

780

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES  
CON MICETOMA CONTRA LA PROTEINA INMUNODOMINANTE  
DE 24 kDa DE *Nocardia brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA

Por

SILVIA MAGDALENA CASILLAS QUINTANA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

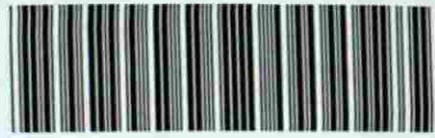
Como requisito para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

Monterrey, N.L.

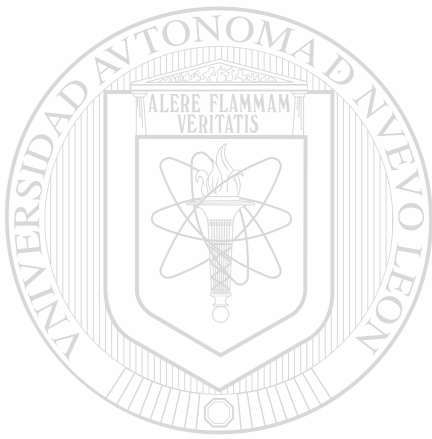
Febrero de 1996



TM  
FOR  
C. 1  
C. 1



1080073222



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



**ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES  
CON MICETOMA CONTRA LA PROTEINA INMUNODOMINANTE  
DE 24 kDa DE *Nocardia brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA**

Por

**SILVIA MAGDALENA CASILLAS QUINTANA**

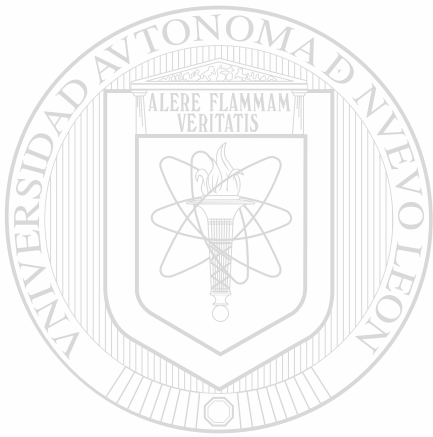
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Como requisito para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

**Monterrey, N.L.**

**Febrero de 1996**

TM  
RC951  
C3



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON  
MICETOMA CONTRA LA PROTEINA INMUNODOMINANTE DE 24 kDa  
DE *Nocardia brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA**

Aprobación de la Tesis:



Dr. Mario César Salinas Carmona  
Asesor de la Tesis.



Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza


Dr. Mario Alberto Garza Elizondo



Dra. María del Socorro Flores de Castañeda



Dra. Nohemí Waksman de Torres



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez  
Secretaria Académica del Area Básica  
Subdirección de Estudios de Postgrado

**ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON  
MICETOMA CONTRA LA PROTEINA INMUNODOMINANTE DE 24 kDa  
DE *Nocardia brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA**

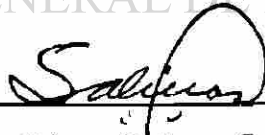
**Presentado por: Biol. Silvia Magdalena Casillas Quintana**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona y la coasesoría del Dr. José Humberto Treviño Ortiz. Apoyado parcialmente por CONACYT; Proyectos No. M9201/F-123 y F226-S9207.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN


Asesor.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dr. Mario César Salinas Carmona

Coasesor.



Dr. José Humberto Treviño Ortiz

## DEDICATORIA

... Mientras haya gente que se preocupe por los demás; el mundo seguirá siendo un lugar de posibilidades y esperanzas...

A Dios, gracias por amarme, porque en todos los aspectos de mi vida me has colmado de bendiciones, por haberme dado la vida para dar y disfrutar del amor de los demás, porque siempre estás conmigo...

A mi tía Chofa, una excelente mamá; tu recuerdo es el centro de unión de una familia, tu camino por la vida es admirable pues estuvo pleno de amor y de servicio a los demás, con todo mi amor.

A las personas que mas amo: Sr. Carlos Casillas Ochoa, Sra. Luz Socorro Quintana de Casillas; Efraín, Carlos Samuel y Luis Alfonso Casillas Quintana, Laura Patricia Muñoz, Ana Cristina, Carlitos y Paola Casillas Muñoz y Luis A. Díaz Fuente.

---

A mis padres, Sr. Carlos Casillas Ochoa y Sra. Luz Socorro Quintana de Casillas, mi mayor bendición es ser su hija; son realmente admirables, mi mejor ejemplo y mi mayor tesoro, gracias por su amor y su confianza, por haberme permitido desde siempre realizar cada una de mis metas; por darme la libertad de ser; por hacerme comprender que mas allá de todo existe alguien que es el padre de todos nosotros, quien guía nuestros pasos. Gracias por mostrarme con su amor, el amor de Dios.

A mis hermanos, Efraín, Carlos Samuel y Luis Alfonso, es maravilloso saber que lo que le pasa a uno nos pasa a todos, por respetar y apoyar mis decisiones, gracias por el amor que siempre me han brindado.



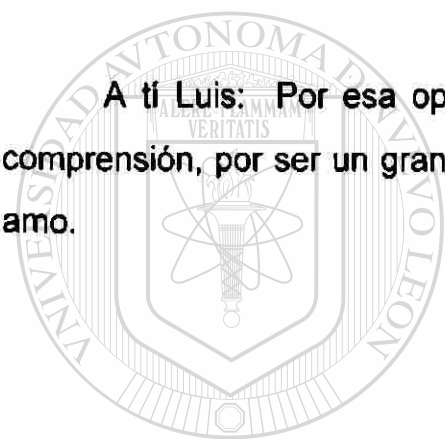
A tí Laura, por todo lo que hemos compartido, gracias por el amor que nos has brindado, porque gracias a Dios formas parte de nosotros.

A tí Carlitos, que has sabido ser paciente y comprensivo en los momentos mas difíciles, a tí Paola, por tu lucha por la vida, por su alegría y su ternura, por amarme.

A mi pequeña Ana Cristina, una realidad que vive en mi corazón.

A tí abuelita, con amor.

A tí Luis: Por esa oportunidad que Dios nos ha dado, por tu apoyo y comprensión, por ser un gran ser humano en quien todo lo encuentro y a quien amo.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## AGRADECIMIENTOS

La culminación de una meta personal es el resultado de la colaboración, apoyo y cariño de muchas personas. Gracias a todas ellas.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su valiosa asesoría, por haberme dado la oportunidad de participar en su equipo de trabajo, por su confianza y sus enseñanzas, por compartirme sus conocimientos, por su tiempo, paciencia y tolerancia, muchísimas gracias, siempre le recordaré.

A la comisión de Tesis, por sus críticas a este trabajo y por sus valiosos consejos.

Al Depto de Medicina Nuclear de la Facultad de Medicina de la UANL por su valiosa colaboración, gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo, gracias.

A Angel Licón Trillo, por tu amistad, por compartirme tus conocimientos, por tus consejos, por tu valiosa colaboración para la realización de este trabajo, muchas gracias.

A Angeles Castro, por tu amistad y tu cariño, por estar conmigo en todo momento, por todo lo que de tí he aprendido, con muchísimo cariño gracias.

A Eva, Isabel, Lucy, Angeles, Karina, Rosalba y Lidia, porque con ustedes aprendí entre muchas cosas que se puede convivir si ante todo existe cariño, respeto y deseos de vivir en armonía, con mucho cariño, gracias.

A la familia Díaz Fuente, por todos sus detalles para conmigo y mi familia, por su apoyo, por aceptarme, por su cariño, por hacerme sentir como en casa, con muchísimo cariño, gracias.

Al Ing. Ramón Guajardo, es realmente una suerte encontrar a personas como usted, gracias por su apoyo.

A Sergio y Marisol, por el cariño que brindan a mi familia y por desearme siempre lo mejor, gracias.

Al padre Alain Maisoneuve porque en todo momento tus palabras han sido guía, con muchísimo cariño, gracias.

Al personal de los Deptos. de Bioquímica y Reumatología, gracias por su valiosa colaboración.

Al Dr. José M. Viader Salvadó, por sus valiosas críticas, gracias por su gran disponibilidad para colaborar con los demás.

A Lisy, Bety, Martita y Aracely por su cariño, por todo gracias.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A la Sra. Elenita y a su familia, por su cariño y por todas sus atenciones, gracias.

A todo el personal del Depto. de Inmunología, porque en todo momento estuvieron y colaboraron conmigo, de cada uno me llevo un bello recuerdo, con mucho cariño, gracias.

A la familia Chapa Ancira, es de admirarse su disponibilidad para brindar su ayuda a quien la necesita, con cariño y admiración, gracias.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, gracias por sus consejos y por su apoyo.

A las familias Pérez Rivera y Díaz Pérez gracias por su cariño y por brindarme siempre su ayuda.

A Martita Contreras gracias por su amistad y su apoyo.

A Irma, Vero, Luis Edgar, Angel, Isa, Ernesto, Angeles y Alma, gracias por su amistad y colaboración.

A todos mis maestros y compañeros quienes de una u otra manera contribuyeron para mi formación.

A la Dra. Herminia Martínez, Normita y Sonia, gracias por su apoyo y atenciones recibidas.

Al Dr. Carlos E. Medina de la Garza gracias por su apoyo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda por sus valiosas críticas<sup>®</sup> a este trabajo, por su amistad y su apoyo, con mucho cariño gracias.

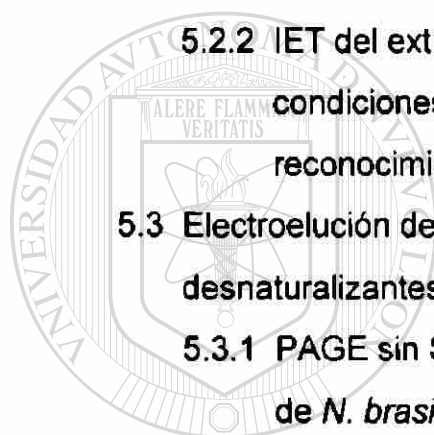
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

## TABLA DE CONTENIDO

Página

I.RESUMEN.....	1
II.INTRODUCCION.....	3
III.OBJETIVOS.....	14
IV. MATERIAL Y METODOS.....	15
1. Obtención del ECD de <i>N. brasiliensis</i> .....	15
1.1 Cepa de <i>N. brasiliensis</i> .....	15
1.2 Preparación del inóculo de <i>N. brasiliensis</i> .....	15
1.3 Cultivo y obtención del ECD de <i>N. brasiliensis</i> .....	16
2. Análisis del ECD de <i>N. brasiliensis</i> mediante SDS-PAGE.....	16
2.1 Preparación de geles.....	16
2.2 SDS-PAGE del ECD de <i>N. brasiliensis</i> .....	18
3. Tinción de geles.....	18
3.1 Tinción con nitrato de plata.....	18
3.2 Tinción con azul de Coomassie.....	19
4. Obtención de extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	19
4.1 Precipitación del ECD de <i>N. brasiliensis</i> con sulfato de amonio..	19
4.2 Tratamiento del sobrenadante con desoxirribonucleasa I.....	19
4.3 Cromatografía de filtración en gel.....	20
4.3.1 Preparación y calibración de una columna con Sephadex G-100 .....	20
4.3.2 Cromatografía de filtración en gel del sobrenadante.....	20
4.5 Análisis por SDS-PAGE del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	21

4.6 IET del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones desnaturalizantes y evaluación del reconocimiento de p24 por el Acm anti-p24.....	22
5. Aislamiento de p24 de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones no desnaturalizantes.....	23
5.1 Fuente de obtención de p24 de <i>N. brasiliensis</i> .....	23
5.2 Identificación de p24 en condiciones no desnaturalizantes.....	23
5.2.1 Análisis por PAGE sin SDS del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	23
5.2.2 IET del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones no desnaturalizantes y evaluación del reconocimiento de p24 por el Acm anti-p24 .....	25
5.3 Electroelución de p24 de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones no desnaturalizantes.....	25
5.3.1 PAGE sin SDS preparativo del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	25
5.3.2 Electroelución de p24 de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones no desnaturalizantes.....	27
5.3.3 Análisis por SDS-PAGE de los electroeluidos.....	28
5.3.4 Análisis por IET de los electroeluidos.....	28
6. Iodinación de ASB.....	29
6.1 Cromatografía de filtración en gel.....	29
6.2 Autorradiografía.....	30
7. Iodinación de p24 de <i>N. brasiliensis</i> .....	30
8. Fragmentación de ASB con tripsina.....	30
9. Análisis por SDS-PAGE de ASB digerida con tripsina.....	31
10. Fragmentación de caseína con tripsina.....	31
11. Análisis pos SDS-PAGE de caseína digerida con tripsina.....	32
12. Fragmentación de p24 de <i>N. brasiliensis</i> con tripsina.....	32



U.A.N.L.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



	Página
13. Análisis por autorradiografía de p24 de <i>N. brasiliensis</i> digerida con tripsina.....	32
14. Determinación de anticuerpos anti- <i>N. brasiliensis</i> por ELISA e IET.....	33
14.1 Sueros examinados.....	33
14.1.1 Técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	33
14.1.2 Análisis de la reactividad de sueros problema contra p24 por IET.....	34
15. Análisis por IET de la reactividad de sueros de pacientes con micetoma activo por <i>N. brasiliensis</i> contra p24 digerida con tripsina.....	35
V. RESULTADOS.....	36
1. Obtención del ECD de <i>N. brasiliensis</i> .....	36
1.1 Determinación de la concentración de proteínas.....	36
1.2 Análisis por SDS-PAGE del ECD de <i>N. brasiliensis</i> .....	36
2. Obtención del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	38
2.1 Fraccionamiento del ECD de <i>N. brasiliensis</i> con sulfato de amonio.....	38
2.2 Cromatografía de filtración en gel del sobrenadante obtenido al precipitar ECD de <i>N. brasiliensis</i> con sulfato de amonio.....	38
3. Análisis por SDS-PAGE e IET del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	39
4. Aislamiento de p24 de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones no desnaturizantes.....	43

4.1	Análisis del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> por PAGE sin SDS e IET para identificar p24 en condiciones no desnaturizantes.....	43
4.2	Electroelución de p24 en condiciones no desnaturizantes y su análisis por SDS-PAGE e IET.....	43
5.	Iodinación de ASB.....	49
6.	Iodinación de p24 de <i>N. brasiliensis</i> .....	50
7.	Análisis por SDS-PAGE de ASB y caseína digeridas con tripsina...51	
8.	Análisis por SDS-PAGE y autorradiografía de p24 de <i>N. brasiliensis</i> digerida con tripsina.....	54
9.	Determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> por ELISA.....	54
10.	Análisis por IET de la reactividad de sueros problema contra p24 de <i>N. brasiliensis</i> .....	57
11.	Análisis por IET de la reactividad de sueros de pacientes con micetoma activo por <i>N. brasiliensis</i> contra p24 digerida con tripsina.....	57
VI. DISCUSION.....		60
VII. CONCLUSIONES.....		68
VIII. LITERATURA CITADA.....		69
IX. APENDICES.....		76
APENDICE A. EQUIPO .....		76
APENDICE B. REACTIVOS QUIMICOS.....		78
APENDICE C. ABREVIATURAS.....		81

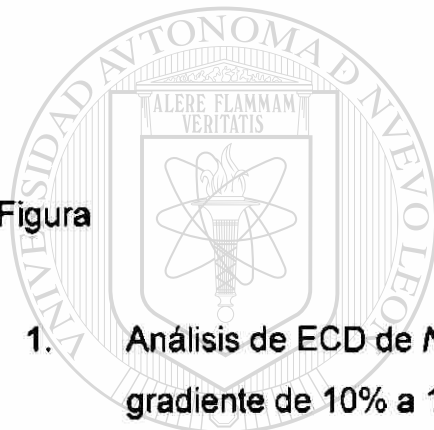


## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Volumen de elución de diferentes marcadores de peso molecular en una columna empaquetada con Sephadex G-100.....	38
2.	Absorbancias de sueros analizados con la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Análisis de ECD de <i>N. brasiliensis</i> por SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8.....	37
2.	Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 12 % a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 de las fracciones obtenidas en sephadex G-100...40	40
3.	Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	41
4.	Análisis por IET del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	42
5.	Análisis por PAGE sin SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> .....	44
6.	Análisis por IET del extracto semipurificado de <i>N. brasiliensis</i> en condiciones no desnaturizantes.....	45
7.	Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 10 % a 18 % T, 2.7% C, pH 8.8 de los tres electroeluidos.....	46



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



8.	Análisis por IET de la reactividad de un suero de paciente con micetoma por <i>N. brasiliensis</i> contra los tres electroeluidos.....	47
9.	Análisis por IET de la reactividad del Acm anti-p24 de <i>N. brasiliensis</i> contra los tres electroeluidos .....	48
10.	Análisis por autorradiografía de ASB iodizada.....	49
11.	Análisis por autorradiografía de p24 iodizada.....	50
12.	Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 de ASB digerida con tripsina.....	52
13.	Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 12% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 de caseína digerida con tripsina.....	53
14.	Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 12% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 y autorradiografía de p24 de <i>N. brasiliensis</i> digerida con tripsina.....	55
15.	Análisis por IET de la reactividad de sueros problema contra p24 de <i>N. brasiliensis</i> sin digerir.....	58
16.	Análisis por IET de la reactividad de sueros de pacientes con micetoma activo por <i>N. brasiliensis</i> contra p24 antes y después de digerirse con tripsina.....	59

## I. RESUMEN

Recientemente estandarizamos un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida, específico para la determinación de anticuerpos anti-*Nocardia brasiliensis* en sueros de pacientes con micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis*. En esta técnica utilizamos como antígeno un extracto semipurificado de *N. brasiliensis* enriquecido en la proteína de 24 kDa (p24), la cual es específica e inmunodominante para los sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*.

La obtención del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* enriquecido en p24 requiere mucho tiempo, es de alto costo y su rendimiento es bajo; por lo que en el presente trabajo nos propusimos estudiar la reactividad de sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis* contra p24 de *N. brasiliensis* digerida con tripsina. Es probable que la síntesis química de los fragmentos tripticos que contengan los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos de los sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* permita en el futuro reemplazar el uso de p24.

A partir de un extracto celular deslipidizado (ECD) de *N. brasiliensis*® mediante precipitación con solución saturada de sulfato de amonio y un tamiz molecular con Sephadex G-100 obtuvimos un extracto semipurificado de *N. brasiliensis* enriquecido en p24. Posteriormente, el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) sin SDS al 12% T, 2.7% C, pH 8.8 y al teñir con azul de Coomassie observamos la presencia de 3 bandas, las cuales en estas condiciones no fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti-p24 (Acm anti-p24) de *N. brasiliensis*.

Cada una de las 3 bandas se electroeluyeron por separado en condiciones no desnaturizantes. Los electroeluidos se analizaron por

electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) e Inmuno-electrotransferencia (IET) y encontramos en cada uno exclusivamente la presencia de una banda que migró a la posición de p24, la cual se tiñó principalmente con azul de Coomassie y fue reconocida tanto por sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis* como por el Acm anti-p24 de *N. brasiliensis* lo que corroboró su identidad.

Posteriormente la proteína de 24 kDa aislada en condiciones no desnaturizantes se marcó con iodo radioactivo y se digirió con tripsina a diferentes tiempos. Los productos de la digestión se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

La digestión triptica de p24 produjo dos fragmentos; un fragmento triptico mayor (FTM) y un fragmento triptico menor (ftm). El FTM se observó con más intensidad a los dos mins de haberse iniciado la digestión y posteriormente sufrió proteólisis; mientras que el ftm se observó con mayor intensidad a los 10 mins de digestión, lo que coincidió con la desaparición total de p24 y del FTM.

Encontramos por ELISA e IET que de 10 sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis*, el 100% reconoció p24 sin digerir. Observamos que los 5 sueros de pacientes que habían presentado micetoma por *N. brasiliensis* y que habían alcanzado remisión completa, así como los 5 sueros de personas aparentemente sanas el 100% mostraron resultados negativos.

Sin embargo, mediante IET no se observó reconocimiento de los 2 fragmentos tripticos de p24 por ninguno de los 10 sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis*.

## II. INTRODUCCION

El Orden de los Actinomycetales comprende un grupo de bacterias Gram positivas que tienden a formar filamentos y a ramificarse. Un ejemplo de estos microorganismos son los que constituyen el género *Nocardia* (11).

Se han descrito más de 30 especies del género *Nocardia* (11), sin embargo solo unas cuantas se han aislado de padecimientos en el hombre, entre ellas se encuentran: *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia otitidiscaviarum* (33).

Estas especies dan origen a enfermedades que varían en su localización. Las infecciones de tipo localizado que dan lugar a lesiones granulomatosas supurativas de carácter destructivo de tejidos, las cuales drenan pus al exterior por trayectos fistulosos conteniendo granos, se denominan micetomas actinomicóticos; y las infecciones sistémicas generalizadas, en las cuales se observa supuración, pero no se detectan granos, son denominadas nocardiosis (17).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

*N. asteroides* es el principal agente causal de la nocardiosis en Norteamérica (14 y 46); dicha enfermedad se presenta principalmente en huéspedes inmunocomprometidos.

El micetoma es una enfermedad crónica, generalmente localizada a miembros inferiores, causada por bacterias aerobias (micetoma actinomicótico) o por hongos (micetoma eumicótico), que afecta la piel y el tejido celular subcutáneo; en ocasiones el proceso purulento puede involucrar músculo, extenderse a los huesos, o puede diseminarse a la cavidad torácica, abdominal, etc, dependiendo de su localización (17, 45).

El micetoma es una infección que se caracteriza por una inflamación fistulosa, en la cual el agente causal está presente en forma de acúmulos miceliales o microcoloniales conocidos como gránulos (17, 45). El cuadro clínico característico del micetoma comprende un aumento de volumen del área afectada (a menudo asintomático) de consistencia dura que con el tiempo desarrolla nódulos; además en la zona infectada se abren numerosos abscesos de los cuales drena un pus filante, en donde se encuentran los microorganismos causantes de la infección (17, 49).

El género *Nocardia* está filogenéticamente relacionado con los géneros *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (27).

Las nocardias son bacterias aerobias estrictas, Gram (+), parcialmente ácido resistentes, filamentosas, cuyas ramificaciones fragmentan a células pleomórficas variando de formas bacilares a cocoides u organismos semejantes a *Corynebacterium*. Suelen ser difíciles de diferenciar de las micobacterias (14, 17, 20, 24 y 49).

Hay numerosas especies saprofíticas de *Nocardia*; en suelos secos y cálidos se han encontrado millones de actinomicetos por gramo de tierra; uno de los géneros predominantes es *Nocardia* (36).

En México el 98% de los casos de micetoma son producidos por actinomicetos y de este porcentaje el 90% son causados por *N. brasiliensis*, aislándose ocasionalmente *N. otitidiscaviarum*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, etc. Esta enfermedad se ha presentado tanto en pacientes inmunosuprimidos como en inmunocompetentes. Los agentes causales más comúnmente aislados de micetoma eumicótico son *Madurella grisea*, *Madurella mycetomii*, etc (24 y 51).

El agente causal se introduce en la piel o tejido subcutáneo del organismo mediante un traumatismo accidental, espina, etc (25). El estado nutricional, susceptibilidad a la infección, respuesta inmune y tratamiento inicial, determinarán que se resuelva la infección o que se instale la entidad con las manifestaciones clínicas características (11).

El micetoma ya sea actinomicótico o eumicótico presenta una amplia distribución en el mundo, presentándose más frecuentemente en la franja localizada entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio. En América se encuentra distribuido principalmente en los países de Centroamérica, México, Venezuela, Colombia y Brasil. En Africa, se presenta frecuentemente en los países de Sudán, Senegal y Somalia. En Asia, la India es el país en el cual se han reportado un mayor número de casos (22 y 25). En México se han reportado casos prácticamente en toda la República, predominando en los estados de Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León y Oaxaca (22).

En el tratamiento de micetoma actinomicótico se han utilizado varios medicamentos; Welsh y cols (53) reportaron una buena respuesta terapéutica con amikacina en combinación con trimetoprim sulfametoxazol en 15 pacientes con micetoma actinomicótico, en los cuales se alcanzó remisión completa.

Los mecanismos de patogenicidad de *N. brasiliensis* y los de resistencia que desarrolla el huésped hacia infecciones por este microorganismo no son bien conocidos. Recientemente, Salinas, Pérez y cols (40) reportaron la presencia de proteínas caseinolíticas en el ECD de *N. brasiliensis*, las cuales quizás estén involucradas en los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria.

*N. brasiliensis* es una bacteria intracelular facultativa capaz de sobrevivir y continuar su crecimiento dentro del citoplasma de macrófagos y

polimorfonucleares que los hayan fagocitado. Se ha propuesto que estas bacterias evaden los mecanismos microbicidas de los macrófagos por medio de la inhibición de la fusión de los lisozomas con las vacuolas fagocíticas en las cuales se encuentra el microorganismo (39), este fenómeno se ha observado en infecciones ocasionadas por *M. tuberculosis* y por *N. brasiliensis* (18).

En 1982, Beaman y cols (5) estudiaron el papel de la respuesta inmune humoral hacia infecciones por *N. asteroides* en un modelo murino, en ratones (CBA/N X DBA/2)F1. Los ratones CBA/N presentan una deficiencia en la función de los linfocitos B ligada al cromosoma X. Los machos derivados del apareamiento de hembras CBA/N con machos inmunológicamente normales, son deficientes en las funciones de los linfocitos B; estos ratones son incapaces de producir anticuerpos, mientras que las hembras sí presentan esa capacidad. Estas hembras y machos fueron infectados con *N. asteroides*, y se observó que los machos a pesar de ser deficientes en los linfocitos B no son más susceptibles a la infección con *N. asteroides* que las hembras que sí poseen la capacidad de formar anticuerpos. En base a estos resultados los autores sugirieron que los anticuerpos no eran esenciales para conferir resistencia hacia infecciones ocasionadas por microorganismos del género *Nocardia*.

Conde y cols (16) infectaron ratones con células de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar. A las dos semanas detectaron depósitos del componente C3 del sistema de complemento e inmunoglobulinas en el sitio de inoculación; además se detectaron anticuerpos en suero a los 45 días postinfección. La detección de C3 en la lesión es un indicio de la presencia de complejos inmunes. Según los autores dichos complejos pudieran contribuir a la patogénesis de la enfermedad o interferir con la función de los linfocitos T, ya que los anticuerpos bloquean los determinantes antigénicos de los antígenos del microorganismo.



Se ha reportado que en pacientes con micetoma, la inmunidad mediada por células presenta alteraciones, reportándose que está disminuída o negativa en casos de micetomas graves (23). Por otra parte, en base a estudios realizados por Rico y cols (37) en un modelo experimental murino, la inmunidad humoral parece no tener efectos protectores.

Se ha comprobado que existen reacciones cruzadas extensas entre *N. brasiliensis* y microorganismos tales como *M. leprae* y *M. tuberculosis*, a causa de la existencia de antígenos semejantes entre ellos (29, 54 y 55).

Las infecciones ocasionadas por microorganismos del género *Nocardia* suelen ser de diagnóstico difícil. El diagnóstico etiológico de micetoma se comprueba actualmente con el examen directo del pus, exudado o tejidos extraídos por biopsia para su cultivo. Este examen es insuficiente para realizar un diagnóstico a nivel de género y especie del agente causal, por lo cual se tiene que cultivar una muestra de la secreción del área afectada en los medios de cultivo habituales y esperar de 2 a 3 semanas de incubación para aislar el microorganismo y poder realizar las pruebas bioquímicas respectivas para su caracterización, entre las que se encuentran hidrólisis de la caseína, tirosina, urea, gelatina, etc. Estos métodos de diagnóstico no son óptimos ya que se requiere de un tiempo prolongado de incubación para el cultivo y caracterización del agente causal, retrasando el diagnóstico de la enfermedad.

Se han realizado numerosos estudios con el fin de estandarizar pruebas serológicas específicas para detectar infecciones producidas por *N. brasiliensis* y por *N. asteroides*.

En el caso de nocardiosis, se han realizado algunos intentos con el fin de estandarizar técnicas de utilidad clínica para el diagnóstico de esta enfermedad.

Blumer y Kaufman (9) utilizaron una mezcla de filtrados de cultivos de *N. asteroides* y de *N. brasiliensis* y el sobrenadante de un homogenizado de células de *N. asteroides* para realizar pruebas de microinmunodifusión, por medio de las cuales evaluaron 71 sueros de pacientes con nocardiosis; 35 de estos sueros (49%) fueron positivos con el antígeno del homogenado y 50 (70%) fueron positivos con la mezcla de los filtrados de cultivo.

Shainhouse y cols (44) usaron un filtrado del medio de cultivo de *N. asteroides* para la detección de anticuerpos fijadores de complemento en 16 sueros de pacientes con infecciones por *Nocardia*; 13 de los 16 sueros fueron positivos a esta prueba. Se observó un alto grado de reacción cruzada ya que 2 de los 5 sueros de pacientes con tuberculosis y 3 de los 3 sueros de pacientes con lepra analizados presentaron reacciones positivas.

En 1985, Sugar y Schoolnick (48) mediante análisis de IET de las proteínas contenidas en el filtrado de cultivo de *N. asteroides*, revelaron que de 17 muestras de sueros de pacientes con nocardiosis, el 100% reaccionó con una proteína cuyo peso molecular fue de 55 kDa (p55), y 11 de estos sueros reconocían también una proteína de 31 kDa (p31); en base a estos resultados los autores sugirieron el uso de estas proteínas como reactivos en pruebas de diagnóstico para nocardiosis. Posteriormente, Angeles y Sugar (2) mostraron que la p55 previamente identificada en el filtrado de cultivo de *N. asteroides* (48), también se encontraba en filtrados de cultivos de *N. brasiliensis* y de *N. otitidiscaviarum*. La p55 fue purificada por medio de electroelución y la utilizaron en pruebas de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) realizadas en papel de nitrocelulosa para identificar sueros de pacientes infectados con *N. brasiliensis*; de 6 sueros de estos pacientes, el 100% fueron positivos. De 2 sueros de pacientes infectados con *Actinomadura madurae*, uno fue positivo y el 100% de los sueros controles (10 sueros de personas aparentemente sanas) fueron negativos.

En 1987, Angeles y Sugar (3) estandarizaron una técnica de ELISA en placa para la determinación de anticuerpos anti-*N. asteroides* en sueros de pacientes con nocardiosis. En este ensayo utilizaron como antígeno el sobrenadante obtenido después de precipitar filtrados de cultivo de *N. asteroides* con sulfato de amonio. En el sobrenadante se encontraba p55, previamente identificada como específica para *Nocardia*. Evaluaron 22 sueros de pacientes con nocardiosis, 21 de pacientes con tuberculosis y 83 de pacientes hospitalizados que no habían tenido infecciones por micobacterias o nocardias. Este ensayo fue altamente específico, ya que el 91% de los sueros de pacientes con nocardiosis tuvieron títulos mayores o iguales a 1:256, mientras que los sueros controles negativos y los obtenidos de pacientes con tuberculosis tuvieron títulos menores a 1:256.

*M. leprae* es un bacilo relacionado filogenéticamente con *N. brasiliensis* y ha sido ampliamente utilizado en estudios tanto de la respuesta inmune humoral como celular en los pacientes infectados con esta bacteria. Uno de los antígenos aislados es una proteína cuyo peso molecular es de 65 kDa (p65); la cual presenta gran homología en su secuencia de aminoácidos con las proteínas de choque térmico de una amplia variedad de microorganismos (4). Esta proteína se encuentra en diferentes especies del género *Mycobacterium* que son importantes desde el punto de vista médico, además es inmunodominante tanto con los sueros de pacientes con lepra como con los sueros de pacientes con tuberculosis.

Buchanan y cols (13), utilizaron 23 anticuerpos monoclonales que reconocían p65 de *M. leprae* y encontraron mediante radioinmunoensayos competitivos, que 14 de estos anticuerpos monoclonales reconocían determinantes antigénicos diferentes. Al evaluar la especificidad de especie de estos determinantes antigénicos mediante inmunoensayos de dot-blot en papel de nitrocelulosa utilizando extractos sonicados de 23 especies diferentes de

micobacterias, observaron que de los 14 anticuerpos monoclonales, solamente uno (III E9) reconoció un determinante antigénico encontrado exclusivamente en p65 de *M. leprae*.

Para determinar la localización precisa y/o la secuencia de aminoácidos de los epítopes protéicos, algunas de las estrategias más comúnmente utilizadas incluyen el análisis de variantes virales que son resistentes a la neutralización por anticuerpos, reacciones con fragmentos proteolíticos purificados y reacciones con colecciones de péptidos sintéticos traslapados.

Mehra y cols (31), plantearon otra estrategia mediante la expresión de ácido desoxirribonucleico recombinante (ADNr) para deducir la secuencia de aminoácidos de 6 determinantes antigénicos de p65; uno de ellos específicos para *M. leprae*. Para ello se creó una subbiblioteca del gen que codifica para dicha proteína, utilizando fragmentos del gen que son integrados al genoma del fago lambda gt11. Posteriormente se identificaron las clonas productoras de determinantes antigénicos específicos a través de un rastreo con anticuerpos monoclonales para p65; luego se determinó la secuencia que codifica para cada epítipo. Para corroborar que esta secuencia era la específica, se sintetizaron péptidos para cada uno de los epítopes y se demostró por la técnica de ELISA<sup>®</sup> que se unían al anticuerpo monoclonal apropiado.

Anderson y cols en 1988 (4), sintetizaron péptidos en fase sólida para definir la secuencia de los epítopes reconocidos por los 14 anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos de p65 (13). Con el uso de estos péptidos sintéticos determinaron la localización de los epítopes en la estructura primaria de la proteína y la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo especie-específico III E9, el cual, según los autores, podría ser útil para el serodiagnóstico de la lepra.

En 1989, Meeker y cols (30) determinaron si los péptidos sintéticos de p65 podrían ser útiles para el serodiagnóstico y monitoreo de la acción terapéutica en los pacientes con lepra. Para ello los sueros de pacientes con lepra lepromatosa fueron evaluados por la técnica de ELISA contra 43 péptidos sintéticos y también se probó la reactividad de estos sueros hacia la proteína de 65 kDa recombinante (p65r). En base a los resultados obtenidos, los autores concluyeron que la respuesta de los anticuerpos humanos es diferente a la observada con los anticuerpos monoclonales de ratón ya que la serorreactividad de los pacientes con lepra hacia los péptidos sintéticos y hacia p65r solamente se observó en un tercio de los pacientes con casos multibacilares activos.

En 1988, Oftung y cols (35), utilizaron péptidos sintéticos de secuencias de aminoácidos de p65 para identificar cuales de ellos eran reconocidos por clonas de células T policlonales de pacientes con tuberculosis que reaccionaron con p65r. Se identificaron 4 epitopes, 3 de los cuales presentaron reacción cruzada con células T de pacientes infectados con *M. leprae* y de pacientes infectados con *M. tuberculosis*. Las clonas de células T reactivas presentaron un fenotipo (CD4+, CD8-) y se demostró que después de ser estimuladas con el antígeno secretaban interleucina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interferón gamma.

El diagnóstico serológico para micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis* no existe como prueba clínica de rutina debido a la falta de antígenos purificados específicos y con alta sensibilidad que eviten reacciones cruzadas.

Salinas y cols (41) mediante análisis de IET, utilizando un extracto sonificado deslipidizado de *N. brasiliensis* (cepa HUJEG-1) y sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, sueros de pacientes con lepra, sueros de pacientes con tuberculosis y sueros de personas aparentemente sanas, identificaron 3 proteínas inmunodominantes con los sueros de personas

infectadas con *N. brasiliensis* las cuales tienen un peso molecular de 24, 26 y 61 kDa. Observaron que de 16 muestras de sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, 13 (81%) reconocían la proteína de 61 kDa (p61), 14 (88%) reconocían la proteína de 26 kDa (p26) y 14 (88%) reconocían la proteína de 24 kDa (p24); de 17 muestras de sueros de pacientes con lepra, 2 (15%) reconocían p61, 3 (23%) reconocían p26 y 3 (23%) reconocían p24; de 25 muestras de sueros de personas aparentemente sanas, 4 (16%) reconocían p61 y ninguna reconoció p26 ni p24.

Las proteínas inmunodominantes de 24 y de 61 kDa fueron purificadas en condiciones desnaturalizantes mediante la técnica de electroelución por Vera y cols (52).

En 1993, nuestro grupo estandarizó (42) un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida para la determinación de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* en sueros de personas infectadas con esta bacteria, en el cual utilizamos como antígeno un extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en el que se encontraba p24. Para evaluar la especificidad de la técnica analizamos 24 sueros de pacientes con lepra, 29 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, 31 sueros de personas aparentemente sanas, 30 sueros de pacientes con micetoma actinomicótico en estadio activo de la enfermedad (26 por *N. brasiliensis*, 3 por *N. asteroides* y uno por *A. madurae*) y 12 sueros de personas que habían presentado micetoma por *N. brasiliensis* y que estaban en remisión completa.

Los sueros de pacientes con micetoma en estadio activo, a excepción del suero de paciente con micetoma producido por *A. madurae*, presentaron valores de absorbancia (abs) a una longitud de onda de 492 nm mayores a 0.300 y el resto de los sueros analizados mostraron valores menores, a excepción de un suero perteneciente a una persona sana que estuvo trabajando con

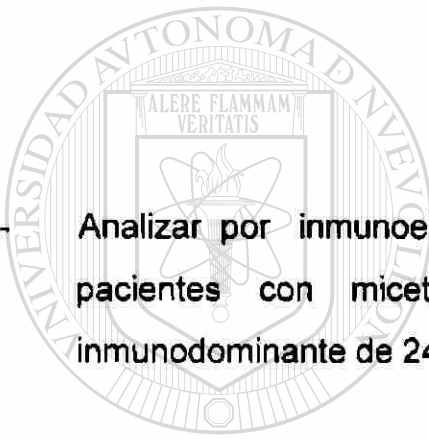
*N. brasiliensis*. También encontramos una correlación entre los valores de absorbancia de los sueros y el estadio clínico de la enfermedad. Observamos que los valores de abs disminúan conforme el paciente se recuperaba de la enfermedad y presentaron valores menores a 0.300 cuando el paciente alcanzó la remisión clínica y bacteriológica.

Algunas de las limitantes para la obtención del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* son: alto costo, se requiere de aproximadamente un mes para la obtención del antígeno y el rendimiento es muy bajo. El presente trabajo se planteó con la finalidad de analizar la reactividad de sueros de pacientes con micetoma en estadio activo de la enfermedad contra la proteína inmunodominante de 24 kDa de *N. brasiliensis* digerida con tripsina, con el propósito de detectar fragmentos trípticos de la misma que sean reconocidos específicamente por estos sueros.

En un futuro se podría realizar la síntesis orgánica de los péptidos trípticos de interés o clonar el gen que codifique para ellos, en lugar de realizar esto mismo con p24 completa, lo que implicaría un mayor costo. También se podrían identificar los epítopes reconocidos por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra p24 y péptidos sintéticos que contengan la secuencia de los fragmentos trípticos.

### III. OBJETIVOS

- 1.- Aislar la proteína inmunodominante de 24 kDa de *N. brasiliensis*.
  
- 2.- Fragmentar la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* utilizando tripsina.
  
- 3.- Analizar por inmunoelectrotransferencia la reactividad de sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* contra la proteína inmunodominante de 24 kDa de *N. brasiliensis* digerida con tripsina.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## IV. MATERIAL Y METODOS

### 1. OBTENCION DEL ECD DE *N. brasiliensis*.

#### 1.1 Cepa de *N. brasiliensis*.

La *N. brasiliensis* utilizada en este trabajo fue obtenida de un paciente con micetoma que asistió a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".

La identificación de la bacteria la realizó el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla en el Depto. de Microbiología de esta Facultad y su identidad se corroboró en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta Georgia de los Estados Unidos de Norteamérica por el Dr. Libero Ajello.

A esta cepa se le denominó "Hospital Universitario José Eleuterio González-1" (cepa HUJEG-1).

Esta cepa se conserva en medio Sabouraud a temperatura ambiente.

#### 1.2 Preparación del inóculo de *N. brasiliensis*.

Se prepararon 4 matraces Erlenmeyer de 125 ml con un volumen de 30 ml cada uno de medio infusión cerebro-corazón (BHI). Después de esterilizarlos a 15 libras de presión por 15 mins se inocularon con una asada tomada de la cepa HUJEG-1 crecida en medio Sabouraud y se dejaron incubando a 37°C con agitación constante durante 48 hrs. El contenido de los matraces se recolectó y se centrifugó a 1920 x g por 7 mins. El precipitado se trituró con un agitador de vidrio y se le agregó 1 ml de solución salina al 0.85% estéril, se dejó reposar durante 5 mins y el sobrenadante se agregó por cantidades iguales a 8 matraces Erlenmeyer preparados como los anteriores, los cuales se incubaron a 37°C con agitación constante durante 48 hrs. El contenido de los matraces se recolectó y se centrifugó a 1920 x g por 7 mins, el precipitado se resuspendió en solución salina y se trituró en un homogenizador por un minuto y medio con 3 descansos de medio min cada uno. El homogenizado se centrifugó a 166 x g por 5 mins y el

sobrenadante (inóculo o suspensión unicelular de *N. brasiliensis*) se colocó en viales ámpula estériles y se almacenó a 4°C.

### 1.3 Cultivo y obtención del ECD de *N. brasiliensis*.

Para obtener masa bacteriana a gran escala se prepararon 40 matraces Erlenmeyer de 1 y 2 litros, con 160 ml o 170 ml de medio BHI respectivamente, los cuales se inocularon con aproximadamente 0.4 ml de suspensión unicelular de *N. brasiliensis* y se incubaron a 37°C por 7 días sin agitación. Posteriormente el medio de cultivo se eliminó por decantación, las bacterias se recolectaron en frascos de polivinilo de 500 ml, se centrifugaron a 1250 x g por 7 mins y se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Las bacterias se deslipidizaron utilizando mezclas de etanol:éter en diferentes proporciones (1:1, 1:2 y 1:3). Después se secaron al vacío, se mezclaron con polvo de vidrio en un mortero y se trituraron durante 90 mins. El homogenizado se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 0.01 M con acetato de magnesio 0.01 M pH 7.4, se dejó en agitación constante durante 12 hrs a 4°C. El polvo de vidrio se eliminó después de centrifugar la muestra a 1920 x g por 30 mins y el resto de la muestra se ultracentrifugó a 144000 x g durante 3 hrs. El sobrenadante (ECD de *N. brasiliensis*) se recuperó, se dializó contra agua destilada por 12 hrs a 4°C, se dejó una alícuota para determinar la concentración de proteínas, el resto se liofilizó y se almacenó a -20°C.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó de acuerdo al método de Lowry (28), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (ASB).

## 2. ANALISIS DEL ECD DE *N. brasiliensis* MEDIANTE SDS-PAGE.

### 2.1 Preparación de geles.

Se utilizaron minigeles de poliacrilamida con SDS, en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8; cuyas dimensiones fueron 7 cm X 10 cm X 0.75 mm de grosor.

El gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8; se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

	Gel al 5%
<b>Solución patrón de acrilamida-</b>	
bis-acrilamida al 30% T, 2.7% C .....	0.499 ml
Agua bidestilada .....	1.980 ml
Amortiguador Tris-HCl pH 6.8 .....	0.375 ml
SDS al 10% .....	0.030 ml
Persulfato de amonio al 10% .....	0.105 ml
TEMED .....	0.003 ml

El gel de corrimiento para geles de poliacrilamida con SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 se preparó con la ayuda de un dispositivo generador de gradientes de 2 columnas, conectadas a una bomba peristáltica. Se utilizaron las siguientes soluciones:

	Columna A 10%	Columna B 18%
<hr/>		
<b>Solución patrón de acrilamida</b>		
bis-acrilamida al 30% T, 2.7% C .....	0.720 ml	1.259 ml
Agua bidestilada .....	0.874 ml	0.193 ml
Amortiguador Tris-HCl pH 8.8 .....	0.396 ml	0.396 ml
Glicerol al 50% .....	0.144 ml	0.222 ml
SDS al 10% .....	0.020 ml	0.020 ml
Persulfato de amonio al 10% .....	0.007 ml	0.007 ml
TEMED .....	0.001 ml	0.001 ml

## 2.2 SDS-PAGE del ECD de *N. brasiliensis*.

Para analizar la calidad del ECD de *N. brasiliensis* se prepararon geles de poliacrilamida con SDS en gradiente de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (26) en geles planos, con un gel de empaquetamiento 5% T, 2.7% C, pH 6.8 y un gel separador en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8.

Se sometieron a electroforesis una muestra de marcadores de baja movilidad relativa ( $M_r$ ) SDS-7L (albúmina sérica bovina de 66 kDa, albúmina de huevo de 45 kDa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de 36 kDa, anhidrasa carbónica de 29 kDa, tripsinógeno de 24 kDa y alfa-lactoalbúmina de 14 kDa) y una muestra de ECD de *N. brasiliensis* por duplicado. La muestra de ECD se mezcló con amortiguador de muestra 4X para condiciones desnaturalizantes (contiene SDS y 2-mercaptoetanol) y se calentó por 2 mins en agua hirviendo. Como amortiguador de corrimiento se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM con SDS al 0.1%. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 volts.

## 3. TINCION DE GELES.

Se utilizaron 2 técnicas de tinción para geles: Tinción con nitrato de plata y tinción con azul de Coomassie.

### 3.1 Tinción con nitrato de plata.

Se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata de Merrill (32). Después de someter las muestras a electroforesis, el gel se colocó en solución fijadora (50% de metanol con 12% de ácido acético) por 30 mins; posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 mins cada uno con una solución de 10% de metanol y 5% de ácido acético. Enseguida se agregó una solución oxidante (0.099% de dicromato de potasio y 0.2% de ácido nítrico) durante 5 mins y después se realizaron 3 lavados de 10 mins cada uno con agua bidestilada. A continuación el gel se sumergió en nitrato de plata 0.012 M por 30 mins, los primeros 5 mins se colocó bajo luz intensa; después se agregó solución reveladora (carbonato de

sodio 0.28 M y 0.5 ml de formol por cada litro de solución). La reacción se detuvo con ácido acético al 1%.

### 3.2 Tinción con azul de Coomassie.

El gel se sumergió en solución colorante de azul de Coomassie (0.1% de azul de Coomassie, 40% de metanol y 10% de ácido acético) por 30 mins; posteriormente se colocó en solución desteñidora (40% de metanol y 10% de ácido acético).

## 4. OBTENCIÓN DE EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*.

### 4.1 Precipitación del ECD de *N. brasiliensis* con sulfato de amonio.

El ECD de *N. brasiliensis* (100 mg) se disolvió en 12 ml de PBS 0.1 M, pH 7.2, se le agregó lentamente y con agitación constante un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio previamente ajustada a pH 7.2 con hidróxido de amonio; la mezcla se dejó agitando durante 30 mins. Todo el proceso se realizó a 4°C. Después, la muestra se centrifugó a 1920 x g por 30 mins, la pastilla se resuspendió en 2 ml de PBS y al igual que el sobrenadante se dializaron exhaustivamente contra solución salina al 0.85%. Para verificar la eliminación de sulfato de amonio, se probaron alícuotas de la solución de diálisis con solución saturada de cloruro de bario. Posteriormente, tanto el precipitado como el sobrenadante se liofilizaron por separado.

### 4.2 Tratamiento del sobrenadante con desoxirribonucleasa I.

El sobrenadante liofilizado se resuspendió en 1.4 ml de PBS, se le agregaron 150 µl de desoxirribonucleasa I y se incubó a 37°C durante 2 hrs. Posteriormente, se centrifugó a 1920 x g por 10 mins, se separó el sobrenadante y se dializó contra agua bidestilada durante 12 hrs a 4°C.

### 4.3 Cromatografía de filtración en gel.

#### 4.3.1 Preparación y calibración de una columna con sephadex G-100.

Se utilizó una columna para cromatografía (23 cm de largo por 2.5 cm de diámetro), la cual se empaquetó con una matriz de sephadex G-100 con una capacidad de retención de agua de 15 ml por gr de peso seco. Se resuspendieron 7 gr de sephadex en agua bidestilada y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. Después, el sephadex se lavó 3 veces con agua bidestilada y se equilibró en PBS 0.1 M pH 7.2; con este material se empacó la columna por gravedad a un flujo de trabajo de 0.5 ml por min a 4°C.

Para determinar el volumen vacío de la columna se utilizó dextrana azul cuyo peso molecular es de 2000 kDa (1 mg en 250 ml de PBS con 5% de glicerol). Posteriormente, se determinó el volumen de elución de las siguientes proteínas de peso molecular conocido: Alcohol deshidrogenasa de 150 kDa (5 mg en 500 ml de PBS con 5% de glicerol), anhidrasa carbónica de 29 kDa (3 mg en 500 ml de PBS con 5% de glicerol) y citocromo "c" de 12.4 kDa (2 mg en 500 ml de PBS con 5% de glicerol). Las diferentes proteínas se eluyeron al flujo de trabajo, se recolectaron alícuotas de 2 ml cada 4 mins y se determinó el valor de abs de cada una de las fracciones a una longitud de onda de 280 nm. Para obtener el perfil de elución de estos marcadores, los valores de abs de cada fracción se graficaron contra los números de fracciones (volúmenes de elución).

#### 4.3.2 Cromatografía de filtración en gel del sobrenadante.

Al sobrenadante tratado con desoxirribonucleasa I y dializado se le agregó 5% de glicerol, se mezcló y después se aplicó a la columna empaquetada con sephadex G-100, se eluyó al flujo de trabajo y se determinó el valor de abs a 280 nm de cada una de las fracciones. El perfil de elución de la muestra se graficó. Las alícuotas que se encontraron en el pico 2 del perfil de elución, previamente reportado por Vera, Salinas y cols (52), se analizaron mediante SDS-PAGE. El gel se tiñó con azul de Coomassie y las fracciones donde se

encontró la banda que correspondía a p24 se mezclaron (extracto semipurificado de *N. brasiliensis*) y se dializaron para eliminar el PBS; posteriormente se concentraron por liofilización y se conservaron a -20°C.

#### 4.5 Análisis por SDS-PAGE del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.

##### - Preparación del gel:

Se preparó un minigel de poliacrilamida analítico con SDS (7 cm X 10 cm X 0.75 mm de grosor), en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8; con un gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8.

##### - Preparación de las muestras:

Las muestras que se sometieron a electroforesis en este experimento fueron las siguientes: marcadores de bajo peso molecular SDS-7L, muestras de ECD y de extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.

Las muestras de los extractos se mezclaron con amortiguador de muestras 4X en relación 1:3 (v/v); posteriormente se agitaron con un vibrador eléctrico y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 2 mins.

##### - Electroforesis:

El gel se sometió a un precorrimento de 50 volts durante 20 mins antes de aplicar las muestras.

La electroforesis se realizó a 80 volts en el gel de empaquetamiento y 150 volts en el gel de separación hasta que el colorante (azul de bromofenol) alcanzó el límite del gel.

Una vez terminada la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie y posteriormente con nitrato de plata.

#### 4.6 IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones desnaturalizantes y evaluación del reconocimiento de p24 por el Acm anti-p24.

La IET se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin (50). Se preparó un minigel de poliacrilamida con SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8, con un gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8 y se colocó un peine con carriles de 2 cm cada uno. Las muestras tanto de ECD como las de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se sometieron a SDS-PAGE. Al término de la electroforesis se cortó parte del gel que contenía cada una de las muestras para teñirlas con azul de Coomassie y el resto de las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa durante una hr a un voltaje constante de 100 v a 4°C, con agitación constante. Como amortiguador de transferencia se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM con 20% de metanol. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se colocó en solución bloqueadora (3% de gelatina de pescado en PBS 0.1 M, pH 7.4) por una hr a 37°C y posteriormente se realizó un lavado de 10 mins con la solución de lavado (gelatina al 0.3% en PBS 0.1 M pH 7.4 con tween 20 1:1000).

El papel de nitrocelulosa se cortó en tirillas de 4 mm de ancho, las cuales se colocaron en una cámara de incubación.

Tanto las tirillas que contenían ECD como las tirillas que contenían extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se incubaron unas con sobrenadante de la clona A4 productora de Acm anti-p24 sin diluir, y otras con suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis*, el cual se diluyó 1:25 con la solución diluyente (gelatina al 1.5% en PBS 0.1 M pH 7.4 con tween 20 1:1000). Las tirillas se incubaron durante 15 hrs a 4°C y posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 mins cada uno con la solución de lavado mencionada anteriormente. Las tirillas que se pusieron en contacto con suero de paciente se incubaron con gammaglobulinas anti-IgG humana desarrolladas en cabra conjugadas a peroxidasa, diluidas 1:1000; mientras que las tirillas que se pusieron en contacto con Acm anti-p24, se incubaron con gammaglobulinas



anti-IgG de ratón desarrolladas en cabra conjugadas a peroxidasa diluidas 1:1000 en la solución diluyente mencionada anteriormente. Las tirillas se incubaron durante 2 hrs con agitación constante, enseguida se realizaron 3 lavados de 10 mins cada uno y posteriormente se expusieron a la solución cromógeno-substrato (10 mg de 3-3'diaminobenzidina en 20 ml de PBS 0.1 M pH 7.4 con 40 ml de peróxido de hidrógeno al 30%). La reacción se detuvo con HCl 1N. Las tirillas se enjuagaron con agua bidestilada y se secaron colocándolas sobre papel absorbente.

## 5. AISLAMIENTO DE p24 DE *N. brasiliensis* EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.

### 5.1 Fuente de obtención de p24 de *N. brasiliensis*.

La p24 de *N. brasiliensis* se aisló a partir del extracto semipurificado de esta bacteria, el cual estaba enriquecido en esta proteína.

### 5.2 Identificación de p24 en condiciones no desnaturalizantes.

#### 5.2.1 Análisis por PAGE sin SDS del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.

##### - Preparación del gel:

El gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8, se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

	Gel al 5%
Solución patrón de acrilamida- bisacrilamida al 30% T, 2.7% C	0.325 ml
Agua bidestilada	1.862 ml
Amortiguador Tris-HCl pH 6.8	0.312 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.012 ml
TEMED.	0.002 ml

El gel de separación al 12% T, 2.7% C, pH 8.8, se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

Gel al 12%

Solución patrón de acrilamida-bisacrilamida al 30% T, 2.7% C. ....	1.799 ml
Agua bidestilada .....	2.110 ml
Amortiguador tris-HCl pH 8.8 .....	0.562 ml
Persulfato de amonio al 10% .....	0.022 ml
TEMED .....	0.002 ml

Como amortiguador de electroforesis se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM.

- Preparación de la muestra:

La muestra de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se mezcló en proporción 1:1 (v/v) con amortiguador de muestra para condiciones no desnaturalizantes 2X.

- Electroforesis:

Se colocó la muestra en el carril del gel, se aplicó un voltaje constante de 80 volts en el gel de empaquetamiento, después se aumentó a 150 volts durante la migración de la muestra en el gel de separación hasta que el colorante llegó al límite del gel.

El gel se tiñó con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

5.2.2 IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturizantes y evaluación del reconocimiento de p24 por el Acm anti-p24.

Se preparó un minigel de poliacrilamida en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8, sin SDS y se utilizó un peine con carriles de 2 cm cada uno.

Las muestras de ECD y de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se sometieron a PAGE sin SDS.

Después de la electroforesis se cortó una parte del gel de cada una de las muestras para teñirlas con azul de Coomassie, mientras que el resto de las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Se colocó papel de nitrocelulosa a ambos lados del gel, tanto hacia el polo positivo (ánodo), como hacia el polo negativo (cátodo).

Como amortiguador de transferencia se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol.

El resto del procedimiento se llevó a cabo de la misma manera que en la sección 4.6, a excepción de que en este experimento se incubaron tirillas de nitrocelulosa de las que se colocaron a ambos lados del gel, con suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis* y otras con sobrenadante de la clona A4 productora del Acm anti-p24 de *N. brasiliensis*.

5.3 Electroelución de p24 de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturizantes.

5.3.1 PAGE sin SDS preparativo del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.

- Preparación de geles:

Se hicieron geles preparativos sin SDS al 12% T, 2.7% C, pH 8.8, cuyas dimensiones fueron 14 cm X 21 cm X 3mm de grosor y se utilizó un peine con un carril de 13 cm.

El gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8, se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

Gel al 5%

Solución patrón de acrilamida-bisacrilamida al 30% T, 2.7% C. ....	0.975 ml
Agua bidestilada .....	0.587 ml
Amortiguador tris-HCl pH 6.8. ....	0.937 ml
Persulfato de amonio al 10%. ....	0.037 ml
TEMED .....	0.007 ml

El gel de separación al 12% T, 2.7% C, pH 8.8, se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

Gel al 12%

Solución patrón de acrilamida-bisacrilamida al 30% T, 2.7% C. ....	24.00 ml
Agua bidestilada. ....	28.20 ml
Amortiguador tris-HCl pH 8.8. ....	7.48 ml
Persulfato de amonio al 10%. ....	0.29 ml
TEMED. ....	0.02 ml

Como amortiguador de electroforesis se utilizó tris 50 mM, glicina 384 mM.

- Preparación de la muestra:

Una muestra de extracto semipurificado de *N. brasiliensis*, la cual se mezcló con amortiguador de muestra 2X para condiciones no desnaturizantes, en relación 1:1, se sometió a electroforesis preparativa.

- Electroforesis:

La muestra de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se colocó en el carril de 13 cm, se aplicó un voltaje constante de 80 v en el gel de empaquetamiento y de 150 v en el gel de separación. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C; al término de la misma, se cortaron 3 porciones pequeñas del gel (una del extremo izquierdo, otra del extremo derecho y una de la parte central), las cuales se tiñeron con azul de Coomassie, mientras que el resto del gel se congeló a -70°C.

5.3.2 Electroelución de p24 de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.

Después de teñir las 3 porciones del gel preparativo mencionadas anteriormente (sección 5.3.1) e identificar diferentes bandas, se descongeló el gel preparativo y se cortaron los fragmentos que correspondían por su posición a las bandas teñidas, los cuales se cortaron en fracciones más pequeñas.

Las proteínas contenidas en cada uno de estos fragmentos se electroeluyeron individualmente.

Para llevar a cabo la electroelución se utilizó un equipo electroelutor de BIO-RAD.

Como amortiguador de electroelución se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM, sin SDS. Se utilizaron membranas para diálisis cuyo poro de exclusión fue de 12 a 15 kDa; las cuales se calentaron a 60°C en amortiguador para electroelución durante una hr antes de su uso.

El módulo para electroelución se ensambló de la siguiente manera: Se utilizaron tres tubos de vidrio en cuya base se colocó un soporte; posteriormente se colocó el dispositivo que contiene la membrana de diálisis en la base de un adaptador de silicón, el cual se llenó con amortiguador de electroelución y después se ensambló en la base del tubo de vidrio; los tubos se llenaron con este amortiguador y dentro de cada tubo se colocaron los fragmentos del gel que correspondían a cada una de las bandas. Posteriormente, el módulo se colocó

dentro de la cámara para electroelución y se agregó amortiguador para electroelución tanto en la cámara superior como en la inferior hasta cubrir los electrodos.

La electroelución se llevó a cabo durante 210 mins a 4°C, con agitación constante y se aplicó una corriente constante de 10 mA por cada tubo.

Las proteínas electroeluidas se dializaron en el mismo equipo, de la manera siguiente: El amortiguador que se encontraba en las cámaras y dentro de cada tubo por encima del soporte se descartó. Se colocó amortiguador Tris-HCl 10 mM EDTA 2 mM pH 7.6 en la cámara inferior y se dejó con agitación constante a 4°C durante 12 hrs. Después, los adaptadores de silicón de cada tubo de vidrio se removieron lentamente y con una micropipeta se extrajo por separado la solución de cada tubo que contenía las proteínas electroeluidas y dializadas.

### 5.3.3. Análisis por SDS-PAGE de los electroeluidos.

Para determinar en cual de los electroeluidos se encontraba p24; muestras de cada uno de ellos se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8; también se incluyeron una muestra de ECD de *N. brasiliensis* y marcadores de bajo peso molecular SDS-7L.

El gel se tiñó con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

### 5.3.4. Análisis por IET de los electroeluidos.

Se preparó un gel igual al anterior (sección 5.3.3), con un peine de 3 carriles de 2 cm cada uno, en los cuales se aplicaron las muestras de los diferentes electroeluidos. Después de la electroforesis se tiñó una parte de cada muestra con azul de Coomassie, mientras que el resto de las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa.

De los 3 papeles de nitrocelulosa se cortaron tirillas, algunas de las cuales se incubaron con suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis* y otras con el Acm anti-p24 para corroborar la identidad y la antigenicidad de esta proteína.

## 6. IODINACION DE ASB.

Para estandarizar las condiciones de iodación, se utilizó como estándar ASB.

En un vial se colocaron 10 µg de ASB resuspendida en 20 µl de PBS 0.1 M pH 7.2, después se agregaron 50 µl de PBS y 10 µl de iodo <sup>131</sup> (aprox. 200 mCi), enseguida se añadieron 25 µg de cloramina T disueltos en 25 µl de PBS 0.1 M pH 7.2, (5 µl cada min con agitación), la muestra se dejó en reposo durante 5 mins, después de lo cual se agregaron 50 µg de metabisulfito de sodio disueltos en 25 µl de PBS 0.1 M; el vial donde se llevó a cabo la reacción de iodación se colocó dentro de un recipiente con hielo. Posteriormente la muestra se sometió a cromatografía de filtración en gel para separar la proteína iodada del iodo libre.

### 6.1 Cromatografía de filtración en gel.

Para separar la proteína iodada del iodo libre se utilizó cromatografía de filtración en gel.

Una columna de 1 ml se empaquetó por gravedad con sephadex G-10 con una capacidad de retención de agua de 2 a 3 ml por gr de peso seco. Se pesaron 500 mg de sephadex G-10 los cuales se resuspendieron en agua bidestilada y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. Después el sephadex se lavó 3 veces con agua bidestilada, se equilibró en amortiguador tris-HCl 10 mM con EDTA 2 mM pH 7.6 y se desgasificó mediante vacío; con este material se empacó la columna por gravedad a un flujo de 5 gotas por min. La muestra se eluyó con el mismo amortiguador. Se recolectaron 10 alícuotas de 300 µl cada una al flujo de trabajo.

## 6.2 Autorradiografía.

Para determinar en cuales de las fracciones de elución se encontraba la proteína iodada, 30 µl de cada una de las fracciones se mezclaron con amortiguador de muestra para condiciones desnaturizantes 4X y se calentaron durante 2 mins en agua hirviendo; posteriormente se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8.

Después de la electroforesis, el gel se colocó sobre papel filtro y encima del mismo se puso una membrana de celofán previamente sumergida en agua bidestilada; el gel se colocó en un secador para geles durante 2 hrs con vacío, la primera hr a 65°C y la segunda a temperatura ambiente.

Una vez seco el gel, en el papel filtro en la posición correspondiente a la parte superior derecha del gel se colocó una marca con iodo radiactivo. Posteriormente el gel se expuso a una película para rayos X dentro de un chasis de acero inoxidable, a -20°C; los tiempos de exposición fueron variables, después de lo cual la película se reveló.

## 7. IODINACION DE p24 DE *N. brasiliensis*.

Se iodaron aproximadamente 20 µg de p24 de *N. brasiliensis*, la p24 iodada se separó del iodo libre por cromatografía de filtración en gel; las fracciones de elución se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía; se utilizó la metodología mencionada en las secciones 6, 6.1 y 6.2.

## 8. FRAGMENTACION DE ASB CON TRIPSINA.

Para las digestiones tripticas se utilizó tripsina TPCK soluble de pancreas bovino (cuya actividad era de 9,700 U/mg de sólido).

Para la proteólisis triptica de ASB se mezclaron ASB y tripsina en una proporción 80:1. A 400 µg de ASB resuspendida en 200 µl de amortiguador de



digestión (tris-HCl 10 mM con EDTA 2 mM pH 7.6) se le agregaron 5 µg de tripsina TPCK resuspendidos en 50 µl de amortiguador de digestión. La digestión se llevó a cabo a 25°C. A diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 30 y 45 mins, 1, 2, 3, 5 y 7 hrs) se recolectaron alícuotas de 25 µl cada una; para detener la reacción se le agregaron a cada alícuota 8.3 µl de amortiguador de muestras para condiciones desnaturizantes y se hirvieron en baño de agua durante 5 mins.

#### 9. ANALISIS POR SDS-PAGE DE ASB DIGERIDA CON TRIPSINA.

Los productos de la digestión de ASB con tripsina obtenidos en la sección anterior (sección 7) se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8; posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie.

#### 10. FRAGMENTACION DE CASEINA CON TRIPSINA.

Para la proteólisis triptica de caseína con tripsina TPCK se mezclaron caseína y tripsina TPCK en relación 220:1. A 400 µg de caseína resuspendidos en 200 µl de amortiguador de digestión tris-HCl 10 mM EDTA 2 mM pH 7.6, se les agregaron 1.8 µg de tripsina resuspendidos en 50 µl de amortiguador de digestión. La digestión se llevó a cabo a 25°C. Se recolectaron alícuotas de 25 µl a diferentes tiempos de digestión (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 y 30 mins); para detener la reacción se agregaron a cada alícuota 8.3 µl de amortiguador de muestra para condiciones desnaturizantes y además las muestras se hirvieron durante 5 mins.

#### 11. ANALISIS POR SDS-PAGE DE CASEINA DIGERIDA CON TRIPSINA.

Los productos de la digestión de caseína con tripsina TPCK obtenidos mediante la metodología mencionada en la sección 9 se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 12% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8; una vez concluida la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie.

#### 12. FRAGMENTACION DE p24 DE *N. brasiliensis* CON TRIPSINA.

Para la proteólisis triptica de p24 de *N. brasiliensis* se mezcló p24 de *N. brasiliensis* y tripsina TPCK soluble en relación 20:1.

La p24 iodizada (20 µg) se resuspendió en 280 µl de agua bidestilada y se mezcló con 0.5 µg de tripsina TPCK resuspendidos en 10 µl de amortiguador de digestión. La reacción se llevó a cabo a 25°C. Se recolectaron alícuotas de 25 µl cada una a diferentes tiempos de reacción (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 mins); la reacción se detuvo agregándole a cada una de las alícuotas 8.3 µl de amortiguador de muestras para condiciones desnaturalizantes y calentando las muestras durante 5 mins en baño de agua hirviendo.

#### 13. ANALISIS POR AUTORRADIOGRAFIA DE p24 DE *N. brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA.

Los productos de la digestión de p24 de *N. brasiliensis* con tripsina TPCK a diferentes tiempos se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 12% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8, posteriormente se realizó autorradiografía como se mencionó en la sección 6.2.

## 14. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-*N. brasiliensis* POR ELISA E IET.

### 14.1 Sueros examinados.

Los sueros incluidos en este estudio fueron obtenidos de pacientes con diagnóstico confirmado por cultivo de micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis*, que asistieron a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario "José E. González".

Las muestras recolectadas se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

Los sueros que se sometieron a IET y ELISA fueron: 10 sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* en estadio activo, 5 sueros de personas que habían presentado micetoma por *N. brasiliensis* y que alcanzaron remisión completa y 5 sueros de personas aparentemente sanas.

#### 14.1.1 Técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.

El antígeno que se utilizó en esta técnica fue un extracto semipurificado de *N. brasiliensis* enriquecido en p24.

A) Se utilizaron placas de poliestireno de fondo plano.

B) Se agregaron 0.5 µg de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* resuspendidos en 200 µl de amortiguador de acetatos pH 5.0.

C) Se realizaron 3 lavados de 10 mins cada uno con PBS 0.1 M pH 7.4 con tween 20 1:1000 (Solución de lavado).

D) Se agregaron 200 µl de solución bloqueadora (leche descremada al 5% en PBS con tween 20 1:1000).

E) Se realizaron 5 lavados: 2 de 5 mins y 3 de un min cada uno.

F) Los sueros problema se agregaron a una dilución 1:500, diluidos en solución bloqueadora y se incubaron durante una hr a 37°C.

G) Se realizaron 5 lavados: 2 de 5 mins y 3 de un min cada uno.

H) Se agregaron anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados a peroxidasa, diluidos 1:1000 en leche descremada al 1% en PBS con tween 20 1:1000; 200 µl a cada pozo; se incubaron durante una hr a 37°C.

I) Se realizaron 3 lavados: Uno de 5 mins y 2 de un min cada uno.

J) A cada pozo se agregaron 160 µl de solución substrato-cromógeno, la cual se preparó de la siguiente manera: 8 mg de ortofenilendiamina dihidroclorada (OPD) se resuspendieron en 20 ml de amortiguador de citratos pH 5.0, más 2.4 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La placa se guardó en oscuridad durante 30 mins.

K) La reacción se detuvo con 40 µl de ácido sulfúrico 1 N por pozo.

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

#### 14.1.2 Análisis de la reactividad de sueros problema contra p24 por IET.

En este experimento se utilizó como antígeno p24 aislada a partir de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.

El antígeno se sometió a SDS-PAGE en gradiente de 12 a 18% T, 2.7% C, pH 8.8. Al término de la electroforesis, la proteína contenida en el gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS 0.1 M pH 7.2, posteriormente se lavó durante 10 mins con leche descremada al 0.1% en PBS 0.1 M, pH 7.2 (solución de lavado); después se cortaron tirillas de 3 mm de ancho, las cuales se incubaron con los sueros problema (sueros de pacientes con micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis*, sueros de pacientes con micetoma en remisión completa y sueros de personas aparentemente sanas) diluidos 1:25 en leche descremada al 1% en PBS 0.1 M pH 7.2 (solución diluyente) a 4°C durante 12 hrs. Después se lavaron y se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con gammaglobulinas anti-IgG humana desarrolladas en cabra y marcadas con iodo 131, diluidas 1:50 en solución diluyente. Posteriormente se lavaron, se secaron y se colocaron entre papel filtro y una membrana de celofán. Las tirillas se expusieron a una

película para rayos X dentro de un chasis de acero inoxidable durante 72 hrs a -20°C, después la película se reveló.

15. ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA ACTIVO POR *N. brasiliensis* CONTRA p24 DIGERIDA CON TRIPSINA.

La p24 de *N. brasiliensis* sin iodinar se digirió con tripsina TPCK en proporción 20:1; se recolectaron alícuotas a los siguientes tiempos: 0, 2 y 10 mins de digestión.

Estos antígenos se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 12% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8. Al término de la electroforesis, tanto la p24 sin digerir como los péptidos tripticos de la misma contenidos en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa cuyo poro era de 0.2  $\mu$ , las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS 0.1 M pH 7.2. Posteriormente se lavaron con leche descremada al 0.1% en PBS con tween 20 1:1000 (solución de lavado) durante 10 mins. Las 3 membranas se cortaron en tirillas de 3 mm de ancho. Las tirillas correspondientes al tiempo 0, 2 y 10 mins de digestión se incubaron a 4°C durante toda la noche con cada uno de los sueros de pacientes con micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis* diluidos 1:25 en leche descremada al 1% en PBS con tween 20 1:1000 (solución diluyente). Después se lavaron y se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con gammaglobulinas anti-IgG humana desarrolladas en cabra y marcadas con iodo 131, diluidas 1:50 en solución diluyente. Posteriormente se lavaron, se secaron en papel absorbente y se colocaron entre papel filtro y una membrana de celofán. Las tirillas se expusieron a una película para rayos X dentro de un chasis de acero inoxidable durante 72 hrs a -20°C y después se reveló.

## V. RESULTADOS

### 1. OBTENCION DE ECD DE *N. brasiliensis*.

#### 1.1 Determinación de la concentración de proteínas.

Se obtuvieron varios lotes de ECD de *N. brasiliensis*.

Para la preparación de cada uno se utilizaron aproximadamente 6.4 litros de medio BHI.

Para cada extracto se obtuvo una masa bacteriana húmeda de aproximadamente 100 gr, de la cual se eliminaron los lípidos.

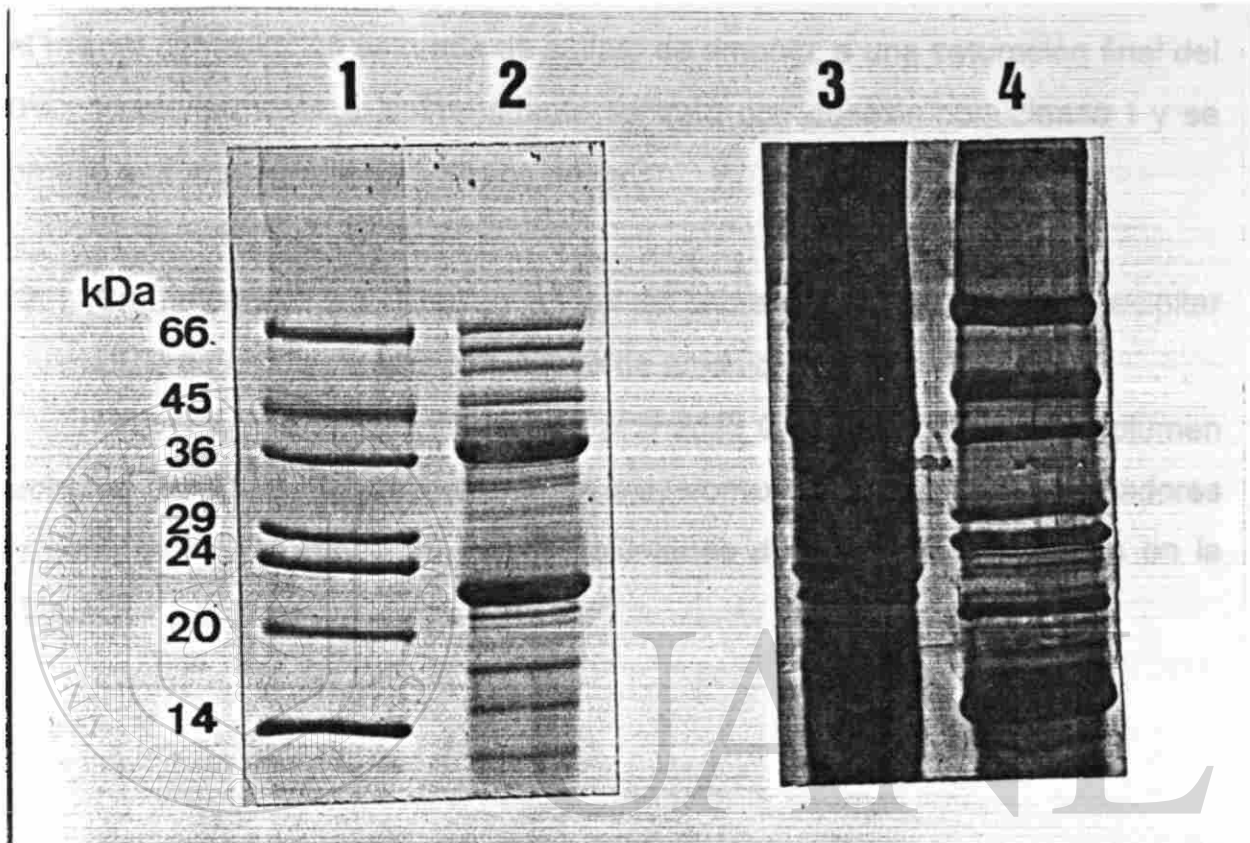
La concentración de proteínas determinada por el método de Lowry en el ECD fue de 1.21 mg/ml; en total se obtuvieron aproximadamente 219 mg por lote.

#### 1.2 Análisis por SDS-PAGE del ECD de *N. brasiliensis*.

Para determinar la calidad del ECD de *N. brasiliensis*, los extractos obtenidos se analizaron mediante SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

Al igual que en el ECD de *N. brasiliensis* de referencia, en los ECD obtenidos encontramos aproximadamente 35 bandas, localizadas principalmente entre los marcadores de 66 y 14 kDa (Fig. 1).

La banda correspondiente a p24 de *N. brasiliensis* se tiñó principalmente con azul de Coomassie mas que con nitrato de plata.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 1: ANALISIS DEL ECD DE *N. brasiliensis* POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8. Carril 1: Marcadores de peso molecular SDS-7L, carril 2: ECD de *N. brasiliensis*. Tinción con azul de Coomassie. Carril 3: ECD de *N. brasiliensis* y carril 4: Marcadores de peso demolecular SDS-7L. Tinción con nitrato de plata y azul de Coomassie.

## 2. OBTENCION DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*.

### 2.1 Fraccionamiento del ECD de *N. brasiliensis* con sulfato de amonio.

Con el fin de fraccionar el ECD de *N. brasiliensis* se precipitaron 100 mg del mismo con solución saturada de sulfato de amonio, a una saturación final del 50%. Posteriormente el sobrenadante se trató con desoxirribonucleasa I y se sometió a cromatografía de filtración en gel.

### 2.2. Cromatografía de filtración en gel del sobrenadante obtenido al precipitar ECD de *N. brasiliensis* con sulfato de amonio.

Una columna empaquetada con sephadex G-100 se calibró. El volumen vacío fue de 30 ml. Posteriormente se eluyeron otras 3 proteínas (marcadores de peso molecular conocido), cuyos volúmenes de elución se muestran en la tabla 1.

TABLA 1: VOLUMEN DE ELUCION DE DIFERENTES MARCADORES DE PESO MOLECULAR EN UNA COLUMNA EMPAQUETADA CON SEPHADEX® G-100.

MARCADOR	PESO MOLECULAR	VOLUMEN DE ELUCION	NUMERO DE FRACCION
Alcohol deshidrogenasa.	150 kDa	34ml	2
Anhidrasa carbónica	29 kDa	50 ml	10
Citocromo "c"	12.4 kDa	60 ml	15



El sobrenadante obtenido mediante la precipitación de ECD de *N. brasiliensis* con solución saturada de sulfato de amonio, se trató con desoxirribonucleasa I y posteriormente se aplicó a la columna de sephadex G-100.

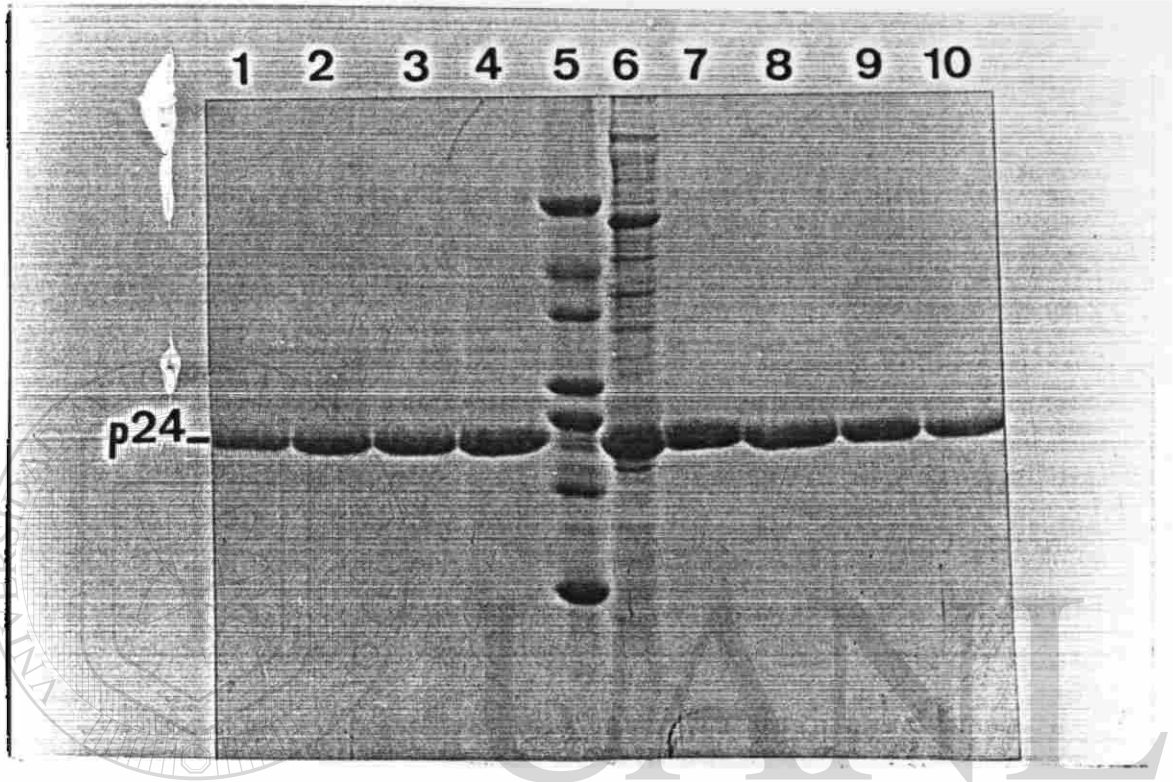
Los valores de abs a 280 nm de cada una de las fracciones se graficaron contra el volumen de elución de las mismas, y al igual que Vera, Salinas y cols (52) identificamos 3 picos; un pico de peso molecular alto (P1), otro con su máxima absorbancia cerca del marcador de 29 kDa (P2) y otro cuya abs fue muy alta pero de peso molecular bajo (P3).

Las fracciones correspondientes al pico 2 se analizaron mediante SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8. El gel se tiñó con azul de Coomassie y observamos la presencia de p24 en las fracciones cuyo volumen de elución fue de 50 a 62 ml (Fig. 2).

Estas alícuotas se mezclaron y constituyeron el extracto semipurificado de *N. brasiliensis*. La concentración de proteínas fue de 100 µg/ml de acuerdo al método de Lowry .

### 3. ANALISIS POR SDS-PAGE E IET DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*.

Para corroborar la identidad y antigenicidad de p24 en el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 las siguientes muestras: Marcadores de peso molecular SDS-7 L, ECD (control positivo) y extracto semipurificado de *N. brasiliensis*. En el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* encontramos una banda que migró a la posición de p24 (Fig. 3). Mediante IET observamos que esta proteína fue reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de un paciente con micetoma por *N. brasiliensis*, así como por el Acm anti-p24 (Fig. 4).



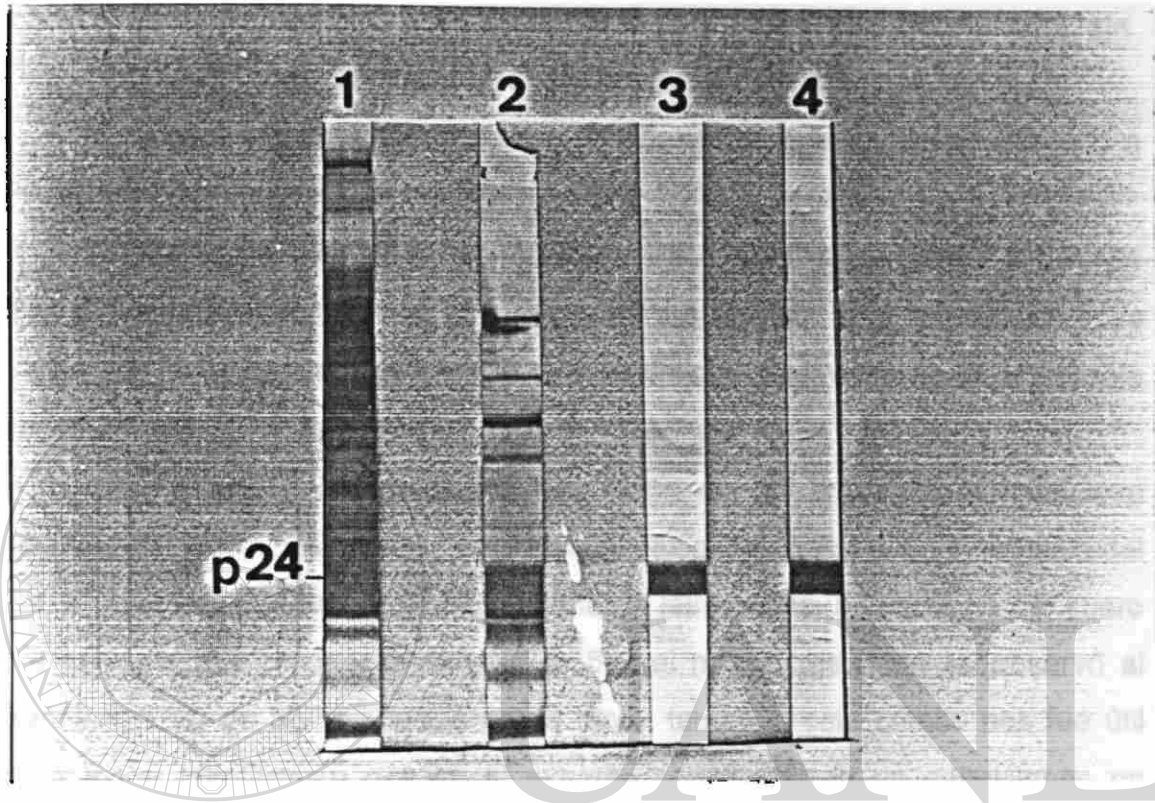
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

FIG. 2: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 12% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN SEPHADEX G-100. Carriles del 1 al 4: Fracciones de la 10 a la 13 respectivamente; carril 5: Marcadores de peso molecular SDS-7 L; carril 6: ECD de *N. brasiliensis* y carriles del 7 al 10: Fracciones de la 13 a la 16 respectivamente. Tinción con azul de Coomassie.



FIG. 3: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*. Carril 1: Marcadores de peso molecular SDS-7 L, carril 2: ECD de *N. brasiliensis* y carril 3: Extracto semipurificado de *N. brasiliensis*. Tinción con azul de Coomassie y con nitrato de plata.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 4: ANALISIS POR IET DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*. Tirillas 1 y 2: ECD de *N. brasiliensis* reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente; y tirillas 3 y 4: Extracto semipurificado de *N. brasiliensis* reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente.

#### 4. AISLAMIENTO DE p24 DE *N. brasiliensis* EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.

##### 4.1 Análisis del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* por PAGE sin SDS e IET para identificar p24 en condiciones no desnaturalizantes.

Una muestra de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* se sometió a PAGE sin SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8.

Después de teñir el gel con azul de Coomassie observamos 3 bandas (Fig. 5); las cuales también se tiñeron con nitrato de plata; por lo tanto, en base a este criterio no pudimos determinar cual de las bandas presentes en el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* podría corresponder a p24.

Mediante IET determinamos que tanto en las tirillas de nitrocelulosa colocadas hacia el polo positivo como en las colocadas hacia el polo negativo del gel, el Acm anti-p24 no reconoció ninguna de las bandas, a diferencia del suero del paciente que reconoció varias (Fig. 6); el mismo resultado se observó al transferir ECD de *N. brasiliensis* por lo tanto, tampoco este criterio nos fue útil para lograr identificar a p24 en el extracto semipurificado en condiciones no desnaturalizantes.

##### 4.2 Electroelución de p24 en condiciones no desnaturalizantes y su análisis por SDS-PAGE e IET.

Las 3 bandas observadas en el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* teñido con azul de Coomassie, se electroeluyeron individualmente y posteriormente cada uno de los electroeluidos se analizaron por SDS-PAGE en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 e IET. Observamos en los tres la presencia exclusivamente de una banda que migró a la posición de p24 (Fig. 7). Los tres electroeluidos se analizaron por IET y fueron reconocidos, tanto por los anticuerpos presentes en el suero de un paciente con micetoma por *N. brasiliensis* (Fig. 8), como por el Acm anti-p24 de *N. brasiliensis* (Fig. 9).



FIG. 5: ANALISIS POR PAGE SIN SDS EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*. Carril 1: Extracto semipurificado de *N. brasiliensis*. Tinción con Azul de Coomassie.

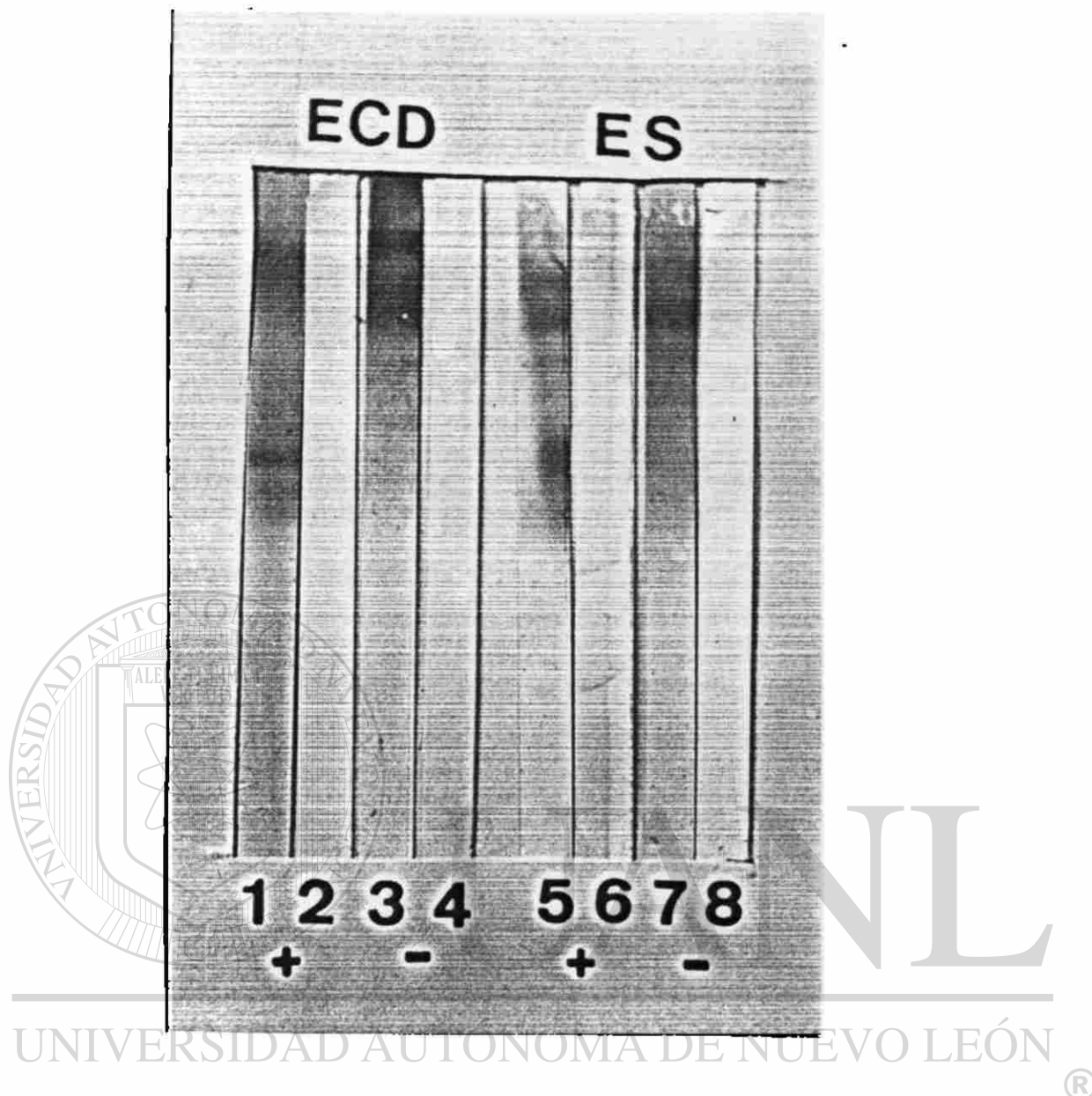
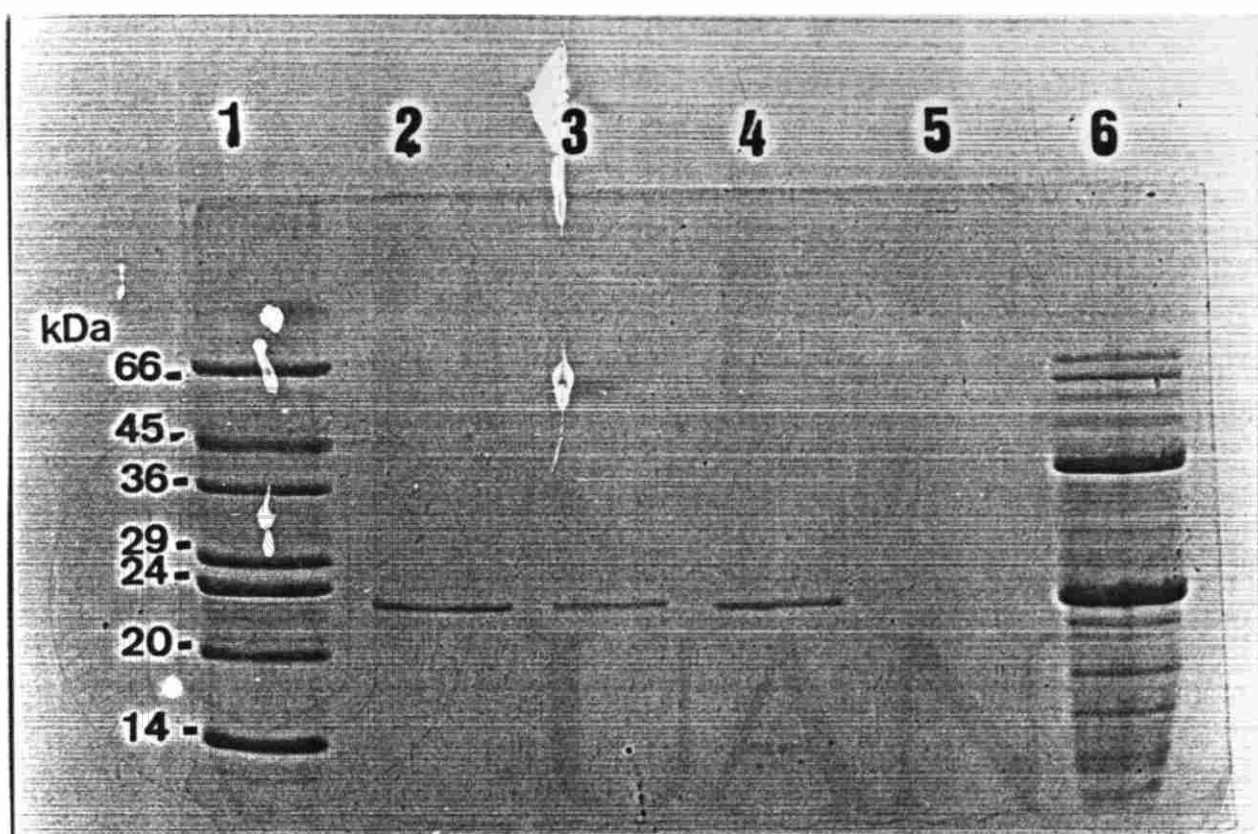


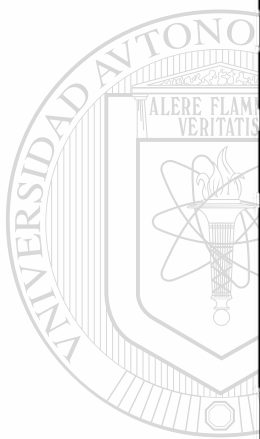
FIG. 6: ANALISIS POR IET DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis* EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES. Tirillas 1 y 2: ECD de *N. brasiliensis* (polo positivo) reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente; tirillas 3 y 4: ECD (polo negativo) reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente. Tirillas 5 y 6: Extracto semipurificado de *N. brasiliensis* (polo positivo) reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente; tirillas 7 y 8: Extracto semipurificado (polo negativo) reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente.



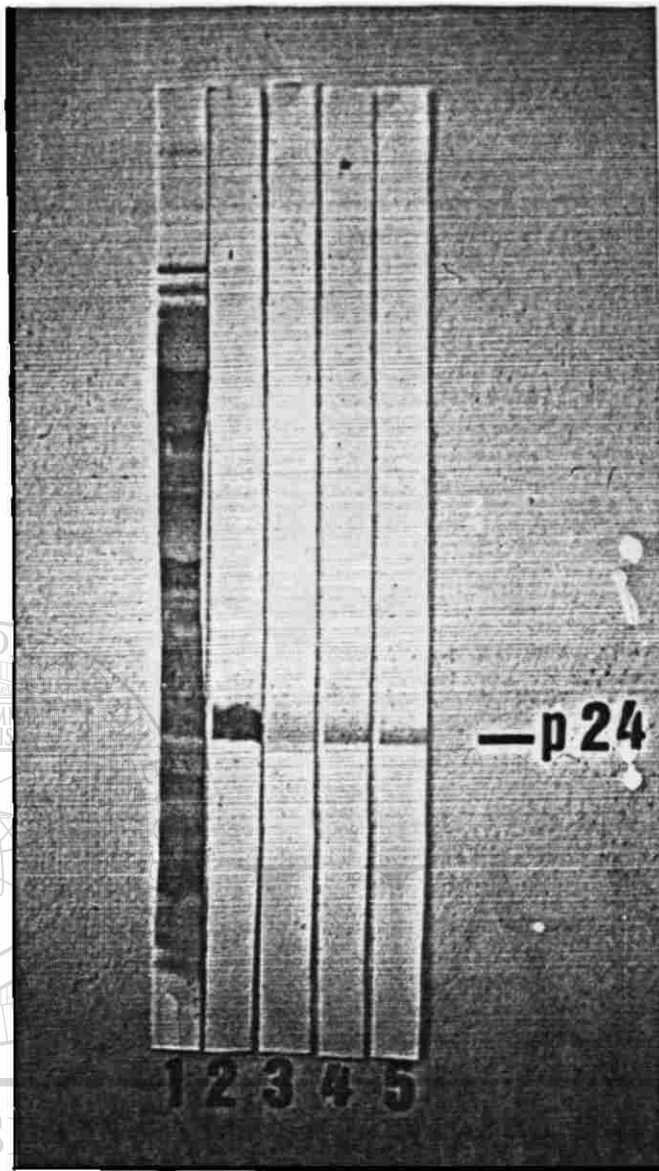
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 7: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE LOS TRES ELECTROELUIDOS. Carril 1: Marcadores de peso molecular SDS-7L, carril 2: Electroeluido 1, carril 3: Electroeluido 2, carril 4: Electroeluido 3, carril 5: Sin muestra y carril 6: ECD de *N. brasiliensis*. Tinción con azul de Coomassie.





UNIVERS



NL

EVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 8: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE UN SUERO DE PACIENTE CON MICETOMA POR *N. brasiliensis* CONTRA LOS TRES ELECTROELUIDOS. Tirillas 1 y 2: ECD de *N. brasiliensis* reveladas con suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis* y con Acm anti-p24 respectivamente y tirillas 3, 4 y 5: Electroeluidos 1, 2 y 3 reveladas con suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis*.

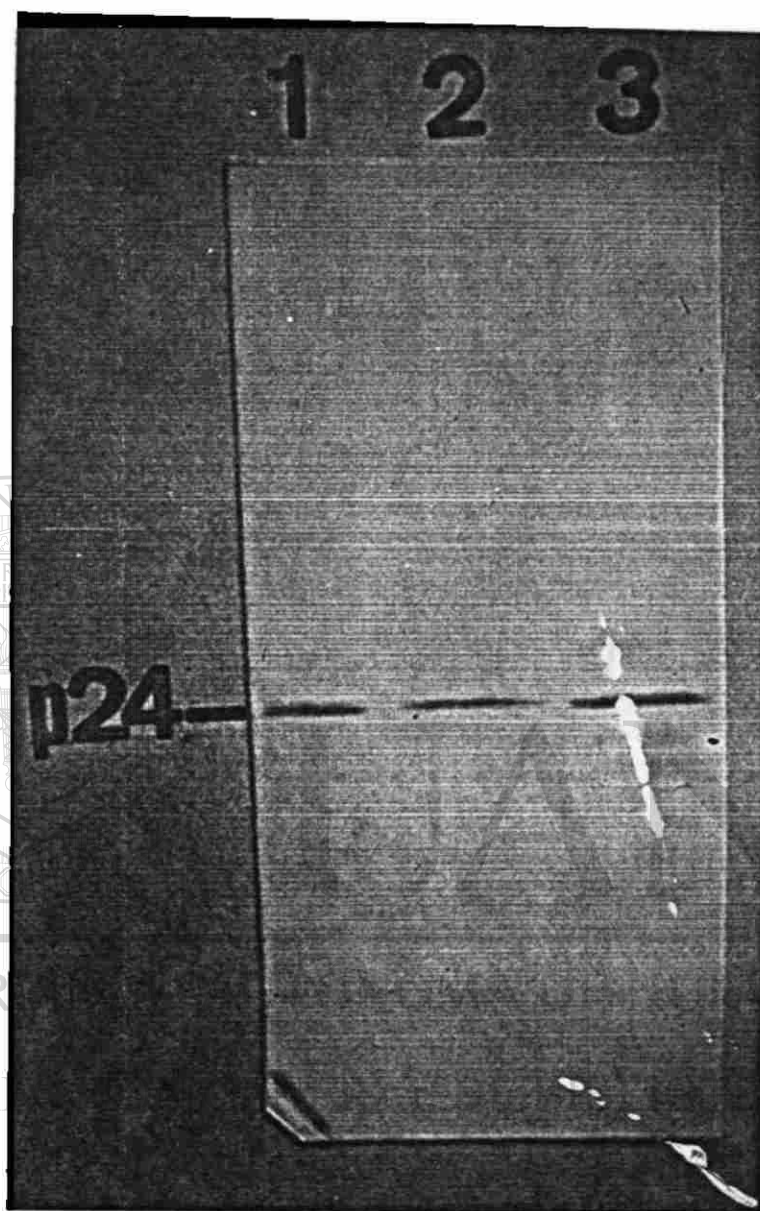


FIG. 9: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DEL Acm ANTI-p24 DE *N. brasiliensis* CONTRA LOS TRES ELECTROELUIDOS. Tirillas 1, 2 y 3: Electroeluidos 1, 2 y 3 reveladas con Acm anti-p24.

## 5. IODINACION DE ASB.

Para estandarizar las condiciones de iodación utilizamos ASB. Una vez iodada la muestra de ASB, se sometió a cromatografía de filtración en gel con el fin de eliminar el yodo libre. El volumen vacío fue de 600 ml y en las siguientes 10 alícuotas (3 ml totales), detectamos mediante autorradiografía la presencia de ASB iodada (Fig. 10).

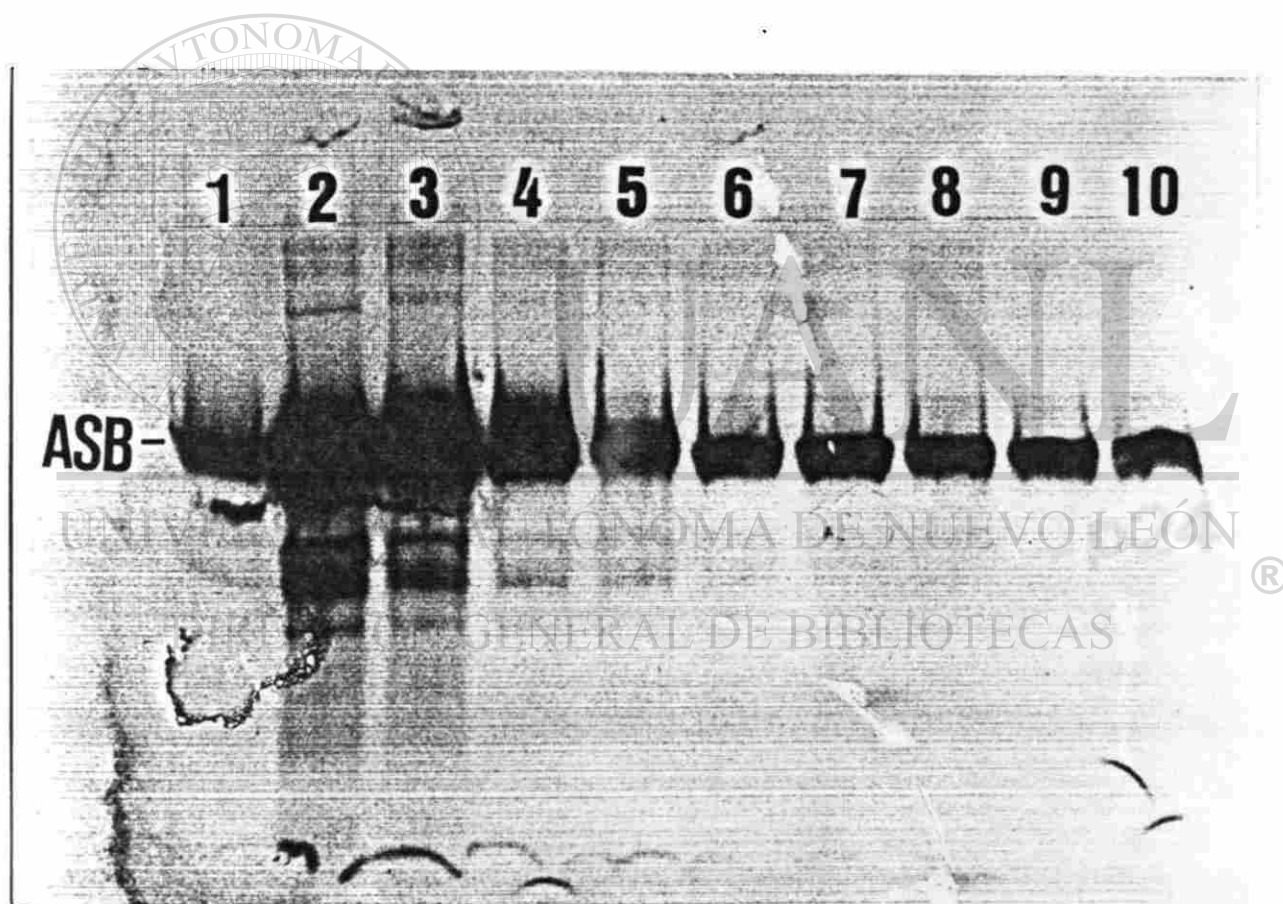


FIG. 10: ANALISIS POR AUTORRADIOGRAFIA DE ASB IODINADA. Carriles del 1 al 10: Fracciones de elución de ASB iodada de la 3 a la 12 respectivamente.

## 6. IODINACION DE p24 DE *N. brasiliensis*.

Utilizando las condiciones para la iodación de ASB se iodó p24 de *N. brasiliensis*. La proteína iodada se separó del yodo libre mediante cromatografía de filtración en gel. Las diferentes fracciones de elución se resolvieron en SDS-PAGE y mediante autorradiografía detectamos la presencia de una banda correspondiente a p24 en las 6 fracciones de elución posteriores al volumen vacío, en algunas de ellas observamos la presencia de 2 bandas de peso molecular menor (Fig. 11).

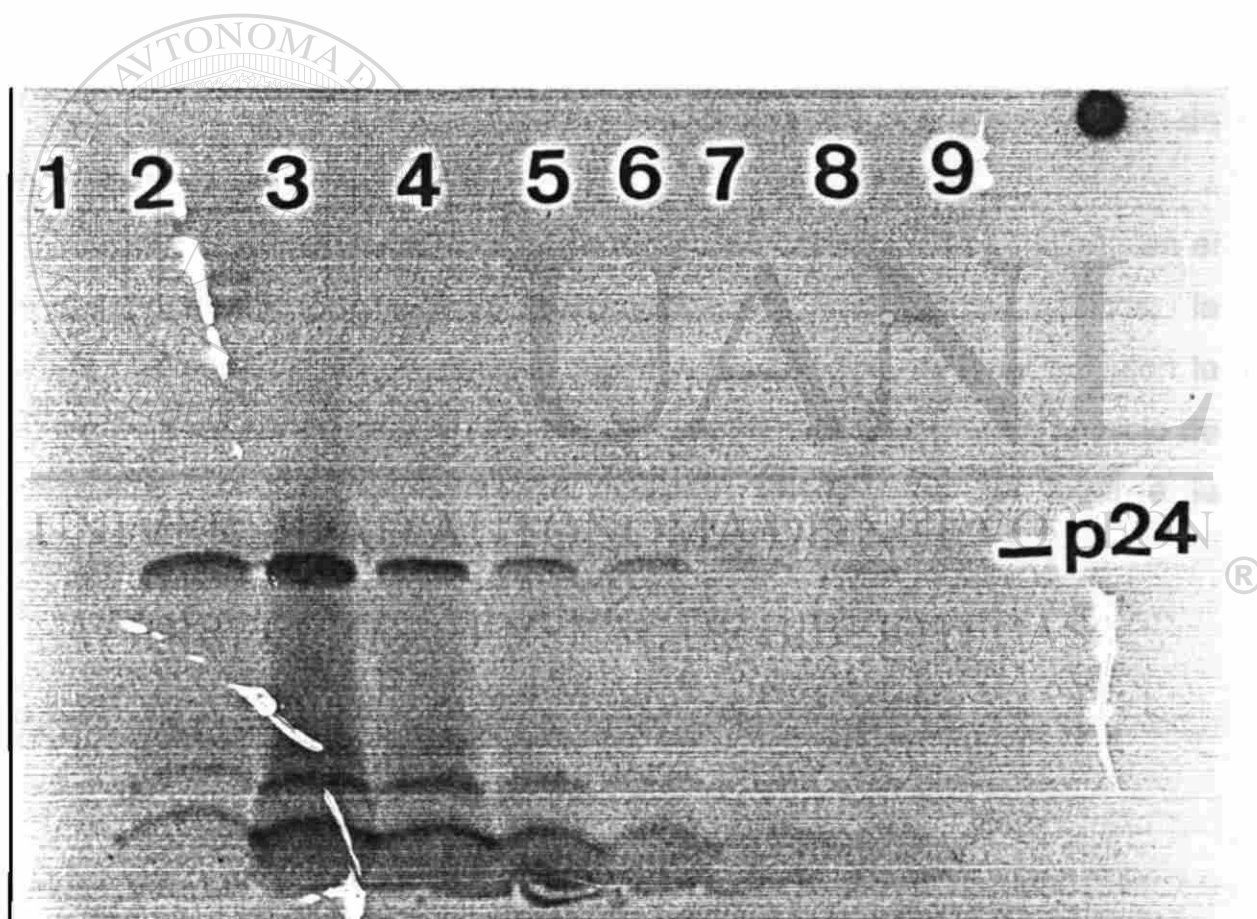


FIG.11: ANALISIS POR AUTORRADIOGRAFIA DE p24 IODINADA. Carriles del 1 al 9: Fracciones de elución de p24 iodada de la 2 a la 10 respectivamente.

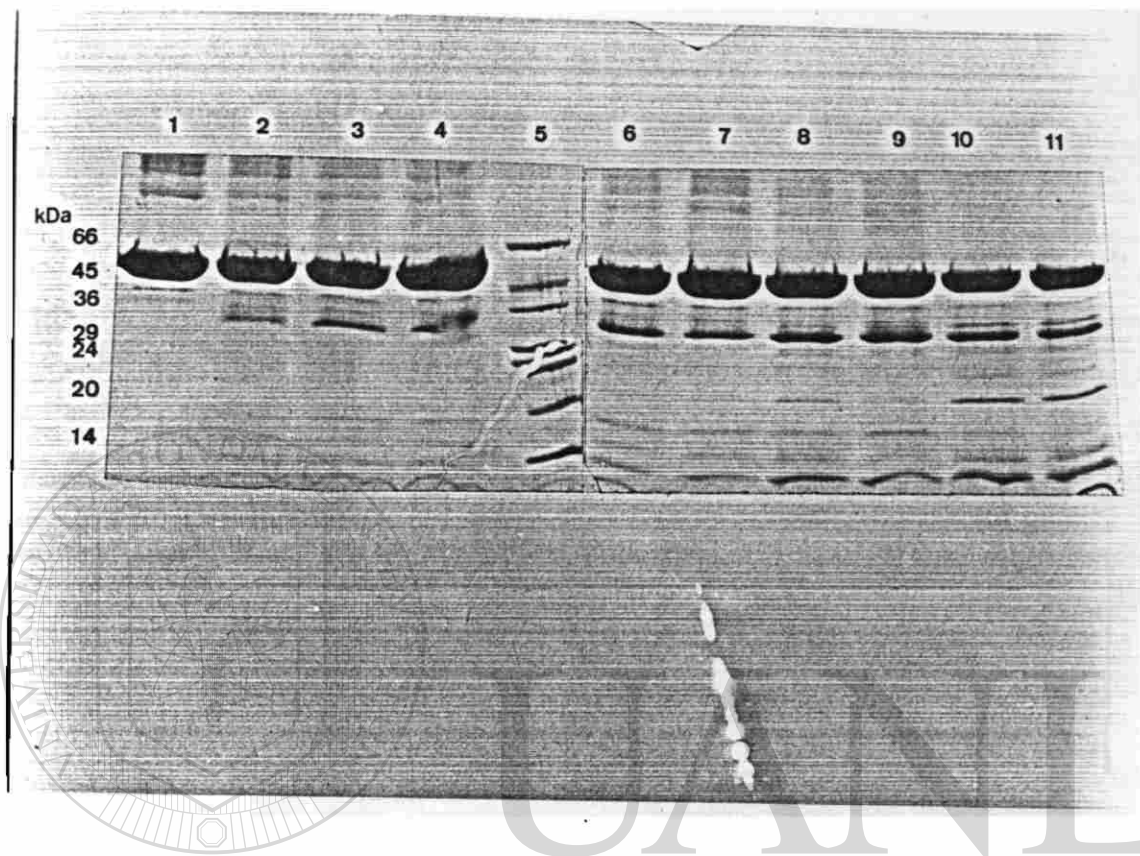
## 7. ANALISIS POR SDS-PAGE DE ASB Y CASEINA DIGERIDAS CON TRIPSINA.

Los productos obtenidos a partir de la digestión tanto de ASB como de caseína con tripsina a diferentes tiempos se analizaron mediante SDS-PAGE en gradiente y tinción con azul de Coomassie.

En la Fig. 12 se muestra el mapa tríptico de ASB (PM 66 kDa); en el cual observamos la presencia de aproximadamente 7 fragmentos trípticos de ASB a diferentes tiempos de digestión; el peso molecular de los fragmentos varió desde 14 hasta 45 kDa; algunos de los fragmentos trípticos que se formaron al inicio de la digestión presentaron posteriormente proteólisis y finalmente desaparecieron. La formación de los fragmentos trípticos de ASB coincidió con la disminución de la intensidad de la banda de ASB.

En la Fig. 13 se muestra el mapa tríptico de caseína (PM 26 kDa); en el cual observamos la formación de aproximadamente 7 fragmentos trípticos; la mayoría presentaron peso molecular mayor a los 14 kDa; al igual que con la ASB algunos de los fragmentos trípticos de caseína que se formaron al inicio de la digestión sufrieron posteriormente digestión tríptica para dar lugar a la formación de fragmentos de peso molecular menor.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

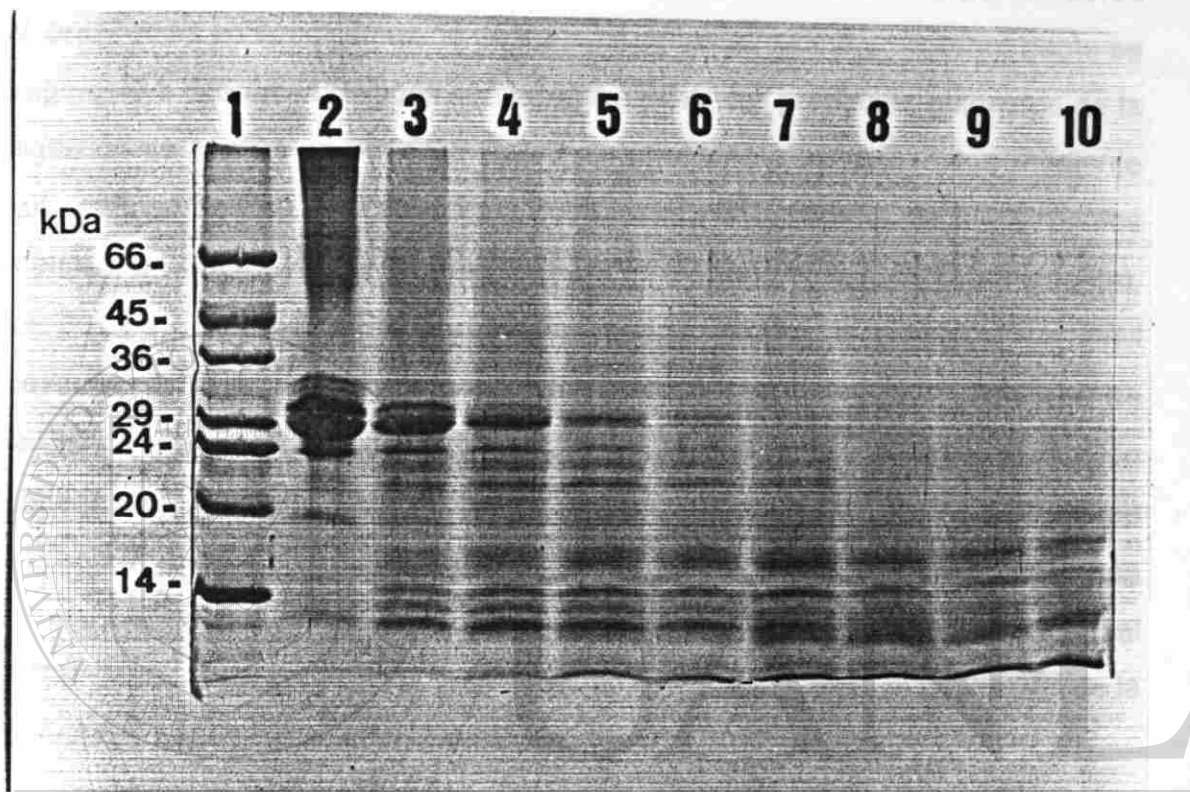


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 12: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE ASB DIGERIDA CON TRIPSINA. Carriles del 1 al 4: ASB digerida con tripsina al tiempo 0, 10, 20 y 30 mins respectivamente; carril 5: Marcadores de peso molecular SDS-7L y carriles del 6 al 11: ASB digerida con tripsina a los 45 mins, 1, 2, 3, 5 y 7 hrs respectivamente. Tinción con azul de Coomassie.

3. ANALISIS POR SDS-PAGE Y AUTORRADIOGRAFIA DE p24 DE *N. brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA.

La p24 de *N. brasiliensis* se analiza a partir de extracto semipurificado de



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 13: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 12% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE CASEÍNA DIGERIDA CON TRIPSINA. Carril 1: Marcadores de peso molecular SDS-7L y carriles del 2 al 10: Caseína digerida con tripsina a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 mins respectivamente. Tinción con azul de Coomassie.

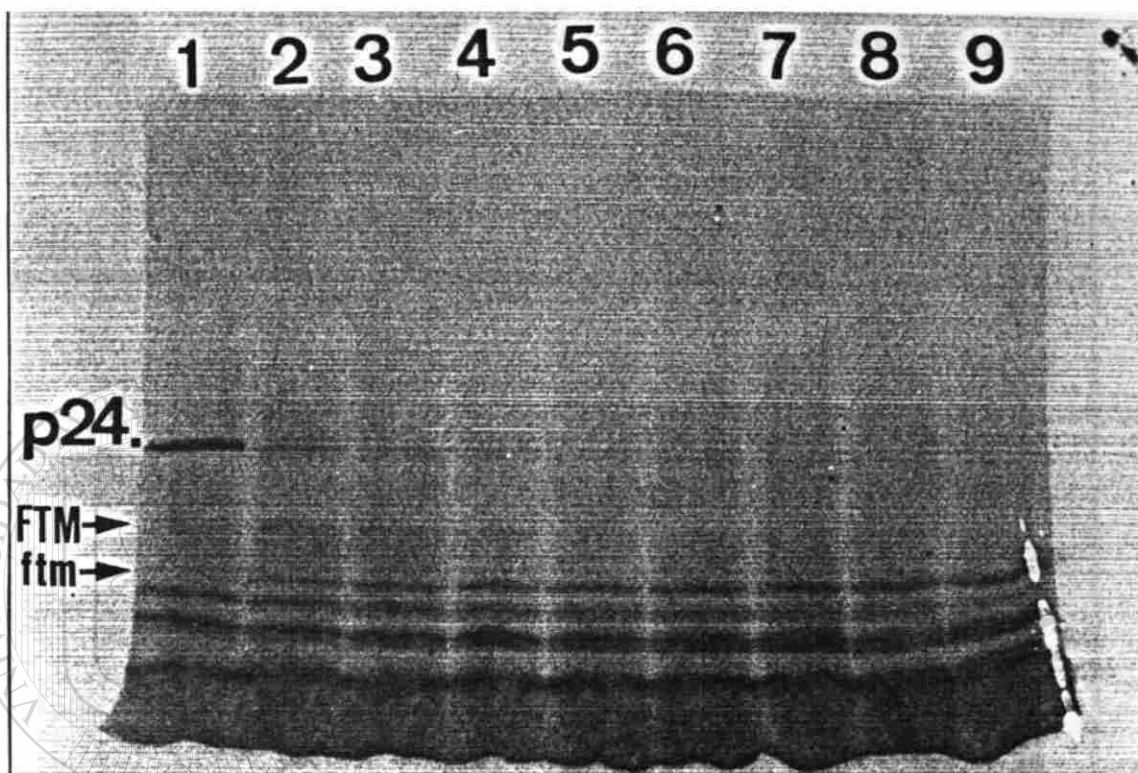
## 8. ANALISIS POR SDS-PAGE Y AUTORADIOGRAFIA DE p24 DE *N. brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA.

La p24 de *N. brasiliensis* aislada a partir de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes se iodizó y posteriormente se fragmentó a diferentes tiempos con tripsina TPCK; los productos obtenidos de la digestión se analizaron por SDS-PAGE en gradiente y se resolvieron mediante autorradiografía (Fig. 14) en la cual observamos la presencia de 2 fragmentos tripticos; un fragmento triptico mayor (FTM) y un fragmento triptico menor (ftm), los dos se detectaron a los 2 mins de haberse iniciado la digestión; el FTM después de los 4 mins presentó digestión triptica; mientras que la intensidad de la banda correspondiente al ftm se fue incrementando conforme la banda correspondiente a p24 y al FTM fueron disminuyendo. A los 10 mins de haberse iniciado la digestión triptica de p24 observamos con mayor intensidad la banda correspondiente al ftm y coincidió con la desaparición total tanto de p24 como del FTM; después de los 10 mins y hasta los 25 mins de digestión la intensidad de la banda correspondiente al ftm permaneció igual.

## 9. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis* POR ELISA.

Los 10 sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* en estadio activo tuvieron valores de absorbancia a 492 nm mayores a 0.3. Por otro lado, los 5 sueros de personas que habían presentado micetoma y que alcanzaron remisión completa y los 5 sueros de personas aparentemente sanas sin antecedentes de micetoma, presentaron valores de absorbancia menores a 0.3 (tabla 2).





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 14: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 12% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 Y AUTORADIOGRAFIA DE p24 DE *N. brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA. Carriles del 1al 9: p24 digerida con tripsina a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 mins respectivamente.

TABLA 2: ABSORBANCIAS DE SUEROS ANALIZADOS CON LA TECNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*.

PACIENTES CON MICETOMA ACTIVO		PACIENTES CON MICETOMA EN REMISION		PERSONAS SANAS	
Clave	Abs	Clave	Abs	Clave	Abs
M1	1.135	MR1	0.138	SN1	0.099
M2	0.967	MR2	0.184	SN2	0.021
M3	1.195	MR3	0.110	SN3	0.105
M4	1.967	MR4	0.098	SN4	0.085
M5	1.815	MR5	0.175	SN5	0.025
M6	0.985				
M7	1.615				
M8	1.975				
M9	1.835				
M10	1.788				

Abs: Absorbancia

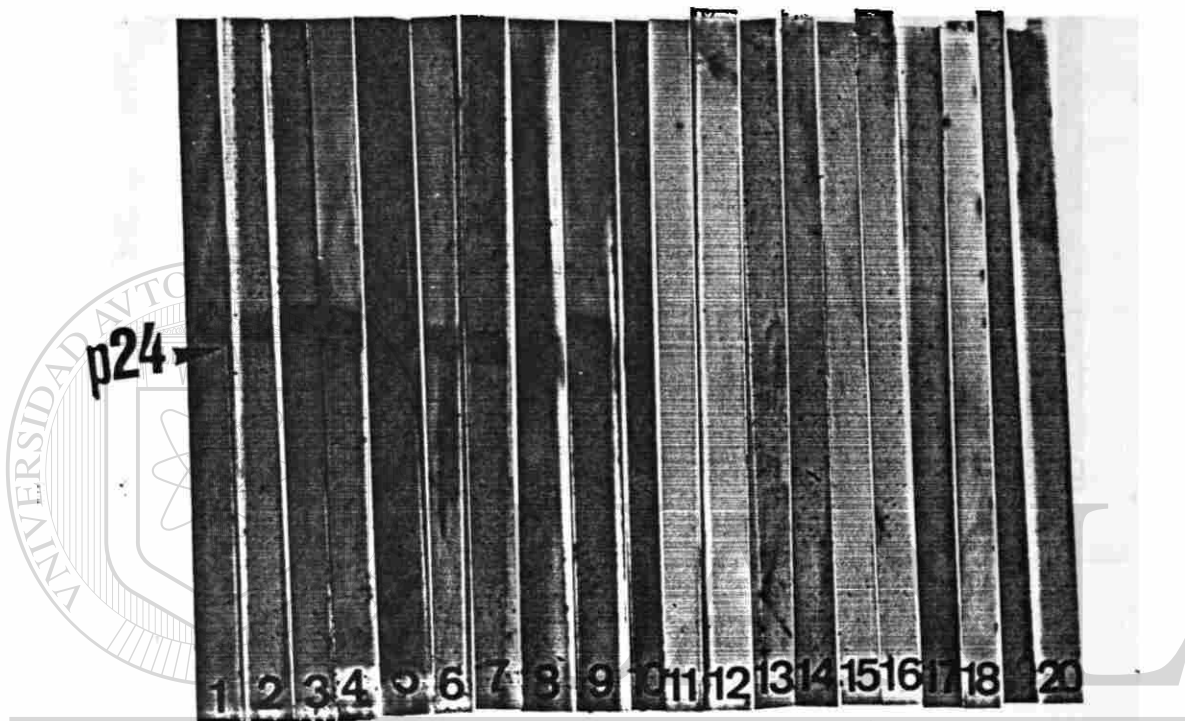
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

10. ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS PROBLEMA CONTRA p24 DE *N. brasiliensis*.

Mediante IET observamos que los 10 sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* en estadio activo reconocieron fuertemente la banda correspondiente a p24. El resto de los sueros (sueros de pacientes con micetoma en remisión completa y sueros de personas aparentemente sanas) no reconocieron a p24 (Fig. 15).

11. ANALISIS DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA ACTIVO POR *N. brasiliensis* CONTRA p24 DIGERIDA CON TRIPSINA POR IET.

La reactividad de los 10 sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis* contra p24 sin digerir y contra p24 a los 2 y 10 mins de digestión triptica se analizó mediante IET. Los 10 sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* activo reconocieron fuertemente a p24 al tiempo cero (sin digerir); solamente 3 de los sueros (M3, M4 y M5) reconocieron muy débilmente a p24 a los 2 mins de digestión; sin embargo ninguno de ellos reconoció los fragmentos tripticos de p24 (Fig. 16).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 15: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS PROBLEMA CONTRA p24 DE *N. brasiliensis* SIN DIGERIR. Tirillas 1 a 10: Reveladas con los sueros M1 al M10 respectivamente; tirillas 11 a 14: Reveladas con los sueros MR1al MR5 respectivamente y tirillas 15 a 18: Reveladas con los sueros SN1al SN5 respectivamente



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 16: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA ACTIVO POR *N. brasiliensis* CONTRA p24 DE *N. brasiliensis* ANTES Y DESPUES DE DIGERIRSE CON TRIPSINA. Tirillas 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 y 28: p24 sin digerir reveladas con los sueros M1 al M10 respectivamente; tirillas 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 y 29: p24 a los 2 mins de digestión reveladas con los sueros M1 al M10 respectivamente y tirillas 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30: p24 a los 10 mins de digestión triptica reveladas con los sueros M1 al M10.

## VI. DISCUSION

Hasta hace poco tiempo la mayoría de los estudios que se habían realizado con el fin de estandarizar pruebas inmunológicas útiles para el diagnóstico de infecciones causadas por microorganismos del género *Nocardia* habían sido realizados para nocardiosis (infección producida por *N. asteroides*) (2, 3, 9, 44 y 48), pero poco se había realizado para micetoma actinomicótico producido por *N. brasiliensis*.

La principal limitante para la estandarización de pruebas serológicas específicas para *N. brasiliensis* fue la falta de antígenos que evitaran la reacción cruzada con sueros de pacientes infectados por micobacterias.

Sin embargo, en 1991 Salinas y cols (41) identificaron por IET las proteínas de 61, 26 y 24 kDa de *N. brasiliensis* como inmunodominantes y altamente específicas con sueros de pacientes con micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis*.

En ese mismo año, Vera y cols (52) lograron purificar en condiciones desnaturalizantes p61 y p24 mediante electroelución.

En 1993, (42) estandarizamos un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida para la determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en sueros de pacientes con micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis*; para la estandarización de esta técnica utilizamos como antígeno extracto semipurificado de *N. brasiliensis* el cual estaba enriquecido en p24; esta técnica ha sido de gran utilidad para el serodiagnóstico rápido de infecciones producidas por *N. brasiliensis* y la evaluación de la respuesta terapéutica de los pacientes con micetoma. Esta técnica de ELISA es altamente sensible,

reproducibile y específica ya que se eliminó totalmente la reacción cruzada con sueros de pacientes infectados por micobacterias (42).

La obtención del antígeno enriquecido en p24 que se utiliza en esta técnica, requiere de mucho tiempo, es costosa y el rendimiento es bajo. La meta de esta tesis fue detectar fragmentos tripticos de p24 que fuesen reconocidos específicamente por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis*. Esta información permitiría en estudios posteriores realizar la síntesis orgánica de estos péptidos y después utilizarlos como herramienta para la estandarización de pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por *N. brasiliensis*.

Para estudiar la reactividad de sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* activo contra p24 digerida con tripsina, tuvimos que establecer las condiciones experimentales para aislar p24 en condiciones no desnaturizantes ya que la actividad de la tripsina se pierde en presencia de SDS y 2 mercaptoetanol (34).

La fuente de obtención de p24 fue el extracto semipurificado de *N. brasiliensis*, el cual estaba enriquecido en p24, como lo habían reportado Salinas y cols (41).

En este trabajo, para identificar p24 seguimos los siguientes criterios establecidos en 1993 por Salinas y cols (41):

- A) Migración electroforética en un SDS-PAGE.
- B) Tinción preferencial con azul de Coomassie mas que con nitrato de plata.

C) Reconocimiento por un anticuerpo monoclonal, recientemente obtenido por Castro y cols (15), el cual reconoció a p24 en condiciones desnaturizantes (clona A4).

En el patrón electroforético del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturizantes observamos la presencia de 3 bandas que se tiñeron con intensidad similar tanto con azul de Coomassie como con nitrato de plata. Además, mediante IET encontramos que ninguna de las tres bandas fue reconocida por el Acm anti-p24 de *N. brasiliensis*; lo anterior pudiera deberse a que el determinante antigénico de p24 reconocido por el Acm no está accesible en p24 en condiciones no desnaturizantes. Ambos resultados fueron diferentes a los que presenta p24 en condiciones desnaturizantes (15 y 41).

Debido a que ninguno de los 3 criterios para identificar p24 se cumplieron con nuestra muestra, decidimos electroeluir en condiciones no desnaturizantes cada una de las 3 bandas observadas en el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en un PAGE sin SDS. Posteriormente, al analizar cada uno de los electroeluidos mediante SDS-PAGE e IET en condiciones desnaturizantes, en los 3 encontramos exclusivamente una banda que migró a la posición de p24, la cual se tiñó principalmente con azul de Coomassie y fue reconocida por el Acm anti-p24; por lo tanto concluimos que en el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturizantes existen 3 bandas que corresponden a p24.

Probablemente, estas 3 bandas sean agregados de p24, los cuales al ser sometidos a tratamientos desnaturizantes (SDS, 2 mercaptoetanol y calor) se disocian en monómeros de esta proteína. Sin embargo, para confirmar lo anterior se deberán realizar otros estudios.



La cantidad de p24 aislada mediante electroelución fue baja, por lo que utilizamos la autorradiografía para detectar los productos de la digestión triptica. Después de iodinar p24 se analizó por SDS-PAGE y autorradiografía; además de la banda correspondiente a p24 encontramos la presencia de dos bandas de menor peso molecular; dichas bandas no se habían detectado anteriormente con las técnicas de tinción con azul de Coomassie ni con nitrato de plata, por lo que suponemos que estas bandas de bajo peso molecular se encontraban en una concentración inferior a los límites de sensibilidad de estas dos técnicas o quizás se formaron durante la iodinación de la proteína; esto debido a que además de los efectos propios de la radiación en este proceso se utilizó como agente oxidante cloramina T, la cual produce efectos desnaturalizantes sobre las proteínas (19). Otra posibilidad es que dichas bandas se hallan formado por medio de digestión proteolítica de la banda superior durante el aislamiento de la misma. La posibilidad de que estas bandas se hallan electroeluido junto con p24 al momento de realizar el corte del gel se descartó ya que al analizar p24 iodinada en PAGE sin SDS observamos que las bandas de bajo peso molecular se localizaban muy distantes de la banda correspondiente a p24.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para aclarar el origen de estas bandas deberán realizarse estudios<sup>®</sup> posteriores.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Con el fin de determinar si la metodología propuesta para la separación de los fragmentos tripticos de p24 era adecuada, decidimos utilizar dos proteínas como controles. Primeramente una proteína de peso molecular mayor a p24, en este caso utilizamos ASB (PM 66 kDa) y una proteína de peso molecular semejante al de la proteína de nuestro interés, para lo cual utilizamos caseína (PM 26 kDa).

Al realizar los mapas tripticos de estas dos proteínas pudimos confirmar que mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie podíamos retener y observar fragmentos tripticos de ASB; lo mismo sucedió con caseína a pesar de ser una proteína de peso molecular menor.

Por lo anterior, decidimos utilizar como soporte para la separación de los fragmentos tripticos de p24 geles de poliacrilamida con SDS en gradiente y como sistema de detección la autorradiografía.

La digestión triptica de p24 produjo dos fragmentos, los cuales se detectaron a los 2 mins de digestión. El fragmento triptico de mayor peso molecular (FTM) se observó con mayor intensidad a los 2 mins, posteriormente también sufrió digestión triptica. El segundo fragmento o fragmento triptico de menor peso molecular (ftm) presentó mayor definición, se empezó a formar a los 2 mins de digestión y su concentración se incrementó progresivamente alcanzando mayor intensidad a los 10 mins; a este tiempo desapareció completamente tanto la banda de p24 como la banda del FTM; después de los 10 mins la intensidad de la banda correspondiente al ftm permaneció igual hasta los 25 mins.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La evaluación por IET y por la técnica de ELISA estandarizada por Salinas y cols (42) para estudiar la reactividad de 10 sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis*, 5 sueros de pacientes con micetoma que habían alcanzado remisión completa y 5 sueros de personas aparentemente sanas contra p24 sin digerir nos mostró los mismos resultados que habían reportado previamente Salinas y cols (42). En cambio, los mismos sueros no reaccionaron con los fragmentos tripticos de p24; esto probablemente se debió a:

A) Pérdida de los determinantes antigénicos presentes en p24 de *N. brasiliensis* sin digerir.

Berzofsky y cols (7) obtuvieron resultados similares al evaluar la reactividad de sueros policlonales de ratón anti-mioglobina de ballena contra 3 fragmentos de mioglobina obtenidos al digerirla con bromuro de cianógeno.

Benjamín y cols (6) mencionaron que la mayoría de los péptidos pequeños de algunas proteínas, no se unen a los anticuerpos inducidos con la proteína nativa, y tampoco, éstos péptidos inducen la formación de anticuerpos que reconozcan la proteína nativa.

B) Probablemente los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos de los sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis* sean de tipo conformacional.

Berzofsky y cols (7) encontraron que algunos de los determinantes antigénicos de la mioglobina de ballena reconocidos por anticuerpos monoclonales anti-mioglobina, estaban formados por residuos de aminoácidos que se encontraban distantes en la secuencia primaria de esta proteína; pero cercanos en la estructura tridimensional de la misma.

En algunos estudios realizados con proteínas pequeñas, cuya estructura terciaria se conoce con alta resolución (lisozima, mioglobina y citocromo "c"), indican que la unión de los anticuerpos es generalmente dependiente de la integridad de la estructura secundaria, terciaria y algunas veces cuaternaria de la proteína (1).

C) Escasa cantidad de los fragmentos trípticos de p24 y que no sea suficiente para ser detectada mediante autorradiografía.

Esta posibilidad es poco probable dado que la autorradiografía es una técnica de alta sensibilidad.

Una de las limitantes para la realización de este trabajo fue la escasa cantidad de p24 aislada mediante electroelución. Para compensar lo anterior utilizamos una técnica más sensible para su detección como lo es el marcaje radiactivo, sin embargo esta técnica posee la desventaja de alterar la estructura de las proteínas; aparte del riesgo potencial que implica el uso de material radiactivo.

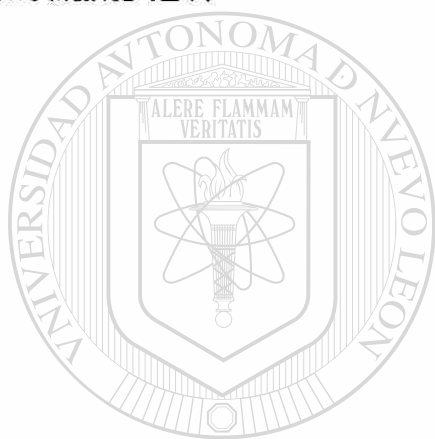
Por lo tanto consideramos que es necesario estandarizar una metodología para el aislamiento y purificación de p24 de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes que nos permita obtener un mayor rendimiento; y si es posible realizar la clonación del gen que codifica para esta proteína para realizar estudios similares a los de este trabajo con tripsina u otras enzimas o agentes químicos que nos permitan obtener péptidos mas grandes en los cuales exista mayor probabilidad de que conserven su reactividad con los anticuerpos.

También se podría realizar la evaluación combinada del reconocimiento de fragmentos de p24 tanto por células T, como por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con micetoma activo; dado que tanto la evaluación de la respuesta inmune humoral como de la respuesta inmune celular sería de gran utilidad para el diagnóstico de infecciones producidas por *N. brasiliensis*.

Consideramos que la técnica de IET es útil para la identificación de

fragmentos de p24 que sean relevantes para la respuesta inmune humoral ya que la técnica de SDS-PAGE nos permite la separación de los mismos y por lo tanto podemos determinar específicamente hacia cual de los fragmentos está dirigida la respuesta, lo que nos evita aislar los fragmentos.

Sin embargo, también se podrían utilizar otras técnicas para evaluar la reactividad de los anticuerpos hacia fragmentos de p24, tales como ELISA competitivo o dot-blot en cuyo caso es muy probable que los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos sean diferentes a los reconocidos mediante IET.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## VII. CONCLUSIONES

1.- La proteína inmunodominante de 24 kDa de *N. brasiliensis* se aisló a partir de extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes mediante electroelución.

2.- La digestión triptica de la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* produjo dos fragmentos.

3.- Los dos fragmentos tripticos de la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* no fueron reconocidos por los sueros de pacientes con micetoma actinomicótico activo por *N. brasiliensis*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## VIII. LITERATURA CITADA

1. Air, G. M. and M. Weigert. 1985. Introduction. Current Communications in Molecular Biology. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 13-14.

2. Angeles, A.M. and A.M. Sugar. 1987. Identification of a common immunodominant protein in culture filtrates of three *Nocardia* species and use in etiologic diagnosis of mycetoma. J. Clin. Microbiol. 25:2278-2280.

3. Angeles, A.M. and A.M. Sugar. 1987. Rapid diagnosis of nocardiosis with an enzyme immunoassay. J. Infect. Dis. 155:292-296.

4. Anderson, D.C., M.E. Barry and T.M. Buchanan. 1988. Exact definition of species-specific and cross-reactive epitopes of the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* using synthetic peptides. The Journal of Immunology. 141:607-613.

5. Beaman, B.L., M.E. Gershwin, A. Ahmed, S.M. Scates and R. Deem. 1982. Response of (CBA/N X DBA/2) F1 mice to *Nocardia asteroides*. Infect. and Immun. 35:111-116.

6. Benjamín, D.C., J. A. Berzofsky, I. J. East, F.R.N. Gurd, C. Hannum, S.J. Leach, E. Margoliash, J.G. Michael, A. Miller, E. M. Prager, M. Reichlin, E.E. Sercarz, S.J. Smith-Gill, P.E. Todd, and A.C. Wilson. 1984. The antigenic structure of proteins: A reappraisal. Annu. Rev. Immunol. 2: 67.

7. Berzofsky, J.A., G. Hicks, J. Fedorko, and J. Minna. 1980. Properties of monoclonal antibodies specific for determinants of a protein antigen, myoglobin. J. Biol. Chem. 255: 11188.

8. Berzofsky, J.A. 1985. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science*. 229:932-940.

9. Blumer, S.O. and L. Kaufman. 1979. Microimmunodiffusion test for nocardiosis. *J. Clin. Microbiol.* 10:308-312.

10. Boiron Patrick. 1993. Inmunología molecular de las infecciones por *Nocardia*. Tomado de: *Actinomicetos, microorganismos de la luz*. Editor: Sandoval T. H. Ed. U. A. Metropolitana Xochimilco. México, D.F. pp. 63-84.

11. Bojalil J. L. F. 1993. Reseña de una contribución mexicana sobre los actinomicetos. Tomado de: *Actinomicetos, microorganismos de la luz*. Editor Sandoval T. H. Ed. U. A. Metropolitana Xochimilco. México, D.F. pp. 17-61.

12. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

13. Buchanan, T.M., H. Nomaguchi, D.C. Anderson, R.A. Young, T.P. Gillis, W.J. Britton, J. Ivanyi, A.H.J. Kolk, O. Closs, B.R. Bloom and V. Mehra. 1987. Characterization of antibody-reactive epitopes on the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae*. *Infect. and Immun.* 55:1000-1003.

14. Callen, P.J. and J. Kingman. 1984. Disseminated cutaneous *Nocardia brasiliensis* infection. *Pediatric Dermatology*. 2:49-51.

15. Castro, C. M. A. 1995. Obtención de anticuerpos monoclonales para buscar la proteína inmunodominante de 24 kDa en la superficie de *Nocardia brasiliensis*. UANL. Fac. de Medicina. Tesis de Maestría en Ciencias. 82 p.



16. Conde, C., R. Mancilla, M. Fresan and L. Ortiz-Ortiz. 1983. Immunoglobulin and complement and tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect. and Immun.* 40:1218-1222.

17. Divo, A. 1977. *Microbiología médica*. 3a. ed. Ed. Interamericana. pp. 377-380.

18. Folb. P.I., A. Timme and A. Horowitz. 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. and Immun.* 18:459-466.

19. Garvey. J.S, N. E. Cremer and D. H. Sussdorf. 1977. *Methods in Immunology*. 3a. ed. Ed. W. A. Benjamin, INC. pp. 171-181.

20. Gebhardt, P.L. 1972. *Microbiología*. 4a. ed. Ed. Interamericana. pp. 338-339.

21. Greenwood, F. C., W. M. Hunter and J. S. Glover. 1963. The preparation de <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of hight specific radioactivity. *Biochem.* 89:114.

22. González-Ochoa, A. 1975. Geografía de las micosis profundas. *Rev. Inv. Salud pub.* 35:85-96.

23. González-Ochoa, A. y F. Baranda. 1953. Una prueba cutánea para el diagnóstico de micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades tropicales*. Tomo XIII:189-198.

24. González-Ochoa, A., H. Shibayama. D. Felix and M. Anaya. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Excerpta. med. Int. Congr. ser.* 55:542-551.

25. Kenneth, S.W. and A. F. Mahmoud. 1984. *Tropical and Geographical Medicine.* 1a. ed. Ed. Mc Graw Hill. pp. 934-941.

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

27. Lechevalier, H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and. 1986. *Bergey's Manual of systematic bacteriology.* 1a. ed. The Williams and Wilkins. 2:1458.

28. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

29. Margni, R.A. 1982. *Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos.* 3a. ed. Ed. Médica Panamericana. pp. 498.

30. Meeker, H.C., D.L. Williams, D.C. Anderson, T.P. Gillis, G. Shuller-Levis and W.L. Levis. 1989. Analysis of human antibody epitopes on the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* by using synthetic peptides. *Infect. and Immun.* 57:3689-3694.

31. Mehra, V., D. Sweetser and R.A. Young. 1986. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83:7013-7017.

32. Merril, C.R., M.I. Dunau and D. Goldman. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 116:201-207.

33. Myrvick, N.Q., N.N. Pearsall y R.S. Weiser. 1977. Bacteriología y Micología Médica. 1a. ed. Ed. Interamericana. pp. 35-428.

34. Needleman, S.B. 1975. Protein sequence determination. 2a. ed. Ed. Springer-Verlag Berlin. pp. 114-158.

35. Oftung, F., A.S. Mustafa, T.M. Shinnick, R.A. Houghten, G. Kvalheim, M. Degree, K.E.A. Lundin and T. Godal. 1988. Epitopes of the *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton protein antigen as recognized by human T cells. J. Immun. 141:2749-2754.

36. Pelczar, J.M., R.D. Reid y E.C.S. Chan. 1984. Microbiología. 4a. ed. Ed. Mc Graw Hill. pp. 636.

37. Rico, G., R. Ochoa, A. Oliva, A. González-Mendoza, S.M. Walker and L. Ortiz-Ortiz. 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigenic specific B cells. J. Immunol. 129:1688-1693

38. Rippon, J.W. 1982. Mycetoma medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2a. ed. W. B. Saunders Eds. pp. 79-94.

39. Roitt, I. 1988. Essential Immunology. 6a. ed. Blackwell Scientific Publications. pp. 69-171.

40. Salinas, M.C., L.I. Pérez, O. Welsh, M. Rodriguez and M.G. Rinaldi. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. J. Mycol. Med. 2:183-188.

41. Salinas, M.C., L. Vera, O. Welsh and M. Rodriguez. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* 276:390-397.

42. Salinas-Carmona, M.C., O. Welsh and S. Casillas. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. of Clin. Microbiol.* 31:2901-2906.

43. Serrano, J.A. y A.H. Sandoval. 1992. Manual de Laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos. 1a. ed. Ed. Talleres Gráficos Universitarios.

44. Shainhouse, Z.J., A.C. Pier and D.A. Stevens. 1978. Complement fixation antibody test for human nocardiosis. *J. Clin. Microbiol.* 8:516-519.

45. Smith, T.D. y N.F. Conant. 1960. Bacteriología de Zinsser. 2a. ed. Ed. Hispanoamericana. pp. 952-954.

46. Stevens, D.A., A.C. Pier, B.L. Beaman, P. A. Morozumi, Lovett and E.T. Houang. 1981. Laboratory evaluation of an outbreak of nocardiosis in immunocompromised host. *Amer. J. Med.* 71:928-934.

47. Stryer L. 1988. Biochemistry. 3a. ed. W.H. Freeman and Company/ N.Y. pp. 55-57.

48. Sugar, A.M., G.K. Schoolnick and D.A. Stevens. 1985. Antibody response in human nocardiosis: Identification of two immunodominant culture filtrate antigens derived from *Nocardia asteroides*. *J. Infect. Dis.* 151:895-901.

49. Tigh, R.R. and M.S. Bartlett. 1981. Actinomycetoma in the United States. *Rev. Infect. Dis.* 3:1139-1150.

50. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.

51. Velasco, C.O. y J.T. Zavala. 1978. Nociones de micología. 1a. ed. Ed. F. Cervántez. pp. 97-108.

52. Vera-Cabrera, L., M.C. Salinas-Carmona, O. Welsh and M. Rodríguez. 1992. Isolation and Purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 30:1183-1188.

53. Welsh, O., E. Saucedo, J. González and J. Ocampo. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:443-448.

54. Ximénez, C., E.I. Melendro, A. González-Mendoza, A.M. García, A. Martínez and L. Ortiz-ortiz. 1980. Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathology.* 70:117-122.

55. Zamora, A., L.F. Bojalil and F. Bastarrachea. 1963. Immunologically active polysaccharides from *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 85:549-555.

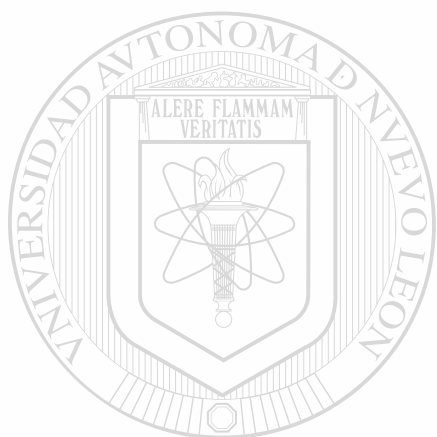
## IX. APENDICES

### APENDICE A

#### EQUIPO:

1. Agitador magnético RC-353 (CORNING)
2. Bomba peristáltica (LKB)
3. Cámara de incubación (BIO-RAD)
4. Cámara de transferencia. Model Trans Blot Cell (BIO-RAD)
5. Casete para exposición de película fotográfica de 20 X 25 cm (SIGMA)
6. Casete para exposición de película fotográfica de 13 X 18 cm (SIGMA)
7. Centrifuga eppendorf 5415 (BRINKMANN)
8. Centrifuga J2-21 (BECKMAN)
9. Centrifuga TJ-6 (BECKMAN)
10. Centrifuga Serofuga II (CLAY ADAMS)
11. Columna para cromatografía (WHEATON)
12. Electroelutor Modelo 422 (BIO-RAD)
13. Espectrofotómetro DU-6 (BECKMAN)
14. Fuente poder Modelo 1000/500 (BIO-RAD)
15. Formador de gradientes Modelo 385 (BIO-RAD)
16. Homogenizador (EVER-BACH)
17. Incubadora (J. M. ORTIZ)
18. Liofilizadora (VIRTIS)
19. Microlector para ELISA BP-96 (DIAMEDIX)
20. Micro-agitador II (DYNATECH)
21. Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD)
22. Película X-Omat AR KODAK (SIGMA)
23. Película X-Omat RP KODAK (SIGMA)
24. Placas para ELISA (BIO-RAD)
25. Potenciómetro 43 (BECKMAN)

26. Refrigerador Ultra low (AMERICAN SCI. PROD.)
27. Refrigerador (KELVINATOR)
28. Secador de geles (EPHORTEC)
29. Incubadora con agitador. Dubnoff metabolic (GCA/ PREC. SCI.)
30. Ultracentrífuga L8-70 M (BECKMAN)
31. Vortex mixer s/p (AMERICAN SCI. PROD.)



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## APENDICE B

### REACTIVOS QUIMICOS

1. Acetato de sodio (MERCK)
2. Acetato de magnesio (MALLINCKRODT)
3. Acido acético glacial (MERCK)
4. Acido cítrico (MONTERREY)
5. Acido clorhídrico (MERCK)
6. Acido etilendiaminotetraacético (SIGMA)
7. Acido nítrico (MERCK)
8. Acido perclórico (MERCK)
9. Acido sulfúrico (BAKER)
10. Acido tricloroacético (BAKER)
11. Acrilamida (SIGMA)
12. Agar de dextrosa Sabouraud (BIOXON)
13. Albúmina sérica bovina (SIGMA)
14. Alcohol deshidrogenasa (SIGMA)
15. Amberlita XAD-7 (SIGMA)
16. Anhidrasa carbónica (SIGMA)
17. Anticuerpo anti-gamma de conejo desarrollada en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA)
18. Anticuerpo anti-IgG humana desarrollado en cabra no conjugado (PIERCE)
19. Anticuerpo anti-IgG humana desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA)
20. Anticuerpo polivalente anti-gamma humana desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA)
21. Anticuerpo anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA)
22. Azida de sodio (FISHER)



23. Azul de bromofenol (SIGMA)
24. Azul de Coomassie G-250 (LKB)
25. Azul de Coomassie R-250 (SIGMA)
26. 2-Mercaptoetanol (SIGMA)
27. Caseína (MERCK)
28. Carbonato de sodio (FISHER)
29. Citocromo "c" (SIGMA)
30. Cloramina T (SIGMA)
31. Cloruro de bario (MONTERREY)
32. Cloruro de potasio (MERCK)
33. Cloruro de sodio (MERCK)
34. Desoxirribonucleasa I (SIGMA)
35. Dextrana azul (SIGMA)
36. 3-3' Diaminobenzidina (SIGMA)
37. Dicromato de potasio (MERCK)
38. Dihidrógeno fosfato de potasio (MERCK)
39. Dodecilsulfato de sodio (SDS) (SIGMA)
40. Etanol (MERCK)
41. Eter etílico (MERCK)
42. Fosfato dibásico de sodio anhidro (MONTERREY)
43. Fosfato de sodio monobásico (MONTERREY)
44. Formol (MONTERREY)
45. Gelatina porcina (SIGMA)
46. Gelatina de pescado (NORLAND)
47. Glicerol (SIGMA)
48. Glicina (SIGMA)
49. Hidróxido de amonio (MONTERREY)
50. Hidróxido de sodio (FISHER)
51. Leche descremada "Svelty" (NESTLE)
52. Marcadores de peso molecular Stock No. SDS-7 L Dalton Marck (SIGMA)

53. Medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) (DIFCO)
54. Membrana de diálisis para electroelución (BIO-RAD)
55. Metabisulfito de sodio (MONTERREY)
56. Metanol (MERCK)
57. N,N'-metilen-bis-acrilamida (SIGMA)
58. N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino (TEMED) (SIGMA)
59. Nitrato de plata (MERCK)
60. Ortofenilendiamina dihidroclorada (OPD) (SIGMA)
61. Papel de nitrocelulosa de 0.22 m (BIO-RAD)
62. Papel de nitrocelulosa de 0.45 m (BIO-RAD)
63. Papel Whatman No. 1
64. Peróxido de hidrógeno al 30% (MONTERREY)
65. Persulfato de amonio (SIGMA)
66. Sephadex G-10 (SIGMA)
67. Sephadex G-100 (SIGMA)
68. Sulfato de amonio (MONTERREY)
69. Sulfato de cobre (MERCK)
70. Tripsina TPCK (SIGMA)
71. Trizma-base (SIGMA)
72. Trizma-hidroclorado (SIGMA)
73. Tween 20 (SIGMA)

## APENDICE C.

### ABREVIATURAS:

1. Acm            Anticuerpo monoclonal.
2. ASB            Albúmina sérica bovina.
3. BHI            Infusión cerebro corazón (Brain heart infusion).
4. °C             Grados centígrados.
5. % C            Porcentaje de agente entrecruzador (bis-acrilamida).
6. cm(s)         Centímetro(s).
7.  $\mu$ Ci            MicroCurie.
8.  $\mu$ g             Microgramo.
9. ECD            Extracto celular deslipidizado.
10. EDTA         Acido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid).
11. ELISA        Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Enzyme linked immunosorbent assay).
12. FTM          Fragmento tríptico mayor.
13. ftm            Fragmento tríptico menor.
14. Fig            Figura.
15. g             Unidad de gravedad.
16. gr            Gramos.
17. hrs            Horas.
18. HCl            Acido clorhídrico.
19. HUJEG        Hospital Universitario José Eleuterio González.
20. IET            Inmunolectrotransferencia.
21. IgG            Inmunoglobulina G.
22. kDa            Kilodalton.
23.  $\mu$ l(s)         Microlitro(s).
24. M             Molar.
25. M.            *Mycobacterium*.

26. mg(s)	Miligramo(s).
27. min(s)	Minuto(s).
28. ml(s)	Mililitro(s).
29. mm(s)	Milímetro(s).
30. mM	Milimolar.
31. Mr	Movilidad relativa.
32. N	Normal.
33. N.	<i>Nocardia</i> .
34. ng(s)	Nanogramos.
35. nm	Nanómetro(s).
36. PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide gel electrophoresis).
37. p24	Proteína de 24 kDa.
38. p26	Proteína de 26 kDa.
39. p31	Proteína de 31 kDa.
40. p55	Proteína de 55 kDa.
41. p61	Proteína de 61 kDa.
42. p65	Proteína de 65 kDa.
43. PBS	Amortiguador salina-fosfatos.
44. pH	Potencial de hidrógeno.
45. PM	Peso molecular.
46. SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate).
47. SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
48. % T	Porcentaje de acrilamida total.
49. TEMED	N,N,N',N' tetrametiletildiamina.
50. TPCK	Tosilfenilclorometilcetona.
51. Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
52. U	Unidades.
53. v	Voltios.
54. v/v	Volumen sobre volumen.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

