



**"OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
PARA BUSCAR A LA PROTEINA INMUNODOMINANTE
DE 24 kDa EN LA SUPERFICIE DE *Nocardia brasiliensis*"**

POR:

MARIA DE LOS ANGELES CASTRO CORONA

TESIS PRESENTADA EN LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

MONTERREY N. L. MAYO, 1995

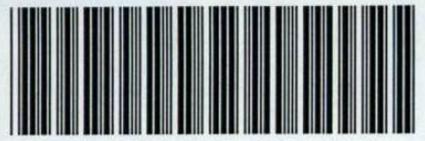
TM

QR82

.N6

C3

c.1



1080071649



**"OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA BUSCAR
A LA PROTEINA INMUNODOMINANTE DE 24 kDa EN LA
SUPERFICIE DE *Nocardia brasiliensis*."**

POR

MARIA DE LOS ANGELES CASTRO CORONA

TESIS PRESENTADA EN LA

FACULTAD DE MEDICINA

DE LA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA

LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

Monterrey, N.L.

Mayo, 1995.

TM
QR821
146
C3



**"OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA BUSCAR
LA PROTEINA INMUNODOMINANTE DE 24 kDa EN LA
SUPERFICIE DE *Nocardia brasiliensis*."**

Aceptada por la comisión de tesis de la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

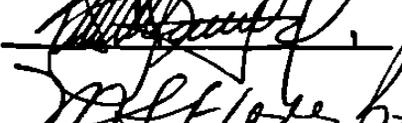
Dr. Mario César Salinas Carmona.



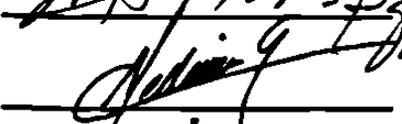
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza.



Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla.



Dra. Ma. del Socorro Flores de C.



Dr. Carlos E. Medina de la Garza.



**"OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA BUSCAR
LA PROTEINA INMUNODOMINANTE DE 24 kDa EN LA
SUPERFICIE DE *Nocardia brasiliensis*"**

Presentada por: MARIA DE LOS ANGELES CASTRO CORONA

Este trabajo fue realizado en el departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. con la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona y la coasesoría del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra. Con el apoyo de Conacyt proyecto No. P228CCOX-891843.

Asesor



Dr. Mario César Salinas Carmona.

Coasesor



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

DEDICATORIA

A la mujer , abuela,madre,amiga, y doctora, a quien solo conocí a través de mi madre y sé que es la autora de lo que es mi familia.

Angeles Enriquez de Mondragón.

A los creadores de mi vida, la que disfruto intensamente. Gracias por confiar en mi y sobre todo por la libertad que me han brindado. Con todo mi amor.

**María de Jesús Corona Mondragón.
José Santos Castro Hernández.**

A el niño que vino y llena de vida y luz nuestros días más tristes y oscuros.

Pedro Daniel Torres Galbraith.

A mis hermanos quienes me obsequiaron todo aquello que ellos no pudieron disfrutar. Gracias. A pesar de la distancia siempre estan conmigo.

**Mario Millán Corona.
Elpidio Millán Corona.
Pablo G. Millán Corona.
Hilda Millán Corona.
Teresa Millán Corona.
Pablo R. Millán Corona.
Fernando Galbraith Pantoja.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por su excelente asesoría durante estos años. Por las lecciones de constancia y paciencia. Por sus magníficas clases, las que disfruto enormemente y siempre recuerdo con inmenso placer. Por confiar en mi para llevar a cabo este trabajo y por su esfuerzo para templar buenos profesionistas.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por su asesoría y por darme la oportunidad de trabajar en el departamento de Microscopía Electrónica.

A la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda, por su crítica aguda y precisa. Por el regalo más hermoso que me ha obsequiado su amistad.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, por sus acertados consejos, por la amistad. Por la lección de fortaleza que nos ha dado.

Al Dr. Carlos E. Medina de la Garza, por brindar espontáneamente ayuda a quien la necesita.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, por el apoyo a los estudiantes de postgrado. Por su carácter y disciplina.

A los maestros que participaron en nuestra formación de estos años y con los que siempre estaremos en deuda.

Dra. Herminia G. Martínez. Dra. Mirthala Moreno. Dr. Hugo. A. Barrera. Dra. Martha. Viader. QBP Enrique Ramírez B. Dr. Mario C. Salinas. Dra. Nohemi Waskman. Dr. Carlos E. Medina. Dr. Manuel Rodríguez. Biol. Ernest Khon. Dr. Julio Sepúlveda. Dr. Juan Manuel Solis. Dra. Nancy Fernandez. Dra. Guadalupe Zapiain. Dra. Alma Y. Arce. Dra. Ma. del Socorro Flores. M. en C. Eva Támez. M en C. Luz Isabel Pérez. M. en C. Guadalupe Moreno. M en C. Ricardo Acosta.

A las personas que estuvieron siempre conmigo y me apoyaron para continuar ante cualquier circunstancia, principalmente en las dificultades.

Ma. de Jesús, José, Tere, Elpidio, Pablo, Hilda, Fernando, Maritza, Roberto, Mónica, Gaby y Pedro Daniel. A ustedes debo gran parte de mis logros. Los amo.

A Silvia M. Casillas Quintana, por tu apoyo incondicional, por las lecciones de honestidad, nobleza y perseverancia. Siempre estarás en mis recuerdos.

A Luz Isabel Pérez Rivera, por compartir tus conocimientos con nosotros, por ofrecernos tu amistad y apoyo en momentos difíciles.

A Isabel, Conchita, Yoly y Velia, por conducir mis primeros pasos en el laboratorio.

A Angel Licon Trillo y Alma Isabel Ramos Cano, porque su llegada ha sido una transfusión de conocimientos, que han enriquecido las discusiones académicas haciéndolas muy productivas. Por compartir su amplia experiencia con nosotros.

A la familia Nocárdica por su comprensión, tolerancia y compañerismo. Lucio, Isabel, Silvia, Angel, Irma. Alma Isabel, Vero y Luis Edgar.

A Martha Contreras Sifuentes, Ana Catalina Elizondo Fraire y Ana Laura Marines Castillo. Por su amistad incondicional.

A la Familia Elizondo Fraire mi eterna gratitud. A Anita Fraire de Elizondo porque con su vitalidad y alegría, es un ejemplo a seguir.

A la Familia Díaz Pérez y Perez Rivera, a Sergio y Marisol, a la familia del 666: Ana Laura, Ana Ma., Marisa, Marina, Fely, Irmita y Blanca y a la familia del 320: Silvia, Eva, Rosalba y Lidia. Gracias por ofrecerme su cariño y adoptarme en momentos difíciles.

A las personas que colaboraron en forma desinteresada.

Al personal del departamento de Inmunología. Luis A. Isabel, Hector, Velia, Verónica, Claudia, Lucy, Silvia N., Ernesto, Aracely, Lizzy, Paty, Marthita, Bety, Francisco, Santana, Reynaldo y Carlitos.

A Don Juan y Don Manuelito, por cuidar siempre de nosotros.

A mis compañeros de Inmunología. Eva, Roberto, Silvia M., Angel, Irma A., Luis Edgar, Alma Isabel, Sonia, Sergio, Marisol, Ana Cristina, Abdias y Juan Carlos. Por las aventuras que compartimos cada día.

A la Sra. Ma de la Luz y a Rosy por la preparación de cortes para microscopía. A Raquel, Lupita y Ricardo por sus sugerencias. A Victor y al QBP. José Ruiz Ordoñez por el material fotográfico. Personal de Histología y Microscopía Electrónica.

A Adriana Pizaña y a la Maestra Rita Rositas del departamento de Microbiología, por su ayuda con las muestras y fotografías de Nocardia.

A mis compañeros de la ULIEG, porque siempre están dispuestos a compartir sus conocimientos. Especialmente a Claudio, Rocío, Augusto, Normita y Ataulfo quienes además me otorgaron su amistad.

A Bladys y Evangelina del departamento de Embriología.

A Silvia, Mercedes, Alicia, Mónica, Rosy, Paty y Alejandro del departamento de Reumatología.

A Lulú y Javier del departamento de Informática por su asesoría en la transcripción del manuscrito.

A los Drs. Julio Sepúlveda, Juan Manuel Solís y Oliverio Welsh por facilitarme el equipo necesario para imprimir esta tesis. A sus secretarías Imelda, Alicia, Nora, Paty y Rosy por brindarme su ayuda durante la impresión de este escrito.

A las secretarías de Postgrado, Socorrito, Normita, Sonia y Paty. Gracias por su atención siempre amable.

A los que han sido una influencia positiva en mi vida y que además son los mejores amigos que he encontrado.

A mi familia, por el amor que existe entre nosotros.

A mis tías Isabel y Petra. Por su comprensión e infinito cariño.

Dr. Eduardo González-Sicilia Cotter. Quien me inició en la profesión que ahora disfruto.

Dr. Alfredo Cortéz Arcos y Dr. Enrique Pinzón Estrada. Con ustedes nació mi interés por la investigación.

Dr. Rich. Zapata González. Con quien descubrí nuevos horizontes.

Drs: Rafael Maltrana y Carlos López Lizano. Con quienes compartí años inolvidables.

Dras: Martha Esparza Moguel, Marta Mendez Garnica y Violeta Medina Crespo. Con las que poco a poco he crecido como mujer.

Dr. Carlos E. Medina de la Garza. Por defender la libertad del ser y por tu lucha constante contra lo establecido. Siempre te recordaré.

A Jean y Alain, porque con ellos he crecido como ser humano.

INDICE GENERAL

I.	RESUMEN.	1
II.	INTRODUCCION.	3
	OBJETIVOS.	13
III.	MATERIAL Y METODOS.	14
1.	Obtención del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> .	14
1.1	Obtención de la cepa bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> .	14
1.2	Obtención del inóculo.	14
1.3	Obtención del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> .	15
2.	Obtención del extracto celular de <i>M. tuberculosis</i> .	16
3.	Análisis electroforético de los extractos celulares.	16
3.1	Análisis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), de los extractos celulares de <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. asteroides</i> , y <i>M. tuberculosis</i> .	17
3.2	Tinción de geles.	19
4.	Obtención de anticuerpos monoclonales anti-proteína de 24 kDa de <i>N. brasiliensis</i> .	20
4.1	Medios de cultivo y reactivos complementarios.	20
4.2	Inmunización de ratones.	22
4.3	Congelación y descongelación de células de mieloma.	24
4.4	Preparación de células de mieloma para fusión.	25
4.5	Determinación de concentración óptima de suero bovino fetal para células de mieloma y células de bazo de ratón BALB/c.	25
4.6	Determinación de sensibilidad a aminopterina de las células de mieloma murino NS-1.	27
4.7	Preparación de células para fusión.	27
4.8	Fusión celular.	28
4.9	Identificación de hibridomas productores de anticuerpos.	28
4.10	Clonación de hibridomas productores de anticuerpos.	29
5.	Análisis de sobrenadantes para producción de anticuerpos.	30
5.1	Ensayo inmunoenzimático en papel de nitrocelulosa (Immuno-dot).	30
6.	Análisis de anticuerpos monoclonales.	31
6.1	Demostración de clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína de 24 kDa de <i>N. brasiliensis</i> mediante inmunoelectrotransferencia (Western-blot).	31
6.2	Determinación del isotipo y subisotipo de los anticuerpos monoclonales mediante una técnica enzimática (E.L.I.S.A.) en fase sólida.	32

6.3	Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos.	34
7.	Inmunocitoquímica con fluorescencia para buscar a la proteína de 24 kDa en la superficie de <i>N. brasiliensis</i> .	34
7.1	Preparación de la suspensión bacteriana.	34
IV.	RESULTADOS.	36
1.	Obtención del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> .	36
2.	Obtención del extracto celular de <i>M. tuberculosis</i> .	36
3.	Análisis de los extractos celulares.	37
4.	Determinación de la concentración óptima de SBF para células de mieloma y células de bazo de ratón BALB/c.	42
5.	Determinación de la sensibilidad a aminopterina por las células de mieloma murino NS-1.	44
6.	Preparación de células de mieloma para fusión.	45
7.	Obtención de células de bazo de ratón hiperinmune.	45
8.	Fusión celular.	45
9.	Análisis de sobrenadantes para producción de anticuerpos.	46
10.	Clonación de híbridos productores de anticuerpos mediante dilución limitante.	46
11.	Demostración de clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína de 24 kDa de <i>N. brasiliensis</i> .	49
12.	Determinación de isotipo y subisotipo.	49
13.	Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos.	53
14.	Inmunocitoquímica con fluorescencia para buscar a la proteína de 24 kDa en la superficie de <i>N. brasiliensis</i> .	54
V.	DISCUSION.	61
	Conclusiones.	69
	LITERATURA CITADA.	70
	APENDICE A. EQUIPO.	76
	APENDICE B. REACTIVOS QUIMICOS.	78
	APENDICE C. ABREVIATURAS.	81

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura No.1	Análisis del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> mediante SDS-PAGE.	39
Figura No.2	Análisis del extracto celular de <i>N. asteroides</i> mediante SDS-PAGE.	40
Figura No.3	Análisis del extracto celular de <i>M. tuberculosis</i> mediante SDS-PAGE.	41
Tabla I	Determinación de concentración óptima de suero bovino fetal para células de mieloma.	42
Tabla II	Determinación de concentración óptima de suero bovino fetal para células de bazo de ratón.	43
Tabla III	Determinación de sensibilidad a aminopterina en células de mieloma.	44
Figura No.4	Análisis mediante ELISA en papel de los sobrenadantes de los híbridos.	47
Figura No.5	Análisis mediante ELISA en papel de los sobrenadantes de los híbridos E5 y G12.	48
Tabla IV	Determinación de isotipo.	50
Figura No.6	Electrotransferencia del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> .	51
Figura No.7	Electrotransferencia del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> .	52
Tabla V	Determinación de subisotipo.	53
Figura No.8	Electrotransferencia del extracto celular de <i>N. asteroides</i> .	56
Figura No.9	Electrotransferencia del extracto celular de <i>M. tuberculosis</i> .	57
Figura No.10	Electrotransferencia del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> .	58
Figura No.11	Fotomicrografías de <i>N. brasiliensis</i> teñidas con Kinyoun.	59
Figura No.12	Fotomicrografía de <i>N. brasiliensis</i> por inmunofluorescencia indirecta.	60