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

Como requisito para obtener el Grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS CON

ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

Monterrey, N.L. Febrero de 1996

TM
RC95
C3
c.1

1080073222

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

Como requisito para obtener el Grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS CON

ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

Monterrey, N.L. Febrero de 1996

TM
RC951
C3

UANL
FONDO
TESIS
(73222)

UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

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.

Asesor.

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.

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 muchísisimo 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.

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.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda por sus valiosas críticas a este trbajo, por su amistad y su apoyo, con mucho cariño gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Página

I.RESUMEN.....1

II.INTRODUCCION.....3

III.OBJETIVOS.....14

IV. MATERIAL Y METODOS.....15

1. Obtención del ECD de *N. brasiliensis*.....15

1.1 Cepa de *N. brasiliensis*.....15

1.2 Preparación del inóculo de *N. brasiliensis*.....15

1.3 Cultivo y obtención del ECD de *N. brasiliensis*.....16

2. Análisis del ECD de *N. brasiliensis* mediante SDS-PAGE.....16

2.1 Preparación de geles.....16

2.2 SDS-PAGE del ECD de *N. brasiliensis*.....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 *N. brasiliensis*.....19

4.1 Precipitación del ECD de *N. brasiliensis* 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 *N. brasiliensis*.....21

Página

4.6 IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones desnaturalizantes y evaluación del reconocimiento de p24 por el Acm anti-p24.....22

5. Aislamiento de p24 de *N.brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.....23

5.1 Fuente de obtención de p24 de *N. brasiliensis*.....23

5.2 Identificación de p24 en condiciones no desnaturalizantes.....23

5.2.1 Análisis por PAGE sin SDS del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....23

5.2.2 IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes y evaluación del reconocimiento de p24 por el Acm anti-p24 25

5.3 Electroelución de p24 de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.....25

5.3.1 PAGE sin SDS preparativo del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....25

5.3.2 Electroelución de p24 de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.....27

5.3.3 Análisis por SDS-PAGE de los electroeluídos.....28

5.3.4 Análisis por IET de los electroeluídos.....28

6. Iodinación de ASB.....29

6.1 Cromatografía de filtración en gel.....29

6.2 Autorradiografía.....30

7. Iodinación de p24 de *N. brasiliensis*.....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 *N. brasiliensis* con tripsina.....32

Página

13. Análisis por autorradiografía de p24 de *N. brasiliensis* digerida con tripsina.....32

14. Determinación de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* 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 *N. brasiliensis*.....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 *N. brasiliensis* contra p24 digerida con tripsina.....35

V. RESULTADOS.....36

1. Obtención del ECD de *N. brasiliensis*.....36

1.1 Determinación de la concentración de proteínas.....36

1.2 Análisis por SDS-PAGE del ECD de *N. brasiliensis*.....36

2. Obtención del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....38

2.1 Fraccionamiento del ECD de *N. brasiliensis* con sulfato de amonio.....38

2.2 Cromatografía de filtración en gel del sobrenadante obtenido al precipitar ECD de *N. brasiliensis* con sulfato de amonio.....38

3. Análisis por SDS-PAGE e IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....39

4. Aislamiento de p24 de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.....43

Página

4.1 Análisis del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* por PAGE sin SDS e IET para identificar p24 en condiciones no desnaturalizantes....43

4.2 Electroelución de p24 en condiciones no desnaturalizantes y su análisis por SDS-PAGE e IET....43

5. Iodinación de ASB....49

6. Iodinación de p24 de *N. brasiliensis*....50

7. Análisis por SDS-PAGE de ASB y caseína digeridas con tripsina...51

8. Análisis por SDS-PAGE y autorradiografía de p24 de *N. brasiliensis* digerida con tripsina....54

9. Determinación de anticuerpos anti-extracto semipurificado de *N. brasiliensis* por ELISA....54

10. Análisis por IET de la reactividad de sueros problema contra p24 de *N.* brasiliensis....57

11. Análisis por IET de la reactividad de sueros de pacientes con micetoma activo por *N. brasiliensis* 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 *N. brasiliensis*.....57

LISTA DE FIGURAS

Figura Página

1. Análisis de ECD de *N. brasiliensis* 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 sepahadex G-100...40
3. Análisis por SDS-PAGE en gradiente de10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....41
4. Análisis por IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....42
5. Análisis por PAGE sin SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 del extracto semipurificado de *N. brasiliensis*.....44
6. Análisis por IET del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes.....45
7. Análisis por SDS-PAGE en gradiente de 10 % a 18 % T, 2.7% C, pH 8.8 de los tres electroeluídos..... 46

Página

8. Análisis por IET de la reactividad de un suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis* contra los tres electroeluídos.....47

9. Análisis por IET de la reactividad del Acm anti-p24 de *N. brasiliensis* contra los tres electroeluídos 48

10. Análisis por autorradiografía de ASB iodinada.....49

11. Análisis por autorradiografía de p24 iodinada.....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 *N. brasiliensis* digerida con tripsina.....55

15. Análisis por IET de la reactividad de sueros problema contra p24 de *N. brasiliensis* sin digerir.....58

16. Análisis por IET de la reactividad de sueros de pacientes con micetoma activo por *N.* brasiliensis contra p24 antes y después de digerirse con tripsina.....59