con átomos de carbono de 16:1, 18:1, 20:1 y 22:1), y se utilizó como estándar interno un ácido graso de 17 átomos de carbono, sin insaturaciones (17:0).

Se inyectaron 2 µl de muestra y la temperatura de inyección fue de 260°C. Se realizó una elución utilizando gradientes de temperatura, aumentando ésta 2°C por minuto hasta alcanzar los 160°C, luego se aumentó a 4°C por min. hasta llegar a una temperatura de 210°C; una vez alcanzada esta temperatura se aumentó a 10°C por min. hasta alcanzar los 260°C. La temperatura de detección fue de 280°C.

3. Inmunización de ratones BALB/c para determinar la inmunogenicidad de las fracciones obtenidas.

3.1 Animales.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 a 12 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico con tapa de rejilla metálica a una temperatura de 20-23°C, se alimentaron con nutricubos para roedores (Purina USA) y agua purificada ad libitum.

3.2 Antígenos.

Se utilizaron como antígenos las cuatro fracciones obtenidas de *Nocardia brasiliensis*: Fracción proteica, fracción lipídica, fracción polisacárida I y fracción polisacárida II.

3.3 Preparación de antígenos para inmunizar.

Para inmunizar a los animales se administraron las fracciones proteica, lipídica, polisacárida I y polisacárida II sin y con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Los antígenos aplicados sin AIF se resuspendieron únicamente en solución salina. Los antígenos con AIF se prepararon como una emulsión con 50% del antígeno en solución salina y el otro 50% de AIF. En el caso particular de la fracción lipídica, una vez concentrada por evaporación, se secó con Nitrógeno; luego se pesó una cantidad tal de ésta para tener una concentración de extracto lipídico de 1.5 mg/ml resuspendido en glicerol al 99%, con ello se inmunizó los animales.

3.4 Esquema de inmunización.

Se formaron 8 grupos de ratones, los primeros 4 grupos estaban constituidos de 10 ratones cada uno (5 ratones se inmunizaron con el antígeno únicamente y 5 con antígeno más AIF) y se inmunizaron con una dosis máxima de 75 µg de antígeno (fracciones proteica, lipídica, polisacárida I y polisacárida

II). Los otros 4 grupos constaron de 5 ratones únicamente, los cuales se inmunizaron con antígeno emulsificado con AIF (proteína, lípido, polisacárido I y polisacárido II), con una dosis mínima de 7.5 µg por ratón.

Los ratones se inmunizaron en tres ocasiones, a los 0, 14 y 28 días; en el vigésimo octavo día los ratones se reinmunizaron con la mitad de la dosis original de antígeno. Los ratones se sangraron vía plexo retroorbitario al tiempo 0 antes de la primoinmunización, el día 28 y 45 (los sueros obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su uso). La vía de administración de los antígenos fue subcutánea en el cojinete plantar.

Se incluyó también un grupo de 6 ratones como control, de los cuales 2 se inmunizaron con solución salina, 2 con AIF y 2 con Glicerol al 99%.

4. Determinación de la respuesta de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con las fracciones proteica, lipídica, polisacárida I y polisacárida II de *Nocardia brasiliensis* (dosis máximas y mínimas).

Se evaluó la respuesta de anticuerpos de todos los ratones contra el antígeno usado para inmunizarlos, el cual, para fines prácticos en este trabajo se denominará antígeno homólogo, y contra las demás fracciones a las que se llamará antígenos heterólogos.

Aunque no se contempló en los objetivos originales, adicionalmente se determinó la respuesta de anticuerpos (en los sueros de los ratones inmunizados con las fracciones) contra un extracto semipurificado de *N. brasiliensis*, el cual está enriquecido en la proteína de 24 kDa (la cual es inmunodominante en humanos y en ratón) de esta bacteria.

4.1 Determinación de anticuerpos contra la fracción proteica de *Nocardia brasiliensis*.

La determinación de anticuerpos contra esta fracción se hizo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) estandarizado en el Departamento de

Inmunología por la Biol. Silvia Casillas (7), el cual consiste en lo siguiente:

- a) 50 µg de extracto crudo de *Nocardia brasiliensis*, resuspendidos en 200 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6, se pegaron en cada pozo de fondo plano de placas "Costar" (Bio-Rad USA). El antígeno se dejó incubando durante toda la noche a 4°C.
- b) Después el contenido de los pozos se eliminó por decantación y se realizaron 3 lavados con Tween 20 en amortiguador salina-fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.2 1:1000 de 10 min. cada uno.
- c) Enseguida se agregaron 200 µl de los sueros problema a una dilución 1:50, diluidos en leche descremada al 5% en PBS con Tween 20 1:1000; se incubaron durante 1 h a 37°C.
- d) Posteriormente se realizaron 5 lavados con solución de lavado (PBS-Tween 20 1:1000): 2 lavados de 5 min. cada uno, y 3 lavados de 1 min. cada uno.
- e) Se añadieron 200 µl de anticuerpo polivalente anti-ratón desarrollado en chivo, conjugado a peroxidasa, diluidos 1:1000 en leche descremada al 1% en PBS con Tween 1:1000; se incubaron 1 h a 37°C.
- f) Luego se realizaron 3 lavados, uno de 5 min. y 2 de 1min. cada uno.
- g) Después se adicionaron 160 µl de ortofenilendiamina dihidroclorada (OPD) - peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como solución cromógeno-substrato, preparado de la siguiente forma: 10 mg de OPD con 25 ml de amortiguador de citratos pH 5.0, más 3 µl de peróxido de hidrógeno al 30%; esta mezcla se preparó en un frasco obscuro, al momento de usarse. La placa se colocó en la obscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.
- h) La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 N, del cual se colocaron 40 µl en cada pozo.
- i) La absorbancia del contenido de cada uno de los pozos se determinó a una longitud de onda de 492 nm en un microlector para ELISA.

4.2 Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

Para la determinación de anticuerpos antilípidos se estandarizaron dos técnicas, una de aglutinación y otra inmunoenzimática. Las condiciones que se emplearon para la estandarización de dichas técnicas se describen a continuación.

4.2.1 Estandarización de una técnica de aglutinación para la determinación de anticuerpos anti-fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

La técnica de aglutinación a estandarizar fue la descrita por Takahashi y cols. (43).

4.2.1.1 Preparación de la suspensión estándar de kaolín.

El kaolín (Sigma), se trató con HCl al 5% durante 24 h en agitación; el HCl se eliminó por lavados repetidos con agua desionizada. El kaolín se secó a 120°C, posteriormente se calentó 2 h a 800±10°C, enseguida se pulverizó mecánicamente con ayuda de un mortero, durante un periodo de 2 h, el polvo se transfirió a otro mortero y se le agregaron 2 ml de agua desionizada y se pulverizó 30 min. más. Esta mezcla se transfirió a un tubo cónico de 15 ml, el cual se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 a 20 h. Enseguida se recolectó en otro tubo, el material no sedimentado (sobrenadante) y se centrifugó a 1200 x g durante 15 min, el sobrenadante obtenido en esta ocasión, se eliminó y el precipitado se resuspendió en agua desionizada para tener así la suspensión estándar de kaolín a la concentración deseada.

4.2.1.2 Preparación de la suspensión de kaolín sensibilizada con antígeno.

Una parte de la solución de lípidos en metanol (0.1 ml) se le agregó gota a gota a 19 partes (1.9 ml) de buffer TME-salina pH 6.6, bajo agitación constante. Se agregó una parte de la suspensión estándar de kaolín (1 ml) a dos partes de

emulsión de antígeno (2 ml), agitando constantemente y posteriormente se incubó a 37°C por 30 min.

4.2.1.3 Ensayo de aglutinación del kaolín.

10 µl de suero de ratón (control o problema) se colocaron en una placa excavada y se les añadió 10 µl de suspensión de kaolín sensibilizado con antígeno. La placa se agitó de 2 a 3 min, posteriormente se observó presencia o ausencia de aglutinación macroscópicamente, y microscópicamente cuando no era posible observar el precipitado a simple vista.

4.2.1.4 Condiciones ensayadas en la estandarización de la técnica de aglutinación del kaolín.

Se probó la combinación de las siguientes condiciones:

- a) pH al cual se efectuó el ensayo: 6.0, 6.6, 7.0 y 7.5
- b) Concentración de kaolín (mg/ml): 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0
- c) Concentración de lípidos (mg/ml): 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0
- d) Tiempo de incubación kaolín-lípido, en horas: 0.5, 1, 2 y 12
- e) Disolvente del lípido: Metanol y cloroformo-metanol (1:2)
- f) Adición de: Fosfatidiletanolamina (0.05 mg/ml), Albúmina de huevo (0.05 mg/ml, 0.5 mg/ml) o Albúmina sérica bovina.
- g) Temperatura de incubación (°C): temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y 37°C.

4.2.2 Estandarización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

Para la estandarización de la técnica se probaron los siguientes materiales, reactivos y tiempos de incubación (7, 21, 50):

- a) Placas de poliestireno con 96 pozos, de fondo plano "Costar" (Bio-Rad USA).
- b) Los pozos se cubrieron con:

- 20 μg de la fracción lipídica de *N. brasiliensis* disueltos en cloroformo-metanol (2:1 v/v) y PBS 0.1 M pH 7.2, 50 μl por pozo, toda la noche a 37°C. La preparación de esta fracción se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 mg de ella se disolvieron en 1 ml de cloroformo-metanol (2:1 v/v); de esta solución se tomaron 400 μl y se resuspendieron por sonicación en 9600 μl de PBS 0.1 M pH 7.3, esta suspensión fue la que se utilizó para pegar a la placa.
 - 50 μg por pozo en 30 μl de etanol al 95%, durante toda la noche a 4°C.
- c) Se hicieron 3 lavados de 10 min. cada uno con:
- 200 μl por pozo de PBS 0.1 M pH 7.2 con Tween 20 1:1000.
 - 100 y 200 μl de PBS pH 7.2.
- d) Se probaron las siguientes soluciones bloqueadoras:
- Suero bovino al 10% en PBS pH 7.2, aplicando 75 μl por pozo e incubando a temperatura ambiente durante 1 h.
 - Albúmina sérica bovina al 1% en PBS pH 7.2, 150 μl por pozo, incubando a 37°C durante 1 h.
 - Leche descremada al 5%, 200 μl por pozo, incubando 2 h a 37°C.
-
- e) Los sueros controles y problema fueron diluidos 1:50 y 1:25 en:
- Suero bovino adulto al 10% en PBS 0.1 M pH 7.2, 50 μl por pozo, incubando 3 h a temperatura ambiente.
 - Albúmina sérica bovina al 1% en PBS 0.1M pH 7.2, 100 μl por pozo, incubando 1 h a 37°C.
 - Leche descremada al 1% en PBS 0.1M pH 7.2 - Tween 20 1:1000, 100 μl por pozo, incubando 2 h a 37°C.
- f) Se realizaron 5 lavados de la placa (ver inciso c): 2 de 5 min. cada uno y 3 de 1 min.
- g) Como segundo anticuerpo se utilizó gammaglobulina polivalente de cabra anti- IgA, IgG e IgM de ratón conjugada a la peroxidasa, diluido 1:1000 en:

- Suero bovino al 10% en PBS 0.1 M pH 7.2, 50 μ l por pozo, incubando las placas 90 min. a temperatura ambiente.
- Albúmina sérica bovina al 1% en PBS 0.1 M pH 7.2, 100 μ l por pozo, incubando 1 h a 37°C.
- Leche descremada al 1% en PBS 0.1 M pH 7.2 -Tween 1:1000, 100 μ l por pozo, 1 h a 37°C.

h) Posteriormente se realizaron 3 lavados (ver inciso c): 1 de 5 min. y 2 de 1 min. cada uno

i) Como solución cromógeno-substrato se utilizó ortofenilendiamina dihidroclorada (OPD) con peróxido de hidrógeno, la cual se preparó de la siguiente manera: 10 mg de OPD se resuspendieron en 25 ml de amortiguador de citratos pH 5.0, más 3 μ l de H₂O₂ al 30%; esta mezcla, preparada al momento de usarse, se colocó en un frasco oscuro y se aplicaron 160 μ l por pozo.

j) La placa se colocó a resguardo de la luz durante 30 min. a temperatura ambiente.

k) La reacción se detuvo con 40 μ l por pozo de H₂SO₄ 1N.

l) La absorbancia se determinó en un microlector para ELISA a una longitud de onda de 492 nm.

Nota:

El ensayo se realizó utilizando como control positivo, sueros de ratones hiperinmunizados con lípidos de *N. brasiliensis*, como control negativo, sueros de ratones sin inmunizar y como blanco todos los reactivos a excepción del suero.

Las condiciones óptimas del ensayo (concentraciones y diluciones de los reactivos y tiempos de incubación) seleccionadas, fueron aquéllas con las que se logró obtener diferencia de absorbancia entre sueros controles positivos y negativos.

4.3 Adaptación de un ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos contra la fracción polisacárida II de *Nocardia brasiliensis*.

Para la adaptación de la técnica se probaron los siguientes materiales y reactivos(7):

- a) Placas de poliestireno de fondo plano "Costar".
- b) Fracción polisacárida II de *Nocardia brasiliensis* a una concentración de 50 µg por pozo, resuspendida en 200 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6, incubando toda la noche a 4°C.
- c) Se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con 200 µl de PBS 0.1 M pH 7.2 con Tween 20 1:1000 (solución de lavado).
- d) Se probó como solución bloqueadora leche descremada al 5% en PBS 0.1 M pH 7.2 con Tween 20 1:1000, y se aplicaron 200 µl a cada pozo, la placa se incubó durante 2 h a 37°C.
- e) Luego se hicieron 5 lavados con 200 µl por pozo de solución de lavado: 2 de 5 min. cada uno y 3 de 1 min. cada uno.
- f) Los sueros de los ratones inmunizados con las fracciones de *Nocardia* y los sueros de los ratones utilizados como control (no inmunizados: controles negativos e hiperinmunizados: controles positivos) fueron diluidos 1:50 en la solución bloqueadora y se aplicaron 200 µl por pozo, incubando 1 h a 37°C.
- g) Posteriormente se realizaron 5 lavados: 2 de 5 min. cada uno y 3 de 1 min.
- h) Se usó como segundo anticuerpo gammaglobulina polivalente de cabra anti-gammaglobulina de ratón, conjugada a la peroxidasa; la cual fue diluida 1:1000 en leche descremada al 1% en PBS-Tween 20 1:1000, se aplicaron 200 µl por pozo y se incubó 1 h a 37°C.
- i) Se realizaron 3 lavados: 1 de 5min. y 2 de 1min. cada uno.
- j) Como solución cromógeno-sustrato se utilizó ortofenilendiamina dihidroclorada (OPD) con peróxido de hidrógeno al 30%; se utilizó la siguiente preparación: 10 mg de OPD se resuspendieron en buffer de citratos pH 5.0 y luego se adicionó a esta solución 3 µl de H₂O₂ al 30%, esta mezcla se colocó en

un frasco obscuro, se preparó al momento de usarse y se aplicaron 160 μ l por pozo. La placa se colocó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.

k) La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 N, 40 μ l por pozo.

l) La absorbancia se midió en un microlector de ELISA, a una longitud de onda de 492 nm, utilizando un filtro diferencial de 600 nm.

4.4 Determinación de anticuerpos contra extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis*.

Se realizó la determinación de anticuerpos (en los sueros de los ratones inmunizados con las diferentes fracciones de *Nocardia brasiliensis*) contra un extracto semipurificado enriquecido en la proteína inmunodominante de 24kDa de este microorganismo. Para ello se utilizó una técnica de ELISA estandarizada en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por la Biol. Silvia Casillas (7, 34).

4.4.1 Obtención del extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis*.

4.4.1.1 Precipitación del extracto celular deslipidizado de *Nocardia brasiliensis*.

Se disolvieron 50 mg del extracto celular deslipidizado de *Nocardia brasiliensis* en 6 ml de PBS 0.1 M, pH 7.3; una vez disuelto se le adicionó, gota a gota y agitando, un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio previamente ajustada a un pH de 7.3 con hidróxido de amonio y la mezcla se dejó agitando durante 30 min.. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga refrigerada (Beckman TJ-6) a 1920 x g por 30 min., se extrajo el sobrenadante, el cual se dializó exhaustivamente contra solución salina al 0.85%. Para verificar la eliminación de sulfato de amonio se probaron alícuotas de la solución de diálisis con solución saturada de cloruro de bario hasta observar ausencia de precipitado blanco. Después de que el extracto se dializó, se dejó una alícuota para analizarla mediante SDS-PAGE y el resto de la muestra se liofilizó.

4.4.1.2 Tratamiento del sobrenadante obtenido al precipitar el extracto celular deslipidizado de *N. brasiliensis* con solución saturada de sulfato de amonio.

El sobrenadante dializado y liofilizado (ver apartado 4.4.1.1), se resuspendió en 500 μ l de PBS pH 7.3 y se le agregaron 25 μ l de Desoxirribonucleasa I (Sigma); se dejó incubando durante 2 h a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 1920 x g por 10 min.. El sobrenadante se dializó contra agua bidestilada durante 12 h a 4°C.

4.4.1.3 Preparación y calibración de una columna de Sephadex G-100 para cromatografía de filtración en gel.

Se utilizó una columna para cromatografía (columna de filtración en gel Wheaton) de 23 cm de largo por 2.5 cm de diámetro, la columna se empaquetó con una matriz de Sephadex G-100 con una capacidad de retención de agua de 15 ml por gramo de peso seco. Se pesaron y resuspendieron en agua bidestilada 7 g de Sephadex y se dejaron hidratar toda la noche a temperatura ambiente. El Sephadex se lavó 3 veces con agua bidestilada y se equilibró en PBS 0.1 M pH 7.3; posteriormente el Sephadex se desgasificó mediante sistema de vacío y con este material se empacó la columna por gravedad, a un flujo de trabajo de 0.5 ml por min. a 4°C.

El volumen vacío de la columna se determinó utilizando dextrana azul con un peso molecular de 2000 kDa (1 mg en 250 μ l de PBS pH 7.3 con 5% de glicerol). Posteriormente, se determinó el volumen de elución de las siguientes proteínas de peso molecular conocido: Alcohol deshidrogenasa de 150 kDa (5 mg en 500 μ l de PBS pH 7.3 con 5% de glicerol), anhidrasa carbónica de 29 kDa (3 mg en 500 μ l de PBS pH 7.3 con 5% de glicerol) y citocromo "c" de 12.4 kDa (2mg en 500 μ l de PBS pH 7.3 con 5% de glicerol). Las proteínas antes mencionadas se eluyeron con PBS pH 7.3, al flujo de trabajo, se recolectaron alícuotas de 2 ml cada 4 min. y se midió la absorbancia de cada una de las

fracciones a una longitud de onda de 280 nm. El perfil de elución de estos marcadores se obtuvo graficando los valores de absorbancia de cada fracción contra los números de fracciones (volúmenes de elución).

4.4.1.4 Cromatografía de filtración en gel.

A la muestra dializada se le agregó 5% de glicerol y luego se aplicó a la columna empaquetada con Sephadex G-100, se eluyó al flujo de trabajo y se midió la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones colectadas. Se graficó el perfil de elución de la muestra. Las alícuotas que se encontraron en el pico 2 del perfil de elución, previamente reportado por Vera y cols (45, 46), se analizaron mediante SDS-PAGE en gradiente de 10-18% T, 2.7% C pH 8.8 con un gel de empaquetamiento de 5% T, 2.7% C pH 6.8. El gel se tiñó con azul de Coomassie y las fracciones donde se encontró la banda que correspondía a la proteína de 24 kDa (p24), se mezclaron y se dializaron para eliminar el PBS (esta mezcla de fracciones constituye el extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis*); posteriormente se concentraron por liofilización y se conservaron a -20°C.

4.4.2 Técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis*.[®]

- a) Cada pozo de una placa de poliestireno de fondo plano fue sensibilizado con 0.5 µg de extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis* resuspendido en 200 µl de amortiguador de acetatos pH 5.0, y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C.
- b) Se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno, con 200 µl por pozo de amortiguador salina-fosfatos 0.1 M pH 7.2 Tween 20 1:1000 (solución de lavado).
- c) Posteriormente se agregaron 200 µl, a cada pozo, de solución bloqueadora que contiene leche descremada al 5% en PBS con Tween 20 1:1000.

- d) Después se realizaron 5 lavados: 2 de 5 min. cada uno y 3 de 1 min. cada uno, con la solución y volumen mencionados en el segundo paso.
- e) Se agregaron 250 μ l de los sueros control y problema respectivamente a una dilución 1:50, en solución bloqueadora y se dejaron incubando a 37°C durante 1 h.
- f) Enseguida se realizaron 5 lavados: 2 de 5 min. cada uno y 3 de 1 min. cada uno, con 200 μ l de PBS 0.1 M pH 7.4 Tween 20 1:1000 a cada pozo.
- g) Posteriormente se agregó anticuerpo polivalente de cabra (anti-IgM, anti-IgG y anti-IgA de ratón) conjugado a peroxidasa, diluido 1:1000 en leche descremada al 1% en PBS con Tween 20 1:1000, 200 μ l a cada pozo; se incubaron durante 1 h. a 37°C.
- h) Posteriormente se realizaron 3 lavados: 1 de 5 min. y 2 de 1 min. cada uno, con 200 μ l de PBS-Tween 20 1:1000 a cada pozo.
- i) Después se agregó la solución substrato-cromógeno; la cual se preparó de la siguiente forma: 8 mg de OPD, que se resuspendieron en 20 ml de amortiguador de citratos pH 5.0 más 2.4 ul de peróxido de hidrógeno al 30% y se agregaron 160 ul a cada pozo. La placa se colocó en obscuridad durante 30 min.
- j) Enseguida la reacción se detuvo agregando 40 ul de ácido sulfúrico 1 N a cada pozo.
- k) La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 492 nm en un microlector para ELISA.

V. RESULTADOS

1. Obtención de las fracciones de *Nocardia brasiliensis*.

1.1 Obtención de la fracción proteica

Después de la inoculación con la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* de 40 matraces (6.0 l de caldo BHI) se cosecharon 90.7 g de masa bacteriana húmeda. De los 90.7 g de masa húmeda se extrajeron 109 mg de proteínas de *N. brasiliensis*, determinadas mediante el método de Bradford (6).

1.2 Obtención de la fracción lipídica.

90.7 g de masa bacteriana húmeda (obtenidos de una cosecha de *Nocardia brasiliensis*) se deslipidizaron, obteniéndose un volumen final de lípidos en etanol-éter de 985 ml, los cuales se concentraron por evaporación.

1.3 Obtención de la fracción polisacárida I.

Posterior a la inoculación con la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* de 40 matraces (6.4 l de caldo BHI) se cosecharon 180.2 g de masa bacteriana húmeda, la cual se deslipidizó y secó, quedando finalmente 11.8 g de masa bacteriana seca. Después de triturar mecánicamente la masa bacteriana y tratarla con KCl y metanol, se obtuvo un precipitado cuyo peso seco fue de 22.3 g, este polvo se resuspendió en agua y se dializó. El material dializado (fracción polisacárida I) mostró un contenido de carbohidratos de 98 µg/ml (21.8 mg de carbohidratos totales).

1.4 Obtención de la fracción polisacárida II.

A partir de 11.5 ml de fracción proteica (con una concentración de proteínas de 2.78 mg/ ml , es decir 32 mg de proteína total y una concentración de carbohidratos de 3.97 mg /ml en total 45.75 mg) tratada con proteinasa K, se obtuvieron 1048 µg/ml de carbohidratos (34 mg totales), determinados por el

método de Dubois (14) y 4.08 μg /ml de proteína (0.132 mg de proteínas totales), determinados por el método de Bradford (6).

2. Caracterización parcial de las fracciones de *Nocardia brasiliensis*.

2.1 Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones de *N. brasiliensis*.

2.1.1 Análisis en SDS-PAGE de la fracción proteica de *Nocardia brasiliensis*.

El patrón electroforético de la fracción proteica de *Nocardia brasiliensis*, se muestra en la figura N°1. Se observó que la fracción, está constituida por bandas distribuidas principalmente entre los marcadores de peso molecular de 14-66 kDa y algunas bandas por abajo del marcador de 14 kDa.

2.1.2 Análisis de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis* mediante SDS-PAGE.

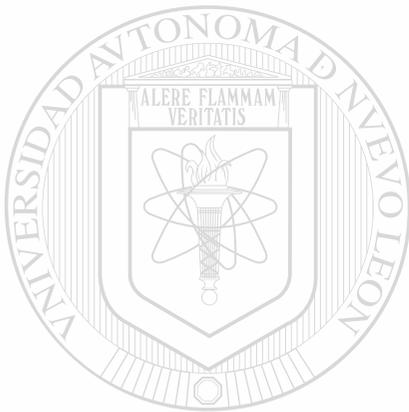
En la electroforesis de esta fracción no se observaron bandas que indicaran la presencia de proteínas, ya que la muestra de lípidos aplicada en el gel, tenía una densidad menor a la del buffer de corrimiento y probablemente la muestra no penetró al gel. En la figura N° 2, en el carril 5 se muestra el gel en el cual se aplicó la muestra de lípidos para su análisis.

2.1.3 Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción polisacárida I de *N. brasiliensis*.

En esta fracción se observó en el gel, con la tinción de azul de Coomassie, una banda correspondiente a la proteína de 24 kDa de *Nocardia brasiliensis*; según se aprecia con la tinción de Nitrato de plata, parte de la muestra sólo logró penetrar al inicio del gel, pues es ahí donde se observa la mayor acumulación de este material. En la figura N° 2, en el carril 4, se muestra el análisis electroforético de la fracción polisacárida I de *Nocardia brasiliensis*.

2.1.4 Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción polisacárida II de *N. brasiliensis*.

De acuerdo al análisis electroforético de esta fracción, no hubo detección de la presencia de bandas de proteína con azul de Coomassie y con Nitrato de plata, lo que era de esperar por el tratamiento realizado con Proteinasa K para eliminar proteínas. Observar figura N° 2, carril 3.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

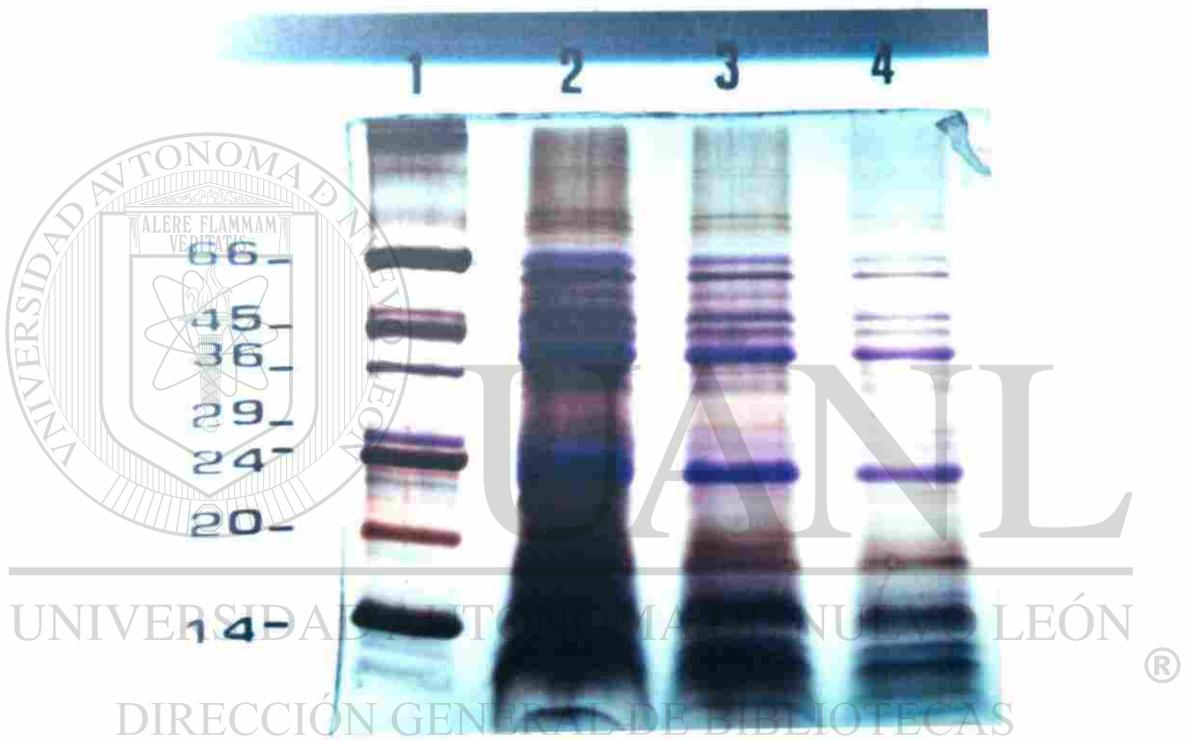


Figura N° 1. Análisis de la fracción proteica de *N. brasiliensis* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en gradiente de 10-18% T, 2.7 % C. Carril 1 Marcadores de bajo peso molecular. Carri 2 al 4 Fracción proteica de *N. brasiliensis* (80, 40 y 20 µg de proteína respectivamente). Tinción con nitrato de plata y azul de Coomassie.

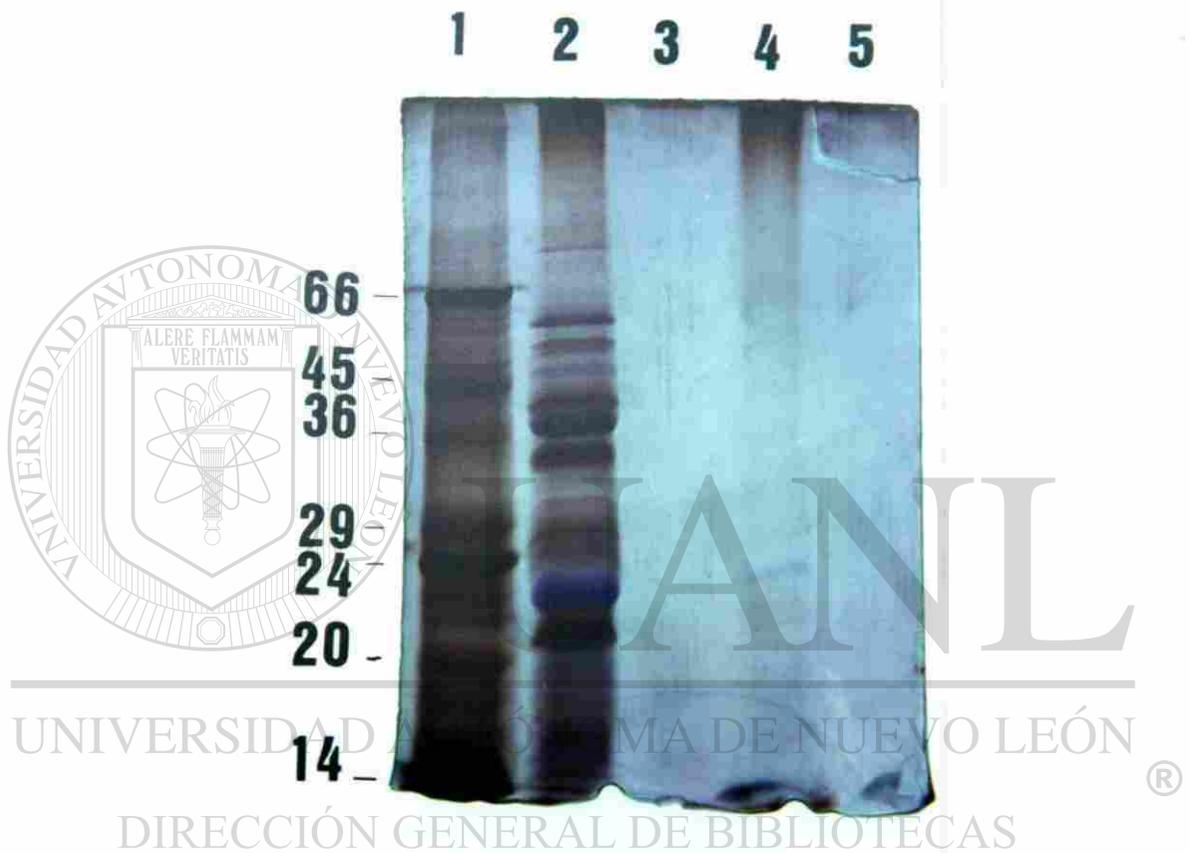


Figura N° 2. Análisis de las fracciones de *Nocardia brasiliensis* en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en gradiente de 10-18% T, 2.7% C. Carril 1 Marcadores de peso molecular bajo. Carril 2 Fracción proteica de *N. brasiliensis*. Carril 3 Fracción polisacárida II de *N. brasiliensis*. Carril 4 Fracción polisacárida I. Carril 5 Fracción lipídica de *N. brasiliensis*. Tinción con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

2.2 Determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos en las fracciones de *N. brasiliensis*.

La concentración de proteínas y carbohidratos en las fracciones proteica, polisacárida I y polisacárida II se muestran en la tabla I. En el caso de la fracción lipídica no fue posible realizar las determinaciones debido a que había interferencias y se obtenían reacciones falsas positivas, porque la muestra de lípidos presentaba coloración naranja.

Tabla I

Determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos en las fracciones de *Nocardia brasiliensis*.

Fracción	Proteínas (Bradford) µg/ml	Carbohidratos (Dubois) µg/ml
Proteica	743	1061
Polisacárida I	11	98
Polisacárida II	4	1048

2.3 Determinación de la presencia de ácidos nucleicos.

La presencia de ácidos nucleicos en las fracciones proteica, polisacárida I y polisacárida II de *Nocardia brasiliensis* se puso de manifiesto mediante la fluorescencia emitida (bajo la luz ultravioleta) por un gel teñido con bromuro de etidio; el enlace de bromuro de etidio a los ácidos nucleicos incrementa su fluorescencia significativamente (32). En la fracción proteica se observa una banda bien definida al inicio del gel, esta banda migró a la misma posición que el estándar de DNA, además se aprecia un barrido abundante que inicia en la parte media de el gel, y en el extremo inferior se ve una banda más gruesa y menos bien definida que la observada al inicio de éste. Ver figura N° 3 carril 2. En la fracción polisacárida I, como se muestra en la figura N° 3 carril 3, se detectó un barrido uniforme que al inicio del gel es muy tenue, pero luego se va haciendo más intenso y al final vuelve a atenuarse (en esta muestra no se observó nada en el extremo inferior del gel). La figura N° 3 carril 4 muestra como en la fracción polisacárida II solo se logró apreciar una banda en el extremo inferior del gel. Cabe aclarar que en la fracción lipídica no se logró hacer la determinación debido a la naturaleza de la muestra (ya que la mayor parte de esta, debido a su hidrofobicidad, no penetró al gel).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura N° 3. Determinación de ácidos nucleicos en las fracciones de *Nocardia brasiliensis* mediante análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 Estándar de DNA (125 ng). Carril 2 Fracción proteica de *Nocardia brasiliensis*. Carril 3 Fracción polisacárida I de *N. brasiliensis*. Carril 4 Fracción polisacárida II de *N. brasiliensis*.

2.4 Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

De acuerdo a las manchas detectadas mediante ácido fosfomolibdico en cromatofolios de aluminio, la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*, está constituida por compuestos de diferentes polaridades, los cuales no se identificaron puesto que no correspondieron con ninguno de los estándares utilizados. Ver figura N° 4.

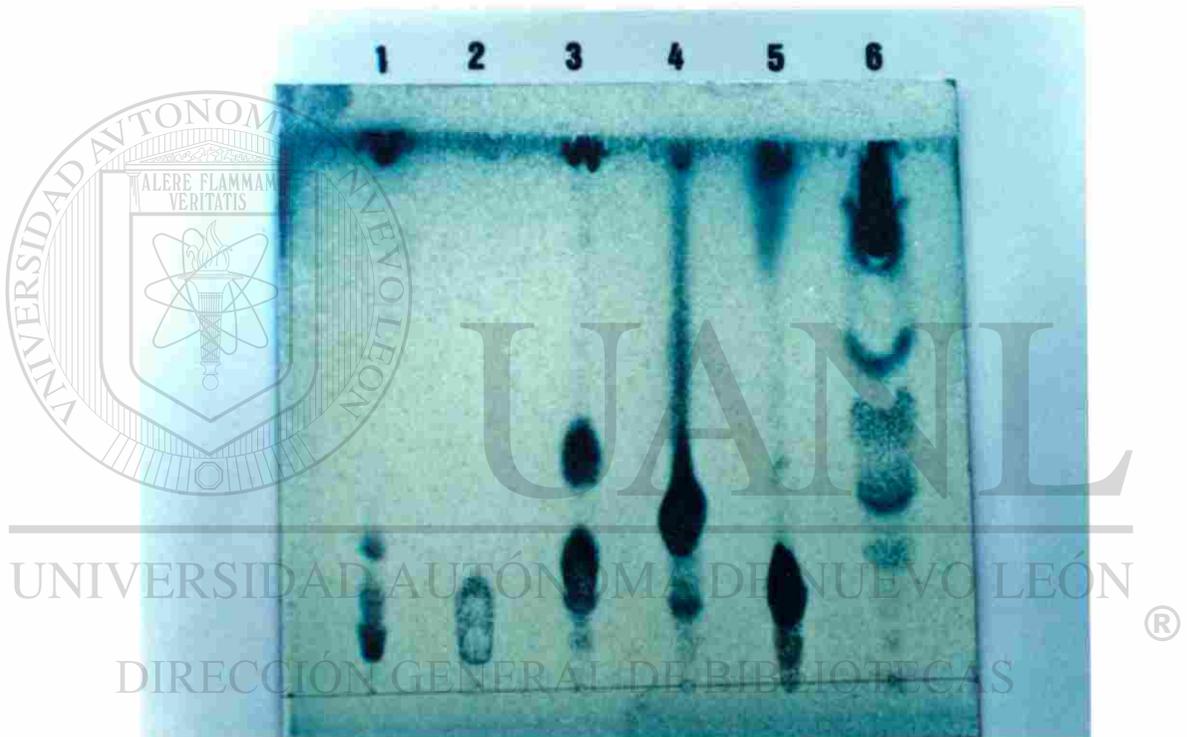
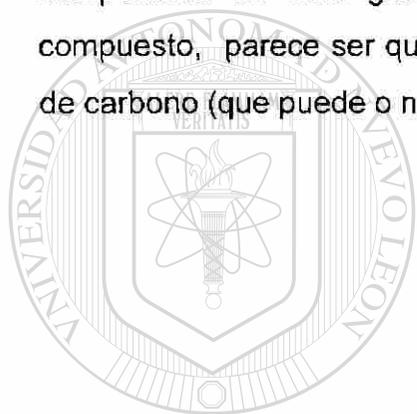


Figura N° 4. Cromatografía en capa fina de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*. Cromatofolio revelado con ácido fosfomolibdico. Carril 1 L-alfa-lecitina/esfingomieline. Carril 2 Esfingomieline. Carril 3 Fosfatidilcolina . Carril 4 fosfatidiletanolamina. Carril 5 Fosfatidilinositol. Carril 6 Fracción lipídica de *N. brasiliensis*.

2.5 Cromatografía gas-líquido de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

En el cromatograma obtenido de el análisis por cromatografía de gases de la fracción lipídica de *Nocardia* y que se muestra en la figura N° 5 se observó la presencia de varios picos, los primeros 3 corresponden a compuestos con 16, 17 y 18 átomos de carbono, respectivamente, sin insaturaciones, el cuarto a un compuesto con 18 átomos de carbono y una insaturación, el siguiente pico a un compuesto con 18 átomos de carbono y dos insaturaciones y el último pico no coincidió con ninguno de los estándares empleados, pero haciendo una gráfica de logaritmo de tiempo de retención versus número de átomos de carbono e interpolando en esta gráfica el logaritmo del tiempo de retención de este compuesto, parece ser que se trata de un compuesto de entre 19 y 21 átomos de carbono (que puede o no tener insaturaciones).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

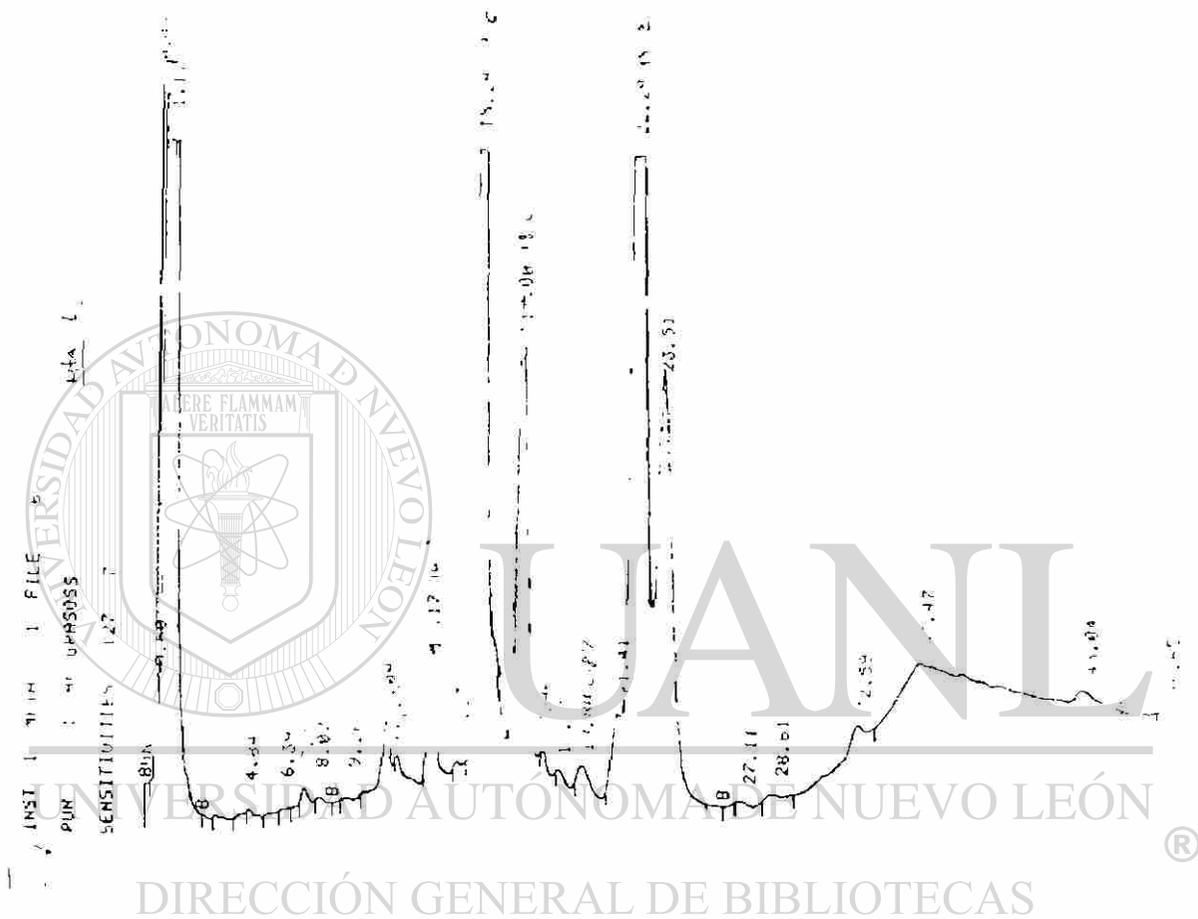


Figura N° 5. Análisis por cromatografía gas-líquido de la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

3. Condiciones de las técnicas de aglutinación e inmunoenzimática, para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de *N. brasiliensis*.

Para la determinación de anticuerpos contra la fracción lipídica de *N. brasiliensis*, se probaron 2 técnicas: la técnica de aglutinación del kaolín y un ensayo inmunoenzimático, utilizando a los lípidos de *N. brasiliensis* como antígeno pegado a las partículas y a la placa.

3.1 Condiciones óptimas de la técnica de aglutinación del kaolín para la determinación de anticuerpos contra la fracción lipídica de *N. brasiliensis*.

Con todas las condiciones ensayadas que se mencionaron en la sección de material y métodos, no se encontraron anticuerpos anti-lípidos. Los controles positivos y negativos nos indicaron que la técnica funcionó adecuadamente. Sin embargo, decidimos utilizar otra técnica más sensible (ELISA) para tratar de evidenciar la presencia de anticuerpos contra la fracción lipídica.

3.2 Condiciones de la técnica inmunoenzimática en fase sólida (ELISA), para la determinación de anticuerpos de ratón anti-fracción lipídica de *N. brasiliensis*.

Las condiciones que resultaron más apropiadas en la estandarización de la técnica de ELISA utilizando como antígeno la fracción lipídica, fueron las que se describen a continuación:

- a) Sensibilización de las placas. La cantidad de antígeno seleccionada fue de 20 μg de fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*, resuspendidos en un volumen de 50 μl , y el tiempo de incubación fue toda la noche a 37°C.
- b) Solución de lavado. La solución de lavado elegida fue PBS 0.1 M pH 7.2 con Tween 20 1:1000, 200 μl por pozo.
- c) Bloqueo de sitios de enlace no específicos. La solución bloqueadora utilizada fue leche descremada Svelty al 5% en PBS- Tween 20 1:1000, 200 μl por pozo, incubando la placa a 37°C durante 2 h.

d) Dilución de los sueros. Los sueros controles y problema se utilizaron a una dilución 1:50 en leche descremada al 1% en PBS-Tween 20 1:1000, 100 µl por pozo.

e) Dilución de anticuerpo conjugado. La dilución 1:1000 de los anticuerpos polivalentes de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados a la peroxidasa, se realizó en leche descremada al 1% en PBS-Tween 20 1:1000.

4. Adaptación de un ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos anti-fracción polisacárida II de *N. brasiliensis*.

Las condiciones descritas en el apartado de material y métodos fueron las que se adecuaron para llevar a cabo la detección de anticuerpos contra la fracción polisacárida II de *Nocardia brasiliensis*.

5. Obtención del extracto semipurificado de *Nocardia brasiliensis*.

5.1 Cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante obtenido al precipitar la fracción proteica de *N. brasiliensis* con sulfato de amonio.

Para calibrar la columna de cromatografía de filtración en gel se hizo lo siguiente:

Con la ayuda de dextrana azul con un peso molecular de 2000 kDa se determinó el volumen vacío de la columna empaquetada con Sephadex G-100; el cual fue de 35 ml. Posteriormente para conocer el volumen de elución, se pasaron a través de la columna las siguientes proteínas de peso molecular conocido: alcohol deshidrogenasa, citocromo c, anhidrasa carbónica, de 15, 16 y 29 kDa respectivamente, cuyos volúmenes de elución se muestran en la tabla II.

Tabla II

**Volúmen de elución de diferentes marcadores en una columna
empaquetada con Sephadex G-100.**

Marcador	Peso molecular	Volumen de elución	Número de fracción
Alcohol deshidrogenasa	150 kDa	45 ml	5
Anhidrasa carbónica	29 kDa	53 ml	9
Citocromo "c"	12.4 kDa	79 ml	22

Finalmente, también se pasó a través de la columna el sobrenadante (previamente dializado y tratado con DNasa) obtenido al precipitar con sulfato de amonio la fracción proteica de *N. brasiliensis*. Los valores de absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones se graficaron contra el volumen de elución de las mismas, y al igual que Vera, Salinas y cols (45, 46) identificamos 3 picos: un pico de peso molecular alto (P #1), otro con su máxima absorbancia cerca del marcador de 29 kDa (P #2) y otro cuya absorbancia fue muy alta pero de peso molecular bajo (P #3).

Las fracciones correspondientes al pico # 2 se analizaron mediante SDS-PAGE en gradiente 10% a 18% T, 2.7% C.

5.2 Análisis mediante SDS-PAGE, de las fracciones correspondientes al pico # 2, obtenidas de la cromatografía en Sephadex G-100.

El análisis de las fracciones que se obtuvieron luego de filtrar el sobrenadante obtenido de la fracción proteica de *N. brasiliensis* a través de la

columna empaquetada con Sephadex G-100 se hizo mediante SDS-PAGE en gradiente de 10-18% y se presenta en la figura N° 6. En los carriles 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se observa mediante la tinción con azul de Coomassie la presencia de la banda (cerca al marcador de peso molecular de 24 kDa) correspondiente a la proteína de 24 kDa (p24) de *Nocardia brasiliensis*.

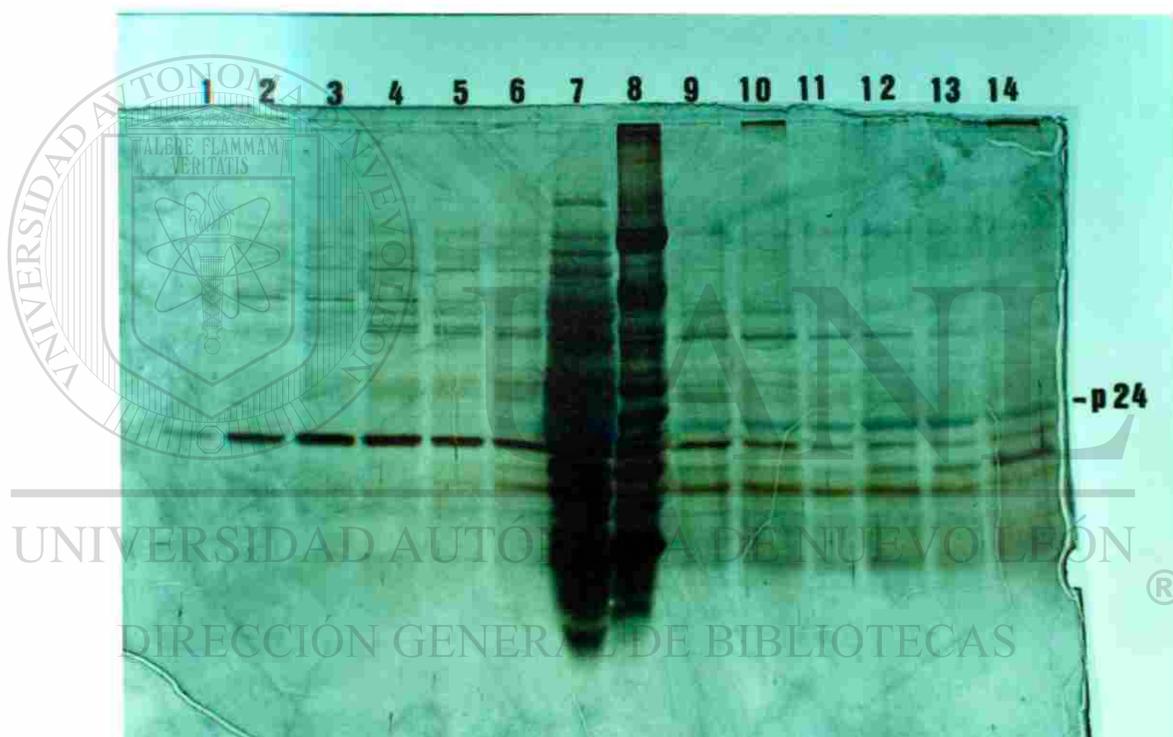


Figura N° 6. Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente 10-18% de las fracciones obtenidas al filtrar por Sephadex G-100. Carril 1-6 Fracciones de la 3 a la 8. Carril 7 Fracción proteica de *N. brasiliensis*. Carril 8 Marcadores de bajo peso molecular. Carril del 9-14 Fracciones de la 9 a la 14. Tinción con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

6. Determinación de la respuesta de anticuerpos mediante la técnica de ELISA en sueros de ratones inmunizados con las fracciones de *N. brasiliensis* (dosis máximas).

6.1 Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica de *Nocardia brasiliensis*.

Se detectó la presencia de anticuerpos en los ratones inmunizados con la fracción proteica sin AIF (a los 45 días) y con AIF (desde los 30 días). Además los sueros de los ratones inmunizados con la fracción polisacárida I mostraron valores de absorbancia de 0.5 a 1.3, desde los 30 días, aún sin AIF, lo que significa un nivel de anticuerpos elevado contra la fracción proteica. Ver figura N° 7 y N° 8a.

6.2 Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

Como lo muestran las figura N° 9 y N° 10a no se detectó la presencia de anticuerpos anti-lípidos en los sueros de los ratones inmunizados con esta fracción, ni en aquéllos inmunizados con las otras fracciones.

6.3 Determinación de la respuesta de anticuerpos contra la fracción polisacárida II de *Nocardia brasiliensis*.

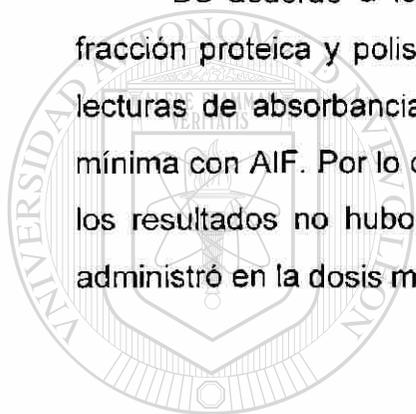
Se observó que hubo respuesta de anticuerpos a los 45 días en los ratones inmunizados con la fracción polisacárida II con y sin AIF. Sin embargo la mayor respuesta de anticuerpos anti-fracción polisacárida II, la mostraron los sueros de los ratones inmunizados con la fracción polisacárida I emulsificada con AIF. Ver figuras N° 11 y N° 12a.

6.4 Determinación de la respuesta de anticuerpos contra el extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.

Los valores de absorbancia más altos contra el extracto semipurificado se observó en los sueros de los ratones inmunizados con las fracciones polisacárida I (con y sin AIF), proteica (con y sin AIF) y polisacárida II (con AIF), como lo muestran las figuras N° 13 y N° 14 a.

7. Efecto de la dosis máxima y mínima de antígeno.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar que en la fracción proteica y polisacárida I, no hubo diferencias significativas en cuanto a lecturas de absorbancia cuando el antígeno se administró en dosis máxima o mínima con AIF. Por lo que respecta a la fracción lipídica como ya se observa en los resultados no hubo respuesta de anticuerpos, aún cuando el antígeno se administró en la dosis máxima con AIF. Ver las figuras 8, 10, 12 y 14.

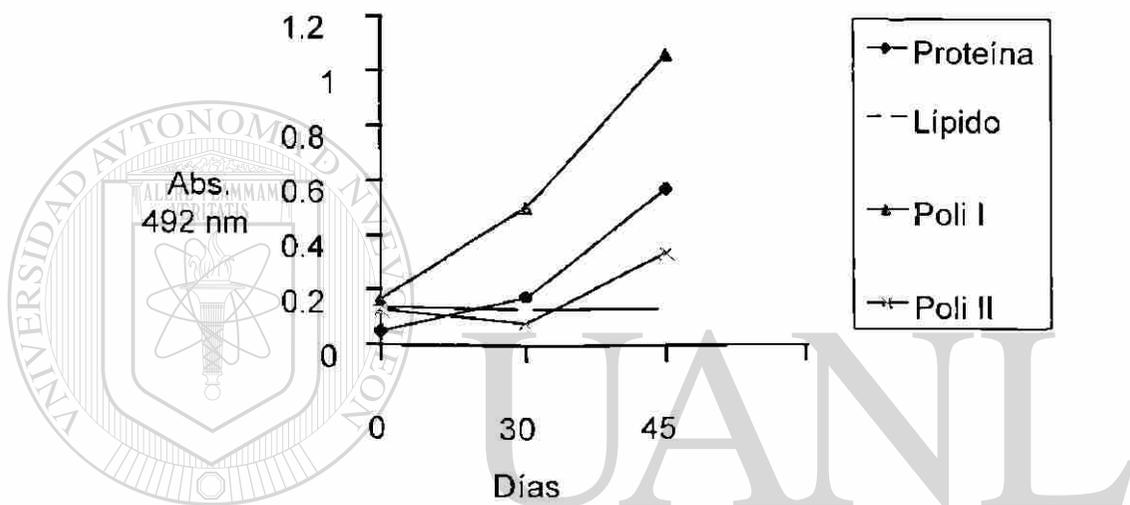


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura N° 7. Respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 µg/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos sin AIF.

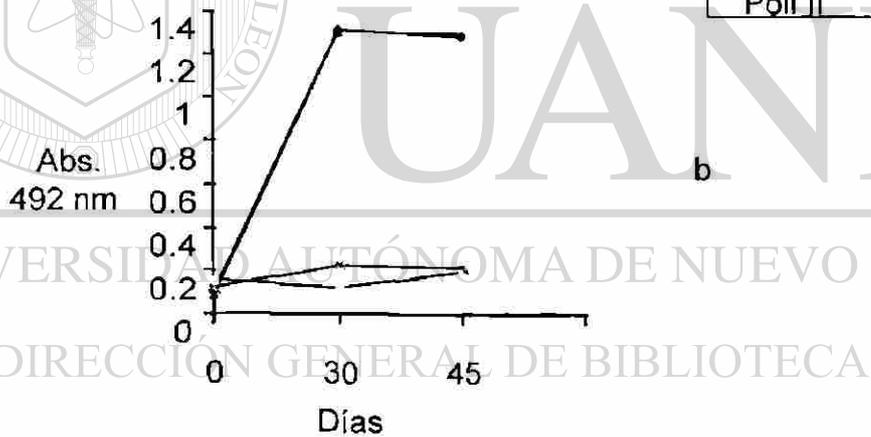
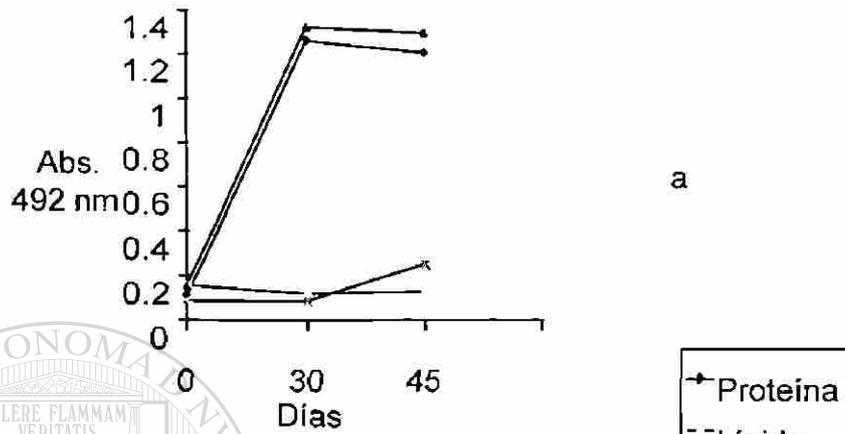


Figura N° 8. Respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica en ratones BALB/c inmunizados con: a) “dosis alta” (75 µg/ratón) y b) “dosis baja” (7.5 µg/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos emulsificados con AIF.

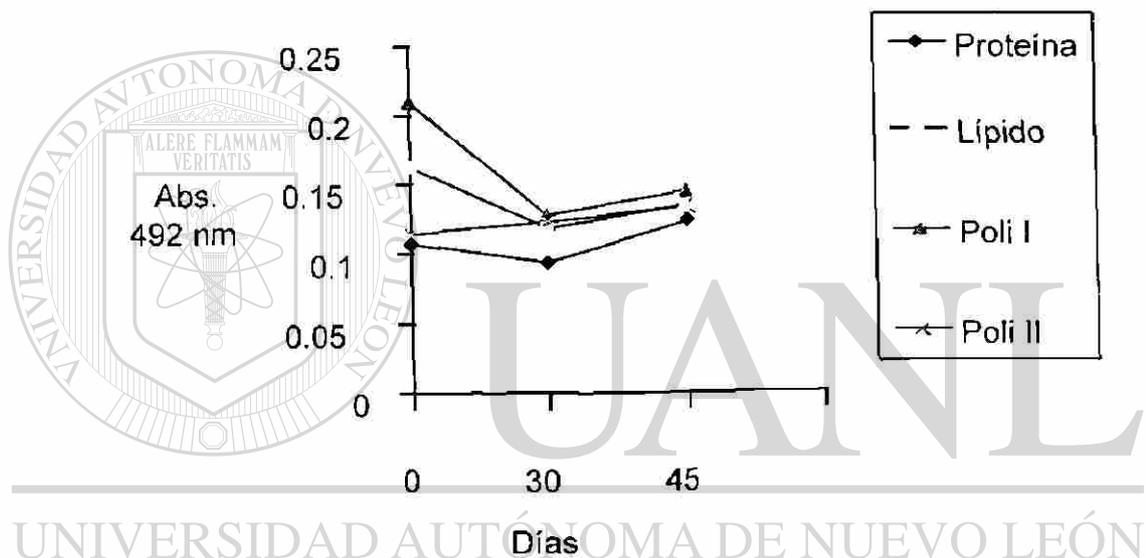


Figura N° 9. Respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 μ g/ratón), de los antígeno homólogo y heterólogos sin AIF.

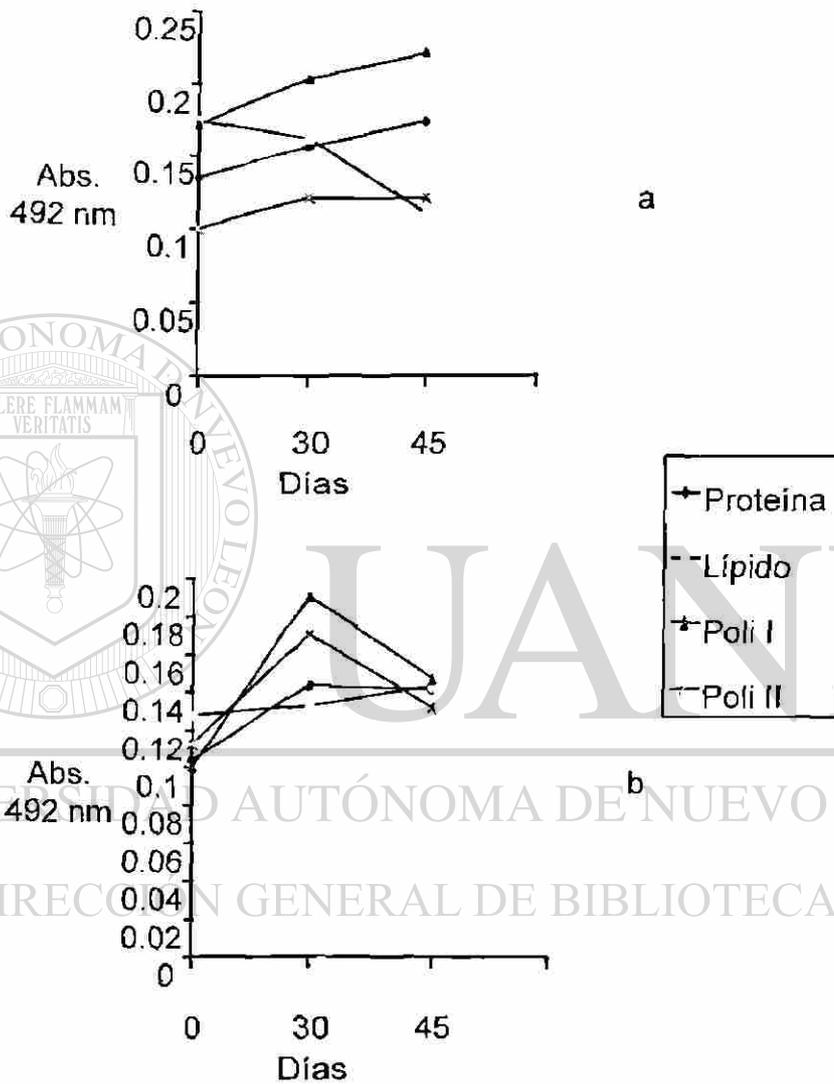
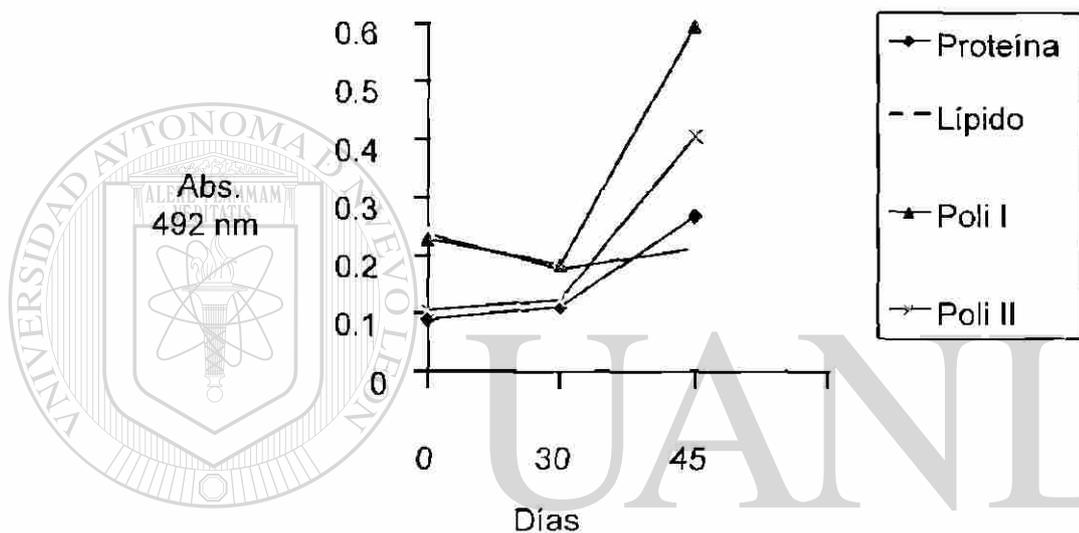


Figura N°10. Respuesta de anticuerpos contra la fracción lipídica en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 µg/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 µg/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos emulsificados con AIF.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura N° 11. Respuesta de anticuerpos contra la fracción polisacárida II en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 µg/ratón), de los antígenos homólogo y heterólogos sin AIF.

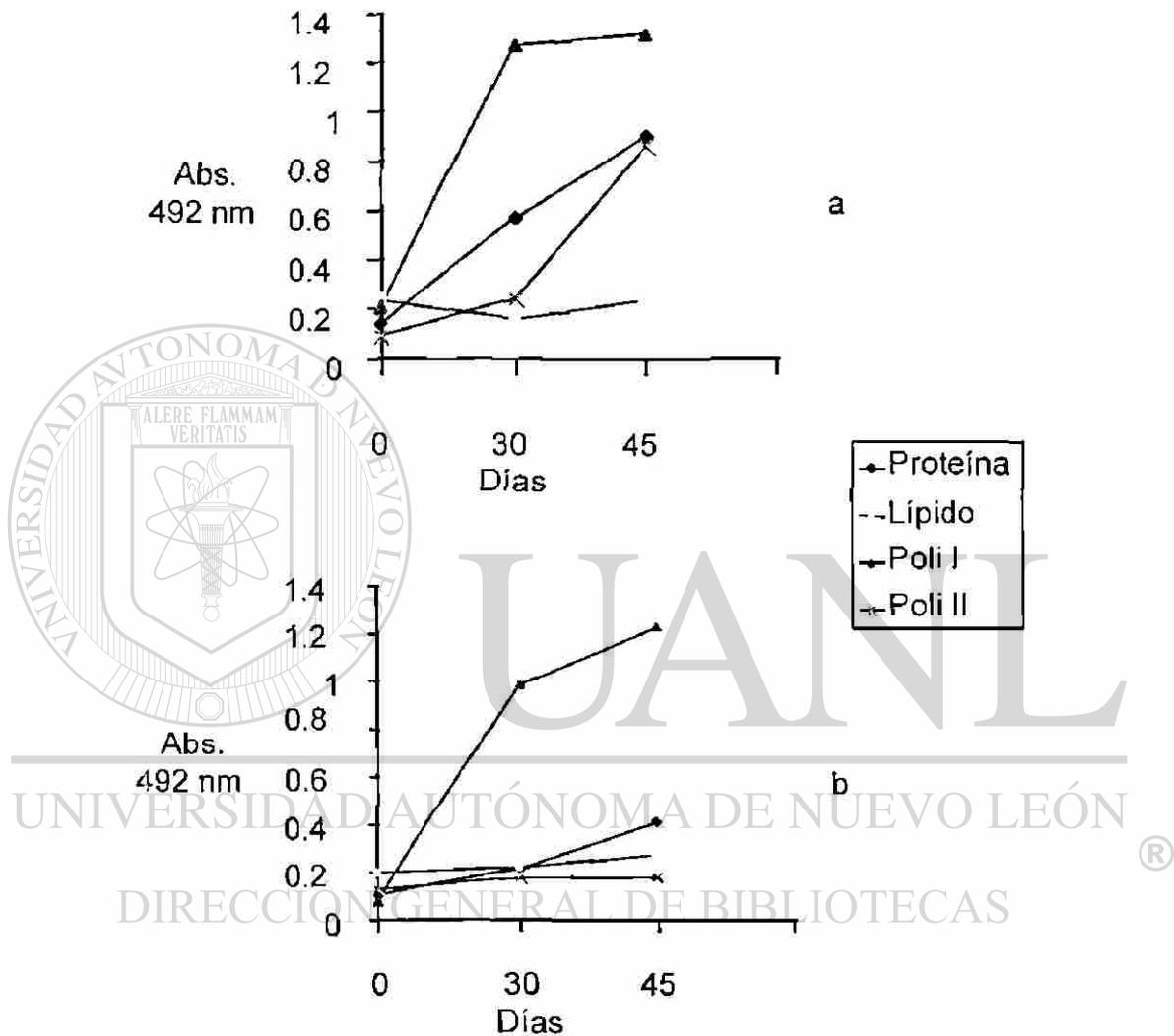
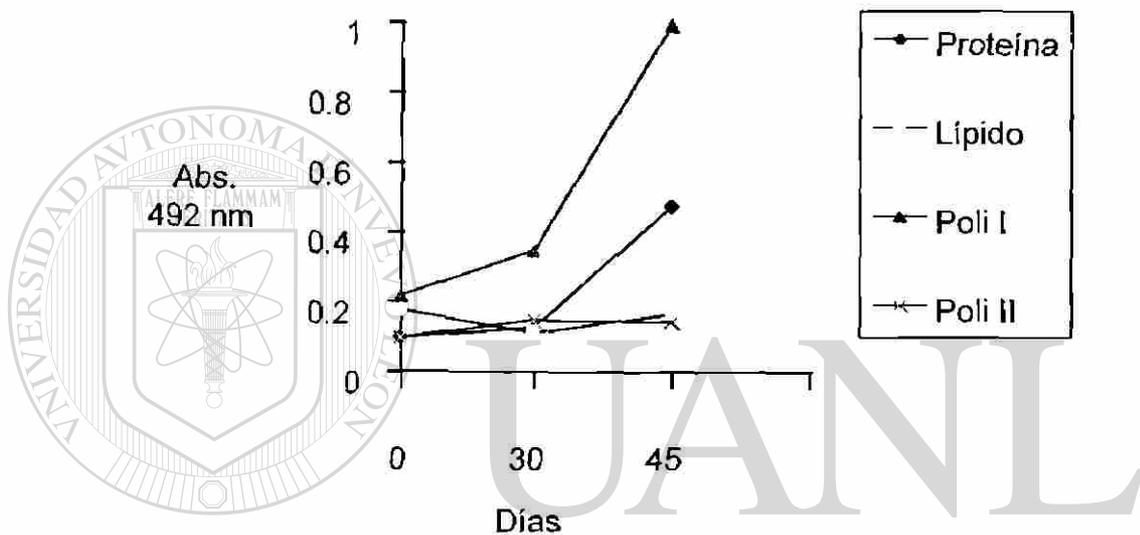


Figura N°12. Respuesta de anticuerpos contra la fracción polisacárida II en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 µg/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 µg/ratón), de los antígenos homólogos y heterólogos emulsificados con AIF.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura N° 13. Respuesta de anticuerpos contra el extracto semipurificado en ratones BALB/c inmunizados con "dosis alta" (75 µg), de los antígenos heterólogos sin AIF.

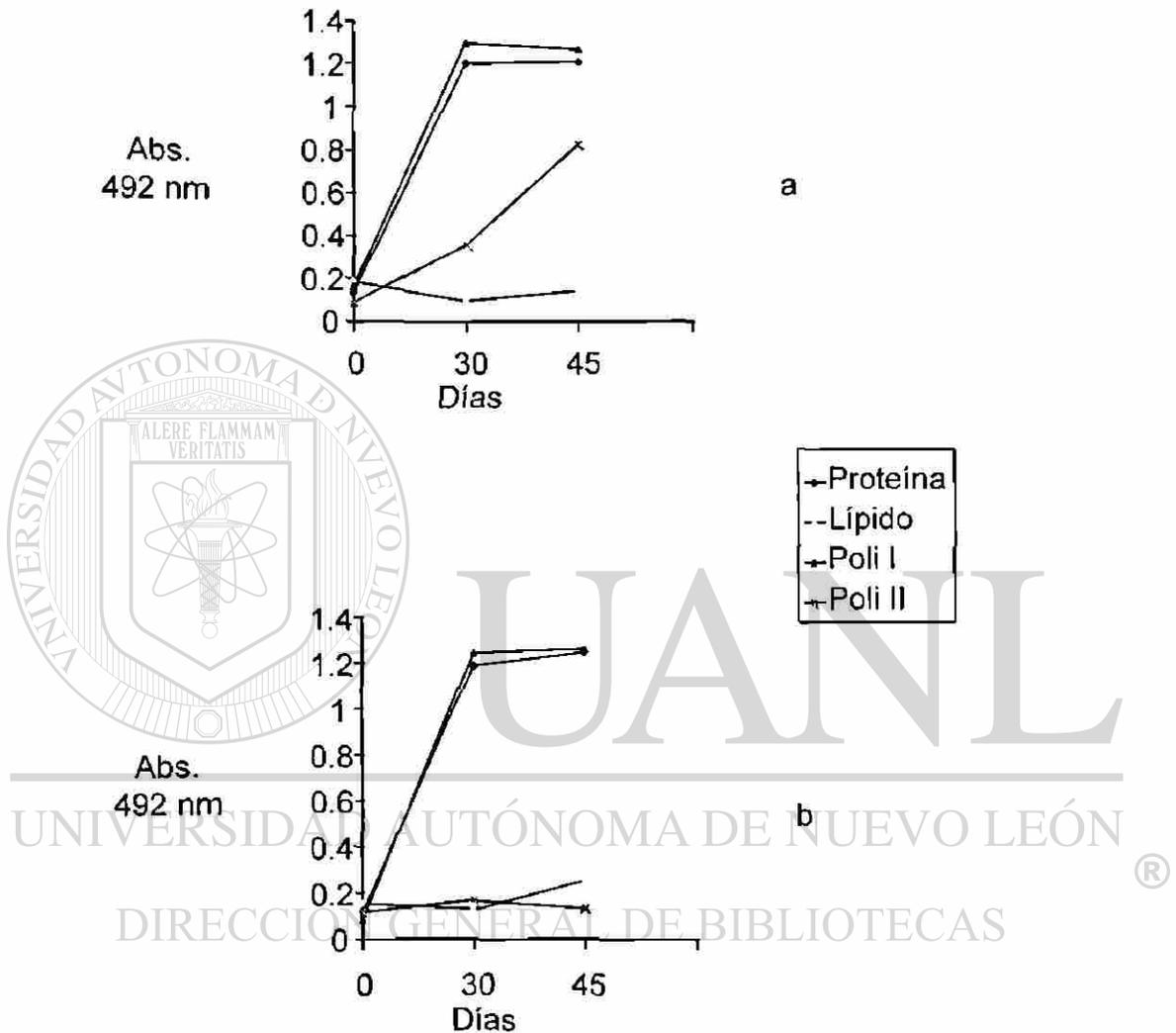


Figura N° 14. Respuesta de anticuerpos contra el extracto semipurificado en ratones BALB/c inmunizados con: a) "dosis alta" (75 µg/ratón) y b) "dosis baja" (7.5 µg/ratón), de los antígenos heterólogos emulsificados con AIF.

VI. DISCUSION

Se han realizado diversas investigaciones en las cuales se ha estudiado tanto la respuesta celular como humoral hacia diferentes antígenos de *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis* pero principalmente con fines diagnósticos (2, 3, 16, 29, 30, 41), aunque también se ha estudiado el papel de estos antígenos en los mecanismos de patogenicidad bacteriana y en los mecanismos de resistencia del hospedero (18, 19, 22, 25, 31).

En el presente trabajo, obtuvimos 4 fracciones de *Nocardia brasiliensis* y mediante las técnicas de determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos utilizadas (Bradford y Dubois respectivamente) encontramos que el extracto celular deslipidizado de *Nocardia brasiliensis* que ha sido llamado fracción "proteica" en éste y en otros trabajos de tesis (7, 9, 45) está constituido principalmente por carbohidratos. Esta fracción estudiada anteriormente en el Departamento de Inmunología, se había manejado como un extracto proteico, pero es importante resaltar que la técnica de cuantificación de proteínas empleada en esos trabajos fue la de Lowry, la cual se basa en 2 reacciones: la primera con el sulfato de cobre en medio alcalino y la segunda con el reactivo de Folin-Ciocalteu, con la cual interfieren los azúcares reductores. En cambio en el presente trabajo se utilizó el método de Bradford (6), en el cual no hay estas interferencias, lo que puede explicar en parte el porque de la diferencia en concentración de proteína detectada por un método y otro.

El hallazgo no esperado de tener más carbohidrato en el extracto "proteico" de *Nocardia brasiliensis*, nos permitirá en el futuro diseñar una metodología más adecuada para aislar antígenos genuinamente proteicos, aunque es importante mencionar que hasta hace tiempo, la mayoría de los intentos para purificar proteínas de bacterias estrechamente relacionadas con

Nocardia, como son las Micobacterias, no han eliminado polisacáridos que pueden provenir de la pared celular o citoplasma de la célula y muchas fracciones llamadas proteicas tienen un alto contenido de polisacárido (11).

En este trabajo, se obtuvieron 2 fracciones enriquecidas en carbohidratos a las que denominamos arbitrariamente polisacárido I y polisacárido II. Comparando la fracción polisacárida I, con la fracción polisacárida II, nuestra aportación de obtener la fracción polisacárida II a partir del extracto "proteico" tiene algunas ventajas: el tiempo requerido para la obtención del antígeno disminuye; se reduce un poco el costo total del proceso, debido a que la cantidad de solvente empleada es mínima y el rendimiento es mejor, ya que, a partir de una misma cosecha de bacterias podemos obtener 3 antígenos: la fracción lipídica, la fracción "proteica" y la fracción polisacárida II; en cambio con la técnica de Zamora y Bojalil (51) unicamente obtenemos el antígeno polisacárido I. Es por ello que la técnica empleada por nosotros para la obtención del polisacárido II puede representar un método alternativo adecuado para la obtención en mayor proporción, y en un tiempo más corto, de este tipo de biomoléculas.

En este estudio encontramos respuesta de anticuerpos contra la fracción proteica al igual que Gupta y cols. (18) y a diferencia de lo reportado por ellos, no detectamos anticuerpos contra la fracción lipídica pero sí contra la fracción polisacárida. Es importante mencionar que, las técnicas que emplearon para la determinación de anticuerpos anti-proteínas, anti-lípidos y anti-polisacáridos, son de menor sensibilidad que las utilizadas por nosotros. Además debemos aclarar que estos investigadores no reportan la caracterización de las fracciones utilizadas en la inmunización.

Se sabe que los antígenos de naturaleza proteica generalmente son mejores inmunógenos que los lípidos y carbohidratos (1, 39), por lo cual no fue

extraño que hubiera respuesta de anticuerpos contra la fracción "proteica" de la bacteria.

En este trabajo se encontró que la fracción lipídica no indujo anticuerpos cuantificables por las técnicas de aglutinación del kaolín (43) y de ELISA (que indica o la falta de anticuerpos o una concentración por abajo de los niveles de sensibilidad de las técnicas empleadas, aunque esta posibilidad es más remota), lo cual contrasta con los datos publicados por Gupta y cols. Esta diferencia pudiera deberse a que ellos emplearon fosfolípidos totales como fracción lipídica, además de que el estudio se realizó con *Nocardia asteroides*.

Por lo que respecta al análisis de la fracción lipídica, realizado mediante cromatografía de gases, se encontraron ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, de que, en el género *Nocardia*, los ácidos grasos característicos liberados de los ácidos micólicos, por pirólisis-cromatografía de gas varían en tamaño de 12 a 18 átomos de carbono, y que esos ácidos grasos pueden estar saturados o contener dobles ligaduras (5).

Con respecto a la respuesta de anticuerpos inducida por la fracción polisacárida I, nos dimos cuenta que resultó mejor que la fracción polisacárida II obtenida por nosotros a partir del extracto "proteico". Un hallazgo que merece atención es que la fracción polisacárida I de Zamora y Bojalil contiene la proteína de 24 kDa (p24) de *Nocardia brasiliensis* (la presencia de p24 se observa en un gel de poliacrilamida con SDS; a pesar de ser considerada una proteína, llama la atención su peculiar tinción con azul de Coomassie y su falta de reacción con nitrato de plata, lo que puede sugerir que contenga otro tipo de componentes en su estructura, como los carbohidratos, que no permitan la unión del nitrato de plata a la proteína), que es una de las proteínas que se ha identificado como inmunodominante tanto en sueros de pacientes con micetoma, como en sueros de ratones inmunizados o infectados experimentalmente con esta bacteria (25, 35, 45) y esto explica en parte que los sueros de los ratones inmunizados con

esa fracción, mostrarán una concentración alta de anticuerpos anti- p24, similar o mayor (cuando se administró el antígeno con y sin AIF respectivamente) a la concentración inducida en los ratones inmunizados con el extracto “proteico”.

De acuerdo con los datos experimentales de este trabajo de tesis es claro que si queremos inducir anticuerpos anti-p24 es mejor usar como antígeno la fracción polisacárida I (obtenida de acuerdo a la modificación de la técnica de Zamora y Bojalil). Sin embargo una ventaja con posible utilidad es que a diferencia de la fracción polisacárida I, la fracción polisacárida II no contiene el antígeno inmunodominante p24 y ello puede servir para explorar en el futuro la explicación de esa inmunodominancia.

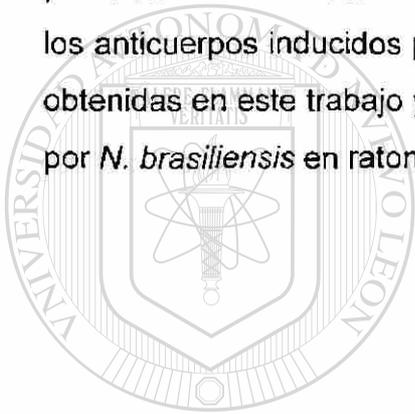
Más adelante se podrán realizar experimentos para demostrar si el antígeno inmunodominante p24 además de proteína contiene carbohidratos y si es así tratar de saber en que proporción se encuentran estos componentes en la molécula.

En el Departamento de Inmunología se tiene evidencia de que un anticuerpo monoclonal anti-p24 solo reacciona con este antígeno cuando está en condiciones desnaturalizantes (9). También en un trabajo previo (8) en el mismo departamento se demostró que p24 es digerida por tripsina, pero sólo forma 2 fragmentos durante 2 horas de digestión. Estos datos se obtuvieron utilizando el extracto “proteico” como fuente del antígeno p24, de donde resultaría interesante repetir esos experimentos (la reacción con el anticuerpo monoclonal y la digestión con tripsina), pero empleando la fracción polisacárida I como fuente del antígeno inmunodominante p24.

Otro dato interesante con respecto a la respuesta de anticuerpos inducida por la fracción polisacárida I es que, aunque la fracción proteica posee mayor contenido de carbohidratos que de proteínas y en esta fracción también se

encuentra la proteína inmunodominante de 24 kDa, hay una respuesta de anticuerpos contra ella, pero más baja que la despertada contra la fracción polisacárida I (aún sin emulsificar esta fracción con AIF). Quizá esto sugiera que pueda existir una relación entre la presencia y proporción de la proteína inmunodominante y de los carbohidratos y que actúen en conjunto para despertar una buena respuesta de anticuerpos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio consideramos que será de gran utilidad el realizar una caracterización más fina de la fracción polisacárida I de *Nocardia brasiliensis*, así como explorar la posible relación entre los anticuerpos inducidos por inmunización activa con las fracciones de *Nocardia* obtenidas en este trabajo y la protección contra el establecimiento de infecciones por *N. brasiliensis* en ratones.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VII. CONCLUSIONES

1.- La llamada fracción proteica es un extracto celular deslipidizado, constituido principalmente por carbohidratos.

2.- La proteína inmunodominante de 24 kDa de *Nocardia brasiliensis*, está presente también, en la fracción polisacárida I.

3.- No se detectaron anticuerpos anti-fracción lipídica de *Nocardia brasiliensis*.

4.- La fracción polisacárida I, induce la mayor respuesta de anticuerpos contra las fracciones proteica y polisacárida II de *Nocardia brasiliensis* y contra un extracto semipurificado de esta bacteria.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman and J.S. Pober. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2nd edition. W.B. Saunders Co.
2. Angeles, A.M. and A.M. Sugar. 1987. Rapid Diagnosis of Nocardiosis with an Enzyme Immunoassay. J. Infect. Dis. **155** (2): 292-296.
3. Angeles, A.M. and A.M. Sugar. 1987. Identification of a common Immunodominant Protein in Culture Filtrates of Three Nocardia Species and use in Ethologic Diagnosis of Mycetoma. J. Clin. Microbiol. **25** (12): 2278-2280.
4. Beaman, B.L., M.E. Gershwin, A. Ahmed, S.M. Scates and R. Deem. 1982. Response of (CBA/N x DBA/2) F1 Mice to *Nocardia asteroides*. Infect. and Immun. **35**: 111-116
5. Beaman, B.L. and L. Beaman. 1994. Nocardia Species: Host-Parasite Relationships. Rev. Clin. Microbiol. **7**: 213-264.
6. 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
7. Casillas, S.M. 1991. Determinación de anticuerpos humanos anti-*Nocardia brasiliensis* por un ensayo inmunoenzimático (ELISA). U.A.N.L. Fac. de Ciencias Biológicas. Tesis de Licenciatura.
8. Casillas, S.M. 1996. Estudio de la reactividad de sueros de pacientes con micetoma contra la proteína inmunodominante de 24 kDa de *Nocardia brasiliensis* digerida con tripsina. U.A.N.L. Fac. Medicina. Tesis de Maestría en Ciencias. 82 p.
9. Castro, C. M.A. 1995. Obtención de anticuerpos monoclonales para buscar la proteína inmunodominante de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*. U.A.N.L. Fac. de Medicina. Tesis de Maestría en Ciencias. 82p.
10. Conde, C., R. Mancilla, M. Fresan and L.Ortiz-Ortiz. 1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. Infect. Immun. **40**: 1218-1222.

11. Daniel, T.M. and B.W. Janicki. 1978. Mycobacterial Antigens: A Review of Their Isolation, Chemistry and Immunological Properties. *Microbiol. Rev.* **42**(1): 84-113.
12. Deem, R.L., B.L. Beaman and M.E. Gershwin. 1982. Adoptive transfer of Immunity to *Nocardia asteroides* in Nude Mice. *Infect. Immun.* **38**(3): 914-920.
13. Diezel, W., Kopperschlager, G., and Hofmann, F. 1972. An improved procedure for protein staining in polyacrilamide gel with a new type of Coomassie Brillant Blue. *Anal. Biochem.* **48**: 617-620.
14. Dubois, M., Gilles, K.A. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
15. Folb, P.I., A. Timmes and A. Horowitz. 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* **18**:459-466.
16. Gonzalez-Ochoa, A., H. Shibayama, D. Felix, and M. Anaya. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* **55**: 542-551.
17. Gonzalez-Ochoa, A. 1975. Geografia de las micosis profundas. *Rev. Inv. Salud pública.* **35**: 85-96.
18. Gupta, V., V. Pancholi, V.K. Vinayak and G.K. Khuller. 1985. Immunological responses to protein, carbohydrate and lipid fractions of *Nocardia asteroides* in mice. *J. Med. Microbiol.* **20**: 263-274.
19. Gupta, R., V. Pancholi, V. K. Vinayak, and G.K. Khuller. 1985. Protective immunity to systemic nocardiosis in mice immunized with cell extract antigens of *Nocardia asteroides*. *Med. Microbiol. Immunol.* **174**: 157-166.
20. Kates, M. 1975. Techniques of Lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. American Elsevier Publishing CO. U.S.A.
21. Kolk A.H. J., R. Evers, D.G. Groothuis, H. Gilis and S. Kuijper. 1989. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Specific Serotypes of *Mycobacterium avium* and the *Mycobacterium avium*-

Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum Complex. Infect. Immun. **57** (8): 2514-2521.

22. Krick, J. and J.S. Remington. 1975. Resistance to infection with *Nocardia asteroides*. J. Infect. Dis. **131**: 665-672.

23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.

24. Lehninger, A. L., D. L. Nelson, M. M. Cox. 1993. Principles of Biochemistry. 2nd edition. Worth Publishers.

25. López, T.E. 1995. Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución de la infección experimental por *Nocardia brasiliensis* en ratones. U.A.N.L. Fac. de Medicina. Tesis de Maestría en Ciencias. 108p.

26. Maniatis, T., et al., (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, B. 16,

27. Melendro, E.I., M.F. Contreras, C. Ximénez, A.M. Garcia and L. Ortiz-Ortiz. 1978. Changes in host resistance caused by *Nocardia brasiliensis* in mice: cross protection against *Listeria monocytogenes*. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. **57**: 74-81.

28. Merrill, C.R., M.L. Dunau and D. Goldman. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyarylamide gels. Anal. Biochem. **116**:201-207.

29. Ortiz-Ortiz, L., M.F. Contreras and L.F. Bojalil. 1972. Cytoplasmic antigens from *Nocardia* eliciting a specific delayed hypersensitivity. Infect. Immun. **5**: 879-882.

30. Ortiz-Ortiz, L., L.F. Bojalil and M.F. Contreras. 1972. Delayed Hypersensitivity to Polysaccharides from *Nocardia*. J. Immun. **108**: 1409-1413.

31. Ortiz-Ortiz, L., D.E. Parks, J. S. López and W.O. Weigle. 1979. B-Lymphocyte Activation with an Extract of *Nocardia brasiliensis*. Infect. Immun. **25**(2): 627-634.

32. Prasad A.S., E. DuMouchelle, D. Kuniuch and D. Oberleas. 1972. A simple fluorometric method for the determination of RNA and DNA in tissues. J. Lab. Clin. Med. **80**: 598-602.
33. Rico, G., R. Ochoa, A. Oliva, A. Gonzalez-Mendoza, S.M. Walker, and L. Ortiz-Ortiz. 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen specific B-cells. J. Immunol. **129**: 1688-1693.
34. Rippon, J.W. 1982. Mycetoma. Medical micology: the patogenic fungi and the patogenic actinomycetes. The W.B. Sauders Co. Philadelphia. Chapter 5, p. 79-114.
35. Salinas-Carmona, M.C., Vera, L., Welsh, O. and Rodríguez M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. Zbl. Bakt. **276**: 390-397.
36. Salinas-Carmona, M.C., O. Welsh, and S.M. Casillas 1993. Enzyme linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. J. Clin. Microb. **31**: 2901-2906.
37. Sandoval-Trujillo, H. 1993. Actinomicetos. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
38. Saul, A. 1983. Lecciones de Dermatología 10a Ed. Francisco Mendez Cervantes. México.
39. Sela, M. 1974. The Antigens. Vol I. Academic Press. USA.
40. Serrano, J.A. y A.H. Sandoval. 1992. Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos. 1a. Ed. Talleres Gráficos Universitarios. Venezuela.
41. Sugar, A.M., G.K. Schoolnik and D.A. Stevens. 1985. Antibody Response in Human Nocardiosis: Identification of Two Immunodominant Culture Filtrate Antigens Derived from *Nocardia asteroides*. J. infect. Dis. **151**(5): 895-901.
42. Supelco. 1996. Catálogo de productos para Cromatografía. Sigma-Aldrich p.22.

43. Takahashi, Y. 1962. Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatide and its clinical evaluation as a serodiagnostic test for tuberculosis. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **85**: 708-719.
44. Tsukamura, M. 1970. Relationship between *Mycobacterium* and *Nocardia*. *Japan J. Microbiol.* **14**: 187-195.
45. Vera, L. 1990. Aislamiento y purificación de dos antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis*. U.A.N.L. Fac. de Medicina. Tesis de Doctorado en Ciencias.
46. Vera-Cabrera, L., M.C. Salinas-Carmona, O. Welsh and M. Rodríguez. 1992. Isolation and Purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1183-1188.
47. Welsh-Lozano, O. 1991. Mycetoma Current Concepts in Treatment *Int. J. Dermatol.* **30**(6): 387-398.
48. Williams, T., M.E., Sharpe and J.G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md. p. 2333-2362.
49. Ximénez, C., E.I. Melendro, A. Gonzalez-Mendoza, A.M. García, A. Martínez, and L. Ortiz-Ortiz. 1980. Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathologia.* **70**: 117-122.
50. Yanagihara D.L., V.L. Barr, C.V. Knisley, A.Y. Tsang, J.K. McClatchy and P.J. Brennan. 1985. Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Glycolipid Antigens for Identification of *Mycobacteria*. *J. Clin. Microbiol.* **21** (4): 569-574.
51. Zamora, A., L.F. Bojalil and F. Bastarrachea. 1963. Immunologically active polysaccharides from *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **85**: 5

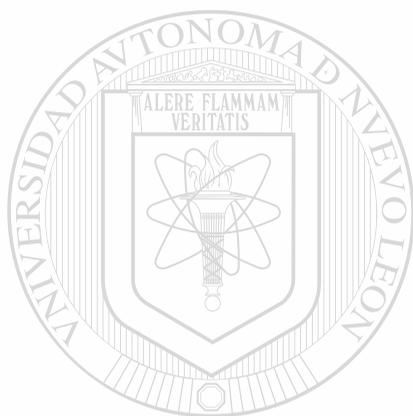
IX. APENDICES

APENDICE A

EQUIPO.

1. Agitador magnético Nuova II (THERMOLYNE)
2. Balanza analítica 2024MP (SARTORIUS)
3. Balanza granataria (SARTORIUS)
4. Baño a temperatura constante Modelo BMT-4 (MAPSA)
5. Bomba peristáltica (LKB)
6. Cámara para electroforesis (BIO-RAD)
7. Cámara para electroforesis (SIGMA)
8. Cámara para cromatografía en capa fina (SIGMA-ALDRICH)
9. Centrifuga eppendorf 5415 (BRINKMANN)
10. Centrifuga TJ-6 (BECKMAN)
11. Centrifuga Serofuga II (CLAY ADAMS)
12. Columna para cromatografía (WHEATON)
13. Cromatógrafo de gases (PERKIN ELMER)
14. Espectrofotómetro DU-6 (BECKMAN)
15. Fuente de poder Modelo 1000/500 (BIO-RAD)
16. Formador de gradientes Modelo 385 (BIO-RAD)
17. Incubadora (J.M. ORTIZ)
18. Incubadora con agitador. Dubnoff metabolic (GCA/PREC. SCI.)
19. Lámpara de luz ultravioleta Modelo 51438 (GELMAN SCIENCES INC.)
20. Liofilizadora (VIRTIS)
21. Microlector para ELISA BP-96 (DIAMEDIX)
22. Microscopio (ZEISS)
23. Mufla Modelo-JL (WEST INSTRUMENT CORPORATION)

24. Placas para ELISA Costar (BIO-RAD)
25. Potenciómetro 43 (BECKMAN)
26. Refrigerador. Ultra low (AMERICAN SCI. PROD.)
27. Refrigerador (KELVINATOR)
28. Rotavapor (BÜCHI)
29. Secador de geles (EPHORTEC)
30. Sonicador Modelo 450 (BRANSON)
31. Ultracentrífuga L8-70 M (BECKMAN)
32. Vortex mixer s/p (AMERICAN SCI. PROD.)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE B

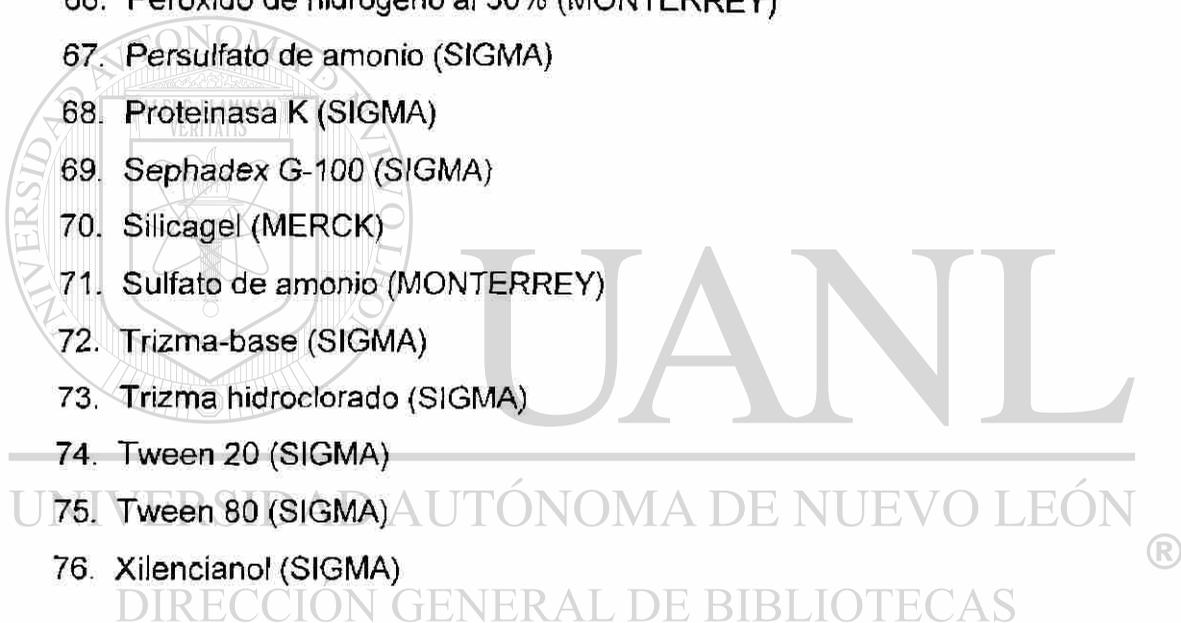
REACTIVOS QUIMICOS.

1. Acetona (BAKER)
2. Acetato de magnesio (MALLINCKRODT)
3. Acido acético glacial (MERCK)
4. Acido cítrico (MONTERREY)
5. Acido clorhídrico (MERCK)
6. Acido desoxirribonucleico (SIGMA)
7. Acido etilendiaminotetraacético (SIGMA)
8. Acido fosfomolibdico (SIGMA)
9. Acido maleico (SIGMA)
10. Acido nítrico (MERCK)
11. Acido perclórico (MERCK)
12. Acido sulfúrico (MERCK)
13. Acido tricloroacético (BAKER)
14. Acrilamida (SIGMA)

15. Agar de dextrosa Sabouraud (BIOXON)
16. Agarosa (SIGMA)
17. Albúmina bovina (SIGMA)
18. Alcohol deshidrogenasa (SIGMA)
19. Amberlita XAD-7 (SIGMA)
20. Anhidrasa carbónica (SIGMA)
21. Anticuerpo polivalente anti-gamma de ratón desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA).
22. Azida de sodio (FISHER)
23. Azul de bromofenol (SIGMA)
24. Azul de Coomassie G-250 (LKB)
25. Azul de Coomassie R-250 (SIGMA)
26. Azul dextrana (SIGMA)

27. 2-Mercaptoetanol (SIGMA)
28. Bicarbonato de sodio (MERCK)
29. Bromuro de etidio (SIGMA)
30. Carbonato de sodio (FISHER)
31. Citocromo "c" (SIGMA)
32. Cloroformo (BAKER)
33. Cloruro de bario (MONTERREY)
34. Cloruro de potasio (MERCK)
35. Cloruro de sodio (MERCK)
36. Desoxirribonucleasa I (SIGMA)
37. Dicromato de potasio (MERCK)
38. Dihidrogeno fosfato de potasio (MERCK)
39. Duodecilsulfato de sodio (Sigma)
40. Esfingomiolina (SIGMA)
41. Etanol (MERCK)
42. Eter etílico (MERCK)
43. Fenol (MERCK)
44. Fosfatidilcolina (SIGMA)
45. Fosfatidilinositol (SIGMA)
46. Fosfato dibásico de sodio anhidro (MONTERREY)
47. Fosfato de sodio monobásico (MONTERREY)
48. Formol (MONTERREY)
49. Galactosa (FISHER)
50. Glicerol (SIGMA)
51. Glicina (SIGMA)
52. Glucosa (BAKER)
53. Hidróxido de amonio (MONTERREY)
54. Hidróxido de sodio (MERCK)
55. Kaolín (SIGMA)
56. Leche descremada "Svelty" (NESTLE)

57. Lecitina/esfingomielina (SIGMA)
58. Marcadores de peso molecular stock No SDS-7 L Dalton Marck (SIGMA)
59. Medio infusión cerebro corazón (DIFCO)
60. Metanol (MERCK)
61. Nitrato de plata (MERCK)
62. N,N,'-metilen-bis-arilamida (SIGMA)
63. N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino (SIGMA)
64. O-fenilendiamina dihidroclorada (SIGMA)
65. Papel Whatman No 1
66. Peróxido de hidrógeno al 30% (MONTERREY)
67. Persulfato de amonio (SIGMA)
68. Proteinasa K (SIGMA)
69. Sephadex G-100 (SIGMA)
70. Silicagel (MERCK)
71. Sulfato de amonio (MONTERREY)
72. Trizma-base (SIGMA)
73. Trizma hidroclorado (SIGMA)
74. Tween 20 (SIGMA)
75. Tween 80 (SIGMA)
76. Xilencianol (SIGMA)



APENDICE C

ABREVIATURAS

1. AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
2. Abs	Absorbancia
3. BHI	Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion)
4. °C	Grados centígrados
5. %C	% de agente entrecruzador (bis-acrilamida)
6. c/a	con adyuvante
7. cm	Centímetros
8. DNA	Acido desoxirribonucleico
9. EDTA	Acido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
10. ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
11. g	Unidad de gravedad
12. g	Gramos
13. h	Hora
14. IgA	Inmunoglobulina A
15. IgG	Inmunoglobulina G
16. Ig M	Inmunoglobulina M
17. H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
18. H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
19. kDa	Kilodalton
20. l	Litro (s)
21. µg	Microgramo (s)

22. mg	Miligramo (s)
23. min	Minuto (s)
24. ml	Mililitro (s)
25. mM	Milimolar
26. M	Molar
27. N.	<i>Nocardia</i>
28. N	Normal
29. ng	Nanogramos
30. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
31. OPD	Ortofenilendiamina dihidroclorada
32. P	Pico
33. PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato (Phosphate Buffered Saline)
34. pH	Potencial de Hidrógeno
35. Poli I	Polisacárido I
36. Poli II	Polisacárido II
37. SDS	Lauril sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)
38. SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
39. %T	Porcentaje de Acrilamida total
40. TEMED	N, N, N', N', Tetrametiletilendiamina
41. TME	Amortiguador Tris-Acido maleico-EDTA (Tris-Maleic acid-EDTA)
42. Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
43. v	Voltios
44. v/v	Volumen sobre volumen

