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 electroeluídos 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 electroeluídos 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).

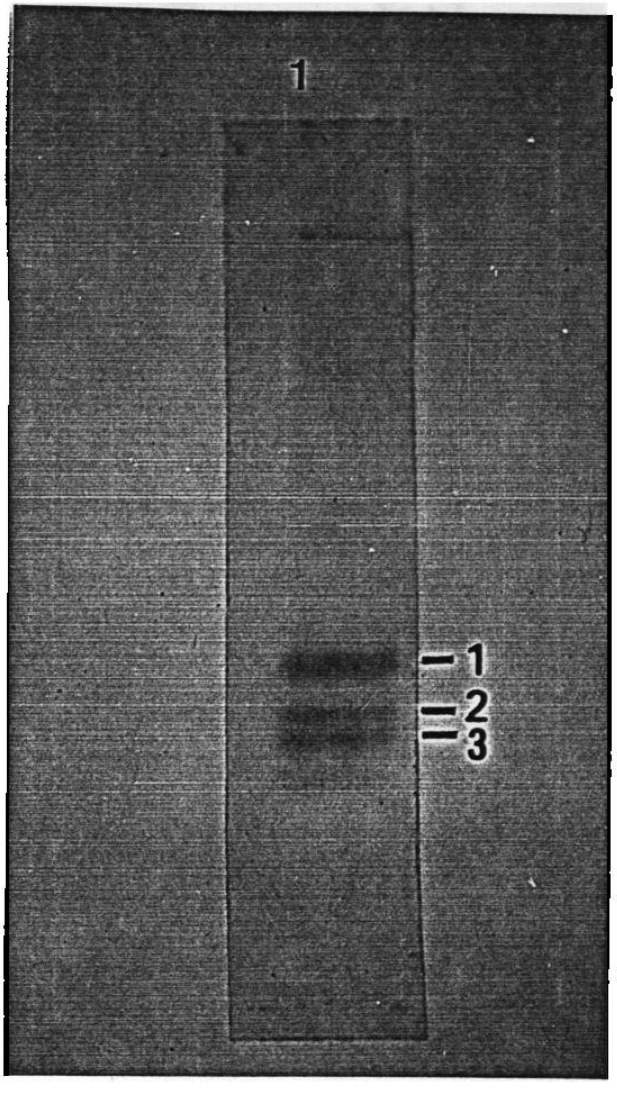

FIG. 5: ANALISIS POR PAGE SIN SDS EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis*. Carril 1: Extracto semipurificado de *N. brasiliensis*. Tinción con Azul de Coomassie.

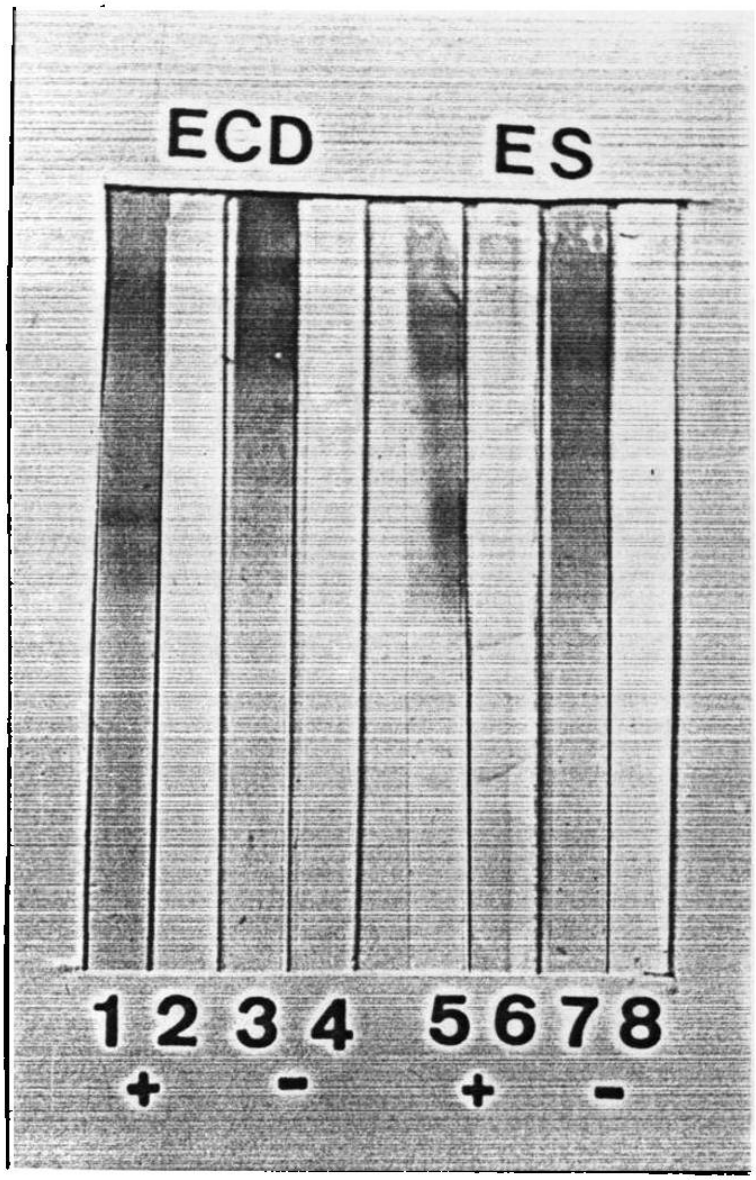

FIG. 6: ANALISIS POR IET DEL EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE *N. brasiliensis* EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES. Tirillas 1 y 2: ECD de *N. brasiliensis* (polo positivo) reveladas con suero de paciente con micetoma y con Acm anti-p24 respectivamente; tirillas 3 y 4: ECD (polo negativo) reveladas con suero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

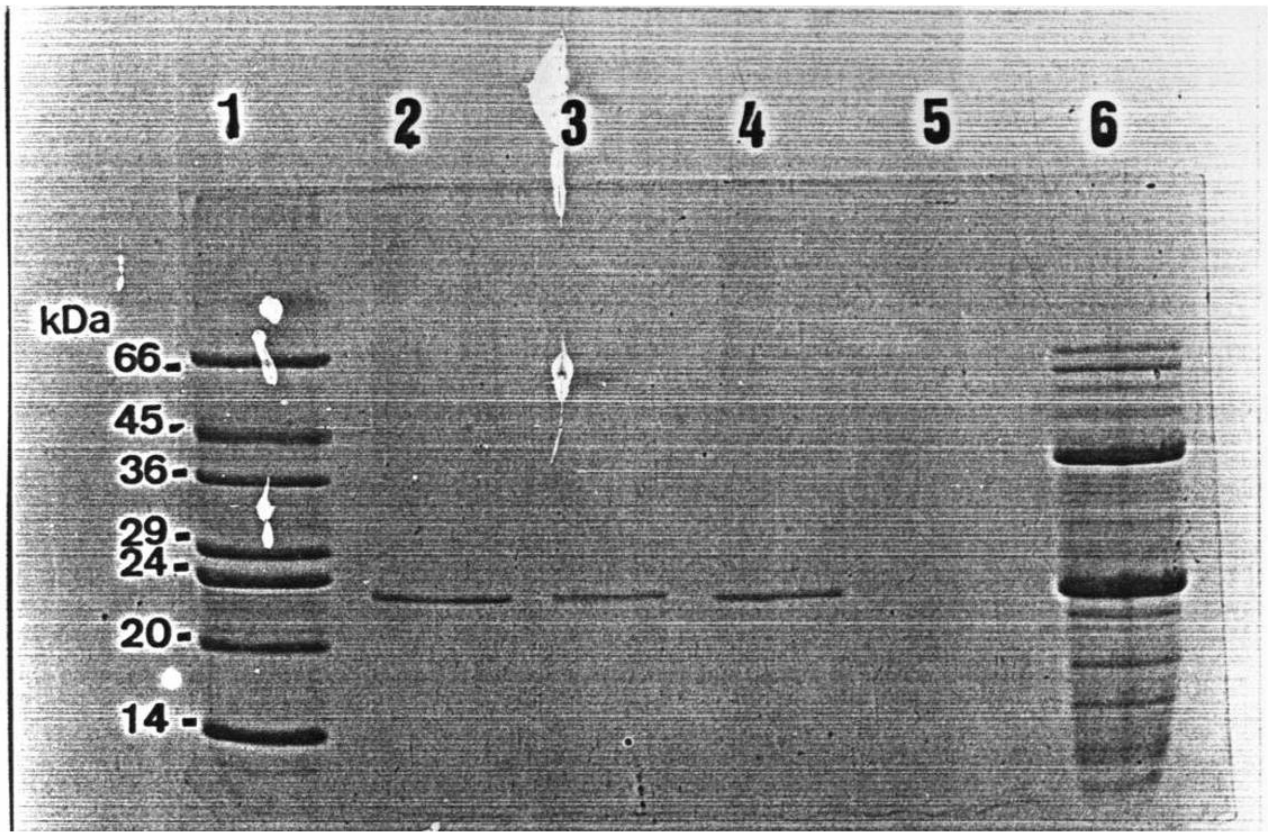

FIG. 7: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE LOS TRES ELECTROELUIDOS. Carril 1: Marcadores de peso molecular SDS-7L, carril 2: Electroeluído 1, carril 3: Electroeluído 2, carril 4: Electroeluído 3, carril 5: Sin muestra y carril 6: ECD de *N. brasiliensis*. Tinción con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

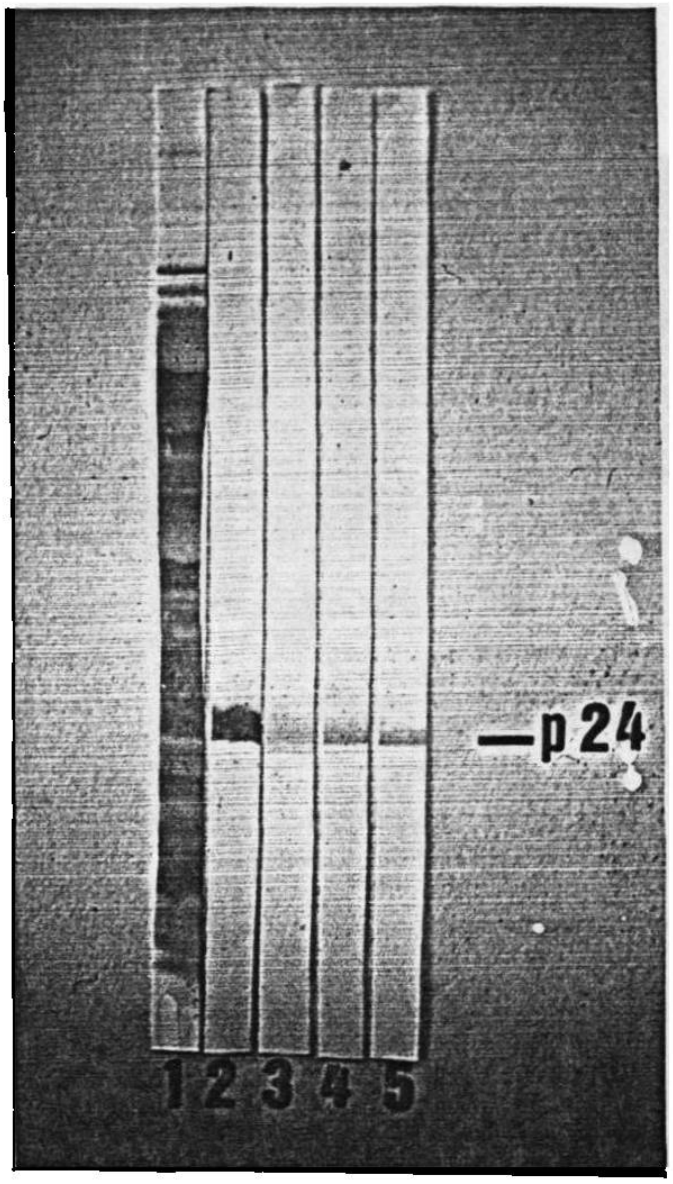

FIG. 8: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE UN SUERO DE PACIENTE CON MICETOMA POR *N. brasiliensis* CONTRA LOS TRES ELECTROELUIDOS. Tirillas 1 y 2: ECD de *N. brasiliensis* reveladas con suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis* y con Acm anti-p24 respectivamente y tirillas 3, 4 y 5: Electroeluídos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

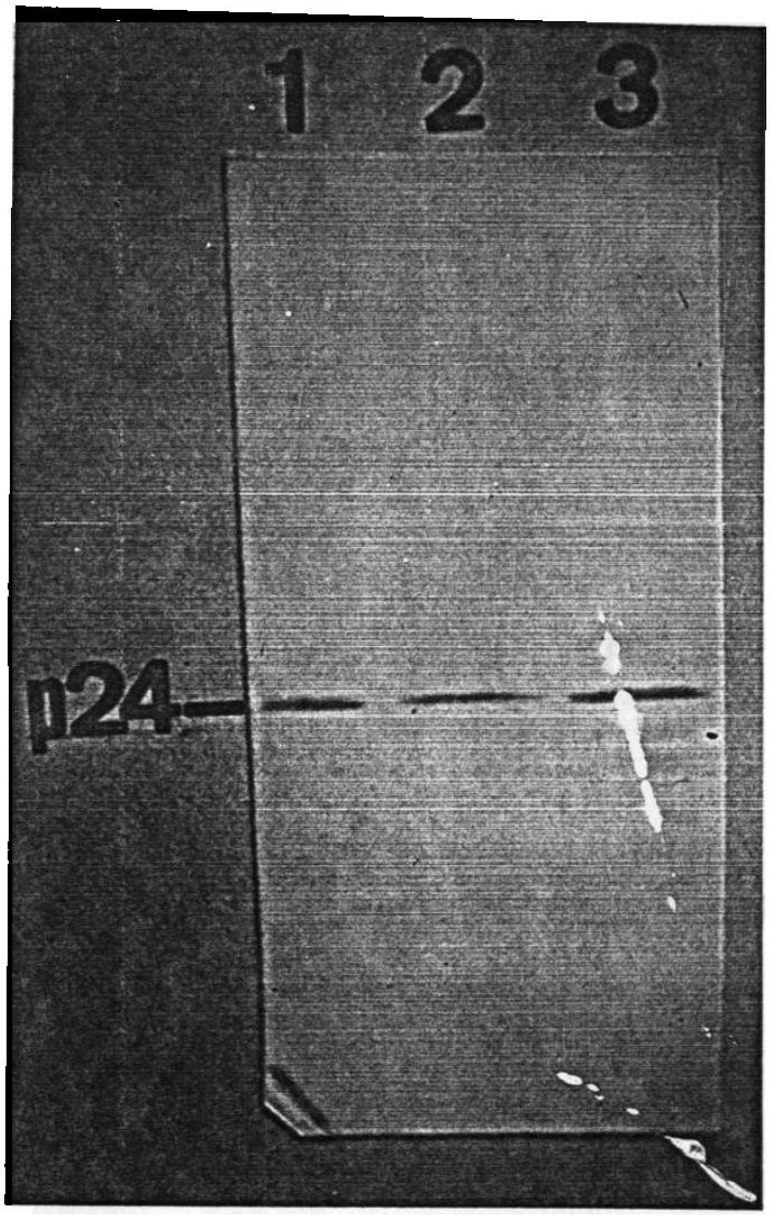

FIG. 9: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DEL Acm ANTI-p24 DE *N.* brasiliensis CONTRA LOS TRES ELECTROELUIDOS. Tirillas 1, 2 y 3: Electroeluídos 1, 2 y 3 reveladas con Acm anti-p24.

5. IODINACION DE ASB.

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

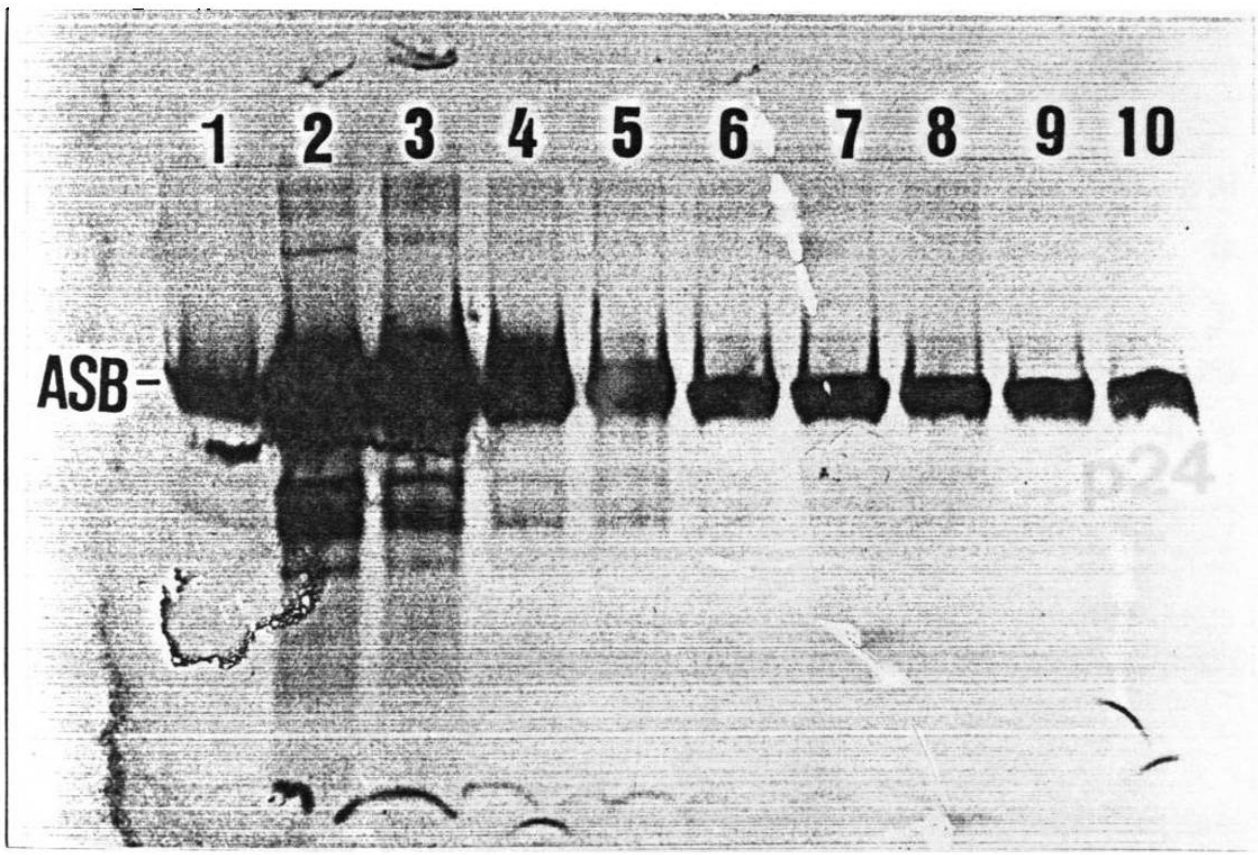

FIG. 10: ANALISIS POR AUTORRADIOGRAFIA DE ASB IODINADA. Carriles del 1 al 10: Fracciones de elución de ASB iodinada de la 3 a la 12 respectivamente.

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

Utilizando las condiciones para la iodinación de ASB se iodinó p24 de *N. brasiliensis.* La proteína iodinada se separó del iodo 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).

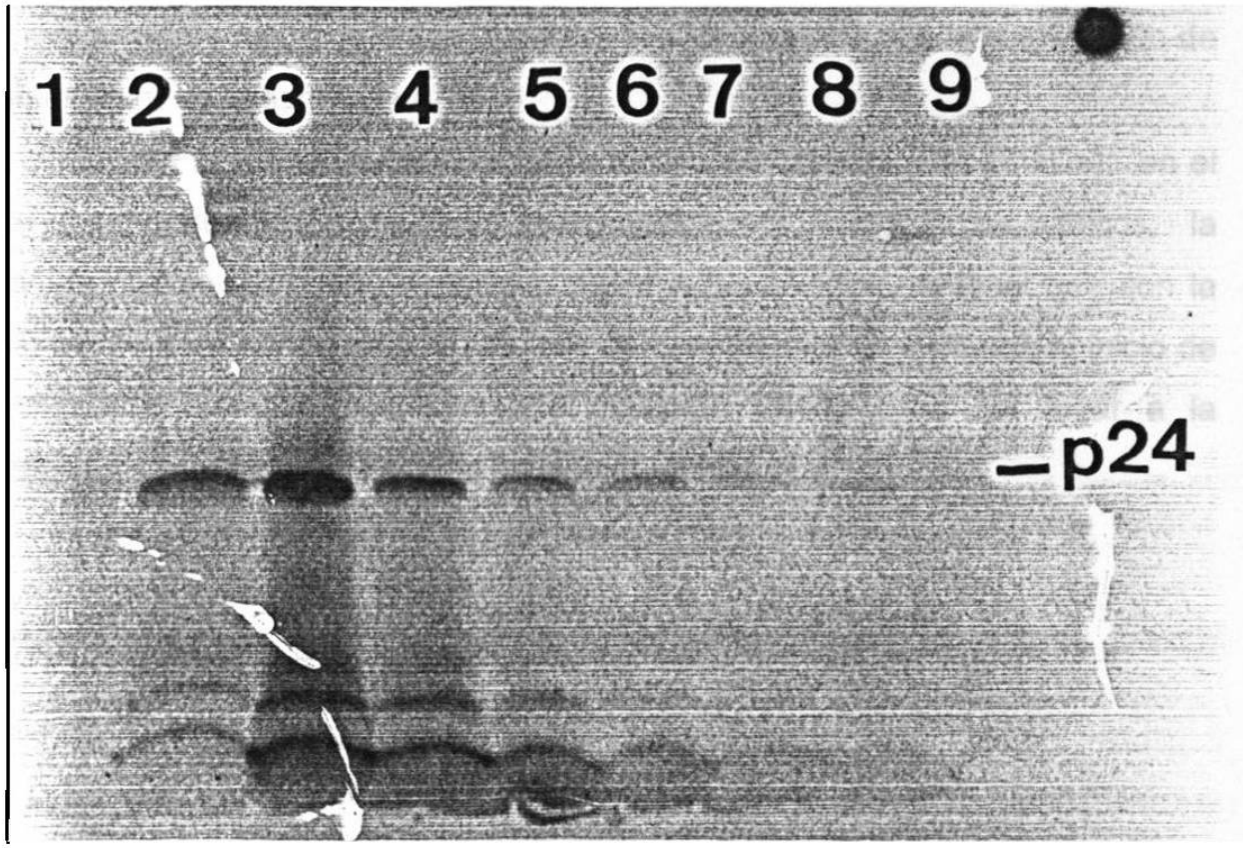

FIG.11: ANALISIS POR AUTORRADIOGRAFIA DE p24 IODINADA. Carriles del 1 al 9: Fracciones de elución de p24 iodinada de la 2 a la 10 respectivamente.

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.

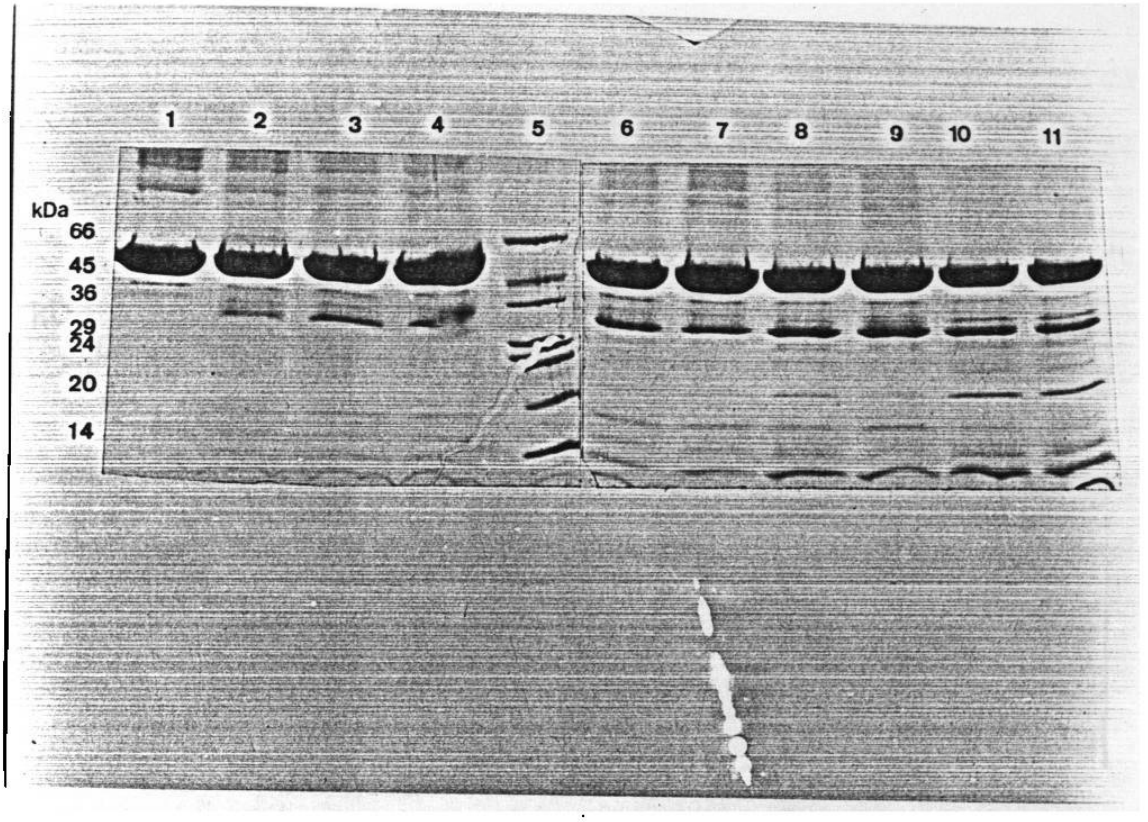

FIG. 12: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE ASB DIGERIDA CON TRIPSINA. Carriles del 1 al 4: ASB digerida con tripsina al tiempo 0, 10, 20 y 30 mins respectivamente; carril 5: Marcadores de peso molecular SDS-7L y carriles del 6 al 11: ASB digerida con tripsina a los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

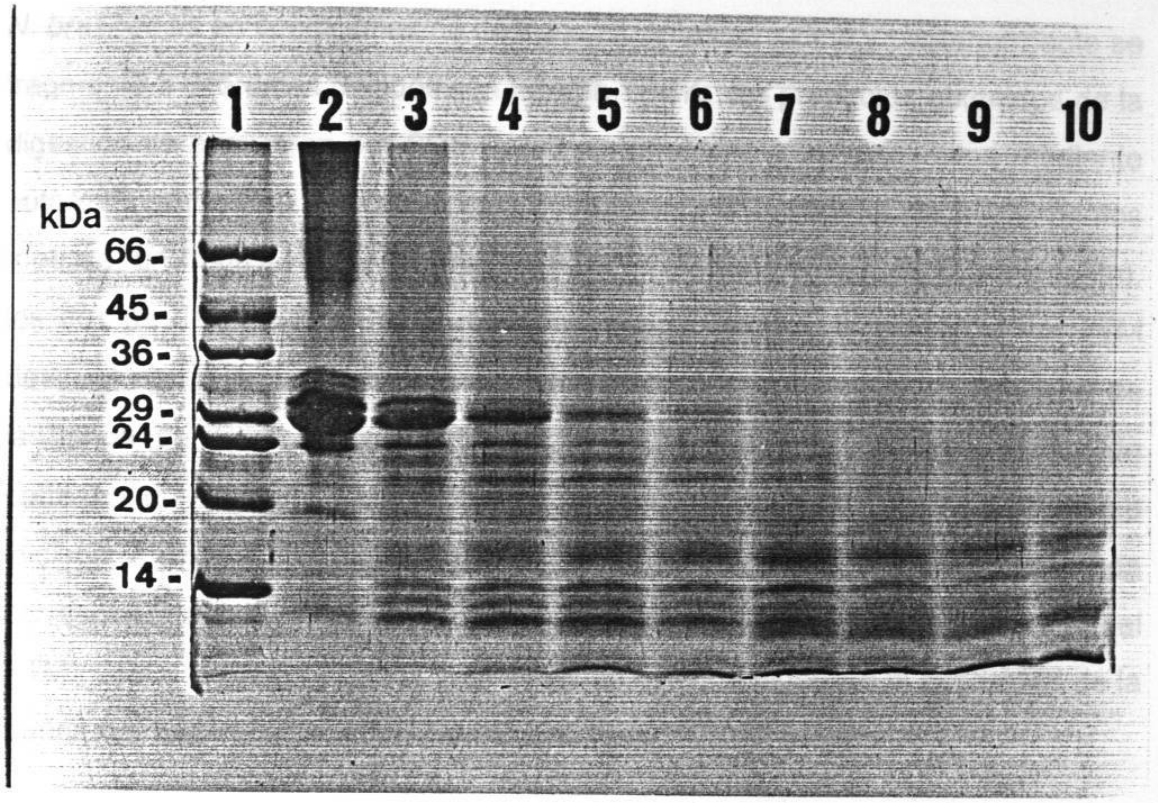

FIG. 13: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 12% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 DE CASEINA DIGERIDA CON TRIPSINA. Carril 1: Marcadores de peso molecular SDS-7L y carriles del 2 al 10: Caseína digerida con tripsina a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 mins respectivamente. Tinción con azul de Coomassie.

8. ANALISIS POR SDS-PAGE Y AUTORRADIOGRAFIA 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 iodinó 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 tríptico mayor (FTM) y un fragmento tríptico menor (ftm), los dos se detectaron a los 2 mins de haberse iniciado la digestión; el FTM después de los 4 mins presentó digestión tríptica; 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 tríptica 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 estadío 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).

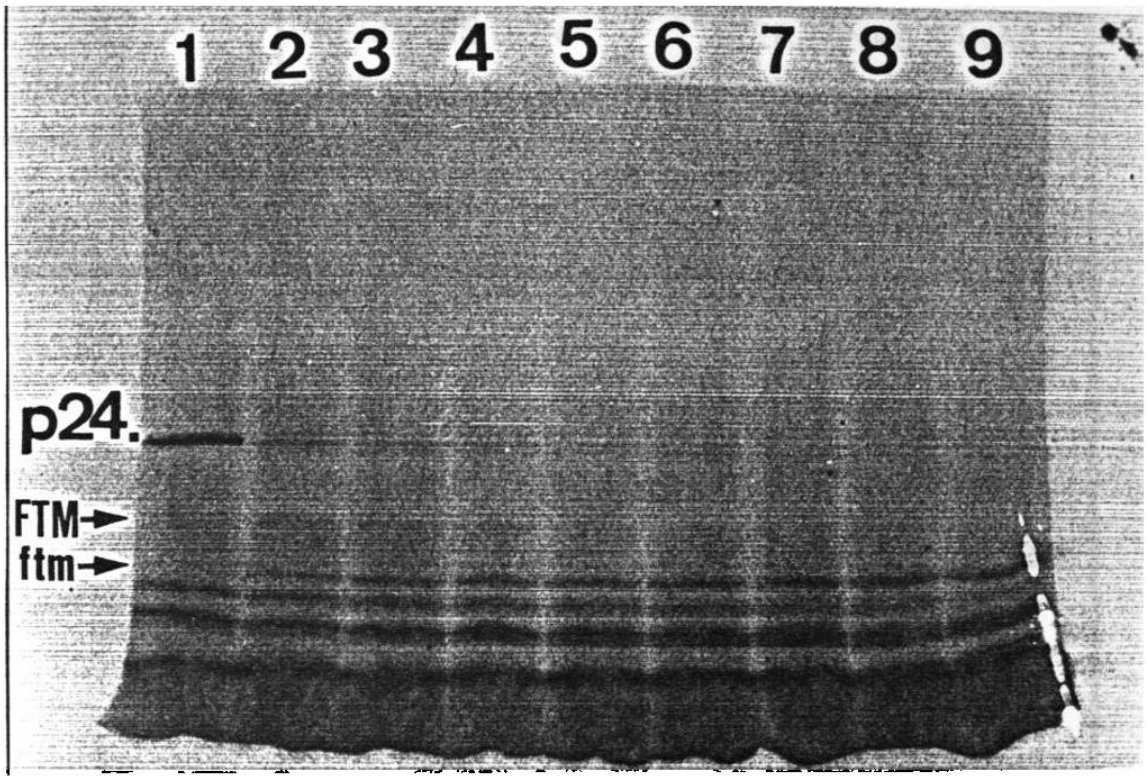

FIG. 14: ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 12% A 18% T, 2.7% C, pH 8.8 Y AUTORRADIOGRAFIA DE p24 DE *N. brasiliensis* DIGERIDA CON TRIPSINA. Carriles del 1al 9: p24 digerida con tripsina a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 mins respectivamente.

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

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 tríptica 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).

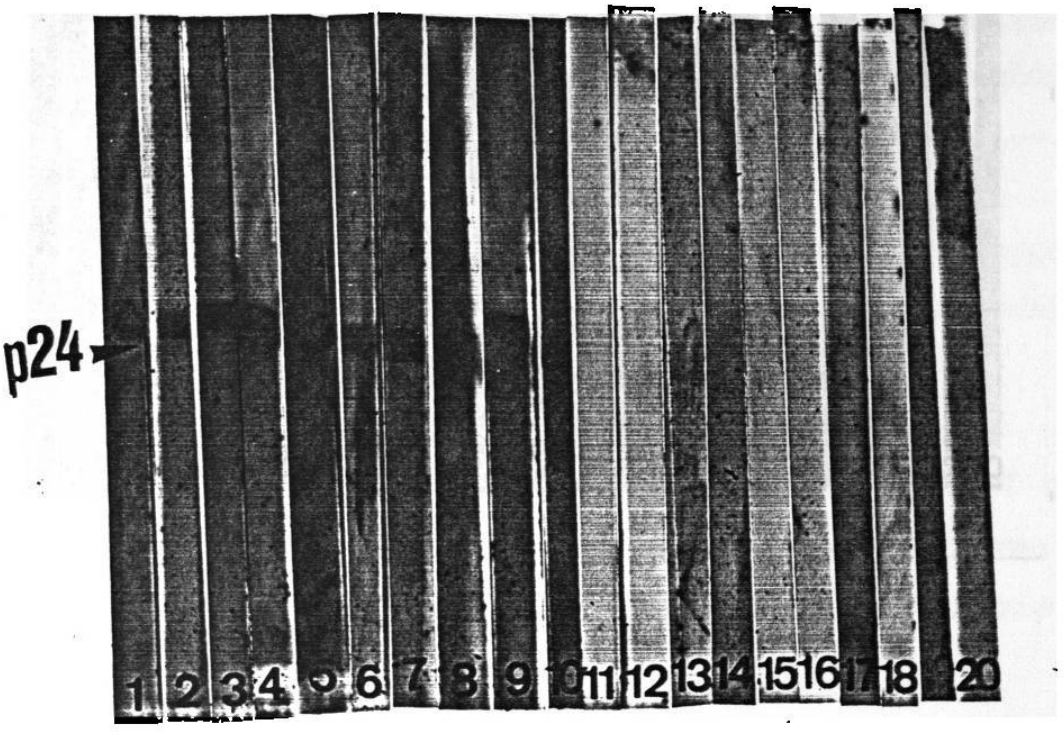

FIG. 15: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS PROBLEMA CONTRA p24 DE *N. brasiliensis* SIN DIGERIR. Tirillas 1 a 10: Reveladas con los sueros M1 al M10 respectivamente; tirillas 11 a 14: Reveladas con los sueros MR1al MR5 respectivamente y tirillas 15 a 18: Reveladas con los sueros SN1al SN5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

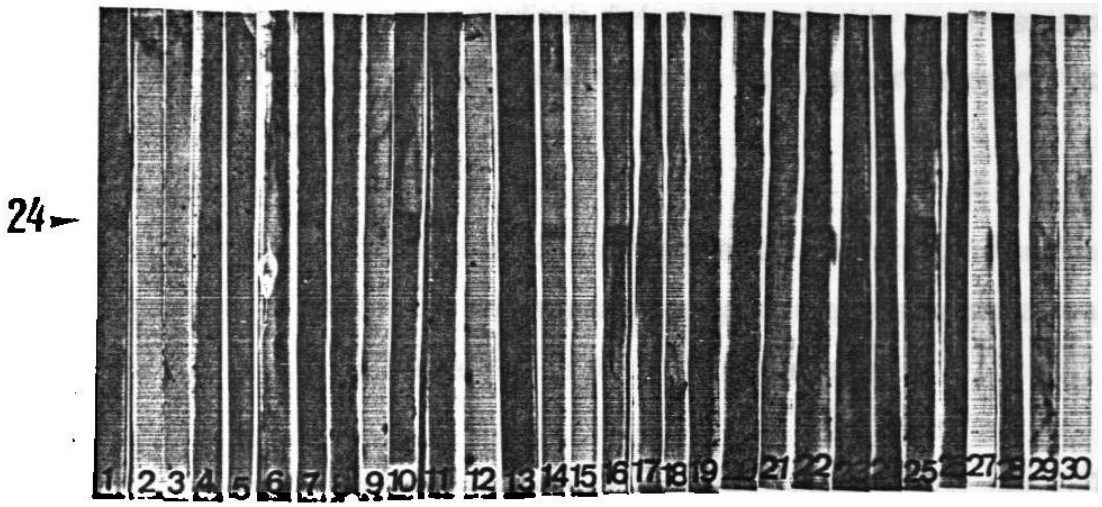

FIG. 16: ANALISIS POR IET DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA ACTIVO POR *N. brasiliensis* CONTRA p24 DE *N. brasiliensis* ANTES Y DESPUES DE DIGERIRSE CON TRIPSINA. Tirillas 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 y 28: p24 sin digerir reveladas con los sueros M1 al M10 respectivamente; tirillas 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 tríptica 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,

reproducible 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 desnaturalizantes 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 desnaturalizantes (clona A4).

En el patrón electroforético del extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes 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 desnaturalizantes. Ambos resultados fueron diferentes a los que presenta p24 en condiciones desnaturalizantes (15 y 41).

Debido a que ninguno de los 3 criterios para identificar p24 se cumplieron con nuestra muestra, decidimos electroeluir en condiciones no desnaturalizantes 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 desnaturalizantes, 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 concluímos que en el extracto semipurificado de *N. brasiliensis* en condiciones no desnaturalizantes existen 3 bandas que corresponden a p24.

Probablemente, estas 3 bandas sean agregados de p24, los cuales al ser sometidos a tratamientos desnaturalizantes (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 tríptica. 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 electroeluído 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.

Para aclarar el origen de estas bandas deberán realizarse estudios posteriores.

Con el fin de determinar si la metodología propuesta para la separación de los fragmentos trípticos 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 trípticos de estas dos proteínas pudimos confirmar que mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie podíamos retener y observar fragmentos trípticos 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 trípticos de p24 geles de poliacrilamida con SDS en gradiente y como sistema de detección la autorradiografía.

La digestión tríptica de p24 produjo dos fragmentos, los cuales se detectaron a los 2 mins de digestión. El fragmento tríptico de mayor peso molecular (FTM) se observó con mayor intensidad a los 2 mins, posteriormente también sufrió digestión tríptica. El segundo fragmento o fragmento tríptico 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.

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 trípticos 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.

Benjamin 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 extructura 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 especificamente 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.

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 tríptica de la proteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* produjo dos fragmentos.

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

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 inmunodominant 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 Maestria 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 131 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. Mahmound. 1984. Tropical and Geografical 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. Sharpeand. 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 polyacrialmide 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 phatogenic fungi and the phatogenic actynomicetes. 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 intracelular 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 outbreack 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. Actynomycetoma 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. Sauceda, J. González and J. Ocampo. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfametoxazole 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. Mycophatology. 70:117-122.

55. Zamora, A., L.F. Bojalil and F. Bastarrachea. 1963. Immunologically active polysacharides 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. Centrífuga eppendorf 5415 (BRINKMANN)
8. Centrífuga J2-21 (BECKMAN)
9. Centrífuga TJ-6 (BECKMAN)
10. Centrífuga Serofuga II (CLAY ADAMS)
11. Columna para cromatografía (WHEATON)
12. Electoelutor Modelo 422 (BIO-RAD)
13. Espectofotómetro 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.)

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. µCi MicroCurie.
8. µg Microgramo.
9. ECD Extracto celular deslipidizado.
10. EDTA Acido etilendiamiotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid).
11. ELISA Ensayo immunoadsorbente 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 Inmunoelectrotransferencia.
21. IgG Inmunoglobulina G.
22. kDa Kilodalton.
23. µl(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.* *Nocardia.*

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` tetrametiletilendiamina.

50. TPCK Tosilfenilclorometilcetona.

51. Tris Tris (hidroximetil) aminometano.

52. U Unidades.

53. v Voltios.

54.v/v Volumen sobre volumen.