

I. RESUMEN

A partir de un cultivo de *Nocardia brasiliensis* en medio de cultivo de infusión cerebro-corazón, se obtuvo un extracto celular y un extracto semipurificado con la proteína de 24 kDa. Estos extractos fueron utilizados como antígenos para inmunizar ratones hembras de la cepa BALB/c y obtener del bazo células productoras de anticuerpos anti- *N. brasiliensis*. Estas células productoras de anticuerpos se fusionaron con células de mieloma murino NS-1 para obtener hibridomas productores de anticuerpos contra la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*.

La presencia de anticuerpos en los sobrenadantes de las células fusionadas se detectaron mediante la técnica de Inmuno-Dot. En esta técnica el papel de nitrocelulosa fue sensibilizado con el extracto celular de *N. brasiliensis*; posteriormente se incubó con los sobrenadantes de los hibridomas y con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. La aparición de color café indicó la presencia de anticuerpos en los sobrenadantes analizados.

De los sobrenadantes analizados se encontraron siete positivos para producción de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* y se seleccionaron dos de ellos para obtener las clonas productoras de anticuerpos contra la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*.

Después de realizar dilución limitante de los hibridomas seleccionados para clonación, se obtuvieron cuatro clones productoras de anticuerpos que reconocieron únicamente a la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*, analizados mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia.

Por medio de la técnica de E.L.I.S.A. se determinó el isotipo y subisotipo de cuatro de los anticuerpos monoclonales obtenidos. Como antígeno se utilizó el extracto celular de *N. brasiliensis* y como segundo anticuerpo un grupo de anticuerpos comerciales contra inmunoglobulinas de ratón. Se encontró que el isotipo de los anticuerpos monoclonales analizados es IgG y subisotipo 2a.

Para la búsqueda de la proteína de 24 kDa en la superficie de *N. brasiliensis*, la cepa HUJEG-1 se cultivó en medio líquido de infusión cerebro-corazón. La mitad de las células obtenidas se deslipidizaron con mezclas de etanol-éter etílico. Las bacterias intactas y las deslipidizadas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-p24 y posteriormente con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína. Estas bacterias se fijaron a un portaobjetos y se analizaron en un fotomicroscopio de fluorescencia. Con esta técnica inmunocitoquímica no se logró detectar a la proteína de 24 kDa en la superficie de *N. brasiliensis*.

II. INTRODUCCION

Nocardia brasiliensis es una bacteria del orden de los Actinomicetales y pertenece al género *Nocardia*. Las nocardias son bacterias aerobias, saprófitas que se encuentran en la naturaleza en el suelo, madera, vegetales y espinas. Las nocardias se localizan con mayor frecuencia, en regiones tropicales y subtropicales (20, 23, 26). En regiones secas con clima cálido se encuentran millones de actinomicetos del género *Nocardia* por gramo de tierra.

Los microorganismos del género *Nocardia* están relacionados filogenéticamente con los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordona* y *Tsukamurella* (25, 54, 60).

Se han aislado del humano tres especies del género *Nocardia* que originan distintas enfermedades: *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia otitidiscaviarum* (18, 22).

Nocardia asteroides produce una infección sistémica caracterizada por supuración sin presencia de granos, originando la enfermedad conocida como nocardiosis. *N. asteroides* es el principal agente causal de la nocardiosis en

Norte América (11), donde esta enfermedad se presenta principalmente en sujetos inmunocomprometidos.

Nocardia brasiliensis es una bacteria Gram positiva, débilmente ácido-alcohol resistente, intracelular facultativa y no móvil. Forma filamentos de diámetro menor de 1 μm , los que se fragmentan a formas bacilares o cocoides semejantes a las *Mycobacterias* o *Corynebacterias* (13, 20, 53).

N. brasiliensis se cultiva entre 30 a 40°C, en medio Sabouraud o Micosel por un período de 2 a 3 semanas; crece en forma de colonias con aspecto de rosetas de maíz de color blanco-amarillento. *N. brasiliensis* a diferencia de otras especies, hidroliza la caseína, gelatina, urea y tirosina (36, 60).

N. brasiliensis es uno de los agentes que causa la enfermedad conocida con el nombre de micetoma. El micetoma es una dermatosis crónica que puede tener como agentes etiológicos a bacterias, en cuyo caso se le denomina micetoma actinomicótico, o ser causado por hongos, denominándosele micetoma eumicótico.

Los micetomas, ya sean eumicóticos o actinomicóticos se presentan con mayor frecuencia en la zona localizada entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio (23). En América se distribuyen en países de Centro América, México, Venezuela,

Colombia y Brasil. En Africa se presentan en Sudán, Senegal y Somalia. En Asia, en la India se presentan el mayor número de casos (23, 26). En México los micetomas por actinomicetos representan un 98%, el 2% restante es causado por eumicetos como *Madurella mycetomatis* y *Madurella griseae*.

N. brasiliensis es el principal agente causal del micetoma actinomicótico en México (23). Se presenta tanto en sujetos inmunocompetentes como en inmunocomprometidos (31).

En México, 86% de los micetomas actinomicóticos son causados por *N. brasiliensis* y un 10% por *Actinomadura madurae* (2), aislándose ocasionalmente *Nocardia ostitidiscaviarum*, *Actinomadura somaliensis* y *Actinomadura pelletieri* (20).

La infección por *N. brasiliensis* se adquiere a través de un traumatismo que produce solución de continuidad de la piel, lo que permite la entrada del microorganismo. El micetoma se observa con mayor frecuencia entre la cuarta y quinta década de la vida, pero existen reportes de casos en niños y ancianos; es más frecuente en hombres que en mujeres con una relación 4:1 (7, 26). Afecta principalmente a adultos jóvenes de estrato socioeconómico bajo. Los campesinos, por razones ocupacionales, son afectados con mayor frecuencia.

El micetoma es una dermatosis crónica que se caracteriza por un proceso inflamatorio fistuloso que afecta principalmente piel, tejido celular subcutáneo, músculo, hueso y en ocasiones puede diseminarse a vísceras. El agente causal se encuentra formando acúmulos de micelios o microcolonias a los que se les dá el nombre de "granos" (2). El tamaño y color de los granos son característicos del agente causal (27).

En México, el micetoma se localiza en un 75% en miembros inferiores (el 44% en pie), 10% en miembros superiores, 10% en dorso y nuca y 5% en cabeza. En el estado de Morelos, el micetoma del dorso es más frecuente, esto se debe a la costumbre de cargar sobre la espalda desnuda caña de azúcar o leña (56).

Las manifestaciones clínicas del micetoma presentan las siguientes características: es un padecimiento generalmente unilateral, el sitio donde se desarrolla la enfermedad tiene relación directa con el punto de inoculación, se observa aumento de volumen y deformidad del área afectada, presenta numerosas fistulas con salida de un exudado filante, serosanguinolento o seropurulento, en ocasiones presenta ulceraciones y costras melicéricas. Se observan cicatrices retráctiles fibrosas hipo e hiperpigmentadas (2). Es una enfermedad de evolución lenta que se puede diseminar por continuidad o por vía linfática a ganglios regionales y raramente por vía hematógica (26).

El diagnóstico etiológico de las infecciones causadas por microorganismos del género *Nocardia* es difícil. La determinación del agente etiológico se establece mediante varios exámenes de laboratorio tales como: examen micológico directo; este permite identificar los granos, con lo cual se puede diferenciar entre la etiología bacteriana y la micótica. Mediante el estudio anatomopatológico es posible en ocasiones hacer un diagnóstico del agente etiológico de acuerdo a su morfología y a sus características tintoriales. Sin embargo es necesario realizar el cultivo y las pruebas bioquímicas para confirmar el diagnóstico.

Para realizar el diagnóstico de micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis* se requieren de tres semanas, ya que es necesario hacer un cultivo y realizar la caracterización bioquímica para la confirmación del agente causal.

A pesar de que los actinomicetos son abundantes en el medio y existen suficientes oportunidades para adquirirlos, son pocos los casos de micetomas. Esto sugiere que el desarrollo de la enfermedad esta sujeto a la influencia de múltiples factores.

La susceptibilidad a la infección, el estado general del hospedero, la respuesta inmune y el tratamiento inicial, determinan la capacidad del hospedero para combatir la infección o evitar que el agente causal se instale en el hospedero y se presente la enfermedad.

Se ha señalado que la inmunidad celular se encuentra alterada en estos pacientes, reportándose disminuída en pacientes con micetomas extensos (16). En cuanto a la inmunidad humoral, no se ha determinado con exactitud el papel que juegan los anticuerpos en la resolución del proceso infeccioso.

En humanos se ha reportado una buena respuesta de anticuerpos contra antígenos de *N. brasiliensis*, observándose mayor cantidad de anticuerpos cuando la enfermedad está activa (47). Esto también se ha encontrado en modelos experimentales con ratones.

No se conocen con exactitud los mecanismos de resistencia que presenta el hospedero hacia infecciones causadas por nocardias; así mismo los mecanismos de patogenicidad de *N. brasiliensis* no son bien conocidos. Buscando posibles mecanismos de daño por nocardias Salinas y colaboradores en 1993, encontraron mediante la técnica de zimograma tres bandas caseinolíticas, producidas por proteasas presentes en un extracto celular de *N. brasiliensis* (46). Estos autores sugieren la posibilidad de que la patogenicidad de este microorganismo depende en parte de la presencia de estas proteasas, las cuales podrían favorecer la destrucción tisular.

Existen varios mecanismos de resistencia del hospedero contra agentes infecciosos: mecanismos inespecíficos y mecanismos específicos. Los mecanismos de resistencia inespecíficos comprenden las barreras anatómicas o mecánicas, como son la integridad de la piel y mucosas; las de tipo químico incluyen ácidos grasos y enzimas; los celulares incluyen macrófagos y polimorfonucleares. *N. brasiliensis* es una bacteria intracelular facultativa que sobrevive y continúa su crecimiento en el citoplasma de macrófagos que la fagocitan. Se ha propuesto que algunas bacterias del género *Nocardia* evaden los mecanismos de destrucción de los macrófagos mediante la inhibición de la fusión de lisosomas con las vacuolas fagocíticas en las que se encuentran las bacterias (7).

En individuos infectados con *N. brasiliensis* se ha demostrado la presencia de hipersensibilidad tardía a antígenos de *Nocardia* (21). Sin embargo no se conoce con certeza el papel de esta reacción en la resistencia del hospedero a infecciones por *N. brasiliensis*.

Se ha sugerido que los anticuerpos juegan un papel importante en la resistencia del hospedero contra algunas cepas de *Nocardia* (21). Hasta el momento no se ha demostrado la presencia de anticuerpos protectores, sin embargo existen algunos reportes que sugieren que los anticuerpos no protegen, sino que al contrario favorecen y agravan la enfermedad (41).

Folb y colaboradores, en el año de 1977 infectaron ratones atímicos y ratones normales con *N. asteroides* y *N. brasiliensis* y observaron que los ratones atímicos murieron más rápidamente que los ratones normales. Estos resultados sugieren que el timo ejerce un papel fundamental en la resistencia a infecciones por *Nocardia* (18).

Beaman y colaboradores, en el año de 1983 sugirieron que los anticuerpos no son responsables de la resistencia contra infecciones ocasionadas por *N. asteroides*. Estos investigadores infectaron con este agente a ratones hembras y machos de la cepa (CBA/N x DBA2)F1. Los ratones machos de esta cepa presentan una deficiencia en la producción de anticuerpos. En este estudio tanto ratones machos como hembras mostraron la misma susceptibilidad a la infección (5).

Salinas y colaboradores en el año de 1992, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia utilizando un extracto celular de *N. brasiliensis* y sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, sueros de pacientes con lepra, sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y sueros de personas aparentemente sanas, identificaron tres antígenos inmunodominantes cuyo peso molecular (PM) es de 61, 26 y 24 kDa. Los sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* reconocieron de manera intensa y consistente 6 bandas cuyo peso molecular corresponden a 61, 49, 45, 42, 26 y 24 kDa. Los sueros de pacientes con tuberculosis y lepra reconocieron intensamente las bandas de 49, 45 y 42 kDa. Los sueros de personas sanas reconocieron algunas bandas, pero no reconocieron a las bandas de 61, 26 y 24 kDa

(45). Posteriormente, Vera y colaboradores en 1992, aislaron y purificaron dos antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis*: las proteínas de 61 y 24 kDa (55).

El-Zaatari y colaboradores en el año de 1986, obtuvieron varios anticuerpos monoclonales contra antígenos de *Nocardias*, sin embargo presentaron reacción cruzada contra antígenos de *Mycobacterias* (16).

Jiménez y colaboradores en el año de 1990, obtuvieron seis líneas híbridas productoras de anticuerpos monoclonales contra antígenos de *Nocardia spp.* Estos anticuerpos presentaron diferentes grados de reacción cruzada contra antígenos de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* y también mostraron reacción cruzada con antígenos obtenidos de filtrados de cultivo de *Mycobacterium spp* (25).

Rambukkana y colaboradores, recientemente obtuvieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de 29-33 KDa de *M. tuberculosis*. Algunos anticuerpos reaccionaron con la banda de 30 kDa y un anticuerpo reaccionó con las bandas de 29 y 33 kDa. Estos anticuerpos fueron utilizados para localizar a sus determinantes antigénicos en las bacterias intactas y en fracciones subcelulares, así como en filtrados de cultivo de *M. tuberculosis*. Este grupo de investigadores encontró que tres de los anticuerpos reconocieron a epítomos en el citosol y uno de ellos reaccionó con las tres fracciones subcelulares (pared, membrana y citosol) y con el filtrado de cultivo (40).

Para comprender mejor la respuesta inmune contra *N. brasiliensis* es necesario conocer a los antígenos que son relevantes en la interacción sistema inmune-*N. brasiliensis*, por ejemplo, la identificación de aquellos antígenos que determinan o inducen protección. Este conocimiento nos permitirá en el futuro entender la relación entre inmunodominancia de algunos antígenos y su localización en la célula bacteriana, lo cual constituye un elemento básico para desarrollar herramientas más finas que permitan el estudio de los mecanismos involucrados en el establecimiento y resolución de la enfermedad.

En este trabajo, nos propusimos obtener anticuerpos monoclonales contra la proteína inmunodominante de 24 kDa de *N. brasiliensis* y emplearlos para su localización en la superficie de la bacteria.

OBJETIVOS

- 1. Obtener anticuerpos monoclonales contra la proteína inmunodominante de 24 kDa de *Nocardia brasiliensis*.**
- 2. Determinar el isotipo y subisotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos.**
- 3. Determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos utilizando un extracto celular de *Nocardia asteroides* y de *Mycobacterium tuberculosis*.**
- 4. Utilizar los anticuerpos monoclonales para buscar la proteína de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*.**

III. MATERIAL Y METODOS

1. OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR DE *N. brasiliensis*.

1.1 Obtención de la cepa bacteriana de *N. brasiliensis*.

La cepa de *N. brasiliensis* utilizada en este estudio se obtuvo a partir de un paciente con diagnóstico de micetoma que acudió a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. La bacteria fue identificada mediante técnicas microbiológicas convencionales por el Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla del Departamento de Microbiología de esta Facultad y su identidad fue confirmada por el Dr. Libero Ajello (Center for Disease Control Atlanta, GA. E.U.A.) y la bacteria fue etiquetada como *Nocardia brasiliensis* HUIJEG-1 (45). Las bacterias se subcultivaron en medio agar Sabouraud para su mantenimiento. Para su cultivo en medio líquido se utilizó infusión cerebro-corazón (B.H.I. Brain Heart Infusion Difco, Detroit, MI.).

1.2 Obtención del inóculo.

De las bacterias que crecieron en medio Sabouraud se tomaron dos o tres colonias y se inocularon en matraces Erlenmeyer (Pyrex) de 125 ml, con un volumen

de 30 ml de medio infusión cerebro-corazón. Estos cultivos se incubaron a 37°C en baño de agua con agitación (Dubnoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific) por 48 hrs.. Las bacterias se recuperaron en tubos cónicos y se centrifugaron (Beckman TJ-6) a 450 x g por 5 min. (36). Este procedimiento se repitió tres veces con solución salina estéril al 0.85%. Las colonias se trituraron mecánicamente con un agitador de vidrio y se lavaron una vez más recuperando únicamente el sobrenadante que contenía las células disgregadas y en suspensión.

1.3 Obtención del extracto celular de *N. brasiliensis*.

De la suspensión celular obtenida previamente, se tomaron 0.4 ml y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 1 litro con 160 ml de medio BHI. Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 7 días. La masa bacteriana obtenida se deslipidizó con mezclas de etanol-éter etílico 1:1, 1:2, 1:3 varias veces hasta eliminar el color naranja de la masa bacteriana, la que posteriormente se secó mediante sistema de vacío. La masa bacteriana seca, se trituró en forma mecánica con polvo de vidrio (Pyrex) y se resuspendió en solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 pH 7.4, con acetato de magnesio 0.01M, en una proporción de 10% p/v y se dejó en agitación constante a 4°C durante 12 hrs.. El polvo de vidrio se eliminó mediante centrifugación a 1800 x g durante 15 min. (Beckman TJ-6). Para obtener el extracto de *N. brasiliensis* el sobrenadante se ultracentrifugó 100 000 x g durante 3 hrs. (Beckman L8-70M). El sobrenadante se dializó durante 24 hrs. contra agua destilada, en una membrana de diálisis con un poro de exclusión molecular de 12-14000 daltones (250-9U). El dializado se separó en

alícuotas y se liofilizó, dejando una alícuota para la determinación de proteínas. El liofilizado se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (32). Este extracto celular se utilizó como antígeno para inmunizar a los ratones y para la determinación de anticuerpos, mediante las técnicas de E.L.I.S.A. e Inmunoelectrotransferencia (Western-blot).

2. OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*.

A partir de un liofilizado comercial de *M. tuberculosis* H37-Ra (DIFCO Laboratorios), se tomaron 100 mg de bacterias, se deslipidizaron con una mezcla de etanol-éter etílico 1:1 y 1:3 una vez con cada una y se secó mediante sistema de vacío. La muestra se trituroó con polvo de vidrio y posteriormente se resuspendió en la solución amortiguadora de Tris-HCl-acetato de magnesio. Se dejó en agitación a 4°C durante 3 hrs.. El polvo de vidrio fue eliminado mediante centrifugación a $1\ 800 \times g$ durante 15 min.. El sobrenadante se dializó, durante 18 hrs. contra agua destilada en un equipo de electroelución (BIO-RAD) con una membrana con poro de exclusión de 10 000 daltones. El dializado se recuperó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS CELULARES.

3.1 Análisis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), de los extractos celulares de *N. brasiliensis*, *N. asteroides* y *M. tuberculosis*.

El extracto de *N. asteroides* fue preparado y donado por la Q.C.B. Verónica López Zuñiga del Departamento de Inmunología de esta Facultad. El análisis de los componentes de los tres extractos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de 8.75 a 18% T con dodecilsulfato de sodio. Se utilizó el sistema de amortiguador discontinuo de Laemmli (30) con un gel de empaquetamiento de 5% T. El gel se preparó de la siguiente manera:

GEL DE CORRIMIENTO

<u>Concentración (% T):</u>	<u>8.75</u>	<u>18</u>
Acrilamida-Bisacrilamida (30% T, 2.7% C).	0.720 ml	1.259 ml
Buffer tris-HCl 3M, pH 8.8.	0.396 "	0.396 "
Glicerol al 50%.	0.144 "	0.222 "
Agua tridestilada.	0.874 "	0.193 "
Laurilsulfato de sodio 10% (Sodium Dodecyl Sulfato SDS).	0.020 "	0.020 "
Persulfato de amonio al 10%.	0.007 "	0.007 "
N,N,N',N',-Tetrametiletilendiamina (TEMED).	0.003 "	0.003 "
Volumen Total:	<hr/> 2.1 ml	<hr/> 2.1 ml

El gradiente se realizó mediante un formador de gradiente (BIO-RAD). La solución de acrilamida al 8.75% T, se vació en la cámara de la izquierda del aparato y la solución de 18.5% T en la cámara derecha, la unión entre las dos cámaras 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 aplicó a un mini cassette (BIO-RAD) de 10x10 cm, con espaciadores de 0.75 mm, mediante una bomba peristáltica a una velocidad aproximada de 1 ml por min.. Al terminar de pasar la mezcla, se aplicó una capa de agua para evitar el contacto de la acrilamida con el aire. Después de que el gel se polimerizó, se eliminó la capa de agua y se secó con papel filtro. Enseguida se colocó un peine de teflon para formar los carriles de las muestras, con una pipeta Pasteur se aplicó el gel concentrador, que se preparó de la siguiente manera:

GEL CONCENTRADOR AL 5% T.

Acrilamida-Bisacrilamida	
(30% T, 2.7% C)	0.449 ml
Buffer Tris-HCl 1M, pH 6.8.	0.375 "
Agua tridestilada.	1.980 "
SDS. al 10%.	0.030 "
Persulfato de amonio al 10%.	0.105 "
TEMED.	0.003 "
	—————
Volumen Total:	2.942 ml

Quando el gel concentrador polimerizó, se quitó el peine y se cubrieron los carriles con buffer de electroforesis trizma-base 25 mM, Glicina 192 mM, con SDS al 0.1%, pH 8.3. El cassette se insertó en la cámara de electroforesis y se realizó un precorrimento a 50 volts (v) durante 25 min.. Cada antígeno (extractos de *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis*) se mezcló con buffer de muestra (SDS al 10%, β -mercaptoetanol al 10% v/v, glicerol al 50% en buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 y 0.2% de azul de bromofenol como indicador del frente de iones) y se calentaron en baño de agua en ebullición durante 2 min.. Posteriormente los antígenos se aplicaron al gel, así como estandares de peso molecular conocido (Dalton Mark VIII) preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La electroforesis se inició a un voltaje de 80 v hasta que el indicador alcanzó el gel de corrimiento, en este momento se aumentó el voltaje a 150 v hasta que el colorante llegó al extremo inferior del gel. El gel se tiñó con nitrato de plata y/o con azul de Coomassie como se describe a continuación.

3.2 Tinción de geles.

3.2.1 Tinción con nitrato de plata.

- a) El gel se colocó en solución de metanol al 50% y ácido acético al 12%, durante 20 minutos.
- b) El SDS se eliminó del gel, realizando tres lavados, de 10 min. cada uno, con solución de etanol al 10% y ácido acético al 5%.

- c) El gel se transfirió a solución oxidante de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$ 3.4 mM, HNO_3 3.22 mM) durante 5 min..
- d) El oxidante se eliminó, mediante tres lavados de 10 min. c/u, con agua tridestilada.
- e) Posteriormente el gel se incubó con solución de nitrato de plata ($AgNO_3$ 12 mM) durante 30 min., los primeros 5 min. bajo luz intensa.
- f) Las bandas se hacen evidentes, mediante el uso de solución reveladora (Na_2CO_3 280 mM con 0.5 ml de formaldehído concentrado por litro de solución). Una vez que se observaron las bandas, la reacción se detuvo con ácido acético al 1%.

3.2.2 Tinción con azul de Coomassie.

- a) El gel se colocó durante 30 min. en una solución de azul de Coomassie (R-250) al 0.1%, en metanol al 40% y ácido acético al 10%.
- b) El gel se destiñó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%.

4. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-PROTEINA DE 24 kDa DE *N. brasiliensis*.

4.1 Medios de cultivo y reactivos complementarios.

- a) Medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con L-glutamina 0.6 g/l cada 15 días; Gentamicina 160 mg/l; suero bovino fetal a diferentes concentraciones. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

- b) Suero bovino fetal (probado para hibridomas) libre de pirógenos.
- c) Hipoxantina/Timidina 50X, probada para producción de hibridomas. A cada vial de HT, se agregaron 10 ml de medio RPMI- 1640 en condiciones de esterilidad. De esta solución se agregaron 10 ml por cada 500 ml de medio de cultivo. La hipoxantina tuvo una concentración final de 100 $\mu\text{M/l}$ y la timidina a 16 $\mu\text{M/l}$.
- d) Hipoxantina/Aminopterina/Timidina 50X, probada para hibridomas Se preparó y aplicó de la misma forma que el HT. La concentración final de aminopterina fué de 2×10^{-5} M/l.
- e) Polietilenglicol (PEG PM 1300-1600) probado para hibridomas. Se preparó una solución al 20% con medio RPMI-1640. El PEG se fundió en baño de agua en ebullición.
- f) Medio de Criopreservación. Medio de cultivo RPMI-1640 con SBF al 20% y dimetilsulfoxido al 20%.
- g) Medio de mantenimiento. Medio de cultivo RPMI-1640 con SBF 10%, gentamicina 160 mg/l y HT.
- h) Medio de Selección. Medio de cultivo RPMI-1640 con SBF al 10% y gentamicina 160 mg/l y HAT.

Notas:

- a) Todos los medios de cultivo, se prepararon en condiciones de esterilidad y se filtraron, con unidades de filtración de 0.22 μm durante su preparación y antes de su uso.
- b) Los suplementos se agregaron al momento de su utilización, filtrándolos con unidades de filtración de 0.22 μm .

- c) Los medios de cultivo y suplementos, se conservaron en refrigeración (2-4°C) si no existía otra indicación.
- d) Los medios y suplementos fueron utilizados a temperatura ambiente a menos que se especificara otra temperatura.

4.2 Inmunización de ratones.

4.2.1 Animales.

Se utilizaron 6 ratones BALB/c hembras de 12 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico, a una temperatura de 16-20°C, se alimentaron con purina (Purina México S.A. de C.V.) y agua destilada estéril ad libitum.

4.2.2 Antígenos.

Se utilizaron como antígenos el extracto celular de *N. brasiliensis* y un extracto semipurificado (preparado y donado por la Biol. Silvia Magdalena Casillas Quintana) que contiene la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*. El extracto semipurificado fue obtenido de la forma siguiente: El extracto celular de *N. brasiliensis* se precipitó con solución saturada de sulfato de amonio. La mezcla se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante. El sobrenadante fue tratado con desoxirribonucleasa I, esta muestra se dializó contra agua destilada. La muestra tratada con desoxirribonucleasa se aplicó a una columna con Sephadex G-100 previamente calibrada. Las alícuotas correspondientes al pico No. 2 se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%, el gel se

tiño con azul de Coomasie para determinar en cuales alícuotas se encontraba la proteína de interés. Dichas alícuotas se mezclaron (esta mezcla constituye el extracto semipurificado) y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry(47).

4.2.3 Preparación de los Antígenos para inmunizar.

Los antígenos para las tres primeras inmunizaciones, se prepararon en forma de emulsión con 50% de adyuvante incompleto de Freund y el otro 50% con solución salina 0.85%. El antígeno para la última inmunización se preparó únicamente con solución salina.

4.2.4 Esquema de inmunización.

Se utilizó un esquema de inmunización previamente establecido en este Departamento. Se aplicaron un total de 4 inmunizaciones :

- a) Primoinmunización. A cada ratón se le administraron 30 μg del extracto celular de *N. brasiliensis*, por vía subcutánea (sc.) 100 μl en cada cojinete plantar posterior.
- b) Primera reinmunización. En esta ocasión se aplicaron a cada ratón 15 μg del extracto celular, sc., 50 μl en cada cojinete plantar posterior.
- c) Segunda reinmunización. A cada ratón se le aplicaron 10 μg del extracto celular, por vía intramuscular (im.) 100 μl .
- d) Tercer reinmunización. Esta inmunización, se aplicó tres días previos a la fusión celular y únicamente se inmunizó el ratón donador de las células de bazo para la fusión. Se aplicaron por vía intraperitoneal (ip.) 5 μg del extracto semipurificado

de *N.brasiliensis*. (Los intervalos entre las tres primeras inmunizaciones fueron de 2 semanas).

Los ratones se sangraron del plexo venoso retroorbitario, antes de cada inmunización y los sueros obtenidos (50 μ l por animal) se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.3 Congelación y descongelación de células de mieloma.

4.3.1 Descongelación.

La línea de mieloma fue donada por el Dr. Alejandro Ruiz Argüelles de los Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, México. Se recuperó un vial con células de mieloma de un tanque con nitrógeno líquido y se colocó en baño de agua a 37°C hasta su descongelación total (no más de 5 min.). El contenido del vial se transfirió a un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de RPMI-1640 con SBF 20%. Las células se lavaron una vez, centrifugando a $610 \times g$ (Beckman TJ-6) durante 5 min.. Posteriormente se realizaron 2 lavados con medio de cultivo con SBF al 10%. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm^3 con 10 ml de medio de mantenimiento, a una concentración celular de $1 \times 10^6/10 \text{ ml}$. Se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5-7% de CO_2 (Contamination Control Inc.). Cuando se observó confluencia de las células, se hicieron diluciones en forma progresiva 1:2, 1:4 y 1:8 (35).

4.3.2 Congelación.

Las células de un cultivo de cinco días se cosecharon mediante centrifugación a 610 x g, durante 5 minutos. Se realizaron dos lavados con medio RPMI-1640. Posteriormente se resuspendieron en medio de criopreservación frío, a una concentración de 1×10^6 células por ml de medio. Se hicieron alícuotas de 1 ml y se colocaron en viales de criopreservación. Los viales se colocaron a -70°C durante 12 hrs.. Después de este tiempo se transfirieron a cilindros de almacenamiento en un tanque con nitrógeno líquido.

4.4 Preparación de células de mieloma para fusión.

Las células que se descongelaron previamente, se sembraron a diluciones de 1:2 ó 1:4 cuando la densidad celular aumentaba y las células cubrían el fondo del frasco.

4.5 Determinación de concentración óptima de SBF para células de mieloma y células de bazo de ratón BALB/c.

4.5.1 Células de mieloma murino BALB/c NS1/1-Ag4-1 (NS-1).

Esta determinación se realizó mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada (1 mCi/10 ml). Los cultivos de las células de mieloma en los que se observó al

invertoscopio proliferación celular, se cosecharon (48-72 hrs. después de la descongelación) mediante centrifugación a $610 \times g$ y se lavaron dos veces con medio RPMI-1640. Se tomó una alícuota de $100 \mu\text{l}$ para determinar el número de células y su viabilidad. Las células con una viabilidad mayor de 85%, se sembraron en placas de microcultivo (Costar de 96 pozos con fondo plano) a una concentración de 2×10^5 células/ $200 \mu\text{l}$ en cada pozo. Se probaron 3 concentraciones diferentes de SBF a 0, 5 y 10%. Cada cultivo se sembró por triplicado. Las células se incubaron en las condiciones ya mencionadas. A las 48 hrs. de incubación, se agregaron a cada pozo, $10 \mu\text{l}$ de timidina tritiada. Veinticuatro horas después de agregar la timidina, las células se cosecharon con un equipo Mini Mesh (Bio Rad). La incorporación de timidina se determinó en un contador de centelleo de emisiones beta (Beckman LS6000TA).

4.5.2 Células de bazo de ratón BALB/c.

El ratón se sacrificó mediante dislocación cervical. El bazo se extrajo en forma aséptica y se colocó en una caja de Petri con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640, en donde las células se disgregaron. La suspensión celular obtenida, se transfirió a un tubo de vidrio (16x100 mm Pyrex) y se colocó en baño de hielo durante 90 seg.. La suspensión celular se recuperó en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a $230 \times g$ (Beckman TJ-6) por 5 min., el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio. Para eliminar a los eritrocitos, la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico con 10 ml de cloruro de amonio. Este tubo se colocó en baño de hielo durante 10 min.. Posteriormente las células se lavaron dos veces y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio. A partir de este paso se

siguió la metodología descrita en el punto 4.4. Como mitógenos se utilizaron concanavalina A y fitohemaglutinina a diferentes concentraciones.

4.6 Determinación de sensibilidad a aminopterina de las células de mieloma murino NS-1.

Los cultivos se prepararon en la forma descrita previamente (punto 4.5.1). En este ensayo un grupo de células se cultivó en medio de mantenimiento y otro grupo en medio de selección.

4.7 Preparación de células para fusión.

4.7.1 Células de mieloma.

Las células de mieloma de un cultivo de cinco días, se cosecharon y lavaron con medio RPMI-1640. Se tomó una alícuota de 100 μ l para determinar viabilidad y número de células.

4.7.2 Obtención de células de bazo de ratón hiperinmune.

Previo a la obtención de las células, el ratón se sangró mediante punción cardíaca y las células del bazo se obtuvieron mediante la técnica descrita (punto 4.5.2).

4.8 Fusión celular.

Las células de mieloma y las células inmunes del bazo se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml, en una relación 1:3 respectivamente, se agregó la cantidad necesaria de medio para aforar a 5 ml. La mezcla celular se centrifugó a 190 x g (Beckman TJ-6) durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y el botón celular se aforó a 1 ml con medio RPMI-1640. Posteriormente se agregó 1 ml de la solución de PEG (39), el tubo se agitó suavemente durante 90 seg. y se agregaron 20 ml de medio RPMI-1640 gota a gota, se dejó en reposo durante 10 min.. Después de este tiempo, las células se centrifugaron a 190 x g durante 10 min.. El botón celular se resuspendió en la cantidad de medio de selección necesaria para obtener una concentración de $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ por pozo. Las células se sembraron en placas de microcultivo (96 pozos, fondo plano), y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5-7% de CO₂. Al día siguiente se verificó ausencia de contaminación. Al cuarto día se reemplazaron 100 μl de medio de selección, al octavo día se reemplazaron 100 μl , en esta ocasión con medio de mantenimiento.

4.9 Identificación de hibridomas productores de anticuerpos.

A partir del 7o día las células se revisaron diariamente en el invertoscopio, en busca de datos sugerentes de proliferación celular como son la morfología y el número de células. Se marcaron los pozos que presentaron datos sugerentes de híbridos

celulares en desarrollo y los pozos que cubrían más del 50% de la superficie del fondo. De estos pozos se extrajeron 100 μ l de sobrenadante (restituyéndolo por medio de cultivo fresco) para determinar la presencia de anticuerpos, mediante una técnica de E.L.I.S.A. en papel (ver punto 5.1). Las poblaciones celulares productoras de anticuerpos se expandieron mediante transferencia, en forma sucesiva, a pozos más grandes y se tomaron alícuotas para congelar y clonar.

4.10 Clonación de hibridomas productores de anticuerpos.

Se preparó una suspensión celular (en medio de mantenimiento) con los híbridos que resultaron positivos para la producción de anticuerpos. Estas células se sembraron (placas de cultivo de 96 pozos, fondo en "U") en una relación de 1 célula en 25 μ l de medio de cultivo por pozo y se incubaron en las condiciones ya descritas. Los cultivos se revisaron diariamente al invertoscopio, se marcaron los pozos en los que se observó proliferación celular y se agregó medio de mantenimiento de acuerdo a la cantidad de células. Los sobrenadantes de los pozos en los que se observó proliferación, de más del 50% de la superficie del pozo, se recuperaron para su análisis con la técnica de inmunoelectrotransferencia, para seleccionar las clonas productoras del anticuerpo anti-proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*. Después de este análisis se seleccionaron varias clonas productoras de anticuerpos anti-p24. Se congelaron unas alícuotas y otras se expandieron para obtener los anticuerpos anti-p24 deseados.

5. ANALISIS DE SOBRENADANTES PARA PRODUCCION DE ANTICUERPOS

5.1 Ensayo inmunoenzimático en papel de nitrocelulosa (Inmuno-dot).

El papel de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm , se humedeció en solución amortiguadora Tris-salina (TBS, Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM) pH 7.5. El papel se colocó en el aparato de microfiltración (BIO-RAD) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A cada pozo se le agregaron 100 μl de la solución amortiguadora y se drenó mediante sistema de vacío, posteriormente se agregó a cada pozo 50 μg de extracto celular de *N. brasiliensis*, el cual se dejó drenar por gravedad durante 30 min.. Con el objeto de cubrir los sitios libres de antígeno, se aplicaron 200 μl por pozo de una solución de albumina sérica bovina al 1% en TBS (1%BSA-TBS, solución bloqueadora). El papel se incubó con la solución bloqueadora durante 1 hr. a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con 300 μl de buffer TBS-Tween 20 al 0.05% (TTBS, solución de lavado), la solución se eliminó con sistema de vacío. Se aplicaron 50 μl de las muestras, los sobrenadantes sin diluir, el suero de ratón diluido 1:10 y el suero de conejo 1:500 (como diluyente se utilizó 1% BSA-TTBS). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente, durante 1 hr.. Se realizaron 3 lavados en la forma ya descrita. Después de los lavados se aplicaron 50 μl de anticuerpos anti-inmunoglobulinas conjugados a peroxidasa, anti-conejo y anti-ratón a las diluciones recomendadas por el fabricante. El papel se incubó con estos anticuerpos durante 1 hr.. a temperatura ambiente. Antes de sacar el papel del sistema

se realizaron dos lavados más. El papel se colocó en solución substrato salina amortiguada con fosfato 0.1M, pH 7.4 (PBS) más 3,3'-diaminobencidina (tetraclorhidrato) al 0.05% y peróxido de hidrógeno (40 µl de solución al 30% por cada 20 ml de solución de diaminobencidina). Al aparecer color, la reacción se detuvo con HCl 5N (47). El papel fue colocado entre dos hojas de papel filtro para secarlo.

6. ANALISIS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

6.1 Demostración de clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* mediante inmuno-electrotransferencia (Western-blot).

Se preparó un gel de poliacrilamida en gradiente de 8.75 a 18%, con un gel de empaquetamiento al 5% y con un peine de 7.5 cm. Se aplicaron 50 µg de antígeno por cada 0.8 cm de gel. La electroforesis se realizó en las condiciones descritas. Al terminar la electroforesis, las proteínas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm. Para la transferencia se utilizó solución amortiguadora trizma-base 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 con 20% de metanol. Para las transferencias se utilizaron las cámaras Mini Trans Blot II y Trans Blot (BIO-RAD). La transferencia de las proteínas se realizó mediante la aplicación de voltaje constante a 100 v durante 1 hr.. Al terminar la transferencia, el papel se bloqueó con gelatina de pescado (Hipure Liquid Gelatin) al 3% en PBS durante 1 hr. a 37°C. El

papel se lavó con gelatina al 0.3% en PBS-Tween 20 1:1000 (solución de lavado), y se cortó en tiras de 0.4 cm. Las tiras se incubaron durante 12 hrs. a 4°C, con los sueros diluidos en gelatina al 1.5% en PBS con Tween 20 1:1000, se utilizaron a las diluciones descritas previamente y los sobrenadantes de cultivo sin diluir. Se realizaron 6 lavados, posteriormente se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulinas conjugados con peroxidasa, a las diluciones recomendadas por el fabricante. El conjugado se incubó durante 2 hrs. a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de esta incubación se realizaron 6 lavados. Finalmente las tiras se colocaron en la solución substrato y se siguió el procedimiento descrito. Esta metodología también se utilizó para el análisis de los anticuerpos anti-p24 con los extractos de *N. asteroides* y *M. tuberculosis*.

6.2 Determinación de isotipo y subisotipo de los anticuerpos monoclonales mediante una técnica inmunoenzimática en fase solida (E.L.I.S.A.).

Esta determinación se realizó mediante la metodología descrita por Salinas y colaboradores en el año de 1993 (47), utilizando como antígeno extracto celular en lugar de extracto semipurificado. Se aplicaron 0.5 µg del extracto celular de *N. brasiliensis* a placas de poliestireno (Costar 96 pozos fondo plano) en 200 µl de solución amortiguadora de acetatos pH 5.0. La placa se cubrió y se dejó incubando a 4°C durante 12 hrs.. Al día siguiente se eliminó el contenido de los pozos mediante decantación. Se realizaron 3 lavados de 10 min. c/u, con 200 µl de PBS 0.01M pH 7.4 Tween 20 1:1000 (solución de lavado). Los probables sitios de unión

inespecíficos se bloquearon con 200 μ l de leche descremada "Svelty" al 5% en PBS-Tween 1:1000 (solución bloqueadora). La placa se incubó con la solución bloqueadora durante 2 hrs. a 37°C. Se realizaron 5 lavados: dos de 5 min. y 3 de 1 min.. Se agregaron 200 μ l de los sobrenadantes y suero control (el suero humano diluido 1:500 en solución bloqueadora). En cuatro pozos se aplicaron 200 μ l de solución bloqueadora como blanco. Se realizaron 5 lavados como se describió previamente. A cada pozo se aplicaron 100 μ l de anti-inmunoglobulinas de ratón (Mouse Typer Sub-Isotyping Kit. Anti-IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 desarrolladas en conejo). La placa se incubó con los anticuerpos a 37°C durante 1 hr.. Se realizaron 5 lavados de la misma forma que los lavados previos. Por último se agregaron a cada pozo 200 μ l de anti-inmunoglobulinas de conejo conjugada con peroxidasa, dilución 1:1000 y se incubaron a 37°C durante 1 hr.. Se realizaron 3 lavados, uno de 5 min. y dos de 1 min.. Se agregaron 160 μ l de solución cromógeno-substrato pH 5 (0.01 g de ortofenilendiamina OPD) más 3 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. En un pozo se aplicó la solución de cromógeno-substrato como testigo. La placa se cubrió y dejó incubando en obscuridad durante 30 min.. La reacción se detuvo con 40 μ l de ácido sulfúrico 1N. Finalmente se midió la absorbancia a 492 nm. Se determinó la media de los pozos blanco-testigo y este valor se les restó a los demás pozos.

6.3 Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

Este análisis se realizó mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, transfiriendo en carriles diferentes los antígenos de *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis*. Las tiras de papel se incubaron con sobrenadantes de clonas productoras de anticuerpos contra la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*. Como controles, se utilizaron: suero inmune de conejo y ratón anti-extracto celular de *N. brasiliensis*, suero humano de un paciente con nocardiosis por *N. asteroides* y dos sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar.

7. INMUNOCITOQUIMICA CON FLUORESCENCIA PARA BUSCAR A LA PROTEINA DE 24 kDa EN LA SUPERFICIE DE *N. brasiliensis*.

7.1 Preparación de la suspensión bacteriana.

La suspensión celular de *N. brasiliensis* se preparó en la forma antes señalada. La mitad de las bacterias obtenidas se deslipidizaron con una mezcla de etanol-éter etílico 1:1. Las bacterias intactas y deslipidizadas se colocaron por separado en tubos Eppendorf de 2 ml a una concentración de 6×10^5 bacterias en 1 ml de PBS (el número de bacterias se determinó mediante la técnica de nefelometría de McFarland) (3). Las bacterias se centrifugaron a 450 x g durante 5 min (Beckman TJ-6) y el sobrenadante

se eliminó. El botón celular se despegó del tubo y se agregaron 200 μ l del sobrenadante de cultivo de una de las clonas anti-p24. Como testigo negativo se utilizó el amortiguador de PBS. Las bacterias se incubaron a 37°C en baño de agua durante 1 hr.. Se realizaron 5 lavados con PBS mediante centrifugación a 450 x g. Las bacterias se incubaron por segunda vez con anticuerpos anti-inmunoglobulina G de ratón, (desarrollada en cabra) conjugada a isotiocinato de fluoresceína, a diferentes diluciones (1:10, 1:15, 1:25, 1:50 y 1:100). Las bacterias se lavaron 5 veces. El botón bacteriano se resuspendió en 100 μ l de PBS. Con esta suspensión bacteriana se prepararon los frotis, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con metanol durante 30 minutos. Los frotis así preparados se cubrieron con un portaobjetos con solución de montaje o resina y posteriormente se analizaron en un Fotomicroscopio con el objetivo de 63x (Axioplan Zeiss).

RESULTADOS

1. OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR DE *N. brasiliensis*.

Después de la inoculación de 38 matraces (Total: 6.270 l de medio BHI) con la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*, se obtuvieron 120 g de masa húmeda. De esta masa húmeda se extrajeron 167.5 mg del extracto celular de *N. brasiliensis*.

a) Determinación de proteínas.

Al extracto celular de *N. brasiliensis* se le determinó la concentración de proteínas, obteniendo una concentración de 1.362 mg/ml, dando un total de 167.5 mg/123 ml.

2. OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR DE *M. tuberculosis*.

A partir de un liofilizado comercial de la cepa de *M. tuberculosis* H37-Ra, se obtuvieron 500 µl del extracto celular. No se determinó la concentración de proteínas por ser la única muestra. Este extracto fue utilizado para los análisis de especificidad mediante inmunoelectrotransferencia.

3. ANALISIS DE LOS EXTRACTOS CELULARES.

3.1 Análisis en SDS-PAGE del extracto celular de *N. brasiliensis*.

Se determinó la composición del extracto celular obtenido y se comparó con un gel de un extracto de *N. brasiliensis* de referencia del Departamento de Inmunología. Observamos que el extracto obtenido fue similar al extracto de referencia. En la figura No. 1 se muestra el patrón electroforético de un extracto de *N. brasiliensis*. Se observó que el extracto está constituido por 35-40 bandas, distribuidas principalmente entre los marcadores de peso molecular de 14-66 KDa y algunas bandas por abajo del marcador de 14 kDa.

3.2 Análisis en SDS-PAGE del extracto celular de *N. asteroides*.

En la figura No. 2 se muestra el patrón electroforético del extracto celular de *N. asteroides*, se observó que este extracto conserva las mismas características que las observadas al momento de su obtención. El extracto de *N. asteroides* esta constituido por aproximadamente 30 bandas que se encuentran distribuidas entre los marcadores de peso molecular de 14-66 kDa y algunas bandas por arriba del marcador de 66 kDa.

3.3 Análisis en SDS-PAGE del extracto celular de *M. tuberculosis*.

Para determinar las características y el número de bandas proteicas del extracto celular de la cepa de *M. tuberculosis* H37-Ra, se aplicaron 4, 10, 16, 20 y 40 μl del extracto celular de *M. tuberculosis* por cada cm de gel. En el gel que se tiñó con azul de Coomassie solo se observó una banda muy delgada a nivel del marcador de peso molecular de 66 kDa en los carriles de 16, 20 y 40 μl (fotografía no mostrada). Con la tinción de nitrato de plata, en los carriles correspondientes a 20 y 40 μl , se observó un barrido homogéneo a lo largo del carril de color café, mientras que en los carriles correspondientes a 4 y 10 μl se observaron de 20-25 bandas distribuidas entre los marcadores de peso molecular de 14-66 kDa (fotografía no mostrada).

En la figura No. 3 se muestra el patrón electroforético correspondiente a 16 μl del extracto de *M. tuberculosis*, en donde se observaron también de 20 a 25 bandas distribuidas a nivel de los marcadores de peso molecular de 14-66 kDa, sin embargo con este volumen del extracto las bandas se observaron más nítidas, por lo que en los ensayos de Western-blot se aplicaron 16 μl por cada 0.8 cm de gel.

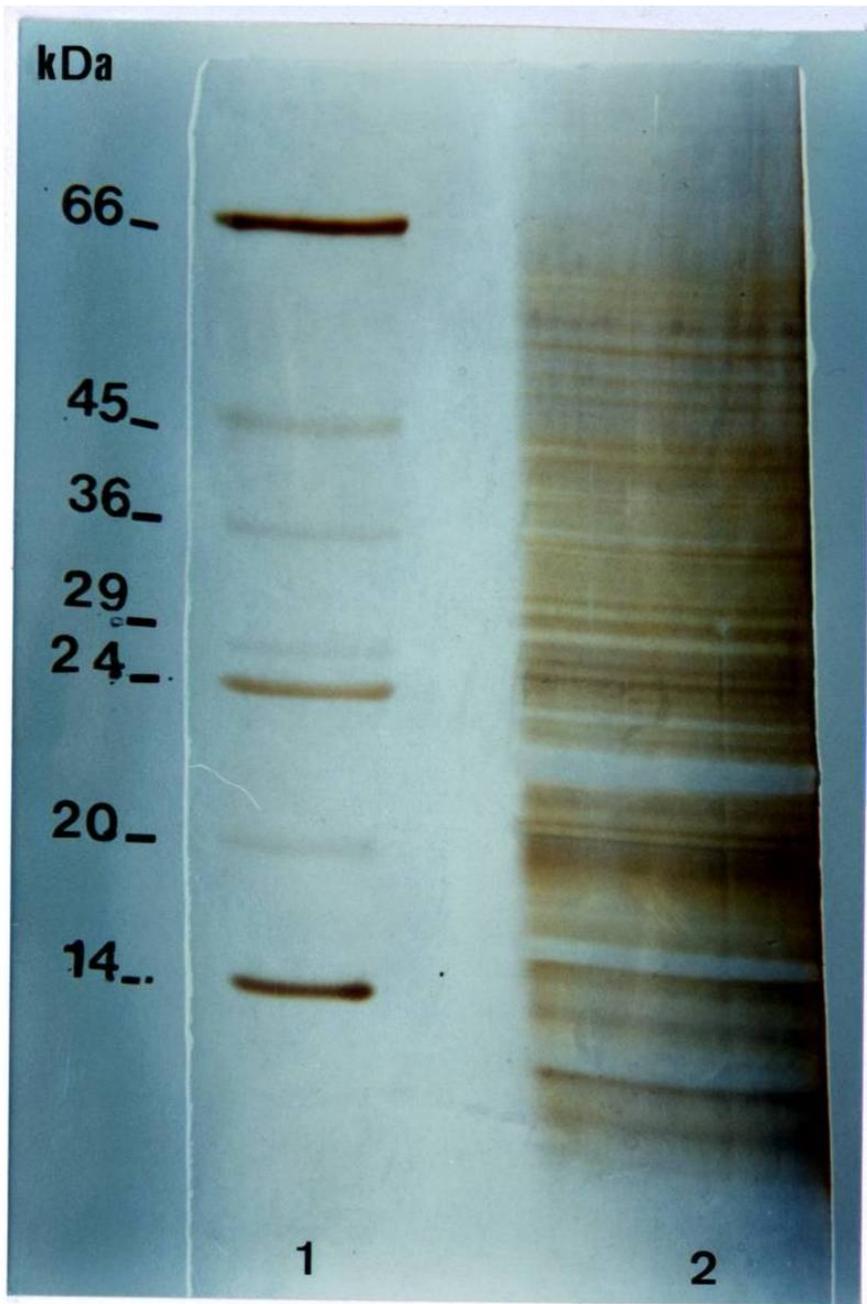


Figura No. 1. Análisis del extracto celular de *N. brasiliensis* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio en gradiente de 8.75-18% T. Carril No. 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril No. 2. Extracto celular de *N. brasiliensis* (50µg). Tinción con nitrato de plata.

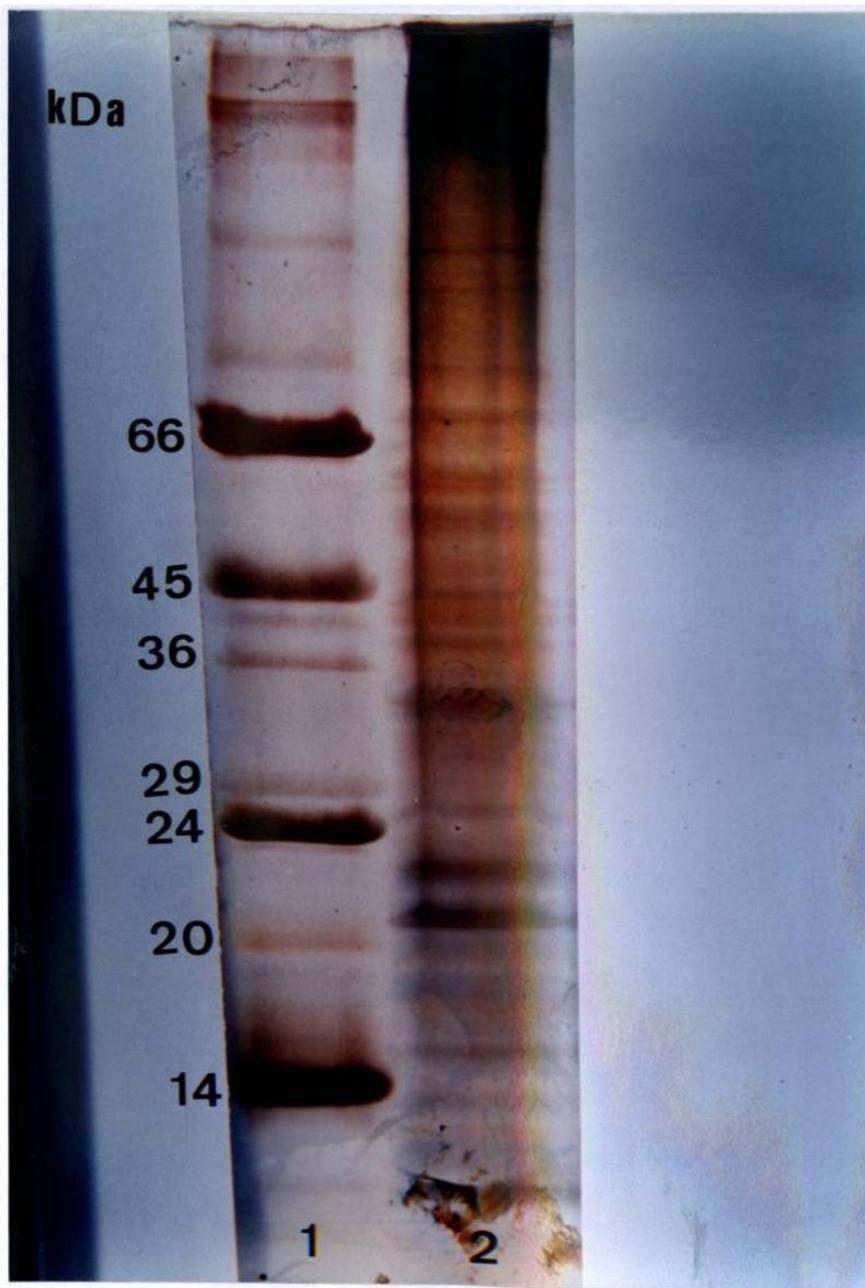


Figura No. 2. Análisis del extracto celular de *N. asteroides* en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio en gradiente de 8.75-18% T Carril No. 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril No. 2. Extracto celular de *N. asteroides* (50 µg). Tinción con nitrato de plata.

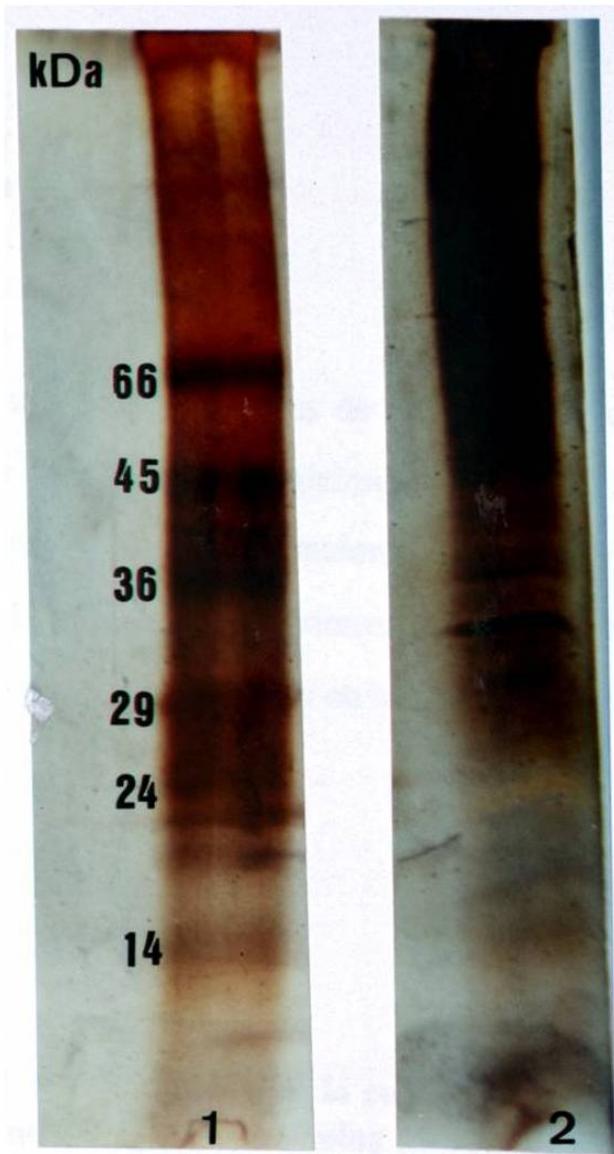


Figura No. 3. Análisis del extracto celular de *M. tuberculosis* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio en gradiente de 8.75-18% T. Carril No.1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril No. 2. Extracto celular de *M. tuberculosis* (16 μ l). Tinción con nitrato de plata.

4. DETERMINACION DE CONCENTRACION OPTIMA DE SBF PARA CELULAS DE MIELOMA Y CELULAS DE BAZO DE RATON BALB/c.

4.1 Células de Mieloma.

Se probaron tres concentraciones de SBF para determinar a que concentración proliferaban mejor las células de mieloma NS-1. En la tabla I se presentan los resultados obtenidos con tres concentraciones de SBF. Se observó que las células que se cultivaron con 10% de SBF presentaron el número más elevado de cuentas por minuto, esto indica mayor proliferación en este medio.

Tabla I Determinación de la concentración óptima de suero bovino fetal para las células de mieloma murino NS-1.

	RPMI sin SBF	RPMI+5% SBF	RPMI+10% SBF
	\bar{X} cpm	\bar{X} cpm	\bar{X} cpm
HT	5192	5132	8146

\bar{X} cpm: Promedio de cuentas por minuto.

HT: Hipoxantina-timidina.

4.2 Células de bazo de ratón BALB/c.

Se realizaron ensayos de incorporación de timidina tritiada para determinar la concentración óptima de SBF para las células de bazo de ratón BALB/c. En la tabla II se muestran los resultados de uno de estos ensayos. De acuerdo a estos resultados se observó, que las células cultivadas en medio con un 5% de SBF presentaron el número más elevado de cuentas por minuto. A pesar de estos resultados se decidió utilizar medio de cultivo con 10% de SBF para el cultivo de las células fusionadas, que fue el medio en el que proliferaron más las células de mieloma, ya que la proliferación de las células del bazo no solo fue influenciada por la concentración de SBF, sino también por los mitógenos utilizados y su concentración según se observa en la tabla.

Tabla II Determinación de la concentración óptima de suero bovino fetal para células de bazo de ratón BALB/c.

MITOGENO	RPMI sin SBF	RPMI + 5 % SBF	RPMI + 10% SBF
	X cpm	X cpm	X cpm
PHA 250 ng	129	17146	10892
PHA 750 ng	281	8574	4062
Con A 250 ng	114	125	659
Con A 750 ng	142	8799	2165
Sin Mitógeno	136	103	188

X cpm: Promedio cuentas por minuto.

PHA: Fitohemaglutinina.

Con A: Concanavalina A.

5. DETERMINACION DE SENSIBILIDAD A AMINOPTERINA EN CELULAS NS-1.

Para determinar la sensibilidad a aminopterina, las células NS-1 se cultivaron en medio de selección y en medio de mantenimiento como control. Se observó que las células NS-1 que se cultivaron en medio con aminopterina (medio de selección), murieron en un lapso de 48-72 hrs. En la tabla III se puede observar que las células cultivadas en medio de selección presentaron cuentas diez veces menores (con 10% de SBF) que el grupo control, comprobando así la eficacia de nuestro medio de selección.

Tabla III Determinación de sensibilidad a aminopterina de las células de mieloma murino NS-1.

	RPMI sin SBF	RPMI + 5% SBF	RPMI + 10% SBF
	\bar{X} cpm	\bar{X} cpm	\bar{X} cpm
HAT	791	863	780
HT	5192	5132	8146

HAT: Hipoxantina-aminopterina-timidina.

HT: Hipoxantina-timidina.

\bar{X} : Promedio cuentas por minuto.

6. PREPARACION DE CELULAS DE MIELOMA PARA FUSION.

Se sembraron tres frascos (de 25 cm³ cada uno) con las células NS-1 a una densidad celular de 1×10^6 células en 10 ml de medio de mantenimiento. Las células presentaron proliferación celular a las 48 hrs por lo que se expandieron mediante una dilución 1:2. Al quinto día de iniciado el cultivo, las células de mieloma se cosecharon y se determinó su número el cual fue de 28.6×10^7 células con una viabilidad de 98%.

7. OBTENCION DE CELULAS DE BAZO DE RATON HIPERINMUNE.

El ratón hiperinmune se sangró y se obtuvieron 1.5 ml de sangre y aproximadamente 175 µl de suero. Del bazo se extrajeron 40.2×10^6 células con una viabilidad del 100%.

8. FUSION CELULAR.

Después de obtener las dos líneas celulares, se sometieron a fusión 40.2×10^6 células del bazo con 13.3×10^6 células de mieloma. Con esta cantidad de células sometidas a fusión, se sembraron un total de 334 microcultivos.

9. ANALISIS DE SOBRENADANTES PARA PRODUCCION DE ANTICUERPOS.

En la figura No. 4 se presenta el resultado de Inmuno-Dot en el que se analizaron 93 sobrenadantes de cultivo. Se observó que siete de ellos fueron positivos. Los híbridos E5 y G12 presentaron la respuesta más intensa, por lo que fueron seleccionados para realizar la clonación. Estos cultivos se expandieron antes de la clonación con la finalidad de incrementar su celularidad y se obtuvieron 21 cultivos. Los sobrenadantes de estos 21 cultivos fueron nuevamente examinados mediante Inmuno-Dot. En la figura No. 5 se presentan los resultados de este ensayo, en donde se observa que todos los sobrenadantes analizados fueron positivos.

10. CLONACION DE HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MEDIANTE DILUCION LIMITANTE.

Para obtener las clonas productoras del anticuerpo de interés, la dilución limitante se realizó con los híbridos E5 y G12. Se determinó el número de células el cual fue de 1.3×10^6 y se sembraron 2 placas de microcultivo.

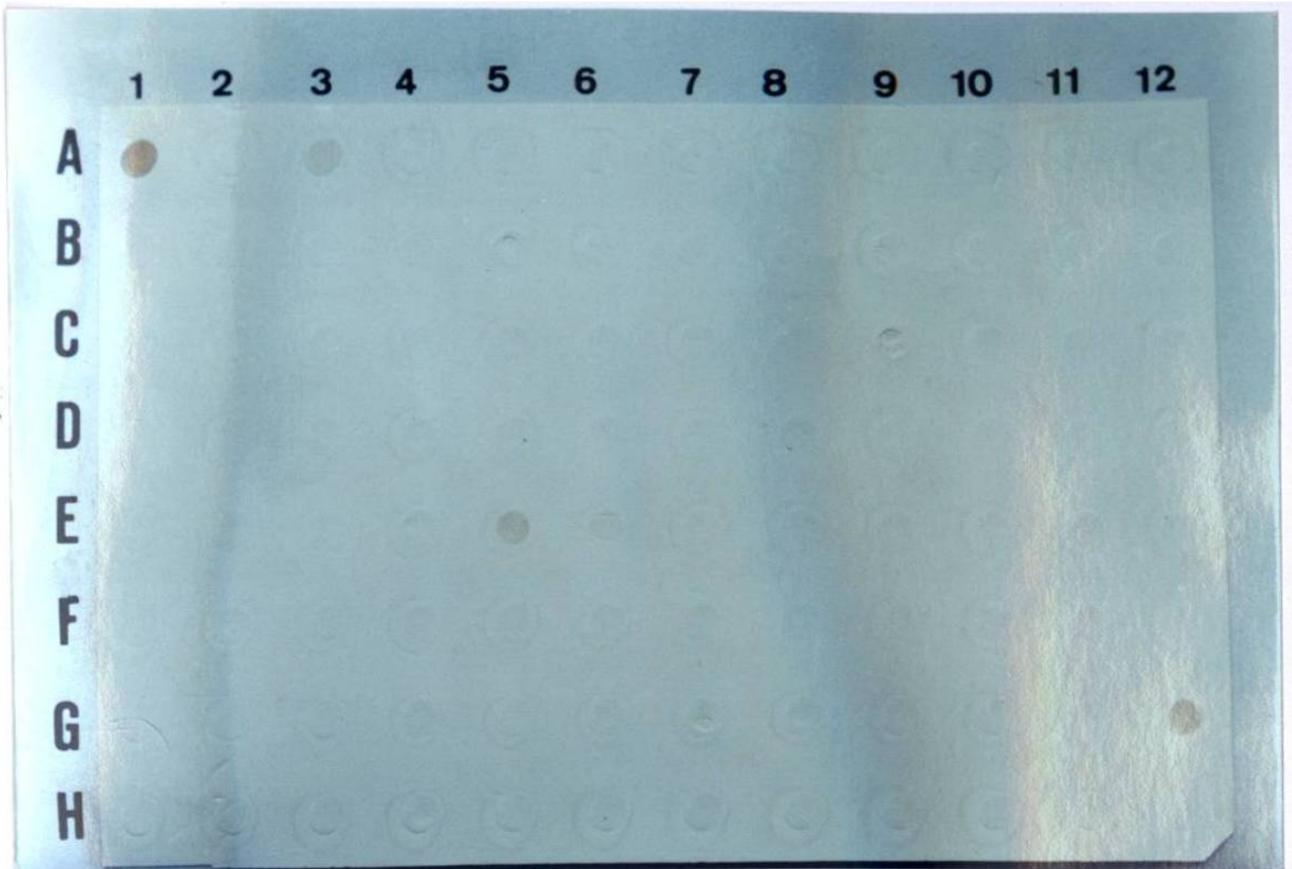


Figura No. 4. Análisis mediante ELISA en papel (Immuno-Dot) de los sobrenadantes de los híbridos. Pozo A1. Suero de conejo inmunizado con el extracto celular de *N. brasiliensis*. Pozo A2. Medio de cultivo. Pozo A3. Suero de ratón BALB/c inmunizado con extracto celular de *N. brasiliensis*. Pozos A4 a H11 sobrenadantes de cultivo.

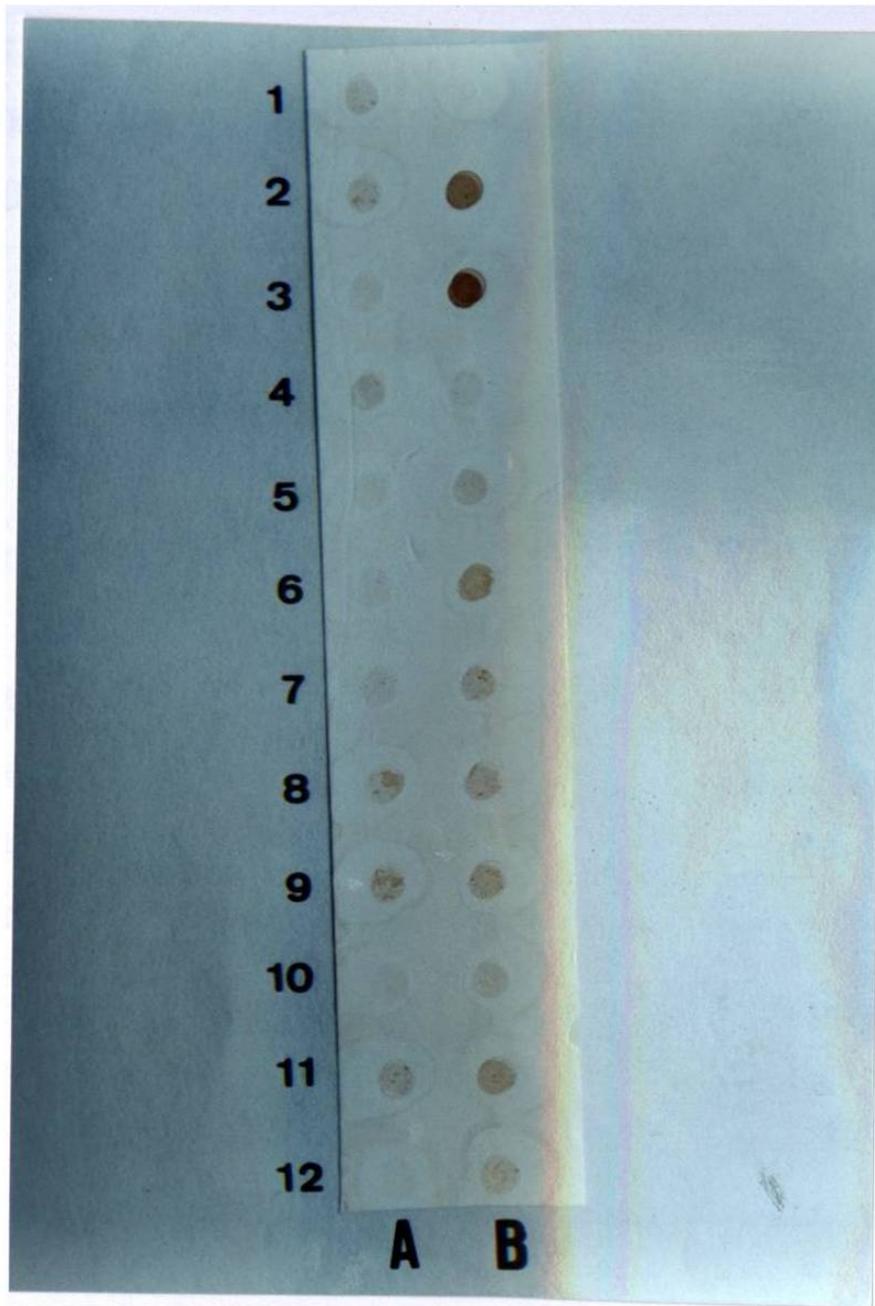


Figura No. 5. Análisis mediante ELISA en papel (Immuno-Dot) de los sobrenadantes los híbridos E5 y G12. Pozo B1. Medio de cultivo. Pozo B2. Suero de conejo inmunizado con el extracto celular de *N. brasiliensis*. Pozo B3. Suero de ratón BALB/c inmunizado con el extracto celular de *N. brasiliensis*. Pozos B4 a B12 y A1 a A12. Sobrendantes de cultivo.

11. DEMOSTRACION DE CLONAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA DE 24 kDa DE *N. brasiliensis*.

Mediante la técnica de Western-blot se analizaron 20 sobrenadantes de cultivo, de los cuales solo 16 fueron positivos (resultados no mostrados). En la figura No. 6 se muestra el Western-blot de 7 sobrenadantes que reconocieron más de una proteína del extracto de *N. brasiliensis*, pero reconocieron con mayor intensidad a las proteínas de 26 y 24 kDa. Se realizó una segunda dilución limitante con los híbridos correspondientes a el sobrenadante que presentó la reacción más intensa contra p-24 y que reaccionó con menor intensidad con otras bandas. En la figura No. 7 se muestra el Western-blot de 4 sobrenadantes que reconocieron exclusivamente a la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis*, y que corresponden a las clonas denominadas A1, A2, A4, H11. La última tira corresponde a la clona denominada D2 que reaccionó con una proteína de mayor peso molecular.

12. DETERMINACION DE ISOTIPO Y SUBISOTIPO.

En la tabla IV se muestran los resultados del ensayo de E.L.I.S.A. con el que se determinó el isotipo de los anticuerpos. De acuerdo a estos resultados el isotipo de las cuatro clonas corresponde a IgG. El sobrenadante de la clona A1 presentó la respuesta

más intensa con una absorbancia de 0.705 seguido por el sobrenadante de la clona A4 con absorbancia de 0.691.

Tabla IV Determinación de isotipo de cuatro de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

	IgM	IgG	IgA
	Abs.	Abs.	Abs.
Suero humano	0.746	0.834	0.708
Clona A1	0.136	0.705	0.152
Clona A2	0.132	0.642	0.136
Clona A4	0.26	0.691	0.096
Clona H11	0.151	0.637	0.143

Abs: Absorbancia.

La tabla V nos muestra los resultados del ensayo de E.L.I.S.A. con el que se determinó el subisotipo de los anticuerpos. El subisotipo de las cuatro clonas fue 2a. En esta determinación el sobrenadante de la clona A4 presentó la respuesta más intensa con 0.550 de absorbancia y la clona H11 con 0.542.

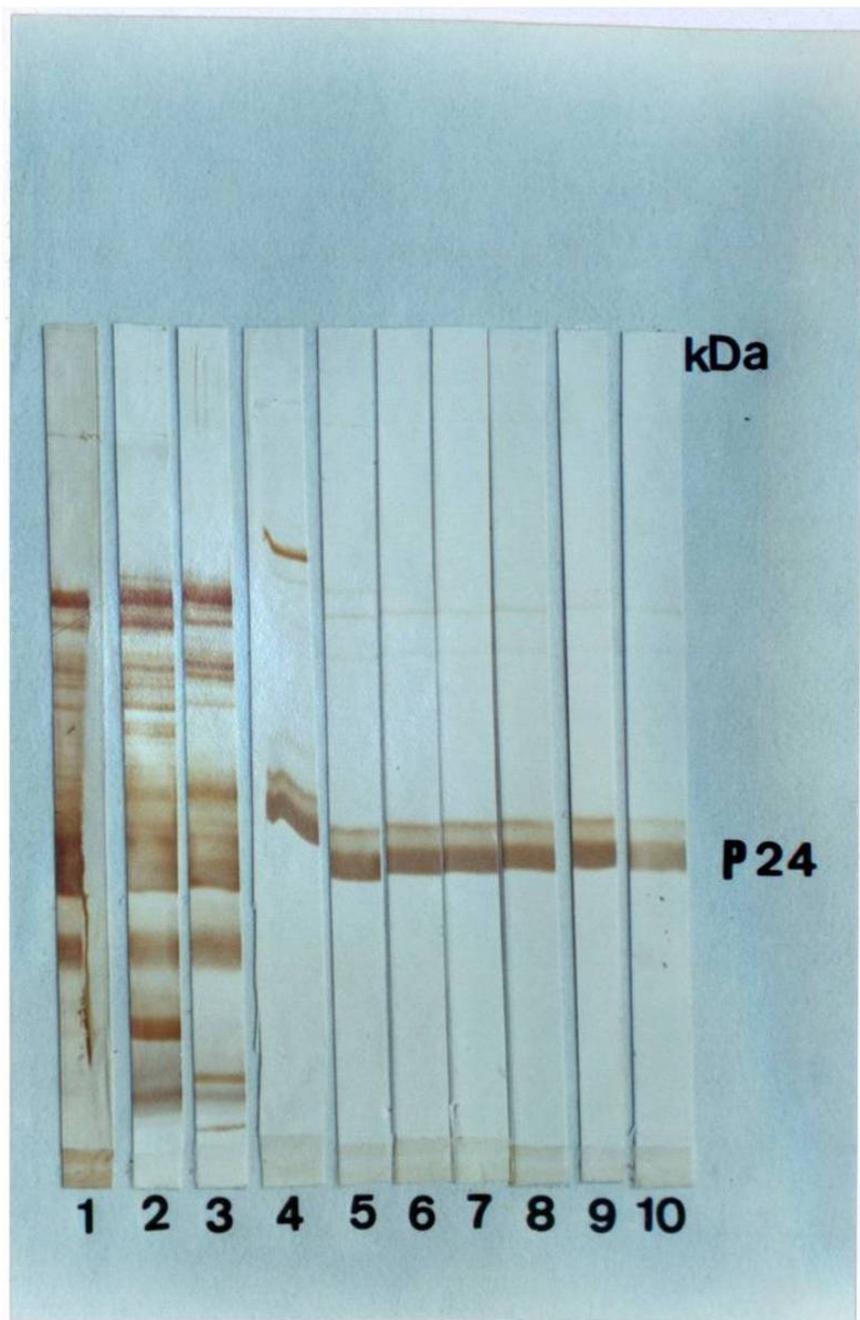


Figura No. 6. Electrotransferencia del extracto celular de *N. brasiliensis* revelada con: Tira No. 1. Suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis*. Tira No. 2. Suero de conejo inmunizado con extracto celular de *N. brasiliensis*. Tira No. 3. Suero de ratón BALB/c inmunizado con extracto celular de *N. brasiliensis*. Tiras 4 a10. Sobrenadante de cultivo.



Figura No. 7. Electrotransferencia del Extracto celular de *N. brasiliensis* revelada con: Tira No. 1. Suero de un paciente con micetoma por *N. brasiliensis*. Tira No. 2. Suero de ratón BALB/c inmunizado con extracto celular de *N. brasiliensis*. Tira No. 3 Sobrenadante clona A1. Tira No. 4. Sobrenadante clona A2. Tira No. 5. Sobrenadante clona A4 Tira No. 6. Sobrenadante clona D2. Tira No. 7. Sobrenadante clona H11. Tira No. 8. Sobrenadante F5.

Tabla V Determinación de subisotipo de cuatro de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
Suero humano	0.627	0.611	0.492	0.571
Suero de ratón	1.402	1.218	1.300	0.153
Clona A1	0.161	0.517	0.156	0.133
Clona A2	0.170	0.436	0.153	0.122
Clona A4	0.189	0.550	0.148	0.106
Clona H11	0.151	0.542	0.149	0.124

Abs: Absorbancia.

13. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los siguientes análisis mediante Western-blot se realizaron para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos. En la figura No. 8 se muestra el Western-blot con el extracto de *N. asteroides*. Ninguno de los sobrenadantes de las tres clonas analizadas reconoció a proteínas de este extracto, como puede observarse en la fotografía. La figura No. 9 corresponde a el Western-blot con el extracto de *M. tuberculosis*. Según se aprecia en esta fotografía ninguno de los sobrenadantes reconoció a proteínas de este extracto. En la figura No. 10 se muestra el Western-blot con el extracto de *N. brasiliensis*. Los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de las clonas A2, A4 y H11 reconocieron a la proteína de

24 kDa en el extracto celular de *N. brasiliensis*. Con estos análisis se determinó que la especificidad de los anticuerpos en los sobrenadantes de las clonas A2, A4 y H11 es exclusiva para *N. brasiliensis*.

14. INMUNOCITOQUIMICA CON FLUORESCENCIA PARA BUSCAR A LA PROTEINA DE 24 kDa EN LA SUPERFICIE DE *N. brasiliensis*.

En la figura No. 11 se muestran 2 fotomicrografías de *N. brasiliensis*; A. intactas y B. deslipidizadas, ambas fueron teñidas con la tinción de Kinyoun (3). Se observa que las bacterias que se deslipidizaron presentaron agregados celulares a diferencia de las bacterias intactas en las que no se presentó este fenómeno. No se observaron diferencias tintoriales de las bacterias intactas en comparación con las deslipidizadas. En la figura No. 12 se muestra una fotomicrografía de *N. brasiliensis* por inmunofluorescencia de uno de los ensayos de inmunocitoquímica en donde no se observó fluorescencia en la superficie de las bacterias, por lo que los sobrenadantes de cultivo de las clonas A2, A4 y H11 se concentraron para realizar los ensayos de inmunocitoquímica con cada una de estas clonas a una concentración mayor del anticuerpo monoclonal. Con el uso de los sobrenadantes concentrados tampoco se observó positividad. Debido a estos resultados y a que en la técnica inmunocitoquímica realizada la reacción antígeno anticuerpo se llevó a cabo con las bacterias en suspensión, se decidió realizar el ensayo directamente en frotis de bacterias preparados en la forma convencional o mediante citocentrifugación. Con los frotis de bacterias no fue posible realizar el ensayo ya que al agregar las soluciones

(sobrenadante de cultivo con anticuerpo monoclonal, anticuerpo conjugado a fluoresceína y PBS), las bacterias se desprendieron de los portaobjetos. Para evitar el desprendimiento de las bacterias, los portaobjetos se trataron antes de realizar los frotis con las siguientes soluciones: a) Metasilicato de Na al 5% b) Gelatina al 0.5, 1 y 1.5%. c) Albumina al 0.5, 1 y 1.5%. d) Resistol (850) al 1%. Desafortunadamente aún con el uso de estos adherentes las bacterias se desprendieron de los portaobjetos. También se realizaron cortes por congelación (de 4 y 6 μm) de una colonia de la bacteria y de un botón de bacterias preparado con albumina y glutaraldehído. Con los cortes por congelación de las bacterias preparadas con albumina también se presentó la dificultad de mantener a las bacterias fijas al portaobjetos. Por tal motivo se prepararon suspensiones bacterianas que fueron incluidas en Lowcryn y se hicieron cortes semifinos de 1 μm . Estos cortes se montaron a portaobjetos y se llevó a cabo la reacción inmunocitoquímica. Los resultados de los ensayos en cortes por congelación de colonias de *N. brasiliensis* y las bacterias incluidas en la resina también fueron negativos.

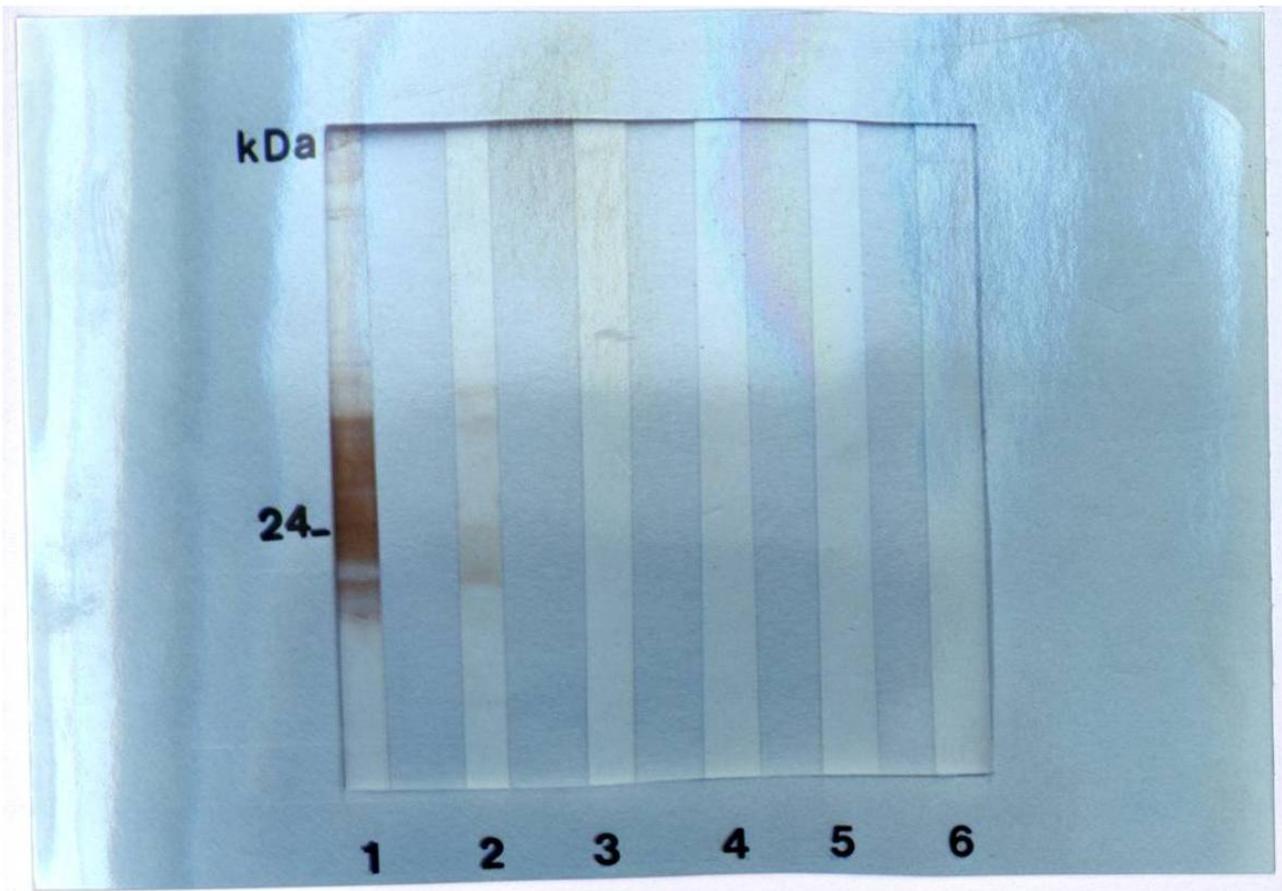


Figura No. 8. Electrotransferencia del Extracto celular de *N. asteroides* revelada con: Tira No. 1. Suero de un paciente con infección por *N. asteroides*. Tira No. 2. Suero de conejo inmunizado con el extracto celular de *N. asteroides*. Tira No. 3. Sobrenadante clona A2. Tira No. 4. Sobrenadante clona A4. Tira No. 5. Sobrenadante clona H11. Tira No. 6. Medio de cultivo.

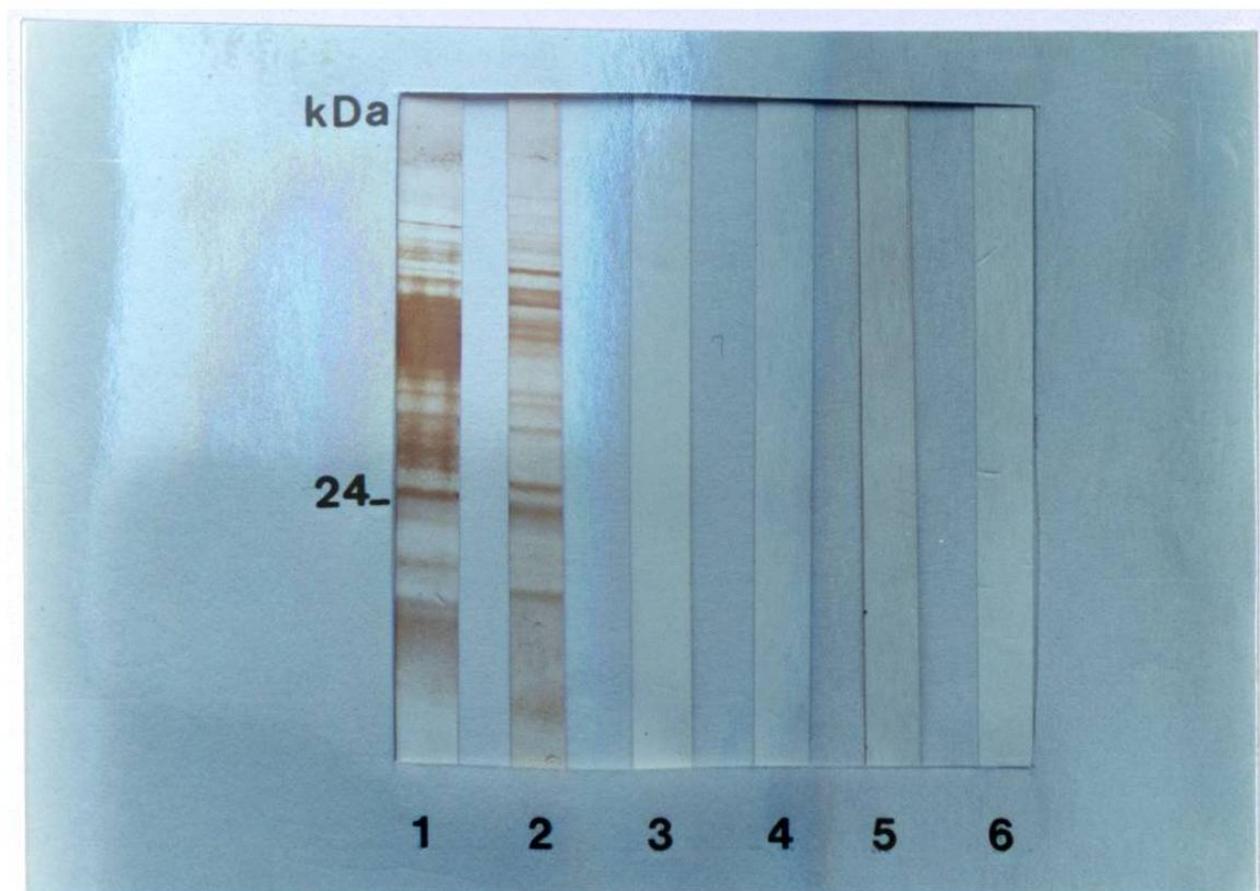


Figura No. 9. Electrotransferencia del Extracto celular de *M. tuberculosis* revelada con: Tiras 1 y 2. Sueros de pacientes con Tuberculosis pulmonar. Tira No. 3. Sobrenadante clona A2. Tira No. 4. Sobrenadante clona A4. Tira No. 5. Sobrenadante clona H11. Tira No. 6. Medio de cultivo.

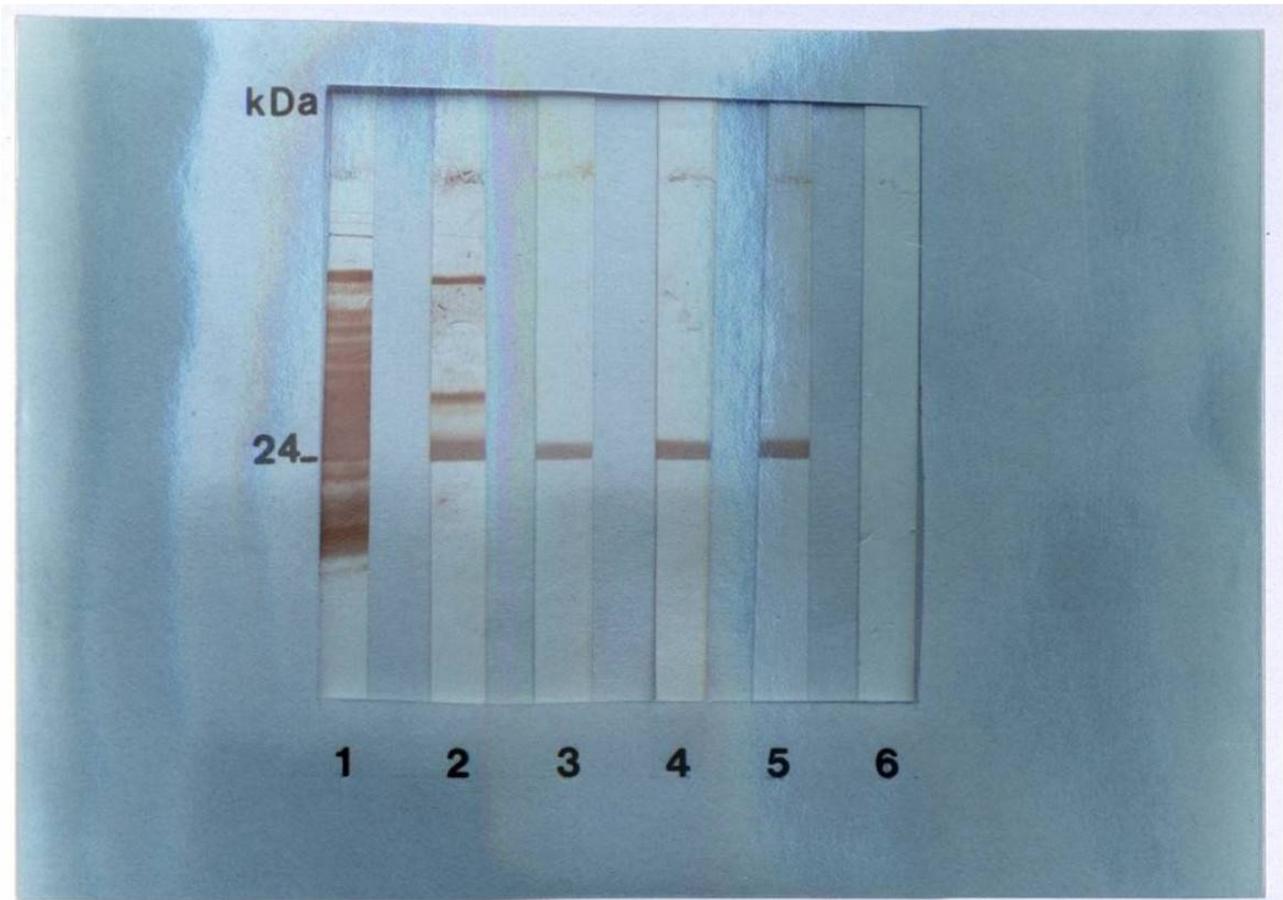


Figura No. 10. Electrotransferencia del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con: Tira No. 1. Suero de conejo inmunizado con *N. brasiliensis*. Tira No. 2. Suero de ratón BALB/c inmunizado con extracto celular de *N. brasiliensis*. Tira No. 3. Sobrenadante clona A2; Tira No. 4. Sobrenadante clona A4. Tira No. 5. Sobrenadante clona H11. Tira No. 6. Medio de cultivo.

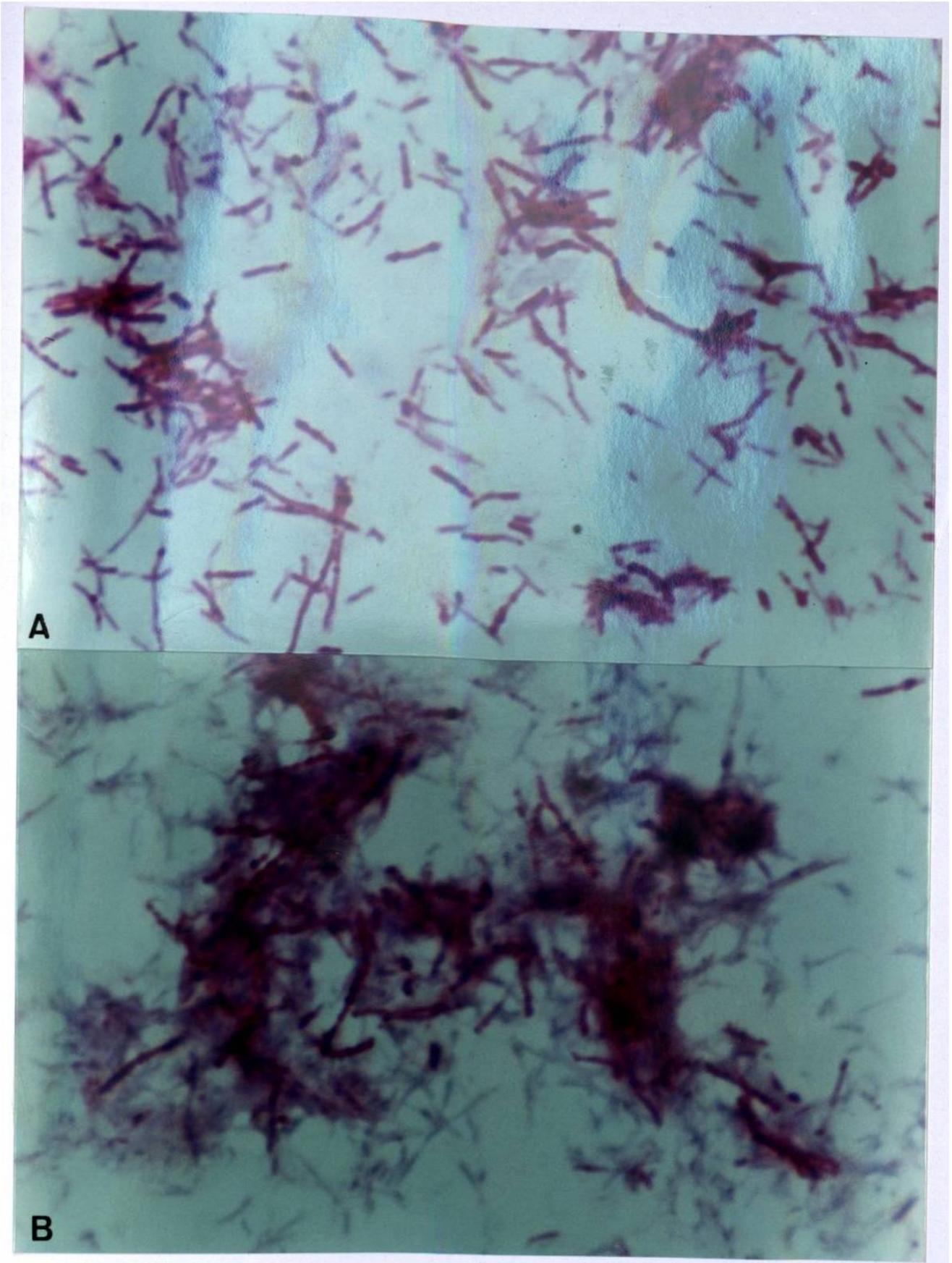


Figura No. 11. Fotomicrografías de *N. brasiliensis* teñida con la tinción de Kinyoun. A. Bacterias intactas. B. Bacterias deslipidizadas (aumento x 1230).

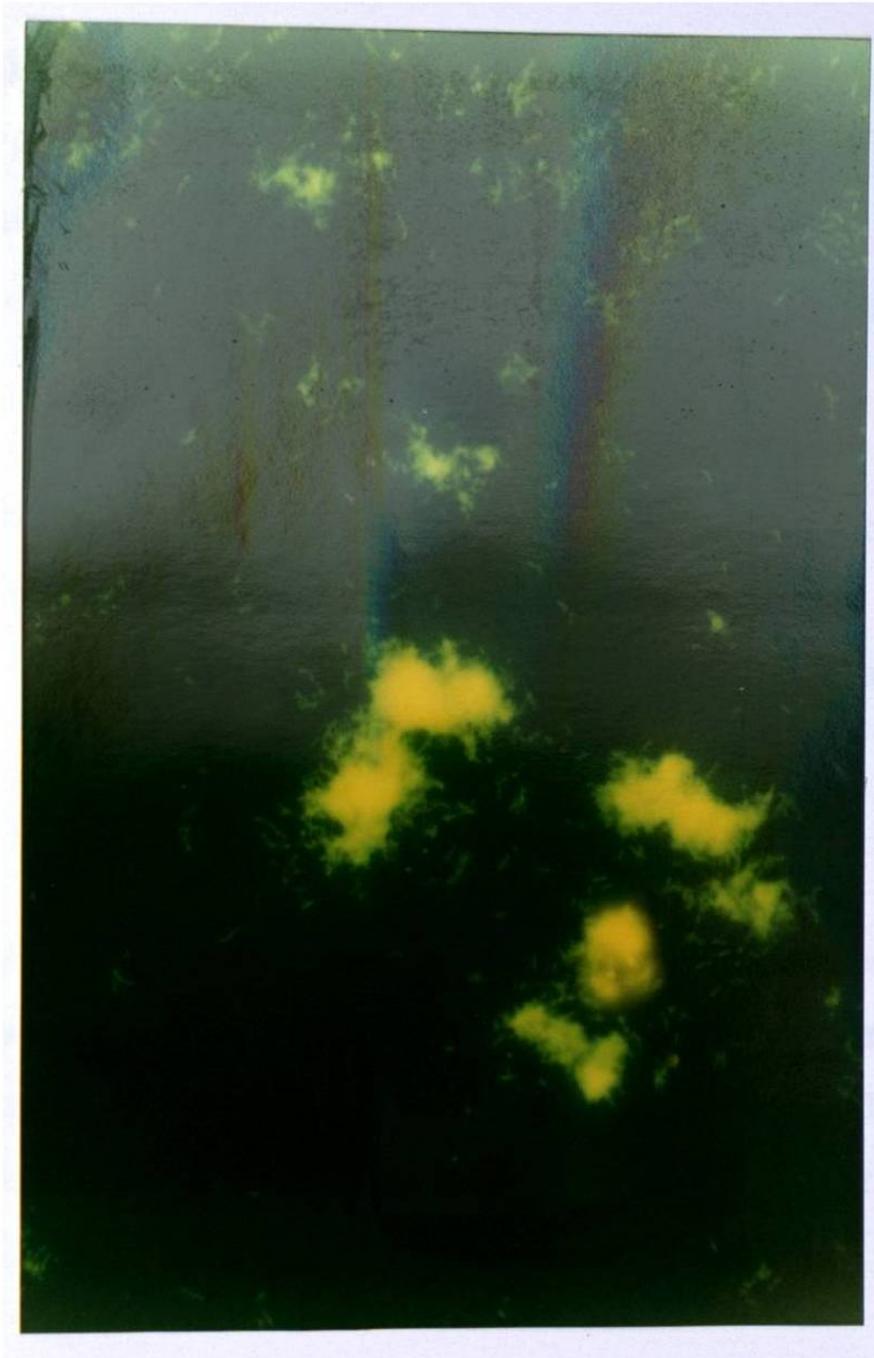


Figura No. 12. Fotomicrografía de *N. brasiliensis* por inmunofluorescencia indirecta incubada con el anticuerpo monoclonal A4 (aumento x 800).

V. DISCUSION

En los últimos años se han publicado diversas investigaciones relacionadas con el estudio de la respuesta inmune contra *Nocardia brasiliensis*, sin embargo ésta no ha sido completamente dilucidada debido a que se desconocen los antígenos importantes para el desarrollo de una respuesta inmune adecuada (9, 10, 18, 41, 45, 61).

En el presente estudio nosotros obtuvimos cuatro anticuerpos monoclonales contra el antígeno inmunodominante de 24 kDa de la bacteria *N. brasiliensis*, los cuales fueron utilizados para la búsqueda de la proteína de 24 kDa en la superficie de la bacteria.

Recientemente, Salinas y cols. en el año de 1992 identificaron tres antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis* (45). La naturaleza, localización y el papel que juegan estos antígenos en la respuesta inmune no son conocidos. Identificar a los antígenos inmunodominantes en la bacteria podrá ser de utilidad para determinar su relevancia en la interacción bacteria-hospedero.

Como ha sido reportado por otros investigadores (25, 29), fue necesario realizar en dos ocasiones la técnica de dilución limitante para finalmente obtener cuatro clones estables productoras de anticuerpos contra el antígeno de 24 kDa (A1, A2, A4, H11).

Es importante mencionar que a partir de la primer dilución limitante, los híbridos obtenidos produjeron anticuerpos principalmente contra los antígenos de 61, 26 y 24 kDa y en mucho menor proporción contra otras bandas. Este hallazgo es similar a lo reportado previamente por Salinas y cols. en la respuesta de producción de anticuerpos observada en sueros de conejos y ratones inmunizados con un extracto celular de *N. brasiliensis* y en sueros de humanos con micetoma por *N. brasiliensis*, confirmando la antigenicidad de estas tres proteínas (45).

En los estudios de inmunoelectrotransferencia en los que se analizaron los sueros de los ratones inmunizados con el extracto celular y el extracto semipurificado de *N. brasiliensis*, observamos que los sueros de estos ratones reconocieron intensamente a la proteína de 24 kDa. Estos resultados son similares a lo reportado por Salinas y cols. confirmando inequívocamente el carácter inmunodominante de la p24 (45).

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales, inmunizamos ratones hembras de la cepa BALB/c. Seleccionamos ratones hembras ya que en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, se observó que estos ratones presentaron mejor respuesta, en cuanto a la producción de anticuerpos, que los ratones machos.

El extracto celular de *N. brasiliensis* que se utilizó como antígeno, se administró en forma de emulsión con adyuvante incompleto de Freund. Utilizamos adyuvante incompleto en vez del adyuvante completo, porque las *Mycobacterias* presentes en este último también son inmunógenos e inducen anticuerpos anti-*Mycobacterias* que presentan reacción cruzada con la respuesta anti-*N. brasiliensis* (25).

En experimentos previos realizados en el departamento de Inmunología en los que se inmunizaron ratones BALB/c con la proteína purificada de 24 kDa, se observó pobre inmunogenicidad de esta proteína, pero como se ha descrito previamente, la proteína de 24 kDa es un antígeno inmunodominante en las infecciones naturales o experimentales en las que se utiliza como antígeno bacterias completas o mediante inmunización con extractos celulares (45). Debido a estas observaciones y con la finalidad de obtener en mayor proporción a las células productoras de anticuerpos contra la proteína de 24 kDa, los ratones se inmunizaron inicialmente con el extracto celular y la última inmunización se realizó con un extracto semipurificado que contiene a la proteína de 24 kDa.

Al determinar el isotipo de los anticuerpos de las clonas A1, A2, A4 y H11, observamos que las cuatro clonas (100%) producen anticuerpos del isotipo IgG a diferencia de lo obtenido por Jiménez y cols. quienes reportaron que solo el 33% de los anticuerpos monoclonales obtenidos por ellos fueron del isotipo IgG (25). Esta discrepancia con nuestros resultados pudiera ser atribuida inicialmente a los esquemas de inmunización utilizados ya que estos investigadores utilizaron un esquema de dos

inmunizaciones, administrando la segunda inmunización tres días previos a la fusión, por lo que es difícil encontrar mayor proporción de anticuerpos de un isotipo diferente a IgM. Es importante tomar en cuenta que el isotipo de los anticuerpos no solo depende del esquema de inmunización sino de las características del antígeno administrado, ya que la respuesta de anticuerpos a un antígeno depende de si el antígeno es reconocido por células T y por B (antígenos T dependientes). Sin embargo existen en la naturaleza antígenos capaces de activar a células B sin la cooperación de T, por ejemplo lipopolisacárido, flagelina bacteriana etc., que son antígenos timoindependientes.

Los resultados de nuestro estudio muestran que el 100% de los anticuerpos monoclonales contra la proteína de 24 kDa son isotipo IgG. Esto sugiere fuertemente que el determinante antigénico de p24 contra el que reaccionaron estos anticuerpos es timodependiente (1, 43).

Con la finalidad de conocer más características de los anticuerpos monoclonales, que serán de utilidad en estudios posteriores, se determinó el subisotipo de los anticuerpos IgG producidos. Observamos que el 100% de los anticuerpos monoclonales corresponde al subisotipo 2a. Estos resultados concuerdan con lo observado por Olds y cols. quienes reportaron que el 100% de los anticuerpos monoclonales contra *Mycobacterias* y *Nocardias* de isotipo IgG corresponden al subisotipo 2a (37). El hallazgo de que los anticuerpos monoclonales IgG son isotipo 2a

corroborar lo propuesto previamente, que el determinante antigénico contra el que están dirigidos estos anticuerpos es timodependiente.

En trabajos previos de producción de anticuerpos monoclonales realizados por otros investigadores, han reportado que los anticuerpos monoclonales obtenidos por ellos presentaron reacción cruzada con bacterias relacionadas filogenéticamente (4, 16, 25, 29). A diferencia de estos estudios nosotros demostramos, mediante la técnica de inmuno-electrotransferencia y con el uso de extractos de *N. asteroides* y *M. tuberculosis* H37-Ra, que los anticuerpos de las clonas A2, A4 y H11 son específicos para *N. brasiliensis* ya que no reaccionaron con extractos de *N. asteroides* ni con *M. tuberculosis*. Estos resultados sugieren que los anticuerpos monoclonales obtenidos por nosotros son específicos para *N. brasiliensis*. Sin embargo, la absoluta certeza de especificidad podrá ser hecha solo después de probar los anticuerpos monoclonales con un número mayor de bacterias relacionadas.

Los anticuerpos monoclonales fueron analizados mediante las técnicas de E.L.I.S.A. y Western-blot, en donde se observó buena respuesta de los cuatro anticuerpos (A1, A2, A4 y H11), por lo que resultó interesante y a la vez sorprendente para nosotros los resultados negativos en la técnica de inmunofluorescencia. Dificultades similares en los estudios de inmunofluorescencia fueron reportados por Rambukkana y cols. trabajando con anticuerpos monoclonales contra *M. tuberculosis* en donde el 80% de los monoclonales obtenidos por ellos presentaron buena respuesta al Western-blot, pero no fueron útiles en los estudios de inmunofluorescencia (40). Es

probable que los resultados obtenidos con inmunofluorescencia se deban a que la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* no se encuentra en la superficie o que el determinante antigénico contra el que están dirigidos los anticuerpos monoclonales no está accesible.

Firget, Mierendoff y Olds reportaron que algunos anticuerpos monoclonales se comportan de manera diferente de acuerdo al ensayo en que son utilizados (17, 34, 37). La diferencia de resultados, de acuerdo a el ensayo utilizado, podría explicarse en base a que cada técnica requiere de una afinidad de unión entre antígeno y anticuerpo diferente para obtener un resultado positivo.

Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser útiles en la localización de antígenos de carácter glicolípido que se encuentran en la superficie de *Mycobacterias* (29, 40). Existen muy pocos estudios que reporten exitosamente la localización de antígenos de carácter proteico en la superficie de *Mycobacterias* o bacterias relacionadas (8, 40, 57).

En el año de 1988 en un estudio de estructura de *Mycobacterias*, Young reportó que la pared celular de estas bacterias, contiene una gran cantidad de glicolípidos y una baja cantidad de proteínas (62). Es un hecho conocido que la pared de *Mycobacterias*, *Corynebacterias* y *Nocardias* son similares (48).

De acuerdo a estas últimas observaciones podemos suponer que en caso de que la p-24 de *N. brasiliensis* se encontrara en la superficie de la bacteria su densidad no es la adecuada para obtener un resultado positivo en inmunofluorescencia.

Con los análisis realizados en este trabajo, no es posible descartar otras posibilidades que expliquen los resultados negativos obtenidos en inmunofluorescencia tales como:

- 1) Modificaciones proteicas durante el transporte de p-24 a pared celular, lo que ocasionaría la pérdida de determinantes antigénicos
- 2) Modificación de los determinantes antigénicos, reconocidos por los anticuerpos monoclonales, con las condiciones experimentales usadas en las técnicas de inmunocitoquímica.
- 3) Los determinantes antigénicos reconocidos en las técnicas de E.L.I.S.A. y Western-blot, son diferentes a los determinantes antigénicos presentes en las bacterias intactas.

Para saber porqué a pesar de su comprobada especificidad los anticuerpos monoclonales obtenidos por nosotros no fueron útiles en los estudios de inmunofluorescencia, será necesario llevar a cabo experimentos adicionales que incluyan el uso de técnicas inmunocitoquímicas para microscopía electrónica, lo cual será objeto de estudios posteriores.

Independientemente de los resultados negativos en la búsqueda de la p24 en la superficie de *N. brasiliensis*, los anticuerpos monoclonales obtenidos por nosotros tienen usos potenciales de importancia:

- 1) Podrán ser de utilidad para estudiar el papel de la p-24 en la patogénesis del micetoma por *N. brasiliensis*.
- 2) Permitirán continuar con los estudios de localización del antígeno de 24 kDa sobre la bacteria al hacer las modificaciones necesarias a las técnicas inmunocitoquímicas actuales.
- 3) Servirán para el aislamiento y purificación de la proteína de 24 kDa que ha de mostrado ser de gran utilidad para el diagnóstico de micetoma por *N. brasiliensis*(47).

CONCLUSIONES

1.- Con el esquema de inmunización empleado en este trabajo, obtuvimos cuatro clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína de 24 kDa de *Nocardia brasiliensis*.

2.- Los anticuerpos monoclonales obtenidos son del isotipo IgG, subisotipo 2a.

3.- Los anticuerpos monoclonales obtenidos no presentaron reacción cruzada con *Nocardia asteroides*, ni con *Mycobacterium tuberculosis* H 37-Ra.

4.- Con las técnicas inmunocitoquímicas empleadas no se observó a la proteína de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*.

VI. LITERATURA CITADA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober J.S. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2nd edition. W.B. Saunders Co. pp 189-203.
2. Arenas, R. 1988. Dermatología. Atlas, Diagnóstico y Tratamiento. 1er ed. Mc Graw-Hill. México. pp 415-421.
3. Balows, A., Hausler, W.J.Jr.,Hermann, K.L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. 1991. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. ASM. Washington.
4. Barbolini, G., Bisetti, A., Colizzi, V., Damiani, G., Migaldi, M. and Vismara, D. 1989. Immunohistologic analysis of mycobacterial antigens by monoclonal antibodies in tuberculosis and mycobacteriosis. Hum. Pathol. 20:1078- 1083.
5. Beaman, B.L., Gershwin, M.E., Ahmed,A., Scates, S.M. and Deem, R. 1982. Response of(CBA/N x DBA2)F1 mice to *Nocardia asteroides*. Infect. and Immun. 35:11-116.
6. Beaman, B.L. and Beaman, L. 1994. *Nocardia* Species: Host-Parasite Relationships. Rev. Clin. Microbiol. 7:213-264.
7. Beaman, B.L. 1975. Structural and biochemical alterations of *Nocardia asteroides* cells walls during its growth cycle J. Bacteriol. 123:1235-1253.
8. Britton, W.J., Hellqvist, L., Garsia, R. J. and Basten, A. 1987. Dominant cell wall proteins of *Mycobacterium leprae* reconaized by monoclonal antibodies. Clin. Exp. Immunol. 67:31-35.
9. Callen, P.J. and Kingman, J. 1984. Disseminated cutaneous *Nocardia brasiliensis* infection. Pediat. Dermatol. 2:49-51
10. Conde, C., Mancilla, R., Fresan, M. and Ortiz-Ortiz L. 1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. Infec. and Immun. 40:1218-1222.

11. Clyde, M.C. 1967. Los hongos y el hombre. 2a. ed. Ed. Interamericana. México. pp. 155.
12. Coons, A.H., Leduc, E.H., Connoly, J. 1956. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* **102**:49-59.
13. Cotion, R.G.H. and Milstein, C. 1973. Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells. *Nature.* **244**:42-43.
14. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., McCarty, M. 1978. *Tratado de Microbiología* 2a ed. Salvat Editores. México. pp 894.
15. Divo, A. 1977. *Microbiología Médica*. 3a ed. Interamericana México. pp 377-380.
16. El-Zaatari, F.A., Reiss, A., Yakrus, M.A., Bragg, S.L. and Kaufman, L. 1986. Monoclonal antibodies against soelectrically focused *Nocardia asteroides* proteins characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer Blot Method. *Diagnostic Immunology.* **4**:97-106.
17. Firget, B., Ohaniance, L.D. and Glberg, M.E. 1984. Some monoclonal antibodies raised with native protein bind preferentially to the denaturated antigen. *Mol. Immunol.* **21**:673-677.
18. Folb, P.I., Timme, A. and Horowitz, A. 1977 *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* **18**:459-466.
19. Frehel, C. and Rastogi, N. 1987. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome lysosome fusion inhibition event. *Infect. Immun.* **55**:2916-2921
20. Gebhardt, P.L. 1972. *Microbiología*. 4a. ed. Ed. Interamericana. México. pp. 338-339.
21. González-Ochoa, A. y Baranda, F. 1953. Una prueba cutánea para el diagnóstico del micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.* Tomo XIII:189-198.

22. González-Ochoa, A., Shibayama, H., Felix, D. and Anaya, M. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Excerpta Med. Int. Cong. Ser.* 55:542-551.
23. González-Ochoa, A. 1975. Geografía de las Micosis Profundas. *Rev. Inv. Salud Pub.* 35:85-96.
24. Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
25. Jiménez, T., Díaz, A.M., Zlotnik, H. 1990. Monoclonal Antibodies to *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* antigens. *J. Clin. Microbiol.* 28:87-91.
26. Kenneth, S.W. and Mahmoud, A.F. 1984. *Tropical and geographical medicine.* 1a ed. Ed. Mc Graw-ill. pp 934-941.
27. Köhler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.* 256:495-498.
28. Köhler, G. and Milstein, C. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6:511-519.
29. Kolk, A. H. J., Evers, R. Groothuis, G.D., Gilis, H. and Kuijper, S. 1989. Production and characterization of monoclonal antibodies against specific serotypes of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex. *Infect. and Immun.* 57:2514-25208.
30. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
31. Lechevalier, H.A., Mair, N.S., Sharpeand, M.E. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacterology.* 1a ed. The Williams and Williams Co. Vol 2. pp 1458.
32. Lowry, O.H., N.J. Rosenburgh, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
33. Mc. Neil, M.M. and Brown, J.M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Rev. Clin. Microbiol.* 17:357-417.

34. Mierendoff, T.C. and Diamond, R.L. 1983. Functional heterogeneity of monoclonal antibodies using different screening assays. *Anal. Biochem.* **135**:221-229.
35. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. 1979. *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. p.351-372.
36. Myrvick, N.Q., Pearsall, N. and Weiser, R.S. 1977. *Bacteriología y Micología Médica*. 1a ed. Ed. Interamericana. p 35-428.
37. Olds, G. R., Sanson, J, A. and Daniel, M. T. 1987. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 epitopes by using a panel of 19 monoclonal antibodies. *J. of Clin. Microbiol.* **5**:471-475.
38. Ortiz-Ortiz, L. and Bojalil, N.F. 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **12**: 225-289.
39. Pontecorvo, G. 1975. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genetics.* **9**: 397-400.
40. Rambukkana, A., Das, P.k., Chand, A., Baas, J.G., Groothuis, D.G. and Kolk, A.H.J. 1991. Subcellular distribution of monoclonal antibody defined epitopes on immunodominant *Mycobacterim tuberculosis* proteins in the 30-kDa region: Identification and localization of 29/33-kDa doublet proteins on Mycobacterial cell wall. *Scand. J. Immunol.* **33**:763-775.
41. Rico, G., Ochoa, R., Oliva, A., González-Mendoza, A., Walker, S.M., Ortiz-Ortiz, L. 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted to antigen specific B cell. *J. Immunol.* **129**: 1688-1693.
42. Rippon, J.W. 1982. *Mycetoma Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 2a ed. W.B. Saunders eds. pp 79-94.
43. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. 1988. *Immunology* 2nd. ed. Gower Medical Publishing. London. p 3.1-3.10.
44. Ruiz-Argüelles, A. 1982. Anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas. La tecnología más revolucionaria en la inmunobiología. *Rev. Invest. Clin. Mex.* **34**: 79-84

45. Salinas-Carmona, M.C., Vera, L., Welsh, O. and Rodriguez, M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* 276:390-397
46. Salinas-Carmona, M.C., Perez, L.I., Welsh, O. and Rodriguez M. 1992. Identification of Intracellular Proteasas from *Nocardia brasiliensis*. *J. Mycol. Med.* 2:183-188.
47. Salinas-Carmona, M.C., Welsh, O. and Casillas-Quintana, S.M. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microb.* 31:2901-2906.
48. Sandoval, T.H. 1993. Actinomicetos. 1er. ed. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
49. Saul, A. 1983. Lecciones de dermatología. 10a ed. Ed. Francisco Mendez Cervantes. México. p 127-139.
50. Serrano, J.E., Sandoval A.H.. 1992. Manual de Laboratorio Para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos. Universidad de los Andes. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico. Consejo de Publicaciones Mérida-Venezuela.
51. Sneath, H.A.P. ed al. 1986. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. 2a. ed. Ed. Williams & Wilkinks Co. Baltimore, Md. pp. 1459.
52. Thompson, K.M. 1988. Human monoclonal antibodies. *Immunology Today.* 9:
53. Tigh, R.R. and Bartlett, M.S. 1981. Actynomycetoma in the United States. *Rev. Infect. Dis.* 3: 1139-1150.
54. Tsukamura, M. 1970. Relationship between *Mycobacterium* and *Nocardia*. *Japan J. Microbiol.* 14:187-195.
55. Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, M.C., Welsh, O. and Rodriguez M. 1992. Isolation and Purification of two immunodominants proteins of *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microb.* 30: 1183-1188.
56. Velasco, C.O. y Zavala, J. 1978. Nociones de Micología. 1a ed. Ed. F. Cervantes. p 97-108.

57. Watson, J.D. 1989. Leprosy: understanding protective immunity. *Immun. Today*. 10:218-226.
58. Welsh, O., López, R. 1985. Micetomas con diseminación pulmonar. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* 13:517-523.
59. Welsh, O., Saucedo, E., González, J. and Ocampo, J. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:443-448.
60. Williams, T., Sharpe, M.E., Holt, J.G. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md. p. 2333-2362.
61. Ximénez, C., Melendro, E.I., González- Mendoza, A. García, A.M., Martínez, a. and Ortiz-Ortiz, L. 1980. Resistance to *Noardia brasiliensis* infection in mice immunized with either Nocardia or BCG. *Mycophatology*. 70:117-122.
62. Young, D.B. 1988. Structure of Mycobacterial antigens. *British. Med. Bolletin.* 44:562-570.

APENDICE A. EQUIPO

1. Agitador magnético (Corning) RC-353.
2. Aparato de microfiltración (BIO-RAD).
3. Bomba peristáltica (LKB).
4. Baño de agua (American) B6990.
5. Cámara de electroforesis (BIO-RAD) Model Mini Protean II.
6. Cámara de electroelución (BIO-RAD).
7. Cámara de transferencia (BIO-RAD) Model Trans Blot Cell.
8. Cámara de transferencia (BIO-RAD) Mini Trans Blot Cell.
9. Campana de flujo laminar (Contamination Control Inc.).
10. Centrífuga (Beckman) J2-21.
11. Centrífuga (Beckman) TJ-6.
12. Centrífuga (Clay Adams) Serofuga II.
13. Cosechadora automática múltiple (M.A. Bioproducts).
14. Equipo para filtración (Millipore).
15. Espectrofotómetro (Zeiss) PMQ-3.
16. Fotomicroscopio (Zeiss) Axioplan.
17. Frascos para cultivo (Corning).
18. Fuente de poder (BIO-RAD) Model 3000/300.
19. Fuente de poder (BIO-RAD) Model 1000/500.
20. Fuente de poder (LKB) Bromo.
21. Formador de gradiente (BIO-RAD) Model 385.
22. Homogenizador (Ever-bach).
23. Incubadora (J.M. Ortiz).
24. Incubadora (Control Enviroment) NARCO.
25. Incubadora con agitación (GCA/Presicion Scientific).
26. Invertoscopio (Zeiss) 47 12 03 - 9901.
27. Lector Microelisa (DIA MEDIX) BP-96.
28. Liofilizadora (VIRTIS).
29. Microscopio (Zeiss).
30. Micro-Shaker II (Dynatech).
31. Pipet-aid (Drummond Scientific Co.).
32. Placas para ELISA (BIO-RAD).
33. Placas para cultivo (Costar).
34. Potenciómetro (Beckman) 43 pH Meter.
35. Refrigerador (American Sci.) Ultra low.
36. Refrigerador (Kelvinator).

37. Thermix Stirrer (Fisher).
38. Thermolyne Maxi Mix (Laboratory Equipment).
39. Tubos eppendorf (BIO-RAD).
40. Tubos cónicos (Falcon).
41. Tubos para criopreservación (Inter Med).
42. Ultracentrífuga (Beckman) L8-70M.
43. Unidades de filtración 0.22 μm (Millipore).

· APENDICE B. REACTIVOS QUIMICOS

1. Acetato de magnesio (Mallinckodt).
2. Acetato de sodio (Merck).
3. Acido acético glacial (Monterrey).
4. Acido cítrico (Monterrey).
5. Acido clorhídrico (Merck).
6. Acido nítrico (Merck).
7. Acido sulfúrico (Monterrey).
8. Acrilamida (SIGMA).
9. Adyuvante incompleto de Freund (SIGMA).
10. Agar Sabouraud (Merck).
11. Albúmina sérica bovina (SIGMA).
12. Amberlita (LKB).
13. Amortiguador de referencia pH 7 (SIGMA).
14. Amortiguador de referencia pH 4 (SIGMA).
15. Anticuerpo anti-IgG de conejo desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA).
16. Anticuerpo anti-IgG de humano desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA).
17. Anticuerpo anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA).
18. Anticuerpo anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado a isotiocianato de fluoresceína (SIGMA).
19. Anticuerpos anti-isotipos y subisotipos de ratón (BIO-RAD).
20. Azul de bromofenol (SIGMA).
21. Azul de Coomasie R-250 (BIO-RAD).
22. Beta-mercaptoetanol (SIGMA).
23. Bicarbonato de Sodio (SIGMA) HYBRI MAX.
24. Bicarbonato de Sodio (Monterrey).
25. Carbonato de sodio anhidro (Fisher Scientific).
26. Cloruro de amonio (SIGMA).
27. Cloruro de potasio (Merck).
28. Cloruro de sodio (Monterrey).
29. Concanavalina A (SIGMA).
30. 3,3'-Diaminobenzidina (SIGMA).
31. Dicromato de potasio (Merck).
32. 2,5-Difeniloxazol (SIGMA).

33. Dihidrógeno fosfato de potasio (Merck).
34. Dimetil sulfoxido (SIGMA).
35. Dodecilsulfato de sodio (SIGMA).
36. Etanol (Merck).
37. Eter (Merck).
38. Fitohemaglutinina (SIGMA).
39. Folin & Ciocalteu's fenol (SIGMA).
40. Fosfato dibásido de sodio anhidro (Monterrey).
41. Fosfato de sodio monobásico (Monterrey).
42. Formol (Monterrey).
43. Gelatina de pescado (Norland).
44. Gentamicina (Shering).
45. Glicerol (SIGMA).
46. Glicina (SIGMA).
47. L-Glutamina (SIGMA) HYBRI MAX.
48. Hipoxantina-timidina (SIGMA) HYBRI MAX.
49. Hipoxantina-aminopterina-timidina (SIGMA) HYBRI MAX.
50. Hidróxido de amonio (SIGMA).
51. Hidróxido de Sodio (Fisher).
52. Leche descremada "Svelty" (Nestle).
53. Marcadores de peso molecular SDS-7 Dalton Marck (SIGMA).
54. Medio de infusión cerebro-corazón (DIFCO).
55. Medio de cultivo RPMI-1640 (Hy-Clone).
56. Membrana de diálisis 250 9U (SIGMA).
57. Metanol (Merck).
58. Nitrato de plata (Merck).
59. N,N'-Metilenbisacrilamida (SIGMA).
60. N,N,N',N',-tetrametiletilendiamina (SIGMA).
61. O-Fenilendiamina dihidroclorada (SIGMA).
62. Papel filtro mini Mash glass fiber (M.A. Bioproducts).
63. Papel de Nitrocelulosa (BIO RAD).
64. Papel Whatman No 1.
65. Peróxido de hidrógeno al 30% (Monterrey).
66. Persulfato de amonio (SIGMA).
67. 2,2'-(1,4-Fenilen)bis (5 feniloxazol) (Merck).
68. Polietilenglicol (PEG PM 1300-1600) (SIGMA).
69. Suero de bovino fetal (Hy-Clone).
70. Sulfato de cobre (Merck).
71. Timidina 3H (Amersham).
72. Tolueno (Merck).

73. Trizma-base (SIGMA).
74. Trizma ácido clorhídrico. (SIGMA).
75. Tween 20 (SIGMA)

APENDICE C. ABREVIATURAS

1.	AgNO ₃	Nitrato de plata.
2.	BHI	Infusión cerebro corazón (Brain heart infusion).
3.	BSA	Albúmina sérica bovina (Bovin serum albumin).
4.	°C	Grados centígrados.
5.	% C	Porciento de agente entrecruzador (bis-acrilamida).
6.	cm	Centímetro(s).
7.	ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).
8.	g	Unidad de gravedad.
9.	gr	Gramos.
10.	HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina.
11.	HCl	Acido clorhídrico.
12.	HNO ₃	Acido nítrico.
13.	hrs.	Horas.
14.	IgA	Inmunoglobulina A
15.	IgG	Inmunoglobulina G.
16.	IgM	Inmunoglobulina M.
17.	ip.	Intraperitoneal.
18.	im.	Intramuscular.
19.	K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potasio.
20.	kDa	Kilodalton.
21.	l	Litro.
22.	M	Molar.
23.	mCi	Micro Curi.
24.	mg	Miligramo(s).
25.	min.	Minuto(s).
26.	ml	Mililitro(s).
27.	mm	Milímetro(s).
28.	mM	Milimolar.
29.	µg	Microgramo.
30.	µl	Microlitro.
31.	µm	Micrómetro
32.	N	Normal.
33.	ng	Nanogramos.

- 34. nm Nanómetros.
- 35. p-24 Proteína de 24 kDa.
- 36. PBS Solución salina amortiguada con fosfatos.
- 37. PEG Polietilenglicol.
- 38. pH Potencial de hidrógeno.
- 39. PM Peso molecular.
- 40. p/v Peso sobre volumen.
- 41. SBF Suero de bovino fetal.
- 42. sc. Subcutánea.
- 43. SDS Laurilsulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate).
- 44. SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).
- 45. seg. Segundos.
- 46. % T Porcentaje de acrilamida total.
- 47. TBS Solución Tris amortiguada con sodio.
- 48. TEMED N,N,N',N',tetrametiletildiamina.
- 49. Tris Tris(hidroximetil)aminometano.
- 50. TTBS Solución Tris amortiguada con sodio más Tween
- 51. v Voltios.
- 52. v/v Volumen sobre volumen.

